

【实验研究】

毛英 白海霞 畅颖 高飞 张志豹 张旭 李彬

【摘要】 目的 研究葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma,UM)组织中星形胶质细胞活化基因-1(astrocyte elevated gene-1,AEG-1)的表达及其与临床组织病理学的关系。**方法** 收集2017年5月,经眼科病理室确诊为UM且临床资料完善的50例患者(50眼)UM石蜡组织标本,经眼球摘除但大部分葡萄膜组织正常的石蜡组织标本为对照组。应用免疫组织化学法检测并分析UM临床病理学特征与AEG-1的相关性。**结果** AEG-1蛋白染色呈粉红色或者红色,胞核染色。实验组中,AEG-1阴性表达21眼(42.0%),阳性表达29眼(58.0%);对照组中AEG-1阴性表达15眼(30.0%),阳性表达35眼(70.0%)。实验组与对照组AEG-1表达差异有显著统计学意义($P=0.000$),提示AEG-1在UM中高表达。在实验组中,当UM患者即存在肿瘤累及睫状体、虹膜新生血管生成、肿瘤基底最大直径 >16 mm、肿瘤高度 >8 mm、肿瘤属于上皮样或混合细胞型、肿瘤眼外生长的患者,其AEG-1阳性表达率分别为73.1%、69.4%,明显高于非高危因素患者,以上各特征组AEG-1表达比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

◆ **Responsible author:** LI Bin, E-mail:
◆ libin43_99@163.com; ORCID: 0000-
◆ 0003-0119-1681

北京同仁医院眼科 2013 年 1 月至 2017 年 5 月,经眼科病理室确诊为 UM 且临床资料完善的 50 例患者(50 眼)UM 石蜡组织标本为实验组,11 例(11 眼)因外伤行眼球摘除但大部分葡萄膜组织正常的石蜡组织标本为对照组。应用免疫组织化学法检测所有石蜡标本中 AEG-1 的表达,并分析 UM 临床病理学特征与 AEG-1 的相关性。结果 AEG-1 蛋白染色呈粉红色或者红色,主要定位于 UM 核周、细胞浆和细胞膜。实验组中,AEG-1 阴性表达 21 眼(42.0%),阳性表达 29 眼(58.0%);对照组中 AEG-1 均呈阴性表达,两组 AEG-1 表达比较差异有显著统计学意义($P=0.000$),提示 AEG-1 在 UM 中高表达。在实验组中,当 UM 患眼存在临床组织病理学高危因素时,即存在肿瘤累及睫状体、虹膜新生血管生成、肿瘤基底最大直径 >16 mm、肿瘤高度 >8 mm、肿瘤细胞为混合细胞型、肿瘤细胞属于上皮样或混合细胞型、肿瘤眼外生长的患者,其 AEG-1 阳性表达率分别为 73.1%、73.9%、95.2%、82.4%、83.3%、74.1%、69.4%,明显高于非高危因素患者,以上各特征组 AEG-1 表达比较差异均有统计学意义。

义(均为 $P < 0.05$)。而患者性别、眼别、年龄、累及视盘与否、继发视网膜脱离与否、上皮样细胞型、侵犯巩膜导管与否组 AEG-1 表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$)。**结论** AEG-1 在 UM 组织中高表达,且与 UM 临床组织病理学多种高危因素呈显著相关性,提示 AEG-1 的高表达有可能成为判断 UM 患者预后的重要指标之一。

