

基质金属蛋白酶-1、血管内皮生长因子在视网膜母细胞瘤中的表达及意义

Expression and Clinical Implication of Matrix Metalloproteinase-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Retinoblastoma

袁思奇 宋 华

赣南医学院第一附属医院眼科, 341000

Siqi Yuan, Hua Song

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China

目的: 检测基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP)-1及血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在视网膜母细胞瘤组织中表达情况,分析其与临床分级之间关系的临床意义。

方法: 采用免疫组化方法检测31例视网膜母细胞瘤组织MMP-1、VEGF表达,对两者的相关性进行统计学分析。

结果: MMP-1、VEGF蛋白在视网膜母细胞瘤组织中呈高表达,MMP-1主要表达于肿瘤细胞胞浆或胞膜中,VEGF主要表达于肿瘤细胞胞浆中,MMP-1、VEGF表达和临床分期密切相关($P < 0.05$),且其表达在不同临床分期期间差异有统计学意义($P < 0.05$),MMP-1、VEGF两者表达存在正相关($r = 0.787, P < 0.05$)。

结论: MMP-1、VEGF蛋白在视网膜母细胞瘤组织中呈高表达,两者表达与肿瘤临床分级密切相关,可能均参与视网膜母细胞瘤新生血管的生成,在肿瘤的浸润转移等中起重要作用。*眼科学报* 2010;25:45-48.

关键词: 视网膜母细胞瘤;基质金属蛋白酶-1;血管内皮生长因子;

Purpose: To investigate the expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinoblastoma and to identify their relationships with clinicopathology characteristics in order to determine their effects on the angiogenesis.

Methods: Thirty-one patients with histologically proved retinoblastoma were enrolled to examine the expression of MMP-1 and VEGF by Immunohistochemistry technique. The relationship between expression and the staging of tumor was analyzed.

Results: The MMP-1 and VEGF were highly expressed in retinoblastoma, and MMP-1, VEGF mainly expressed in tumor cells. MMP-1 and VEGF was positively correlated with tumor stage ($P < 0.05$). The expression MMP-1 was positively correlated with VEGF level ($R = 0.787, P < 0.00$).

Conclusions: The MMP-1 and VEGF are highly expressed in retinoblastoma cells. The expression is related to clinical invasion and metastasis. MMP-1 expression is positively related to VEGF level. MMP-1 and VEGF may play an important role in

angiogenesis and tumor progression in retinoblastoma. *Eye Science* 2010; 25: 45-48.

Key words: Retinoblastoma; Matrix metalloproteinase-1; Vascular endothelial growth factor

基质金属蛋白酶-1 (Matrix metalloproteinase, MMP) 是一类降解细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 的重要酶系。MMP 从 60 年代被发现以来新成员不断出现, 目前有 20 余种^[1]。它是中性内肽酶, 其活性需 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 存在。MMP-1 为其中一种, 其作用主要降解 I、II、III 型胶原, 促进血管生成。MMP 与其他细胞因子如: 金属蛋白酶组织抑制剂 (Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)、ECM、生长因子及细胞之间存在着复杂的网络调节机制, 异常的调节是疾病发生发展的原因。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 具有多种生物学功能, 与肿瘤的生长和转移密切相关。研究显示, VEGF 在视网膜母细胞瘤中异常高表达, 对于确定视网膜母细胞瘤的组织特性和生物学行为具有重要意义^[2]。MMP-1 在其他肿瘤中研究较多, 在视网膜母细胞瘤中涉及较少, 本研究通过免疫组化方法, 观察 VEGF 与 MMP-1 在视网膜母细胞瘤中的表达情况, 分析其相关性, 并探讨其表达的临床意义。

材料与方 法

一、研究对象

我院 2000 年 4 月-2009 年 4 月经病理活组织检查确诊的视网膜母细胞瘤 31 例 (31 眼)。男 23 例, 女 18 例, 年龄 5 个月~9 岁, 平均 3.3 岁。取患者石蜡包埋标本进行研究, 按照视网膜母细胞瘤组织中有无菊形团排列分为分化型和未分化型, 其中分化型 13 例, 未分化型 18 例; 肿瘤细胞浸润视神经者 14 例, 无浸润者 17 例。肿瘤旁正常视网膜组织 11 例作为对照。

二、主要试剂

即用型免疫组化超敏 ElivisionTMplus 试剂盒, 鼠抗人 MMP-1 单克隆抗体 (工作浓度 1:150), 鼠抗人 VEGF 单克隆抗体 (工作浓度 1:150), DAB 显色剂, 以上试剂均购自北京中山公司, 并严格按照其说明进行操作。

三、实验方法

免疫组织化学染色切片脱蜡至水, 3%过氧化

氢 (H_2O_2) 室温孵育 20 min; 10% 正常山羊血清室温孵育 10 min HIF-1 α 多克隆抗体, 其余按照 SP 试剂盒说明操作, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性切片作阳性对照。

