

การแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 ในชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกที่ฝังในพาราฟินโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

สหพัฒน์ บรรตวรักษ์^{1,2,*} วัชรินทร์ วงศ์เสนา³ วิภาวี แก้วโพธิ์⁴ ชาญวิทย์ สิลายวัฒน์^{1,2}
 บรรจบ ศรีภา⁵ พัชรี เจริญนัยกุล^{1,2} อรุณรัฐ ร่มพฤษ^{1,2} เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์^{1,2} พิศมัย ยืนยาว⁶
¹คณะเทคนิคการแพทย์ ²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
³คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ⁴นักศึกษาหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์
 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ⁵ภาควิชาพยาธิวิทยา ⁶ภาควิชาสูติเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ: Matrix metalloprotease-9 (MMP-9) และ Matrix metalloprotease-11 (MMP-11) เป็นเอนไซม์ที่สร้างจากเซลล์ในร่างกายหลายชนิด MMPs สามารถย่อยสลายประกอบโครงสร้างของ basement membrane และ extracellular matrix หากมีการแสดงออกมากขึ้นย่อมแสดงถึงการสลายโครงสร้างดังกล่าว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกกับความรุนแรงของโรค ผลการศึกษาตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ฝังในพาราฟิน ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่า rabbit anti-MMP-9 (M5302) และ anti-MMP-11 (M0806) ความเข้มข้น 0.5 µg/ml และ 3.0 µg/ml ให้ผลเหมาะสมต่อการย้อม MMP-9 และ MMP-11 ตามลำดับ โดยมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอในไซโตพลาสซึมของเซลล์มะเร็ง ประเมินผลการย้อมด้วยผลคูณค่าคะแนนความเข้มของการติดสีและจำนวนเซลล์ (final score) พบว่าตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูกมีค่า final score > 0 ซึ่งบ่งถึงการแสดงออกของ MMP-9/ MMP-11 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งร้อยละ 65.38 (17/26 ราย) ร้อยละ 69.23 (18/26 ราย) เทียบกับกลุ่มมดลูกโต (myoma) ร้อยละ 0 (0/16 ราย) ร้อยละ 0 (0/24 ราย) ตามลำดับ สรุปพบอัตราการแสดงออกของ MMP-9/ MMP-11 ของเนื้อเยื่อปากมดลูกสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็ง สนับสนุนว่าการแสดงออกของ MMP-9/ MMP-11 ในเซลล์มะเร็งมีความสัมพันธ์กับการพัฒนามะเร็งปากมดลูก

คำสำคัญ: เอ็มเอ็มพี-9 เอ็มเอ็มพี-11 มะเร็งปากมดลูก อิมมูโนฮิสโตเคมี

บทนำ: โอกาสรอดของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกสัมพันธ์กับระยะมะเร็งเมื่อเริ่มการรักษา โดยหากเข้ารับการรักษาในระยะแรกมีค่า 5-year survival rate ในอัตราร้อยละ 80-95¹⁾ แต่หากเข้ารับการรักษาหลังจากที่เซลล์มะเร็งมีการแพร่กระจายเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองจะมีค่า 5-year survival rate ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 40-50^{2,3)} ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่เคยผ่านการรักษาตามขั้นตอนและหายพบว่าร้อยละ 17 มีโอกาสกลับเป็นซ้ำ (recurrence) โดยพบได้ทั้งแบบเกิดซ้ำในบริเวณเดิม/ใกล้เคียงหรือแบบเกิดที่อวัยวะอื่น มีการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาอย่างต่อเนื่อง⁴⁻⁷⁾ แต่ผลก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจมากนัก⁸⁾ ผู้ป่วยกลับเป็นซ้ำมีค่าเฉลี่ย disease-free interval (DFI) นาน 18 เดือน และมีค่า survival rate เพียง 2-12 เดือน การตรวจกรองมะเร็งปากมดลูกโดยวิธี Pap test จะตรวจเมื่อยังไม่มีอาการใดๆ เพื่อดูความเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณปากมดลูก หากพบความผิดปกติจำเป็นต้องมีการตรวจชิ้นเนื้อ (biopsy) แบบวิธี LEEP หรือ Cone ก่อนเริ่มการรักษา อย่างไรก็ตามถ้าการตรวจ Pap test ได้ผลปกติก็ไม่สามารถยืนยันว่าไม่มี

เซลล์มะเร็ง เนื่องจากพบว่าประมาณร้อยละ 10 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกที่ให้ผล Pap test ปกติ⁹⁾ จึงต้องยืนยันด้วยผลการตรวจชิ้นเนื้อเท่านั้น มูลเหตุที่พบการกลับเป็นซ้ำเริ่มจากผู้ป่วยมีอาการผิดปกติอย่างอื่นนำ ผู้ป่วยมีอาการผิดปกติที่ชัดเจน และจากการทำ vaginal smear ร้อยละ 87, 9 และ 2 ตามลำดับ⁸⁾ แสดงว่าตรวจกรองมะเร็งปากมดลูกและการติดตามการรักษายังมีความไวต่ำ