【关键词】 葡萄膜黑色素瘤;星形胶质细胞活化基因-1;高危因素;免疫组织化学

【中图分类号】 R773.4

葡萄膜黑色素瘤(uveal melanoma, UM)是成人最常见的眼内原发性恶性肿瘤,每年一百万人中近6人罹患此疾病^[1],其中脉络膜黑色素瘤和睫状体黑色素瘤所占比例分别为 92% ~ 94% 和 6% ~ 7.8%^[2]。UM 组织病理学与患者预后之间相关性研究成果已成为 UM 患者临床检测的重要手段及指标。近几年研究发现一系列癌基因与肿瘤的发生发展有着显著相关性,其中星形胶质细胞活化基因-1(astrocyte elevated gene-1, AEG-1)是目前研究较热的一个原癌基因, AEG-1 表达的蛋白又称异黏蛋白(metadherin, MTDH),其过表达已被证实与多种恶性肿瘤的发生发展有显著相关性,但 AEG-1 在 UM 中的表达尚未见相关的研究^[3]。本研究通过免疫组织化学法检测 AEG-1 在 UM 组织中的表达,并分析其表达与临床组织病理学高危因素的关系,初步探讨 AEG-1 表达与 UM 侵袭转移的相关性,以期为 UM 临床相关理论治疗及其预后提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织病理学标本 收集 2013 年 1 月至 2017 年 5 月北京同仁医院眼科病理室存档的 50 例(50 眼)UM 石蜡组织标本(实验组),11 例(11 眼)因外伤行眼球摘除术但大部分葡萄膜组织正常的石蜡组织标本(对照组)。UM 石蜡标本中,男 25 例(25 眼),女 25 例(25 眼);右眼 26 例,左眼 24 例;患者年龄 28 ~ 79(47.6 ± 14.9)岁。伴视盘受累者 33 例(33 眼),继发视网膜脱离者 41 例(41 眼),累及睫状体者 26 例(26 眼),伴虹膜新生血管者 23 例(23 眼);肿瘤最大直径范围为 3 ~ 23 mm,其中 > 16 mm 者 21 例(21 眼);肿瘤高度范围为 1 ~ 14 mm,其中 > 8 mm 者 17 例(17 眼);上皮样细胞型 9 例(9 眼),混合细胞型 18 例(18 眼),上皮样或混合细胞型 27 例(27 眼);发生肿瘤侵犯巩膜导管者 47 例(47 眼);肿瘤眼外生长患者 36 例(36 眼)。所有病例术前均未接受化学治疗或放射治疗等辅助治疗。眼球标本均经过 100 g · L⁻¹多聚甲醛固定,并常规石蜡包埋。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗人 MTDH 多克隆抗体(ab45338,美国 Abeam 公司);免疫组织化学 Elivision III Super 试剂盒(KIT-9922,中国福州迈新生物技术开发公司);AEC 显色试剂盒(AEC-0037,中国泰科兰博北京生物技术有限公司);PBS 缓冲液、枸橼酸盐缓冲液(MVS-0066,中国福州迈新生物技术开发公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 AEG-1 表达 各组眼蜡

块组织连续切片 5 张(厚 3.0 ~ 3.5 μm),其中 1 张经过苏木精-伊红染色进行病理诊断和分类,3 张经免疫组织化学染色,1 张以 PBS 代替一抗染色予以对照。石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱蜡水化, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。加入 pH 9.0 的 Tris/EDTA 抗原修复液进行微波抗原修复,滴加体积分数 3% H₂O₂ 阻断溶液,室温条件下孵育 15 min 以阻断其内源性过氧化物酶的活性;吸去 H₂O₂, PBS 漂洗 3 次,加入兔抗人 MTDH(AEG-1)多克隆抗体一抗(1:200),4℃孵育过夜, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;以 HRP 标记即用型酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物,室温孵育 60 min, PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;每张切片滴加新鲜配制的 AEC 溶液,在光学显微镜下控制显色;苏木素复染 5 min,盐酸分化 3 s, PBS 漂洗 3 次,水性封片剂封片。其中 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学染色结果判定 所有患眼均经 2 名以上病理科专家在不知临床资料的前提下进行分析确定。AEG-1 表达产物主要定位于细胞核周、细胞浆和细胞膜,根据染色细胞百分率及染色程度进行评定^[4], (1)染色细胞所占比计数细胞的百分比:每张组织切片随机选取 5 个高倍镜视野,按照阳性细胞数占同类细胞数的百分比情况评分, ≤ 5% 记 0 分, > 5% ~ 25% 记 1 分, > 25% ~ 50% 记 2 分, > 50% 记 3 分。(2)染色程度评分:无着色记 0 分,浅着色记 1 分,中度着色为 2 分,深着色为 3 分。将每张组织切片染色程度评分与染色细胞百分比得分相乘的积为染色结果最后得分,其中 0 ~ 1 分记为阴性(-), 2 ~ 3 分记为弱阳性(±), 4 ~ 6 分记为中等阳性(+), > 6 分记为强阳性(++)。为了简化数据处理,将阴性(-)与弱阳性(±)合并为阴性;中等阳性(+)与强阳性(++)合并为阳性。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。在实验组和对照组 AEG-1 的表达用频数和率表示。采用 Pearson χ^2 检验和 Fisher 确切概率法比较实验组和对照组的组间及 UM 不同临床组织病理学特征分类组中 AEG-1 表达的差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AEG-1 在 UM 和正常葡萄膜组织标本中的表达 AEG-1 蛋白染色物质呈准确的粉红色或者红色颗粒,主要位于 UM 细胞核周、细胞浆和细胞膜。免疫组织化学染色结果显示,实验组 50 例(50 眼)UM 组织标本中, AEG-1 阴性表达 21 眼(42.0%), 阳性

