

肿瘤抑制因子 TIMP2 在肺癌组织中的表达及其临床意义

吴永凯, 刘永煜

(辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042)

摘要: [目的] 探讨肿瘤抑制因子 TIMP2 在肺癌组织中的表达及其与各临床指标关系。[方法] 采用免疫组织化学染色方法检测 94 例肺癌患者肿瘤组织和相应的正常肺组织中 TIMP2 蛋白的表达水平。[结果] TIMP2 蛋白的免疫组化染色显示主要为细胞浆着色。TIMP2 肺泡阳性表达率为 64.20%, 支气管阳性表达率 63.51%, 肿瘤组织阳性表达率为 30.85%。经统计学分析结果显示 TIMP2 蛋白肿瘤组织内表达水平与周围正常肺泡和支气管表达有明显差异 ($P < 0.001$)。[结论] 肺癌组织中 TIMP2 蛋白水平显著降低, 提示其在肺癌的发生过程中蛋白表达受到显著抑制。

关键词: TIMP2; 肺肿瘤; 肿瘤抑制因子

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)06-0452-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.06.B003

Expression of TIMP2 in Lung Cancer Tissues and Its Significance

WU Yong-kai, LIU Yong-yu

(Liaoning Provincial Tumor Hospital, Shenyang 110042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of TIMP2 in lung cancer tissues and its relationship with clinical characteristics. [Methods] The TIMP2 protein levels in ninety-four tumor tissues and corresponding normal tissues, including squamous cell carcinoma (SCC) 42 cases, lung adenocarcinoma (ADC) 43 cases, small cell lung cancer (SCLC) 7 cases and others 2 cases, were examined by immunohistochemical (IHC). [Results] IHC results showed that positively stained of TIMP2 was 30.85% in tumor tissues, which was significantly lower than that in normal alveoli tissues (64.20%, $P < 0.001$) and normal bronchial (63.51%, $P < 0.001$). [Conclusion] The expression level of TIMP2 protein decreases in lung cancer tissues, which indicates that its expression may be significantly suppressed in lung cancer carcinogenesis.

Subject words: TIMP2; lung neoplasms; tumor suppress gene

根据《2012 年中国肿瘤登记年报》的资料显示, 肺癌已成为我国第一大癌症, 而且确诊时 50% 的患者属于晚期, 导致了不良预后^[1]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 紧密相关, 因此在肿瘤的侵袭和转移过程中扮演着重要角色。而基质金属蛋白酶抑制剂家族 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 通过调节 MMPs 的活性来维持细胞外基质的平衡^[2]。TIMP2 是 TIMPs 家族成员 (共包含 4 个家族成员,

TIMP1~4) 之一, 是 MMP2、MT-MMP1 等的内源性抑制剂, 参与组织损伤后修复和组织器官发育等过程^[3,4]。本研究使用免疫组织化学染色的方法分析肺癌组织中 TIMP2 的蛋白水平与肺癌的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

所有临床组织样品取自 2010 年 3 月至 2011 年 5 月辽宁省肿瘤医院胸部外科收治的肺癌患者共计 94 例。根据世界卫生组织 (WHO) 2004 年的肺癌组

通讯作者: 刘永煜, 主任医师, 硕士; 辽宁省肿瘤医院外科, 辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号 (110042); E-mail: 124315516@sina.com
收稿日期: 2014-04-15

组织学分型标准进行肺癌组织学分型, 根据国际抗癌联盟(UICC)2002年发布的第6版肺癌TNM分期系统进行肺癌分期。所有患者术前均未接受过物理治疗或化学药物治疗。患者男性66例, 女性28例, 中位年龄61岁(41~78岁)。鳞癌42例, 腺癌43例, 小细胞肺癌7例, 其他(支气管内黏液表皮样癌、非典型类癌)2例。I+II期53例, III+IV期41例。低分化37例, 中分化41例, 高分化6例, 无明确分化10例。同一张切片上的支气管和肺泡组织作为正常对照。所有标本采用10%甲醛固定、石蜡包埋组织用于免疫组织化学染色。

1.2 免疫组织化学染色方法

采用SP法, 鼠源TIMP2抗体购自美国R&D公司, 稀释度为1:100, 染色操作程序参照试剂说明书进行。简要步骤如下: 将石蜡切片经二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水; 3% H₂O₂处理15min, 1×PBS洗3次, 每次3min; 羊血清封闭20min; 甩去封闭血清, 加稀释好的一抗, 4℃过夜; 1×PBS洗3次, 生物素标记的二抗, 37℃孵育30min; 1×PBS洗3次, 加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37℃孵育30min; DAB显色, 苏木素复染; 切片经梯度乙醇, 二甲苯脱水, 中性树脂胶封片。以PBS代替一抗作为阴性对照, 显微镜下观察。

