

### 【临床研究】

婴幼儿时期视网膜母细胞瘤(retinal glioblastoma, RB)是眼科常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>。目前, RB的病因仍不完全明确, 可能与遗传、病毒感染等因素

有关<sup>[3]</sup>。本研究旨在通过观察 RB 组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达,探讨其与新生血管形成、视神经浸润及 RB 分化程度的关系,为 RB 的治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般对象 选择 2010 年 1 月至 2014 年 3 月在湖北医药学院附属襄阳医院眼科接受手术治疗的 RB 患者的 RB 组织和癌旁正常组织标本各 30 例,男 18 例,女 12 例,平均年龄(5.2 ± 2.6)岁,平均体质量指数(20.2 ± 3.2) kg · m<sup>-2</sup>,发现肿瘤时间(2.2 ± 0.8)个月,手术时间(120.1 ± 42.5) min;未分化型 18 例,分化型 12 例;有视神经浸润 13 例,无视神经浸润 17 例。所有患儿均接受眼球摘除术,术前均未接受放射和化学治疗。

1.2 主要试剂和仪器 鼠抗人 TIMP-1 和 MMP-9 抗体工作液(美国 Stanta Cruz 公司),兔抗人 VEGF 抗体工作液、二氨基联苯胺显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司),PV6000 通用型试剂盒(美国 Zymed 公司);德国 L24012-I 型石蜡切片机,日本 Olympus BH-2 显微摄影器材。

1.3 VEGF、TIMP-1 和 MMP-9 表达检测 采用免疫组织化学法测定 VEGF、TIMP-1 和 MMP-9 的表达。将石蜡块切成 4 μm 厚的切片,放入二甲苯中脱蜡,梯度乙醇水化;孵育后将内源性的过氧化物酶阻断;洗涤后使用微波进行抗原修复处理;分别注入 VEGF、TIMP-1 和 MMP-9 抗体,孵育;洗涤后加入通用型 PV6000 多聚体,孵育;洗涤后用新配置的 3,3'-二氨基联苯胺显色剂进行显色反应;用蒸馏水冲洗后进行苏木精复染处理;脱水、透明,最后用中性树脂胶封片。阴性对照为用磷酸盐缓冲溶液分别替代 3 种一抗,阳性对照为已知表达为阳性的组织切片。

1.4 结果判定标准 (1)VEGF 阳性染色的标准:以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性表达,每张切片评分依据为阳性细胞的比例以及染色强度进行评分:阳性细胞 > 50% 为 3 分,26% ~ 50% 为 2 分;10% ~ 25% 为 1 分;< 10% 为 0 分;染色强度呈强阳性为 3 分;中等阳性为 2 分;弱阳性为 1 分;阴性为 0 分;2 项分数之和即为 VEGF 最终阳性程度评分;5 ~ 6 分为强阳性(++) , 3 ~ 4 分为弱阳性(+) , 0 ~ 2 分为阴性(-)。(2)TIMP-1 和 MMP-9:均以细胞质内或细胞膜呈现为棕黄色或黄色的颗粒为阳性表达,依据 Shimizu 评分标准<sup>[4]</sup>对结果实施半定量积分法判

定,阳性细胞数 > 50% 为 3 分,30% ~ 50% 为 2 分,10% ~ 29% 为 1 分,< 10% 为 0 分;每张切片的阳性细胞着色程度按照棕褐色、棕黄色、黄色和无色分别计 3、2、1、0 分,结果判断依据 2 项的积分和;4 ~ 5 分为强阳性(++),3 分为弱阳性(+),0 ~ 2 分为阴性(-)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RB 组织与癌旁正常组织中 MMP-9、VEGF 和 TIMP-1 的表达 结果见表 1。RB 组织中 MMP-9 和 VEGF 的阳性表达率显著高于癌旁正常组织,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );但 RB 组织与癌旁正常组织中 TIMP-1 的阳性表达率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 RB 组织和癌旁正常组织中 MMP-9、VEGF、TIMP-1 的表达

Tab.1 Expression of MMP-9, VEGF and TIMP-1 in RB tissues and adjacent normal tissues

组织类型	n	MMP-9		VEGF		TIMP-1	
		阴性/例	阳性/例	阴性/例	阳性/例	阴性/例	阳性/例
癌旁正常组织	30	22	8	24	6	27	3
RB 组织	30	12	18	9	21	25	5
$\chi^2$		6.787		15.151		0.577	
P		<0.01		<0.01		>0.05	

2.2 MMP-9、VEGF、TIMP-1 的表达与 RB 分化程度的关系 结果见表 2。未分化型 RB 组织中 MMP-9 和 VEGF 的阳性表达率显著高于分化型 RB,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );未分化型 RB 组织与分化型 RB 组织中 TIMP-1 的阳性表达率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 MMP-9、VEGF、TIMP-1 的表达与 RB 分化程度的关系

Tab.2 Relationship between the expression of MMP-9, VEGF, TIMP-1 and the differentiation of RB

RB 分化程度	n	MMP-9		VEGF		TIMP-1	
		阴性/例	阳性/例	阴性/例	阳性/例	阴性/例	阳性/例
未分化型	18	4	14	2	16	15	3
分化型	12	8	4	7	5	10	2
$\chi^2$		5.926		7.646		0.476	
P		<0.05		<0.01		>0.05	

2.3 MMP-9、VEGF、TIMP-1 的表达与 RB 视神经浸润的关系 结果见表 3。有视神经浸润的 RB 组织中 MMP-9 和 VEGF 的阳性表达率显著高于无视神经浸润的 RB,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );

