DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.007

骨肉瘤细胞核因子表达与肿瘤血管生成的关系*

王 东** 李颖嘉 牟江洪 陈 俐 (第三军医大学附属大坪医院病理科) 重庆, 400042

提 要 目的: 探讨细胞核因子κB(NF-κB)表达与骨肉瘤血管生成的关系。方法: 选择 80例有随访结果的骨肉瘤,应用免疫组化方法检测 NF-κB p65亚单位以及血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达,同时观察肿瘤内微血管密度(MVD)。结果: 80例骨肉瘤中 48例 NF-κB p65阳性,阳性产物主要定位于肿瘤细胞浆。NF-κB表达与 VEGF表达和 MVD呈显著正相关,而且 NF-κB阳性组病人存活时间显著低于阴性组。结论: ① NF-κB p65是骨肉瘤相关的一种癌蛋白,在骨肉瘤的发生和发展中发挥重要的作用;② NF-κB对 VEGF可能有正向调节作用,进而影响骨肉瘤血管生成;③ NF-κB对肿瘤血管生成的作用,可能是影响骨肉瘤预后的主要原因之一。

关键词 骨肉瘤;细胞核因子κB;新生血管化,病理性
中图法分类号 R738.1

业已证明血管生成是实体瘤生长和转移的关键因素,骨肉瘤和其它许多肿瘤中肿瘤内微血管密度(Intratumoral microvascular density, MVD)是影响肿瘤预后的重要因素[1],但有关肿瘤血管生成的调节机制仍不十分清楚。细胞核因子κB(Nuclear factorκB, NF-κB)是一种多功能的转录因子[2],许多研究表明其在肿瘤血管生成中可能具有核心的调节作用[3,4],推测 NF-κB和肿瘤血管生成可能有关,但国内外均未见报道。为此,本研究应用免疫组化技术检测 80例骨肉瘤 NF-κB p65亚单位蛋白表达,旨在探讨其与 MVD和血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)表达及病人预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选用 1968~1993年间本院及院外会诊的长骨髓内型骨肉瘤 80例。肿瘤直径 5~25 cm,平均 10 cm。组织学级参照 Price三级法[5],组织学分型按 Dahlin氏分型[6]和 1993年 WHO骨肉瘤组织学分类[7]两种方法。全部病例均有随访,总体 2年存活率为 33.8%, 5年存活率为 18.3%。此外,选用 10例骨纤维结构不良和 5例骨母细胞瘤作对照研究。

1.2 免疫组化

全部标本均经 10%福尔马林液固定,石蜡包埋切片。所用单克隆抗体 FⅧ-RA及 CD31为 Dako公司产品, VEGF多克隆抗体和 NF-κB p65亚单位多克隆抗体购自 Santa Cruz公司。LSAB试剂盒为 Dako公司产品,染色方法参照试剂盒说明进行。PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 肿瘤内微血管密度计数(MVD)[8]

应用 CMIAS真彩色图像分析系统测定。首先选取具有代表性的组织切片,排除肿瘤出血区及边缘反应区。低倍镜(40×)观察确定每例切片中 3个血管密度最高区域(热点区域),然后在高倍镜(200×)下,计数每个区域的 MVD,其平均值即作为该例肿瘤的 MVD值。

1.4 统计学处理

NF-κB表达与骨肉瘤临床病理以及 VEGF表达的关系采用 χ^2检验,与 MVD的关系采用 t检验。用生命表法计算累积生存率, COX模型进行单因素分析, Log-rank检验比较 NF-κB阳性组和阴性组生存率。

2 结果

2.1 骨肉瘤 NF-κB p65的表达

NF-κB p65亚单位免疫组化阳性产物呈棕褐色细颗粒状,主要定位于肿瘤细胞胞浆,见图 1。80例骨肉瘤中 48例 NF-κB p65阳性,阳性率为 60%。在 10例骨纤维结构不良和 5例骨母细胞瘤中 NF-κB p65免疫组化结果阴性,边缘性反应骨和外伤性骨痂组织未见着色。

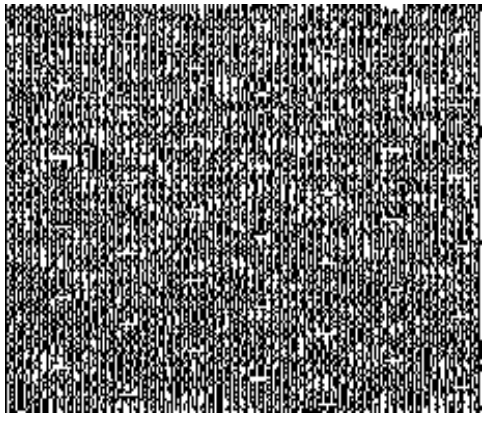


图 1 软骨母细胞型骨肉瘤 NF-κB p65蛋白免疫组化染色,阳性反应主要定位于肿瘤细胞胞浆 (LSAB× 200)

Fig 1 Immunohistochemical staining of NF-κB p65 subunit in osteosarcoma of chondroblastic type, the positive product was mainly localized in the cytoplasm of tumor cell (LSAB× 200)

