

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子和血管内皮生长因子在骨巨细胞瘤中的表达及临床意义

黄永惠¹, 叶顶琼¹, 王运飞² (四川省隆昌县人民医院: 1. 肿瘤科; 2. 神经内科 642150)

【摘要】 目的 研究骨巨细胞瘤(GCT)中细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)-CD147、血管内皮生长因子(VEGF)的表达情况,探析两者间的相关性及与临床病理、预后、复发的关系,为临床判断 GCT 生物学行为及评估预后提供准确的检验指标,也为临床治疗提供新的思路。**方法** 选择 2010 年 2 至 2013 年 4 月隆昌县人民医院行手术治疗的 GCT 患者病理切片 68 份,采用免疫组织化学法(即 S-P 法)检测 CD147、VEGF、基质金属蛋白酶(MMP)等分子表达情况,分析两者的相关性及其患者病理资料、Jaffe's 分级、预后的影响因素。**结果** 患者性别、年龄等一般资料与 CD147、VEGF 阳性表达无相关;各级 Jaffe's 分级患者 CD147 和 MMP-2 阳性表达差异有统计学意义($P < 0.05$),预后各分组患者 CD147、MMP-2、MMP-9 阳性表达差异有统计学意义($P < 0.05$);CD147 和 MMP-9、VEGF 的表达呈正相关($r = 0.696, P = 0.025; r = 0.674, P = 0.000$)。**结论** CD147 的阳性表达和 GCT 患者病情恶化以及复发有着密切的关系,并且和 MMP-9、VEGF 的阳性表达密切相关,是目前临床评价 GCT 恶性程度以及评估预后的重要检测指标。

【关键词】 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 血管内皮生长因子; 骨巨细胞瘤; 基质金属蛋白酶; 免疫组织化学法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.06.022 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)06-0773-03

Expression and clinical significance of CD147 and VEGF in giant cell tumor of bone HUANG Yong-hui, YE Ding-qiong, WANG Yun-fei (1. Department of Oncology; 2. Department of Neurology, Peoples Hospital of Longchong, Longchong, Sichung 642150, China)

【Abstract】 Objective To study the expression status of extracellular matrix metalloproteinases (MMP) inducing factor (CD147) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in giant cell tumor (GCT) of bone, to explore the correlation between the two factors and their relations with clinical pathology, prognosis and recurrence of diseases for accurate judgment of disease's biological behaviors and prognosis assessment. **Methods** Immune histochemical method (S-P method) was used to detect expression levels of CD147, VEGF and MMP genes in pathological sections of 68 patients with GCT of bone, who receiving surgical treatment during February 2010 to April 2010. The correlation between CD147 and VEGF, and the influence factors on pathological characters, Jaffe's classification and prognosis. **Results** Gender and age of patients were not related to positive expression of CD147 and VEGF. The difference of positive expression of CD147 and MMP-2 between patients with Jaffe's classification were significant ($P < 0.05$). The differences of positive expression of CD147, MMP-2 and MMP-9 in patients with different prognosis were significant ($P < 0.05$). The expression of CD147 was positively correlated to MMP-9 ($r = 0.696, P = 0.025$) and VEGF ($r = 0.674, P = 0.000$). **Conclusion** The positive expression of CD147 could be closely related to the disease deterioration and recurrence of GCT of bone, and related to positive expression of MMP-9 and VEGF. CD147 might be an effective indicator for evaluation of malignant degree and prognosis of GCT of bone.

【Key words】 extracellular matrix metalloproteinases inducing factor; vascular endothelial growth factor; giant cell tumor of bone; matrix metalloproteinases; immunohistochemical method

骨巨细胞瘤(GCT)是一种具有潜在侵袭及恶变的良性原发性肿瘤,主要发生于 20~40 岁的女性,据统计资料显示,我国 GCT 发病率高于西方国家^[1]。GCT 患者病灶主要位于骨髓,可扩展至干骺端甚至骨干。股骨远端、桡骨远端、胫骨近端、肱骨近端、骶骨为 GCT 常见的发病部位。GCT 患者约 80% 为良性,25%~50% 患者经治疗后复发,少数病情严重患者会发生肺转移,极少患者在放疗或复发后恶变。目前,临床上最常用 Jaffe's、Enneking 和 Campanacci 外科分期法来划分 GCT 肿瘤期限,但这些分级并不能准确预测 GCT 的生物学行为。因此,需要探寻一种有效预测 GCT 生物学行为及预后的相关检测指标^[2]。本研究对细胞外基质金属蛋白酶诱导因

