

基质金属蛋白酶-2、基质金属蛋白酶-9 和血管内皮生长因子在视网膜母细胞瘤中的表达及意义

Expression of Matrix metalloproteinase-2, Matrix metalloproteinase-9 and Vascular Endothelial Growth Factor in Retinoblastoma and its Clinical Significance

周 林 徐 岬 康建芳

徐州医学院附属淮安医院, 淮安 223002

Lin Zhou, Jia Xu, Jianfang Kang

Huai'an Hospital of Xuzhou Medical College, Huai'an 223002, China

目的: 研究基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)中的表达及其与 RB 分化程度和视神经浸润的关系, 探讨它们在 RB 浸润、转移过程中的作用和临床意义。

方法: 采用免疫组化方法检测 40 例 RB 中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的表达。

结果: 40 例 RB 中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的阳性表达率分别为 52.5%、57.5%和 72.5%。未分化型 RB 中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的阳性表达均高于分化型($P < 0.05$); 有视神经浸润的 RB 中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的阳性水平均高于无视神经浸润的 RB ($P < 0.05$)。RB 中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的表达呈正相关关系($P < 0.05$)。

结论: RB 中 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 高表达与 RB 的浸润和转移相关, 且 MMP-2、MMP-9 表达与 VEGF 表达存在相关性。联合检测 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的表达可作为反映 RB 浸润、转移潜能的生物学指标, 有助于筛选转移高危病例及评价患者预后。《眼科学报》2010; 25: 59-62.

关键词: 视网膜母细胞瘤; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9; 血管内皮生长因子; 免疫组织化学

Purpose: To study the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in retinoblastoma (RB) and its relationship with the differentiation and optic nerve infiltration of RB, and to investigate the role of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and VEGF in the infiltration and metastasis of RB and their clinical significance.

Methods: Immunohistochemical technique was used to detect the protein expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF in 40 RB cases.

Results: The MMP-2, MMP-9 protein and VEGF protein expression were detected as positive in 52.5%, 57.5% and 72.5% of 40 RB cases respectively. The expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF was significantly higher in the undifferentiated pattern

than in the rosetted pattern ($P < 0.05$); and the expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF was significantly higher in tumors with optic nerve invasion than in those without optic nerve invasion ($P < 0.05$). In RB, the expression of MMP-2, MMP-9 had a positive correlation with the expression of VEGF.

Conclusions: In RB, high expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF is related to the invasion and metastasis of RB. The expression of MMP-2, MMP-9 is positively correlated with the expression of VEGF. The expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF may act as a biological marker for the invasion and metastasis of RB. The method may help screen and identify the cases with high risk for metastasis and to predict the prognosis of patients. *Eye Science 2010; 25: 59-62.*

Key words: Retinoblastoma; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemistry

视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)起源于视网膜胚胎性核层细胞,是婴幼儿最常见的、危害性最大的眼内恶性肿瘤,可危及患儿的视力甚至生命,新生儿发病率1/15 000~1/28 000^[1]。通常认为,RB患儿的预后与视神经浸润与否、有无眶内及远处转移有密切关系。

肿瘤的浸润与转移是一个多阶段、多种因子参与调控的过程,其中细胞外基质降解,肿瘤新生血管形成是其中的重要环节^[2-3]。近来的实验研究发现基质金属蛋白酶类(Matrix metalloproteinases, MMP)在恶性肿瘤的侵袭和转移中发挥着重要作用。MMP是一类锌依赖性蛋白水解酶,它们能够降解细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)和基膜的大多数蛋白质,其中相对分子质量为72的基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和相对分子质量为92的基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9),属于其家族中的明胶酶类,主要降解明胶和IV、V、VII、X型基膜胶原,使肿瘤细胞能够沿着受损的基底膜向着周围组织浸润,最终导致肿瘤的侵袭和转移^[4]。血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)可通过特异性作用于血管内皮细胞表面受体,促进血管内皮细胞有丝分裂,增加血管的通透性,为肿瘤的浸润,转移提供有利条件^[5]。

本实验采用免疫组化技术检测MMP2、MMP9和VEGF在RB中的表达,以探讨其与RB分化程度,视神经浸润和新生血管生成的关系,为指导临床治疗,判断预后提供理论依据。

资料与方法

一、一般资料

收集徐州医学院附属淮安医院病理科1989年至2010年2月接受眼球摘除术的RB患者,共40例,标本经10%福尔马林固定,石蜡包埋,40例术前均未进行化疗或放疗。其中男23例,女17例,年龄4个月~8岁,平均2.9岁。左眼22例,右眼18例。按照RB中是否有菊形团排列分为分化型15例和未分化型25例。肿瘤细胞浸润视神经13例,无浸润27例。

