

TTT 治疗脉络膜黑色素瘤实验研究

王宏彬¹, 王光璐², 王名扬², 彭晓燕²

基金项目: 中国首都医学发展基金资助项目(No. ZD199811)
作者单位:¹(100050) 中国北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院眼科;²(100037) 中国北京市, 首都医科大学附属北京同仁眼科中心
作者简介: 王宏彬, 女, 医学博士, 副主任医师, 2004/2005 年在美
国宾夕法尼亚大学眼科做博士后, 研究方向: 眼底病。
通信作者: 王宏彬. wang_hbcn@yahoo. com. cn
收稿日期: 2008-11-11 修回日期: 2009-01-02

Experimental study of TTT treatment of choroidal melanoma

Hong-Bin Wang¹, Guang-Lu Wang², Ming-Yang Wang², Xiao-Yan Peng²

Foundation item: Medical Development Fund Projects in China's Capital(No. ZD199811)

¹Department of Ophthalmology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; ² Department of Ophthalmology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100037, China

Correspondence to: Hong-Bin Wang, Department of Ophthalmology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. wang_hbcn@yahoo. com. cn

Received: 008-11-11 Accepted: 2009-01-02

Abstract

• **AIM:** To discuss the related research of histopathologic changes and apoptosis after transpupillary thermotherapy treatment on human choroidal melanoma.

• **METHODS:** TTT for the clinical treatment beyond the control of choroidal melanoma patients with huge eyeballs removed, paraffin-embedded sections, the histopathological examination, VIII factor, immuno-histochemical study and detect apoptosis on TTT treatment region by TUNEL method.

• **RESULTS:** After TTT treatment, the laser spot irradiated tumor site's cell structure disappears, and the outermost layer is wet necrotic area. The middle layer is dry necrosis, nuclear pyknosis, in the dry necrosis areas and below the tumor tissue. Positive staining can be seen a large number of apoptotic cells and macrophages, tumor capillary was visible in expansion in the laser spot.

• **CONCLUSION:** TTT treatment of choroidal melanoma can directly lead to the destruction of tumor tissue necrosis, but also caused tumor cell apoptosis. However, if the tumor thick can not be completely destroyed, the tumor beneath will cause localized telangiectasia after the laser. Whether it will increase the transfer need to be further explored.

• **KEYWORDS:** transpupillary thermotherapy; apoptos-is; melanoma

Wang HB, Wang GL, Wang MY, *et al.* Experimental study of TTT treatment of choroidal melanoma. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(2):243-245

摘要

目的: 探讨人脉络膜黑色素瘤经瞳孔温热疗法(transpupillary thermotherapy, TTT) 治疗后的组织病理学变化和细胞凋亡相关研究。

方法: 对经临床 TTT 治疗不能控制的巨大脉络膜黑色素瘤患者摘除眼球, 石蜡包埋切片, 行组织病理学检查, VIII 因子免疫组织化学研究, 并应用 TUNEL 方法对 TTT 治疗区域行细胞凋亡检测。

结果: TTT 治疗后, 在激光斑照射的肿瘤部位, 最外层为湿性坏死区, 其细胞结构消失。中间为干性坏死区, 细胞核固缩, 在干性坏死区及其下方的肿瘤组织中, 可见大量凋亡染色阳性细胞及巨噬细胞, 在激光斑底部可见肿瘤毛细血管呈扩张状态。

结论: TTT 治疗脉络膜黑色素瘤可以直接摧毁肿瘤组织导致坏死, 同时也会引起肿瘤细胞凋亡。但如果瘤体组织太厚, 不能完全破坏, 则肿瘤下方组织激光后会局引起局部毛细血管扩张, 是否会加重转移, 尚需进一步探讨。

