

基质金属蛋白酶-2 和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子在视网膜母细胞瘤中的表达

程育宏¹, 史强¹, 申家泉², 王理论³, 刘思伟¹

作者单位:¹(710061)中国陕西省西安市,西安交通大学医学院第一附属医院眼科;²(250021)中国山东省济南市,山东大学附属省立医院眼科;³(716000)中国陕西省延安市,延安大学附属医院眼科

作者简介:程育宏,男,毕业于山东大学,硕士,主治医师,研究方向:玻璃体视网膜疾病、眼肿瘤。

通讯作者:刘思伟,男,毕业于西安交通大学,博士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:白内障、眼肿瘤。whyhsw@vip.sina.com

收稿日期:2015-04-07 修回日期:2015-06-08

Expressions of matrix metalloproteinase-2 and extracellular matrix metalloproteinase inducer in retinoblastoma

Yu-Hong Cheng¹, Qiang Shi¹, Jia-Quan Shen², Li-Lun Wang³, Si-Wei Liu¹

¹Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China;²Department of Ophthalmology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China;³Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Si-Wei Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. whyhsw@vip.sina.com

Received:2015-04-07 Accepted:2015-06-08

Abstract

• AIM: To investigate expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) in retinoblastoma (Rb) and the relationships between MMP-2, EMMPRIN and tumor development.

• METHODS: Immunohistochemical technique was used to detect expressions of MMP-2 and EMMPRIN in 39 cases of paraffin embedded Rb samples. Quantitative analysis of expressions of MMP-2 and EMMPRIN were assessed by measuring the mean gray scale of Rb tissue with LEICA IM50 Color Pathologic Analysis System. The differences of expressions of MMP-2 and EMMPRIN in each clinical and pathological stage were statistically analyzed, and the same step was also undertaken to study the relationship between Rb with MMP-2 positive expression and that with EMMPRIN positive expression.

• RESULTS: The positive expression rate of MMP-2 was 90% (Gray value: 109.64 ± 14.52 ; 35/39), and that of EMMPRIN was 85% (Gray value: 108.01 ± 13.60 ; 33/39). The expressions of MMP-2 and EMMPRIN were significantly higher in tumors of glaucomatous stage (Gray value: 108.21 ± 11.47 and 107.56 ± 14.32) than those in intraocular stage (Gray value: 121.13 ± 11.32 and 119.34 ± 12.66 ; $P < 0.01$ and $P < 0.05$). And the same conclusion can be concluded between those in extraocular stage (Gray value: 91.03 ± 11.71 and 92.26 ± 12.93) with those in glaucomatous stage ($P < 0.01$ and $P < 0.05$). The expressions of MMP-2 and EMMPRIN were significantly higher in tumors with optic nerve invasion (Gray value: 103.89 ± 13.39 and 105.23 ± 14.00) than those without optic nerve invasion (Gray value: 118.39 ± 15.11 and 117.53 ± 16.13) ($P < 0.01$ and $P < 0.05$).

• CONCLUSION: The positive expression levels of MMP-2 and EMMPRIN may correlate with tumor infiltration and metastasis.

• KEYWORDS: retinoblastoma; matrix metalloproteinase-2; extracellular matrix metalloproteinase inducer; immunohistochemistry; pathologic

Citation: Cheng YH, Shi Q, Shen JQ, et al. Expressions of matrix metalloproteinase-2 and extracellular matrix metalloproteinase inducer in retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(7):1154-1157

摘要

目的:探讨基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)在视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)中的表达及其与临床病程的关系。

方法:用免疫组织化学SABC法分别检测39例Rb中MMP-2及EMMPRIN的表达;用LEICA IM 50型全自动医学图像分析系统测量其平均灰度值,比较不同临床和病理阶段Rb中表达MMP-2和EMMPRIN的差异及二者阳性表达之间的关系。