TIMP2蛋白在细胞浆着色, 染色强度判断标准^[5]: 无染色=0, 轻度染色(浅黄色)=1, 中度染色(棕黄色)=2, 强染色(黄褐色)=3; 染色面积判断标准: 无细胞染色=0, <25%细胞染色=1, 25%~50%细胞染色=2, >50%细胞染色=3。两种积分相加, 0分为“-”, 1~2分为“+”, 3~4分为“++”, 5~6分为“+++”。进行半定量判断, “++”、“+++”为阳性结果, “-”、“+”为阴性结果。

1.3 统计学处理

采用SPSS 15.0软件进行统计学分析。使用非参数检验Mann-Whitney U Test来比较免疫组织化学染色结果的组间差异。所有比较均为双侧检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TIMP2蛋白在肺癌组织中的表达

肺癌石蜡包埋组织切片染色后, 可分析病例为: 肺癌94例, 正常肺泡81例, 正常支气管74例。

TIMP2蛋白的免疫组化染色显示主要为细胞浆着色。TIMP2肺泡阳性表达率为(52/81)64.20%(Figure 1), 支气管阳性表达率63.51%(47/74)(Figure 2), 肿瘤组织阳性表达率为30.85%(29/94)(Figure 3)。经卡方检验, 显示TIMP2蛋白肿瘤组织内表达水平与周围正常肺泡和支气管表达有明显差异($P<0.001$)。

2.2 TIMP2蛋白与肺癌患者临床病理特征的关系

在低、中、高分化的肺癌组织中TIMP2的阳性率分别为29.73%、34.15%、16.67%, 各组间无显著统计学差异($P=0.269$)。TIMP2在肺癌早期(I+II期)组织中的阳性率为28.30%, 晚期(III+IV期)为34.15%, 两组之间无统计学差异($P=0.603$)。TIMP2在有淋巴结转移的肺癌组织中表达阳性率为32.69%, 无淋巴结转移的肺癌组织中表达阳性率为29.03%, 两者无统计学差异($P=0.842$)。TIMP2在肺鳞癌组织中阳性率为23.81%, 肺腺癌组织中阳性率

Table 1 TIMP2 protein expression level in lung cancer tissues

Factors	N	Expression of TIMP2		P
		Negative	Positive	
Gender				
Male	67	48(71.64%)	19(28.36%)	0.121
Female	27	17(62.96%)	10(37.04%)	
Age(years)				
>60	55	36(65.45%)	19(34.55%)	0.367
≤60	39	29(74.36%)	10(25.64%)	
Smoking history				
Yes	56	41(73.21%)	15(26.79%)	0.200
No	38	24(63.16%)	14(36.84%)	
Histological type				
SCC	42	32(76.19%)	10(23.81%)	0.449
ADC	43	27(62.79%)	16(37.21%)	
SCLC	7	4(57.14%)	3(42.86%)	
Others	2	2(100.00%)	0	
Stage				
I+II	53	38(71.70%)	15(28.30%)	0.603
III+IV	41	27(65.85%)	14(34.15%)	
LNM				
Yes	52	35(67.31%)	17(32.69%)	0.842
No	31	22(70.97%)	9(29.03%)	
Grade				
Poor	37	26(70.27%)	11(29.73%)	0.269
Moderate	41	27(65.85%)	14(34.15%)	
High	6	5(83.33%)	1(16.67%)	
Tumor thrombus				
Yes	7	7(100.00%)	0	0.043
No	80	54(67.50%)	26(32.50%)	

为 37.21%,小细胞肺癌组织中阳性率为 42.86%,各组间无统计学差异($P=0.449$)。TIMP2 在有脉管瘤栓的肺癌组织中阳性率为 0,在无脉管瘤栓的肺癌组织中阳性率为 32.50%,两者有统计学差异 ($P=0.043$)(Table 1)。

3 讨 论

TIMP2 作为活性最强的 MMP-2 内源性抑制因子在肿瘤发生发展过程中的作用和机制也越来越受到关注。Bourboulia 等^[6]在肺腺癌 A549 细胞中的研

