Ezrin 在骨肉瘤中的表达及临床意义

丁 健,李 智,文 哲,李敬中 (解放军第 161 中心医院骨科,湖北 武汉 430010)

[摘 要] **目的** 探讨人体骨肉瘤组织中的 Ezrin mRNA 和蛋白的表达及其与骨肉瘤临床病理特征的关系。**方法** 收集 42 例骨肉瘤和 15 例良性骨肿瘤标本,应用免疫组织化学技术检测 Ezrin 的蛋白表达,应用 RT-PCR 检测 Ezrin mRNA 的表达情况,并与临床病理特征进行相关性分析。**结果** Ezrin 蛋白及 mRNA 在骨肉瘤中的阳性表达显著高于其在良性骨肿瘤中的阳性表达($P<0.05$);Ezrin mRNA 表达的阳性率和骨肉瘤分化程度密切相关,而与患者性别、年龄及肿瘤部位无关。**结论** Ezrin 可能参与了骨肉瘤的发生、发展和转移,Ezrin 的表达情况可作为评估骨肉瘤生物学行为的一项指标。

[关键词] Ezrin;骨肉瘤;免疫组织化学;逆转录-聚合酶链反应
[中图分类号] R738 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0255-03

Expression of Ezrin and its clinical significance in osteosarcoma

DING Jian, LI Zhi, WEN Zhe, LI Jing-zhong (Department of Orthopaedics, 161st Hospital of PLA, Wuhan Hubei 430010, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical meaning of Ezrin in osteosarcoma. **Methods** RT PCR and immunohistochemical method were used to obersrver the Expression of Ezrin mRNA and protein in 42 patients of osteosarcoma and 15 patients of benign bone tumors. The relationship of the clinicopathological parameters of osteosarcoma with the expression of Ezrin mRNA was analyzed statistically. **Results** The positive expression of Ezrin protein and mRNA which were observed in osteosarcoma was significantly higher than that in benign bone tumors ($P<0.05$). The positive expression of Ezrin mRNA was highly related to the differentiation, but was not related to the genders of patients, and sites of osteosarcoma. **Conclusion** Ezrin may participated in the genesis, development, and metastasis of osteosarcoma. The expression of Ezrin may serve as a valuable marker for prognosis of osteosarcoma.

Keywords: Ezrin; osteosarcoma; immunohistochemistry; RT-PCR

骨肉瘤是一种可以产生骨样基质的高度恶性梭形细胞肉瘤,是青少年最常见的一种恶性骨肿瘤,主要好发于 15 ~ 25 岁生长旺盛的青少年,在原发恶性骨肿瘤中居前三位,且恶性程度高,容易发生肺转移。Ezrin 蛋白是一种能与黏附分子连接的骨架连接蛋白,参与细胞信号转导、维持细胞形态和辅助细胞运动等活动。最近有研究证实 Ezrin 同某些软组织肿瘤的侵袭、转移密切相关[1]。但目前 Ezrin 在骨肉瘤中的表达及其临床意义,以及 Ezrin 与骨肉瘤病理特征的相关性研究少有报道。本研究运用 RT-PCR 和免疫组化法检测 Ezrin 在人体骨肉瘤和良性骨肿瘤中的表达差异,探讨其在骨肉瘤的发生、发展和转移中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集我院 2008 年 3 月至 2010 年 12 月,行手术治疗的骨肿瘤患者术后标本 57 例,患者中男性 37 例,女性 20 例,年龄 12 ~ 69 岁。所有患者术前均未进行放疗、化疗及生物免疫治疗。本组 57 例标本中,骨肉瘤标本 42 例,良性骨肿瘤标本 15 例。手术过程中取得的标本及时液氮速冻,保存于 -70 ℃冰箱中待用。骨肉瘤标本的组织学类型:成骨细胞型 27 例,成软骨型 9 例,成纤维型 3 例,特殊类型 3 例(骨旁骨肉瘤 1 例,骨膜骨肉瘤 1 例,低级别中央型 1 例)。良性骨肿瘤标本中包含骨纤维结构不良 9 例,骨良性纤维组织细胞瘤 3 例,骨囊肿 3 例。

