

PTEN、MMP-7、VEGF 在骨巨细胞瘤中的表达

陈述伟¹, 杨述华¹, 张劲松¹, 朱续胜¹, 袁永辉²

Expressions of PTEN and MMP-7、VEGF in Giant Cell Tumor of Bone (GCT)

CHEN Shu-wei¹, YANG Shu-hua¹, ZHANG Jing-song¹, ZHU Xu-sheng¹, YUAN Yong-hui²

1. Department of Orthopaedics, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Abstract :Objective To evaluate the expressions of PTEN (phosphatase and tension homologue deleted on chromosome 10), MMP-7(matrix metalloproteinases-7, MMP-7), VEGF (vascular endothelial growth factor) and their relationships with clinical factors, pathological types and metastasis, recurrence of giant cell tumor of bone (GCT). **Methods** The expressions of PTEN, MMP-7, VEGF in 65 cases of human GCT were detected by using immunohistochemical staining. The expressions of PTEN, MMP-7, VEGF and other clinical fractures were analyzed with the metastasis and recurrence of the tumor. **Results** The expressions of the PTEN, MMP-7, VEGF in GCT were 56.95% and 72.30%, 49.20%, respectively. In the clinical-pathological-X-ray groups, the expressions of PTEN were 83.30%, 68.10%, 28.00%, the positive rate had no significantly difference between the Non-malignant and doubtful-malignant groups, $P > 0.05$ ($P = 0.271$), but there were significantly difference between the doubtful-malignant and malignant groups, $P < 0.05$ ($P = 0.001$); the expression of MMP-7 were 39.00%, 72.50%, 96.00%, and the expression of VEGF were 16.67%, 54.50%, 68.00%, the positive rates of them had significantly difference, $P < 0.05$ ($P = 0.031, 0.001$); the expressions of PTEN, MMP-7, VEGF in the recurrence group were 33.30%, 93.30%, 86.60%, but in the nonrecurrence group were 64.00%, 66.00%, 38.00%, their expressions were statistically related to the recurrence of GCT, $P < 0.05$ ($P = 0.035, 0.038, 0.001$); in the metastasis group, the expressions of PTEN, MMP-7, VEGF were 30.00%, 100%, 85.00%, in the no metastasis group, the positive rates of PTEN, MMP-7, VEGF were 68.80%, 60.00%, 33.30%, the positive rates of them had significantly difference, $P < 0.05$ ($P = 0.003, 0.001, 0.001$); at the same time, The expression of PTEN in GCT was inversely correlated with the expressions of VEGF and MMP-7, $P < 0.05$ ($P = 0.001, 0.02$); However, the expressions of PTEN, MMP-7, VEGF had no statistically significance with the pathological types and sexuality. **Conclusion** The decreased expression of PTEN and increased expressions of MMP-7, VEGF have significant relationship to the prognosis of GCT. The combined detection of PTEN and MMP-7 may be of important clinical value to evaluate the infiltrative ability and prognosis of GCT.

Key words: Giant cell tumor of bone (GCT); PTEN/ biosynthesis; MMP-7/ biosynthesis; VEGF/ biosynthesis; Immunohistochemistry

摘要:目的 探讨骨巨细胞瘤中的 PTEN、MMP-7、VEGF 表达与“三结合分类”、病理分级及复发、转移的关系。方法 采用免疫组化法检测 65 例骨巨细胞瘤标本 PTEN、MMP-7、VEGF 基因蛋白的表达, 分析其与骨巨细胞瘤临床病理分期、分级及复发、转移的关系。结果 PTEN、MMP-7、VEGF 的阳性表达率分别为 56.95%、72.30%、49.20%; 在“三结合分类”组中 PTEN 的阳性表达率分别为 83.3%、68.10%、28.00%, 呈下降趋势, 良性与中间性组间差异不显著 ($P = 0.271$), 而中间性与恶性组间差异明显 ($P = 0.001$); 而 MMP-7 阳性表达率分别为 39.00%、72.50%、96.00%, VEGF 阳性表达率分别为 16.67%、54.50%、68.00%, 组间差异明显 ($P = 0.031, 0.001$); 在转移组中 PTEN、MMP-7、VEGF 的阳性表达率分别为 30.00%、100%、85.00%, 在无转移组中 PTEN、MMP-7、VEGF 的阳性表达率分别为 68.80%、60.00%、33.3%, 两组间差异明显 ($P = 0.003, 0.001, 0.001$); 复发组中 PTEN、MMP-7、VEGF