表达 29 眼(58.0%);对照组 11 例(11 眼)正常葡萄膜组织标本中 AEG-1 均呈阴性表达,两组 AEG-1 表

达比较差异有显著统计学意义($\chi^2 = 12.162, P = 0.000$),提示 AEG-1 在 UM 中高表达(图 1)。

图 1 AEG-1 在 UM 和正常葡萄膜组织标本中的表达情况(AEC 染色,×40)。A:实验组中患眼葡萄膜组织(脉络膜),其广泛中度着色,AEG-1 呈阳性表达(箭头所示);B:对照组中正常葡萄膜组织(脉络膜),组织范围内无着色且背景清晰,AEG-1 呈阴性表达(箭头所示);C:对照组中正常葡萄膜组织(睫状体、虹膜),组织范围内无着色且背景清晰,AEG-1 呈阴性表达(箭头所示)

2.2 AEG-1 表达与 UM 一般临床病理特征的关系

UM 患眼临床病理特征中,不同性别($P = 1.000$)、眼别($P = 1.000$)、年龄间($P = 0.398$),累及视盘与否($P = 1.000$),继发视网膜脱离与否($P = 1.000$),AEG-1 的表达差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 50 例 UM 患眼的一般临床病理特征及 AEG-1 的表达 [n(%)]

一般病理特征	眼数	AEG-1 阳性表达	χ^2 值	P 值
性别				
男	25(50.0)	14(56.0)	0.082	1.000
女	25(50.0)	15(60.0)		
眼别				
右	26(52.0)	15(57.7)	0.002	1.000
左	24(48.0)	14(58.3)		
年龄				
<50 岁	27(54.0)	14(51.9)	0.911	0.398
≥50 岁	23(46.0)	15(65.2)		
视盘受累				
是	33(66.0)	19(57.6)	0.007	1.000
否	17(34.0)	10(58.8)		
继发视网膜脱离				
是	41(82.0)	24(58.5)	0.027	1.000
否	9(18.0)	5(55.6)		

2.3 AEG-1 表达与 UM 临床病理学高危因素的关系 实验组中,各高危因素组 AEG-1 阳性表达情况见表 2,各特征组除肿瘤细胞为上皮样细胞型及肿瘤侵犯巩膜导管外,AEG-1 表达比较差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),提示 UM 组织中 AEG-1 的表达差异与患者肿瘤累及睫状体,虹膜新生血管生成,肿瘤基底最大直径 > 16 mm,肿瘤高度 > 8 mm,细胞类型为混合细胞型、上皮样或混合细胞型,眼外生长其均有显著相关性(表 2,图 2 ~ 图 5)。

3 讨论

UM 是成人最常见的眼内原发性肿瘤,恶性程度高且预后差^[5-6],基于转移风险的不确定性,需要对更

表 2 50 例(50 眼)UM 患眼中 AEG-1 表达及其与组织病理学高危因素的关系 [n(%)]