子(EMMPRIN)-CD147、血管内皮生长因子(VEGF)在 GCT 组织中的表达情况进行研究,并分析其与临床病理及预后的关系,旨在为临床准确判断 GCT 生物学行为及预后评估提供参考,为临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料来源 选择本院 2010 年 2 到 2013 年 4 月收治的 GCT 患者 68 例,其中男 29 例,女 39 例,年龄 13~56 岁,平均年龄(33.5 ± 4.7)岁,均行手术治疗。其中 8 例行刮除;24 例行刮除+骨移植;6 例行切除+骨移植;16 例行切除+人工关节置换;14 例行切除+植骨。病变及取材部位:脊柱 6 例、尺骨 2 例、桡骨 5 例、股骨 23 例、胫骨 10 例、骶骨 10 例、髌骨 5

例、指骨 7 例。本研究选取的标本均经病理组织学证实为 GCT 并参照 Jaffe's 外科分级标准^[3]: I 级 25 例, II 级 34 例, III 级 9 例。入选标本均为患者手术过程中刮除或切除组织经 10% 中性甲醛固定, 采用石蜡包埋, Ameritool 公司生产的切片机 4 μm 连续切片, 并进行常规 HE 染色。

1.2 试剂及设备 试剂免疫组化染色试剂盒(CW0118A), 浓缩型 DAB 试剂盒(C0168), 抗原修复液(SBT10001), 兔抗人 CD147(10186-RP01)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、VEGF 多克隆抗体(HG10008-M)均购于北京中衫金桥公司; PBS(D3183)、苏木精(GT-5084)均购于西安科昊公司。Ameritool 公司生产的切片机(DYQ-401K)、Olympus 公司生产的显微镜(EXTECH-MC200)、Eppendorf 公司生产的离心机(ROTOLAVTT 细胞洗涤离心机)、GILSON 公司生产的移液枪(Pipetman Ultra)、江苏南通金余公司生产的水浴箱(CJB-S 140 mm × 140 mm)。Siemens 公司生产的 4 °C 冰箱(MBC-4V368)。

1.3 方法

1.3.1 S-P 染色方法 石蜡包埋后, 4 μm 连续切片, 随后常规脱蜡置水。每张切片抗原修复处理 3 次, 每次 2 min。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次, 每次 5 min, 于室温下使用 3% 双氧水处理, 时间为 15 min, 以彻底将内源性过氧化物酶活性消除。再用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 于室温下滴加 5% 山羊血清封闭液, 保持 30 min, 将多余的液体除去。加入一抗, CD147(1:100)、MMP-2(1:100)、MMP-9(1:150)、VEGF(1:100), 将其置于 4 °C 冰箱中过夜。于 37 °C 下孵育 1 h。PBS 冲洗, 每张切片处理 3 次, 每次 5 min, 加入通用的二抗后处理 30 min。PBS 冲洗, 每张切片处理 3 次, 每次 5 min, 加入辣根酶决链霉素卵白素液后处理 30 min。PBS 冲洗, 每张切片处理 3 次, 每次 5 min, DAB 试剂显色, 并于显微镜下仔细观察, 5~15 min 后水洗并终止显色反应。苏木精复染, 脱水, 透明, 封片。于高倍镜下观察每张切片, 选取 5 个不同视野, 观察阳性细胞的数量以及染色情况, 阳性细胞为胞浆或胞膜浅黄色或棕黄

色, 综合阳性细胞数量以及染色强度进行分级^[4]。阳性细胞所占百分比分级评分标准: 1 分(1%~25%)、2 分(>25%~50%)、3 分(>50%~75%)、4 分(>75%); 染色程度分级评分标准: 0 分(无色)、1 分(浅黄色)、2 分(黄色)、3 分(棕黄色)。上述阳性细胞所占百分比分级评分 × 染色程度分级评分后分为 4 个等级: 0~1 分为(-)、2~3 分为(+)、4~5 分为(++)、>6 分为(+++)。