的阳性表达率分别为 33.30%、93.30%、86.60%, 无复发组中 PTEN、MMP-7、VEGF 的阳性表达率分别为

收稿日期:2006-03-27;修回日期:2006-09-07

作者单位:1. 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科; 2. 华中科技大学同济医学院病理科

64.00%、66.00%、38.00%，两组间差异明显 ($P = 0.035$ 、 0.038 、 0.001)，且 PTEN 与 MMP-7、VEGF 负相关 ($P = 0.001$ 、 0.020)，而与病理分级及年龄、性别无统计学差异。

结论 PTEN、MMP-7、VEGF 的表达与“三结合分类”有一定的关系，并与转移、复发显著相关，联合检测有助于骨巨细胞瘤的临床评估，对其预后判断具有重要临床意义。

关键词 骨巨细胞瘤；PTEN；MMP-7；VEGF；免疫组织化学

中图分类号：R738.1 文献标识码：A

文章编号：1000-8578(2007)04-0290-03

0 引言

骨巨细胞瘤 (Giant cell tumors of bone, GCT) 是一种中间的、潜在的恶性肿瘤，其生物学行为复杂而多变，易发生转移与复发。与肿瘤细胞的增殖调控、基底膜的降解、血管的增生密切相关。我们应用免疫组织化学方法，联合检测 PTEN、MMP-7、VEGF 在骨巨细胞瘤中的表达，探讨其与肿瘤细胞的生长、增殖、浸润和转移等生物学行为及其与临床病理分期分级的关系，旨在为治疗 GCT 与评估预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 样本来源 选择 1995 年 8 月 25 日 ~ 2004 年 8 月 23 日华中科技大学同济医学院附属协和医院 (48 例)、同济医学院病理科 (17 例)，有完整随访资料的手术切除骨巨细胞瘤标本共 65 例，其中男 38 例，女 27 例，年龄 15 ~ 58 岁，平均年龄 35.2 岁，中位数年龄 28 岁；单纯病灶刮除 12 例，切除加阿霉素骨水泥填塞 16 例，广泛切除及人工关节置换 37 例；随访时间 15 ~ 120 个月，平均 48.3 个月；有 15 例复发，其中单纯病灶刮除组 6 例，切除加骨水泥组 4 例，广泛切除组 5 例；转移 20 例，其中 Ⅰ级 3 例，Ⅱ级 6 例，Ⅲ级 11 例。根据 Jaffe 1940 年提出的病理分级标准^[1]：Ⅰ级 18 例，Ⅱ级 17 例，Ⅲ级 30 例。结合临床、病理、影像学表现，即“三结合分类”，参考 WHO (2002) 骨肿瘤分类标准^[2]，良性 18 例，恶性 25 例，中间性 22 例。

1.2 主要试剂 PTEN 兔抗人多克隆抗体，MMP-7、VEGF 鼠抗人单克隆抗体，羊抗兔、羊抗鼠 SP 试剂盒及 DAB 显示剂，均购自北京中山生物技术公司。

1.3 方法 各种标本常规石蜡包埋，5 μ m 连续切片，分别做 HE 和免疫组化染色，免疫组化染色为 SP 法，染色方法依说明书进行，阳性对照采用已知实验中证实对本实验所用抗体呈阳性反应的阳性切片，以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定 参照 Axiotis 等^[3] 标准，由两位病

理科医生采用双盲法独立检测，PTEN、MMP-7、VEGF 阳性细胞均为细胞质中出现明显的棕黄色或深黄色颗粒，每例病理切片取 5 个高倍镜视野进行结果判定，按染色强度及阳性细胞占肿瘤细胞总数的百分比综合计分：(1) 染色强度：无色为 0 分，淡黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，黄褐色为 3 分；(2) 阳性细胞数：5 个高倍镜视野在每张切片上计算 200 个癌细胞，阳性细胞数 10% 为 0 分，阳性细胞数 11% ~ 25% 为 1 分，26% ~ 50% 为 2 分，51% ~ 100% 为 3 分，两类分数乘积，0 ~ 2 分者为阴性 (-)，3 分及以上者为阳性。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 12.0 统计软件进行分析，计数资料组间比较采用 χ^2 检验，PTEN 与 MMP-7、VEGF 的相关性比较采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

