基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1042-04

VEGF 和 BMP-2 在骨肉瘤组织中的表达及临床意义

付能高[1,2],柯珍勇[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400010; 2. 四川省南充市川北医学院附属医院骨科,南充 637000)

【摘 要】目的:探索 VEGF 和 BMP-2 在骨肉瘤组织中的表达与骨肉瘤的诊断、转移复发及预后的关系。方法:应用免疫组织化学法(S-P 法)检测 41 例骨肉瘤组织中 VEGF、BMP-2 及 CD34 的表达,计算微血管密度(MVD),并综合分析所有病例资料。结果:41 例骨肉瘤患者中,VEGF 及 BMP-2 阳性表达率分别为 68.2%(28/41)和 61.0%(25/41),与肿瘤大小、Price's 分级、Dahlin's 组织学分型等无关 ($P>0.05$)。VEGF 阳性组 BMP-2 阳性率及 MVD (分别为 75%和 40.25 ± 8.02) 与阴性组 BMP-2 阳性率及 MVD(分别为 30.8%和 15.54 ± 5.87)相比,差异有显著意义($P<0.05$)。复发或转移组 VEGF 及 BMP-2 的阳性率(分别为 92.9%和 85.7%)明显高于无复发或转移组的 VEGF 及 BMP-2 的阳性率(分别为 55.6%和 48.1%),差异具有显著意义($P<0.05$)。VEGF 及 BMP-2 阳性组的 5 年存活率(分别为 7.1%和 4%)明显低于 VEGF 及 BMP-2 阴性组的 5 年存活率(分别为 46.2%和 43.8%),差异有显著意义($P<0.05$)。结论:VEGF、BMP-2 在骨肉瘤组织中呈高表达,VEGF 的表达与 BMP-2 的表达及 MVD 显著相关,检测 VEGF、BMP-2 的表达和 MVD 值可以作为判断骨肉瘤转移复发和预后的重要指标。

【关键词】骨肉瘤;VEGF;BMP-2;免疫组织化学

【中国图书分类法分类号】R738.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-15

Expression of VEGF and BMP-2 in osteosarcoma tissue and its clinical significance

FU Neng-gao, et al

(*Department of Orthorpedics, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression of VEGF and BMP-2 in osteosarcoma tissue and its association with diagnosis, metastasis/recurrence and prognosis of osteosarcoma. *Methods*: Immunohistochemical staining (SP method) was used to detect the expression of VEGF, BMP-2 and CD34 in specimens from 41 cases of osteosarcoma. Microvessel density was calculated, and overall information of all the 41 cases were analyzed. *Results*: In 41 cases, the positive rates of VEGF and BMP-2 were 68.2%(28/41) and 61.0%(25/41) respectively. The expression of VEGF and BMP-2 were not significantly correlated to tumor's size, Price's grade and Dahlin's difierentiation ($P>0.05$). The positive rate of BMP-2 and MVD(75% and 40.25 ± 8.02) in VEGF positive patients were respectively much higher than those(30.8% and 15.54 ± 5.87) in VEGF negative patients ($P<0.05$). The positive rates of VEGF and BMP-2 (92.9% and 85.7%) in patients with metastasis / recurrence were respectively remarkably higher than those(55.6% and 48.1%) in patients without metastasis/recurrence ($P<0.05$). The five- year survival rate in patients with positive expression of VEGF and BMP-2 (7.1% and 4%) were significantly lower than that(46.2% and 43.8%) in negative control group ($P<0.05$). *Conclusion*: High expression of VEGF and BMP-2 were found in osteosarcoma tissue. The expression of VEGF was closely correlated to the expression of BMP-2 and MVD. Detection of VEGF and BMP-2 expression and MVD may be useful for judging metastasis/recurrence and prognosis of osteosarcoma.

【Key words】Osteosarcoma; VEGF; BMP-2; Immunohistochemistry

骨肉瘤是原发于骨的恶性肿瘤,多见于青少年,恶性程度高,预后差,约 30%的患者对化疗药物不敏感[1],成为骨肉瘤治疗失败的重要因素。约 80%的患者首诊时已发生肺转移,部分患者在原发瘤切除术后发生肺转移,虽然医疗技术的进步使骨肉瘤转移病灶的发生率有明显降低,5 年生存率也有明显提高,但是致残率和病死率仍然很高,对社会和患者家庭的影响仍然很大。因此预防骨肉瘤肺转移对提高患者的生存率和预后非常重要[2]。研究表明,

