

BMP-2、OPN、VEGF 的表达在骨肉瘤肺转移中的意义

柴斌, 杨述华, 王渝, 余理瑶, 杨操

Expression of BMP-2, OPN and VEGF and Their Clinical Significance in Osteosarcoma with Lung Metastasis

CAI Bin, YANG Shu-hua, WANG Yu, YU Li-yao, YANG Cao

Department of Orthopaedics, Union Hospital of Tongji Medical College of Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of BMP-2, Of osteopontin(OPN) and VEGF in osteosarcoma and its association with lung metastasis. **Methods** Immunohistochemical staining (SABC method) was used to investigate BMP-2, OPN and VEGF expression in 53 cases of osteosarcoma which had complete follow up data. **Results** BMP-2, OPN and VEGF expression was all located in the cytoplasm of osteosarcoma cell. The positive rates of BMP-2, OPN and VEGF in osteosarcoma tissue were 62.26%, 50.94% and 67.92%, respectively. The positive rates of BMP-2, OPN and VEGF in osteosarcoma tissue with lung metastasis were 92.3% (12/13), 76.92% (10/13) and 92.3% (12/13), respectively, which were much higher than that in osteosarcoma tissue without lung metastasis. BMP-2, OPN and VEGF positive was remarkably correlated the and lung metastasis in osteosarcoma. ($P < 0.05$). The intensity signal of BMP-2, OPN and VEGF weren't related to gender, age, size and location of tumor, time of illness, osteosarcoma classification, while they were correlated with lung metastasis. **Conclusion**

BMP-2, OPN and VEGF are express in osteosarcoma cell. The high expression involve in the carcinogenesis and the development of osteosarcoma and correlated closely to the lung metastasis of osteosarcoma. The expression of BMP-2 is closely correlated to that of OPN and VEGF.

Key words: Osteosarcoma Immunohistochemical; BMP-2; OPN; VEGF; Lung metastasis

摘要: **目的** 研究 BMP-2、OPN、VEGF 在骨肉瘤组织中的表达, 探讨其与骨肉瘤肺转移的关系。方法运用免疫组织化学 SABC 法, 检测 53 例有完整随访资料的骨肉瘤病例中 BMP-2、OPN、VEGF 的表达。结果 BMP-2、OPN 和 VEGF 的阳性表达均定位于细胞胞浆, BMP-2、OPN 和 VEGF 在 53 例骨肉瘤组织中的阳性表达率分别为 62.26% (33/53)、50.94% (27/53) 和 67.92% (36/53)。在已发生肺转移的骨肉瘤组织中 BMP-2、OPN 和 VEGF 的阳性表达率分别为 92.3% (12/13)、76.92% (10/13) 和 92.3% (12/13), 明显高于无肺转移的骨肉瘤组织中 BMP-2 (52.5%, 21/40)、OPN (42.5%, 17/40) 和 VEGF (60%, 24/40) 的阳性表达率, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三者在骨肉瘤组织中的阳性表达与患者的性别、年龄、肿瘤的大小、肿瘤部位、组织学类型、发病时间等因素差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但与是否肺转移显著相关。结论 BMP-2、OPN 及 VEGF 在骨肉瘤中有着不同程度的高表达, 与骨肉瘤的发生发展, 并与骨肉瘤肺转移密切相关, BMP-2 的表达分别和 OPN、VEGF 的表达密切相关。

关键词: 骨肉瘤; BMP-2; OPN; VEGF; 肺转移

中图分类号: R738.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)04-0270-04

0 引言

骨肉瘤是儿童、青少年中最常见的恶性骨肿瘤。骨肉瘤的侵袭、转移机制一直是骨肿瘤研究领域的一个热点。有研究表明, 骨形态发生蛋白 (BMP) 在

骨肉瘤发病和转移中起重要作用, 其中 BMP-2 的作用尤其突出, 骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 同样被发现在肿瘤的侵袭和转移中有着重要作用^[1-2]。肿瘤血管的生长无疑是肿瘤发生侵袭和转移的重要因素, 许多血管生长因子在肿瘤中均有表达, 介导血管新生。血管内皮生长因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) 是其中效力最强的因子之一, 它可直接或间接地参与血管新生的每一个过程。本试验用免疫组织化学染色的方法, 研究 BMP-2、

