

# MMP-2 和 MMP-14 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义

龙 华, 周 波

作者单位: (441300) 中国湖北省随州市中心医院眼科  
作者简介: 龙华, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、白内障、  
眼部整形、眼部肿瘤。  
通讯作者: 龙华. longhua198177@yahoo. com. cn  
收稿日期: 2011-06-03 修回日期: 2011-08-09

## Expression and significance of MMP-2 and MMP-14 in retinoblastoma

Hua Long, Bo Zhou

Department of Ophthalmology, Suizhou Central Hospital, Suizhou  
441300, Hubei Province, China

Correspondence to: Hua Long. Department of Ophthalmology,  
Suizhou Central Hospital, Suizhou 441300, Hubei Province, China.  
longhua198177@yahoo. com. cn

Received: 2011-06-03 Accepted: 2011-08-09

### Abstract

• AIM: To investigate the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) in retinoblastoma (Rb), and their relationships with tumor development stage.

• METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-14 in 50 cases of paraffin embedded Rb samples. Quantitative analysis of the expression of MMP-2 and MMP-14 was assessed by HMIAS-2000 Color Pathologic Analysis System. The differences of the expression of MMP-2 and MMP-14 in each clinical and pathological stage were analyzed statistically.

• RESULTS: Positive expression rate of MMP-2 was 76% (38 cases) and of MMP-14 was 82% (41 cases). The expression of MMP-2 and MMP-14 was significantly higher in tumors with optic nerve invasion than in tumors without optic nerve invasion ( $P < 0.01$ ); the expression of MMP-2 and MMP-14 was significantly higher in tumors of extra-ocular stage than in tumors of glaucomatous stage or intra-ocular stage ( $P < 0.01$ ); There was a statistically significant positive correlation between the expression of MMP-2 and the expression of MMP-14 ( $P < 0.01$ ).

• CONCLUSION: MMP-2 and MMP-14 exist in retinoblastoma cells. The level of MMP-2 and MMP-14 is related to optic nerve invasion and clinical stage of Rb, which suggests the expression of MMP-2 and MMP-14 could be connected to the invasion and development of tumor cells. Further research is needed for deeper understanding of the biological behavior and better evaluation of the prognosis of Rb.

• KEYWORDS: matrix metalloproteinase-2; matrix metallo-

proteinase-14; retinoblastoma; immunohistochemistry

Long H, Zhou B. Expression and significance of MMP-2 and MMP-14 in retinoblastoma. *Gugji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11 (10): 1719-1721

### 摘要

目的: 探讨视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 中基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和 MMP-14 的表达及其与临床病程的关系。

方法: 应用免疫组织化学 SP 法检测 50 例 Rb 组织中 MMP-2 和 MMP-14 的表达; 用 HMIAS-2000 型全自动医学彩色图像分析系统测量其平均光密度值。统计学方法比较不同临床和病理阶段 Rb 表达 MMP-2 和 MMP-14 的差异。

结果: 患者 50 例 Rb 组织切片中 MMP-2 阳性表达 38 例, 占 76%; MMP-14 的阳性表达 41 例, 占 82%; 有视神经浸润的肿瘤 MMP-2 和 MMP-14 表达水平明显高于无视神经浸润的肿瘤 ( $P < 0.01$ ), 处于眼外期的肿瘤 MMP-2 和 MMP-14 的表达水平明显高于眼内期和青光眼期的肿瘤 ( $P < 0.01$ ); Rb 中 MMP-2 和 MMP-14 的阳性表达水平呈密切相关 ( $P < 0.01$ )。

结论: MMP-2 和 MMP-14 的表达水平与视神经浸润和临床分期存在密切的关系, 提示其表达水平与该肿瘤的浸润与发展有关。

关键词: 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-14; 视网膜母细胞瘤; 免疫组织化学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 10. 010

龙华, 周波. MMP-2 和 MMP-14 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义. 国际眼科杂志 2011; 11(10): 1719-1721

