

· 临床研究 ·

视网膜母细胞瘤组织 SUZ12 及 MMP-9 蛋白的表达及意义研究

张冬香, 姚军平, 张贻转

(武汉科技大学附属天佑医院眼科 430064)

摘要:目的 探讨 Zeste 基因抑制子 12(SUZ12)及基质金属蛋白-9(MMP-9)在视网膜母细胞瘤(RB)中的表达及意义。

方法 56例 RB 石蜡包埋标本作为研究对象,其中眼内生长期 10 例,眼内压增高期 28 例,眼外扩展期 18 例;侵袭程度(N)由 N0~N3 分别为 22、16、12、6 例;细胞分化程度(D)由 D0~D3 分别为 10、16、18、12 例。免疫组织化学方法检测 SUZ12、MMP-9 蛋白在不同临床分期、侵袭程度及分化程度的 RB 标本中的表达并进行相关性分析。**结果** SUZ12 及 MMP-9 蛋白在 RB 组织中的表达较癌旁组织明显增高($P<0.01$)。SUZ12 及 MMP-9 的表达与 RB 的临床分期、侵袭程度(N0~N3)及细胞分化程度(D0~D3)相关。眼内压增高期 SUZ12 及 MMP-9 蛋白表达均显著高于眼内生长期($t=10.299, 16.253; P<0.01, P<0.01$);眼外生长期显著高于眼内生长期($t=20.819, 36.417; P<0.01, P<0.01$)及眼压增高期($t=10.348, 15.061; P<0.01, P<0.05$)。SUZ12 及 MMP-9 由 N0~N3 呈逐渐升高趋势,由 D0~D3 呈逐渐下降趋势,且 SUZ12 与 MMP-9 在 RB 中的表达相关性显著($r=0.840$)。**结论** SUZ12 及 MMP-9 在 RB 组织中呈高表达,并且可预测 RB 的恶性程度。

关键词: 视网膜母细胞瘤; Zeste 基因抑制因子; 基质金属蛋白酶-9; 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.35.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)35-4274-03

A significance study on expression of SUZ12 and MMP-9 in retinoblastoma

Zhang Dongxiang, Yao Junping, Zhang Yizhuan

(Department of Ophthalmology, Tian You Hospital Affiliated to Wuhan University of

Science and Technology, Wuhan, Hubei 430064, China)

Abstract: Objective To observe the expression of inhibitor of Zeste 12(SUZ12) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in retinoblastoma(RB) and their significance. **Methods** The paraffin embedded specimens from 56 patients with RB were studied, 10 patients belong to intraocular stage, 28 patients intraocular pressure increased stage and 18 patients outside ocular stage among them, 22, 16, 12, and 6 patients with invasion degree(N) from N0-N3 differently, while 10, 16, 18 and 12 patients with cell differentiations(D) from D0-D3 differently. The expressions of SUZ12 and MMP-9 protein in 56 patients were detected in different clinical stages, invasion degree and cell differentiation by immunohistochemical staining and their correlations were analyzed. **Results** The expressions of SUZ12 and MMP-9 in RB tissues [$(31.48 \pm 12.20)\%$, $(34.49 \pm 13.25)\%$] were obviously higher than in para-cancer tissue [$(0.26 \pm 0.06)\%$, $(0.36 \pm 0.08)\%$] ($P<0.01$). The expression of SUZ12 was related to clinical stages, invasion degree and cell differentiation. The expression of SUZ12 and MMP-9 in intraocular pressure increased stage was obviously higher than intraocular stage ($t=10.299, 16.253; P<0.01$), and outside ocular stage was obviously higher than intraocular stage ($t=20.819, 36.417; P<0.01$) and intraocular pressure increased stage ($t=10.348, 15.061; P<0.01$). The expression of SUZ12 and MMP-9 was increasing from N0 to N3 but decreasing from D0 to D3. The expression of SUZ12 in RB was related to MMP-9 expression ($r=0.840, P=0.000$). **Conclusion** The expression of SUZ12 and MMP-9 increased in RB tissue and it is helpful to predict the malignancy degree of RB.

