

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.05.026

• 临床研究 •

肝癌组织中FMNL-2和MMP-2的表达及临床病理分析



罗 佳¹, 章敬成¹, 刘繁荣^{1,2}, 吴冬梅¹, 廖首生¹, 杨宇晴¹

Expression of FMNL-2 and MMP-2 in Primary Hepatocellular Carcinoma and Its Clinicopathological Characteristics

LUO Jia¹,ZHANG Jingcheng¹,LIU Fanrong^{1,2},WU Dongmei¹,LIAO Shousheng¹,YANG Yuqing¹

1.Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2.Department of Pathology, Medical College of Nanchang University
Corresponding Author:LIU Fanrong,E-mail:liufanrong@163.com

Abstract:Objective To invesstigate the expression of FMNL-2 and MMP-2 in hepatocellular carcinoma (HCC) and the adjacent tissues, and to detect their relationship with the clinicopathological features. **Methods** The protein expression of FMNL-2 and MMP-2 were detected by immunohistochemistry MaxvisionTM method in the cancer tissues and adjacent tissues from 100 patients. Integrated optical density (IOD) of immunohistochemical image was estimated by Image-ProPlus 6.0 software. Statistical analysis was performed by SPSS19.0 software. **Results** IOD of FMNL-2 between cancer tissues and adjacent tissues were (90 748.36±46 276.91) and (39075.46±24763.12);IOD of MMP-2 between cancer tissues and adjacent tissues were (87 969.46±27 131.77) and (59 517.72±20 218.23) ($P<0.05$); IOD of FMNL-2 between cirrhosis of liver tissue and non-cirrhosis liver tissue were (47 471.96±40 273.54) and (72 123.41±45 517.93), respectively ($P<0.05$); IOD of MMP-2 between HBsAg positive and negative group were (77 668.34±27 682.79) and (64 585.83±26173.62),respectively ($P<0.05$),IOD of MMP-2 between metastasis and without metastasis group were(63 854.73±21 730.42) and (77 218.05±28 930.01)($P<0.05$),FMNL-2 expression was positively correlated to that of MMP-2 in cancer tissues and adjacent tissues ($r=0.240$, $P=0.016$). **Conclusion** FMNL-2 and MMP-2 proteins are abnormally expressed in hepatocellular carcinoma, indicating that detection of FMNL-2 and MMP-2 proteins may be helpful for diagnosis of hepatocellular carcinoma.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Formin-like 2(FMNL-2); Matrix metalloproteinase-2

摘 要: 目的 探讨肝癌及癌旁组织中FMNL-2和MMP-2的蛋白表达及与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组织化学MaxvisionTM法检测100例肝癌及癌旁组织中FMNL-2和MMP-2的蛋白表达情况, 应用图文分析软件Image-Pro Plus6.0测定FMNL-2和MMP-2的蛋白累积吸光度值 (IOD), 采用SPSS19.0软件统计分析。**结果** 肝癌及癌旁组织中FMNL-2蛋白IOD值分别为(90 748.36±46 276.91)和(39 075.46±24 763.12), MMP-2蛋白IOD值分别为 (87 969.46±27 131.77) 和 (59 517.72±20 218.23), 两组差异均有统计学意义 ($P<0.05$); FMNL-2在伴与不伴肝硬化组中IOD值分别为 (47 471.96±40 273.54) 和 (72 123.41±45 517.93) ($P<0.05$); MMP-2在HBsAg阳性或阴性组中IOD值分别为 (77 668.34±27 682.79) 和 (64 585.83±26 173.62) ($P<0.05$), 在有无转移组中IOD值分别为 (63 854.73±21 730.42) 和 (77 218.05±28 930.01) ($P<0.05$), 差异有统计学意义; 并且肝癌及癌旁组织中FMNL-2和MMP-2蛋白表达呈正相关 ($r=0.240$, $P=0.016$)。**结论** 在肝癌发生、发展过程中存在FMNL-2和MMP-2蛋白异常表达, 联合监测两者蛋白表达可能会有助于肝癌的诊断。