组织病理学高危因素	眼数	AEG-1 阳性表达	χ^2 值	P 值
累及睫状体				
是	26(52.0)	19(73.1)	5.055	0.044
否	24(48.0)	10(41.7)		
虹膜新生血管				
是	23(46.0)	17(73.9)	4.428	0.047
否	27(54.0)	12(44.4)		
肿瘤基底最大直径				
> 16 mm	21(42.0)	20(95.2)	20.611	0.000
≤16 mm	29(58.0)	9(31.0)		
肿瘤高度				
> 8 mm	17(34.0)	14(82.4)	6.271	0.016
≤8 mm	33(66.0)	15(45.5)		
上皮样细胞型				
是	9(18.0)	5(55.5)	0.027	1.000
否	41(82.0)	24(58.5)		
混合细胞型				
是	18(36.0)	15(83.3)	7.410	0.008
否	32(64.0)	14(43.8)		
上皮样或混合细胞型				
是	27(54.0)	20(74.1)	6.226	0.021
否	23(46.0)	9(39.1)		
侵犯巩膜导管				
是	47(94.0)	28(59.6)	0.797	0.565
否	3(6.0)	1(33.3)		
眼外生长				
是	36(72.0)	25(69.4)	6.913	0.012
否	14(28.0)	4(28.6)		

多的预后相关因素作进一步研究^[7]。Kang 等^[8]于 2002 年鉴定发现 AEG-1。有研究认为 AEG-1 可作为一种广泛肿瘤生物标记物,在神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤中均存在 AEG-1 高表达^[9]。本研究通过对 AEG-1 在 UM 中的表达及其与临床组织病理学特征相关性研究显示 AEG-1 表达与 UM 的预后具有相关性。

图2 虹膜新生血管形成、肿瘤累及睫状体患眼标本中 AEG-1 的表达(AEC 染色, ×40)。A: 患眼有虹膜新生血管膜的形成, 伴虹膜前粘连, 其肿瘤组织大面积中度着色, AEG-1 呈阳性表达; B: 患眼肿瘤累及睫状体, 少量侵犯睫状体平坦部, 其肿瘤内部区域局部深度着色, AEG-1 呈阳性表达

图3 肿瘤最大基底直径 > 16 mm、肿瘤高度 > 8 mm 患眼标本中 AEG-1 的表达(AEC 染色, ×40)。A: 患眼肿瘤组织几乎充满整个眼球, 并伴坏死组织的形成, 测得肿瘤最大基底直径 > 16 mm, 其大面积深度着色, AEG-1 呈阳性表达; B: 患眼肿瘤呈弥漫生长, 表面被覆纤维结缔组织被膜, 瘤体内部可见纤维结缔组织分割的囊样改变, 肿瘤高度 > 8 mm, 其大面积中度着色, AEG-1 呈阳性表达

图4 不同肿瘤细胞类型患眼标本中 AEG-1 的表达。A: UM 细胞类型为混合细胞型, 肿瘤组织中上皮样细胞占比明显大于梭形细胞, 其大面积深度着色, AEG-1 呈阳性表达(AEC 染色, ×100); B: UM 细胞类型为混合细胞型, 肿瘤组织中梭形细胞占比明显大于上皮样细胞, 其小面积浅度着色, AEG-1 呈阴性表达(AEC 染色, ×100); C: UM 细胞类型为上皮样细胞型, 在高倍镜下观察几乎所有细胞, 核周具有清晰可见且定位准确的红色颗粒, 胞浆及胞膜呈粉红染色, 背景清晰, AEG-1 呈阳性表达(AEC 染色, ×400); D: UM 细胞类型为梭形细胞型, 肿瘤组织范围内未见着色, 且背景清晰, AEG-1 呈阴性表达(AEC 染色, ×40)

本研究通过 AEG-1 表达与一般临床病理特征的相关性分析, 得出不同年龄、性别、眼别、是否视盘受

图5 肿瘤组织侵犯视盘、肿瘤眼外生长患眼标本中 AEG-1 的表达。A: 患眼可见肿瘤组织侵犯视盘, 筛板后凸但未穿出筛板, 神经根未见明显肿瘤组织侵犯, 其肿瘤组织中未见着色, AEG-1 呈阴性表达(AEC 染色, ×40); B: 患眼肿瘤组织穿过基底部巩膜导管, 沿视神经根行球外生长, 其肿瘤组织大面积中度着色, AEG-1 呈阳性表达(AEC 染色, ×20)