### 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, 是一种在婴幼儿最常见的、危害性最大的眼内恶性肿瘤, 新生儿发病率为  $1/15\,000 \sim 1/28\,000$ <sup>[1]</sup>, 可危及患儿的视力甚至生命。通常认为 Rb 的预后与视神经浸润与否、肿瘤有无远处转移等有密切关系。近来的实验研究发现, 基质金属蛋白酶类 (matrix metalloproteinases, MMPs) 在恶性肿瘤的侵袭和转移中发挥着重要作用, MMP-2 和 MMP-14 是 MMPs 中的重要成员, 对细胞外基质包括基底膜均有降解作用, 从而破坏了机体防御肿瘤浸润与转移的能力, 增加了肿瘤的浸润性。本研究运用免疫组织化学法检测了 MMP-2 和 MMP-14 在 Rb 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 所有石蜡标本来自我院 2000-01/2010-12 接受眼球摘除术的 Rb 患者, 共 50 例, 其中男 29 例, 女 21 例,

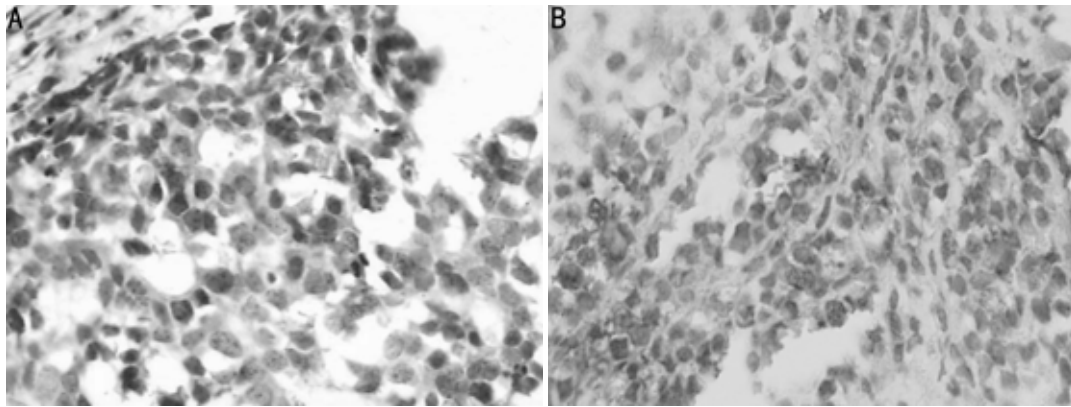


图1 MMPs在Rb组织中的阳性表达(SP×400) A: MMP-2; B: MMP-14。

患者年龄4mo~10岁,平均3.9岁。临床分期:眼内期15例,青光眼期18例,眼外期17例,全身转移期0例;有视神经浸润27例,无视神经浸润23例。所有患者均经我院病理科确诊。主要试剂:鼠抗人MMP-2单克隆抗体(使用浓度为1:50),鼠抗人MMP-14单克隆抗体(使用浓度为1:50),免疫组织化学SP试剂盒,DAB显色剂等均由北京中杉公司提供。

**1.2 方法** 以MMP-2和MMP-14均为阳性的乳腺癌组织为阳性对照,PBS代替一抗为阴性对照,采用免疫组织化学染色SP法进行染色,具体步骤如下:石蜡标本行4μm厚连续切片,脱蜡,梯度乙醇入水,30g/L过氧化氢乙醇溶液孵育10min,以灭活内源性过氧化氢酶,枸橼酸盐缓冲液内微波修复抗原92℃~98℃,20min,室温冷却,PBS漂洗,血清封闭后滴加一抗,4℃湿盒过夜,PBS漂洗3次。滴加二抗工作液,37℃湿盒内孵育30min,PBS洗涤3次。滴加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素,置湿盒内37℃孵育30min,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,中性树脂胶封片。光镜下观察,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。每张切片选取5个视野,在HMIAS-2000型全自动医学彩色图像分析系统的×400倍光镜下测量MMP-2和MMP-9在瘤旁正常视网膜和Rb组织细胞中的平均光密度值。

