

## . 实验研究 .

## 细胞黏附分子CD99在人髓母细胞瘤中的表达及意义

张 鹏 陈昕薇 梁励玮 元 玲 任 勇

**【摘要】目的** 探讨细胞黏附分子CD99在人髓母细胞瘤组织中的表达特点及其临床意义。**方法** 采用免疫组化法检测107例髓母细胞瘤及15例瘤旁正常脑组织标本中CD99的表达。所有病人均随访至死亡或截止至2013年12月,随访时间为12~80个月,利用Kaplan-Meier生存曲线进行生存分析。**结果** 髓母细胞瘤CD99阳性表达率(57.94%, 62/107)明显高于瘤周正常脑组织(0%, 0/15;  $P < 0.05$ )。CD99的表达水平与病人性别、年龄、肿瘤的病理组织学分型和分子亚型均无明显相关性( $P > 0.05$ )。CD99的高表达与髓母细胞瘤病人的预后呈显著负相关( $P < 0.05$ )。**结论** CD99高表达与髓母细胞瘤预后显著相关,可作为预后判断的指标及治疗髓母细胞瘤潜在的新靶点。

**【关键词】** 髓母细胞瘤; 细胞黏附分子CD99; 预后; 免疫组织化学染色; 基因表达

**【文章编号】** 1009-153X(2019)09-0547-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

**Expression and clinical meanings of cell adhesion molecule CD99 in human medulloblastomas**

ZHANG Peng, CHEN Xin-wei, LIANG Li-wei, YUAN Ling, REN Yong. Department of Pathology, General Hospital, Central Theater, PLA, Wuhan 430070, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression and clinical meanings of cell adhesion molecule CD99 in human medulloblastomas (MB). **Methods** The levels of CD99 protein expression were determined by immunohistochemical technique in 107 MB samples and 15 peritumorous and normal cerebellum tissues samples. The relationship of CD99 expression with MB clinicopathological characteristics and prognosis in the patients with MB were analyzed statistically. **Results** The positive expression rate of CD99 (57.94%, 62/107) was significantly higher in MB tissues than that (0.00%, 0/15) in the normal cerebellum tissue ( $P < 0.01$ ). The expression of CD99 in MB tissues was not correlated with the patient's age and gender and tumorous histologic and molecular subtypes ( $P > 0.05$ ). Kaplan-Meier survival analysis suggested that the positive expression of CD99 in MB tissues was negatively correlated with the overall survival rate in the patients with MB ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** High level of CD99 expression is significantly correlated with medulloblastoma progress and poor prognosis in the patients with MB, so it can be used as a novel biomarker and a new target for treating medulloblastomas and a novel index of predicting the prognosis in the patients with MB.

**【Key words】** Medulloblastomas; CD99; Prognosis; Expression; Immunohistochemical technique

髓母细胞瘤(medulloblastoma, MB)是儿童最常见的恶性脑肿瘤,具有极强的侵袭、转移特性,预后差<sup>[1]</sup>。虽然近年来随着神经外科手术技术及放疗技术的不断进步以及化疗药物的规范应用,其病死率及致残率均有一定程度的降低,但仍有相当一部分病人死于肿瘤复发和转移<sup>[2,3]</sup>。因此,探讨MB的病因、发病和侵袭转移机制具有重要的临床意义。细胞黏附分子参与细胞之间以及细胞与细胞外基质的相互作用。目前,已发现许多肿瘤存在细胞黏附分子的异常高表达,并且在肿瘤的进展和转移中发挥作用<sup>[4]</sup>。本文通过免疫组织化学染色方法检测MB

细胞黏附分子CD99的表达情况,分析其与肿瘤临床病理特征及病人预后的关系。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 收集2002年1月至2010年12月术后病理诊断为MB的标本107例,其中男68例,女39例;年龄3~45岁,中位年龄12岁,≤16岁77例,>16岁30例。根据WHO中枢神经系统肿瘤分类(2016年修订版)进行组织学和分子亚型分类<sup>[5]</sup>:组织学分为经典型69例、结节型/促结缔组织增生型32例、大细胞型和间变型6例;分子亚型分WNT亚型22例、SHH亚型25例和非SHH/WNT亚型60例。另选择15例肿瘤旁正常脑组织作为对照。所有病例术前均未接受放、化疗,无其他肿瘤病史。

1.2 CD99免疫组化染色 所有组织均经10%中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm连续切片,分别做

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.09.011

基金项目:湖北省重点实验室开放基金(2018SYS001)

作者单位:430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院病理科(张 鹏、陈昕薇、梁励玮、元 玲、任 勇)

