

MMP-9 和 NF- κ B 在视网膜母细胞瘤中的表达

郁佳,王剑锋,秦梅,岳晓丽,周琦,李娟

作者单位:(233000)中国安徽省蚌埠市,蚌埠医学院第一附属医院眼科
作者简介:郁佳,女,硕士,副主任医师,研究方向:眼底疾病、眼部肿瘤、白内障。
通讯作者:郁佳, dd445i@sina.com
收稿日期:2012-04-06 修回日期:2012-06-29

Expression of MMP-9 and NF- κ B in retinoblastoma

Jia Yu, Jian-Feng Wang, Mei Qin, Xiao-Li Yue, Qi Zhou, Juan Li

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China

Correspondence to: Jia Yu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China. dd445i@sina.com
Received:2012-04-06 Accepted:2012-06-29

Abstract

• AIM: To investigate the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and nuclear factor of κ B (NF- κ B) in retinoblastoma (RB) and their relationships with differentiation and optic nerve infiltration for discussion their effect in invasion and metastasis of RB.

• METHODS: Immunohistochemical technique was adopted to examine the protein expression of MMP-9 and NF- κ B in 47 cases. All the data were analyzed by statistics.

• RESULTS: The expression ratio of MMP-9 was 46.8%, and the expression was also significantly related to the differentiation degree ($P < 0.05$) and never infiltration ($P < 0.05$). The positive rate of NF- κ B expression was 63.8%. The expression had notable relationship with the differentiation degree ($P < 0.05$), but not correlated with the never infiltration ($P > 0.05$). The expression of NF- κ B had an obvious relationship with the expression of MMP-9 ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: In RB, MMP-9 expressed in higher level. NF- κ B was activated and had higher expression in RB. The expression of NF- κ B was related to the expression of MMP-9. The activation of NF- κ B can possibly promote invasion and metastasis of RB by up-regulating the expression of MMP-9. Detecting the expression of MMP-9 and NF- κ B may be biological indicator of invasion and metastasis of RB and can help to filter cases with high risk of metastasis.

• KEYWORDS: retinoblastoma; matrix metalloproteinase-9; nuclear factor- κ B

Citation: Yu J, Wang JF, Qin M, et al. Expression of MMP-9 and NF- κ B in retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(8):1470-1473

摘要

目的:研究基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和核转录因子- κ B(nuclear factor of κ B, NF- κ B)在视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)中的表达及与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。

方法:应用MMP-9和NF- κ B单克隆抗体,采用免疫组织化学方法,对47例RB患者石蜡包埋标本进行MMP-9和NF- κ B表达的测定,数据进行统计学分析。

结果:(1)47例RB中MMP-9阳性表达率为46.8%,与RB的分化程度($P < 0.05$)及有无视神经浸润($P < 0.05$)相关。(2)NF- κ B在RB组织中阳性表达率为63.8%,与RB的分化程度相关($P < 0.05$),与有无视神经浸润无相关性($P > 0.05$)。(3)RB中NF- κ B的表达与MMP-9的表达有相关性($P < 0.05$)。

结论:RB组织中MMP-9高表达。NF- κ B在RB中被激活。RB中NF- κ B表达与MMP-9表达相关,NF- κ B激活后可能通过上调MMP-9的表达促进RB的浸润、转移。二者表达的检测可以作为反映RB浸润、转移潜能的生物学指标,有助于筛选转移高危病例。