关键词: 肝细胞癌; 成蛋白相关蛋白2(FMNL-2); 基质金属蛋白酶-2

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-04-02; 修回日期: 2013-07-18
基金项目: 江西省教育厅科技计划资助项目 (20100611);
江西省科技支撑计划重点项目 (2010BSA13100)
作者单位: 1.330006 南昌, 南昌大学第二附属医院病理科; 2.南昌大学医学院病理教研室
通信作者: 刘繁荣, E-mail: liufanrong@163.com
作者简介: 罗佳(1985 -), 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤病理学的研究

0 引言

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma,HCC) 是常见的恶性肿瘤之一, 其发病率仅次于肺癌, 约占国内全部癌症发病率的10%, 且有逐年上升的趋势^[1]。原发性肝癌术后复发转移率居高不下, 预后不理想, 5年生存率仅为20%~30%^[2]。因此, 研

究HCC相关基因用以筛选理想的肿瘤标志物，探讨HCC的发病机制并应用于肿瘤的临床治疗具有重要的意义。

Formins蛋白家族的FMNL-2(formin-like 2)是细胞骨架重塑的关键调控因子，在胃癌、乳腺癌及结直肠癌等多种肿瘤组织中存在表达^[3-4]，与肿瘤的侵袭与转移密切相关。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPS)能够降解细胞外基质(extracellular cell matrix,ECM)中各种蛋白成分，通过破坏组织学屏障而影响肿瘤细胞的侵袭和转移。本研究采用免疫组织化学Maxvision™法检测FMNL-2及MMP-2(matrix metalloproteinase-2)在肝癌及癌旁组织中的表达及相关性，初步探讨两种基因在肝癌发病机制中的意义。

1 资料与方法

1.1 标本

收集南昌大学第二附属医院病理科2007年—2011年肝癌石蜡标本100例，所有患者术前均未行化疗或放疗。其中男74例，女26例，年龄17~76岁，平均51.1岁；AFP阳性68例，阴性32例；HBsAg阳性70例，阴性30例；巨块型34例，结节型66例；伴肝硬化30例；有淋巴转移26例。所有标本均取癌及癌旁组织（距肿块边缘≥5 cm处肝组织），HE切片染色及免疫组织化学染色分析高分化21例，中分化39例，低分化40例。全部病例均经病理证实为肝细胞肝癌。

1.2 材料

鼠抗人FMNL-2单克隆抗体（1:50）购自Abnova公司，鼠抗人MMP-2（即用型）单克隆抗体、免疫组织化学染色试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法

采用免疫组织化学染色Maxvision™法分别检测100例肝癌及癌旁组织中FMNL-2和MMP-2的表达，操作步骤按试剂盒说明进行，DAB显色，苏木精对比染色。用PBS代替一抗作阴性对照，已知阳性标本切片作阳性对照。

1.4 结果判定

FMNL-2和MMP-2蛋白免疫组织化学染色阳性表达定位于细胞质，呈棕黄或棕褐色颗粒，多为弥漫性分布。采用图文分析软件IPP6.0，400倍光学显微镜下选取相同条件（光源、亮度色彩饱和度、增益对比）的5个随机视野区进行拍摄。所得图片采用累积吸光度（IOD）测试指标进行定量分析。

1.5 统计学方法

应用SPSS19.0统计软件包进行分析，各组数据以($\bar{x}\pm s$)表示，数据分析采用t检验及Pearson Correlation相关性分析。所有检验均为双侧概率检验，检验水准为 $\alpha = 0.05$ ，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FMNL-2的表达

FMNL-2阳性表达定位于细胞质，呈棕色颗粒分布，癌组内多为灶性及弥漫性；癌旁组以弥漫性为主。FMNL-2在肝癌组织中呈高表达，IOD为（90 748.36±46 276.91）；在癌旁组织中呈低表达，IOD为（39 075.46±24 763.12），两组间差异有统计学意义（ $t=10.509$ ， $P<0.05$ ），见图A1、B1。FMNL-2在阴性对照组中无表达。