1.2 试剂

鼠抗人 Ezrin 抗体购自 Labvisio 公司,SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司,Trizol 和 Taq 酶、逆转录酶等购自申能博彩生物公司,Ezrin 引物、GAPDH 引物上海申友公司合成。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 将保存在 -70℃冰箱中的骨肿瘤标本制备悬液,按 Trizol 一步法提取总的 RNA。根据试剂盒规定的条件合成 cDNA,然后进行 PCR 扩增逆转录产物。扩增后的产物经过 2% 的琼脂糖凝胶电泳,以 GAPDH 作内参照来观察结果并成像。

1.3.2 免疫组化 将石蜡切片脱蜡至水,置入 pH 值为 6.0 的柠檬酸盐缓冲液,微波修复抗原后用双氧水及小牛血清先后处理。加入Ⅰ抗,4 ℃下作用 12 h,然后滴加Ⅱ抗,37 ℃孵育 30 min,再经 ABC 在 37 ℃孵育 30 min,后行 DAB 显色,并以苏木素行细胞核复染。分级标准(参考 Mathew 等分级标准):阴性(-),无阳性细胞者;阳性(+),小于 50% 细胞着黄色或(和)小于 30% 细胞着棕黄色者;强阳性(++),大于 50% 细胞着黄

[作者简介] 丁 健(1975 -),男,湖北省武汉市人,主治医师,本科,主要从事骨科疾病临床方面的研究。E-mail:Chounanzi@163.com

[收稿日期] 2012-04-08 [修回日期] 2012-04-20

色或(和)大于30%细胞着棕黄色者。将免疫组化染色阳性及强阳性者合并为染色阳性组,与染色阴性组相比较。

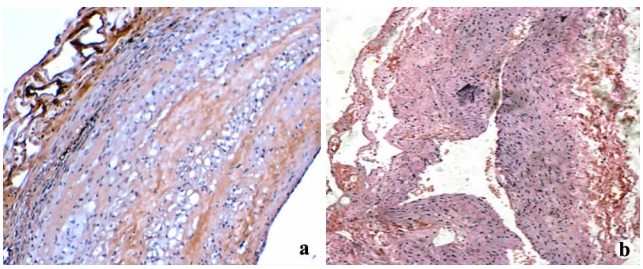
1.4 统计学处理

应用 SPSS 18.0 软件进行数据统计,染色结果和病理参数间的关系进行χ^2检验,$P<0.05$表示两者具有统计学差异。

2 结果

2.1 Ezrin 蛋白的表达

在两组标本中,Ezrin 蛋白的阳性表达均表现为在细胞质中出现棕黄色颗粒样物质。Ezrin 蛋白在骨肉瘤中的阳性表达率为 85.7%(36/42),而在良性骨肿瘤中其阳性表达率仅为 13.3%(2/15),两者阳性表达率间的差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

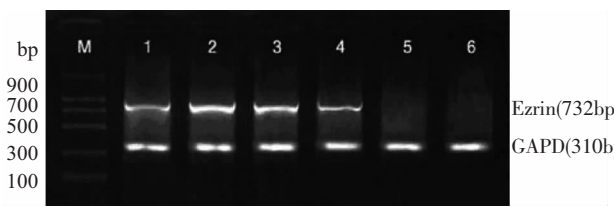


a: Ezrin 在骨肉瘤组织中呈阳性表达,b: Ezrin 在肱骨纤维结构不良组织中呈阴性表达

图 1 Ezrin 在骨肿瘤组织中的表达情况(×200)

2.2 Ezrin mRNA 的表达

在 42 例骨肉瘤标本中,33 例 Ezrin mRNA 呈阳性表达(78.6%),而在 15 例良性骨肿瘤标本中仅 2 例 Ezrin mRNA 呈阳性表达(13.3%),两者间差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2、表 1。



M:marker;1 ~4: 骨肉瘤组织;5 ~6:良性骨肿瘤组织

图 2 Ezrin mRNA 在骨肿瘤组织中的表达情况

2.3 Ezrin mRNA 的表达与骨肉瘤临床及病理的关系

将 42 例骨肉瘤患者按年龄、性别、肿瘤部位及肿瘤分化程度分组,采用χ^2检验比较各组 Ezrin mRNA 表达的差异。结果提示 Ezrin mRNA 阳性表达与肿瘤细胞的分化程度相关($P<0.05$),而与患者的年龄、性别及肿瘤部位无相关性,见表 1。肿瘤细胞分化程度越低,Ezrin mRNA 阳性表达率越高。