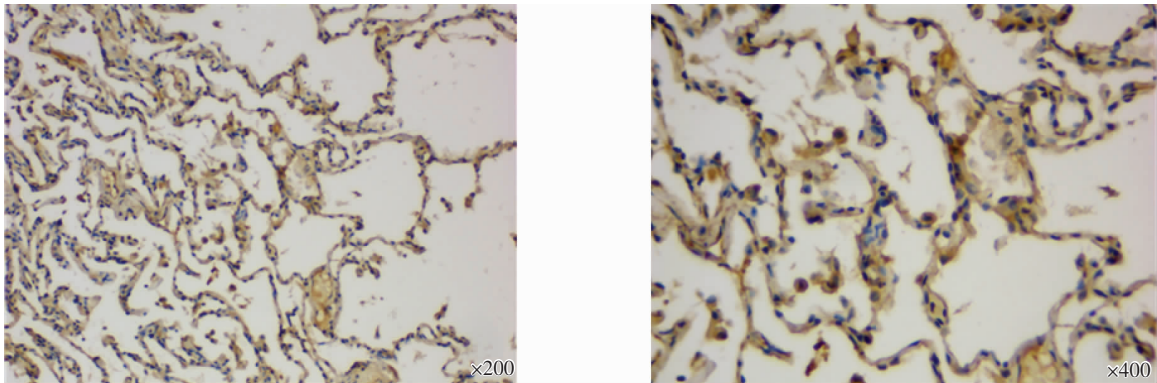


Figure 1 Positive expression of TIMP2 in normal alveolar

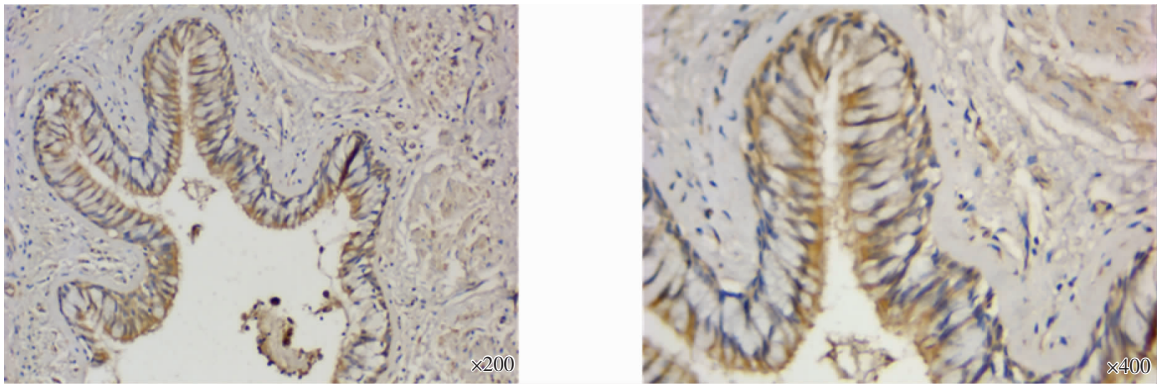


Figure 2 Positive expression of TIMP2 in normal bronchial

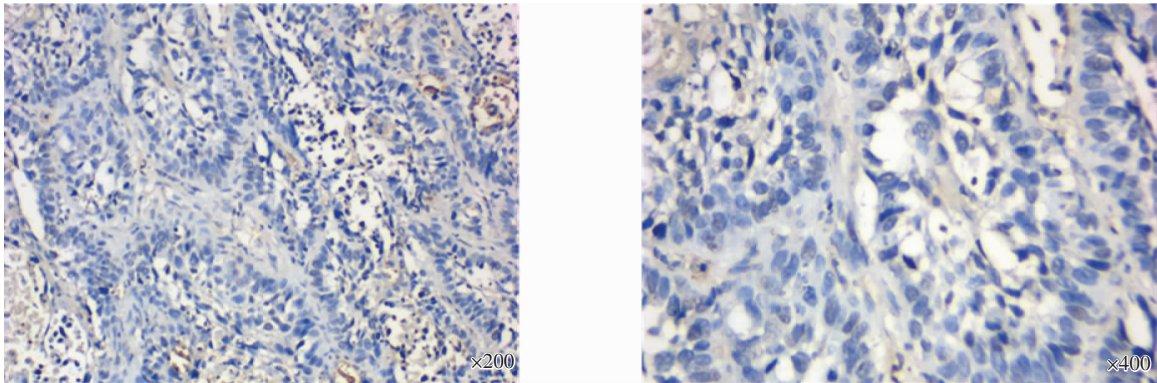


Figure 3 Positive expression of TIMP2 in tumor tissues

究显示,TIMP2 不仅通过与 MMPs 的相互作用来抑制肿瘤的生长,而且可以增强 E-cadherin/beta-catenin 复合物的表达。TIMP2 可以通过特异性结合活化状态的 MMP 并抑制其蛋白酶活性,进而抑制肿瘤的生长和远处转移。TIMP2 的这种生理功能和分子机制在体外实验和动物体内模型中已得到证实,Li 等^[7]应用腺病毒载体感染的方法研究 TIMP2 在肺癌、结肠癌小鼠模型中的作用发现,TIMP2 能明显抑制肿瘤的生长、血管生成和转移,并能延长小鼠的存活期,展示了 TIMP2 基因疗法在肿瘤辅助治疗中的应用前景。