结果:Rb患者39例中MMP-2阳性表达35例(灰度值为 109.64 ± 14.52),占90%;EMMPRIN阳性表达33例(灰度值为 108.01 ± 13.60),占85%;青光眼期Rb中MMP-2和EMMPRIN的表达(灰度值分别为 108.21 ± 11.47 , 107.56 ± 14.32)明显高于眼内期(灰度值分别为 121.13 ± 11.32 , 119.34 ± 12.66 ; $P < 0.01$, $P < 0.05$),眼外期二者表达(灰度值分别为 91.03 ± 11.71 , 92.26 ± 12.93)明显高于青光眼期($P < 0.01$, $P < 0.05$);视神经浸润组Rb中MMP-2和

EMMPRIN 的表达(灰度值分别为 103.89 ± 13.39 , 105.23 ± 14.00)明显高于无视神经浸润组(灰度值分别为 118.39 ± 15.11 , 117.53 ± 16.13 ; $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

结论: MMP-2 及 EMMPRIN 的表达水平可能与 Rb 的浸润转移有关。

关键词: 视网膜母细胞瘤; 基质金属蛋白酶-2; 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 免疫组织化学; 病理性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.7.09

引用: 程育宏, 史强, 申家泉, 等. 基质金属蛋白酶-2 和细胞外基质金属蛋白酶诱导因子在视网膜母细胞瘤中的表达. 国际眼科杂志 2015;15(7):1154-1157

0 引言

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)起源于视网膜胚胎性核层细胞,是一种婴幼儿最常见的、危害性最大的眼内恶性肿瘤,可危及患儿的视力甚至生命。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。近年来的研究发现基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2),以及细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)在促进肿瘤的侵袭转移中发挥着重要作用^[1]。本次研究运用免疫组织化学法检测了 MMP-2 和 EMMPRIN 在视网膜母细胞瘤中的表达,分析其与临床病程的关系,探讨其在肿瘤浸润转移中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验所有石蜡包埋标本均来自山东省立医院眼科病理室自 1988-03/2005-12 间接受眼球摘除术的 Rb 患者 39 例,其中男 16 例,女 23 例。年龄 3 月龄~8 岁,平均 2.88 ± 5.32 岁。通过调阅病历及病理诊断书确定临床分期:眼内期 22 例,青光眼期 11 例,眼外扩展期 6 例,全身转移期 0 例;有视神经浸润 18 例,无视神经浸润 21 例;双眼发病 1 例。所有病例均经病理确诊。主要试剂:兔抗人 MMP-2 单克隆抗体,工作浓度为 1:100;兔抗人 EMMPRIN 单克隆抗体,工作浓度为 1:100,即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(包括羊抗小鼠 IgG 二抗、DAB 显色剂、SABC),中性树胶均购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 实验方法 免疫组织化学法。以 MMP-2 和 EMMPRIN 均为阳性的乳腺癌组织为阳性对照。具体步骤:石蜡标本行 $4\mu\text{m}$ 厚连续切片,脱蜡,梯度乙醇脱水,3%过氧化氢乙醇溶液孵育 10min,以灭活内源性过氧化氢酶,蒸馏水洗涤 10min;枸橼酸盐缓冲液内微波修复抗原, $92^\circ\text{C} \sim 98^\circ\text{C}$, 10min,室温冷却, PBS 洗涤 3 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20min,不洗;滴加一抗(用 PBS 代替一抗为阴性对照), 4°C 湿盒过夜, PBS 洗涤 3 次;滴加二抗工作液, 37°C 湿盒内孵育 20min, PBS 洗涤 3 次;滴加试剂 SABC, 37°C 10min, PBS 洗涤 4 次; DAB 显色,光镜下控制,观察染色结果满意后水洗终止,苏木素复染细胞核,二甲苯透明,梯度乙醇脱水。自然晾干后中性树胶封片。

1.2.2 观察方法 光学显微镜下观察, Rb 切片组织中胞浆和/或胞膜上出现较多棕黄色颗粒为阳性表达,无棕黄色颗粒出现为阴性表达。并在 LEICA IM50 型全自动医学图像分析系统的 10×40 倍光镜下测量 Rb 切片组织中