MMPs เป็นกลุ่มเอนไซม์หลายชนิด (MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9,-10,-11,12,-13,-14,-15,-16,-17,-19,-20,-21,-22,-23,-24,-25,-26,-27,-28) สามารถจัดกลุ่มตามชนิดสับสเตรต คือ กลุ่ม collagenase (MMP-1,-8,-13) กลุ่ม gelatinases (MMP -2,-9) กลุ่ม stromelysins (MMP-3,-10,-11) กลุ่ม matrilysins (MMP-7,-26) กลุ่ม membrane-type MMPs (MMP-14,-15,-16,-17,-24,-25) และกลุ่มอื่นๆ (MMP-12,-19,-20,-21,-22,-23,-27,-28)^{10,11)} MMPs ส่วนใหญ่จะไม่แสดงออกภายใต้สภาวะปกติ แต่จะถูกกระตุ้นจากหลายปัจจัยเช่น cytokines, growth factors, oncogene products และ mechanical stress¹²⁾ MMPs ส่วนใหญ่จะถูกหลั่งออกมาเป็น inactive

*ติดต่อได้ที่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
 โทรศัพท์/ โทรสาร 043 202089 e-mail: sahapat@kku.ac.th, dr_sahapat@yahoo.com

zymogen (proMMPs) และถูกย่อยภายนอกเซลล์เป็น activated extracellular ยกเว้นกลุ่ม membrane type MMPs (MT-MMPs) ซึ่งจะเกาะบนผิวเซลล์ และจับกับ tissue inhibitor of MMP (TIMP) เพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมที่จะจับกับ proMMP จากนั้น MT-MMP อีกโมเลกุลก็จะสามารถ activate proMMP ที่ถูกเชื่อมอยู่ให้กลายเป็น activated MMP¹⁰⁾ การทำงานถูกควบคุมโดย tissue inhibitor of MMP (TIMP) ที่เข้าจับแบบจำเพาะ¹³⁻¹⁴⁾ โดย TIMP-1 ยับยั้ง MMP-1¹⁵⁾, TIMP-2 ยับยั้ง MMP-2¹⁶⁾, TIMP-3 ยับยั้ง MMP-1,-2,-3,-9,-13¹⁷⁾, TIMP-4 ยับยั้ง MMP-2,-7,-1,-3,-9¹⁸⁾ MMP เกี่ยวข้องกับการจัดโครงสร้างใหม่ (remodeling) ของเนื้อเยื่อ และสลายด้านขวางกั้นการเคลื่อนย้าย (barrier) ของเซลล์มะเร็งเนื่องจาก Basement membrane (Bm) ประกอบด้วย collagen type-IV, laminin, nidogen และ extracellular matrix (ECM) ประกอบด้วย collagen type -I, -II และ -III ซึ่งเป็นสับสเตรทของ MMPs¹⁰⁾ ทั้งในภาวะปกติ เช่น embryonic tissue development¹⁹⁾, wound healing²⁰⁻²¹⁾ หรือในภาวะที่เกิดพยาธิสภาพ เช่น inflammation²²⁾, tumor development²³⁻²⁶⁾ เป็นต้น จากข้อมูลการทำ cDNA microarray ใน cervical cancer พบยีน MMP-9 และ MMP-11 มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งปากมดลูก²⁷⁾ MMP-9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase) จัดอยู่ในกลุ่ม gelatinases, MMP-11 (stromelysin-3) จัดอยู่ในกลุ่ม stromelysins เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ extracellular matrix component/ extracellular matrix modeling¹⁰⁻¹¹⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ฝังในพาราฟินโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี สำหรับใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูก เพื่อไขข้อสงสัยความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกกับความรุนแรงโรค

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ:

กลุ่มตัวอย่างศึกษาและตัวอย่างตรวจ

โครงการนี้เป็นโครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการวิทยา มะเร็งและภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุลในโรคมะเร็งปากมดลูก ที่ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลข HE480227 คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างศึกษาจากผู้ป่วยที่เซ็นชื่อให้ความยินยอมเข้าร่วมโครงการ และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นโดยสูติแพทย์ และรับการวินิจฉัยยืนยันจากพยาธิแพทย์ ตามระบบ

FIGO staging system²⁸⁾ กลุ่มตัวอย่างศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ MMP-9/ MMP-11 ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกกับความรุนแรงของมะเร็งปากมดลูก จำนวน 54 ราย ประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 26 ราย ตั้งแต่ระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 และกลุ่มมดลูกโต (myoma) ที่มีผล ThinPrep[®] ให้ผลลบ 28 ราย โดยสูติแพทย์จะเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก ตั้งแต่ครั้งแรกที่มาตรวจรักษา และฝังในพาราฟิน ตัวอย่างชิ้นเนื้อควบคุมเป็นชิ้นเนื้อเยื่อเหงือก (gingival tissue section) จากผู้ป่วยเหงือกอักเสบเรื้อรัง (Oral Lichen Planus: OLP) ที่ฝังในพาราฟิน ซึ่งมีผลการตรวจพบ MMP-9 ของเซลล์บริเวณที่อักเสบตามรายงานการศึกษาที่ผ่านมา²⁹⁾ เพื่อใช้เป็นชิ้นเนื้อควบคุมสำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

ความเข้มข้นแอนติบอดี anti- MMP-9 (M5302), anti-MMP-11 (M0806)

Rabbit anti-MMP-9 (M5302) และ anti-MMP-11 (M0806) ของบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา ถูกนำมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อปรับขั้นตอนการย้อมเริ่มต้นในชิ้นเนื้อเยื่อเหงือก (gingival tissue) จากผู้ป่วยเหงือกอักเสบเรื้อรัง (Oral Lichen Planus: OLP) ซึ่งเป็นชิ้นเนื้อควบคุมการย้อม MMP-9²⁹⁾ แอนติบอดีเจือจางด้วย PBS ความเข้มข้น 0.25, 0.5 และ 1.0 µg/ml สำหรับ anti- MMP-9 (M5302) และ ความเข้มข้น 2.0, 3.0, 4.0, และ 5.0 µg/ml สำหรับ anti-MMP-11 (M0806)

