

MTA1、VEGF 在化疗后骨肉瘤组织中的表达及其相关性

杨 阳¹, 步国强², 于秀淳³

Relation between MTA1 and VEGF Combinative Expression for Prognosis in Osteosarcoma Patients after Chemotherapy

YANG yang¹, BU Guo-qiang², YU Xiu-chun³

1. Graduate School of The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Orthopedics, Heze Municipal Hospital of Shandong Province; 3. Department of Orthopedics, The General Hospital of Ji'nan Military Region

Abstract: Objective To explore the role of metastasis associated protein-1 (Mta-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the occurrence and development of osteosarcoma after chemotherapy. And to investigate the relation between MTA1 and VEGF combinative expression and the prognosis in osteosarcoma patients after chemotherapy. **Methods** SP immunohistochemical technique was used to detect the expression of MTA1 and VEGF in the residual tumor cells from 31 osteosarcoma patients after chemotherapy. **Results** There were statistical significance of MTA1 and VEGF combinative expression for the prognosis in osteosarcoma patients after chemotherapy. **Conclusion** Both negative of MTA1 and VEGF are better for the prognosis in osteosarcoma patients after chemotherapy. While positive expression for both of them means poor prognosis. The results indicate that Mta-1 and VEGF combinative expression could be used to assess the prognosis of patients with osteosarcoma after chemotherapy.

Key words: Osteosarcoma; Neoadjuvant chemotherapy; MTA1; VEGF

摘要:目的 探讨转移相关蛋白(Mta-1)和血管内皮生长因子(VEGF)在化疗后骨肉瘤组织中表达与化疗后骨肉瘤患者预后之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法,检测 31 例化疗后骨肉瘤组织中 MTA1 与 VEGF 的表达。并应用统计学方法分析其与预后的相关性。**结果** 统计学分析显示化疗后骨肉瘤组织中 MTA1 与 VEGF 表达与骨肉瘤患者预后显著相关($P < 0.05$),MTA1 与 VEGF 联合检测对化疗后骨肉瘤患者预后更有指导意义。**结论** VEGF 与 MTA1 均为阴性预后较好;VEGF、MTA1 均为阳性预后较差。联合检测 MTA1 与 VEGF 可以用于评估化疗后骨肉瘤患者的预后。

关键词: 骨肉瘤; 新辅助化疗; MTA1; VEGF

中图分类号: R738.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)02-0155-04

0 引言

骨肉瘤是一种临床常见原发性骨肿瘤,目前骨肉瘤的治疗主要为手术、放、化疗和生物治疗相结合的综合治疗,5 年生存率由 20 世纪 70 年代前的 15%~20%提高到目前的 60%~80%左右。随着免疫学、分子生物学等相关学科的发展和完善,人们对骨肉瘤的发生及转移机制在分子水平上有了更深的认识。转移相关蛋白(metastasis associated pro-

tein-1, Mta-1)是近年来发现的与肿瘤转移相关的新基因组。新生血管是肿瘤发生浸润和转移的必要条件,肿瘤细胞在生长过程中分泌的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是刺激血管内皮细胞增殖的最重要因子之一。我们通过免疫组织化学方法,分别测定化疗后肿瘤组织中 MTA1 与 VEGF 表达,分析两者之间的相关性以及对肿瘤患者预后的影响。

1 资料与方法

1.1 标本选取

所选病例符合以下标准:(1)经穿刺或活检,病理组织学证实为骨肉瘤;(2)治疗前经胸片、CT 扫

收稿日期:2010-02-15;修回日期:2010-08-30

作者单位:1. 200433 上海,第二军医大学研究生院;2. 山东省菏泽市市立医院骨科;3. 济南军区总医院骨病科

作者简介:杨阳(1984-),男,硕士在读,主要从事骨肉瘤的保肢治疗工作

描排除远处转移,Enneking 分期均为 II B 期的肢体骨肉瘤;(3)入院前未行任何治疗;(4)应用 DIA 方案化疗方案治疗,DIA 方案由顺铂(DDP)、异环磷酰胺(IFO)和阿霉素(ADM)组成,首先给予 DDP 化疗,间隔 1 周后再给予 IFO,ADM 为 1 疗程,间隔 2 周后给予第 2 疗程化疗,剂量 DDP:120 mg/m² 4~6h 滴入 IFO:2.0g/m² 连用 5 天,ADM:30 mg/m²,连用 3 天。术前行两个疗程化疗,手术切除肿瘤组织;(5)有化疗前后病理标本且免疫组织化学染色后无脱片。按上述标准选择济南军区总医院骨科 1999 年 1 月—2005 年 12 月诊断为骨肉瘤资料完整的 31 例患者。所有标本经常规甲醛固定、石蜡包埋。每例组织蜡块 4 μm 连续切片 10 张,1 张切片 HE 染色作光学显微镜下诊断复查,另 1 张切片作 MTA1 免疫组织化学染色,其余备用。