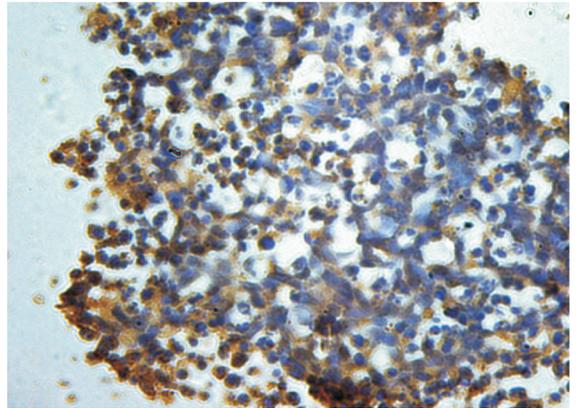


图1 MMP-2 在 Rb 组织中的阳性表达 (SABC $\times 400$)。

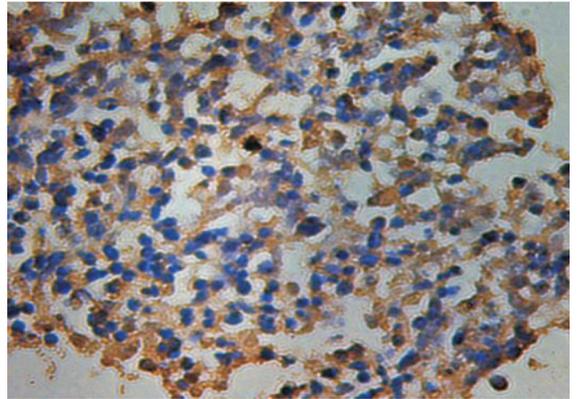


图2 EMMPRIN 在 Rb 组织中的阳性表达 (SABC $\times 400$)。

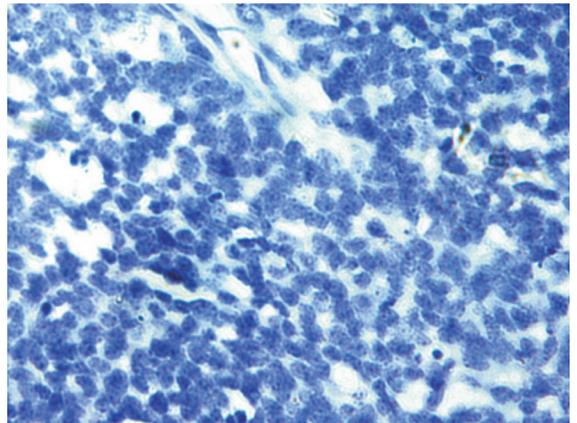


图3 阴性对照在 Rb 组织中无棕黄色染色出现 (SABC $\times 400$)。

MMP-2 和 EMMPRIN 表达的灰度值,每张切片随机选取 5 个视野,算出其平均值为每张切片的灰度值。灰度值愈小其阳性表达水平愈高,反之则表达水平愈低。

统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件。进行独立样本 t 检验以及单因素方差分析和 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-2 和 EMMPRIN 在 Rb 中的阳性和阴性表达

Rb 标本 39 例中,检测到 MMP-2 阳性表达 35 例,表达率为 90% (35/39); EMMPRIN 阳性表达 33 例,表达率为 85% (33/39),二者皆表现为胞浆和/或胞膜呈现出棕黄色着色(图 1,2)。MMP-2 阴性表达 4 例,占 10% (4/39); EMMPRIN 阴性表达 6 例,占 15% (6/39,图 3)。经独立样本 t 检验, MMP-2 和 EMMPRIN 在阳性和阴性组中的灰度值表达差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 1。

表1 视网膜母细胞瘤中 MMP-2 及 EMMPRIN 阳性组与阴性组表达水平比较

名称	例数	灰度值	t	P
MMP-2				
阳性	35	109.64±14.52	3.068	0.002
阴性	4	132.37±6.33		
EMMPRIN				
阳性	33	108.01±13.60	4.310	0.000
阴性	6	133.63±11.98		

表2 视网膜母细胞瘤中有视神经浸润组与无视神经浸润组 MMP-2 及 EMMPRIN 表达水平比较

名称	例数	灰度值	t	P
MMP-2				
有视神经浸润	18	103.89±13.39	3.147	0.002
无视神经浸润	21	118.39±15.11		
EMMPRIN				
有视神经浸润	18	105.23±14.00	2.521	0.016
无视神经浸润	21	117.53±16.13		