通讯作者:任 勇,E-mail:rybest@126.com

HE及相应的免疫组化指标染色。按SP试剂盒(丹麦DAKO公司)说明书操作。切片脱蜡水化后,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗3次,每次5 min。0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液(pH=6.0)高温高压抗原修复,自然冷却室温后,PBS冲洗3次,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶10 min。PBS冲洗3次,滴加鼠抗人CD99单克隆抗体,4℃孵育过夜,PBS冲洗3次,滴加相应二抗,室温孵育30 min,PBS冲洗3次,DAB显色,苏木精复染,0.1%盐酸酒精分化,自来水冲洗,PBS冲洗3次,梯度乙醇脱水干燥后中性树脂封片。用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照,用CD99阳性的Ewing肉瘤作为阳性对照。

根据免疫组化抗体说明书判断阳性染色定位:兔抗人单克隆抗体β-catenin(CTNNB1, 1:800稀释;美国BD公司)表达于细胞质和(或)细胞核;兔抗人单克隆抗体GAB1(1:50稀释;美国Abcam公司)表达于细胞质;鼠抗人单克隆抗体CD99(福州迈新生物技术公司)表达于细胞膜和细胞质。通过β-catenin和GAB1两种抗体三种组合表达方式对MB的分子亚型进行分类<sup>[6]</sup>。

参照文献报道的方法结合染色强度和阳性细胞比例进行免疫组化结果的半定量分析:无阳性着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;肿瘤细胞阳性范围评分,无阳性细胞为0分,1%~5%为1分,6%~50%为2分,>51%记为3分,将染色强度评分和阳性细胞比例评分相乘的值作为该切片总分,0~4分为阴性,5~9分为阳性。

1.3 统计学分析 应用SPSS 13.0软件进行分析;计数资料采用χ<sup>2</sup>检验和Fisher确切概率法;利用Kaplan-Meier生存曲线进行生存分析;以P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MB组织CD99的表达 107例MB中,阳性表达62例(图1B、1D),阴性45例;表达阳性率为57.94%。15例瘤周正常脑组织CD99表达均阴性(图1A、1C)。MB组织CD99阳性表达率明显高于瘤周正常脑组织(P<0.05)。

2.2 MB组织CD99表达水平与临床病理特征的关系 CD99表达水平与病人性别、年龄、肿瘤的病理组织学分类和分子亚型均无明显相关性(P>0.05,表1)。

2.3 MB组织CD99表达水平与病人预后的关系 所有病人均随访至死亡或截止至2013年12月,随访时间为12~80个月。Kaplan-Meier法分析显示CD99阳

性表达组病人3年、5年生存率分别为48.39%和34.16%,中位生存期为35.21个月;而CD99阴性表达

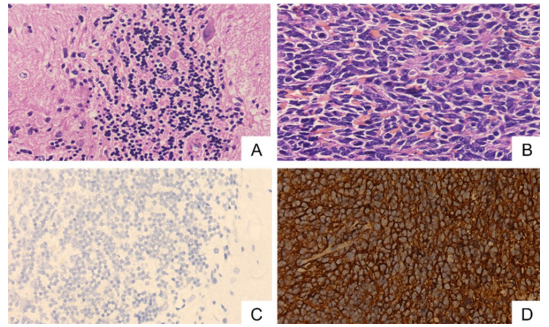


图1 瘤周正常脑组织和髓母细胞瘤组织HE染色和CD99免疫组化染色

A. 正常脑组织HE色,×400;B. 髓母细胞瘤HE染色,×400; C. 正常脑组织CD99免疫组化染色呈阴性,S-P法,×400; D. 髓母细胞瘤CD99免疫组化染色呈阳性,S-P法,×400

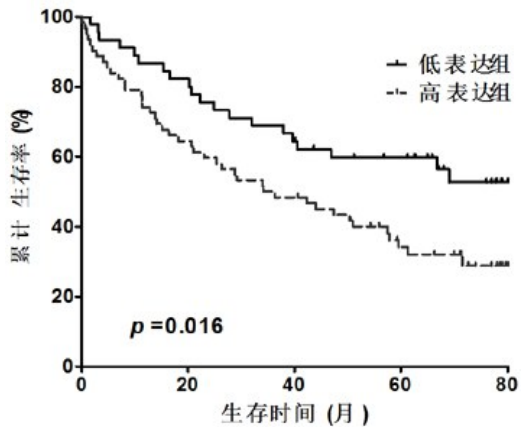


图2 CD99阴性与阳性表达髓母细胞瘤生存曲线图

表1 髓母细胞瘤CD99表达水平与临床病理特征的关系

临床病理参数	CD99表达(例)		阳性率
	阴性	阳性	
性别			
男	31	37	54.41%
女	14	25	64.10%
年龄			
≤16岁	32	45	58.44%
>16岁	13	17	56.67%
病理组织学分类			
经典型	35	34	49.28%
结节型/促结缔组织增生型	9	23	71.88%
大细胞型和间变型	2	4	66.67%
分子亚型分类			
WNT	11	11	50.00%
SHH	11	14	56.00%
Non-SHH/WNT	23	37	61.67%

