

· 论 著 ·

Hepsin、MMP-7、CD147 与三阴性乳腺癌微血管密度的相关性分析

聂 琰¹, 谭 博²

(1. 中国人民解放军陆军第八十二集团军医院血液内分泌科肿瘤血液病区, 河北保定 071000;

2. 河北省保定市第一医院内分泌科, 河北保定 071000)

摘要:目的 探讨 Hepsin、基质金属蛋白酶-7(MMP-7)、CD147 与三阴性乳腺癌(TNBC)微血管密度(MVD)的相关性。方法 选取 2015 年 5 月至 2018 年 1 月中国人民解放军陆军第八十二集团军医院收治的 86 例 TNBC 患者组织标本作为 TNBC 组, 另选取同期中国人民解放军陆军第八十二集团军医院收治的 80 例非 TNBC 患者组织标本作为非 TNBC 组。比较两组 Hepsin、MMP-7、CD147 表达情况及 MVD, 并进行 Pearson 相关性分析。结果 TNBC 组 Hepsin、MMP-7、CD147 阳性表达率均明显高于非 TNBC 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Hepsin、MMP-7、CD147 表达、MVD 值与年龄、肿瘤直径、病理类型均无关($P > 0.05$); 与月经情况、临床分期、组织学分级、淋巴结转移有关($P < 0.05$)。TNBC 组织 Hepsin、MMP-7、CD147 同时阳性表达的 MVD 值均明显高于 Hepsin、MMP-7 及 CD147 单独阳性表达的 MVD 值, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。经 Pearson 相关性分析显示, TNBC 组织 Hepsin、MMP-7、CD147 阳性表达与 MVD 值均呈正相关($P < 0.05$)。结论 Hepsin、MMP-7、CD147 阳性表达与 TNBC 组织的 MVD 值均呈正相关, 三者可能均与 TNBC 的高侵袭性有密切关系。

关键词:Hepsin; 基质金属蛋白酶-7; CD147; 三阴性乳腺癌; 微血管密度**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.15.016**中图法分类号:**R737.9**文章编号:**1673-4130(2020)15-1863-05**文献标识码:**A

Correlation between Hepsin, MMP-7, CD147 and microvessel density in triple-negative breast cancer

NIE Yan¹, TAN Bo²

(1. Department of Hematology and Endocrinology, the 82nd Army Hospital of Chinese People's Liberation Army, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Department of Endocrinology, the First Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between Hepsin, matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), CD147 and microvessel density (MVD) in triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods** From May 2015 to January 2018, the specimens of 86 TNBC patients in the 82nd Army Hospital of Chinese People's Liberation Army were selected as TNBC group. The specimens of 80 non-TNBC patients in the same period were selected as non-TNBC group. The expression of Hepsin, MMP-7, CD147 and MVD were compared between the two groups and the Pearson correlation analysis was conducted. **Results** The positive expression rates of Hepsin, MMP-7, CD147 in TNBC group were significantly higher than those in non-TNBC group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of Hepsin, MMP-7, CD147 and MVD were not related to age, tumor diameter and pathological type ($P > 0.05$), but related to menstruation, clinical stage, histological grade and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The MVD of positive expression of combination of Hepsin, MMP-7, CD147 in TNBC tissues were significantly higher than those of positive expression of single Hepsin, MMP-7, CD147, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). By Pearson correlation analysis, the positive expression of Hepsin, MMP-7, CD147 in TNBC tissues was positively correlated with MVD ($P < 0.05$). **Conclusion** The positive expression of Hepsin, MMP-7, CD147 is positively correlated with the MVD of TNBC tissues, which may be closely related to the high invasiveness of TNBC.