二、主要试剂

鼠抗人MMP-2单克隆抗体,鼠抗人MMP-9单克隆抗体,兔抗人VEGF多克隆抗体,免疫组化SP试剂盒,DAB显色剂,中性树胶等,均购自福州迈新公司。

三、免疫组织化学染色

用已知MMP-2, MMP-9, VEGF阳性表达的乳腺癌组织为阳性对照, PBS代替一抗为阴性对照,采用SP法进行染色。具体步骤如下:石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蒸馏水冲洗3遍。滴加3% H₂O₂去离子水,以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育10 min。VEGF水浴法进行还原热修复, MMP-2, MMP-9抗原无需修复。滴加一抗50 μl, 37℃孵育30 min, 4℃过夜, PBS漂洗3次。滴加生物素标记二抗(1:100)工作液1滴, 37℃孵育20 min, PBS洗涤3次。滴加SP(1:100), 37℃孵育20 min, PBS洗涤3次。DAB显色,光镜下观察染色结果满意后水洗终止,苏木精衬染,二甲苯透

明,梯度乙醇脱水,中性树胶封片。

四、结果判定标准

1. MMP-2 和 MMP-9: MMP-2 和 MMP-9 以细胞膜或细胞质内出现明显的黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色。按 Shimizu 评分标准进行半定量积分判断结果。阳性细胞数按无阳性细胞,阳性细胞数 $< 1/3$, $1/3 \sim 2/3$ 和 $> 2/3$ 分别判为 0、1、2、3 分,每张切片阳性细胞的着色强度按无着色,黄色,棕黄色和棕褐色分别判为 0、1、2、3 分,根据两项积分之和判断其结果:0~2 为阴性(-),3 为弱阳性(+),4~5 为强阳性(++).

2. VEGF: VEGF 染色阳性以细胞质呈现棕黄色颗粒状染色为标准,每张切片根据染色强度及阳性细胞百分数的多少进行评分:染色强度(0 分,阴性;1 分,弱阳性;2 分,中等阳性;3 分,强阳性)及阳性细胞百分率(0,无阳性细胞;1, $< 25\%$ 阳性细胞;2, $26\% \sim 50\%$ 阳性细胞;3, $> 50\%$ 阳性细胞)。两项分数之和为 0~2 分者计为 VEGF 表达阴性(-),3~4 分为弱阳性(+),5~6 分者为强阳性(++).

五、统计学分析

所有数据应用 SPSS 11.0 软件进行统计处理。采用 χ^2 检验及确切概率方法。

结 果

一、肿瘤组织与正常视网膜 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的表达

40 例 RB 中有 21 例 MMP-2 阳性表达,阳性表达率为 52.5%,23 例 MMP-9 阳性表达,阳性表达率为 57.5%,瘤旁正常视网膜组织 MMP-2, MMP-9 均为阴性表达。有 29 例 VEGF 阳性表达,阳性表达率为 72.5%,4 例瘤旁正常视网膜组织 VEGF 轻度表达,细胞质及细胞膜染色呈淡黄色,其余 36 例阴性表达。

二、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 表达与 RB 分化程度的关系

MMP-2 阳性表达率在未分化型 RB 组织中为 64% (16/25),分化型为 33.3% (5/15),两者间有统计学差异 ($P < 0.05$); MMP-9 阳性表达率在未分化型 RB 组织中为 68% (17/25),分化型为 40% (6/15),两者间有统计学差异 ($P < 0.05$); VEGF 阳性表达率在未分化型 RB 组织中为 84% (21/25),分化型为 53.3% (8/15),两者间有统计学差异 (P

< 0.05)。

三、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 表达与 RB 视神经浸润的关系

有、无视神经浸润的 RB 组织中 MMP-2 阳性表达率分别为 92.3% (12/13), 33.3% (9/27), 两者间有统计学差异 ($P < 0.05$)。MMP-9 阳性表达率分别为 100% (13/13), 37% (10/27), 两者间有统计学差异 ($P < 0.05$)。VEGF 阳性表达率分别为 100% (13/13), 59.3% (16/27), 两者间有统计学差异 ($P < 0.05$)。

四、相关性分析

RB 组织中, VEGF 分别与 MMP-2、MMP-9 表达呈明显正相关 ($r = 0.926, 0.892$, 均 $P < 0.05$)。

讨 论

肿瘤侵袭和转移的基本过程是瘤细胞从原发瘤脱离后侵犯周围和(或)远处组织,涉及瘤细胞穿过 ECM 屏障、血管壁的基底膜,以及穿出血管壁进入宿主微环境的过程。ECM 是肿瘤侵袭和转移的重要组织屏障。基质金属蛋白酶对基底膜中细胞外基质的降解是肿瘤浸润和转移的关键步骤之一。MMP 是一类具有 Zn^{2+} 依赖性的内源性蛋白水解酶,其中属于明胶酶的明胶酶 A (MMP-2) 和明胶酶 B (MMP-9) 主要降解明胶和 IV、V、VII、X 型基底膜胶原,在细胞与基质间的粘附起着重要的作用^[6-7]。有研究显示,肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤细胞产生 MMP-2 和 MMP-9 的能力有着密切的正相关关系,它们不仅参与细胞外基质的降解,而且还对肿瘤细胞的粘附能力和能动性有影响^[8]。在胃癌、乳腺癌、结肠癌等多种恶性肿瘤中都有 MMP-2 和 MMP-9 的显著提高^[6-7,9]。