* 全军"九五"青年基金项目, No.军队-18
** 王 东,男,34岁,副主任医师,副教授,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 肿瘤内微血管密度计数

FⅧ-RA和 CD31阳性产物定位于血管内皮细胞胞浆,见图 2。80例骨肉瘤中 50例两种抗原皆为阳性,另外 30例中 FⅧ-RA阳性 16例,CD31阳性 14例。80例骨肉瘤中 MrD值范围为 7.3~ 93,中位数为 31.1,平均值为 35.4

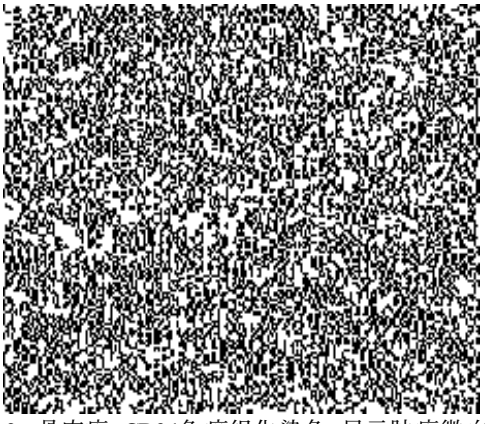


图 2 骨肉瘤 CD31免疫组化染色,显示肿瘤微血管密度 (LSAB× 200)

Fig 2 Immunohistochemical staining of CD31 in osteosarcoma, showing the intratumoral microvessel density (LSAB× 200)

2.3 骨肉瘤中 VEGF的表达

VEGF阳性产物主要定位于肿瘤细胞胞浆,在肿瘤细胞低分化区,骨样组织幼稚区,以及新生毛细血管周围多见 VEGF强表达。80例骨肉瘤中,42例 VEGF阳性(52.5%)。

2.4 NF-κB p65表达与骨肉瘤病理的关系

NF-κB p65表达与肿瘤体积、Price组织学分级、Dahlin's分型无关,而与 WHO骨肉瘤组织新分型有关(表略)。

2.5 NF-κB p65表达与 MVD、VEGF表达的关系

NF-κB阳性组 VEGF高表达,而且 MVD值明显高于阴性组,见表 1。提示 NF-κB表达与 MVD、VEGF表达密切相关。

表 1 NF-κB p65表达与 MVD、VEGF表达的关系

Tab 1 The relationship between NF-κB p65 expression and MVD、VEGF expression

NF-κB	n	VEGF		MVD	P
		-	+	x (s, Range)	
Positive	48	14	34	42.7(18.6, 7.0- 93)	< 0.05
Negative	32	24	18	33.0(21.1, 7.3- 87.3)	< 0.05

2.6 NF-κB p65与骨肉瘤预后的关系

NF-κB p65阳性组和阴性组骨肉瘤 2年和 5年存活率分别为 20%,10%及 60%,22%,经 Log-rank检验两组生存率差异有显著性(χ^2= 5.62, P < 0.05)。为进一步确定 NF-κB对骨肉瘤预后的影响,选用 COX模型进行单因素分析,结果表明 NF-κB为影响骨肉瘤预后的重要因素(P < 0.001),回归系数= 1.23,相对危险度= 3.34。

3 讨论

肿瘤血管生成包括血管内皮细胞的迁移、粘附、增殖,以及管状结构形成等一系列复杂过程,其中有多种血管生成因子和细胞粘附分子的参与。NF-κB因具有激活免疫球蛋白轻链基因表达而得名,是由 50× 10^3u蛋白(p50)和 65× 10^3u蛋白(p65/RelA)组成的异源二聚体。在正常情况下 NF-κB和 NF-κB的抑制因子 IκB形成复合物而处于静止状态,当细胞受到外界因素,如细胞因子、病毒感染等刺激时,IκB通过磷酸化而降解,NF-κB和IκB分离迅速移位至细胞核,发挥转录因子作用而产生级联效应。目前的研究表明 NF-κB作用于血管形成的诸多环节,可能对血管形成具有核心的调节作用。

其一、肿瘤细胞能产生与释放多种血管生成因子,促进肿瘤血管生成。在已发现的血管生成因子中,已证明转化生长因子β(TGFβ)、肿瘤坏死因子α(TNFα)、白介素 1α(IL-1α)和白介素 8(IL-8)含有 NF-κB的特异结合位点,其表达受 NF-κB的调节[3]。用 NF-κB反义核苷酸能够抑制 TNFα诱导的血管生成,并同时能抑制 TNFα介导的碱性纤维生长因子(bFGF)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达[4],提示 NF-κB对 bFGF和 VEGF的表达也存在潜在的调节作用。