3 讨论

Ezrin 蛋白是从不同间叶来源的横纹肌肉瘤和骨肉瘤中分别发现的,其基因位于染色体 6q25.2 ~ q26,相对分子量为 81 kDa,mRNA 长 3 166 bp,一共编码 585

表 1 骨肉瘤 Ezrin mRNA 表达与临床病理特征之间的关系

临床病理特征		例数	Erzin mRNA 的表达		P值
			阳性	阴性	
性别	男	26	20	6	0.692
	女	16	13	3	
年龄(岁)	< 20	15	12	3	0.783
	≥20	27	21	6	
肿瘤部位	脊柱	22	18	4	0.947
	骨盆	8	6	2	
	四肢	12	9	3	
分化程度	高	9	3	6	0.025
	中	21	19	2	
	低	12	11	1	

个氨基酸[2-3]。Ezrin 属于 ERM 家族,和其他家族成员有着高达 75% ~80% 的同源性。Ezrin 蛋白的表达具有相对的细胞及组织特异性,常和 Moesin(膜突蛋白)、Radixin(根蛋白)在细胞膜的内面一起表达,调节细胞形态和生存,并参与很多疾病的发生和发展过程。Ezrin 蛋白还能与某些肿瘤细胞表面黏附分子相互作用,对肿瘤细胞的某些特性进行调控,进而影响肿瘤的分化、侵袭和转移过程[4]。有研究者[2-3]发现,在儿童骨肉瘤和横纹肌肉瘤的转移过程中,Ezrin 蛋白的阳性表达起了很重要的作用,说明其或许与儿童恶性肿瘤的转移及预后密切相关。但是,Ezrin 蛋白在成年人肿瘤中的阳性表达却存在截然不同的转归。在女性卵巢浆液性瘤中,Ezrin 蛋白的低表达常常提示预后较差[5];而在成人胰腺癌中,Ezrin 蛋白的高阳性表达反而提示预后不良[6-7]。这说明 Ezrin 蛋白对肿瘤转移及预后的影响极为复杂。

本研究运用了免疫组化和 RT-PCR 来检测 Ezrin 的表达,结果发现其在骨肉瘤细胞中的阳性表达显著高于良性骨肿瘤。我们初步判断,可能是因为骨肉瘤细胞中某种调控机制失调,从而导致 Ezrin 的表达上调。由此,本文也认为 Ezrin 的阳性表达可以作为辨别良、恶性骨肿瘤的一个重要指标。另外,Ezrin 表达对骨肉瘤癌细胞发生、分化和侵袭转移起着关键的促进作用。在骨肉瘤组织中,肿瘤细胞分化程度与 Ezrin mRNA 的阳性表达成反比,骨肉瘤中 Ezrin 的阳性表达越高,常预示着其恶性程度更高、侵袭性更强、预后更差。近来的相关研究发现,在肿瘤细胞的浸润和转移过程中,常会出现 Ezrin 蛋白与瘤细胞表面 CD44 分子共同表达。并且,Ezrin 蛋白还能同 CD44 形成复合

物,共同表达于肿瘤细胞中[8]。Setala 等[9]在 A431 细胞株中观察到,在细胞膜表面的微绒毛和胞膜皱褶中,存在 Ezrin 蛋白和 CD44 的协同表达。在结肠癌细胞中,Ezrin 能与 CD44v6 细胞内的羧基端连接而引起细胞结构改变,并使细胞骨架蛋白的构象和分布发生改变,由此改变肿瘤细胞的转移和侵袭能力。此外,Ezrin 蛋白还能通过与肿瘤细胞表面的转移信号产生协同放大等相互作用,影响胞内信号转导的平衡,参与调控肿瘤的生长与转移[10]。

总之,Ezrin 可能在骨肉瘤的发生、发展和转移中起到重要作用,Ezrin 在骨肉瘤细胞的阳性表达可能影响到肿瘤转移的全过程。针对骨肉瘤的基因治疗、免疫治疗、靶向治疗等综合性治疗,将会是提高临床疗效的有效手段[11]。Ezrin 极可能成为将来治疗肿瘤的关键突破点,深入对 Ezrin 的研究可能对今后肿瘤转移的机制研究和临床治疗提供有意义的指导。

[参考文献]

[1] Park HR, Jung WW, Bacchini P, et al. Ezrin in osteosarcoma: comparison between conventional high-grade and central low-grade osteosarcoma[J]. Pathol Res Pract, 2006, 202(7): 509 - 515.

