DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.013

髓内型骨肉瘤患者预后的多因素 COX模型分析

王 东* 李增鹏 高奉浔 (第三军医大学附属大坪医院病理科) 重庆,400042

提 要 目的: 研究病理多因素对骨肉瘤预后的影响。方法: 通过计算机 COX多因素分析模型,利用累积生存率,对 80例有随访的长骨髓内型骨肉瘤进行预后研究。结果: 80例骨肉瘤患者 2年、5年生存率分别为 33.8%和 18.3%。在选取的 14个因素中,对预后影响最大的因素依次为: 骨样组织分型(RR= 2.35)、p53(RR= 2.27)、血管内皮生长因子(VEGF)表达(RR= 2.07)、WHO分型(RR= 1.87)、增殖细胞核抗原(PCNA)(RR= 1.74)、微血管密度(MVD)(RR= 1.01)。治疗方法和转移抑制基因 nm23-H_1蛋白表达对预后影响不大。结论: 该结果对综合评估骨肉瘤预后有重要意义。

关键词 骨肿瘤/病理学;多元分析;预后

中图法分类号 R738.1

骨肉瘤是严重危害人体健康的恶性肿瘤之一,特别是青少年。应用联合化疗,很大程度提高了治疗效果,但病人的死亡率仍很高[1]。影响骨肉瘤预后的因素很多,而病理因素是最为重要的。在过去的研究基础上[2-4],我们采用累积生存率,运用 COX多因素分析模型,进一步探讨骨肉瘤的预后因素。

1 材料和方法

1.1 临床资料

选用 1968~1993年间我院及院外会诊长骨髓内型骨肉瘤 80例,其中男性 52例,女性 28例,男女之比为 1.8∶1 年龄 11~68岁,平均 23岁,最高峰 10~19岁 54例,占 62.5%。肿瘤侵犯软组织者 74例(92.5%)。肿瘤直径 5~25 cm,平均 10 cm 组织学分级参照 Price分级法[5],组织学分型按下列 3种不同方法进行:① Dahlin氏分型[6];② 根据肿瘤性骨样组织分化程度进行分型[2];③ 1993年 WHO骨肉瘤组织学分类[7]。

80例骨肉瘤中手术切除标本 75例,活检标本 5例。截肢加化疗 35例(43.8%),单性截肢 24例(30%),瘤段切除灭活再植或断端融合加术后化疗 17例,活检未治 4例。全部病例均有随访,随访时间 3~20年,总体 2年存活率为 33.8%,5年存活率为 18.3%。

1.2 免疫组化染色

全部标本均经福尔马林液固定,石蜡包埋连续切片,分别 HE和免疫组化染色。后者包括: 增殖细胞核抗原(PCNA)、八因子相关抗原(FⅧ)、血小板/内皮细胞粘附分子(CD31)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肿瘤抑制基因 p53蛋白(CM-1)、转移抑制基因 nm23蛋白(nm23-H_1)。染色方法按 SP试剂盒说明进行,PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

每例观察 1 000个肿瘤细胞,计数其中增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞数,PCNA标记指数= PCNA阳性细胞数/观察肿瘤细胞数×100%。

肿瘤内微血管密度(MVD)计数应用 CMIAS真彩色图像分析系统测定[8]。对 FⅧ-RA和/或 CD31染色切片低倍镜(×40)下确定每例切片中 3个血管密度最高区域,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。

根据 VEGF染色深度将其分为(-)、(±)、(+)和(++)级,其中(++)级为 VEGF高表达组,(-)、(±)和(+)级为 VEGF低表达组。

P53蛋白染色以细胞核有明确棕褐色颗粒为阳性细胞,每张切片观察 10个高倍视野,阳性细胞> 10%即为阳性病例。nm23-H_1分为阳性和阴性组。

1.4 统计方法

将 80例骨肉瘤临床病理资料和免疫组化检测结果归纳为下述特征性因素:① 性别;② 年龄;③ 肿瘤最大直径;④ 侵犯软组织;⑤ 治疗方法;⑥ Price分级;⑦ Dahlin氏分型;⑧ 肿瘤性骨样组织分型;⑨ 1993年 WHO骨肉瘤分型;⑩ PCNA;⑪ MVD;⑫ VEGF;⑬ p53;⑭ nm23 生存时间按日记录,以手术日至死亡时间或者随访单所获的截尾时间为准。将全部资料输入计算机,利用累积生存,通过似然比进行单因素分析,而后对初步筛选出的显著因素进行 COX模型多因素分析。统计分析采用 SAS6.07软件进行(重庆医科大学卫生统计学教研室)。