统计学分析:数据均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用SPSS 15.0软件进行t检验和正态分析后Spearman等级相关分析,取P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Rb组织中MMP-2和MMP-14的表达** 在50例Rb组织切片中,MMP-2阳性表达38例,表达率为76%;MMP-14阳性表达41例,表达率为82%,二者皆表现为胞浆和/或胞膜出现棕黄色颗粒(图1)。经两样本t检验,MMP-2和MMP-14表达阳性组与阴性组中Rb组织的平均光密度值差异具有统计学意义(P<0.01,表1)。

**2.2 MMP-2和MMP-14在Rb有视神经浸润和无视神经浸润组中的表达** 50例Rb标本中,有视神经浸润者27例(54%),无视神经浸润者23例(46%)。经两样本t检验,MMP-2和MMP-14在有视神经浸润组 and 无视神经浸润组中表达的灰度值差异具有统计学意义(P<0.01,表2)。

表1 Rb中MMP-2和MMP-14表达阳性组与阴性组的表达  $\bar{x} \pm s$

组别	n(例)	光密度值	t	P
MMP-2				
阳性	38	0.217 ± 0.029	6.457	0.000
阴性	12	0.135 ± 0.017		
MMP-14				
阳性	41	0.247 ± 0.046	7.479	0.000
阴性	9	0.168 ± 0.017		

表2 Rb有视神经浸润组与无视神经浸润组中MMP-2和MMP-14的表达  $\bar{x} \pm s$

组别	n(例)	光密度值	t	P
MMP-2				
有视神经浸润	27	0.224 ± 0.025	3.457	0.002
无视神经浸润	23	0.153 ± 0.014		
MMP-14				
有视神经浸润	27	0.268 ± 0.049	5.479	0.000
无视神经浸润	23	0.184 ± 0.023		

表3 Rb中MMP-2和MMP-14在临床各期的表达  $\bar{x} \pm s$

组别	n(例)	光密度值
MMP-2		
眼内期	15	0.145 ± 0.021
青光眼期	18	0.155 ± 0.016
眼外期	17	0.235 ± 0.034
MMP-14		
眼内期	15	0.178 ± 0.025
青光眼期	18	0.191 ± 0.018
眼外期	17	0.275 ± 0.029

**2.3 MMP-2和MMP-14在Rb临床各期中的表达** 50例Rb中,眼内期15例,青光眼期18例,眼外期17例。经方差分析,眼外期Rb中MMP-2和MMP-14表达均明显高于眼内期和青光眼期Rb,差异均有统计学意义(P<0.01);眼内期与青光眼期Rb中MMP-2和MMP-14的表达均无明显差异(P>0.05,表3)。

**2.4 MMP-2和MMP-14在Rb中表达水平的关系** 对MMP-2和MMP-14在Rb中的阳性表达水平进行正态分析后Spearman等级相关分析,Rb组织中MMP-2和MMP-14的阳性表达强度呈正相关关系(r=0.877,P<0.01)。

### 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<sup>[2]</sup>。其中降解细胞外基质的蛋白酶主要是 MMPs。MMPs 是高度保守的依赖于锌离子的内切蛋白水解酶家族, 可降解基底膜和细胞外基质的大多数蛋白质。MMP-14 作为 MMPs 中的重要一员, 不但是前体 MMP-2 (pro MMP-2) 的细胞表面激活因子, 使之激活后具备了降解 ECM 的能力, 而且可以直接赋予无侵袭潜能的细胞穿透 I 型胶原的能力, 且此过程不依赖 pro MMP-2 的激活<sup>[3]</sup>。同时它还能够通过降解层粘连蛋白-5 而暴露可以启动内皮细胞移动能力的关键序列, 从而有利于肿瘤细胞的浸润转移<sup>[4]</sup>。而 MMP-2 的作用底物是 IV 型胶原, 它能直接分解基底膜中的纤维连接蛋白和层粘连蛋白, 在肿瘤细胞突破基底膜屏障引起浸润转移中起重要作用<sup>[5,6]</sup>。本研究初步探讨了 MMP-2 和 MMP-14 在 Rb 中的表达及意义。