关键词:视网膜母细胞瘤;基质金属蛋白酶-9;核转录因子- κ B

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.08.12

引用:郁佳,王剑锋,秦梅,等.MMP-9和NF- κ B在视网膜母细胞瘤中的表达.国际眼科杂志2012;12(8):1470-1473

0 引言

肿瘤的浸润转移是多分子、多基因参与的极其复杂的过程。首先肿瘤细胞要破坏由细胞间基质和基底膜(basement membrane, BM)组成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)。在参与破坏ECM的酶中,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)能够降解ECM的大多数蛋白质,在肿瘤细胞浸润、转移过程中发挥着重要作用^[1]。细胞核转录因子 κ B(nuclear factor of κ B, NF- κ B)是一种具有多向调节功能的转录因子,可以上调MMP-9和VEGF等多种基因的表达,与肿瘤的发生、转移关系密切^[2,3],有关MMP-9和NF- κ B与恶性肿瘤浸润转移关系的研究已有报道,但其在视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)中表达的相关研究报道较少。本研究应用免疫组织化学的方法检测MMP-9和NF- κ B蛋白在47例RB中的表达,分析其表达与RB分化程度及视神经浸润关系,探讨它们在RB浸润、转移过程中的作用,以期判断预后、指导临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集蚌埠医学院第一附属医院病理科 1990/2006 年手术切除的 RB 眼球蜡块标本 47 例,蜡块重新切片复查,每例连续切片数张,4 μ m 厚,全部诊断证实为 RB。47 例术前均未进行化疗或放疗。其中男 25 例,女 22 例;左眼 27 例,右眼 20 例。年龄 6 月龄~9 岁,平均 3.74 \pm 1.62 岁。按照 RB 中有无菊形团排列为分化型和未分化型,其中分化型 17 例,未分化型 30 例。肿瘤细胞浸润视神经者 15 例,无浸润者 32 例。瘤旁正常视网膜组织作为对照。鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体、免疫组织化学检测试剂盒及浓缩型 DAB 试剂盒购自福州迈新公司。鼠抗人 NF- κ B 单克隆抗体,购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学方法检测 MMP-9 和 NF- κ B 蛋白 石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,染色方法按试剂盒说明进行。PBS 漂洗 3 \times 5min,滴加 30mL/L 过氧化氢室温封闭 10min 以阻断内源性过氧化物酶活性,加入修复液后微波热修复 10min,PBS 漂洗 3 \times 5min;滴加 MMP-9 和 NF- κ B 第一抗体,抗体浓度为 1:100,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,4 $^{\circ}$ C 过夜。滴加生物素标记抗第二抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 20min,PBS 冲洗后,滴加 SABC 工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,PBS 冲洗,DAB 显色,自来水冲洗,苏木素复染,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。实验中用 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知 MMP-9 和 NF- κ B 阳性表达的乳腺癌组织作阳性对照。

1.2.2 染色判断标准 MMP-9 和 NF- κ B 免疫组织化学阳性表达呈棕黄色颗粒。参考有关文献^[4],根据染色程度及染色细胞百分率进行评定。染色程度:无显色、浅黄色、棕黄色和棕褐色分别为 0,1,2,3 分;染色细胞占计数细胞的百分率;每张切片随机选取 5 个高倍视野,按阳性细胞数占同类细胞数的百分比, \leq 5% 为 0 分,6%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分, $>$ 51% 为 3 分。将每张切片染色程度与染色细胞百分率得分相乘的积为其最后得分。0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(\pm),4~6 分为中等阳性(+), $>$ 6 分为强阳性(++)。为简化数据处理,将-, \pm 合并为“阴性”;+,,++合并为“阳性”。

统计学分析:利用 SPSS 13.0 软件包对实验结果进行分析。MMP-9 和 NF- κ B 表达与肿瘤临床病理关系采用四格表 χ^2 检验。MMP-9 与 NF- κ B 表达的一致性检验采用配对四格表 χ^2 检验,二因子在肿瘤组织中表达的相关性用 Spearman 法行秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-9 和 NF- κ B 在 RB 和正常视网膜组织中的表达 MMP-9 蛋白阳性表达位于肿瘤细胞的细胞浆内,47 例 RB 中有 22 例阳性表达,阳性率为 46.8% (图 1)。以 PBS 代替一抗阴性对照组中未见表达,瘤旁正常视网膜组织中 MMP-9 蛋白呈阴性表达。NF- κ B 蛋白阳性表达位于肿瘤细胞细胞核和细胞浆内,以细胞核着色为阳性统计,47 例 RB 中 NF- κ B 蛋白的阳性表达率为 63.8% (图 2)。以 PBS 代替一抗,阴性对照组中未见表达,瘤旁正常视网膜组织细胞核 NF- κ B 蛋白呈阴性表达。

2.2 MMP-9 和 NF- κ B 表达与 RB 分化程度的关系

MMP-9, NF- κ B 与 RB 分化类型的关系见表 1。由表 1 可以看出,两指标在未分化组阳性表达均高于分化组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