Key words:Hepsin; matrix metalloproteinase-7; CD147; triple negative breast cancer; microvessel**作者简介:**聂琰,女,主治医师,主要从事恶性肿瘤治疗方面的研究。**本文引用格式:**聂琰,谭博. Hepsin、MMP-7、CD147 与三阴性乳腺癌微血管密度的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(15): 1863-1867.

density

三阴性乳腺癌(TNBC)是乳腺癌的一种特殊亚型,是指雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体2(HER-2)均为阴性的乳腺癌,其好发于年轻女性,细胞分化差,具有高侵袭性、易复发和远处转移等特点,预后较差^[1]。Hepsin是一种Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶,具有多种生理功能,如降解细胞外基质、介导细胞间黏附、细胞的跨膜信号传导等^[2]。有研究表明,Hepsin与浸润性乳腺癌有密切关系^[3]。基质金属蛋白酶-7(MMP-7)是基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员之一,可由巨噬细胞、纤维母细胞、肿瘤细胞分泌,可降解基底膜成分,参与炎症、血管新生、肿瘤转移等^[4]。CD147是一种表达于肿瘤细胞表面的黏附分子,可诱导肿瘤细胞释放MMP,降解基质和基底膜,从而促进肿瘤细胞的浸润和转移^[5-7]。本研究探讨Hepsin、MMP-7、CD147与TNBC微血管密度(MVD)的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2015年5月至2018年1月中国人民解放军陆军第八十二集团军医院收治的86例TNBC患者组织标本作为TNBC组,年龄25~82岁,平均(55.36±6.47)岁。纳入标准:经免疫组织化学检查ER、PR、HER-2均为阴性;对免疫组织化学检查HER-2为(+)或(++)的患者进一步进行FISH检测,结果为阴性;术前均未进行抗肿瘤治疗;均无远处转移。本研究经中国人民解放军陆军第八十二集团军医院伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。另选取同期中国人民解放军陆军第八十二集团军医院收治的80例非TNBC患者组织标本作为非TNBC组,年龄27~81岁,平均(55.02±7.14)岁。纳入标准:术前均未进行抗肿瘤治疗;均无远处转移。

1.2 试剂与仪器 采用常规HE染色和免疫组织化学染色。Hepsin兔抗人单克隆抗体(批号ab18256、ab31148)、MMP-7兔抗人单克隆抗体(批号ab207299)、CD147兔抗人单克隆抗体(批号ab188190、ab212057)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;二抗(生物素标记羊抗兔)来自武汉博士德生物工程有限公司(批号ab207995)。德国Microm公司El-350-2石蜡包埋机,德国Leica公司RM2135切片机,日本Olympus公司BM51型倒置显微镜。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色及结果判定 免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)二步法:标本先经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,再用4%中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,乙醇脱水,4 μm切片,再脱蜡水化,用枸橼酸液高温高压修复抗原。每张切片滴

加过氧化物酶后于37℃孵育10 min,后滴加山羊血清封闭;然后滴加一抗,4℃孵育过夜,PBS冲洗后滴加二抗,37℃孵育30 min,PBS冲洗后加入生物素-过氧化物酶溶液,37℃孵育20 min,用鲜二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染。最后用中性树胶封片,于显微镜下观察。用PBS代替一抗作为阴性对照。

Hepsin是细胞膜出现黄色至棕褐色颗粒为阳性表达,MMP-7是细胞质出现棕色或棕黄色颗粒为阳性表达,CD147是细胞膜和细胞质出现黄色或棕黄色颗粒为阳性表达。在高倍镜下,每张切片随机选取5个视野进行观察,先根据染色强度评分:无色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分;然后根据阳性细胞数所占百分比评分:阳性细胞数0%计0分,>0%~25%计1分,>25%~50%计2分,>50%~75%计3分,>75%计4分;最后根据染色强度与阳性细胞数评分乘积判断阳性等级:0分为阴性(-),>0~3分为弱阳性(+),>3~5分为中阳性(++),>5分为强阳性(+++).切片由2位病理科医生采用双盲法评分,取2次结果的平均值作为最终结果。

1.3.2 MVD值 根据Weidner法,血管内皮细胞可被CD34抗体染成棕黄色,可与周围血管、肿瘤细胞和其他结缔组织分开的内皮细胞或内皮细胞簇,作为一个微血管;只要结构不连续,分枝结构也可作为一个血管。先在低倍(×100)视野下寻找肿瘤组织间质微血管密集处,然后在高倍(×400)视野下计数5个视野的微血管数,取其平均值作为MVD值。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0统计软件进行数据分析处理。3组及以上组间均数比较采用方差分析(F检验),进一步两两比较采用SNK-q检验;计数资料以例数或百分率表示,采用χ²检验;相关性采用Pearson相关分析。检验水准α=0.05,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