การย้อม MMP-9 และ MMP-11 โดยการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี

เตรียมสไลด์โดยนำสไลด์ชิ้นเนื้อเยื่อหนา 4 µm มาผ่านขั้นตอน deparaffinized โดยจุ่มใน xylene 3 อ่าง นาน 30 นาที ในอ่างแรก และ 5 นาที ในอ่างที่เหลือ จากนั้น re-hydrated โดยจุ่มใน 100% เอทานอล 2 อ่าง และ 95% เอทานอล 2 อ่าง อ่างละ 2 นาที ตามลำดับ แล้วจุ่มในน้ำกลั่น 2 นาที นำสไลด์ไปต้มใน citrate buffer (pH 6.0) นาน 20 นาที เพื่อให้แอนติเจนเผยออก (retrieve antigen) วางสไลด์ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำไปจุ่มล้างด้วยบัฟเฟอร์ 2 นาที ทำการยับยั้ง endogenous peroxidase activity ด้วย 3 % H₂O₂ นาน 30 นาที และจุ่มล้างในบัฟเฟอร์ อ่างละ 5 นาที 2 อ่าง และหยดทับด้วย 5% bovine serum ที่ทิ้งไว้ นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาเททิ้งและเติม rabbit anti-MMP-9 (M5302) และ anti-MMP-11 (M0806) ให้ท่วม และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในอ่างความชื้น 1 คืน จากนั้นจุ่ม

ในบัฟเฟอร์ 5 นาที 2 อ่าง และหยด rabbit EnVision+ reagent (DAKO, Carpinteria, CA) ให้ท่วม และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในอ่างความชื้น 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปจุ่มล้างในอ่างบัฟเฟอร์ 2 อ่าง นาน 5 นาที จากนั้นหยดสับสเตรท 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (DAKO, Carpinteria, CA, U.S.A) ให้ท่วมและวางไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้อง ในอ่างความชื้น 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปล้างโดยผ่านน้ำประปา 5 นาที นำไปย้อมทับด้วย hematoxylin (ACTA) โดยการจุ่ม 10 ครั้ง นาน 10 วินาที แล้วล้างโดยผ่านน้ำประปา 5 นาที และ dehydrated โดยจุ่มในอ่าง 95% เอธานอล 2 อ่าง อ่าง 100% เอธานอล 2 อ่าง และ xylene 2 อ่าง นานอ่างละ 2 นาที ตามลำดับ จากนั้นปิดทับด้วย permount

การย้อม MMP-9/MMP-11 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก

ย้อม MMP-9/ MMP-11 ในชิ้นเนื้อปากมดลูก จำนวน 54 รายประกอบด้วย กลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 26 ราย และ กลุ่มมดลูกโต (myoma) ที่มีผล ThinPrep^R ให้ผลลบ 28 ราย โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย anti-MMP-9 (M5302), anti-MMP-11 (M0806) ด้วยความเข้มข้นเหมาะสม

การอ่านผลและรายงานผลการย้อม MMP-9/MMP-11 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

การอ่านผลตัดแปลงจากวิธีรายงานผลการย้อม Immunohistochemistry (IHC) จากชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูก³⁰⁾ และ มะเร็งตับอ่อน³¹⁾ โดยอ่านผลทั่วทั้งสไลด์ แล้วรายงานผลเป็น 2 พารามิเตอร์ คือ 1) ผลเชิงปริมาณ พิจารณาจากจำนวนเซลล์ที่ย้อมติด (immunoreactive cell number) แบ่งค่าคะแนน (score) เป็น 4 ระดับ ดังนี้: 0= เซลล์ย้อมติดน้อยกว่า 10 %; 1= เซลล์ย้อมติดประมาณ 10-40%; 2= เซลล์ย้อมติดประมาณ 40-60%; 3= เซลล์ย้อมติดมากกว่า 60% 2) ผลเชิงคุณภาพ พิจารณาจากความเข้มของการย้อมติด (immunoreactive intensity) แบ่งค่าคะแนน เป็น 3 ระดับ ดังนี้ 0 = ย้อมไม่ติด (no staining); 1= ย้อมติดน้อยมาก (weak staining); 2= ย้อมติดปานกลาง (moderate staining); 3= ย้อมติดเข้มชัดเจน (intense staining) โดยเปรียบเทียบกับชิ้นเนื้อควบคุม นำค่าทั้ง 2 พารามิเตอร์ มาคูณกันได้เป็นค่าคะแนนสุดท้าย (final score) สำหรับการรายงานผล³²⁾

ผล:

ผลการหาสภาวะย้อมที่เหมาะสมในชิ้นเนื้อควบคุม

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย้อม MMP-9 ในชิ้นเนื้อควบคุม พบว่า rabbit anti-MMP-9 (M5302) ความ

