

DDR2 和 MMP-13 在中耳胆脂瘤中的表达及意义

许连方¹ 孙文忠²

[摘要] 目的:研究在中耳胆脂瘤上皮组织中盘状结构域受体 2(DDR2)、基质金属蛋白酶 13(MMP-13)的表达水平,探讨两者在中耳胆脂瘤骨质破坏中的作用及相互关系。**方法:**运用免疫组织化学 SP 法检测 DDR2、MMP-13 在 30 例中耳胆脂瘤上皮组织和 10 例外耳道正常上皮组织中的表达水平,并应用计算机图像分析系统对其表达进行定量分析,分析两者在中耳胆脂瘤上皮组织中的表达与骨质破坏程度之间的相互关系。**结果:**在中耳胆脂瘤上皮组织中 DDR2 及 MMP-13 表达的平均光密度值显著高于外耳道正常上皮组织($P<0.05$)。DDR2 和 MMP-13 在中耳胆脂瘤上皮组织的表达呈正相关($r=0.738, P<0.01$);且两者的表达与骨质破坏程度呈正相关,骨质破坏范围越广,二者的表达越高($P<0.05$)。**结论:**DDR2 和 MMP-13 在中耳胆脂瘤的骨质破坏中可能具有重要的作用。

[关键词] 盘状结构域受体 2;基质金属蛋白酶-13;胆脂瘤,中耳

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2016.12.004

[中图分类号] R739.61 **[文献标志码]** A

The expression and significance of DDR2 and MMP-13 in human middle ear cholesteatoma

XU Lianfang¹ SUN Wenzhong²

(¹Guilin Medical University, Guilin, 541000, China; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, People's Hospital of Liuzhou City, the Second Affiliated Hospital of Guangxi University of Science and Technology)

Corresponding author: SUN Wenzhong, E-mail: 1278863616@qq.com

Abstract Objective: To ascertain the expression level of discoidin domain receptors 2(DDR2) and matrix metalloproteinase-13(MMP-13) in human middle ear cholesteatoma tissues and further investigate their roles in bone destruction and correlation. **Method:** Using immunohistochemical S-P method to detect the expression level of DDR2, MMP-13 in 30 specimens with middle ear cholesteatoma epithelial tissue and 10 specimens with normal ear epithelial tissues. At the same time, the computer image analysis system was used to detect the expression of the two indexes by the quantitative analysis, analyzing their expression in middle ear cholesteatoma epithelial tissue and the correlation between the extent of bone destruction. **Result:** The expression of DDR2 and MMP-13 were confirmed in human middle ear cholesteatoma epithelial tissues and normal ear epithelial tissues. The mean optical density of DDR2 and MMP13 in human middle ear cholesteatoma epithelial tissues which were tested by the computer image quantitative analysis system were higher than those in normal ear epithelial tissues ($P<0.05$). The expression of DDR2 and MMP-13 in middle ear cholesteatoma epithelial tissues were positively correlated ($r=0.738, P<0.01$). In addition, the two indexes were associated and relative to the extent of bone destruction, the wider the extent of bone destruction was, the higher the expression of both indexes ($P<0.05$). **Conclusion:** DDR2 and MMP-13 may play important roles in bone destruction of human middle ear cholesteatoma.

Key words domain receptor 2; matrix metalloproteinase-13; cholesteatoma, middle ear

胆脂瘤型中耳炎最重要的临床特征是周围骨质的溶骨性破坏,主要表现为听骨链和临近颅骨的进行性侵蚀性破坏,引发各种颅内、外严重并发症。由胆脂瘤上皮、周围的骨细胞或肉芽组织释放的蛋白水解酶能导致胆脂瘤中骨基质的降解^[1],其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)在此过程中发挥的作用越来越受到关注。盘状结构

域受体 2(discoidin domain receptors 2, DDR2)是一种受体型蛋白酪氨酸激酶,具有调控 MMP-13 表达的功能^[2]。有实验研究结果表明,DDR2 在肺癌、卵巢癌、鼻咽癌等肿瘤中异常表达^[3-5],提示 DDR2 的表达在肿瘤细胞分化、增殖特别是肿瘤转移和侵袭过程中占有重要地位,而以上表达 DDR2 的肿瘤均来源于上皮组织,提示上皮细胞在增殖过程中有表达 DDR2 的特性,结合胆脂瘤具有迁移性、分化变异性、复发性、侵袭性、破坏性和非正常调控下的增殖性等特点,推断 DDR2 可能在胆脂瘤上皮细胞中有表达。本实验采用免疫组织化学方