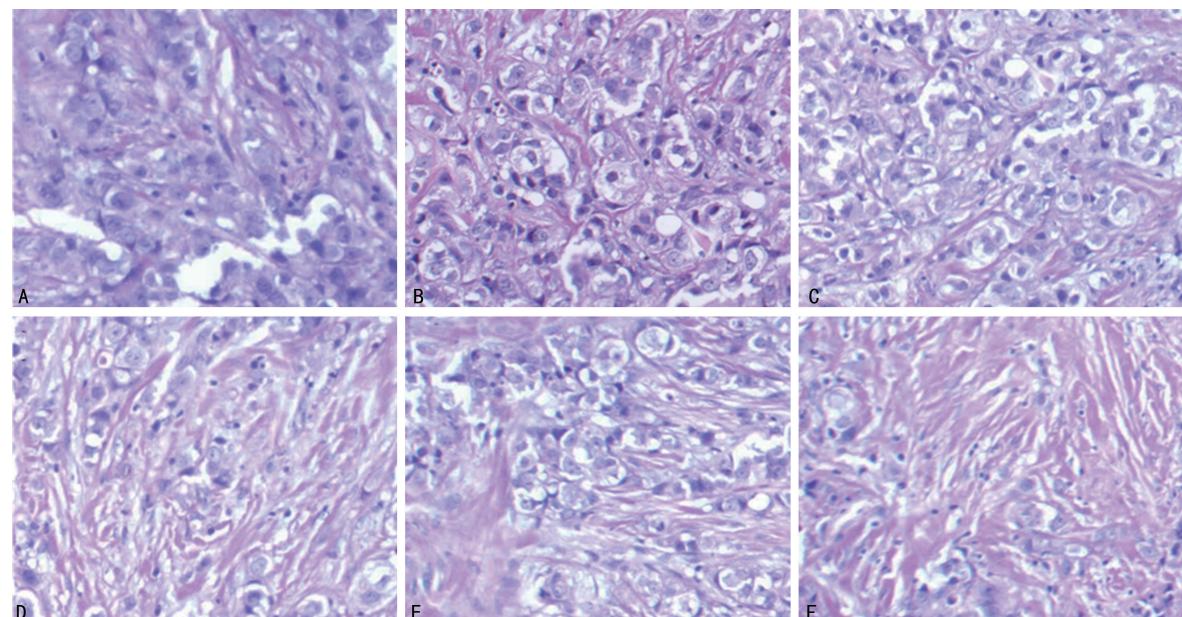
2.1 两组Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达率比较 TNBC组Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达率均明显高于非TNBC组,差异均有统计学意义(P<0.05)。见表1、图1。

表1 两组Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达率比较[n(%)]

组别	n	Hepsin	MMP-7	CD147
TNBC组	86	59(68.6)	64(74.4)	52(60.5)
非TNBC组	80	28(35.0)	43(53.8)	24(30.0)
t		18.765	7.728	15.496
P		<0.001	0.012	<0.001

2.2 Hepsin、MMP-7、CD147 表达及 MVD 值与 TNBC 临床病理因素的关系

Hepsin、MMP-7、CD147 表达及 MVD 值与年龄、肿瘤直径、病理类型



注: A 为 Hepsin 在 TNBC 中高强度表达(+++), 细胞膜着色(DAB 染色, $\times 400$); B 为 MMP-7 在 TNBC 中高强度表达(+++), 细胞质着色(DAB 染色, $\times 400$); C 为 CD147 在 TNBC 中强度表达(++) , 细胞膜和细胞质着色(DAB 染色, $\times 400$); D 为 Hepsin 在非 TNBC 中弱强度表达(+), 细胞膜着色(DAB 染色, $\times 400$); E 为 MMP-7 在非 TNBC 中强度表达(++) , 细胞膜着色(DAB 染色, $\times 400$); F 为 CD147 在非 TNBC 中弱强度表达(+), 细胞膜着色(DAB 染色, $\times 400$)。