เข้มข้น 0.25 µg/ml ได้ผลย้อมติดจางๆ (w+) ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 µg/ml ได้ผลย้อมติดไม่ชัด โดยมีลักษณะการติดแบบไม่จำเพาะร่วม (nonspecific) (ตารางที่ 1-I) ซึ่งแสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในช่วงตั้งแต่มากกว่า 0.5 µg/ml แต่จำเป็นต้องศึกษาเพื่อปรับขั้นตอนการย้อมที่เหมาะสม โดยก่อนการ deparaffin จะต้องนำสไลด์ชิ้นเนื้อจุ่มใน xylene 30 นาที แทนการการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 60°C ในเบื่องตัน เมื่อใช้ anti-MMP-9 (M5302) ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 µg/ml และ anti-MMP-11 (M0806) ความเข้มข้น 3.0, 4.0, และ 5.0 µg/ml จะได้ผลการย้อมชัดเจนไม่มี nonspecific background แสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย้อม MMP-9 และ MMP-11 เท่ากับ 0.5 µg/ml และ 3.0 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1-II) เมื่อทดลองย้อมซ้ำโดยใช้ความเข้มข้น anti-MMP-9 (M5302) 0.5 µg/ml และ anti-MMP-11 (M0806) 3.0 µg/ml พบว่าได้ผลย้อมชัดเจน (3+) ไม่มี nonspecific background (ตารางที่ 1-III) โดยมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ของ Squamous cell ในชิ้นเนื้อควบคุม ดังรูปที่ 1

ผลย้อม MMP-9/MMP-11 โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีในตัวอย่างชิ้นเนื้อปากมดลูก

ผลย้อม MMP-9/MMP-11 ในชิ้นเนื้อปากมดลูก จำนวน 54 ราย ประกอบด้วย กลุ่มมะเร็งปากมดลูก 26 ราย และ กลุ่มมดลูกโต (myoma) ที่มีผล ThinPrep^R ให้ผลลบ 28 ราย โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วย anti-MMP-9 (M5302) 0.5 µg/ml และ anti-MMP-11 (M0806) 3.0 µg/ml ได้ผลย้อมชัดเจน โดยมีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ของเซลล์

Table 1 Optimization of immunohistochemistry staining for MMP-9 and MMP-11 with rabbit anti-MMP-9 (M5302) และ anti-MMP-11 (M0806)

Antibody concentration (µg/ml)	staining result		
	1-I	1-II	1-III
anti-MMP-9 (M5302)			
0.25	w+	/	/
0.5	?/bg	3+	3+
1.0	?/bg	3+	/
anti-MMP-11 (M0806)			
2.0	/	w+	/
3.0	/	3+	3+
4.0	/	3+	/
5.0	/	3+	/

w+ = weak, ? = not clear, bg = nonspecific background, 3+ = well and clear, / = not done

มะเร็งปากมดลูก ดังรูปที่ 1 และการแสดงออก MMP-9 ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก มีค่ามัธยฐานของ immunoreactive cell number score(A) =1.5; immunoreactive intensity score (B) =1; และ final score (A*B) = 2 โดยพบค่า final score > 6 ร้อยละ 23.08 (6/26 ราย) ค่า final score = 3-4 ร้อยละ 19.23 (5/26 ราย) ค่า final score = 1-2 ร้อยละ 23.08 (6/26 ราย) ค่า final score = 0 ร้อยละ 34.62 (9/26 ราย) เมื่อพิจารณาจากค่า final score > 0 ซึ่งบ่งถึงการแสดงออกของ MMP-9 พบในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งร้อยละ 65.38 (17/26 ราย) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ ตารางที่ 4

การแสดงออก MMP-11 ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก มีค่ามัธยฐานของ immunoreactive cell number score(A) =2; immunoreactive intensity score (B) = 1; และ final score (A*B) = 2 โดยมีค่า final score > 6 ร้อยละ 15.38 (4/26 ราย) ค่า final score = 3-4 ร้อยละ 19.23 (5/26 ราย) ค่า final score = 1-2 ร้อยละ 34.62 (9/26 ราย) ค่า final score = 0 ร้อยละ 30.77 (8/26 ราย) เมื่อพิจารณาจากค่า final score >0 ซึ่งบ่งถึงการแสดงออก MMP-11 พบในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งร้อยละ 69.23 (18/26 ราย) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ ตารางที่ 4

กลุ่มมดลูกโต (myoma) ตรวจไม่พบการแสดงออก MMP-9 และ MMP-11 ดังรูปที่ 1 ตารางที่ 3 และตารางที่ 4

วิจารณ์: การศึกษานี้สามารถพัฒนาวิธีตรวจหาการแสดงออกของ MMP-9/ MMP-11 ในชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ฝังในพาราฟิน ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของความเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 กับความรุนแรงของโรคมะเร็งปากมดลูกต่อไป โดยใช้ rabbit anti-MMP-9 (M5302) และ rabbit anti-MMP-11 (M0806) สำหรับย้อมชิ้นเนื้อปากมดลูกที่ฝังในพาราฟิน การศึกษาพบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการย้อม MMP-9 และ MMP-11 เท่ากับ 0.5 µg/ml และ 3.0 µg/ml ตามลำดับ การแช่ชิ้นเนื้อใน xylene นานขึ้น 30 นาที แทนการอุ่นสไลด์ชิ้นเนื้อที่ 60° ซ ก่อนการ deparaffin ได้ผลการย้อมติดชัดเจนขึ้นโดยไม่มี nonspecific background มีรูปแบบการติดสีกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic staining pattern) ของเซลล์ ผลการตรวจการแสดงผลการแสดงออก MMP-9 และ MMP-11 ในชิ้นเนื้อปากมดลูกพบว่า กลุ่มมะเร็งปากมดลูกร้อยละ 65.38 (17/26 ราย) มีค่า MMP-9 final score >0 ซึ่งบ่งถึงการแสดงออก MMP-9 โดยมีค่ามัธยฐานของ immunoreactive cell number score (A) =1.5; immunoreactive intensity score (B) =1; และ final