* 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 结果

2.1 临床病理和免疫组化分析结果,见表 1

表 1 80例骨肉瘤临床病理和免疫组化分析结果

Tab 1 The results of clinicopathological and immunohistochemical staining analysis

Factors	Results	Factors	Results
Sex		Osteoid classification	
Male	52	Well-differentiated	14
Female	28	Intermediate differentiated	31
Age(years)	11~68	Poor-differentiated	35
Mean	23	WHO classification, 1993	
Tumor size		Conventional central	59
<10 cm	39	Telangiectatic	4
≥10 cm	41	Intraosteous well differentiated	14
Soft tissue		Round-cell	3
Invasive	74	PCNA index	
Non-invasive	6	GradeⅠ (0%~25%)	14
Therapy		GradeⅡ (25%~50%)	25
Amputation+chemotherapy	35	GradeⅢ (50%~75%)	23
Segmental excision	17	GradeⅣ (75%~100%)	28
Amputation only	24	MVD	
Biopsy only	4	<31	40
Price's grading		≥31	40
GradeⅠ	7	VEGF expression	
GradeⅡ	38	High grade(++)	43
GradeⅢ	35	Low grade(-,±,+)	37
Dahlin's Classification		p53 expression	
Osteoblastic type	33	Positive	30
Chondroblastic type	16	Negative	50
Fibroblastic type	24	nm23-H_1 expression	
Others	7	Positive	33
		Negative	47

2.2 预后因素的 COX模型多因素分析

对 14个因素进行单因素分析,得出 8个显著性因素:肿瘤性骨样组织分型、WHO新分型、PCNA、MVD、VEGF、p53、nm23-H_1和治疗方法。组织学分型对预后的影响表现为,骨样组织成熟型比骨样组织中间型、幼稚型预后好,骨内高分化骨肉瘤比其它髓内普通型骨肉瘤预后好。治疗方法对预后的影响表现为截肢或瘤段切除加术后化疗的比单纯性截肢或活检未治的预后较好。通过 COX模型多因素分析,按混乱度(AIC)值测出的最重要一组预后因素为:PCNA、肿瘤性骨样组织分型、WHO新分型、MVD、VEGF和 p53,其中 PCNA、肿瘤性骨样组织分型、WHO新分型为显著相关的因素。用相对危险度(RR)进行比较,上述 6个因素对预后的反映程度依次为:骨样组织分型>p53>VEGF>WHO分型>PCNA>MVD,见表 2。

表 2 COX模型多因素分析结果

Tab 2 Risk factors affecting overall survival rate determinated by COX proportional hazard model

Variable	Regression coefficient	Standard error	χ^2	P	RR
PCNA	0.50	0.12	9.41	<0.001	1.74
Osteoid types	0.85	0.21	16.40	<0.001	2.35
WHO classification	0.69	0.14	11.32	<0.001	1.87
MVD	0.01	0.01	3.89	<0.05	1.01
VEGF	0.71	0.27	6.89	<0.01	2.03
p53	0.82	0.29	8.20	<0.01	2.27

3 讨论

骨肉瘤是高度恶性的骨肿瘤,自从临床应用联合化疗后生存率有所提高,近年又开展了保肢治疗,对肢体功能的保留和恢复有重要意义。本组单因素分析结果显示截肢加化疗和保肢治疗加化疗比单纯手术和未治组存活时间较长,但应用多因素分析时则没有进入。可能与治疗方法对预后影响较小,以及病例数量较少有关。

传统骨肉瘤组织分型采用 Dahlin氏标准[6],分为骨母细胞型、软骨母细胞型和纤维母细胞等亚型,然而这 3种成分常混合存在,临床和 X线表现差异不明显,对预后判断和治疗也没什么意义。由于骨肉瘤恶性程度高,组织学分级与预后亦无明确关系。早在 1990年我们通过形态观察和形态计量学分析提出了骨肉瘤肿瘤性骨样组织的新分型[2],结果表明骨样组织成熟型比中间型和幼稚型预后要好得多。1993年 WHO提出了骨肉瘤的新分型[7],将髓内型骨肉瘤分为普通型、高分化型、毛细血管扩张型和圆形细胞型,其中骨内高分化骨肉瘤亚型即与骨样组织成熟型是一致的。两种方法殊途同归,进一步表明骨样组织分型具有重要的实际意义。COX模型分析表明两种分型方法密切相关,并且均为影响预后的重要因素。