组病人3年、5年生存率分别为68.89%和59.75%。两组病人3、5年生存期差异显著( $P<0.05$ ;图2)。

### 3 讨论

MB发病高峰年龄在7岁左右。目前,随着手术方式的改进及放、化疗策略的完善,其病死率和致残率已明显下降,中危病人5年生存率在70%~80%,而高危病人5年生存率在55%~76%。由于病人多为处于生长发育期的儿童,术后放化疗引起的神经系统损害如严重的认知障碍、生长发育迟缓等并发症会给病人带来巨大的伤害<sup>[7]</sup>。故寻找新的特异性的治疗靶点具有重要临床意义。

CD99由位于X和Y染色体短臂的MIC2基因编码的跨膜糖蛋白,在许多肿瘤,如Ewing肉瘤<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>、胃腺癌<sup>[10]</sup>和骨肉瘤<sup>[11]</sup>等中,均存在异常表达。Ewing肉瘤CD99普遍高表达,已作为相对特异性的标志物应用于Ewing肉瘤的辅助诊断。而CD99在胃腺癌组织中呈显著低表达,提示CD99低表达在胃腺癌的形成和进展中起重要作用。在骨肉瘤中,CD99作为肿瘤抑制基因发挥作用。

本实验运用免疫组织化学染色观察到CD99在MB中呈异常高表达,高表达阳性率达57.94%,而在正常脑组织中不表达;但是,CD99的表达水平与MB病人性别、年龄、肿瘤的病理组织学分型和分子亚型均无明显相关性。我们应用Kaplan-Meier法对CD99蛋白表达水平和MB病人总生存期进行相关性分析,发现低表达组总生存期明显长于高表达组,提示CD99可用作MB病人预后判断的指标。

近年来,通过基因表达谱的比较分析发现MB是一个高度异质性肿瘤,可将其分为WNT、SHH、Group C和Group D 4个分子亚型。WNT亚型预后最好。WNT、SHH亚型MB分别是Wnt和shh信号通路被激活。Group C、D两个亚型也统称为非Shh/Wnt亚型,具有高侵袭性且易发生转移,对放、化疗耐受,临床预后差<sup>[7]</sup>。我们的实验结果显示CD99的表达与MB的分子亚型无关而与病人总生存期呈显著负相关。究其原因,一方面可能是收集的MB病例样本量还不够大;另一方面,我们根据文献利用免疫组织化学染色检测MB中 $\beta$ -catenin和GAB1两个抗体的三种不同的表达方式组合来区分其分子亚型,远不及基因检测分类的准确。

总之,本研究表明CD99在MB组织中高表达,并与病人预后密切相关。提示CD99在MB的发生和进展中可能起重要的促进作用,可作为病人预后

判断的指标,并有望成为治疗的靶点。

### 【参考文献】

- [1] Zhang ZY, Xu J, Ren Y, *et al.* Medulloblastoma in China: clinicopathologic analyses of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups reveal different therapeutic responses to adjuvant chemotherapy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99490.
- [2] 姜涛,王军梅,杜江,等. 儿童髓母细胞瘤的临床预后及危险因素分析[J]. *中华神经外科杂志*, 2016, 32(4): 338-343.
- [3] 王陈,汪立刚,胡力,等. 儿童幕下髓母细胞瘤的诊断及显微手术治疗(附28例报道)[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2018, 23(5): 305-307.
- [4] Okegawa T, Pong RC, Li Y, *et al.* The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy [J]. *Acta Biochim Pol*, 2004, 51(2): 445-457.
- [5] 王玉元,姚瑜,钟平. 髓母细胞瘤分子分型的研究进展[J]. *中华神经外科杂志*, 2016, 32(7): 738-740.
- [6] Ellison DW, Dalton J, Kocak M, *et al.* Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups [J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 121(3): 381-396.
- [7] 段泽君,姚坤,边宇,等. 髓母细胞瘤分子病理学分型及与临床治疗、预后相关性研究[J]. *诊断病理学杂志*, 2016, 23(5): 387-389.
- [8] Scotlandi K, Baldini N, Cerisano V, *et al.* CD99 engagement: an effective therapeutic strategy for Ewing tumors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(18): 5134-5142.
- [9] Byun HJ, Hong IK, Kim E, *et al.* A splice variant of CD99 increases motility and MMP-9 expression of human breast cancer cells through the AKT-, ERK-, and JNK-dependent AP-1 activation signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(46): 34833-34847.
- [10] Lee JH, Kim SH, Wang LH, *et al.* Clinical significance of CD99 down-regulation in gastric adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(9): 2584-2591.
- [11] Zhou Q, Xu J, Zhao J, *et al.* Downregulation of CD99 and upregulation of human leukocyte antigen class II promote tumor aggravation and poor survival in patients with osteosarcomas [J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 477-484.

(2019-03-05收稿,2019-03-22修回)