2.1 PTEN、MMP-7、VEGF 在骨巨细胞瘤中的表达 65 例骨巨细胞瘤中 PTEN、MMP-7、VEGF 的阳性表达率分别为 56.95%、72.30%、49.20%，三者均为胞浆表达，PTEN 主要表达在多核细胞，在多核瘤巨细胞中更为明显，MMP-7、VEGF 在单核或者多核细胞中都有表达，且肿瘤边缘或增生活跃部位着色深，部分内皮细胞也着色。

2.2 PTEN、MMP-7、VEGF 与病理分级、“三结合”分类的关系 按骨巨细胞瘤“三结合分类”即结合临床、病理、影像学，PTEN 蛋白在良性、中间性、恶性组间阳性表达率分别为 83.30% (15/18)、68.10% (15/22)、28.00% (7/25)，各组间阳性率呈下降趋势，良性与可疑恶性差异无显著， $P > 0.05$ ($P = 0.271$)，但可疑恶性、恶性之间差异呈显著性改变， $P < 0.05$ ($P = 0.001$)，而 MMP-7、VEGF 的阳性表达率则呈上升趋势，三组间的阳性率分别为 39.00% (7/18)、72.50% (16/22)、96.00% (24/25) 及 16.67% (3/18)、54.50% (12/22)、68.00% (17/25)，组间差异明显， $P < 0.05$ ($P = 0.031$ 、 0.001)；而在病理分级各组之间，PTEN 的阳性表达率分别为 61.10% (11/18)、58.80% (10/17)、53.30% (16/30)，MMP-7 的阳性表达率分别为 50.00% (9/18)、70.50% (12/17)、86.60% (26/30)，VEGF 的阳性表达率分别为 33.30% (6/18)、41.10% (7/17)、63.30% (19/30)，三者阳性表达率差异无统计学意义， $P > 0.05$ ($P = 0.890$ 、 0.214 、 0.631)。

2.3 PTEN、MMP-7、VEGF 表达与肿瘤复发转移的关系 骨巨细胞瘤复发组与无复发组中，PTEN 的阳性率分别为 33.30% (5/15)、64.00% (32/50)，

MMP-7 的阳性率分别为 93.30% (14/15)、66.00% (33/50); VEGF 阳性表达率分别为 86.60% (13/15)、38.00% (19/50), 两组之间差异显著, $P < 0.05$ ($P = 0.035, 0.038, 0.01$)。在转移组与无转移组中, PTEN 阳性率分别为 30.00% (6/20)、68.80% (31/45), MMP-7 阳性率分别为 100% (20/20)、60.00% (27/45), VEGF 阳性率分别为 85.00% (17/20)、33.3% (15/45), 两组之间差异显著, $P < 0.05$ ($P = 0.003, 0.001, 0.001$)

2.4 PTEN 表达与 MMP-7、VEGF 的相关性 对骨巨细胞瘤 PTEN 与 MMP-7、VEGF 的阳性表达进行相关性分析, 其相关系数 ($r = -0.538$, $r^2 = 18.838$, $P = 0.001$; $r = -0.386$, $r^2 = 9.697$, $P = 0.020$) 为负, 表明两者存在明显负相关。

3 讨论

3.1 骨巨细胞瘤中 PTEN 阳性表达的意义 肿瘤细胞的增殖取决于细胞内外的正负信号在一定水平的动态平衡。PTEN 是最近发现的第一个具有磷酸脂酶活性的主要通过 PI3K 的脂质产物 ptdIns-3,4,-P2 及 ptdIns-3,4,-5-P3 (即 PIP3) 去磷酸化, 拮抗 PI3K/AKT 通路发挥肿瘤抑制作用。现已明确 AKT 为 PTEN 重要的应分子^[4,5]。此外, PTEN 还具有蛋白磷酸酶功能, 可使 FAK、SHC 去磷酸化, 该作用与 PTEN 调控细胞的粘附及转移有关; 也与调控多种细胞存活的相关途径有关, 如 MAPK 通路^[6]。文献报道^[7], PTEN 水平的变化与肿瘤的增殖、分化有关, 在许多人类肿瘤(如消化道、淋巴造血系统、乳腺、前列腺肿瘤等)中, 其表达的阳性率与这些肿瘤的恶性程度呈显著负相关。本实验结果显示, 在骨巨细胞瘤中, 随着“三结合分类”中恶性程度的增加及肿瘤的复发与转移, PTEN 蛋白的表达呈显著性下降, 提示其失活对骨巨细胞瘤的恶变及获得性转移潜能产生了重要作用。