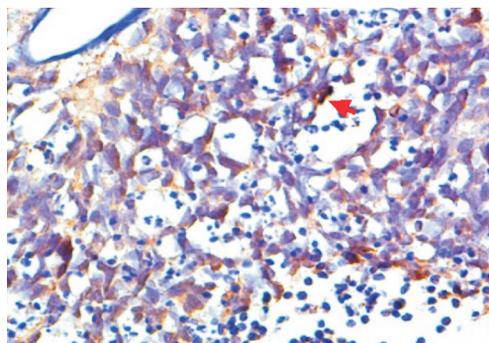


图 1 MMP-9 蛋白在 RB 中的表达 (SP \times 400)。

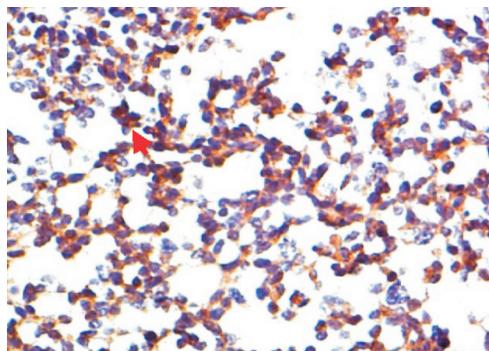


图 2 NF- κ B 蛋白在 RB 中的表达 (SP \times 400)。

表 1 MMP-9 和 NF- κ B 表达与 RB 分化程度的关系 例

分型	n	MMP-9		NF- κ B	
		+	-	+	-
未分化型	30	18	12	23	7
分化型	17	4	13	7	10
χ^2		5.80		5.92	
P		$<$ 0.05		$<$ 0.05	

表 2 MMP-9 和 NF- κ B 表达与 RB 视神经浸润的关系 例

分型	n	MMP-9		NF- κ B	
		+	-	+	-
视神经浸润组	15	12	3	12	3
无视神经浸润组	32	10	22	18	14
χ^2		9.75		2.50	
P		$<$ 0.05		$>$ 0.05	

表 3 RB 中 NF- κ B 蛋白表达与 MMP-9 表达的关系 例

NF- κ B	n	MMP-9	
		+	-
+	30	20	10
-	17	2	15
合计	47	22	25

2.3 MMP-9 和 NF- κ B 表达与 RB 视神经浸润的关系

MMP-9, NF- κ B 与 RB 视神经侵犯的关系见表 2。由表 2 可以看出, MMP-9 在视神经浸润组的阳性表达高于未浸润组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。NF- κ B 在视神经浸润组的阳性表达高于未浸润组,但二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 RB 中 NF- κ B 表达与 MMP-9 表达的关系

NF- κ B 表达与 MMP-9 表达的关系见表 3。47 例 RB 中, NF- κ B 阳性患者中 MMP-9 阳性表达率 66.7% (20/30) 高于 NF- κ B 阴性患者中 MMP-9 阳性表达率 11.8% (2/17)。两因子

在 RB 组织中表达的一致性,经统计学处理差异有统计学意义($\chi^2=5.33, P<0.05$)。二因子表达存在正相关关系($r_s=0.887, P<0.05$)。

3 讨论

RB 是最常见的婴幼儿原发性眼内恶性肿瘤, RB 患者死亡的主要原因是肿瘤发生全身浸润、转移。研究表明,恶性肿瘤细胞发生转移时首先要分泌或诱导酶类破坏 ECM 和血管 BM 构成的生理屏障,这是肿瘤细胞发生浸润、转移的先决条件。MMP-9 属于 MMP 家族中的明胶酶类,主要降解明胶和 IV, V, VII, X 型基底膜胶原,其高表达可导致 ECM 和血管 BM 的降解加速,使肿瘤细胞能够沿着受损的 BM 移出癌巢向周围组织浸润,而且 MMP-9 可以调节血管内皮细胞黏着,诱导肿瘤新生血管形成,有利于肿瘤细胞进出血管,从而促进远处转移^[5,6]。它的高表达与恶性肿瘤不良预后有关。本文研究发现, MMP-9 蛋白在 RB 组织中表达增高,而且其阳性表达率随着 RB 病理分级增高显著增加($P<0.05$),提示 MMP-9 高表达可能增加 RB 肿瘤细胞的侵袭性。有视神经浸润组中 MMP-9 的表达高于无视神经浸润组($P<0.05$),这与龙华等^[7]的实验结果一致,进一步证实了 MMP-9 可能参与 RB 浸润转移, MMP-9 可以作为反映 RB 恶性程度和转移的一个生物学指标。