累、是否继发视网膜脱离及是否侵犯巩膜导管组 AEG-1 的表达差异均无统计学意义(均为 $P > 0.05$), 但其他相关大样本的研究认为患者预后与高龄、视盘受累, 巩膜导管也存在相关性^[10], 这与本研究结果不一致, 可能是样本量较少所致^[11]。

本研究显示 AEG-1 在 UM 中呈高表达。有研究依据肿瘤最大基底直径将 UM 分为小肿瘤(≤ 10 mm)、中肿瘤($> 10 \sim 16$ mm)、大肿瘤三个等级(> 16 mm)^[12], 随着肿瘤增大其生存率逐渐下降^[13-14], 所以最大基底直径可以作为预测 UM 患者预后相关因素之一。本实验中将小肿瘤及中肿瘤的最大基底直径合并, 分析肿瘤最大基底直径 > 16 mm 与 ≤ 16 mm 两组间 AEG-1 表达的差异, 结果显示, 差异具有统计学意义($P = 0.000$), 说明肿瘤基底最大直径越大, AEG-1 阳性表达越明显, 提示患者预后越差。同样关于肿瘤大小的参数中, 肿瘤高度 > 8 mm 其 5 a 转移率较肿瘤高度 ≤ 8 mm 高, 所以瘤体高度也被认为是评估 UM 患者预后的关键因素^[15]。本研究分析肿瘤高度 > 8 mm 与 ≤ 8 mm 两组间 AEG-1 表达的差异性, 两组比较差异具有统计学意义($P = 0.016$), 考虑 AEG-1 阳性表达率随肿瘤高度的增大而升高, 同时 UM 转移风险率也随之增大。

当 UM 累及或原发于睫状体时, 因肿瘤位于眼前节, 与房水流出道相邻, 加之多数肿瘤患者有虹膜新生血管的生成, UM 的转移风险也会明显增高^[16]。本实验通过对 UM 累及睫状体与否和虹膜新生血管生成与否与 AEG-1 表达的相关性分析显示, 两特征组内比较差异均具有统计学意义($P = 0.044$ 、 0.047), 说明 AEG-1 的高表达与 UM 累及睫状体和虹膜新生血管生成密切相关, 提示 AEG-1 的高表达与 UM 转移有关。

根据病理细胞形态, 将 UM 分为 4 种细胞类型, 分别为梭形细胞型、上皮样细胞型、混合细胞型、其他类型(包括簇状型、坏死型或气球样细胞型等)。有研究发现梭形细胞型预后较好, 上皮样细胞型预后最差, 混合细胞型预后取决于上皮样细胞与梭形

细胞的比例^[17]。本研究显示 AEG-1 表达与 UM 细胞类型为混合细胞型具有显著相关性($P = 0.008$),并且当混合细胞型中上皮样细胞占比例较大时,AEG-1 阳性表达率明显升高,但 UM 细胞类型仅为上皮样细胞型时,其与 AEG-1 表达无相关性($P = 1.000$),其原因可能是 UM 上皮样细胞型患眼样本量较少(5 眼),且对比样本多为混合细胞型。为了提高多种细胞类型与 AEG-1 表达相关性的准确性,研究合并分析上皮样型或混合型类型,得出当 UM 细胞为上皮样型或混合型时,其 AEG-1 阳性表达率为 74.1%,差异具有统计学意义($P = 0.021$),表明上皮样或混合细胞型与 AEG-1 具有相关性。基于上述统计结果,理论上认为 AEG-1 的高表达与上皮样或混合细胞类型有相关性,提示患者预后差^[17]。

球外生长也被认为是肿瘤转移的独立预后因素,当肿瘤球外生长时,更容易通过血管、淋巴管或直接蔓延等途径增加转移的风险^[18]。本研究同样分析了球外生长与否与 AEG-1 表达的相关性,发现球外生长与 AEG-1 表达显著相关,差异具有统计学意义($P = 0.012$),考虑 AEG-1 的高表达与肿瘤球外生长具有相关性。