3.2 骨巨细胞瘤中 MMP-7、VEGF 阳性表达的意义 基质金属蛋白酶 (Matrimetalloproteinases, MMPs) 又称基质水解酶, 是 MMPs 家族中分子量最小, 但作用强大的一种水解酶, 能降解胶原、明胶、层粘连蛋白、纤维连接蛋白等构成基底膜和 ECM 的重要成分, 已有研究表明 MMP-7 的表达与肿瘤的增殖活性^[8]及肿瘤的浸润深度和淋巴结的范围有关^[9,10]。VEGF 是一种肝素结合糖蛋白, 是最主要的血管生成因子, 通过血管内皮细胞表面的两个受体 fit-1 和 flk-1 的结合刺激内皮细胞的增殖, 增加微血管的通透性, 促进肿瘤血管的形成, 为肿瘤快速增殖和转移提供条件^[11,12]。现代肿瘤学研究表明,

血管的生成与肿瘤的转移密不可分, MMP-7 和 VEGF 协同表达, VEGF 改变了内皮细胞的活化形式, 增强了 MMP-7 的释放, 加快了基底膜的降解和内皮细胞的迁移^[13], 在本实验中二者共同阳性表达 25 例, 阴性表达 21 例, 二者关系密切 ($P < 0.05$)。

本实验研究结果显示 PTEN 蛋白在骨巨细胞瘤中表达降低与其“三结合分类”有一定关系, 与其复发与转移密切相关, 并与 MMP-7 和 VEGF 显著负相关, 提示联合检测 PTEN、MMP-7、VEGF 可作为骨巨细胞瘤侵袭状态、转移与复发倾向的判定及手术方式选择的一种重要参考指标。

参考文献:

- [1] Jaffe HL, Lichtenstein L, Portis RB. Giant cell tumor of bone: Its pathologic appearance grading, supposed variants and treatment [J]. Arch Pathol, 1940, 30(3): 993-995.
- [2] Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. WHO classification of tumors, pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone[M]. 3rd ed. Lyon: IARC Press, 2002. 45-50.
- [3] Axiotis CA, Monteagudo C, Merino MJ, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma [J]. Am J Pathol, 1991, 138(4): 799-806.
- [4] Stocker H, Andjickovic M, Oldham S, et al. Living with lethal PIP3 level: Viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in AKT/PKB [J]. Science, 2002, 295(5562): 2088-2091.
- [5] Maehama T, Taylor GS, Dixon JE, et al. PTEN and myotubulin: novel phosphoinositide phosphatases [J]. Ann Rev Biochem, 2001, 70(1): 247-249.
- [6] Kang-Parks, Lee YI, L YI, et al. PTEN modulates insulin like growth factor- (IGF-)-mediated signaling: the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF- Expression in hepatoma cell [J]. FEBS LETT, 2003, 545(2-3): 203-208.
- [7] Laura S, Ramon P. PTEN: Life as a tumor suppressor [J]. Exp Cell Res, 2001, 264(10): 29-41.
- [8] Liu XP, Oga A, Suehiro Y, et al. Inverse relationship between matrix metalloproteinase-7 expression and proliferative activity of cells in advanced gastric carcinoma [J]. Hum Pathol, 2002, 33(7): 741-747.
- [9] Kitoh T, Yanai H, Saitoh Y, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer [J]. J Gastroenterol, 2004, 39(5): 434-440.
- [10] Ajisaka H, Yonemura Y, Miwa K. Correlation of lymph node metastases and expression of matrix metalloproteinase-7 in patients with gastric cancer [J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(57): 900-905.
- [11] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors [J]. Cancer Res, 2000, 60(5): 203-212.
- [12] Brekken RA, Thorpe PE. Vascular endothelial growth factor and vascular targeting of solid tumor [J]. Anticancer Res, 2001, 21(6): 4221-4229.
- [13] Hofmann UB, Westphal JR, Vanmuijen GN, et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma [J]. J Invest Dermatol, 2000, 115(3): 337-344.

[编辑:周永红]