NF- κ B 是由 50ku 蛋白(P50)和 65ku 蛋白(P65/RelA)组成的异源二聚体,是一种具有多向调节功能的转录因子^[8]。它广泛存在于多种细胞中,可以与相关基因启动子或增强子特殊 DNA 序列结合,调控凋亡相关基因、原癌基因以及与肿瘤转移相关黏附分子、MMP^[9]、血管内皮生长因子等基因的表达,发挥中心调控作用。正常情况下 NF- κ B 与其抑制因子 I κ Bs 形成复合物位于细胞质中处于静止状态。在肿瘤组织中, NF- κ B 被不恰当地激活异位进入细胞核,其转录功能也异常增高,可以诱导下游基因过度表达,促进肿瘤的发生发展^[10]。本文实验结果显示, 47 例 RB 中 NF- κ B 蛋白的阳性表达率为 63.8%, 阳性表达主要位于细胞核,说明 NF- κ B 已通过核转位的机制被激活。

NF- κ B 活化后通过调控多种基因表达在恶性肿瘤浸润、转移的过程中发挥重要作用。Sasaki 等^[11]发现胃癌组织中 NF- κ B 持续性活化,且 NF- κ B 高表达与淋巴转移、肿瘤大小、病理分期、肿瘤浸润深度等临床病理特征有关。姜孝新等^[12]研究发现,肿瘤体积较大、分化程度低、伴有血管癌栓和淋巴结转移的肝细胞癌组织中 NF- κ B p65 蛋白表达要高于肿瘤体积小、分化好、无血管癌栓和淋巴结转移的肝细胞癌组织。本文研究发现, NF- κ B 的阳性表达与 RB 组织学分型相关,未分化型中 NF- κ B 的阳性表达率明显高于分化型,这为 NF- κ B 表达水平反映 RB 侵袭能力提供了理论依据。实验中还发现,视神经浸润组 NF- κ B 的阳性表达率(80.0%)虽然高于未浸润组(56.3%),但二者无统计学差异($P>0.05$),这与王良君等^[13]的报导结果相同。但本实验与王良君等^[13]的实验中病例数目均有限, NF- κ B 与 RB 视神经浸润的关系需要增加样本数量进一步研究。

研究已经证实^[14,15], NF- κ B 是与多种肿瘤转移密切相关的 MMPs 的上游调控因子。Sato 等^[16]认为 MMP-9 基因的启动子上含有 NF- κ B, AP-1, Sp1 等多个结合位点,通过这些结合位点,生长因子、细胞因子及原癌基因均

可诱导 MMP-9 的表达,促进肿瘤的侵袭和转移。Thant 等^[17]实验发现, NF- κ B 在被 ras 基因激活后,可与 MMP-2 和 MMP-9 启动子上的 κ B 序列结合,使其表达上调。在本实验中, NF- κ B(+)组 MMP-9 的表达阳性率与 NF- κ B(-)组 MMP-9 的表达阳性率比较有统计学差异($P<0.05$), NF- κ B 表达与 MMP-9 表达呈正相关性。提示在 RB 中 MMP-9 的高表达可能与 NF- κ B 有关, NF- κ B 活化后可以在转录水平调控 MMP-9 的表达,增强了 MMP-9 基因的转录活性使 MMP-9 表达上调,进而促进 RB 的浸润和转移。

综上所述, MMP-9 在 RB 中高表达, NF- κ B 在 RB 中持续激活。NF- κ B 被激活后可以上调 MMP-9 的表达。检测 RB 中 MMP-9 和 NF- κ B 的表达可以作为反映 RB 浸润、转移潜能的生物学指标,有助于筛选转移高危病例。本研究所选择的病例数有限,尚需增加病例数并对 RB 不同临床分期的标本进行检测以进一步确定 MMP-9 和 NF- κ B 的表达与临床分期的关系。今后基因治疗将成为恶性肿瘤的一种重要治疗模式。通过抑制 MMP-9 和 NF- κ B 的表达,阻断其活性,可以有效抑制 RB 的浸润和转移,降低肿瘤恶性程度。张克君等^[18]发现通过转染 I κ B- α 基因抑制肝癌细胞系 HCC9204 细胞 NF- κ B 的活性可以下调肿瘤中 MMP-9 mRNA 表达,为基因治疗抑制肿瘤浸润、转移寻找理想靶基因提供了理论依据。相信随着对 RB 浸润、转移过程的深入研究, MMP-9 和 NF- κ B 有望成为 RB 基因治疗新的靶抗原。