有视神经浸润与无视神经浸润的 RB 组织中 TIMP-1 的阳性表达率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

表 3 MMP-9、VEGF、TIMP-1 的表达与 RB 视神经浸润的关系

Tab. 3 Relationship between the expression of MMP-9, VEGF, TIMP-1 and optic nerve invasion of RB

视神经浸润	n	MMP-9		VEGF		TIMP-1	
		阴性/例	阳性/例	阴性/例	阳性/例	阴性/例	阳性/例
无视神经浸润	17	11	6	9	8	14	3
有视神经浸润	13	1	12	0	13	11	2
$\chi^2$		9.977		11.491		0.719	
P		<0.01		<0.01		>0.05	

3 讨论

RB 目前发病机制尚未完全明了,普遍认为其与遗传、病毒感染等因素相关<sup>[5]</sup>。MMP 是有着 Zn<sup>2+</sup> 依赖性的一种内源性蛋白酶,与肿瘤细胞的浸润和转移有密切联系。TIMP 是 MMP 的一种特异性抑制物,能有效阻止 MMP 降解细胞外基质,对肿瘤细胞的侵袭转移有抑制作用<sup>[6]</sup>。在细胞外基质代谢中, MMP 和 TIMP 的相互作用是肿瘤转移和侵袭的关键。VEGF 是血管生成极为关键的促成因子,有助于提高血管的渗透性以及促进内皮细胞的生长,在许多肿瘤的浸润、转移、生长和发生过程中有着非常重要的作用<sup>[7]</sup>。

在 RB 的发生、发展过程中,有关 TIMP 和 MMP 的研究尚少。有研究采用免疫组织化学法对接种 HXO-RB-44-GFP 细胞至裸鼠的肿瘤组织内 TIMP-2、TIMP-1、MMP-9、MMP-7 和 MMP-2 的水平进行检测,发现 RB 肿瘤内 TIMP 表达下降,而 MMP 表达上升,大部分的 MMP-9、MMP-7 和 MMP-2 为阳性染色;而细胞 TIMP-2、TIMP-1 染色几乎全部呈阴性<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,视神经浸润及 RB 分化程度与 MMP-9 表达相关,但是与 TIMP-1 无关。说明在 RB 中 TIMP-1 和 MMP-9 存在着表达的失衡,在浸润与 RB 分化中 MMP-9 高表达起着重要的作用<sup>[9]</sup>。关于动物实验的研究结果显示,无论是内源性的还是人工合成的 MMP 抑制剂均可以对肿瘤形成新生血管进行一定的抑制,发现 MMP 是血管生成一种重要的正性调节剂<sup>[10]</sup>。在 RB 组织中检测 VEGF 能够为治

疗肿瘤提供新思路。本研究结果显示,在 RB 中 VEGF 和 MMP-9 的表达呈一致性。提示在 RB 组织中,VEGF 的激活可以使得 MMP-9 表达升高,而升高的 MMP-9 有助于肿瘤新生血管的生成<sup>[11]</sup>。本研究的结果还发现 VEGF、MMP-9 的表达与 RB 的分化程度、视神经浸润状况均有着明显的联系。

综上所述,RB 中 VEGF 和 MMP-9 的高表达在血管生成、视神经浸润和 RB 分化中有重要意义。

参考文献:

[1] Venkatesan N,Krishnakumar S,Deepa P R,*et al.* Molecular deregulation induced by silencing of the high mobility group protein A2 gene in retinoblastoma cells[J]. *Mol Vis*,2012,18:2420-2437.

[2] 刘瑾,朱豫. 视网膜母细胞瘤的治疗进展[J]. 眼科新进展, 2013,33(1):91-94.

[3] Roomi M W,Roomi N,Bhanap B,*et al.* Antineoplastic activity of a nutrient mixture in Y-79 malignant retinoblastoma cells[J]. *Oncol Rep*,2013,29(1):29-33.

[4] Xin G H,Zhao X H, Liu D, *et al.* Effect of VEGF-targeted anti-sense gene therapy on retinoblastoma cell line SO-RB50 *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Ophthalmol*,2012,5(4):440-447.

[5] Theriault B L,Dimaras H,Gallie B L,*et al.* The genomic landscape of retinoblastoma;a review[J]. *Clin Experiment Ophthalmol*,2014, 42(1):33-52.

[6] 李芸,唐罗生,周清华,等. 视网膜母细胞瘤和正常视网膜组织中基质调控蛋白表达及其意义[J]. 国际眼科杂志,2008,8 (6):1079-1082.

[7] Radhakrishnan V,Kashyap S,Singh L,*et al.* VEGF expression in residual tumor cells in orbital retinoblastoma(IRSS stage Ⅲ) treated with NACT;a prospective study[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012,59(3):567-569.

[8] 葛蓁,李玉军,刘波. MMP-9、TIMP-1 和 VEGF 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义[J]. 山东医药,2007,47(19):53-55.

[9] Prasanna M R,Kwatra K S,Calton N,*et al.* Retinal dysplasia mimicking retinoblastoma [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2013, 56 (1):64-65.

[10] 游志鹏,姜德咏. Ets-1、MMP-1 及 TIMP-1 在视网膜母细胞瘤中的表达[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2005,5(2):91-93.

[11] Miyata S,Urabe M,Gomi A,*et al.* An R132H mutation in isocitrate dehydrogenase 1 enhances p21 expression and inhibits phosphorylation of retinoblastoma protein in glioma cells[J]. *Neurol Med Chir(Tokyo)*,2013,53(10):645-654.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)