四、结果判断标准

免疫组化染色阳性效应产物应为棕黄色颗粒。组织学评分用下列方法确定: ①阳性细胞百分率, 阳性细胞百分数小于 5%, 记为 0 分, 5%~35% 细胞显色记为 1 分, 36%~65% 细胞显色记为 2 分, 细胞显色大于 66%, 记为 3 分; ②显色程度, 不显色或显色不清为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 深褐色为 3 分。将两种评分相加除以 2, 作为该切片的最终评分, 分别将 0~1 分、1.5~2 分和 2.5~3 分定为阴性 (-)、阳性 (+) 和强阳性 (++)。

五、统计学处理

用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析, 对所得数据进行 χ^2 检验及直线相关分析。

结 果

一、视网膜母细胞瘤中 MMP-1 的表达

MMP-1 多见于肿瘤细胞胞浆及胞膜, 在肿瘤组中的阳性表达率为 61.3%, 在阴性对照组中未见表达, 在正常组中的阳性表达率为 18.2%, 肿瘤组与正常组的 MMP-1 阳性表达率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

MMP-1 在未分化型、分化型视网膜母细胞瘤的阳性表达率分别为 83.3% (15/18)、30.8% (4/13), 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。MMP-1 在有、无视神经浸润的视网膜母细胞瘤组织中的阳性表达率分别为 82.4% (14/17)、35.7% (5/14), 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

二、视网膜母细胞瘤中 VEGF 的表达

VEGF 多见于肿瘤细胞胞浆, 在肿瘤组中的阳性表达率为 74.2%, 在阴性对照组中未见表达, 在正常组中的阳性表达率为 9.1%。肿瘤组与正常组的 VEGF 阳性表达率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

VEGF在分化型、未分化型视网膜母细胞瘤的阳性表达率分别为 53.9%(7/13)、88.9%(16/18), 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在有、无视神经浸润的视网膜母细胞瘤组织中 VEGF 阳性表达率分别为 88.2%(14/17)、57.1%(8/14), 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

三、视网膜母细胞瘤中 MMP-1 与 VEGF 表达

及相关性分析

MMP-1 与 VEGF 在视网膜母细胞瘤组织中表达率分别为 61.3%、74.2%, 两者的免疫组化结果见表 3。两者在视网膜母细胞瘤组织中的阳性表达率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。经直线相关分析, 两者在视网膜母细胞瘤中表达呈明显正相关关系($r = 0.787, P < 0.05$)。

表 3 视网膜母细胞瘤中 MMP-1 与 VEGF 的免疫组化结果

例(%)

组别	例数	VEGF				MMP-1			
		-	+	++	阳性率	-	+	++	阳性率
分化组	13	6	6	1	(53.9)	9	4	0	(30.8)
未分化组	18	2	12	4	(88.9)	3	12	3	(83.3)
浸润组	17	2	12	3	(88.2)	3	12	2	(82.4)
无浸润组	14	6	6	2	(57.1)	9	4	1	(35.7)

讨 论

肿瘤的发生发展与癌基因的激活、抑癌基因的失活相关, 其中涉及到许多相关因子的参与。有研究表明^[3], 当肿瘤的直径超过 1~2 mm 时, 肿瘤的生长需要新生血管提供氧气及营养来维持其生长, 否则肿瘤细胞将凋亡。研究表明, 肿瘤的生长和转移依赖肿瘤细胞对缺氧的适应和新生血管形成, 故此血管形成被认为是肿瘤继续生长、转移及复发的先决条件^[4]。而新生血管形成的前提是基底膜的降解和内皮细胞迁移、增殖, 此过程受多种因子的调控。其中, MMP 与 VEGF 认为是肿瘤生长的关键因子^[5]。

目前 MMP 有 20 余种成员^[6]。它是中性内肽酶, 其活性需 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 存在。MMP-1 为其中一种, 在体外可由许多正常细胞(如巨噬细胞等)产生, 与其他多种 MMP 一样, 在正常休眠组织中 MMP-1 水平极低, 一般难以检测。当机体出现某些病理条件下, 其可广泛发挥其生物学功能, 如降解胶原组织, 促进血管生成。在肿瘤组织, 其主要表现为其强大的降解间质胶原作用, 促进了间质的破坏及加速癌细胞的转移。在肿瘤的生长中, 基膜是肿瘤细胞浸润扩散过程中的一道天然屏障。由肿瘤细胞和支持细胞产生的 MMP-1 可特异性地降解基质膜中的 I、II、III 型胶原, 使宿主基质膜丧失完整性。研究证实, MMP 的表达水平与癌的分期、淋巴结转移、预后等密切相关, 其活化形式与癌细胞