2.2 MMP-2的表达

MMP-2阳性表达为棕褐色或棕黄色，大多数呈现弥漫性分布，定位于细胞质，少数细胞膜有阳性表达。MMP-2在肝癌组织内高表达，IOD为（87 969.46± 27 131.77）；在癌旁组织低表达，IOD为（59 517.72±20 218.23）。两组间差异有统计学意义（ $t=10.509$ ， $P<0.05$ ），见图A2、B2。MMP-2在阴性对照组中无表达。

2.3 肝癌组中FMNL-2和MMP-2的表达相关性

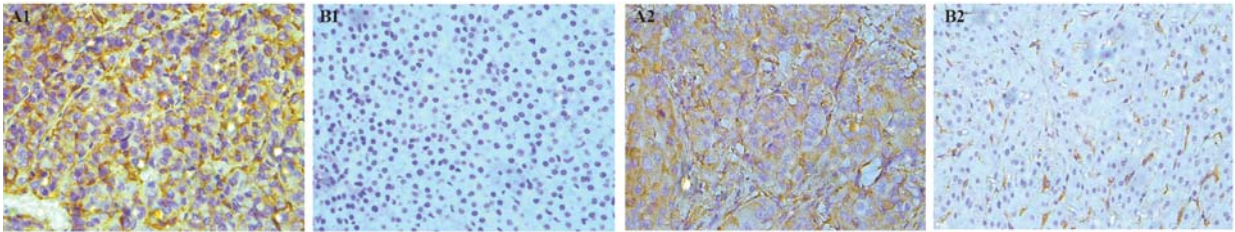
经Pearson Correlation相关性分析，肝癌组织中FMNL-2和MMP-2蛋白均为高表达，癌旁组织中均为低表达，两者间具有正相关性（ $r=0.240$ ， $P=0.016$ ），差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

2.4 FMNL-2及MMP-2蛋白表达与HCC临床病理特征的关系

FMNL-2在是否伴肝硬化组中IOD值分别为（47 471.96±40 273.54）和（72 123.41±45 517.93）（ $P<0.05$ ）；MMP-2在HBsAg阳性或阴性组中IOD值分别为（77 668.34±27 682.79）和（64 585.83±26 173.62）（ $P<0.05$ ），在有无转移组中IOD值分别为（63 854.73±21 730.42）和（77 218.05±28 930.01）（ $P<0.05$ ）；其他各组数据间差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），见表1。

3 讨论

肿瘤的发生及侵袭运动是以细胞的黏附、运动及变形为基础的复杂过程，需要依赖一系列细胞肌动蛋白骨架结构的改变。FMNL-2属于Formins蛋白家族成员，在微丝的组装及重构过程



FMNL-2:Formin-like 2; MMP-2: matrix metalloproteinases-2;A:hepatocellular carcinoma tissue;B:adjacent tissue;1:FMNL-2;2:MMP-2

图1 肝癌及癌旁组织中FMNL-2 和MMP-2的表达 (MaxvisionTM ×400)

Figure1 FMNL-2 and MMP-2 expression in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues (MaxvisionTM ×400)

中起关键调控作用，其高度保守的FH2功能域可促进两个肌动蛋白单体聚合成二聚体，形成微丝成核中心，启动微丝成核，并可维持细胞骨架中微管的稳定性。而富含脯氨酸的FH1功能域可调控肌动蛋白的成核活性，为不断延伸的微丝生长端提供肌动蛋白单体，产生线性微丝^[5-6]。