Key words: retinoblastoma; inhibitor of Zeste 12; matrix metalloproteinase-9; immunohistochemical staining

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是婴幼儿常见的恶性肿瘤,严重危害患儿的视力和生命。RB的发生、发展与细胞周期某些基因改变密切相关。Zeste 基因抑制子 12(inhibitor of Zeste 12, SUZ12)是 p107 蛋白家族(p107 group protein, PcG)中的重要成员之一,在细胞的增生、细胞周期及胚胎发育过程中起着重要的调控作用^[1-2]。SUZ12 可以通过改变基因的表达而调控肿瘤的表现型,对肿瘤的发生和发展起着重要的调控作用,目前已成为研究热点^[3]。最近大量研究表明,基质金属蛋白-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达与 RB 的侵袭和转移关系密切^[4-7]。有关 SUZ12 基因对 RB 的作用目前国内外尚缺乏研究,本研究采用免疫组织化学方法

检测了 RB 组织中 SUZ12 及 MMP-9 的表达,分析二者的相关性以及与 RB 临床分期以及侵袭和分化程度的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2001 年至 2011 年手术切除的 RB 石蜡包埋标本 56 例,其中,男 30 例,女 26 例,年龄 6 个月至 10 岁,平均 (3.28 ± 1.62) 岁。所有标本均有癌旁组织作为对照,取标本前均未行放疗或化疗。按照传统临床分期,其中眼内生长期 10 例,眼内压增高期 28 例,眼外扩展期 18 例。视神经侵袭程度(N)按照 Stannard^[8]分类方法: N0(22 例)为视神经未受侵袭; N1(16 例)为肿瘤侵犯视乳头,但局限于筛板内; N2(12 例)肿瘤侵犯筛板后视神经,但视神经切除断端未见肿瘤;

N3(6 例)视神经断端可见肿瘤。细胞分化程度(D):D0(10 例)为肿瘤细胞完全未分化;D1(16 例)分化的肿瘤细胞面积小于 1/3 肿瘤面积;D2(18 例)分化的肿瘤细胞面积为 1/3~2/3 肿瘤面积;D3(12 例)分化的肿瘤细胞面积大于 2/3 肿瘤面积。

1.2 主要试剂 兔抗人 SUZ12、MMP-9 多克隆抗体购自美国 SantaCruz,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)包被的兔抗羊二抗购自中国博士德生物公司,免疫组织化学试剂盒购自丹麦 Dako 公司。

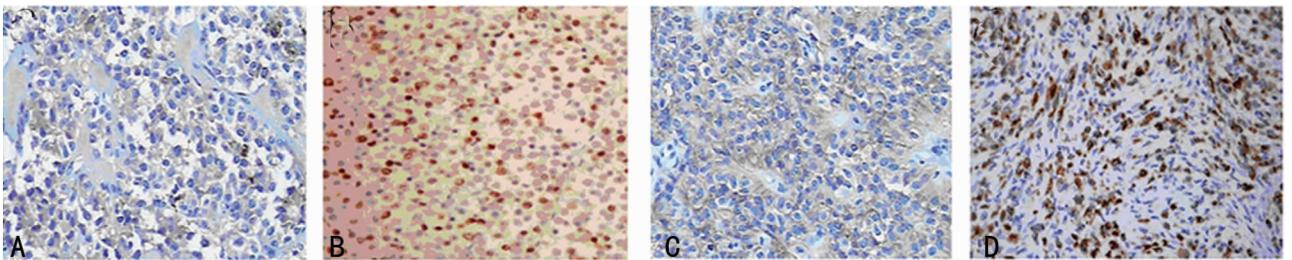
1.3 方法 免疫组织化学法检测 RB 组织标本 SUZ12、MMP-9 蛋白的表达,具体操作步骤严格按照试剂盒操作说明书进行,SUZ12、MMP-9 抗体稀释比例为 1:5 000,生物素标记的二抗为 1:10 000,染色结束后经显色剂显色 5 min,然后经苏木素复染、封片。结果判定:SUZ12 阳性为细胞核或细胞质呈黄色或棕黄色染色,MMP-9 阳性为细胞膜或细胞质呈黄色或棕黄色染色。图像采用 Imag pro plus 图像分析系统分析

阳性细胞在参照系中所占相对面积百分比。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SUZ12 与 MMP-9 的表达分析采用 *t* 检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SUZ12 及 MMP-9 蛋白在 RB 组织中的表达增高 免疫组织化学检测发现,SUZ12 蛋白阳性反应呈棕黄色,主要位于细胞核。SUZ12 蛋白在癌旁组织中阳性表达量极低($0.26\% \pm 0.06\%$),在 56 例 RB 组织中的表达平均为($31.48\% \pm 12.20\%$),较癌旁组织明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。MMP-9 阳性反应呈棕黄色,主要位于细胞质,在 RB 组织中平均表达($34.49\% \pm 13.25\%$),显著高于癌旁组织($0.36\% \pm 0.08\%$),差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