收稿日期: 2006-02-22; 修回日期: 2006-07-27

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科

作者简介: 柴斌 (1979-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事骨肿瘤与生物材料的研究

OPN 和 VEGF 在 53 例骨肉瘤组织中的表达及分布,以及与骨肉瘤肺转移的相关性以了解它们在骨肉瘤侵袭和转移中的生物学作用及其临床意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

收集同济医学院附属协和医院 2003 年 1 月 ~ 2005 年 6 月手术切除骨肉瘤石蜡包埋标本 53 例,其中男 35 例,女 28 例,年龄 10 ~ 49 岁,平均年龄 21.5 岁,术前均未行化疗、放疗及其他抗肿瘤治疗。所有标本均经 4 % 甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μ m 厚的连续切片,HE 染色,病理确诊。肿瘤大小:直径 5 ~ 22cm, 10cm 38 例, < 10cm 25 例。肿瘤部位:股骨 26 例,胫腓骨 17 例,肱骨 10 例。组织学分型按 WHO 标准分型,其中成骨细胞型 21 例,成软骨细胞型 17 例,成纤维细胞型 12 例,小细胞型 3 例。另取 11 例正常骨组织标本做对照。

1.2 主要试剂

兔抗人 BMP-2 多克隆抗体 (BA0585),兔抗人 VEGF 单克隆抗体 (BA0407),兔抗人 OPN 单克隆抗体 (BA1678),SABC 染色试剂盒,均购自武汉博士德公司。

1.3 实验方法

免疫组织化学染色方法:BMP-2、OPN、VEGF 染色按 SABC 染色试剂盒说明操作,石蜡切片经脱蜡,梯度酒精水化后,用 3 % H₂O₂ 甲醇室温孵育 15min,热修复抗原处理 20min,加入 5 % 山羊血清孵育 1h 后再分别加入一抗(工作浓度为 1:150)4 过液,再分别加入二抗及 SABC 作用 30min,DAB 显色,苏木素复染。

1.4 结果判定

判断标准:光镜下观察染色的切片,胞浆内出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。随机观察 5 个高倍视野以阳性细胞所占比例分为:- (< 5 %);+ (6 % ~ 25 %);++ (26 % ~ 50 %);+++ (> 51 %)

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行 ² 检验并计算 Spearman 相关系数, $P < 0.01$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织中 BMP-2、OPN、VEGF 的表达定位

本组资料 BMP-2、OPN 和 VEGF 蛋白表达主要定位于骨肉瘤细胞胞浆,部分骨肉瘤细胞胞膜同时阳性。在 53 例骨肉瘤组织中 BMP-2、OPN 和 VEGF 的阳性表达率分别为 62.26 % (33/53)、

50.94 % (27/53) 和 67.92 % (36/53),见图 1。

2.2 骨肉瘤组织中 BMP-2、OPN、VEGF 的表达与肺转移的关系

53 例骨肉瘤已发生肺转移的中 BMP-2、OPN 和 VEGF 的阳性表达率明显高于无肺转移的骨肉瘤组织中 BMP-2、OPN 和 VEGF 的阳性表达率,差异有统计学意义, $P < 0.05$,见表 1。

表 1 骨肉瘤组织中 BMP-2、OPN、VEGF 的表达与肺转移的关系

组别	n	BMP-2			OPN			VEGF		
		+	-	(%)	+	-	(%)	+	-	(%)
肺转移	13	12	1	92.3	10	3	76.92	12	1	92.3
无肺转移	40	21	19	52.5	17	23	42.5	24	16	60

2.3 BMP-2、OPN、VEGF 在骨肉瘤中的表达与其临床病理特征的关系

BMP-2、OPN、VEGF 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的大小、肿瘤部位、组织学类型、发病时间等因素均无相关性,但是三者的表达与是否肺转移有显著相关性,见表 2。

2.4 BMP-2、OPN、VEGF 在骨肉瘤中的表达的相关性

53 例骨肉瘤中,共有 33 例 BMP 表达阳性,且多为高表达。其总表达阳性率为 62.26 %,BMP 与 VEGF 和 OPN 表达强度的相关分析,见表 3。