参考文献

- 1 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. *Virchows Arch* 2001;438(2):121
- 2 Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8(2):108-118
- 3 Zhu Y, Singh B, Hewitt S, et al. Expression patterns among interferon regulatory factor-1, human X-box binding protein-1, nuclear factor kappa B, nucleophosmin, estrogen receptor-alpha and progesterone receptor proteins in breast cancer tissue microarrays. *Int J Oncol* 2006;28(1):67-76
- 4 Skomedal H, Kristensen GB, Lie SK, et al. Aberrant expression of the cell cycle associated protein TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and ERGf in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999;73(2):223-228
- 5 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. *World J Gastroenterol* 2003;9(5):899-904
- 6 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
- 7 龙华,姜发纲. MMP-2 和 MMP-9 在视网膜母细胞瘤中的表达及意义. *眼科新进展* 2006;26(12):908-910
- 8 Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008;132(3):344-362
- 9 Yu HB, Zhang HF, Li DY, et al. Matrine inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *J Asian Nat Prod Res* 2011;13(3):242-250
- 10 Luqman S, Pezzuto JM. NF kappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res* 2010;24(7):949-963

- 11 Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, *et al.* Nuclear factor- κ B p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001;7(12):4136-4142
- 12 姜孝新,伍小平,蒋艳. NF- κ Bp65、VEGF 在肝细胞癌中的表达及临床意义. *肿瘤药学* 2011;1(3):173-176
- 13 王良君,王利华,李超英. 视网膜母细胞瘤的 VEGF 和 NF- κ B P65 表达及意义. *青岛大学医学院学报* 2004;40(4):349-350,352
- 14 Huang S, Pettaway CA, Uehara H, *et al.* Blockade of NF- κ B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001;20(31):4188-4197
- 15 Shishodia S, Majumdar S, Banerjee S, *et al.* Ursolic acid inhibits

- nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Res* 2003;63(15):4375-4383
- 16 Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 1993;8(2):395-405
- 17 Thant AA, Sein TT, Liu E, *et al.* Ras pathway is required for the activation of MMP-2 secretion and for the invasion of src-transformed 3Y1. *Oncogene* 1999;18(47):6555-6563
- 18 张克君,李德春,高焱明,等. NF- κ B、MMP-9 与肝细胞肝癌浸润转移的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2006;12(10):691-694

好消息—《国际眼科杂志》英文版被 PubMed 和 PubMed Central 收录

本刊讯 《国际眼科杂志》英文版 International Journal of Ophthalmology 于 2011-01 申请 PMC, 经过极为严格的科学评审和技术评审, 于 2011-12-02 通过评审并于 2012-05-03 被 PubMed 和 PMC 正式收录。这是《国际眼科杂志》英文版继 2010-09 被 SCI Expanded 收录后又被另一国际权威数据库收录, 这对本刊英文版的发展具有重大意义。

PubMed 和 PubMed Central(PMC) 是美国国立医学图书馆(NLM) 国家生物技术信息中心(NCBI) 开发和维护的生物医学与生命科学期刊文献免费数据库。PubMed 是一种免费的搜寻引擎, 提供生物医学方面的论文搜寻及摘要, 但不包括期刊论文的全文, 其数据库来源为 Medline。PMC 是由 NLM 下属的 NCBI 创立的开放存取(OA) 的生物医学和生命科学全文数据库, 并在全球范围内免费提供使用。PubMed 和 PMC 的关系: 两者都是 NLM 建立的数据库, 其中 PubMed 是一个基于互联网的文献检索系统, 它收录了几千种生物医学和生命科学期刊的目次和文摘, 该数据库提供与 PMC 全文的链接以及与数千种期刊网站的链接。而 PMC 是免费生物医学和生命科学电子期刊全文数据库, 目前收录 400 余种期刊, 数量还在不断增加。PMC 所有论文在 PubMed 中都有相应的记录。

IJO 编辑部