1.3.2 胃癌微血管密度计数方法 GCT 内任一孤立棕黄色细胞或细胞簇均视为一条单独的血管, 有无官腔以及红细胞并不作为判定为血管的必要条件, 已经形成的肌层血管、分辨不清、染色模糊的细胞不计, 于低倍镜下找到内含微血管最为丰富的肿瘤组织即“热点”, 再于高倍镜下计数 3 个视野内的微血管数目, 取其平均值分析。

1.4 统计学处理 选择 SPSS18.0 软件包对数据进行统计分析, CD147、VEGF、MMP-9 和患者性别、年龄、分级、预后之间的关系采用非参数秩和检验, CD147 和 VEGF、MMP-9、MMP-2 表达的相关性采用 Spearman 分析, 检验标准为 α=0.05, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 染色结果分析 CD147 于 GCT 组织中染色强度不一, 单核机制细胞胞浆内和包膜上主要表达呈棕黄色颗粒状的阳性物质, 多核巨细胞也会存在少量的表达。MMP-2、MMP-9 主要表达于多核巨细胞, 呈现胞浆着色, 棕黄色为阳性物质, 在部分单核基质细胞中也有一定的表达。VEGF 阳性表达于细胞质内, 多核和单核细胞内均有表达。

2.2 CD147、VEGF 阳性表达和临床病理参数的关系分析 患者性别、年龄等一般情况与 CD147、VEGF 阳性表达无相关(P>0.05)。各级 Jaffe's 评级患者 CD147 和 MMP-2 阳性表达比较, 差异有统计学意义(P<0.05), 预后各分组患者 CD147、MMP-2、MMP-9 阳性表达比较, 差异有统计学意义(P<0.05), 见表 1。

表 1 Jaffe's 分级和预后和 CD147、VEGF 阳性表达的关系(n)

因子	Jaffe's 分级			预后			
	I 级(25)	II 级(34)	III 级(9)	正常(48)	恶变(5)	复发(13)	转移(2)
CD147							
(-)	4	3	0	5	0	2	0
(+)	8	9	2	14	1	3	0
(++)	9	17	5	21	2	7	1
(+++)	4	5	2	8	2	3	1
P		0.046				0.007	
VEFG							
(+)	13	5	4	14	3	5	0
(++)	10	26	2	30	2	7	0
(+++)	2	3	2	4	0	1	2
P		0.216				0.053	
MMP-2							
(+)	7	9	1	13	4	3	0
(++)	11	18	6	31	1	6	0
(+++)	7	7	2	5	0	4	2
P		0.033				0.025	

续表 1 Jaffe's 分级和预后和 CD147、VEGF 阳性表达的关系 (n)

因子	Jaffe's 分级			预后			
	I 级 (25)	II 级 (34)	III 级 (9)	正常 (48)	恶变 (5)	复发 (13)	转移 (2)
MMP-9							
(+)	5	7	1	14	0	1	0
(++)	8	11	3	15	2	7	0
(+++)	12	16	5	19	3	5	2
P		0.050				0.036	

2.3 CD147 和 VEGF 阳性表达相关分析 通过 Spearman 相关性分析,CD147 的表达和 MMP-9、VEGF 的表达呈正相关 ($r=0.696, P=0.025; r=0.674, P=0.000$)。

3 讨论

GCT 是一种常见的骨原发性良性肿瘤,具有一定的恶变能力,主要由单核细胞样细胞、单核基质细胞、多核巨细胞组成,但是上述细胞的起源和在肿瘤发生及发展过程中的相关作用还需临床进一步深入研究。另外,GCT 发生和发展涉及众多细胞因子以及信号通路,其相关作用机制也尚未阐明。临床上治疗 GCT 首选方式为手术治疗,但术后患者仍存在复发及恶变的可能^[5]。