关键词: 经瞳孔温热疗法; 细胞凋亡; 脉络膜黑色素瘤

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 02. 009

王宏彬, 王光璐, 王名扬, 等. TTT 治疗脉络膜黑色素瘤实验研究. 国际眼科杂志 2009;9(2):243-245

0 引言

经瞳孔温热疗法(transpupillary thermotherapy, TTT) 目前广泛应用于治疗眼部脉络膜黑色素瘤, 视网膜血管瘤, 转移癌等, 但其治疗机制仍在进一步研究。我们通过对 TTT 治疗失败的人脉络膜黑色素瘤手术摘除眼进行分子生物学检测, 研究激光治疗对人脉络膜黑色素瘤的组织病理学影响和细胞凋亡在其中的作用, 以进一步了解 TTT 的治疗机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选用 3 例 TTT 治疗失败的人脉络膜黑色素瘤患眼。所有患者均在同仁眼科中心门诊应用科林公司提供的 810nm 半导体红外激光(Iridex, oculight, SLx, 用特殊的 TTT 转换器安装在裂隙灯上) 行 TTT 治疗。激光的光斑直径 3mm, 能量 800mW, 时间 1min × 2 次。治疗后 1wk 因肿瘤不能控制, 在患者知情同意的情况下, 门诊摘除患眼, 送同仁医院眼科病理取材并制作蜡块(图 1B), 进行组织病理学, 免疫组织化学和细胞凋亡检测。

1.2 方法 切片制作: 选激光斑处行 5μm 厚度连续石蜡切片, 置于 APES 胶片上。60℃ 烤片 8h 以上备用。用伊红和苏木素染色进行组织病理学检查。细胞凋亡 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 试剂盒检测: 石蜡切片脱蜡至水, 蒸馏水

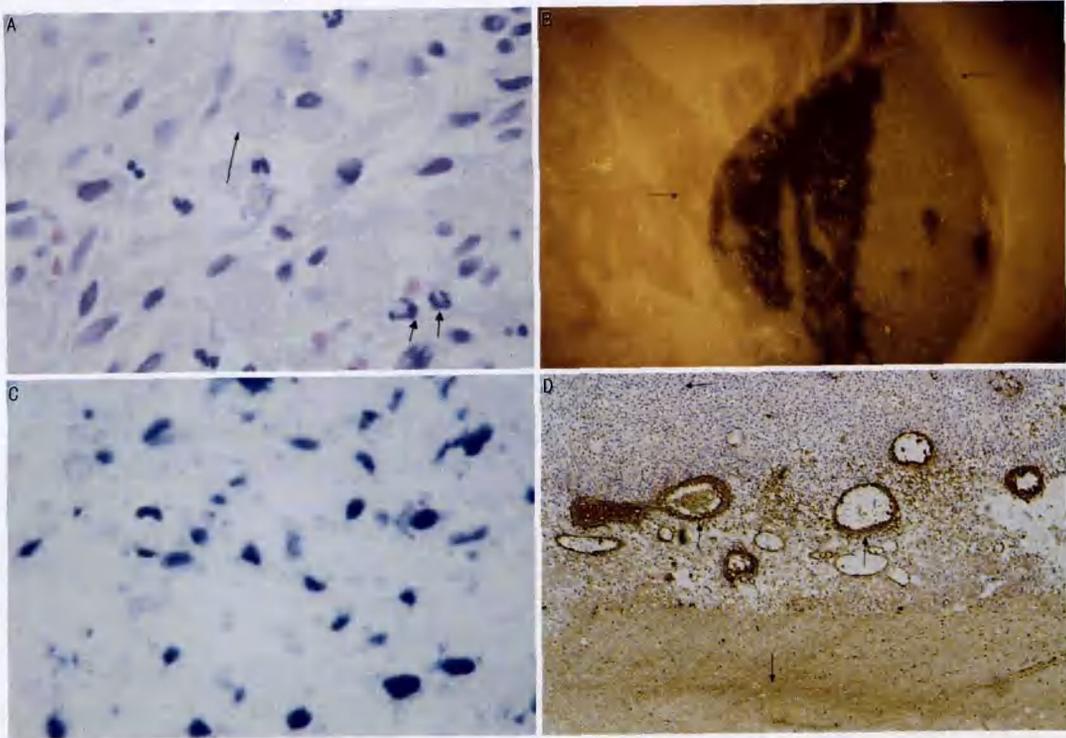


图1 A:TTT激光治疗后的脉络膜黑色素瘤组织干性坏死区可见肿瘤细胞核固缩,形态不规则(HE染色 $\times 200$);B:人眼脉络膜黑色素瘤组织蜡块,表面已封蜡;C:激光治疗后干性坏死区及其下方的肿瘤组织中,可见大量蓝色凋亡染色阳性细胞(BCIP/NBT染色 $\times 200$);D:免疫组织化学染色:瘤体组织激光斑部位,可见湿性坏死区和干性坏死区。激光斑底部干性坏死区肿瘤组织中可见局部毛细血管扩张,VIII因子免疫组织化学染色阳性(DAB染色,苏木素复染),湿性坏死区细胞结构消失(向下箭头方向 $\times 20$)