图 1 两组 Hepsin、MMP-7、CD147 阳性表达情况比较

表 2 TNBC 组 Hepsin、MMP-7、CD147 表达及 MVD 值与 TNBC 临床病理因素的关系

项目	n	Hepsin 阳性[n(%)]	MMP-7 阳性[n(%)]	CD147 阳性[n(%)]	MVD 值($\bar{x} \pm s$)
年龄(岁)					
<55	45	30(66.7)	34(75.6)	28(62.2)	162.08±15.26
≥55	41	29(70.7)	30(73.2)	24(58.5)	163.31±16.04
月经情况					
绝经前	61	49(80.3)*	52(85.2)*	46(75.4)*	181.27±17.64*
绝经后	25	10(40.0)	12(48.0)	6(24.0)	160.75±14.29
肿瘤直径(cm)					
<2	31	21(67.7)	23(74.2)	20(64.5)	161.25±14.97
≥2	55	38(69.1)	41(74.5)	32(58.2)	160.73±15.38
临床分期					
I + II 期	70	45(64.3)	49(70.0)	39(55.7)	163.79±15.56
III 期	16	14(87.5)*	15(93.8)*	13(81.2)*	182.16±16.17*
组织学分级					
I 级	19	8(42.1)	9(47.4)	7(36.8)	162.28±14.49
II 级	26	14(53.8)	16(61.5)	12(46.2)	169.14±14.77
III 级	41	37(90.2)*	39(95.1)*	33(80.5)*	180.56±15.52*
病理类型					
浸润性导管癌	73	50(68.5)	54(74.0)	44(60.3)	163.05±16.29
其他	13	9(69.2)	10(76.9)	8(61.5)	162.86±16.14

续表2 TNBC组Hepsin、MMP-7、CD147表达及MVD值与TNBC临床病理因素的关系

项目	n	Hepsin阳性[n(%)]	MMP-7阳性[n(%)]	CD147阳性[n(%)]	MVD值($\bar{x} \pm s$)
淋巴结转移					
有	38	32(84.2) [*]	35(92.1) [*]	31(81.6) [*]	179.95±14.26 [*]
无	48	27(56.2)	29(60.4)	21(43.8)	164.38±14.03

注:与同一项目另外组比较,^{*}P<0.05。

2.3 TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达的MVD值比较 TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147同时阳性表达的MVD值均明显高于Hepsin、MMP-7及CD147单独阳性表达的MVD值,差异均有统计学意义(P<0.05)。见表3。

表3 TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达的MVD值比较

指标	阳性例数(n)	MVD值($\bar{x} \pm s$)
Hepsin	59	178.21±16.03
MMP-7	64	180.13±15.48
CD147	52	175.94±15.27
Hepsin、MMP-7、CD147	41	183.76±16.42
F		6.128
P		<0.001

2.4 TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147表达与MVD值的相关性分析 经Pearson相关性分析显示,TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达与MVD值均呈正相关(P<0.05)。见表4。

表4 TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147表达与MVD值的相关性分析

指标	r	P
Hepsin	0.614	<0.001
MMP-7	0.672	<0.001
CD147	0.563	<0.001

3 讨 论

Hepsin基因最早是从人肝脏和肝癌细胞的cDNA文库中克隆确定,Hepsin蛋白是一种Ⅱ型跨膜丝氨酸蛋白酶,参与多种重要的生理反应过程^[3]。KICRHOFER等^[8]研究表明,Hepsin可将单链肝细胞生长因子(HGF)激活为有生物活性的双链HGF,HGF能降解肿瘤组织周围的基质,促进癌细胞侵袭。

MMPs是可以降解细胞外基底膜基质的一类高度保守蛋白水解酶,MMP-7是其中相对分子质量最小的成员,可在多种正常细胞和肿瘤细胞上表达^[9]。MMP-7可通过灭活α-抗胰蛋白酶,活化MMPs其他成员(如MMP-2、MMP-9),降解IV型胶原、蛋白聚糖、

纤粘连蛋白及层粘连蛋白,促进肿瘤细胞突破基底膜屏障,向周围组织浸润、转移^[10];MMP-7还能促进多种调节血管生长因子的合成和释放,如血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子受体1等^[11]。