1982 年 Biswas 发现 CD147 属于免疫球蛋白超家族成员且广泛表达于细胞表面的跨膜糖蛋白,为多效性分子,在胎儿的发育以及视网膜功能方面起着至关重要的作用,同时,胸腺 T 细胞的发展,淋巴细胞应答程序、组织重建、空间认知、精子发生等都有密切关系^[6]。除了上述作用之外,CD147 还在肿瘤的发生、发展以及侵袭转移过程中发挥着重要的作用,主要表现为以下几个方面。(1)促进肿瘤的侵袭和转移;(2)诱导肿瘤血管的生成;(3)促进肿瘤细胞的锚着非依赖性生长。CD147 在肿瘤发展过程中还可以刺激并诱导 MMP 的生成,近年研究发现,CD147 还能直接诱导肿瘤细胞产生 MMP^[7]。

体内外临床研究显示,CD147 表达和 VEGF 诱导具有十分密切的关系,CD147 过度表达时可刺激肿瘤生长及血管生成。对于 CD147 糖基化的研究报道显示,CD147 功能和附着糖的类型与肿瘤存在直接联系,由此可推测细胞外基质在 CD147 糖基化过程中发挥着重要的作用,同时考虑到 MMP 的表达诱导也需要糖基化,由此提示,糖基化过程可能是调控 CD147 的重要机制,可作为今后治疗方向进行研究^[8]。

近年来,越来越多的临床研究证实了肿瘤的组织学表现和生物学行为之间存在不一致性,Jaffe's 分级以及 Enneking 影像学分级虽具有判定 GCT 局部浸润的作用,但是无法预测其复发和转移。本研究结果显示,患者性别、年龄等一般资料与 CD147、VEGF 阳性表达无相关 ($P>0.05$)。由此说明患者年龄、性别不能作为判断 GCT 侵袭以及复发的指标。各级 Jaffe's 患者 CD147 和 MMP-2 阳性表达差异有统计学意义 ($P<0.05$),预后各分组患者 CD147、MMP-2、MMP-9 阳性表达差异有统计学意义 ($P<0.05$)。提示 CD147、MMPs、GCT 侵袭和预后有关,可作为临床评估 GCT 患者预后的重要参考指标。另外,CD147 和 VEGF、MMP-9 等因子表达呈正相关,此结论和宫颈癌等肿瘤组织情况相似,由此提示 CD147 可能促进 VEGF 的表达,并通过降解细胞外基质和促进肿瘤血管生成,

为肿瘤的增殖以及转移提供有利条件^[8]。

综上所述,CD147 的阳性表达和 GCT 患者病情恶化以及复有着密切的关系,并且和 MMP-9、VEGF 的阳性表达密切相关,是目前临床上评价 GCT 恶性程度以及评估预后的重要检测指标。

参考文献

- [1] Ke X, Fei F, Chen Y, et al. Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 α and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(8): 1598-1607.
- [2] Tsuji K, Ishikawa Y, Imamura T. Technique for differentiating alveolar soft part sarcoma from other tumors in paraffin-embedded tissue: comparison of immunohistochemistry for TFE3 and CD147 and of reverse transcription polymerase chain reaction for ASPSCR1-TFE3 fusion transcript[J]. Hum Pathol, 2012, 43(3): 356-363.
- [3] Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(40): 16663-16668.
- [4] de Oliveira AT, Pinheiro C, Longatto-Filho A, et al. Co-expression of monocarboxylate transporter 1(MCT1) and its chaperone(CD147) is associated with low survival in patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs) [J]. J Bioenerg Biomembr, 2012, 44(1): 171-178.
- [5] 韩跃虎, 杨柳, 黄景辉, 等. CD147、PCNA、VEGF 和 MMPs 在骨巨细胞瘤中的表达及临床意义[J]. 中国骨与关节外科, 2012, 5(1): 65-71.
- [6] 柳忠兴, 于秀淳. CD147 和 Survivin 在骨巨细胞瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国骨与关节杂志, 2012, 1(3): 253-257.
- [7] 刘焕彩, 刘金兰, 孟晓光, 等. 骨巨细胞瘤组织中 MMP-2、E-cadherin 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(42): 93-94.
- [8] 李翀, 李海, 冯一中. 骨巨细胞瘤中 Skp2、p27 及 E2F-1 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(11): 1202-1205.