作者介绍:付能高(1973-),男,硕士,
研究方向:脊柱、骨肿瘤。
通讯作者:柯珍勇,男,副教授,E-mail: kzy6417@163.com。

VEGF 和 BMP-2 在骨肉瘤的生长、侵袭以及转移中起重要作用，本研究运用免疫组化技术检测 41 例骨肉瘤组织中 VEGF 和 BMP-2 的表达水平，结合患者的病史资料、病理特点探讨其在骨肉瘤的诊断、转移复发及预后中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取我院病史资料保存完整的 1993 年 6 月～2003 年 6 月手术切除的 41 例骨肉瘤标本，所有标本均经病理组织学再次确诊。术前均未行放化疗及其他抗癌治疗。其中男 25 例，女 16 例，年龄 8～58 岁，平均年龄 22.5 岁，肿瘤直径 5～18 cm，平均 11.5 cm。肿瘤部位包括股骨、胫腓骨及肱骨。组织学分级参照 Price 标准，组织学分型按 Dahlin 标准，另取 10 例骨纤维结构不良和 10 例正常骨组织标本作为对照组。

1.2 主要试剂

兔抗人 BMP-2 多克隆抗体（BA0585），购自武汉博士德公司。鼠抗人 VEGF 单克隆抗体（sc-7269），兔多抗 CD34 抗体（sc -9095），S-P 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂均购于北京中杉公司。

1.3 实验方法

所有标本用甲醛固定，石蜡包埋、切片，经脱蜡、乙醇脱水及热修复抗原处理后，VEGF、BMP-2 及 CD34 染色按 SP 试剂盒说明操作，以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定

VEGF 和 BMP-2 阳性标准：光镜下观察，胞浆内出现棕黄色颗粒的细胞为阳性。随机观察 10 个高倍视野（10×40），每个视野数 100 个细胞，以阳性细胞数≥10%为阳性表达（+），阳性细胞数＜10%为阴性表达（-）。CD34 阳性标准：单个或成簇的微血管内皮细胞呈棕黄色，不以血管管径或红细胞作为判断标准，管壁纤维化及炎症坏死区不计数。MVD 计数：先用 40 倍光镜找到肿瘤血管密集区，在 200 倍视野下计算微血管数量，每张切片计 3 个视野，然后取平均值作为 MVD。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件包，计量资料比较采用独立样本 t 检验，计数资料的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 骨肉瘤组织中 VEGF、BMP-2 及 CD34 的表达定位

免疫组化显示，VEGF、BMP-2 阳性表达为棕黄色，主要位于骨肉瘤细胞胞浆，部分胞膜同时阳性；所有标本 CD34 均阳性表达，为血管内皮细胞呈棕黄色（见图 1）。在 41 例骨肉瘤组织中，VEGF、BMP-2 的阳性表达率分别为 68.2%（28/41）和 61.0%（25/41），对照组 VEGF 及 BMP-2 均无阳性表达，与骨肉瘤组比较差异有显著性（P<0.05）。

2.2 VEGF、BMP-2 的表达与患者临床病理资料的关系

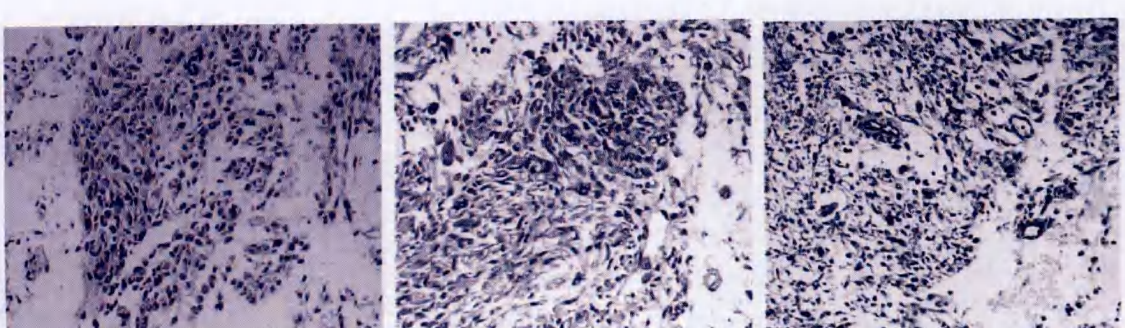
本组病例中，VEGF、BMP-2 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的大小、Price's 分期、Dahlin's 组织学类型、发病时间等因素均无相关性（P>0.05），见表 1。