CD147又称细胞外基质金属蛋白酶诱导因子,属于免疫球蛋白超家族成员,是一种高度糖基化的跨膜蛋白^[12]。CD147广泛表达于人体多种正常细胞,而在恶性肿瘤细胞中表达明显升高,其在肿瘤浸润、转移及血管生成中发挥重要作用^[13]。李欢等^[14]研究表明,在乳腺癌细胞中,CD147抗体水平升高,MMP-7蛋白阳性表达率降低,CD147抗体可抑制癌细胞MMP-7蛋白表达。

肿瘤的生长、转移及预后对血管生成有依赖性。MVD是检测肿瘤血管生成的一项客观指标^[15]。CD31广泛分布于血管内皮细胞,可作为MVD的定量指标,具有较高的特异度和灵敏度^[16]。

本研究结果表明,TNBC组Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达率均明显高于非TNBC组,差异均有统计学意义(P<0.05)。Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达率在TNBC组织中均明显提高,并参与TNBC的发病过程。本研究还表明,Hepsin、MMP-7、CD147表达及MVD值与年龄、肿瘤直径、病理类型均无关(P>0.05);与月经情况、临床分期、组织学分级、淋巴结转移均有关(P<0.05)。提示TNBC恶化程度越严重,Hepsin、MMP-7、CD147阳性表达率越高。相关研究表明,Hepsin蛋白与乳腺癌浸润性导管癌的临床分期呈正相关,与组织分化程度呈负相关^[17];MMP-7作为MMPs家族成员之一,在多种肿瘤细胞中均有较高表达,有研究结果显示,MMP-7可促进乳腺癌的血管生成^[18]。另外,有研究显示,CD147基因沉默可以抑制TNBC细胞的增殖和迁移^[19]。因此,本研究结果与已经发表的相关研究结果结论基本一致,提示Hepsin、MMP-7、CD147三者均参与了TNBC的发生、发展及肿瘤细胞的侵袭和转移,但鲜有相关研究表明三者之间的关系。本研究针对此做了进一步深入研究。

本研究结果表明,TNBC组织Hepsin、MMP-7、CD147同时阳性表达的MVD值均明显高于Hepsin、MMP-7及CD147单独阳性表达的MVD值,差异均有统计学意义(P<0.05)。说明当Hepsin、MMP-7、CD147同时为阳性表达时,MVD值最高,提示Hep-

sin、MMP-7 及 CD147 三者参与了 TNBC 的侵袭和转移，并且可能存在协同作用，可加剧 TNBC 的侵袭性。分析 Hepsin、MMP-7 及 CD147 之间的关系可能是 Hepsin 在肿瘤细胞中表达后可通过降解细胞外基质、介导细胞间黏附、细胞的跨膜信号传导等多种途径参与肿瘤细胞的侵袭和转移；MMP-7 通过降解细胞外基质，促进和调节血管生长因子的合成和释放，直接和间接促进肿瘤新生血管形成；CD147 则通过诱导 MMPs 家族多个成员的表达，参与肿瘤的浸润、转移及血管生成。

Pearson 相关分析表明，TNBC 组织 Hepsin、MMP-7、CD147 阳性表达与 MVD 值均呈正相关 ($P < 0.05$)，提示 Hepsin、MMP-7、CD147 三者可能在 TNBC 肿瘤细胞发生、发展及转移中相互影响，相互作用。分析其可能原因：CD147 在肿瘤细胞中的高表达可诱导 MMP-7 基因的高转录和高表达，导致肿瘤组织中 MMP-7 蛋白水平和活性明显提高；Hepsin 可促进 HGF 的活化；MMP-7 和 HGF 的大量合成可促进间质成分和细胞基底膜的胶原蛋白过度降解，以及肿瘤细胞间的黏附作用消失，导致肿瘤细胞的侵袭和转移能力增强。因此，Hepsin、MMP-7、CD147 之间的关系可能是 CD147 和 Hepsin 通过诱导 MMP-7、HGF 的表达，降解细胞外基质，促进血管生长因子释放，直接或间接促进肿瘤新生血管形成，导致肿瘤侵袭和转移。