1.2 临床资料

31 例患者中,男 14 例,女 17 例;平均年龄 15.14 岁(6~29 岁)。病变部位:股骨远端 16 例,胫骨近端 13 例,肱骨近端 1 例,腓骨近端 1 例。所有病例均经病理组织学证实。参照 Enneking 外科分期,均为 II B 期。手术方式和例数:保留骨骺的瘤段骨切除灭活再植术 5 例、瘤段骨切除灭活再植术 13 例、瘤段骨切除特制肿瘤型人工假体置换术 9 例、瘤段骨切除同侧锁骨反转代肱骨术 1 例、肿瘤扩大切除术 1 例、髌关节离断术 1 例、瘤段骨切除灭活同时行特制肿瘤型人工假体置换术 1 例。应用 DDP-IFO-ADM 化疗方案治疗,两疗程后行外科手术。所有患者均获得随访,平均随访 24.17 月(5~69 月)。随访期内死亡 8 例,其中 7 例为肺转移或复发后肺转移患者,1 例死于化疗并发症脑出血。另外肺转移带瘤生存 2 例,局部复发 4 例,其中再次行肿瘤扩大切除术 2 例,根治性切除术 2 例,随访 5~44

月正常。本研究将随访期发生肺转移、肿瘤复发及其他原因引起死亡的病例均归为预后不良组,其余病人为预后良好组。

1.3 试剂及来源

一抗为 Santa Cruz 公司浓缩型山羊抗人 MTA1 多克隆抗体及美国 Cellbiochem 公司的羊抗人 VEGF 多克隆抗体。即用型 SP 超敏试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,严格按 SP 法步骤操作。用 PBS 液代替一抗作为阴性对照,已知阳性标本作阳性对照。

1.4 免疫组织化学染色

采用 SP 法,常规脱蜡至水化,以枸橼酸盐缓冲液微波炉抗原修复法修复抗原,一抗工作浓度是 1:500,用 PBS 液稀释,其他步骤均严格按照说明书操作。

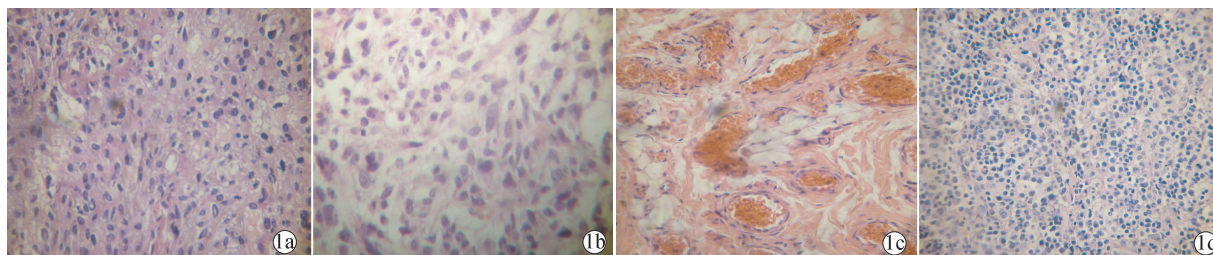
1.5 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件。分类变量间比较采用多因素方差检验,组间因子联合表达采用 descriptive 统计分析。设定 MTA1 表达阳性为 1,表达阴性为 0;VEGF 表达阳性为 1,VEGF 表达阴性为 0;预后良好组为 1,预后不良组为 0。

2 结果

2.1 VEGF 在化疗后骨肉瘤组织中的表达

本组 VEGF 阳性表达为 14 例,VEGF 阴性表达为 17 例,阳性表达率为 45.16%。在全部随访的 31 例中,14 例为阳性表达,仅有 4 例预后良好;阴性表达的 17 例中,13 例预后良好,4 例预后不良,经统计学处理发现预后不良组的阳性表达率(71.43%)明显高于预后良好组(23.53%)。表明化疗后骨肉瘤组织中 VEGF 表达与患者预后相关(sigVEGF:0.031<0.05),见图 1b、1d。



1a: the positive expression of MTA1 in osteosarcoma after chemotherapy, cytoplasm and nucleus showed dark brown granular staining; 1b: the negative expression of MTA1 in osteosarcoma after chemotherapy, shows no obvious cytoplasm stained; 1c: the positive expression of VEGF in osteosarcoma after chemotherapy, large amount of new blood vessel formation; 1d: the negative expression of VEGF in osteosarcoma after chemotherapy, no significant angiogenesis

图 1 化疗后骨肉瘤组织中 MTA1 和 VEGF 的表达(SP ×400)