A:SUZ12 癌旁组织;B:SUZ12 RB 组织;C:MMP-9 癌旁组织;D:MMP-9 RB 组织。

图 1 SUZ12、MMP-9 蛋白在 RB 组织及癌旁组织中的表达(免疫组织化学 SAB×100)

2.2 SUZ12、MMP-9 蛋白在不同临床分期的 RB 组织中的表达及相关性 不同临床分期的 RB 患者 SUZ12 及 MMP-9 蛋白表达明显不同($F=168.750,407.263; P < 0.01$)。各组间两两相比,眼内压增高期 SUZ12 及 MMP-9 蛋白表达($29.85\% \pm 5.08\%$)、($33.09\% \pm 3.92\%$)均显著高于眼内生长期($12.00\% \pm 3.35\%$)、($11.90\% \pm 2.01\%$)($t=10.299,16.253; P < 0.01, P < 0.01$);眼外生长期($44.83\% \pm 4.30\%$)、($49.22\% \pm 2.86\%$)显著高于眼内生长期($t=20.819,36.417; P < 0.01, P < 0.01$)和眼内压增高期($t=10.348,15.061; P < 0.01, P < 0.01$)。Spearman 相关性分析发现,SUZ12、MMP-9 蛋白的表达均与临床分期相关($r=0.902,0.915; P < 0.01, P < 0.01$),并且 SUZ12 与 MMP-9 在 RB 组织中的表达有相关性($r=0.840, P < 0.01$)。

2.3 SUZ12、MMP-9 与 RB 视神经侵袭程度相关 SUZ12、MMP-9 的表达在不同视神经侵袭程度的 RB 组织中的表达有统计学差异($F=61.854,43.526; P < 0.01$),由 N0~N3 呈逐渐升高趋势,N3 较 N0 增高达 2.5 倍左右。相关性分析发现,SUZ12、MMP-9 蛋白的表达均分别与侵袭程度相关($r=0.917,0.837; P < 0.01$),并且 SUZ12 与 MMP-9 在不同侵袭程度的 RB 组织中的表达相关性具有统计学意义($r=0.861, P < 0.01$),见表 1。

2.4 SUZ12、MMP-9 与不同分化程度的 RB 组织中的表达及相关性 不同分化程度的 RB 组织中 SUZ12、MMP-9 的表达有显著差异($F=48.360,28.872; P < 0.01, P < 0.01$)。并且 SUZ12、MMP-9 蛋白的表达与细胞分化程度相关($r=0.892,0.763; P < 0.01, P < 0.01$),SUZ12 与 MMP-9 在不同分化程

度的 RB 组织中的表达相关性具有统计学意义($r=0.840, P < 0.05$),见表 2。

表 1 SUZ12、MMP-9 蛋白在 RB 不同视神经侵袭程度中的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

视神经侵袭程度	n	SUZ12	MMP-9
N0	22	19.67±8.18	22.91±10.96
N1	16	32.69±3.36	33.82±2.93
N2	12	43.11±4.38	48.10±2.50
N3	6	48.11±1.10	51.46±2.21
r	—	0.917	0.837
P	—	<0.01	<0.01

—:此项无数据。

表 2 SUZ12、MMP-9 蛋白在不同分化程度的 RB 组织中的表达($\bar{x} \pm s, \%$)

分化程度	n	SUZ12	MMP-9
D0	10	46.81±3.66	48.61±3.26
D1	16	38.58±5.09	41.75±8.99
D2	18	25.89±6.36	30.58±8.44
D3	12	17.60±9.35	18.89±9.99
r	—	0.892	0.763
P	—	<0.01	<0.01

—:此项无数据。

3 讨 论

SUZ12 与 Zeste 2 增强子 (enhancer of zeste 2, EZH2)、胚胎外胚层发展因子 (embryo ectoderm development factor, EED) 共同构成 PcG 复合体, 抑制靶基因启动子的活性^[5] 从而调控细胞增殖、分化、衰老等, 并且在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用^[9]。以往研究发现 SUZ12 在侵袭性肿瘤如前列腺癌^[10]、胃癌^[11]、乳腺癌^[12]、神经系统肿瘤^[13] 中表达增高, 并且与肿瘤的恶性潜能密切相关。目前尚未发现有关 SUZ12 在 RB 中表达情况的报道。