3 讨论

骨形态发生蛋白 (BMP) 最初是作为一种可在异位诱导骨和软骨形成的蛋白质被发现。通过近 40 年的研究发现,BMP 不仅参与胚胎的形成、发育及组织细胞的分化和增殖,而且与某些肿瘤的发生、发展及转移密切相关。而其中 BMP-2 是迄今为止所研究过的 BMP 家族中骨诱导活性最强且能单独诱导成骨的因子。有证据表明强表达 BMP 的骨肉瘤病人的骨转移和肺转移明显高,而且发现转移周期的时间也明显短于 BMP 表达阴性的病人,同时 5 年存活率也比表达阴性病人要差。Hideki 等^[3] 分析了 24 例骨肉瘤 BMP/BMPRII 表达和预后,发现表达阳性的病人预后不良。这些都提示 BMP 参与了骨肉瘤的生长进展和浸润。Arihiro 等^[4] 研究发现骨肉瘤的转移与 BMP 的表达显著相关,在 14 例骨肉瘤中,伴有骨转移的 BMP 的表达率是 75 %,不伴有骨转移的 BMP 表达率是 20 %。本研究通过免疫组化 SABC 法检测 BMP-2 在骨肉瘤组织中的表达发现伴有肺转移的骨肉瘤 BMP-2 的表达率为 92.3 %,而不伴有肺转移的骨肉瘤 BMP-2 的表达率

表 2 BMP-2、OPN、VEGF 在骨肉瘤中的表达与其临床病理特征的关系

项目	例数	BMP-2 表达阳性	²	P	OPN 表达阳性	²	P	VEGF 表达阳性	²	P
性别										
男	35	19	2.79	>0.05	15	1.73	>0.05	23	0.23	>0.05
女	18	14			12			13		
年龄(岁)										
18	21	15	1.24	>0.05	11	0.029	>0.05	17	2.71	>0.05
>18	32	18			16			19		
肿瘤的大小										
10cm	19	12	0.01	>0.05	9	0.15	>0.05	15	1.65	>0.05
>10cm	34	21			18			21		
肿瘤部位										
股骨	26	17	0.79	>0.05	13	0.44	>0.05	19	4.47	>0.05
胫腓骨	17	11			8			13		
肱骨	10	5			6			4		
组织学分型(WHO)										
成骨细胞型	21	16	3.15	>0.05	12	1.29	>0.05	17	3.87	>0.05
成软骨细胞型	17	9			7			11		
成纤维细胞型	12	6			6			7		
小细胞型	3	2			2			1		
发病时间										
>3 个月	39	24	0.03	>0.05	19	0.29	>0.05	26	0.11	>0.05
<3 个月	14	9			8			10		
转移										
肺转移	13	12	6.62	<0.05	10	4.65	<0.05	12	4.70	<0.05
无肺转移	40	21			17			24		

表 3 BMP 与 VEGF 和 OPN 表达强度的相关分析

BMP	例数	VEGF			OPN			
		-	+	++--+++	-	+	++--+++	
-	20	11	7	2	9	7	4	
+	12	5	4	3	6	4	2	
++--+++	21	1	9	11	3	7	11	
合计	53	17	20	16	18	18	17	

注: BMP 与 VEGF, BMP 与 OPN 之间比较, Spearman 相关系数 $r = 0.519, 0.345; P < 0.01$, 呈显著相关性

为 52.5%, 结果表明 BMP-2 的表达与骨肉瘤的肺转移呈明显相关性。其参与转移的机制目前还不是很清楚, 需要我们做进一步的研究。作者认为这些间质细胞可能在转移过程中起重要作用。

肿瘤细胞表达的 VEGF 量升高, 导致局部血管内皮通透性增加和大量畸形残缺新生血管形成, 这为肿瘤组织迅速提供营养物质和瘤细胞侵入脉管系统形成癌栓并进一步发生远处转移形成转移瘤创造了良好条件。Kaya 等^[5]研究了 27 例原发骨肉瘤的活检组织标本中 VEGF 表达的临床意义, 他们发现 VEGF 的表达与骨肉瘤组织的组织分型以及分级等无关, 与肺转移的发生明显相关(相对于 VEGF 阴性表达的患者, VEGF 阳性的患者更易发生肺转移,