Figure 1 The MTA1 and VEGF expression of osteosarcoma after chemotherapy(SP ×400)

表 1 相关性分析
Table 1 Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: prognosis

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	sig.
Corrected Model	2.825 ^a	3	0.942	5.239	0.006
Intercept	9.047	1	9.047	50.335	0.000
MTA1	1.036	1	1.036	5.762	0.024
VEGF	1.178	1	1.178	6.552	0.016
MTA1 * VEGF	9.251E-02	1	9.251E-02	0.515	0.479
Error	4.853	27	0.180		
Total	17.000	31			
Corrected Total	7.677	30			

Note: a. R Squared = 0.368 (Adjusted R Squared = 0.298)

2.2 MTA1 在化疗后骨肉瘤组织中的表达

本组 MTA1 阳性表达为 17 例,MTA1 阴性表达为 14 例,阳性表达率为 54.84%,在全部随访的 31 例中,17 例阳性表达中有 6 例预后良好;阴性表达的 14 例中,11 例预后良好,3 例预后不良,经统计学处理发现预后不良组的阳性表达率(78.57%)明显高于预后良好组(35.29%)。表明 MTA1 在化疗后骨肉瘤组织中表达与患者预后相关(sigMTA1: 0.016<0.05),见图 1a、1b。

2.3 MTA1 与 VEGF 表达的相关性

通过分析发现 MTA1 与 VEGF 同时呈阳性表达 9 例,见表 2(VEGF = 0, MAT1 = 0 Mean 值 0.89),MTA1 与 VEGF 同时呈阴性表达 9 例(VEGF = 1, MAT1 = 1 Mean 值为 0.11);经统计学处理未发现 MTA1 与 VEGF 间未存有相关性,见表 1(VEGF * MAT 的 sig = 0.479, P>0.05)。同时呈阳性表达的 9 例患者中,1 例预后良好,3 例肺转移,4 例死亡,1 例局部复发死亡;同时呈阴性表达的 9 例患者中,7 例预后良好,1 例化疗并发脑出血,1 例死亡。表明 MTA1 与 VEGF 同时呈阳性表达的患者预后较差。

表 2 Descriptive 统计分析
Table 2 Descriptive Statistics

Dependent Variable: prognosis

MAT1	VEGF	Mean	Std. Deviation	n
0	0	0.89	0.333	9
	1	0.60	0.548	5
	Total	0.79	0.426	14
1	0	0.63	0.518	8
	1	0.11	0.333	9
	Total	0.35	0.493	17
Total	0	0.76	0.437	17
	1	0.29	0.469	14
	Total	0.55	0.506	31

3 讨论

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是最常见的骨原发性恶性肿瘤,好发于血运丰富的长骨干骺端,其血行转移的发生率高且进展迅速,诊断及治疗都较困难^[1]。因此,寻找较好的检测指标^[2]判断肿瘤的浸润、转移等生物学特性,为临床及时提供最佳的治疗方案十分重要。

VEGF 是骨肉瘤血管生成过程中最重要的正向调节因子,它可促进血管内皮细胞的有丝分裂、扩张血管、增加血管内皮细胞的通透性、诱导内皮细胞表达纤维蛋白酶原激活因子(PA)、激活金属蛋白激酶和间质性胶原酶、促进血管基底膜的降解,为内皮细胞迁移、生长创造条件^[3-4]。杨建和等^[5]研究表明,血清中 VEGF 主要是由肿瘤组织产生,其水平与组织中 VEGF 表达呈显著正相关。Kaya 等^[6]应用免疫组织化学方法研究骨肉瘤组织中 VEGF 表达及临床意义,发现 VEGF 阳性表达的骨肉瘤患者比 VEGF 阴性表达的患者预后更差。但化疗后骨肉瘤组织中 VEGF 表达意义文献报道较少,本研究通过对化疗后骨肉瘤组织中 VEGF 表达研究,通过对所有病人随访结果的对比分析,发现阳性表达组中预后良好率为 23.53%,明显低于阴性表达组(71.43%),通过 descriptive 统计分析发现化疗后 VEGF 阳性表达的骨肉瘤患者预后更差(sigVEGF: 0.016, P<0.05)。化疗后骨肉瘤组织 VEGF 表达升高,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提供条件并导致骨肉瘤复发、转移。因此通过对化疗后骨肉瘤组织中 VEGF 检测,可以用于预测骨肉瘤患者预后。

MTA1 基因是于 1994 年由 Toh 等^[7]应用差异 cDNA 杂交技术,首次从 13762NF 大鼠乳腺癌转移系统筛选克隆出肿瘤转移相关基因 MTA1,继后