近几年来FMNL-2参与肿瘤发生、发展的报道越来越多，各类研究显示FMNL-2在肿瘤细胞的侵袭力方面有着重要作用，可以调节肌动蛋白骨架的重构从而参与细胞运动、变形及胞质分裂等活动，可能是肿瘤细胞向周边浸润和远处转移的重要调控基因。Pang等^[2]通过生物信息学分析显示FMNL-2基因定位于人类染色体2q23.3，是一类肿瘤相关基因，通过Rho GTPase相关信号通路参与肿瘤细胞极性控制及侵袭迁移等运动。Kitzing等^[7]研究证实FMNL-2作为Rho C的特殊效应器，具有

促肌动蛋白成核的特征性FH2功能域，可通过调节Rho GTPase来控制肌动蛋白骨架的重组，从而调控细胞形态及侵袭运动。各项研究显示FMNL-2在一些正常组织及胚胎组织中阳性表达，同时在乳腺癌、胃癌、结肠癌等肿瘤组织中也存在高表达。李余发等^[8]研究显示FMNL-2蛋白在高转移的结直肠癌细胞系中相对高表达，FMNL2可能通过Ras-MEK-MAPK和PI3K-AKT两条信号通路促进大肠癌发生EMT，从而经EMT促进大肠癌 的细胞转移。

国内关于FMNL-2在肝癌的发生及发展机制方面的研究极少，本研究采用免疫组织化学法初步检测FMNL-2在肝癌及癌旁组织的表达情况及差异，发现肝癌组织中存在FMNL-2的高表达，其IOD平均值达到90 748.36，与癌旁组织的IOD平均值39 075.46相比，差异有统计学意义。本实验主要采用图文分析软件IPP6.0在相同条件下检测免疫

表1 肝癌患者临床病理特征与FMNL-2和MMP-2蛋白表达的关系

Table1 Relationship between FMNL-2/MMP-2 expressions and clinicopathological features of HCC patients

Features	<i>n</i>	<i>IOD</i> (FMNL-2)		<i>t</i>	<i>P</i>	<i>IOD</i> (MMP-2)		<i>t</i>	<i>P</i>
Gender									
Male	74	67 923.37±45 533.75				88 246.86±28 250.77			
Female	26	56 340.80±43 727.33		1.127	0.262	87 128.69±24 708.76		0.129	0.898
Age(years)									
>50	50	68 810.90±46 766.37				85 121.96±18 212.30			
≤50	50	61 012.92±43 576.79		0.863	0.390	90 816.96±33 975.85		0.739	0.464
Differentiation									
Well-Moderate	60	65 836.75±48 390.15				77 191.53±28 395.40			
Poor	40	63 526.15±40 336.05		0.249	0.804	68 571.67±26 303.58		1.531	0.129
Types via visual observation									
Nodular	66	68 152.57±46 052.01				71 336.53±27 721.00			
Massive	34	58 621.20±43 291.07		1.000	0.320	78 416.11±27 668.37		-1.211	0.229
Liver cirrhosis									
No	58	72 123.41±45 517.93				69 912.39±26 214.42			
Yes	42	47 471.96±40 273.54		2.502	0.014	81 531.50±28 387.77		-1.916	0.059
AFP									
+	68	62 403.47±47 005.23				76 220.38±29 178.60			
–	32	70 342.34±41 098.86		-0.809	0.421	68 480.50±24 090.84		1.305	0.195
HBsAg status									
+	70	63 487.94±48 530.40				77 668.34±27 682.79			
–	30	68 234.50±36 555.95		-0.480	0.632	64 585.83±26 173.62		2.200	0.030
Metastasis									
Yes	26	74 586.69±54 979.36				63 854.73±21 730.42			
No	74	61 512.66±41 027.68		1.274	0.206	77 218.05±28 930.01		-2.149	0.034

组织化学结果，与人工计数方法相比，具有更好的重复性，并可定性定量的客观分析。因此，免疫组织化学法检测目的基因FMNL-2的蛋白表达是否可作为临床诊断肝癌的参考指标，值得进一步探讨。