本研究发现 SUZ12 在 RB 组织中呈高表达, 主要定位于细胞核。并且 SUZ12 蛋白的表达与 RB 的临床分期、侵袭程度及细胞分化程度相关, 随着肿瘤的侵袭程度的增加而呈升高趋势, 随着细胞分化程度的增高呈逐渐下降趋势。这初步表明, SUZ12 在 RB 的侵袭和转移过程中起着一定的作用。MMP-9 可以调节血管内皮细胞活性, 诱导新生血管形成, 在肿瘤的侵袭和转移过程中起着重要作用, MMP-9 高表达与肿瘤的预后不良有关。本研究发现 MMP-9 在 RB 组织中呈高表达, 并且眼内压增高期显著高于眼内生长期, 眼外生长期显著高于眼内生长期及眼内压增高期。MMP-9 的表达随着侵袭程度的增高而逐渐增高, 随细胞分化程度的增高呈逐渐降低趋势。这与国内外报道相似^[4-7, 14]。可见, SUZ12、MMP-9 的表达与 RB 的恶性潜能相关。

本研究还发现 RB 组织中 SUZ12 与 MMP-9 的表达呈正相关。二者相互作用机制仍不明确。作者推测可能是由于 RB 组织中 SUZ12 基因活性增高, 激活 MMP-9 基因的转录活性, 从而使 MMP-9 的表达增高。有研究发现 SUZ12 可能调控许多靶基因的表达, 对判断肿瘤的侵袭能力和预后具有重要价值^[15]。SUZ12 可能起着类似于癌基因的作用, 可能通过抑制某些抑癌基因的表达从而影响肿瘤的恶性潜能^[11, 16]。SUZ12 对 MMP-9 的调控作用及机制仍有待于进一步研究。

总之, SUZ12 及 MMP-9 在 RB 组织中高表达, 并且其表达水平预示着肿瘤的恶性程度, 不仅对 RB 的诊断及预后判断有指导意义, 还有望成为 RB 治疗的分子靶点。有关 SUZ12 对 MMP-9 的调控作用仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, et al. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity[J]. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4061-4071.
- [2] Pasini D, Bracken AP, Hansen JB, et al. The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(10): 3769-3779.
- [3] Li H, Cai Q, Wu H, et al. SUZ12 promotes human epithelial ovarian cancer by suppressing apoptosis via silencing HRK[J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(11): 1462-1472.
- [4] Kim JH, Kim JH, Cho CS, et al. Differential roles of ma-

trix metalloproteinase-9 and -2, depending on proliferation or differentiation of retinoblastoma cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(3): 1783-1788.

- [5] Adithi M, Nalini V, Kandalam M, et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in retinoblastoma[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007, 29(6): 399-405.
- [6] Long H, Zhou B, Jiang FG. Expression of MMP-2 and MMP-9 in retinoblastoma and their significance[J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(5): 489-491.
- [7] Bajenaru M L, Pina Y, Murray T G, et al. Gelatinase expression in retinoblastoma; modulation of LH (BETA) T (AG) retinal tumor development by anecortave acetate[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(6): 2860-2864.
- [8] Stannard C, Lipper S, Sealy R, et al. Retinoblastoma; correlation of invasion of the optic nerve and choroids with prognosis and metastasis[J]. *Br J Ophthalmol*, 1979, 63(8): 560-570.
- [9] Hahn MA, Hahn T, Lee DH, et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10280-10289.
- [10] Ren G, Baritaki S, Marathe H, et al. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(12): 3091-3104.
- [11] Zhang H, Ye YJ, Cui ZR, et al. The relationship between suppressor of zeste 12 expression and clinical features of gastric cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2011, 26(2): 141-143.
- [12] Kleer CG, Cao Q, Varambally S, et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(2): 11606-11611.
- [13] Crea F, Hurt EM, Farrar WL. Clinical significance of polycomb gene expression in brain tumors[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9(2): 265-270.
- [14] 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[J]. *国际眼科杂志*, 2012, 12(8): 1470-1472.
- [15] Yu JD, Yu JJ, Rhodes DR, et al. A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10657-10663.
- [16] Kotake Y, Cao R, Viatour P, et al. pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4a tumor suppressor gene[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 49-54.

(收稿日期: 2013-09-17 修回日期: 2013-10-18)