的侵袭性密切相关, MMP-1 的表达水平与淋巴结转移也有明显的相关性^[7]。本研究, 正常组中 MMP-1 低表达, 而肿瘤细胞则呈高表达, 与此同时在有视神经浸润的视网膜母细胞瘤组织中, MMP-1 阳性表达率明显高于无神经浸润者, 这一结果与既往的研究相似, 反映了 MMP-1 表达水平与视网膜母细胞瘤的恶性程度密切相关。

VEGF 是血管生成的刺激因子, 它参与肿瘤血管生成的多个环节。VEGF 可对血管内皮细胞增殖、水解基膜、迁移和血管构建等环节进行调控, 促进新生血管的形成。实体肿瘤的生长不仅取决于肿瘤细胞的种植效率和增生速度, 还取决于肿瘤新生血管的形成。研究表明 VEGF 可以激活蛋白水解酶系统, 进而促进细胞外基质降解, 从而促进血管新生^[8]。本研究肿瘤组 VEGF 表达比正常人明显升高, 且在未分化型和有视神经浸润者, 比分化型和无视神经浸润者明显要高, 这表明 VEGF 的表达与视网膜母细胞瘤相关, 且其表达水平的高低与视网膜母细胞瘤的恶性程度高度相关。

Edina 等^[9]在肺癌的研究中也发现 VEGF 与 MMP 存在一定的相关性, 其认为一方面 MMP 通过对基底膜分解, 促进 VEGF 及其他血管形成因子的作用, 另一方面, MMP 对细胞外基质的水解, 可促进毛细血管芽的形成。有研究显示, VEGF 与 MMP 两者在宫颈癌的血管生成及浸润、转移过程中具有某种内在联系, 认为 VEGF 可能会间接的促进 MMP 产生并增加其活性, 从而激活基质降

解,提高肿瘤细胞的穿透力,影响肿瘤浸润、转移^[10]。本研究视网膜母细胞瘤中 MMP-1 与 VEGF 表达正相关,与既往在其他肿瘤的研究结论相似,这提示 MMP-1 与 VEGF 可能存在某种内在的关联,共同在视网膜母细胞瘤的血管生成及浸润、转移过程其中重要的作用。但其内在的机制尚不明确,需进一步的研究加以探求。

参考文献

1. Visse R, Nagase H. Matrix metallo proteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92 (8): 827-839.
2. 姜影, 杜金荣, 张艳梅. 视网膜母细胞瘤 VEGF、PCNA 表达研究 [J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31 (5): 255-256.
3. Carron CP, Meyer DM, Pegg JA, et al. A Peptidylinhibitor antagonist of the integrin alpha (v) beta 3 inhibits leydig cell tumor growth and development of hypercalcemia of malignancy [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (9): 1930.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: the therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285 (21): 1182-1186.
5. Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, et al. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma [J]. *Ontology*, 2003, 64 (1): 61-73.
6. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure [J]. *Circulation*, 2000, 102 (16): 1944-1949.
7. Gouyer V, Conti M, Devos P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with non small cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent [J]. *Cancer*, 2005, 103 (8): 1676-1684.
8. 郑璐, 梁平, 李靖, 等. HDGF、VEGF 在人肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系 [J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32 (7): 680-683.
9. Edina T, Thorsten W, Cornelius K, et al. Expression of type IV collagenase correlates with the expression of vascular endothelial growth factor in primary non-small cell lung cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1997, 123 (5): 652-658.
10. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, et al. Overexpression of VEGF and antiangiogenic factor 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2003, 16 (6): 552-557.

(收稿日期: 2010-03-02 编辑: 林燕薇)

(上接第 25 页)

3. 杜磊, 邢怡桥, 陈长征. 小剂量曲安奈德玻璃腔内注射治疗黄斑水肿 [J]. *眼科新进展*, 2006, 26 (5): 372-374.
4. 徐海峰, 董晓光. 糖尿病性黄斑水肿的治疗 [J]. *国外医学眼科学分册*, 2004, 28 (6): 411-414.
5. Jonas JB, Kreissig I, Söfker A, et al. Intravitreal injection of triamcinolone for diffuse diabetic macular edema [J]. *Arch Ophthalmol*, 2003, 121 (1): 57-61.
6. Jonas JB, Martus P, Degenring RF, et al. Predictive factors for visual acuity after intravitreal triamcinolone treatment for diabetic macular edema [J]. *Arch Ophthalmol*, 2005, 123 (10): 1338-1343.
7. Audren F, Erginay A, Haouchine B, et al. Intravitreal triamcinolone acetate for diffuse diabetic macular edema: 6-month results of a prospective controlled trial [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2006, 84 (5): 624-630.
8. 艾华, 杨新光, 田冰玉, 等. 去炎松玻璃体腔内注射治疗视网膜中央静脉阻塞引起的黄斑水肿 37 例 [J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6 (6): 1427-1430.

(收稿日期: 2010-03-25 编辑: 刘建华)