表3 视网膜母细胞瘤中 MMP-2 及 EMMPRIN 在临床各期表达水平比较

名称	例数	灰度值
MMP-2		
眼内期	22	121.13±11.32
青光眼期	11	108.21±11.47 ^{b,d}
眼外期	6	91.03±11.71 ^b
EMMPRIN		
眼内期	22	119.34±12.66
青光眼期	11	107.56±14.32 ^{a,c}
眼外期	6	92.26±12.93 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 眼内期; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 眼外期。

2.2 MMP-2 和 EMMPRIN 在 Rb 有视神经浸润和无视神经浸润组中的表达 Rb 标本 39 例中,有视神经浸润者 18 例(46%),无视神经浸润者 21 例(54%)。经独立样本 t 检验, MMP-2 和 EMMPRIN 在有视神经浸润和无视神经浸润组中灰度值的表达差异具有统计学意义 (P<0.01, P<0.05),见表 2。

2.3 MMP-2 和 EMMPRIN 在 Rb 临床各期中的表达 Rb 患者 39 例中,眼内期 22 例,青光眼期 11 例,眼外扩展期 6 例,经单因素方差分析,总体比较 MMP-2 和 EMMPRIN 在 Rb 临床各期中的表达有统计学意义 (F=17.65, 10.77; P<0.05), LSD-t 检验进行两两比较,眼内期与青光眼期及眼外扩展期、青光眼期与眼外扩展期 MMP-2 及 EMMPRIN 表达差异均具有统计学意义 (P<0.05),见表 3。

3 讨论

恶性肿瘤的局部侵袭和转移要经过以下几个过程: (1)肿瘤细胞脱离癌巢; (2)诱导、产生蛋白酶等降解细胞外基质; (3)侵入血管及淋巴管; (4)到达远处,穿出血管及淋巴管; (5)黏附于局部,诱导产生新生血管,局部生长^[2]。ECM 是肿瘤侵袭和转移的重要组织屏障,其中降解细胞外基质的蛋白酶主要是 MMP。MMP-2 属于其

家族中的明胶酶类,可控制肿瘤新生血管生成、影响细胞黏附分子的功能以及调控肿瘤细胞的生长等,其高表达可导致细胞外基质和血管基底膜的降解加速,使肿瘤细胞易于移出癌巢和进出血管从而促进其侵袭、转移^[3,4]。EMMPRIN 是由肿瘤细胞产生的一种跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族中的一员,可通过肿瘤细胞与肿瘤间质中成纤维细胞间的相互作用促进成纤维细胞分泌 MMP-1, MMP-2, MT1-MMP, 也可通过肿瘤细胞与肿瘤细胞间的相互作用促进肿瘤细胞分泌 MMP-2,对 ECM 进行降解^[5];同时它也可以通过一种旁分泌的方式作用于血管内皮细胞,通过调节内皮细胞 MMPs 的产生,上调肿瘤中血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达水平,参与生成肿瘤新生血管,共同促进肿瘤细胞的浸润转移^[6-8]。

本实验通过免疫组化研究发现, MMP-2 和 EMMPRIN 在 Rb 组织中的阳性表达率分别为 90% 和 85%),阳性组 MMP-2 和 EMMPRIN 表达的灰度值明显低于阴性组 (P<0.01),青光眼期 Rb 中 MMP-2 和 EMMPRIN 表达的灰度值低于眼内期 (P<0.01, P<0.05),眼外期低于青光眼期 (P<0.01, P<0.05),视神经浸润组中二者表达的灰度值明显低于无视神经浸润组 (P<0.01, P<0.05),提示了 MMP-2 和 EMMPRIN 的高表达可能与 Rb 的侵袭转移能力增强及肿瘤的预后不良有关。Zhou 等^[9]应用免疫组织化学 SP 法检测 40 例 Rb 组织中 MMP-2 和 MMP-9 的表达,发现 MMP-2 和 MMP-9 的阳性表达率分别为 52.5%, 57.5%, 而且有视神经浸润的肿瘤 MMP-2 和 MMP-9 表达水平明显高于无视神经浸润的肿瘤 (P<0.05),处于眼外期的肿瘤 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平明显高于眼内期和青光眼期的肿瘤 (P<0.05),认为 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平与视神经浸润和临床分期存在密切的关系,其表达水平与该肿瘤的浸润与发展有关。Adithi 等^[10]运用免疫组化和免疫印记法对 60 例 Rb 进行检测,发现 EMMPRIN 的阳性表达率为 64%,同时伴有 MMP-2 和 MMP-9 的高表达 (66%, 61%) 以及 TIMPs 的低表达;在发生转移的 Rb 中 EMMPRIN 强阳性表达 (3+) 率为 39%,而在未发生转移的病例中仅为 3%,认为在 Rb 中 EMMPRIN 对 MMP-2 的表达具有上调作用,且二者在肿瘤的浸润转移中起着重要作用。其结果与本实验结果一致都发现了 Rb 中 EMMPRIN 和 MMP-2 的高表达。