2.3 VEGF 的表达与 BMP-2、MVD 的关系

VEGF 阳性组 BMP-2 表达率与阴性组 BMP-2 表达率比较，差异有显著性（P<0.05）。VEGF 阳性组 MVD 为 40.25±8.02，阴性组为 15.54±5.87，经检验方差齐性（F =1.87，P>0.01），t= 9.92，P=0.001，差异有统计学意义，见表 2。

2.4 VEGF、BMP-2 的表达与转移复发及预后的关系

在复发或转移组，VEGF 及 BMP-2 的表达率明显高于无复发或转移组的 VEGF 及 BMP-2 的表达率，差异具有显著意义（P<0.05）。在 VEGF 及 BMP-2 阳性表达组，5 年存活率明显低于 VEGF 及 BMP-2 阴性组的 5 年存活率，差异有统计学意义（P<0.05），见表 3。



VEGF 阳性　　BMP-2 阳性　　CD34 阳性

图 1　VEGF、BMP-2 及 CD34 阳性（SP×100）

表 1 VEGF、BMP-2 的表达与患者临床病理资料的关系

项目	例数	VEGF				BMP-2			
		-	+	χ^2	P	-	+	χ^2	P
性别									
男	25	6	19	1.75	>0.05	12	13	2.17	>0.05
女	16	7	9			4	12		
年龄(岁)									
≤15	17	3	14	2.65	>0.05	5	12	1.13	>0.05
>15	24	10	14			11	13		
肿瘤大小									
≤10 cm	12	3	9	0.05	>0.05	4	8	0.02	>0.05
>10 cm	29	10	19			12	17		
Price's 分级									
Ⅰ级	12	4	8	0.02	>0.05	5	7	0.45	>0.05
Ⅱ级	19	6	13			8	11		
Ⅲ级	10	3	7			3	7		
Dahlin's 分级									
骨母细胞型	15	4	11	0.45	>0.05	3	12	3.90	>0.05
软骨母细胞型	11	4	7			5	6		
纤维母细胞型	10	3	7			5	5		
其他	5	2	3			3	2		
病程									
>3 个月	26	7	19	0.26	>0.05	10	16	0.01	>0.05
<3 个月	15	6	9			6	9		

表 2 VEGF 的表达与 BMP-2、MVD 的关系

VEGF	例数	BMP-2				Mvd		
		-	+	χ^2	P	$\bar{x} \pm s$	T	P
+	28	7	21	7.30	<0.05	40.25 ± 8.02	9.92	<0.05
-	13	9	4			15.54 ± 5.87		

表 3 VEGF、BMP-2 的表达与转移复发及预后的关系

项目		例数	复发或转移				5 年存活状况			
			有	无	χ^2	P	存活	死亡	χ^2	P
VEGF	+	28	13	15	4.33	<0.05	2	26	6.33	<0.05
	-	13	1	12			6	7		
BMP-2	+	25	12	13	5.47	<0.05	1	24	7.45	<0.05
	-	16	2	14			7	9		

3 讨 论

骨肉瘤好发于长骨干骺端，滋养血管丰富，肿瘤的生长、浸润和转移复发均依赖新生血管的形成，而血管的生成与 VEGF 密切相关。VEGF 是近年发现的二聚体蛋白，是最主要的血管生成因子，可特异性地促进内皮细胞分裂增殖，增加血管通透性，促进肿瘤的早期转移[3]。VEGF 也是肿瘤血管生成的重要因子，其高表达水平是多种肿瘤转移和预后的指标[4]。Mei J 等[5]将 P 沉寂子-VEGF 质粒转染 MG-63 骨肉瘤细胞，Western blotting 法检测 VEGF 的表达，结果 VEGF 表达水平与 MG-63 细胞的血管生成拟态有关，转染组细胞的生长被抑制，出现早期凋亡，认为 VEGF 的表达与骨肉瘤细胞的增值