前者肺转移的发生率为 10%, 而后者肺转移的发生率则为 89%, $P < 0.0003$)。他们认为, VEGF 可以用来预见未行治疗的骨肉瘤患者发生肺转移的可能性。本研究伴有肺转移的病例 VEGF 的表达率为 92.3%, 而不伴有肺转移的表达率为 60%, 经统计学分析骨肉瘤 VEGF 的表达与肺转移相关($\chi^2 = 4.65, P < 0.05$)。这一结果基本和 Kaya 等研究结果一致。因此, 作者认为 VEGF 是原发骨肉瘤发生血循环转移的决定性因素之一, 是影响肿瘤细胞进入血循环、发生远隔转移的物质基础。本研究结果还表明骨肉瘤中 BMP-2 的表达与 VEGF 的表达呈正相关, 提示 BMP-2 可能在骨肉瘤的血管生成过程中发挥协同作用, 而 BMP-2 可能在 VEGF 介导的血管生成机制中起重要作用。

骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)是一种与恶性转化有关的磷酸化蛋白, 因最初是从骨基质中分离出来的, 故将其命名为骨唾液酸蛋白(Bone sialoprotein1, BSP-1)。OPN 通过与其主要受体一整合素和 CD44 相互作用, 继而引起肿瘤细胞移行、浸润和基因表达等环节的变化, 在不同的恶性肿瘤转移形成过程中发挥重要作用^[6]。OPN 在体外实验中通

过激活 $\alpha_1\beta_3$ 受体,诱导 NF- κ B,抑制内皮细胞凋亡。因此,OPN 可能参与肿瘤细胞的血管生成(angiogenesis)。肿瘤细胞的增殖、转移与血管生成是密切相连的,有研究^[7]认为 OPN 促进肿瘤的生长是通过加强血管生成的结果。有学者认为^[8] OPN 可通过趋化作用使内皮细胞迁移而促进血管形成,这种作用与 VEGF 关系密切。由于 OPN 与玻粘蛋白都具有 RGD 序列,玻粘蛋白可以激活 VEGF 的受体 VEGFR-2,从而引发血管生成活性。故有学者推测 OPN 可能也通过此种方式促进血管生成^[9]。本研究中肺转移组的 OPN 的阳性率为 76.92%,无肺转移组的 OPN 的阳性率为 42.5%,OPN 的表达与骨肉瘤的肺转移的关系具有统计学意义,也证实 OPN 在骨肉瘤的肺转移中发挥重要作用。此外,本研究还表明骨肉瘤中 BMP-2 的表达和 OPN 的表达呈显著相关,提示两者在骨肉瘤的发生及转移中可能发挥协同作用。其具体作用还不是很清楚,需要进一步的研究,作者大胆推测两者可能还是在肿瘤的血管生成及肿瘤细胞的扩散和浸润中发挥协同作用。

(本文图见第 318 页)

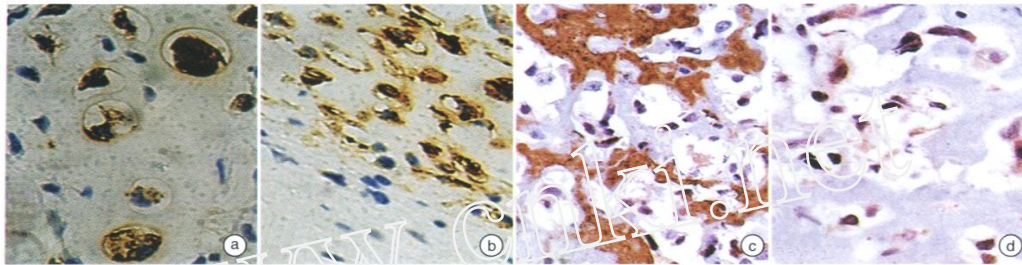
参考文献:

- [1] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC, et al. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression[J]. Trends Cell Biol. 2006,16(2):79-87.
- [2] Guarino V, Faviana P, Salvatore G, et al. Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(9):5270-5278.
- [3] Hideki Yoshikawa, Takanoobu Nakase, Akira Myoui, et al. Bone morphogenetic proteins in bone tumors[J]. J Orthop Sci, 2004, 9(3):334-340.
- [4] Arihiro K, Inai K, et al. Expression of CD31, Met/hepatocyte growth factor receptor and bone morphogenetic protein in bone metastasis of osteosarcoma[J]. Pathol Int, 2001, 51(2):100-106.
- [5] Kaya M, Wada T, Akatsuka T, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(2):572-577.
- [6] Meerwitsch K, Bergeron F, Lehloud L, et al. A novel RGD antagonist that targets both α_3 and $\alpha_5\beta_1$ induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen [J]. Vascu Pharm, 2003, 40(2):77-89.
- [7] Hirama M, Takahashi F, Takahashi K, et al. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth[J]. Cancer Lett, 2003, 198(1):107-117.
- [8] Shijubo N, Uede T, Kon S, et al. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology[J]. Crit Rev Oncog, 2000, 11(2):135-146.
- [9] Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, et al. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice [J]. Int J Cancer, 2002, 98(5):707-712.

[编辑:周永红]

BMP-2、OPN、VEGF 的表达在骨肉瘤肺转移中的意义

(正文见 270 页)



1. BMP-2 的表达 +; 2. BMP-2 的表达 ++; 3. OPN 的表达; 4. VEGF 的表达

图 1 光镜下观察染色结果(SABC × 400)

一种新的重组腺病毒载体 pAdBM5-GFP-mAFP 的构建

(正文见 274 页)

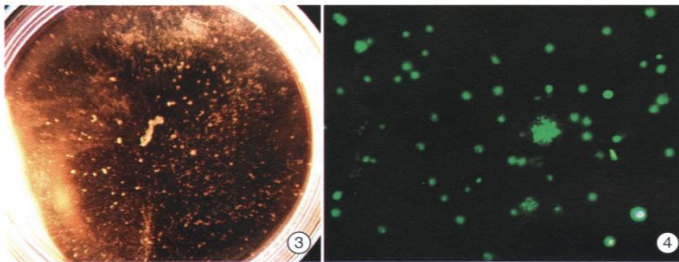


图 3 线性化重组载体和腺病毒骨架质粒共转染 293 细胞, 7 天后可见明显噬斑形成(× 400)

图 4 出现同源重组表达目的基因的 293 细胞可见 GFP 表达(× 400)

白藜芦醇抑制人脑胶质瘤 细胞生长及诱导凋亡比较

(正文见 283 页)

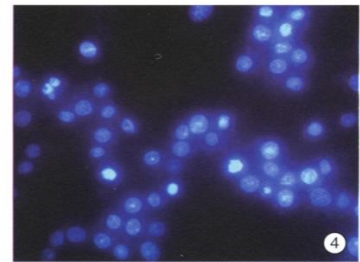
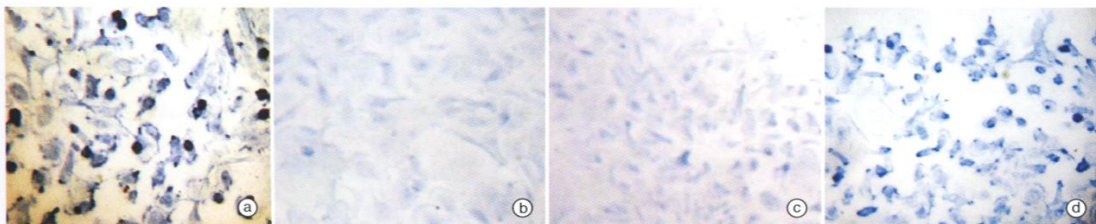


图 4 Res 作用 24h 后经 Hoechst 33342 荧光染色的 U251 凋亡细胞(× 400)

siRNA 靶向 Her-2 逆转录病毒载体构建 及在 SKOV3 中的表达

(正文见 277 页)



a. SKOV3; b. SKOV3/siRNA1; c. SKOV3/siRNA2; d. SKOV3/siRNA-negative control

图 2 免疫组化检测 siRNA 干扰 SKOV3 细胞株 Her-2 蛋白的表达(× 400)