本实验通过对 MMP-2 和 EMMPRIN 在 Rb 中的表达水平进行比较发现,提示二者在 Rb 中可能具有共同表达作用,促进 Rb 的浸润转移。在其他肿瘤中也发现了类似的现象。如 Nabeshima 等^[11]通过对周围神经鞘瘤的研究发现,EMMPRIN 在恶性神经鞘瘤中的阳性表达率明显高于良性神经鞘瘤。EMMPRIN 分泌和激活 MMP-2,使其具备了降解 ECM 的能力,对 ECM 进行降解,以及二者可上调肿瘤中 VEGF 的表达水平以利于肿瘤的血管新生^[5,8],这些都可能是 MMP-2 和 EMMPRIN 共同促进 Rb 浸润转移的机制。若能在分子及转录水平阐明 MMP-2 和 EMMPRIN 与 Rb 肿瘤间的作用机制,对其信号传导途径进行干扰,将有助于为 Rb 的临床治疗寻找新的途径,改善患者的预后。

参考文献

1 Dalberg K, Eriksson E, Eaberg U. Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression; correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg* 2000;24(3):334-340

2 Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001;45(11):833-835

3 Sharma R, Chattopadhyay TK, Mathur M, et al. Prognostic significance of stromelysin-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in esophageal cancer. *Oncology* 2004;67(4):300-309

4 Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10(2):383-392

5 Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001;61(5):2276-2281

6 Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B. EMMPRIN mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002;19(8):697-702

7 Menashi S, Serova M, Ma L. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase expression by amphiregulin intratransformed human breast epithelial cells. *Cancer Res* 2003;63(22):7575-7580

8 Tang Y, Nakada MT, Kesavan P. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating Vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 2005;65(8):3193-3199

9 Zhou L, Xu J, Kang J. Expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in retinoblastoma and its clinical significance. *Yan Ke Xue Bao* 2010;25(1):62-64

10 Adithi M, Nalini V, Kandalam M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29(6):399-405

11 Nabeshima K, Iwasaki H, Nishio J, et al. Expression of emmprin and matrix metalloproteinases (MMPs) in peripheral nerve sheath tumors; emmprin and membrane-type (MT)1-MMP expressions are associated with malignant potential. *Anticancer Res* 2006;26(2B):1359-1367

科技期刊对论文摘要的要求

根据有关规定,可以把摘要编写要求归纳成如下几点。

省略“我们”“作者”“本文”这样的主语。

简短精练,明确具体。简短,指篇幅短,一般要求50~300字(依摘要类型而定);精炼,指摘录出原文的精华,无多余的话;明确具体,指表意明白,不含糊,无空泛、笼统的词语,应有较多而有用的定性和定量的信息。

一般不要交代背景,更不要阐述一般性知识。

格式要规范,尽可能用规范术语,不用非共知共用的符号和术语。不得简单地重复题名中已有的信息,并切忌罗列段落标题来代替摘要。除了实在无变通办法可用以外,一般不出现插图、表格,以及参考文献序号,一般不用数学公式和化学结构式。不分段。

摘要一般置于作者及其工作单位以后,关键词之前。

摘自《科学技术期刊编辑教程》