洗;2.5g/L高锰酸钾及草酸脱色素。微波炉热修复2min;胰酶消化20s,PBS洗5min $\times 3$ 次;冰上加Triton-S 100,PBS洗;加tunnel试剂,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBS洗;加入AP试剂,37 $^{\circ}$ C孵育0.5h,PBS洗,BCIP/NBT显色。脱水,透明,封片。对照组选用未行激光的脉络膜黑色素瘤组织。免疫组化研究:选取有激光斑的瘤组织切片,应用VIII因子一抗(Santa Cruz公司)及通用型二抗,两步法孵育后,DAB染色。

2 结果

正常未经治疗的脉络膜黑色素瘤组织未见细胞凋亡的发生,肿瘤细胞排列紧密。激光治疗后的脉络膜黑色素瘤组织阴性对照:加tunnel制剂时,只加DUTP,未加酶,未见凋亡阳性表达。TTT治疗后,在人眼激光斑照射的肿瘤部位,最外层可见大片湿性坏死区,其内组织细胞结构消失。中间为干性坏死区,可见肿瘤细胞核固缩(图1A),在干性坏死区及其下方的肿瘤组织中,可见大量凋亡染色阳性细胞及巨噬细胞侵入(图1C)。激光斑底部干性坏死区肿瘤组织中可见局部毛细血管广泛扩张,VIII因子免疫组织化学染色阳性(图1D)。

3 讨论

经瞳孔温热疗法目前主要应用于治疗老年黄斑变性,脉络膜黑色素瘤^[1-5],TTT亦可作为放射敷贴治疗的辅助治疗。其优点是可以轻易到达眼后节,加快缩小肿瘤组织,减少对周围正常组织的破坏。作为恶性肿瘤的治疗方法,其治疗后组织坏死的深度及治疗机制,尚需要进一步研究。我们的研究通过对TTT治疗后的人脉络膜黑色素瘤病眼进行检查,发现在激光斑照射的肿瘤部位,最外层可见大片湿性坏死区,其内组织细胞结构消失,这表明温热疗法本身可由于热效应导致局部黑色素肿瘤的直接坏死。中间为干性坏死区,干性和湿性坏死区域可以达到

1.5mm深度。在干性坏死区及其下方的肿瘤组织中,可见大量凋亡染色阳性细胞及巨噬细胞侵入。这表明TTT治疗中肿瘤细胞凋亡和细胞坏死共同存在,同时伴随巨噬细胞的吞噬作用。与传统激光不同,TTT传送的热能可使眼底温度升高至45~60 $^{\circ}$ C,这一温度不至于象激光光凝那样,引起细胞的即刻坏死,而是首先导致细胞膜的损害,蛋白质变性,染色质破坏以及细胞生化功能的紊乱等,数小时及数天后,才发展为坏死。故我们认为对于小的肿瘤组织,只要TTT光斑可以覆盖,会收到较好的效果。但TTT治疗后1wk,我们发现激光斑底部肿瘤组织可见局部毛细血管明显扩张,我们认为可能是由于热效应刺激毛细血管反应性扩张。国外文章报道^[6],TTT治疗失败眼,7例中有5例发生巩膜外转移,在这5例中,B超仅发现1例。我们发现的TTT治疗后肿瘤底部毛细血管扩张有可能是加速巩膜外转移的原因之一,应该引起重视。所以,对于TTT治疗后的肿瘤眼尤其是瘤体较大的需二次治疗的肿瘤眼要密切观察随访。对于早期巩膜外转移,由于B超不宜发现,会对患者造成危险,所以病例的选择应该非常慎重。我们认为对于恶性肿瘤,最好选择一次激光治疗就可以覆盖并摧毁瘤体的眼进行治疗,这样会增加安全性。这一治疗技术与肿瘤转移的关系尚需要进行多中心大样本的研究。

总之,我们发现TTT治疗脉络膜黑色素瘤可以直接摧毁肿瘤组织,引起肿瘤细胞的坏死,及肿瘤底部肿瘤细胞的凋亡,同时促进吞噬细胞侵入。但TTT激光治疗后可以引起光斑下方肿瘤组织毛细血管扩张,有可能会加重巩膜外转移,这一点应该引起重视。