恶性肿瘤具有高度增殖活性,其发生和发展是由多种癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活共同作用的结果。PCNA是一种 36×10^3 u的 DNA聚合酶 δ的辅助蛋白,许多研究表明它是细胞周期 G_1/S期的内在标记物。肿瘤抑制基因 p53系骨肉瘤的重要相关基因之一,P53蛋白过度表达和 PCNA标记指数与骨肉瘤的预后有关。肿瘤抑制基因 nm23定位于人体 17号染色体长臂(17q22),nm23蛋白水平的低表达与许多恶性肿瘤的侵袭性转移有关。COX模型单因素分析结果表明 nm23-H_1表达与骨肉瘤预后有关,但多因素分析则未能进入。

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

实体肿瘤的生长和转移是血管生成依赖性的[9]。血管内皮生长因子 (VEGF)是由肿瘤细胞分泌的一种重要的血管生成因子。通过旁分泌机制刺激内皮的增生、移位和血管结构形成。肿瘤内微血管密度 (MVD)和 VEGF表达与多种肿瘤的转移和预后有关。本结果亦显示 MVD和 VEGF与骨肉瘤预后显著相关。肿瘤血管生成一方面受肿瘤血管生成表型的影响,另一方面亦受环境因素 (如低氧)的调节。肿瘤细胞快速增殖引起组织内低氧,而低氧又会刺激肿瘤细胞分泌 VEGF等血管生成因子,促进血管生成。此外,已有研究表明肿瘤抑制基因 p53突变可以负向调节血管生成抑制因子血小板反应素-1(TSP-1)[10],并正向调节 VEGF表达[11],而参与调节血管生成。基础研究的结果表明 p53基因、PCNA与肿瘤血管生成是密切相关的。它们之间相互作用,共同决定了肿瘤细胞的恶性表型和生物学行为。

影响骨肉瘤的预后因素很多,而国内外报道多为单因素分析。本研究应用 COX模型对骨肉瘤临床病理、治疗方法、肿瘤细胞增殖、血管生成和肿瘤抑制基因表达等 14个因素进行分析,得出一组影响骨肉瘤预后的主要因素,并根据其相对危险度大小,确定其对预后的影响程度依次为:骨样组织分型> p53> VEGF> WHO分型> PCNA> MVD。该结果对于综合评估骨肉瘤的预后有着重要意义。

参考文献

1 Dorfman H D, Czerniak B. Bone cancers. Cancer, 1995, 75(1): 203

2 王　东,高奉浔.骨肉瘤肿瘤性骨样组织分型的立体计量学与预后的研究.中华病理学杂志, 1990, 19(4): 268

3 王　东,陈　俐,高奉浔.骨肉瘤 p53蛋白过度表达与预后的关系.临床与实验病理学杂志, 1997, 13(1): 45

4 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

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

6 Dahlin D C, Coventry M B. Osteogenic sarcoma: A study of 600 cases. J Bone Joint Surg, 1967, 49A: 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 Holligsworth H C, Kohn E C, Steinberg S M, *et al*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. Am J Pathol, 1995, 147(1): 33

9 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4

10 Dameren K M, Volpert O V, Tainsky M A, *et al*. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombos-pondin-1. Science, 1994, 265(5178): 1582

11 Kieser A, Weich H A, Brandner G, *et al*. Mutant p53 potentates protein kinase C induction of vascular endothelial grow factor expression. Oncogene, 1994, 9(3): 963

(收稿: 1997-12-23;修回: 1998-10-30)

(编辑　汪勤俭)

Prognostic factors for intramedullary osteosarcoma　a multivariate analysis using COX proportion hazard model in 80 cases

Wang Dong, Li Zengpeng, Gao Fengxun (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the prognostic significance of pathological parameters in osteosarcoma. Methods: Fourteen individual variables were statistically evaluated using the cumulative survival rate by the computerized COX multivariate analysis model in 80 patients with intramedullary osteosarcoma of long bone. Results: The 2- and 5-year cumulative survival rates were 33.8% and 18.3% respectively. The most important prognostic variables for predicting overall survival included the neoplastic osteoid classification, p53 protein, expression of vascular endothelial growth factor, the type according to WHO classification in 1993, proliferating nuclear antigen and intratumoral microvessel density. The methods of treatment and the expression of nm23-H1 protein did not strongly influence the prognosis of the disease. Conclusion: The results are important for comprehensive evaluation of the prognosis of osteosarcoma.

Key words bone tumor/pathology; multivariate analysis; prognosis

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