score (A*B) = 2 มีค่า MMP-11 final score >0 ซึ่งบ่งถึงการแสดงออก MMP-11 ร้อยละ 69.23 (18/26 ราย) โดยมีค่ามัธยฐานของ immunoreactive cell number score (A) =2; immunoreactive intensity score (B) = 1; และ final score (A*B) = 2 โดยกลุ่มมดลูกโต (myoma) ตรวจไม่พบการแสดงออก MMP-9 และ MMP-11 แสดงว่ากลุ่มมะเร็งปากมดลูก มีการแสดงออกของ MMP-9 และ MMP-11 สูงขึ้นในชิ้นเนื้อปากมดลูก เมื่อเทียบกับกลุ่มมดลูกโต (myoma) สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานการแสดงออก MMP-2, MMP-9, MMP-11 มีความสัมพันธ์กับมะเร็งหลายชนิด^{11,27,33-47)} เช่นมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-2 และ/หรือ MMP-9 กับการ invasion และ/หรือ metastasis ของมะเร็ง gastric³⁴⁾, thyroid³⁶⁾, breast³⁷⁾, ovarian³⁸⁾, squamous cell CA³⁹⁾, cervical cancer⁴⁰⁻⁴³⁾, endometrial carcinoma⁴⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่าง MMP-11 กับ invasive carcinoma หลายชนิด⁴⁵⁻⁴⁶⁾ เช่น colon, head, neck, prostate, breast⁴⁷⁾ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการทำ cDNA microarray ใน cervical cancer พบยีน MMP-9 และ MMP-11 มีการแสดงออกมากขึ้นในเซลล์มะเร็งปากมดลูก²⁷⁾

จากข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของ MMP-9/ MMP-11 ที่สูงขึ้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับระยะความรุนแรงของโรค หรือการกลับเป็นซ้ำ (cervical cancer recurrence) กับมะเร็งปากมดลูก โดย MMP-9/ MMP-11 ที่เพิ่มมากขึ้นน่าจะทำให้มีการย่อยสลาย basement membrane และ extracellular matrix บริเวณดังกล่าวมากขึ้นช่วยให้เซลล์มะเร็งสามารถบุกรุกหรือแพร่กระจายได้ซึ่งบ่งถึงการพัฒนาของมะเร็ง ดังนั้นข้อมูลการแสดงออกของ MMP-9/MMP-11 จึงน่าจะมีประโยชน์สำหรับใช้พยากรณ์ความรุนแรงของโรคหรือติดตามผลการรักษามะเร็งปากมดลูกได้เบื้องต้นอีกทางหนึ่ง การเพิ่มจำนวนตัวอย่างศึกษา การเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีการติดตามการรักษา (follow up case) และการตรวจแอกติวิตี้ของ MMP (activity assay) เพิ่มเติมจะช่วยให้สามารถอธิบายกลไกหน้าที่การทำงานได้ชัดเจนมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ: งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการวิทยามะเร็งและภูมิคุ้มกันระดับโมเลกุลในโรคมะเร็งปากมดลูก ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2549 และ 2550 และภายใต้การสนับสนุนบางส่วนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับทบวงมหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ MRG4680180

