DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.014

骨肉瘤组织蛋白酶 D表达及其与预后的关系*

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

提 要 目的:探讨骨肉瘤组织蛋白酶 D表达与肿瘤细胞增殖活性及骨肉瘤预后的关系。方法:运用免疫组织化学染色,检测 85例骨肉瘤细胞增核抗原(PCNA)及组织蛋白酶 D(Cath-D)的表达,计算其标记指数(Labelling index即 LI)。结果:Cath-D LI在 6%~ 98.5%之间,PCNA LI在 9%~ 98%之间,Cath-D LI与骨肉瘤患者的年龄、性别、肿瘤的大小及 Dahlin分型无关,而与 WHO 1993年新分型,Price分级及 PCNA LI密切相关。生存率分析显示 Cath-D LI<62.5%的骨肉瘤预后较好,>62.5%的骨肉瘤预后较差。结论:骨肉瘤 Cath-D表达与肿瘤细胞增殖活性及生存率密切相关,提示 Cath-D LI可能是评估骨肉瘤预后的一项有价值的指标。

关键词 骨肉瘤;组织蛋白酶 D;免疫组织化学;预后
中图法分类号 R738.1

骨肉瘤是严重危害青少年健康的恶性肿瘤之一。大量研究表明,组织蛋白酶 D(Cathepsin D, Cath-D)在乳腺癌[1]、胃癌、卵巢癌、喉癌、甲状腺癌、黑色素瘤等的侵袭、转移乃至预后中有一定程度的关系,但与骨肉瘤转移和预后关系怎样,目前尚未见报道。本研究应用免疫组织化学染色方法,检测 85例骨肉瘤 Cath-D的表达,旨在探讨 Cath-D表达与骨肉瘤细胞增殖活性及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

1968~ 1993年间长骨中央型骨肉瘤 85例,男性 57例,女性 28例,男女比约为 2∶1,患者年龄 11~ 55岁,平均 21.5岁。其中手术切除标本 81例,活检 4例。全部病例均有随访,随访时间 5~ 25年。

1.2 免疫组化染色

标本均经 10%福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋切片,所用增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体及 Cath-D多克隆抗体均为 DAKO公司产品,ABC法进行免疫组化染色。Cath-D染色时于加一抗前用胰酶消化 20 min,以 PBS液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定方法

选择切片中典型的骨肉瘤组织学图像,高倍镜下观察 500个肿瘤细胞,计数其中 PCNA及 Cath-D阳性细胞数。PCNA标记指数(Labelling index, LI)= PCNA阳性细胞数/所观察的肿瘤细胞数×100%;Cath-D LI= Cath-D阳性细胞数/观察的肿瘤细胞数×100%。指据 Cath-D LI将 Cath-D标记结果分为 0~ 3级:0级阴性(<10%);Ⅰ级(10%~ 30%);Ⅱ级(30%~ 66%);Ⅲ级(>66%阳性)。

1.4 统计学分析方法

Cath-D表达与骨肉瘤临床病理的关系,应用 Pearson χ^2检验进行统计学分析,Cath-D LI与 PCNA LI相关性采用 Spearman秩和相关检验。以中位数将 Cath-D染色结果分为高表达及低表达两组,统计两组骨肉瘤存活期,并行 Log-rank检验。

2 结果

2.1 临床病理资料

肿瘤直径 5~ 20 cm,平均约 10.5 cm。组织学分级采用 Price三级法,组织学分型采用 1993年 WHO新分型[2]有 Dahlin分型两种,以作比较。随访 5~ 25年,平均生存期为 26个月,两年生存率约为 51.8%,5年生存率仅为 23.4%。

2.2 免疫组化染色结果

PCNA的表达呈颗粒状阳性,定位于细胞核。骨肉瘤中骨母细胞、纤维母细胞、软骨母细胞、小圆型细胞和多核瘤巨细胞对 PCNA均呈阳性反应。PCNA LI在 9%~ 98%之间,平均指数为 54.5%。随着骨肉瘤分化程度的不同,PCNA阳性表达亦呈显著异质性,见图 1 2