¹ 桂林医学院(广西桂林, 541000)

² 柳州市人民医院耳鼻咽喉头颈外科 广西科技大学第二附属医院

通信作者:孙文忠, E-mail: 1278863616@qq.com

法,研究DDR2、MMP-13在中耳胆脂瘤上皮组织中的表达情况,分析二者与骨质破坏程度之间的相互关系,进一步探讨中耳胆脂瘤骨质破坏的可能机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2014-03—2015-03在柳州市人民医院耳鼻喉头颈外科行手术治疗的胆脂瘤型中耳炎患者30例,其中男12例,女18例;年龄13~65岁,平均34.5岁。10例外耳道正常皮肤标本取自同一时期行耳部手术的患者。所有术中标本离体后,均用10%中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,标本切片厚度为5 μ m,苏木精-伊红染色,由经验丰富的病理科医生在镜下观察证实为胆脂瘤,并且具有典型胆脂瘤上皮组织结构。

1.2 试剂

兔抗人DDR2多克隆抗体(Rabbit anti-DDR2 polyclonal antibody, ImmunoWay公司,美国),工作浓度1:200。兔抗人MMP-13多克隆抗体(Rabbit anti-MMP-13 polyclonal antibody, ImmunoWay公司,美国),工作浓度1:100。免疫组织化学试剂盒及二氨基联苯胺(DAB)显色剂均购自北京中杉生物公司。

1.3 研究方法

SP免疫组织化学染色具体步骤为:①常规切片,捞片后置60℃烤箱60 min以使切片紧密粘附;②常规脱蜡水化,PBS冲洗3×5 min;③滴加3%过氧化氢,室温10 min以灭活内源性酶,PBS冲洗3×5 min;④抗原热修复:将切片放入盛有枸橼酸钠缓冲液(pH8.0)的压力锅内,高压3 min,自然冷却,PBS冲洗3×5 min;⑤滴加封闭液,室温下静置20 min,甩去封闭液,不洗;⑥滴加一抗50 μ l,4℃过夜(需在37℃复温20 min),PBS冲洗3×5 min;⑦滴加辣根过氧化物酶标记的二抗50 μ l,37℃恒温箱内静置20 min,PBS冲洗3×5 min;⑧滴加链霉亲和素-过氧化物酶,37℃恒温箱内静置20 min,PBS冲洗3×5 min;⑨DAB显色5~10 min,在显微镜下掌握染色程度,自来水冲洗15~20 min用以终止反应;⑩苏木精复染2~3 min,根据染色程度可选择进行盐酸乙醇分化,自来水冲洗15~20 min。常规脱水、透明、封片、镜检。用已知阳性片做阳性对照,PBS代替一抗做阴性对照。

1.4 结果判定标准

1.4.1 DDR2、MMP-13的分布及表达水平判定

DDR2以细胞质和胞膜呈现棕褐色染色颗粒为阳性表达。MMP-13以细胞质呈棕褐色染色颗粒为阳性表达。所有免疫组织化学切片在镜下观察,根据其染色程度,分为弱阳性(淡黄色)、中等阳性(棕

色)和强阳性(棕褐色)。采用Image-pro plus 6.0图像分析系统(Media Cybernetics),每张切片在400倍光镜下选取5个具有典型代表部位,计算阳性表达率,同时对阳性细胞表达的平均光密度作定量分析,取其平均值作为研究结果。

1.4.2 中耳胆脂瘤骨质破坏程度分级 在手术高倍显微镜下观察中耳胆脂瘤病变范围及听小骨破坏情况:(+)表示无明显听小骨破坏;(++)表示破坏砧骨;(++)表示破坏砧骨和镫骨;(+++表示破坏锤骨、砧骨、镫骨、乳突天盖和(或)乙状窦盖板^[6]。

1.5 统计学方法

应用SPSS 15.0统计软件对数据作统计学处理,DDR2和MMP-13表达平均光密度的差异采用 t 检验,采用Spearman等级相关性分析指标均数之间的关系,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DDR2在中耳胆脂瘤组织及正常外耳道皮肤中的表达