和凋亡有关,并对骨肉瘤的血管生成拟态起决定性作用。Kaya 等[6]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,发现 VEGF 的表达与肺转移的发生明显相关,VEGF 阳性的骨肉瘤患者比 VEGF 阴性的患者预后更差($P<0.03$),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,并可用来判断骨肉瘤患者的预后。我们的研究显示,VEGF 阳性组复发或转移率为 46.4%,阴性组复发或转移率为 7.69%,差异有统计学意义($\chi^2=4.33$,$P=0.039$)。VEGF 阳性组 5 年存活率为 7.14%,阴性组 5 年存活率为 41.65%,差异有统计学意义($\chi^2=6.30$,$P=0.013$)。提示 VEGF 的阳性表达能促进骨肉瘤的转移或复发,降低患者的 5 年存活率,预后差,同 Kaya 等研究结果基本一致。由于骨肉瘤细胞表达的 VEGF 量明显升高,导致局部血管内皮通透性增加,为瘤组织快速生长提供了大量的营养物质,同时瘤组织中大量畸形、残缺的新生血管形成,为肿瘤细胞侵入血管而发生远处转移创造了条件,因此 VEGF 可以作为骨肉瘤转移、复发及预后的重要指标。

BMP-2 是转化生长因子超家族中的一员,是成骨活性较强且能单独诱导成骨的因子。BMP-2 是最主要的调节骨形成的信号蛋白,对骨的生长以及肿瘤的发生和进展非常重要[7]。现已证实在体内体外 BMP-2 均能诱导多能间质祖细胞分化为成骨细胞[8]。Sotobori T 等[9]研究发现,rhBMP-2 能提高骨肉瘤细胞的趋触性反应,认为 BMP-2 能通过调节纤维连接蛋白-整合素 β1 信号,增强骨肉瘤的转移和侵袭。Arihiro 等[10]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%,BMP 表达阳性的病人预后不良。本研究发现,转移或复发病例 BMP-2 的表达率为 85.7%,非转移复发病例 BMP-2 的表达率 48.1%,差异有统计学意义($\chi^2=5.47$,$P=0.021$)。BMP-2 阳性病例 5 年存活率(4.0%)明显低于阴性病例 5 年存活率(43.7%),差异有统计学意义($\chi^2=7.45$,$P=0.007$)。这表明 BMP-2 的阳性表达与骨肉瘤的转移或复发、预后密切相关,提示 BMP-2 参与了骨肉瘤的生长进展和浸润,可以作为骨肉瘤转移复发和预后的一项重要指标。

MVD 是目前研究肿瘤血管生成的量化指标,与肿瘤的转移复发密切相关并具有判断预后的价值[11]。Hicklin 等[12]研究发现,激活 VEGF 受体途径能促发血管形成,促进内皮细胞的增生、迁徙。Kaya M 等[13]用内皮他丁抑制骨肉瘤的血管生成,能预防患者术后的肺转移,提高生存率,改善预后。本研究显示,VEGF 阳性病例 MVD=40.25±8.02,阴性病例 MVD=15.54±5.87,差异有统计学意义($t=9.92$,$P=0.001$),提示 VEGF 表达越强 MVD 值越大,微血管数越丰富,肿瘤越易生长、浸润和转移,因此 VEGF 和 MVD 均可作为肿瘤转移、复发和预后的重要指标。

此外,本研究还发现,VEGF 阳性组 BMP-2 的阳性率为 75%,远高于阴性组 BMP-2 的阳性率 30.77%,差异有统计学意义($\chi^2=7.30$,$P=0.007$),而 VEGF 和 BMP-2 的阳性表达与性别、年龄、骨肉瘤的组织分型及分级等无关($P>0.05$),说明骨肉瘤组织中 BMP-2 的表达与 VEGF 的表达显著相关,BMP-2 可能在骨肉瘤的血管生成过程中与 VEGF 发挥协同作用,也可能在 VEGF 介导的血管生成机制中起重要作用,但是具体机制尚不清楚,有待进一步研究。

骨肉瘤的早期诊断、治疗、转移复发及预后是极其复杂的过程,牵涉到一系列复杂的分子生物学事件。我们的研究表明,VEGF、BMP-2 在骨肉瘤组织中表达率非常高,并且与骨肉瘤的转移复发和 5 年生存率显著相关,推测 VEGF 可能独立或在 BMP-2 的协同作用下,促进骨肉瘤微血管的生成,导致早期血行转移;同时 BMP-2 的表达和 VEGF 的表达显著相关,推测 VEGF 也有可能参与了 BMP-2的诱导成骨过程,具体机制尚不清楚。Weiss KR 等[14]研究两组具有不同转移潜力的老鼠骨肉瘤细胞株(高转移的 K7M2 和低转移的 K12),发现 K7M2 细胞株表达更高的 VEGF 和 BMP2,认为理论上抑制 VEGF 和 BMP2 能够抑制骨肉瘤转移。因此检测 VEGF、BMP-2 的表达和 MVD 值可以作为判断骨肉瘤转移复发、预后的重要指标,同时也为研究通过 VEGF 或 BMP-2 途径治疗骨肉瘤提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Warzecha J, Gottig S, Chow K U, et al. Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the Hedgehog-inhibitor cyclopamine[J]. J Chemother, 2007, 19(5): 554-561.