Cath-D阳性表达定位于细胞浆,呈棕褐色细或粗颗粒状,可见于骨肉瘤中各种肿瘤细胞。Cath-D表达具有一定异质性,在瘤细胞及骨样组织分化成熟的区域,Cath-D表达多为散在弱阳性,而在低分化区域,Cath-D多为弥漫的强阳性。此外,在肿瘤间质中部分炎症细胞及肿瘤微血管内皮细胞可见 Cath-D强阳性表达,见图 3 4 85例标本中阴性(<10%)2例,Ⅰ级(<30%)10例,Ⅱ级(30%~ 66%)29例,Ⅲ级(>66%)44例。Cath-D LI在 6%~ 98.5%之间,平均指数为 56.2%,其中位数为 62.5%。

* 全军"九五"青年基金项目,No.军队-18
** 肖华亮,男,25岁,医师
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

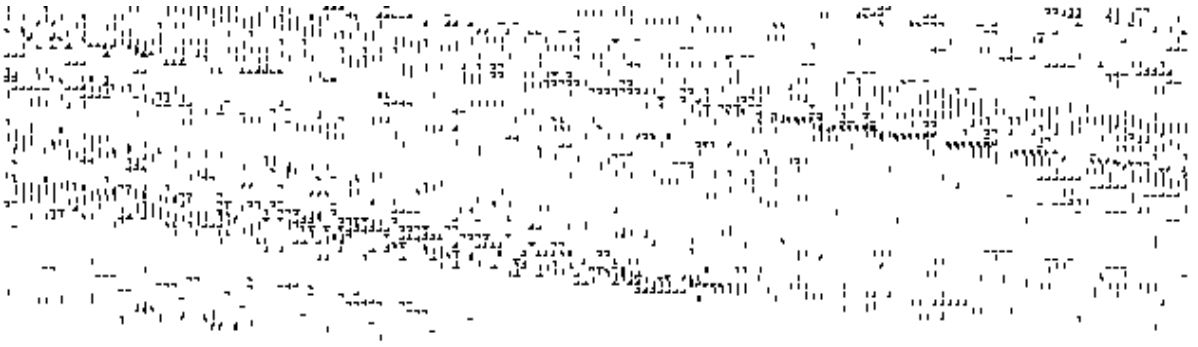


图 1 低分化骨肉瘤示 PCNA高表达 (ABC× 200)

Fig 1 High-grade expression of PCNA in poor-differentiated osteosarcoma (ABC× 200)

图 2 高分化骨肉瘤示 PCNA较低表达 (ABC× 200)

Fig 2 Low-grade expression of PCNA in well-differentiated osteosarcoma (ABC× 200)

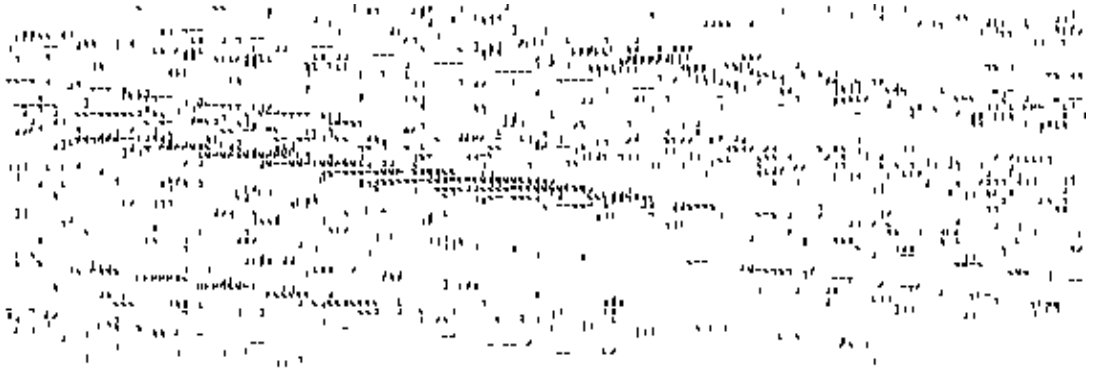


图 3 低分化骨肉瘤示 Cath-D弥漫阳性表达 (ABC× 200)

Fig 3 Tumor cells show diffuse staining of cathepsin D in poor-differentiated osteosarcoma (ABC× 200)