4 结 论

本研究为 TNBC 肿瘤细胞具有分化差、高侵袭性、易复发和远处转移等的作用机制提供了研究基础，为 TNBC 的靶向治疗提供了参考依据。Hepsin、MMP-7、CD147 阳性表达均与 TNBC 组织的 MVD 值呈正相关，三者可能均与 TNBC 的高侵袭性有密切关系。

参 考 文 献

- [1] 范东伟, 姚昌洋, 姚廷敬. 三阴性乳腺癌的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(1): 71-75.
- [2] EL-REBEYA H S, KANDILA M A, SAMAKAA R M, et al. The role of hepsin in endometrial carcinoma[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2017, 25(9): 624-631.
- [3] 肖芹, 范钦和, 顾学文. 浸润性乳腺癌中 Hepsin 和 c-Met 的表达及临床病理意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2008, 24(1): 37-39.
- [4] 吴宝萍, 刘亚静, 王小兰. 锌指蛋白 139 及基质金属蛋白酶 7 在子宫内膜腺癌中的表达及意义[J]. 中国综合临床, 2017, 33(3): 254-258.
- [5] 吴雪峰, 孙洪帅, 李晓鸥, 等. CD147 在多种肿瘤患者血清中的表达及其临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(10): 1760-1761.
- [6] 周晔明, 张凤春, 郭政东, 等. 三阴乳腺癌发病机制的研究进展[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(12): 2814-2816.
- [7] PURRINGTON K S, VISSCHER D W, WANG C, et al. Genes associated with histopathologic features of triple negative breast tumors predict molecular subtypes[J]. Breast Cancer Res Treat, 2016, 157(1): 117-131.
- [8] KICRHOFER D, PEEK M, LIPARI M T, et al. Hepsin activates prohepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2[J]. FEBS Lett, 2005, 579(9): 1945-1950.
- [9] NIU J, LI X M, WANG X, et al. DKK1 inhibits breast cancer cell migration and invasion through suppression of β -catenin/MMP7 signaling pathway[J]. Cancer Cell Int, 2019, 24(19): 168-172.
- [10] 刘辉, 吕丽琼, 莫小勤, 等. MMP-2、MMP-7、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(16): 3046-3048.
- [11] 张伟, 张飞燕, 李芳, 等. VEGF、MMP-7 在乳腺导管原位癌、浸润性导管癌中的表达及相互关系[J]. 河北医科大学学报, 2012, 33(8): 914.
- [12] 张玉扬, 张丹, 孙丽丽, 等. 老年三阴乳腺癌组织中 MMP-9 和 CD147 的表达及意义[J]. 中国老年学, 2017, 37(13): 215-217.
- [13] 叶辉, 徐明, 叶曼娜, 等. CD147 在浸润性乳腺癌分子亚型中的表达与临床意义[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(4): 518-522.
- [14] 李欢, 马立人. CD147 抗体诱导乳腺癌细胞中 MMP-7 蛋白的表达及意义[J]. 河北联合大学学报(医学版), 2009, 11(5): 635-636.
- [15] KIM J Y, KIM S H, KIM Y J, et al. Enhancement parameters on dynamic contrast enhanced breast MRI: do they correlate with prognostic factors and subtypes of breast cancers[J]. Magn Reson Imaging, 2015, 33(1): 72-80.
- [16] CHAWLA N, KATARIA S P, AGGARWAL K, et al. Significance of vascular endothelial growth factor and CD31 and morphometric analysis of microvessel density by CD31 receptor expression as an adjuvant tool in diagnosis of psoriatic lesions of skin[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2017, 60(2): 189-195.
- [17] 何川, 桃丽, 孙根, 等. 乳腺浸润性导管癌中 Hepsin 的表达及临床病理意义[J]. 实用肿瘤学杂志, 2014, 28(3): 213-216.
- [18] 段筱娟, 李志义, 杨玉涛, 等. 乳腺癌中 MMP-7 的表达与微血管密度的相关性研究[J]. 贵州医药, 2015, 39(9): 838-840.
- [19] 汪成, 庄志刚, 单鸣, 等. CD147 基因沉默抑制三阴性乳腺癌细胞增殖的作用机制[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(3): 305-311.