细胞的迁移不仅是依靠细胞肌动蛋白骨架的重构，基底膜的降解也是促使肿瘤细胞侵袭和转移的关键环节。基质金属蛋白酶 MMP-2是降解细胞外基质及基底膜的关键酶，在肿瘤细胞的发展过程中起重要作用。Yamamoto等^[9]研究显示原发性肝癌中MMP-2的高表达与门静脉浸润、肝内转移及术后复发相关，表明MMP-2在肝癌组织的浸润转移中发挥重要作用。Yang等^[10]发现肝癌组织中MMP-2可降解ECM及基底膜的关键成分，破坏组织结构，重塑ECM，促进肿瘤的生长及新生血管的形成，同周边组织侵袭和远处转移密切相关。

本研究显示肝癌组织中有MMP-2的高表达，在癌旁组织内阳性表达较低，差异具有统计学意义。HBsAg阳性的肝癌患者，其癌与癌旁组表达差异明显，提示HBsAg指标阳性的患者比HBsAg阴性的患者更有可能导致肝癌的发生。MMP-2在有转移的肝癌组织中阳性表达明显高于无转移组，显示MMP-2与肝癌细胞的侵袭转移有着密切关系，MMP-2是否可作为临床诊断肝癌转移的参考指标尚待验证。

本研究还发现FMNL-2和MMP-2蛋白表达具有相关性，在FMNL-2高表达的肝癌组织中，MMP-2也呈现过表达的现象。Liang等^[11]研究显示在结直肠癌中，FMNL-2的信使RNA即MicroRNA-137表达水平的提高和FMNL-2表达水平的降低会抑制信号通路 Akt和MAPK的磷酸化，降低MMP-2的表达，导致结直肠癌细胞侵袭性下降。肝癌组织内FMNL-2与MMP-2的相关作用机制尚无报道，两者表达水平的差异是否存在拮抗或协同作用、如何影

响肝癌细胞的发生发展机制，尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center MM,*et al*.Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.

[2] Pang RW, Joh JW, Johnson PJ,*et al*.Biology of hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol,2008,15(4):962-71.

[3] Zhu XL, Liang L,Ding YQ.The expression and clinical significance of formlin-like 2 in colorectal carcinoma[J]. Zhongguo Zong He Lin Chuang,2008,24(5):401-4. [朱曦龄,梁莉,丁彦青. FMNL2在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J].中国综合临床,2008,24(5):401-4.]

[4] Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 genes in silico[J].Int J Oncol,2003,22(5):1161-8.

[5] Courtemanche N, Pollard TD. Determinants of formin homology 1 (FH1) domain function in actin filament elongation by formins[J]. J Biol Chem,2012,287(10):7812-20.

[6] Paul AS, Pollard TD. The role of the FH1 domain and profilin in formin-mediated actin-filament elongation and nucleation[J]. Curr Biol,2008,18(1):9-19.

[7] Kitzing TM, Wang Y, Pertz O, *et al*.Formin-like 2 drives amoeboid invasive cell motility downstream of RhoC[J]. Oncogene,2010,29(16):2441-8.

[8] Li YF, Xiao FM, Liang L,*et al*.Bioinformatic Analysis of the Gene FMNL2 in Clorectal Cancer Metastasis[J]. Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang,2011,38(7):361-6.[李余发,肖法嫚,梁莉,等.大肠癌转移相关基因FMNL2的生物信息学分析[J].中国肿瘤临床,2011,38(7):361-6.]

[9] Yamamoto H,Itoh F, Adachi Y,*et al*.Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma[J].Gastroenterology,1997,112(4):1290-6.

[10] Yang C, Zeisberg M, Lively J C, *et al*.Integrin α 1 β 1 and α 2 β 1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment[J]. Cancer Res, 2003, 63(23): 8312-7.

[11] Liang L,Li X,Zhang X,*et al*.MicroRNA-137, an HMGA1 target, suppresses colorectal cancer cell invasion and metastasis in mice by directly targeting FMNL2[J].Gastroenterology,2013,144(3): 624-35.

[编辑：黄园玲；校对：周永红]