图 4 高分化骨肉瘤示 Cath-D散在阳性表达 (ABC× 200)

Fig 4 It showed the expression of cathepsin D in well-differentiated osteosarcoma in a single pattern (ABC× 200)

2.3 骨肉瘤 Cath-D指数与肿瘤临床病理的关系

Cath-D高表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小及 Dahlin分型无关,PriceⅢ级的 Cath-D表达明显高于 PriceⅠ级及Ⅱ级 ($P < 0.01$),WHO新分型中普通型的 Cath-D表达明显高于高分化型,二者相差非常显著 ($P < 0.01$)。

2.4 肿瘤 Cath-D表达与瘤细胞增殖活性之间的关系

结果显示,瘤细胞 PCNA高表达者其 Cath-D也大都显示为高表达,经行 Spearman秩和相关检验,等级相关系数 $r_s = 0.425$ ($P < 0.01$),提示 Cath-D LI与 PCNA LI之间存在显著正相关。

2.5 肿瘤 Cath-D水平与预后的关系

以 Cath-D LI中位数 62.5%将 85例标本分为高表达组及低表达组,统计两组的存活期,并行 Log-rank检验,$\chi^2 = 6.42$,$P < 0.025$,两者相差显著,Cath-D高表达组骨肉瘤患者的生存期较低表达组显著缩短。

3 讨论

骨肉瘤是骨的最常见的原发性恶性肿瘤,其发病率占恶性骨肿瘤的 21%左右,好发于青少年,本组资料平均年龄为 21.5岁,最高峰段 16~19岁,占 55%。骨肉瘤恶性度高,危害性大,其致死率及因截肢造成的致残率均较高,近年来,随着诊治手段的不断改进,其存活率有所提高,国外报道其 5年存活率在 40%~50%之间,本组病例 5年生存率仅为 23.4%。早期经血道发生远处转移是其预后不良的主要原因之一,探讨其转移机制,研究转移过程中的各种影响因素,并获得一种能较准确评价其预后的指标,是骨肉瘤病理研

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

究中的一个重要问题。

恶性肿瘤的侵袭、转移是一个相当复杂的过程。瘤细胞自脱离原瘤灶到转移灶的形成,至少应两次穿越血管壁并向周围组织侵袭,在此过程中,蛋白水解酶包括胶原酶、血纤溶酶原激活剂、组织蛋白酶等可能起着极为重要的作用。

Cath-D是一种嗜酸性溶酶体蛋白水解酶,广泛存在于人体各种组织和细胞中,现已能自体外培养的乳腺癌细胞中产生,它具有多种分子量形式,最初为 52× 10^3u的前体蛋白,然后在溶酶体内加工成为 48× 10^3u的中间体,最后转变为分子量 34× 10^3u及 14× 10^3u的成熟形式[3]。Cath-D作为一种蛋白水解酶,可以直接催化细胞外基质的降解,并间接破坏血管基膜;它还可以激活组织蛋白酶 B,从而触发链式反应,诱导产生活化的尿激酶型-血纤溶酶原激活剂(u-PA)[4],而组织蛋白酶 B、u-PA均被认为是与恶性肿瘤侵袭、转移密切相关的蛋白水解酶;此外,Cath-D也参与肿瘤细胞的有丝分裂活动[5],这也是其影响肿瘤转移的可能机制之一。

目前 Cath-D免疫组化已广泛应用于乳腺癌、胃肠道癌、卵癌、喉癌、前列腺癌、膀胱癌、黑色素瘤等的研究中,发现 Cath-D表达与这些肿瘤的侵袭、转移、预后有不同程度的关系,其中以与乳腺癌的关系研究最为深入,研究表明,Cath-D免疫组化染色,可作为乳腺癌,尤其是Ⅰ期乳腺癌判断预后的一个独立指标。1995年 Aaltonen[1]报道了 151例乳腺癌,其中 Cath-D高表达组生存率明显低于低表达组;Garcia用 Cath-D转染细胞,不仅观察到其可以使细胞转化,增加恶性表型,而且其过度表达与侵袭转移有关[6]。1996年 Gohring研究发现 Cath-D表达可作为判断无淋巴结转移乳腺癌患者预后不良的标志[7];另有研究证实,Cath-D间质细胞表达对于判断乳腺癌复发及预后的意义远远高于肿瘤细胞表达[8]。在其肿瘤,如胃癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜腺癌、黑色素瘤等,Cath-D表达与预后的关系目前存在争论。至于骨肉瘤 Cath-D表达及其与骨肉瘤临床病理参数及预后的关系,国内外未见类似报道。本研究结果表明,Cath-D表达与患者的年龄、性别、肿瘤的大小及 Dahlin分型均无关,而与 Price分级和 WHO骨肉瘤新分型密切相关。通过生存率的比较,发现 Cath-D高表达组比低表达组生存期明显缩短($P < 0.025$),提示 Cath-D对评估骨肉瘤预后有一定价值。