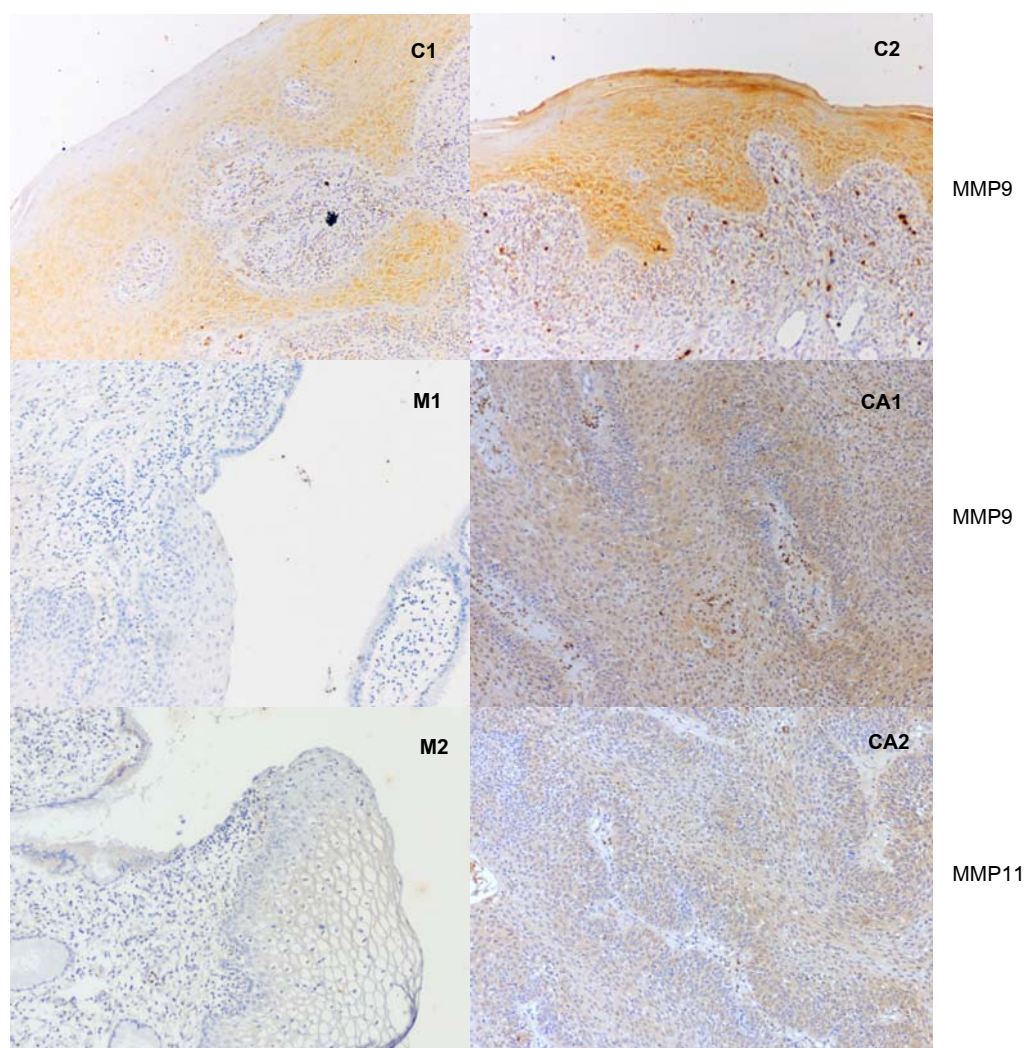


Figure 1 Immunohistochemical staining for MMP-9 and MMP-11. Gingival tissue sections (C1 and C2) of oral lichen planus (OLP) were stained with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of rabbit anti-MMP-9 (M5302) as positive controls. MMP-9 immunoreactivity was a cytoplasmic staining pattern of squamous cell with the staining scores (immunoreactive cell number $\times$ intensity) of 3 $\times$ 2 (final score=6) for C1 and 3 $\times$ 3 (final score=9) for C2. Cervical cancer cell in tissue sections showed cytoplasmic staining pattern with 3 $\times$ 2 (final score=6) for MMP-9 (CA1) and 3 $\times$ 1 (final score=3) for MMP-11 (CA2). Myoma cases (M1, M2) showed negative stained (staining score 0/0 and final score 0) for either MMP-9 or MMP-11. (DAB positive or immunoreactive cell number score; 0 < 10%, 1 = 10 - 40%, 2 = 40 - 60%, 3 > 60%, immunoreactive intensity score; 0 = no staining, 1 = weak staining, 2 = moderate staining, 3 = intense staining)

Table 2 Immunohistochemistry results using rabbit anti-MMP-9 (M5302) and anti-MMP-11 (M0806) to detect MMP-9/MMP-11 expression in cervical paraffin embedded tissues sections of 26 cervical cancer cases. Each immunoreactive cell number score (A), immunoreactive intensity score (B), final score (A*B) and median score were shown.

code	Cervical tissue sections code	anti-MMP-9 (M5302)			anti-MMP-11 (M0806)		
		staining score		Final Score	staining score		Final Score
		A	B	(A*B)	A	B	(A*B)
CA1	S43-8653A	3	1	3	3	1	3
CA2	S44-334A	3	1	3	0	0	0
CA3	S43-9484A	3	2	6	3	2	6
CA4	S42-3754A	3	2	6	3	3	9
CA5	S43-9713A	0	0	0	1	1	1
CA6	S44-916A	3	1	3	0	0	0
CA7	S44-498A	3	2	6	3	1	3
CA8	S44-941A	3	2	6	2	1	2
CA9	S44-537A	3	2	6	2	1	2
CA10	S43-889A	3	1	3	3	1	3
CA11	S44-1261A	1	2	2	1	2	2
CA12	S44-8206A	3	2	6	3	2	6
CA13	S44-261A	0	0	0	0	0	0
CA14	S44-228A	2	2	4	2	1	2
CA15	S45-8270A	0	0	0	0	0	0
CA16	S44-1413A	0	0	0	0	0	0
CA17	S44-2492A	2	1	2	3	2	6
CA18	S44-7071A	1	2	2	1	1	1
CA19	S44-2536A	1	1	1	2	2	4
CA20	S44-4891A	0	0	0	2	1	2
CA21	S44-6952A	0	0	0	0	0	0
CA22	S44-4220A	0	0	0	0	0	0
CA23	S44-2361A	0	0	0	2	2	4
CA24	S44-3473A	0	0	0	0	0	0
CA25	S44-4013A	1	1	1	1	1	1
CA26	S44-3782A	2	1	2	2	1	2
case number		26	26	26	26	26	26
median score		1.5	1	2	2	1	2

CA= cervical cancer cases; A*B= final score; A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%; B= immunoreactive intensity score; 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=intense

Table 3 Immunohistochemistry results using rabbit anti-MMP-9 (M5302) and anti-MMP-11 (M0806) to detect MMP-9/MMP-11 expression in cervical paraffin embedded tissues sections of 28 myoma cases. Each immunoreactive cell number score (A), immunoreactive intensity score (B), final score (A*B) and median score were shown.

code	Cervical tissue sections code	anti-MMP-9 (M5302)			anti-MMP-11 (M0806)		
		staining score		Final Score	staining score		Final Score
		A	B	(A*B)	A	B	(A*B)
My1	S47-979A	/	/	/	2	2	4
My2	S47-1988A	0	0	0	0	0	0
My3	S47-1806A	0	0	0	0	0	0
My4	S47-1362A	0	0	0	0	0	0
My5	S47-1719A	/	/	/	0	0	0
My6	S47-1907A	0	0	0	/	/	/
My7	S47-1989A	/	/	/	0	0	0
My8	S47-1753A	0	0	0	0	0	0
My9	S47-1461A	/	/	/	0	0	0
My10	S47-1410A	0	0	0	0	0	0
My11	S47-1244A	0	0	0	0	0	0
My12	S47-1245A	0	0	0	0	0	0
My13	S47-278A	0	0	0	/	/	/
My14	S47-655A	/	/	/	0	0	0
My15	S47-723A	/	/	/	0	0	0
My16	S47-540A	/	/	/	0	0	0
My17	S47-462A	/	/	/	0	0	0
My18	S47-1141A	0	0	0	0	0	0
My19	S47-407A	0	0	0	0	0	0
My20	S47-365A	0	0	0	0	0	0
My21	S47-928A	0	0	0	0	0	0
My22	S47-747A	/	/	/	0	0	0
My23	S47-141A	/	/	/	0	0	0
My24	S47-142A	0	0	0	/	/	/
My25	S47-369A	0	0	0	/	/	/
My26	S47-484A	/	/	/	0	0	0
My27	S47-700A	0	0	0	0	0	0
My28	S47-724A	/	/	/	0	0	0
case number		26	16	16	16	24	24
median score		1.5	0	0	0	0	0