[2] Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, et al. Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma[J]. Oncol Rep, 2008, 19(6): 1533-1539.

[3] Raspollini M R, Amunni G, Villanucci A, et al. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor ex-

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1046-05

褪黑素对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道氧化应激的预防作用

夏峻巍,徐 玲

(重庆医科大学附属第一医院肺科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨褪黑素(Melatonin,MLT)对慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease,COPD)大鼠模型气道氧化应激的影响。方法:36 只雄性 Wistar 大鼠随机分成对照组、COPD 组、MLT 组,采用熏烟加气管注入脂多糖(Lipopolysaccharide LPS)复制 COPD 大鼠模型,MLT 组在造模前 30 min 腹腔注入 MLT。28 d 后气管切开测定肺功能,检测肺泡灌洗液(BALF)中白细胞计数及分类,BALF 中一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷光甘肽过氧化物酶(GSH-PX),以及光镜下观察病理形态。结果:(1)MLT 组 BALF 中白细胞总数、中性粒细胞比例较 COPD 组明显减低(分别为 $P<0.01$,$P<0.05$),单核—巨噬细胞绝对计数下降,与对照组相比差异均无统计学意义。(2)MLT 组大鼠 BALF 中 NO、MDA 较 COPD 组明显减低($P<0.05$),T-SOD、GSH-PX 较 COPD 组明显增高($P<0.05$)。(3)MLT 组 0.3 s 用力呼气容积(FEV0.3)、0.3 s 用力呼气容积/用力肺活量(FEV0.3/FVC)、峰流速(PEF)较 COPD 组均有增加,但两者之间无显著性差异($P>0.05$),同时仍较对照组减低($P<0.05$)。(4)COPD 组支气管、肺实质病理改变具有特征性,MLT 组病理损害减轻,但仍异常于对照组。结论:通过减少氧化应激,增加抗氧化酶类的活性,MLT 早期干预能够部分阻止 COPD 的进程。

【关键词】肺疾病;慢性阻塞性;氧化应激;褪黑素

【中国图书分类法分类号】R563.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-24

Preventative effect of melatonin on airway oxidative stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease

XIA Jun-wei, et al

(*Department of Pulmonary Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

作者介绍:夏峻巍(1972-),男,主治医师,硕士,研究方向:慢性阻塞性肺疾病。

通讯作者:徐 玲,女,主任医师,E-mail:vincentxia007@yahoo.com.cn。

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of melatonin(MLT) on airway oxidative stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Methods*: 36 male wistar rats were

pression in advanced serous carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer,2004,14(5):815-823.

[4] 王 东,仲召阳,李增鹏,等.骨肉瘤 VEGF 表达及 VEGF 抗体抑制血管生成的实验研究[J].重庆医学,2006,35(15):1369-1372.

[5] Mei J,Gao Y,Zhang L,et al.VEGF-siRNA silencing induces apoptosis,inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro[J].Exp Oncol,2008,30(1):29-34.

[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] Khan S A,Nelson M S,Pan C,et al.Endogenous heparan sulfate and heparin modulate bone morphogenetic protein-4 signaling and activity[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2008,294(6):C1387-1397.

[8] Jorgensen N R,Henriksen Z,Sorensen O H,et al.Dexamethasone, BMP-2 and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype:validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts [J]. Steroids,2004,69(4):219-226.

[9] Sotobori T,Ueda T,Myoui A,et al.Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts [J]. Exp Cell Res,2006,312(19):3927-3938.

[10] Arihiro K,Inai K.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.

[11] Weidner N.Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer[J].Am J Pathol,1995,147(1):9-19.

[12] Hicklin D J,Ellis L M.Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis[J]. J Clin Oncol,2005,23(5):1011-1027.

[13] Kaya M,Wada T,Nagoya S,et al.Prevention of postoperative progression of pulmonary metastases in osteosarcoma by antiangiogenic therapy using endostatin [J]. J Orthop Sci,2007,12(6):562-567.

[14] Weiss K R,Cooper G M,Jadlowiec J A,et al.VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells[J]. Clin Orthop Relat Res,2006,450:111-117.

(责任编辑:关蕴良)