本实验通过免疫组织化学研究发现, 50 例 Rb 组织切片中 MMP-2 阳性表达 38 例, 占 76%; MMP-14 的阳性表达 41 例, 占 82%; 有视神经浸润的肿瘤 MMP-2 和 MMP-14 表达水平明显高于无视神经浸润的肿瘤 ( $P < 0.01$ ), 处于眼外期的肿瘤 MMP-2 和 MMP-14 的表达水平明显高于眼内期和青光眼期的肿瘤 ( $P < 0.01$ ), 提示 MMP-2 和 MMP-14 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。Adithi 等<sup>[7]</sup>用免疫组织化学和免疫印记法对 60 例 Rb 进行检测, 发现 MMP-2 高表达 (66%), 结果与本实验结果一致, 都发现了 Rb 中 MMP-2 的高表达。与 Rb 一样来源于神经外胚层的肿瘤中, 发现 MMP-2 和 MMP-14 的变化与本实验结果类似。如在人脑胶质细胞瘤中高级别胶质瘤组织 (III ~ IV) 中 MMP-2 和 MMP-14 的阳性表达率显著高于低级别胶质瘤组织 (I ~ II), 在单因素生存分析中, MMP-2 和 MMP-14 的表达与患者预后不良有关, 提示 MMP-2 和 MMP-14 的表达水平与肿瘤的恶性程度及侵袭能力有关<sup>[8]</sup>。本实验结果还表明, 尚有部

分 Rb 病例不表达 MMP-2 和 MMP-14, 二者的阴性表达率分别为 24% 和 18%, 具体原因有待进一步研究。本实验通过对 MMP-2 和 MMP-14 在 Rb 中的表达水平进行比较显示, Rb 组织中 MMP-2 和 MMP-14 的表达强度呈正相关关系 ( $P < 0.01$ ), 且关系密切, 提示 MMP-2 和 MMP-14 在 Rb 的侵袭和转移过程中具有协同作用。其原因可能为 MMP-14 表达上调的同时激活了更多的 MMP-2, 增加了 Rb 向周围组织侵袭转移的能力, 也进一步证明 MMP-14 与 Rb 的侵袭转移密切相关。

通常认为 Rb 的预后与视神经浸润与否、肿瘤临床分期等有着密切的关系。从本实验发现, MMP-2 和 MMP-14 的表达水平与视神经浸润和临床分期存在密切的关系, 提示其表达水平与该肿瘤的浸润与发展有关。通过药物或基因工程的方法, 抑制 MMP-2 和 MMP-14 基因的表达, 将为治疗 Rb 提供新的手段。

#### 参考文献

- 1 葛坚. 眼科学. 北京: 人民卫生出版社 2002: 194
- 2 Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001; 345(11): 833-835
- 3 Hotary K, Allen E, Puntrieri A, et al. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinase 1, 2 and 3. *J Cell Biol* 2000; 149(6): 1309-1323
- 4 Gilles C, Polette M, Coraux C, et al. Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt16): 2967-2976
- 5 程育宏, 申家泉. 基质金属蛋白酶家族内细胞外基质金属蛋白酶诱导因子与常见眼内恶性肿瘤的关系. *国际眼科杂志* 2008; 8(6): 1243-1245
- 6 栗映梅, 申家泉. 基质金属蛋白酶及其组织抑制因子与眼病的相关性研究进展. *国际眼科杂志* 2007; 7(4): 1135-1138
- 7 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
- 8 张海泉, 袁先厚, 江普查, 等. MT1-MMP 及 MMP-2 在人脑胶质瘤中的表达及意义. *现代肿瘤医学* 2006; 14(2): 138-141