本研究采用免疫组织化学方法在 94 例肺癌手术切除石蜡包埋切片中检测 TIMP2 蛋白的表达,肺癌组织 TIMP2 的表达显著高于肺泡和支气管中 TIMP2 的表达。在癌组织中,染色强度评分 0~1 分共有 65 例(69.1%),2~3 分有 29 例(30.9%),肺泡中深染(2~3 分)有 52 例,占 64.2%,在支气管中深染(2~3 分)有 47 例,占 63.5%。本研究中 TIMP2 的表达同肿瘤 TNM 分期无关,提示其低表达可能出现在肺癌发生的早期阶段。根据 TIMP2 在多种肿瘤中的研究结果显示,它的表达水平与肿瘤发生发展关系存在肿瘤类型和细胞类型(肿瘤细胞或基质细胞)特异性。现有研究发现 TIMP 家族在各种来源的正常组织中都有有一定甚至较高的表达,而 MMP 家族蛋白则在所有的正常组织中都表达很低或基本不表达^[8]。大量实验结果表明,不论是通过遗传多态性检测肿瘤的发病风险还是通过表观遗传机制检测启动子区的甲基化程度都发现 TIMP2 在多种肿瘤组织中表达下调^[9-14]。

本研究中肺癌组织中 TIMP2 的表达同瘤栓的形成有关。瘤栓是在肿瘤的生长过程中,瘤细胞自身形成同聚物,或者与白细胞、血小板形成异聚物。肺癌脉管瘤栓的形成是非小细胞肺癌预后的重要因素,脉管瘤栓在非小细胞肺癌中的发生率大约为 5%~30%。脉管瘤栓在远处转移和肿瘤周围卫星病灶的形成中具有重要的作用,同骨转移密切相关^[15]。本研究同时也探讨肺癌组织中 TIMP2 蛋白水平同年龄、性别、肺癌类型、分化、淋巴结转移、患者吸烟史的关系,经过统计分析,TIMP2 蛋白水平同上述因素无关。

综上所述,TIMP2 作为肿瘤抑制因子在肺癌组

织中的蛋白水平显著降低,并有可能发生在肿瘤的早期阶段,为肺癌的基因治疗提供新的治疗靶点。

参考文献:

- [1] He J, Chen WQ. 2012 Chinese cancer registry annual report[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2012. [赫捷, 陈万青. 2012 年中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012.]
- [2] Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer[J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2245-2252.
- [3] Batra J, Soares AS, Mehner C, et al. Matrix metalloproteinase-10/TIMP-2 structure and analyses define conserved core interactions and diverse exosite interactions in MMP/TIMP complexes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75836.
- [4] Niarakis A, Giannopoulou E, Ravazoula P, et al. Detection of a latent soluble form of membrane type 1 matrix metalloproteinase bound with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in periprosthetic tissues and fluids from loose arthroplasty endoprostheses[J]. *FEBS J*, 2013, 280(24): 6541-6555.
- [5] Li M, Xiao T, Zhang Y, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 levels in peripheral plasma and tumour tissues of lung cancer patients[J]. *Lung Cancer*, 2010, 69(3): 341-347.
- [6] Bourboulia D, Han H, Jensen-Taubman S, et al. TIMP-2 modulates cancer cell transcriptional profile and enhances E-cadherin/beta-catenin complex expression in A549 lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2013, 4(1): 166-176.
- [7] Li H, Lindenmeyer F, Grenet C, et al. TIMP2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice[J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12(5): 515-526.
- [8] Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, et al. Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development[J]. *FEBS Lett*, 2004, 563(1-3): 129-134.
- [9] Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, et al. Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP2 gene in cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2004, 108(6): 882-886.
- [10] Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, et al. Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies[J]. *Oncogene*, 2005, 24(30): 4799-4805.
- [11] Kubben FJ, Sier CF, Meijer MJ, et al. Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer[J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(6): 744-751.
- [12] Pulkuri SM, Patibandla S, Patel J, et al. Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP2) gene in human prostate tumors[J]. *Oncogene*, 2007, 26(36): 5229-5237.
- [13] Vairaktaris E, Yapijakis C, Yiannopoulos A, et al. Strong association of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 polymorphism with an increased risk of oral squamous cell carcinoma in Europeans[J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(4): 963-968.
- [14] Yang L, Gu HJ, Zhu HJ, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 G-418C polymorphism is associated with an increased risk of gastric cancer in a Chinese population[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34(6): 636-641.
- [15] Suemitsu R, Yoshino I, Tomiyasu M, et al. Serum tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Surg Today*, 2004, 34: 896-901.