My= myoma cases; A*B= final score, / = not tested; A= immunoreactive cell number score; 0 <10%, 1=10-40%, 2=40-60%, 3>60%; B= immunoreactive intensity score; 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=intense

Table 4 The final scores of MMP-9/MMP-11 immunohistochemistry results of cervical tissue sections using rabbit anti-MMP-9 (M5302) and anti-MMP-11 (M0806) in 26 cases of cervical cancer and 28 cases of myoma

immunohistochemistry result (Final score)	positive cases (%)		immunohistochemistry result (Final score)	positive cases (%)	
	MMP-9	MMP-11		MMP-9	MMP-11
Cervical cancer cases: N=26			Myoma cases: N=16		
0	9 (34.62)	8 (30.77)	0	16 (100.00)	24 (100.00)
1-2	6 (23.08)	9 (34.62)	1-2	0	0
3-4	5 (19.23)	5 (19.23)	3-4	0	0
>6	6 (23.08)	4 (15.39)	>6	0	0

เอกสารอ้างอิง:

1. FIGO. 1998. Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological cancer. *J Epid Biost* 3: 1-168.
2. Sevin BU, Nadji M, Lampe B, Lu Y, Hilsenbeck S, Koechli OR. 1995. Prognostic factors of early stage cervical cancer treated by radical hysterectomy. *Cancer* 76: 1978-86.
3. Lin HH, Cheng VF, Chan KW, Chen CK, Huang SC. 1996. Risk factor for recurrence in patients with stage Ib, IIa, and IIb cervical carcinoma after radical hysterectomy and postoperative pelvic irradiation. *Obstet Gynecol* 88: 274-9.
4. Ansink AC, De Barros Lopes A, Naik R, Monaghan JM. 1996. Recurrent stage IB cervical carcinoma: evaluation of the effectiveness of routine follow up surveillance. *Br J Obstet Gynaecol* 103: 1156-8.
5. Look KY, Rocereto TF. 1990. Relapse patterns in FIGO stage IB carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 38: 114-20.
6. Gerdin E, Cnattingus S, Jognson P, Pertterson B. 1994. Prognostic factors and relapse patterns in early-stage cervical carcinoma after brachytherapy and radical hysterectomy. *Gynaecol Oncol* 53: 314-9.
7. Larson DM, Copeland LJ, Malone JM, Stringer CA, Gershenson DM, Edwards CL. 1988. Diagnosis of recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy. *Obstet Gynecol* 71: 6-9.
8. Duyn A, van Eijkeren M, Kenter G, Zwinderman K, Ansink A. 2002. Recurrent cervical cancer: detection and prognosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81: 759-63.
9. Rich WM. Cancer of the cervix. Available from <http://www.gyncancer.com/cervix.html#screening>. Access on 2008.
10. Overall CM. 2002. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity. *Mol Biotech* 22: 51-86.
11. Barusrux S. 2007. Role of matrix metalloproteinases and its expression in cancer. *J Health Res* 21; 239-49.
12. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. 1998. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* 280: 898-902.
13. Birkedal-Hansen H., Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, *et al.* 1993. Matrix metalloproteinases: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197-250.
14. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. 1996. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271: 30375-80.
15. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. 1997. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74: 111-22.
16. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270: 5331-8.
17. Apte SS, Olsen BR, Murphy G. 1995. The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* 270: 14313-8.
18. Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, *et al.* 1997. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem*. 272: 20479-83.
19. Girard M, Matsubara M, Kublin C, Tessier MJ, Cintron C, Fini ME. 1993. Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodelling. *J Cell Sci* 104: 1001-11.
20. Fini M, Girard M, Matsubara M. 1992. Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol* 70: 26-33.
21. Legrand C, Gilles C, Zahm JM, Polette M, Buisson AC, Kaplan H, *et al.* 1999. Airway epithelial cell migration dynamics: MMP-9 role in cell-extracellular matrix remodeling. *J Cell Biol* 146: 517-29.
22. Renaud S, Erne B, Fuhr P, Said G, Lacroix C, Steck AJ, *et al.* 2003. Matrix metalloproteinases-9 and -2 in secondary vasculitic neuropathies. *Acta Neuropathol* 105: 37-42.
23. Kachra Z, Beaulieu E, Delbecchi L, Mousseau N, Berthelet F, Moumdjian R, *et al.* 1999. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clin Exp Metastasis* 17: 555-66.
24. Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. 1990. Immunohistochemical

distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. *Am J Pathol* 136: 585–92.

25. Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresh DA. 2001. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 119–24.
26. Urbanski SJ, Edwards DR, Hershfield N, Huchcroft SA, Shaffer E, Sutherland L, *et al.* 1993. Expression pattern of metalloproteinases and their inhibitors changes with the progression of human sporadic colorectal neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 2: 81–9.
27. Chen Y, Miller C, Mosher R, Zhao X, Deeds J, Morrissey M, *et al.* 2003. Identification of cervical cancer markers by cDNA and tissue microarrays. *Cancer Res* 63: 1927–35.
28. Kurman RJ, Solomon D. 1994. The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses: definitions, criteria, and explanatory notes for terminology and specimen adequacy. New York: Springer-Verlag.
29. Zhou ZJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ. 2001. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 28: 72–82.
30. Liu SS, Tsang BK, Cheung ANY, Xue WC, Cheng DKL, Ng TY, *et al.* 2001. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 37: 1104–10.
31. Lu Z, Friess H, Graber HU, Guo X, Schilling M, Zimmermann A, *et al.* 1997. Presence of Two Signaling TGF- β receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Dig Dis Sci* 42: 2054–63.
32. Barusux S, Wongsena W, Leelayuwat C, Paupairoj A, Jearanaikoon P, Yuenyao P, *et al.* 2008. Immunohistochemical staining for MICA expression in cervical cancer cells. *J Health Res* 22: 35–42.
33. Ray JM, Stetler-Stevenson WG. 1994. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7: 2062–72.
34. Albo D, Shinohara T, Tuszyński GP. 2002. Up-regulation of matrix metalloproteinase 9 by thrombospondin 1 in gastric cancer. *J Surg Res* 108: 51–60.
35. Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y. 1996. Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 69: 9–16.
36. Maeta H, Ohgi S, Terada T. 2001. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 438: 121–8.
37. Jones JL, Glynn P, Walker RA. 1999. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 189: 161–8.
38. Sakata K, Shigemasa K, Nagai N, Ohama K. 2000. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int J Oncol* 17: 673–81.
39. Chebassier N, Leroy S, Tenaud I, Knol AC, Dreno B. 2002. Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in squamous cell carcinomas of immunosuppressed patients. *Arch Dermatol Res* 294: 124–6.
40. Arguello-Ramirez J, Perez-Cardenas E, Delgado-Chavez R, Solorzaluna G, Villa-Trevin S, Arenas-Huertero F. 2004. Matrix metalloproteinases-2, -3, and -9 secreted by explants of benign and malignant lesions of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 14: 333–40.
41. Asha Nair S, Karunagaran D, Nair MB, Sudhakaran PR. 2003. Changes in matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during tumor progression in the uterine cervix. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 123–31.
42. Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. 2002. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol Rep* 9: 565–9.
43. Van Trappen PO, Ryan A, Carroll M, Lecoer C, Goff L, Gyselman VG, *et al.* 2002. A model for co-expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer. *Br J Cancer* 87: 537–44.
44. Di Nezza LA, Misajon A, Zhang J, Jobling T, Quinn MA, Ostor AG, *et al.* 2002. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of

matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. *Cancer* 94: 1466–75.

45. Mari BP, Anderson IC, Mari SE, Ning Y, Lutz Y, Kobzik L, *et al.* 1998. Stromelysin-3 is induced in tumor/stroma cocultures and inactivated via a tumor-specific and basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 276: 618–26.

46. Wang CS, Tetu B. 2002. Stromelysin-3 expression by mammary tumor-associated fibroblasts under in vitro breast cancer cell induction. *Int J Cancer* 99:792–9.

47. Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noel A, Chenard MP, Wolf C, *et al.* 1997. Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 26: 43–53.

MMP-9 AND MMP-11 EXPRESSION IN PARAFFIN EMBEDDED CERVICAL CANCER TISSUES BY IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUE

Sahapat Barusrux^{1,2,*} Wachanan Wongsena³ Wipawee Kaewpho⁴ Chanvit Leelayuwat^{1,2} Banchop Sripa⁵ Patcharee Jearanaikoon^{1,2} Arunrat Romphruk^{1,2} Temduang Limpai boon^{1,2} Pissamai Yuenyao⁵

¹Faculty of Associated Medical Sciences ²The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University ³Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University ⁴M.Sc. candidate in Medical Sciences, Khon Kaen University ⁵Department of Pathology ⁶Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

ABSTRACT: Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and Matrix metalloproteinase-11 (MMP-11) are protease enzymes produced by many of human cell types. MMPs can cleavage many component substances of basement membrane and extracellular matrix structure. Over-expression of MMP indicates the tissue structure breakdown event. This study aimed to set up MMP-9/MMP-11 expression method for paraffin embedded cervical tissues. The method will be useful for the correlation studying of MMP-9/MMP-11 expression and disease severity. MMP-9/MMP-11 expression detected by immunohistochemistry method was successfully set up with optimal concentration of 0.5 µg/ml rabbit anti-MMP-9 (M5302) and 3.0 µg/ml anti-MMP-11 (M0806). Immunoreactivity of MMP-9 and MMP-11 was shown as cytoplasmic pattern in cervical cancer cells. The scoring numbers of intensity and number of stained cells of cervical paraffin embedded tissues sections by these antibodies were multiplied for final score. Positive MMP-9/ MMP-11 expression (final score >0) was found 65.38% (17/26 cases)/ 69.23% (18/26 cases) in cervical cancer group and dysplasia group 64.71% (11/17 cases)/ 61.11% (11/18 cases) compared to 0% (0/16 cases)/ 0% (0/24 cases) in myoma group, respectively. In summary, the results showed over-expression of MMP-9/ MMP-11 in cervical tissue section of cervical cancer and dysplasia groups which supporting the correlation of cancer development and poor prognosis of cervical cancer.

Keywords: MMP-9, MMP-11, cervical cancer, immunohistochemistry

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: sahapat@kku.ac.th, dr_sahapat@yahoo.com