参考文献

1 Stoffelns BM. Tumor regression and visual outcome after transpupillary

thermotherapy (TTT) for malignant choroidal melanoma. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2006;223(1):74-80
2 Spire M, Devouassoux MS, Kodjikian L, et al. Primary transpupillary thermotherapy for 18 small posterior pole uveal melanomas. *Am J Ophthalmol* 2006;141(5):840-849
3 Desjardins L, Lumbroso-Le Rouic L, Levy-Gabriel C, et al. Combined proton beam radiotherapy and transpupillary thermotherapy for large uveal melanomas: a randomized study of 151 patients. *Ophthalmic Res* 2006;38(5):255-260

4 Kiratli H, Bilgic S, Söylemezoglu F, et al. Peripheral subretinal pigment accumulation following transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2008;39(1):60-62
5 Aaberg TM Jr, Bergstrom CS, Hickner ZJ, et al. Long-term results of primary transpupillary thermal therapy for the treatment of choroidal malignant melanoma. *Br J Ophthalmol* 2008;92(6):741-746
6 Zaldivar RA, Aaberg TM, Sternberg P Jr, et al. Clinicopathologic findings in choroidal melanomas after failed transpupillary thermotherapy. *Am J Ophthalmol* 2003;135(5):657-663

热烈祝贺《国际眼科杂志》被国际权威检索系统 美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》及荷兰《医学文摘》 连续收录并被波兰《哥白尼索引》最新收录!

本刊讯 《国际眼科杂志》自2002年以来先后被美国《化学文摘》(CA)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ)及荷兰《医学文摘》(Embase Scopus)连续收录,最近又被新的国际医学生物学检索系统波兰《哥白尼索引》(Index of Copernicus, IC)收录。这表明本刊的国际影响不断扩大,并表明本刊的学术质量得到多个国际权威检索系统的认可。值此,我们向大力支持本刊的编委、作者及读者致以崇高的敬意并表示衷心的感谢!

《国际眼科杂志》编辑部
2009-02-17

波兰《哥白尼索引》(Index of Copernicus, IC)简介

波兰《哥白尼索引》(<http://scientists.indexcopernicul.com/index.php>)是由 Medical Science International (国际医学)创办的医药学、生物学国际检索系统,是一个新的通向科学信息的世界性的门户;有益地补充了美国《医学索引》(Medline)和美国科学信息研究所 (ISI) 的内容。

波兰《哥白尼索引》针对的受众有:学术研究者和科学家,临床医师,科技信息提供者和出版商,图书管理员,期刊编辑,相关政府机构。

波兰《哥白尼索引》的服务可分为以下几类:

重要期刊列表 提供广泛的科学信息采集,期刊策划、推广,服务作者。Index Copernicus 还致力于提高地方性期刊的国际影响。

科学家 提供衡量个人专业成就的统一方法,可以用于大学和政府的管理。对单个科学家进行评论、提供他们的简历和档案,可服务于学位晋级目的,以及寻找研究伙伴和科学带头人。它还有助于寻找具有相似学术兴趣和经历的研究者。

机构 基于从 Scientists Section 收集的信息,提供关于科学机构、院校等的分析数据。从而为提供科研经费和策划科学研究的政府及其他机构提供依据。

实验室和临床试验注册 此项服务提供已有实验室/动物/人体试验的数据库信息,有利于整个相关学科的发展。许多国际期刊,特别是那些被列入 Medline 和 ISI 的期刊不久将被要求为发表的研究结果提供“试验注册号”。Index Copernicus 将会成为一个国际性的注册号储存器。

临床个案报告注册 该服务的目的是收集临床案例报告,为提供个案的临床医生提供一个交流的平台,以有利于跨学科交流,从而对现有的医学知识进行国际化的整合。

专利数据库 这项服务提供生物医学领域记录在案和申请中的专利的数据库信息。该服务还将提供关于专利注册程序,专利注册办公室和相关法律事务的信息。

药物信息列表 这项服务将依据注册文件[SPCs]提供有关处方药和非处方药的信息。这些信息将具体包括化学名称、商业名称、制造商、ATC 代码、病症以及注册国。