Nawa 等^[8]在人类高转移乳腺癌细胞株中发现其对应的人类同源物 MTA1。它主要参与组成核小体重塑活性的组蛋白去乙酰化酶,发挥其基因转录抑制作用,实现其对下游基因的调控,进而促进肿瘤的侵袭和转移。目前已有文献报道 MTA1 基因的表达水平与一些上皮源性恶性肿瘤的转移或浸润潜能有关,如乳腺癌、卵巢癌、食管癌、贲门癌等^[9]。关于 MTA1 基因与骨肉瘤的复发或转移的报道较少。李新志等^[10]通过应用半定量 RT-PCR 检测高转移性骨肉瘤细胞株和低转移性骨肉瘤细胞株中 MTA1 的表达水平,发现高转移性骨肉瘤细胞株中 MTA1 的表达水平明显高于低转移性骨肉瘤细胞株,表明 MTA1 基因表达水平与骨肉瘤细胞的侵袭、转移潜能相关。本研究检测化疗后骨肉瘤组织中 MTA1 表达,通过对所有患者随访结果的对比分析,发现阳性表达组中预后良好率为 35.29%,明显低于阴性表达组(78.57%),经统计学分析发现化疗后 MTA1 阳性表达的骨肉瘤患者预后更差(sigMTA1:0.024, $P < 0.05$)。有文献报道骨肉瘤患者的预后与化疗后残存肿瘤细胞侵袭、转移的潜能有关^[11],化疗后骨肉瘤中 MTA1 的表达能够反映化疗后残存肿瘤细胞的侵袭、转移等分子生物学特性。所以,通过检测化疗后骨肉瘤中 MTA1 的表达,有助于更准确的判断患者的预后。

本研究采用免疫组织化学方法,测定了 MTA1 与 VEGF 在 31 例化疗后骨肉瘤组织中的表达,MTA1 的阳性表达率为 54.84%、VEGF 的阳性表达率为 45.16%,两者均对化疗后骨肿瘤预后有明显影响(sigVEGF:0.016, sigMTA1:0.024, $P < 0.05$)。证明检测 MTA1 以及 VEGF 在化疗后骨肉瘤组织中是否高表达有助于判断新辅助化疗支持下骨肉瘤患者的预后。另外 VEGF 与 MAT1 之间的交互表达(sig = 0.479, $P > 0.05$)说明两者之间无明显相关性,即 VEGF 与 MAT1 通过各自独立作用机制影响化疗后骨肉瘤患者的预后。通过对 VEGF 与 MAT1 联合表达统计分析 VEGF、MTA1 均为阴性时预后最好(Mean 值为 0.89),VEGF、MAT1 均为阳性时预后最差(Mean 值为 0.11);当 VEGF 阳性表达时,患者预后 Mean 值为 0.60,当

MTA1 阳性表达时,患者预后 Mean 值为 0.63,均低于 VEGF、MTA1 同时阴性表达(Mean 值为 0.89)。证明当 VEGF、MTA1 在化疗后骨肉瘤组织中均为阴性时预后较好。

综上所述,通过本实验验证了:(1)MTA1 及 VEGF 可以指导化疗后骨肉瘤患者预后。(2)MTA1 及 VEGF 通过各自独立作用机制影响化疗后骨肉瘤患者预后。(3)VEGF 与 MTA1 联合表达对预测化疗后骨肿瘤患者预后具有统计学意义。

参考文献:

- [1] 吕佳音,吴丹凯,高忠礼,等. MDM2 与 VEGF 在骨肉瘤组织中的表达及临床意义[J]. 吉林大学学报,2007,33(3):577-580.
- [2] 张伟滨. 骨肉瘤生物治疗基础研究的现状[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2008,15(2):101-104.
- [3] Anne Saaristo, Terhi Karpanen, Kari Alitalo. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis[J]. *Oncogene*, 2000, 19(53):6122-6129.
- [4] George W Sledge. Vascular endothelial growth factor in breast cancer: Biologic and therapeutic aspects[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(3):104-110.
- [5] 杨建和,肖溶,岑岭,等. 血清 VEGF 和 TRACP-5b 在多发骨髓瘤中的表达及意义[J]. 江苏医药,2009,35(4):414-416.
- [6] 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.
- [7] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(37):22 958-22 963.
- [8] Nawa A, Nishimori K, Lin P, et al. Tumor metastasis-associated human MTA1 gene: Its deduced protein sequence, localization, and association with breast cancer cell proliferation using antisense phosphorothioate oligonucleotides[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 79(2):202-212.
- [9] Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, et al. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2002, 35(2):149-154.
- [10] 李新志, 陈安民, 易成腊, 等. MTA1 基因表达与人骨肉瘤细胞浸润和转移的关系[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(2):81-84.
- [11] 步国强, 于秀淳. MTA1 在化疗后骨肉瘤中的表达及其与预后的关系[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(3):221-223.

[编辑:周永红;校对:朱宇泽]