DDR2在中耳胆脂瘤组织及正常外耳道皮肤中的表达见图1、2。DDR2的阳性表达产物主要定位于细胞质和细胞膜,在中耳胆脂瘤上皮多呈强阳性表达,阳性细胞在上皮各层细胞中均有分布,无明显强弱趋势。在正常外耳道上皮组织多为弱阳性或阴性表达,阳性细胞主要集中在基底层。其阳性例数的平均光密度值分别为 0.287 ± 0.023 和 0.223 ± 0.021 ($P < 0.05$),阳性率分别为86.67%(26/30)和40.00%(4/10),DDR2在中耳胆脂瘤上皮组织的表达明显高于正常外耳道上皮组织。

2.2 MMP-13在中耳胆脂瘤组织及正常外耳道皮肤中的表达

MMP-13在中耳胆脂瘤组织及正常外耳道皮肤中的表达见图3、4。MMP-13的阳性表达产物主要定位于细胞质,在中耳胆脂瘤上皮呈中等阳性至强阳性表达,且在上皮各层细胞均有表达,以基底层表达最强。在正常外耳道上皮组织多为弱阳性或阴性表达。其阳性例数的平均光密度值分别为 0.256 ± 0.026 和 0.215 ± 0.014 ($P < 0.05$),阳性率分别为83.33%(25/30)和30.00%(3/10),MMP-13在中耳胆脂瘤上皮组织的表达明显高于正常外耳道上皮组织。

2.3 DDR2、MMP-13阳性表达与胆脂瘤侵袭能力的关系

30例胆脂瘤型中耳炎患者中,中耳胆脂瘤骨质破坏(+)3例,(++)5例,(++)14例,(+++8例。运用计算机图像定量分析,分别计算DDR2和MMP-13的平均光密度值,Spearman相关分析显示,胆脂瘤骨质破坏程度与DDR2表达的平均光密度有显著相关性($r = 0.597, P < 0.01$),与MMP-

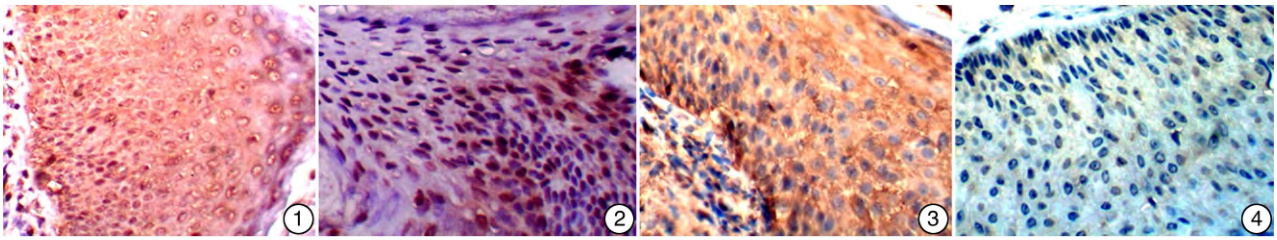


图1 DDR2在中耳胆脂瘤上皮中的表达(SP×40); 图2 DDR2在正常外耳道上皮中的表达(SP×40); 图3 MMP-13在中耳胆脂瘤上皮中的表达(SP×40); 图4 MMP-13在正常外耳道上皮中的表达(SP×40)

13表达的平均光密度亦有显著相关性($r=0.637$, $P<0.01$)。DDR2和MMP-13表达的平均光密度值越大,密度越高,胆脂瘤骨质破坏程度就越强。见表1。

表1 DDR2、MMP-13平均光密度值与中耳胆脂瘤骨质破坏程度的关系

胆脂瘤骨质破坏程度	例数	DDR2	MMP-13
+	3	0.207 ± 0.021	0.215 ± 0.013
++	5	0.243 ± 0.016	0.241 ± 0.025
+++	14	0.281 ± 0.023	0.273 ± 0.027
++++	8	0.313 ± 0.027	0.305 ± 0.012

2.4 中耳胆脂瘤上皮中DDR2、MMP-13表达的相关性

对30例胆脂瘤组织标本进行计算机图像分析,记录DDR2和MMP-13的平均光密度值,其阳性例数的平均光密度值分别为 0.287 ± 0.023 , 0.256 ± 0.026 ,经Spearman相关分析,二者表达存在正相关($r=0.738$, $P<0.01$)。