综上所述,在 UM 中 AEG-1 的表达与肿瘤侵犯睫状体、虹膜新生血管生成、基底直径 $> 16\text{ mm}$ 、肿瘤高度 $> 8\text{ mm}$ 、细胞形态为上皮样细胞型或混合细胞型及肿瘤球外生长均有显著相关性,提示转移风险高,预后差。但对于其机制的研究,AEG-1 是否通过改变 UM 细胞生物学行为、调节侵袭转移相关的信号传导通路以及相关基因的表达水平对 UM 侵袭转移的影响尚需要分子生物学实验来进一步研究证明。

参考文献

- [1] WAGNER M, MARIANI P, BIDARD FOCM, RODRIGUES MJ, FARKHONDEH F, CASSOUX N, *et al.* Diffusion-weighted MRI for uveal melanoma liver metastasis detection[J]. *Eur Radiol*, 2015, 25(8):2263-2273.
- [2] SHIELDS CL, FURUTA M, THANGAPPAN A, NAGORI S, MASHAYEKHI A, LALLY DR, *et al.* Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes[J]. *Arch Ophthalmol*, 2009, 127(8):989-998.
- [3] HUANG Y, LI LP. Progress of cancer research on astrocyte elevated gene-1/Metadherin (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2):493-501.
- [4] SKOMEDAL H, KRISTENSEN GB, LIE AK, HOLM R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas[J]. *Gynecol Oncol*, 1999, 73(2):223-228.
- [5] CHATTOPADHYAY C, KIM DW, GOMBOS DS, OBA J, QIN Y, WILLIAMS MD, *et al.* Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between[J]. *Cancer*, 2016, 122(15):2299-2312.
- [6] KRANTZ BA, DAVE N, KOMATSUBARA KM, MARR BP, CARVAJAL RD. Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease[J]. *Clin Ophthalmol*, 2017, 11:279-289.
- [7] SHIELDS JA, SHIELDS CL. Management of posterior uveal melanoma: past, present, and future; the 2014 Charles L. Schepens lecture[J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(2):414-428.
- [8] KANG DC, SU ZZ, SARKAR D, EMDAD L, VOLSKY DJ, FISHER PB. Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene-1, AEG-1[J]. *Gene*, 2005, 353(1):8-15.
- [9] EMDAD L, SARKAR D, LEE SG, SU ZZ, YOO BK, DASH R, *et al.* Astrocyte elevated gene-1: a novel target for human glioma therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(1):79-88.
- [10] SHIELDS CL, KALIKI S, COHEN MN, SHIELDS PW, FURUTA M, SHIELDS JA. Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyné Lecture [J]. *Eye (Lond)*, 2015, 29(8):1027-1035.
- [11] SHIELDS CL, SAY EA, HASANREISOGLU M, SAKTANASATE J, LAWSON BM, LANDY JE, *et al.* Cytogenetic abnormalities in uveal melanoma based on tumor features and size in 1059 patients: The 2016 W. Richard Green Lecture [J]. *Ophthalmology*, 2017, 124(5):609-618.
- [12] DIENER-WEST M, HAWKINS BS, MARKOWITZ JA, SCHAT AP. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988 [J]. *Arch Ophthalmol*, 1992, 110(2):245-250.
- [13] COUPLAND SE, CAMPBELL I, DAMATO B. Routes of extraocular extension of uveal melanoma: risk factors and influence on survival probability [J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(10):1778-1785.
- [14] DAMATO B, DUKE C, COUPLAND SE, HISCOTT P, SMITH PA, CAMPBELL I, *et al.* Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(10):1925-1931.
- [15] LI W, GRAGOUDAS ES, EGAN KM. Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma [J]. *Arch Ophthalmol*, 2000, 118(8):1066-1070.
- [16] KALIKI S, SHIELDS CL, SHIELDS JA. Uveal melanoma: Estimating prognosis [J]. *India J Ophthalmol*, 2015, 63(2):93-102.
- [17] ANDREOLI MT, MIELER WF, LEIDERMAN YI. Epidemiological trends in uveal melanoma [J]. *Br J Ophthalmol*, 2015, 99(11):1550-1553.
- [18] VAN BEEK JG, KOOPMANS AE, VAARWATER J, DE ROOIJ, PARIDAENS D, NAUS NC, *et al.* The prognostic value of extraocular extension in relation to monosomy 3 and gain of chromosome 8q in uveal melanoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(3):1284-1291.