其二、粘附分子在内皮细胞形成管状结构中,从一维的基因调节向三维的血管结构转化发挥着至关重要的作用[9],而内皮细胞间的粘附主要是由细胞间粘附分子-1(ICAM-1)、血小板内皮细胞粘附分子-1(PECAM-1,亦称 CD31)介导的。已知 ICAM-1结构中含有 NF-κB结合序列,是 NF-κB调节的靶基因。PECAM是近年研究的一个新热点,在动物实验中用 PECAM-1抗体能有效地抑制肿瘤血管生成[10]。PECAM和 ICAM-1同属免疫球蛋白超家族,在结构和功能上有许多相似之处,目前虽未确证其是否含有 NF-κB结合序列,但有证据表明 PECAM-1的表达亦受 NF-κB的调节[11]。

其三、内皮细胞与基质的作用是由内皮细胞表面整合素决定的,肿瘤血管内皮细胞特异表达整合素 $\alpha_v\beta_3$和 $\alpha_v\beta_5$。Sharma等[12]的研究表明整合素 α_v是 NF-κB的靶分子。上述研究结果提示 NF-κB在内皮细胞之间以及内皮细胞与基质之间的粘附中起调节作用。

本组 10例骨纤维结构不良和 5例骨母细胞瘤中 NF-κB p65免疫组化结果阴性,而 80例骨肉瘤中 48

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

例 NF-κB p65阳性。NF-κB阳性组 VEGF高表达,而且 MVD值明显高于阴性组。同时 NF-κB p65阳性组存活率明显低于阴性组。该结果进一步表明 NF-κB p65是骨肉瘤相关的一种癌蛋白,在骨肉瘤的发生和发展中发挥重要的作用;NF-κB对 VEGF可能有正向调节作用,进而影响骨肉瘤血管生成;NF-κB对肿瘤血管生成的作用,可能是影响骨肉瘤预后的主要原因之一。此外,NF-κB p65表达与骨肉瘤体积、Price分级、Dahlin氏组织学分型无关,而与 WHO新的骨肉瘤分型有关。

本结果表明 NF-κB和骨肉瘤血管生成显著相关,进一步佐证 NF-κB对多种肿瘤相关生长因子及肿瘤血管生成的多个环节可能具有调节作用,NF-κB有可能成为抗骨肉瘤血管生成治疗一个新的靶基因。

参考文献

1 王　东,陈　俐,高奉浔.骨肉瘤中血管密度与预后的研究.中华病理学杂志,1997,26(5):266

2 Siebenlist U, Franzoso G, Brozon K. Structure, regulation and functions of NF-kappa B. Annu Rev Cell Biol, 1994, 10(2): 405

3 Read M A, Whitley M Z, Williams A J, *et al*. NF-κB and I κBα: an inducible regulatory system in endothelial activation. J Exp Med, 1994, 179(2): 503

4 Yoshida S, Ono M, Shono T, *et al*. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. Mol Cell Biol, 1997, 17(7): 4015

5 Price C H. Osteogenic sarcoma: An analysis of survival and its relationship to histological grading and structure. J Bone Joint Surg, 1961, 43(B): 300

6 Dahlin D C, Coventry M B. Osteogenic sarcoma: A study of 600 cases. J Bone Joint Surg, 1967, 49(A): 101

7 Schajowicz F, Sissons H A, Sobin H. The World Health Organization's histologic classification of bone tumor. A commentary on the second edition. Cancer, 1995, 75(5): 1208

8 Hollingsworth H C, Kohn E C, Steiberg S M, *et al*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol, 1995, 147(1): 33

9 Vernon R B, Sage E H. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. Am J Pathol, 1995, 147(4): 873

10 Delisser H M, Christofidou-Solomidou M, Strieter R M, *et al*. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. Am J Pathol, 1997, 151(3): 671

11 Friedlander M, Brooks P C, Shaffer R W, *et al*. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha vintegrins. Science, 1995, 270(5241): 1500

12 Sharma H W, Higgins S K, Perez R, *et al*. A DNA motif present in alpha V integrin promoter exhibits dual binding preference to distinct transcription factors. Anticancer Res, 1995, 15(5B): 1857

(收稿: 1998-06-31;修回: 1998-10-15)

(编辑　汪勤俭)

Relationship between expression of nuclear factor and angiognesis in osteosarcoma*

Wang Dong, Li Yingjia, Mu Jianghong, Chen Li (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To explore the relationship between the expression of nuclear factor κB (NF-κB) and angiogenesis in osteosarcoma. Methods: The expression of NF-κB p65 subunit and endothelial cell growth factor (VEGF) were detected immunohistochemically in specimens from 80 cases of osteosarcoma with following-up data. Meanwhile, the intratumoral microvessel density (MVD) was calculated with morphometry. Results: Of the 80 cases of osteosarcoma, 48 were positive to NF-κB p65 subunit staining and the positive products were mainly localized in the cytoplasm of tumor cells. The expression of NF-κB was positively correlated with VEGF expression and MVD. Furthermore, the survival time was much shorter in cases with positive expression of NF-κB than in those with negative one. Conclusion: ① NF-κB is an important oncoprotein and plays an important role in occurrence and development of osteosarcoma. ② NF-κB may induce the angiogenesis in the tumor through up-regulating the VEGF expression. ③ Involvement of NF-κB in angiogenesis might be one of the most important factors that influence the prognosis in patients with osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; NF-κB; neovascularization, pathologic

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net