3 讨论

胆脂瘤型中耳炎对周围骨质破坏的机制尚不明。近几年来,国内外学者对中耳胆脂瘤骨质破坏机制的研究结果表明,细胞因子参与的骨质破坏作用、酶类介导的骨吸收作用、胆脂瘤的机械压力作用等多种因素^[7],均参与了中耳胆脂瘤骨质破坏的过程。胆脂瘤并非肿瘤,是由囊内容物、胆脂瘤上皮组织、胆脂瘤基质共同组成。其中,基质降解、自身稳定性失调可能是导致胆脂瘤破坏骨质的因素之一。

MMPs是一类锌离子依赖性的蛋白酶家族,能降解除多糖以外的所有细胞外基质,其家族成员可由破骨细胞和成骨细胞所分泌,彼此之间又相互激活,进一步加速骨基质的降解。作为细胞外基质和基膜的主要降解酶,MMP-13对Ⅱ型胶原的降解能力最强^[8],且在稳定细胞外基质、溶解破坏骨基质的过程中发挥重要的作用。随着国内外学者对

MMPs蛋白酶家族的深入研究,MMP-13在中耳胆脂瘤骨质破坏中所发挥的作用也越来越受到关注。本实验结果表明,在中耳胆脂瘤上皮中MMP-13的阳性表达可见于上皮各层细胞,与正常外耳道上皮组织比较,表达明显增高。经Spearman相关分析,胆脂瘤侵袭能力与MMP-13表达平均光密度有显著相关性,表明在中耳胆脂瘤组织中MMP-13能够降解骨基质内的胶原,胶原降解又引起了骨质破坏,说明其在中耳胆脂瘤骨质破坏中发挥着重要作用。

盘状结构域受体蛋白酪氨酸激酶(discoidin domain receptors protein tyrosine kinases, DDRs)是一种受体型蛋白酪氨酸激酶,在人体大多组织中都有表达,其主要功能是通过调控胶原的合成和降解,进而参与细胞的增殖、黏附及细胞外基质的重塑,在疾病的病理生理过程中发挥着极为关键的作用。DDR2作为DDRs家族中的一员,它的一个非常重要的功能是通过调控胶原蛋白的分泌和降解来监控细胞外基质水平。与DDR1比较,Ⅱ型胶原对DDR2的亲和力更强^[9],在Ⅱ型胶原降解片段的刺激下DDR2在较长的一段时间内可处于激活状态,同时上调MMP-13的表达^[10]。有研究证实^[11],在软骨中Ⅱ型胶原、DDR2、MMP-13三者之间存在着一种循环过程,即Ⅱ型胶原的降解片段激活DDR2,DDR2能诱导合成MMP-13,MMP-13增多又可加速Ⅱ型胶原的降解,最终导致软骨的破坏。本实验结果显示,中耳胆脂瘤上皮中DDR2呈高表达,明显高于正常外耳道皮肤。经Spearman相关分析,胆脂瘤侵袭能力与DDR2表达平均光密度有明显相关性,说明在中耳胆脂瘤骨质破坏过程中,DDR2也同样发挥着重要作用。结合本实验中DDR2和MMP-13在中耳胆脂瘤中表达的平均光密度值,经Spearman相关分析显示呈正相关,说明DDR2和MMP-13在中耳胆脂瘤骨质破坏过程中有一定联系。

DDR2和MMP-13在胆脂瘤型中耳炎中的表达已被理论证实。依据本实验研究结果,笔者认为:DDR2和MMP-13在中耳胆脂瘤的骨质破坏机制中发挥着决定性的作用;在胆脂瘤组存在

DDR2、MMP-13 阴性表达可能是实验操作存在误差或者是标本取材的原因;DDR2 在中耳胆脂瘤中的高表达可能是刺激 MMP-13 表达上调的重要因素;在中耳胆脂瘤的骨质破坏机制中,可能存在着“胶原-DDR2-MMPs-骨质破坏-胶原”这一循环模式。本实验初步揭示了 DDR2、MMP-13 在中耳胆脂瘤中的存在及其意义,为进一步探究 DDRs 和 MMPs 在中耳胆脂瘤骨质破坏机制中所起的作用奠定了基础。同时,也将为临床用于干预胆脂瘤炎症、认识增殖与骨质破坏的分子靶点和指导新药筛选提供科学依据。