[2] Yu Y, Khan J, Khanna C, et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 175 - 181.

[3] Khanna C, Wan X, Bose S, et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis[J]. Nat Med, 2004, 10(2): 182 - l86.

[4] Krishnan K, Bruce B, Hewitt S, et al. Ezrin mediates growth and survival in Ewing's sarcoma through the AKT/mTOR, but not the MAPK, signaling pathway[J]. Clin Exp Metastasis, 2006, 23(3-4): 227 - 236.

[5] Sneddon WB, Syme CA, Bisello A, et al. Activation-independent parathyroid hormone receptor internalization is regulated by NHERF1 (EBP50)[J]. J Biol Chem, 2003, 278(44): 43787 - 43796.

[6] Ferrari S, Zanella L, Alberghini M, et al. Prognostic significance of immunohistochemical expression of ezrin in non-metastatic high-grade osteosarcoma[J]. Pediatr Blood Cancer, 2008, 50(4): 752 - 756.

[7] 张 伟,曾 静,郭乔楠. 两种人抗失巢凋亡骨肉瘤细胞模型建立方法的比较[J]. 局解手术学杂志, 2010,19(2): 77-79.

[8] Wan X, Mendoza A, Khanna C, et al. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2005, 65(6): 2406 - 2411.

[9] Setala L, Lipponen P, Tammi R, et al. Expression of CD44 and its variant isoform v3 has no prognostic value in gastric cancer[J]. Histopathology, 2001, 38(1): 13 - 20.

[10] 阙祥勇,李新志. Ezrin 蛋白与骨肉瘤相关性研究进展[J]. 广东医学,2011,32(6):801 - 803.

[11] 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.

(编辑:雷 艳)

·个案与短篇·

义眼台植入术后眶脂肪完全萎缩 1 例

蒋 炜,韩 非,段烈英 (成都军区总医院眼科,四川 成都 610083)

[关键词] 义眼台;眶脂肪萎缩;手术
[中图分类号] R779.64 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2012)03-0257-01

义眼台植入术大多并发结膜、巩膜裂开、义眼台暴露[1-2]、浅结膜囊、感染等,而眶脂肪萎缩发生比较少。为了积累临床资料,现将我院 2009 年 5 月收治的 1 例义眼台植入术后眶脂肪完全萎缩患者的诊治情况报告如下。

1 资料与方法

患者男,21 岁。5 年前因外伤致左眼球摘除,为行整形来我院,查体:左眼浅结膜囊,眼球缺如,眼外肌运动不明显。术前检查完善后,在局麻下行左眼浅结膜囊成形及羟基磷灰石义眼台植入,术中无法找到眼外肌,羟基磷灰石义眼台植入后,用 6/0 可吸收缝线间断褥式缝合筋膜,8/0 可吸收缝线缝合结膜,结膜囊涂红霉素眼膏,安置临时义眼,加压包扎。术后 48 h 拆除绷带,取出临时义眼。术后 1 个月复查,结膜愈合好,未见义眼台暴露,安置美容义眼,安置义眼后角膜突度计检查 15/15 mm(眶外缘距离 105 mm),左眼睑裂高 11 mm,患者较满意。术后 6 个月,患者再次来院要求整形,查体:左眼睑裂明显变小(高 7 mm),义眼明显凹陷,安置义眼后角膜突度计检查 15/12 mm(眶外缘距离 105 mm),诊断为义眼台植入术后脂肪萎缩。故再次行左眼眶填充术,在局麻下,横行切开左眼上穹窿部结膜约 1.5 cm,钝性分离眶内组织并探查,发现眶脂肪明显减少,仅少许疏松组织。将羟基磷灰石切割成数个小块,放入原义眼台后方,直至眼眶饱满,8/0 可吸收缝线分层间断缝合筋膜、连续褥式缝合结膜,加压包扎。

(下转第 260 页)

[收稿日期] 2012-02-25 [修回日期] 2012-03-12