本研究发现, RB 组织中 MMP-2 的阳性表达率为 52.5%, MMP-9 的阳性表达率为 57.5%, 而瘤旁正常视网膜组织 MMP-2、MMP-9 均呈阴性表达,提示 MMP-2 和 MMP-9 可能在 RB 的发生、发展中起着重要的作用。本研究还发现, MMP-2 和 MMP-9 的表达与 RB 组织学类型及视神经浸润密切相关。未分化型 RB 组织中 MMP-2 阳性表达率为 64%, MMP-9 阳性表达率为 68%, 两者均明显高于分化型。有视神经浸润 RB 中 MMP-2 阳性表达率为 92.3%, MMP-9 阳性表达率为 100%, 也都明显高于无视神经浸润的 RB, 进一步证实了 RB

中 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平与肿瘤的恶性程度及侵袭能力有关。

由于新生血管的生成是肿瘤生长和转移的前提条件。RB 就是一种与血管生成关系密切的恶性肿瘤。RB 的发生与发展,与多种细胞因子的表达有关^[10],VEGF 及其受体 VEGFR 就是其中的信号分子之一,它们能促进肿瘤血管形成,对血管内皮细胞的增殖、迁移,水解基膜和构建血管的调控作用较强,因而与肿瘤的生长、侵袭及转移关系密切^[11]。

本研究结果显示 VEGF 在 RB 中的阳性表达率为 72.5%,明显高于正常视网膜组织,提示 VEGF 可能在 RB 肿瘤生长转移过程中起重要作用。本研究还发现,VEGF 表达与 RB 的组织学分型及有无视神经浸润密切相关。未分化型 RB 组织中 VEGF 阳性表达率为 84%,明显高于分化型。有视神经浸润的 RB 中 VEGF 阳性表达率为 100%,明显高于无视神经浸润的 RB,均证实 RB 中 VEGF 的表达水平与肿瘤细胞的侵袭能力密切相关。

本研究结果显示,MMP-2、MMP-9 和 VEGF 在 RB 中的高表达有明显正相关性,说明 MMP 是重要的血管生成正性调节剂,可以通过激活 VEGF 并上调 VEGF 的表达,促进 RB 组织中新生血管的生成。机理可能是 MMP 对血管基膜和细胞外基质的反复降解,有利于血管内皮细胞迁徙,促进新生血管形成;而 VEGF 又改变了内皮细胞的活化形式,可以刺激内皮细胞产生 MMP 或者通过调控 MMP 与其抑制物之间的平衡,从而激活基质降解的瀑布式反应,使肿瘤细胞更容易穿透基质,促进肿瘤的浸润和转移^[12]。

总之,对 RB 组织进行 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的联合检测,不仅可以判断肿瘤的生物行为,也为探讨肿瘤治疗提供了一个新思路,通过抑制 MMP-2、MMP-9、VEGF 的表达,阻断其活性,有效调节血管生成的途径,抑制 RB 的浸润和转移,降低肿瘤恶性程度,从而为今后使用人工合成金属蛋白酶抑制剂或反义寡核苷酸治疗 RB 提供理论依据和新的策略。

参考文献

1. 葛 坚. 眼科学[M].北京:人民卫生出版社,2002, 194.
2. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2;a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2003,16(6): 552-557.
3. Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer [J]. *Essays Biochem*, 2002,38(1):21-36.
4. Maeta H, Ohgi S, Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas [J]. *Virchows Arch*, 2001,438(2):121-128.
5. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress [J]. *Endocr Rev*, 2004,25 (4):581-611.
6. Ogata Y, Miura K, Ohkita A, et al. Imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression by tumor cells implicated in liver metastasis from colorectal carcinoma[J]. *Kurume Med J*, 2001,48(3):211-218.
7. Zhang S, Li L, Lin JY, et al. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2003,9(5):899-904.
8. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998,10(5):602-608.
9. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration [J]. *Pathol Int*, 2002,52(4):255-264.
10. 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.
11. Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis [J]. *Blood*, 2000,96(2):546-553.
12. Rooprai HK, Rucklidge GJ, Panou C, et al. The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells[J]. *Br J Cancer*, 2000,82(1):52-55.

(收稿日期:2010-03-15 编辑:杨江瑜)