参考文献

- [1] SCHONERMARK M P, ISSINN P R, ERBRICH B K, et al. Expression pattern of the plasminogen activator plasm in system in human cholesteatoma[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1999, 108: 245—252.
 - [2] XU L, PENG H, WU D, et al. Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice[J]. *Biol Chem*, 2005, 280: 548—555.
 - [3] FORD C E, LAU S K, ZHU C Q, et al. Expression and mutation analysis of the discoidin domain receptors 1 and 2 in non-small cell lung carcinoma[J]. *Cancer*, 2007, 96: 808—814.
 - [4] MATSUMURA H, KANO K, MARÍN DE EVSIK-OVA C, et al. Transcriptome analysis reveals an unexpected role of a collagen tyrosine kinase receptor gene, Ddr2, as a regulator of ovarian function[J]. *Physiol Genomics*, 2009, 39: 120—129.
 - [5] CHUA H H, YEH T H, WANG Y P, et al. Upregulation of discoidin domain receptor 2 in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Head Neck*, 2008, 30: 427—436.
 - [6] 江超武,展鸿谋,王文惠,等. 转化生长因子 $\beta 1$ 和即刻早期基因及 p27 在中耳胆脂瘤上皮中的表达[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 39(4): 211—215.
 - [7] 林刃舆,迟放鲁. 中耳胆脂瘤形成机理的研究进展[J]. *国外医学耳鼻喉科学分册*, 2001, 25(3): 153—212.
 - [8] 李瑾,郭宝良. 基质金属蛋白酶-13(MMP-13)与乳腺癌关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(7): 1650—1653.
 - [9] LEITINGER B, STEPLEWSKI A, FERTALA A. The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2[J]. *Mol Biol*, 2004, 344: 993—1003.
 - [10] WANG J, LIU X, DENG Y, et al. Functional analysis of discoidin domain receptor 2 in synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. *Autoimmun*, 2002, 19: 161—168.
 - [11] SUNK I G, BOBACZ K, HOFSTAETTER J G, et al. Increased expression of discoidin domain receptor 2 is linked to the degree of cartilage damage in human-knee joints: a potential role in osteoarthritis pathogenesis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56: 3685—3692.
- (收稿日期:2016-02-15)
-
- (上接第 937 页)
- nexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346: 243—249.
- [12] BHALLA S, SHARMA R, KHANDELWAL G, et al. Absence of *GJB6* mutations in Indian patients with non-syndromic hearing loss[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2011, 75: 356—359.
 - [13] HERNANDEZ-JUAREZ A A, LUGO-TRAMPE J D E, CAMPOS-ACEVEDO L D, et al. *GJB2* and *GJB6* mutations are an infrequent cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss in residents of Mexico[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2014, 78: 2107—2112.
 - [14] YUAN Y, ZHANG X, HUANG S, et al. Common molecular etiologies are rare in nonsyndromic Tibetan Chinese patients with hearing impairment[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e30720.
 - [15] 万亚蕊,张延平,孙建和,等. *GJB6* 基因敲除小鼠耳蜗血管纹超微结构观察[J]. *中国听力语言康复科学杂志*, 2014, 12(1): 44—47.
 - [16] KELLY J J, SHAO Q, JAGGER D J, et al. Cx30 exhibits unique characteristics including a long half-life when assembled into gap junctions[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128: 3947—3960.
 - [17] KIKUCHI T, KIMURA R S, PAUL D L, et al. Gap junction systems in the mammalian cochlea[J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 32: 163—166.
 - [18] FORGE A, JAGGER D J, KELLY J J, et al. Connexin30-mediated intercellular communication plays an essential role in epithelial repair in the cochlea[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126: 1703—1712.
 - [19] 袁永一,黄德亮,戴朴,等. 中国非综合征遗传性聋人群 *GJB6* 基因突变分析[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 21(1): 3—6.
 - [20] 陈垠钊,宗凌,周蔚,等. 200 例非综合征型聋患者 *GJB3* 和 *GJB6* 基因突变分析[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2012, 20(3): 198—200.
 - [21] PANDYA A, ARNOS K S, XIA X J, et al. Frequency and distribution of *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands[J]. *Genet Med*, 2003, 5: 295—303.
 - [22] ROUX A F, PALLARES-RUIZ N, VIELLE A, et al. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France[J]. *BMC Med Genet*, 2004, 5: 5—14.
- (收稿日期:2016-02-19)