PCNA即细胞增殖核抗原,它是 DNA多聚酶 δ的辅助单位,是真核细胞 DNA合成所必需的一种分子量为 36× 10^3u的核蛋白,在 DNA复制中起重要作用,其合成和表达与细胞增殖状态相关,可作为 S期的特异性标记[9]。过去的研究表明,PCNA高表达与骨肉瘤患者预后密切相关[10],本结果显示,Cath-D LI与 PCNA之间呈显著正相关,这也从一定程度上反映了 Cath-D表达与预后的关系。

我们通过对 85例有随访资料的骨肉瘤病例进行研究,结果表明 Cath-D LI> 62.5%比 Cath-D LI< 62.5%的骨肉瘤预后差,提示骨肉瘤瘤细胞 Cath-D LI可能是评估骨肉瘤预后的一项新指标,而且其方法简便,实用性强,有一定的临床应用价值。

参考文献

1 Aaltonen M, Lipponen P, Kosma V M, *et al*. Prognostic value of cathepsin-D expression in female breast cancer. Anticancer Res, 1995, 15(3): 1033

2 Schajowicz F. Histological typing of bone tumors. WHO intern. Histological classification of tumors. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1993. 10~13

3 Schwartz M K. Tissue cathepsins as tumor markers. Clin Chim Acta, 1995, 237(1~2): 67

4 Kobayashi H, Schmitt M, Goretzki L, *et al*. Cathepsin-B efficiently actives the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen actor(pro-uPA). J Biol Chem, 1991, 226(8): 5148

5 Vignon F, Capony F, Chambon M, *et al*. Autocrine growth stimulation of the MCF7 breast carcinoma cells by the estrogen-regulated 52K protein. Endocrinology, 1986, 118(4): 1537

6 Garcia M, Derocq D, Pujol P, *et al*. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. Oncogene, 1990, 5(12): 1809

7 Gohring U J, Scharl A, Theien U, *et al*. Comparative prognostic value of cathepsin D and urokinase plasminogen activator, detected by immunohistochemistry, in primary breast carcinoma. Anticance Res, 1996, 16(2): 1017

8 Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. Br J Cancer, 1995, 71(1): 158

9 Bravo R, Frank R, Blundell P A, *et al*. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-δ. Nature, 1987, 326(612): 515

10 王　东,高奉浔.增殖细胞核抗原与骨肉瘤预后的研究.中华病理学杂志, 1990, 19(5): 268

(收稿: 1998-03-31;修回: 1998-10-15)

(编辑　汪勤俭)

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

Cathepsin D expression in osteosarcoma and its prognostic significance

Xiao Hualiang, Wang Dong, Li Zengpeng, Chen Li (Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To identify the relation of cathepsin D (Cath-D) expression to tumor cell proliferative activity and prognosis in osteosarcoma. Methods: The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cath-D in tumor cells were semiquantitatively analyzed with immunohistochemistry in a consecutive prospective series of 85 osteosarcoma patients and the labeling index (LI) was calculated. Results: In all the cases, the range of Cath-D LI was 6% ~ 98.5% and that of PCNA LI 9% ~ 98%. The Cath-D LI was not correlated to the patient's sex, age, tumor size and Dahlin's type but closely correlated with new WHO classification in 1993, Price's grade and PCNA LI. Furthermore, the patients with a Cath-D LI less than 62.5% showed a better survival than those with a Cath-D LI more than 62.5%. Conclusion: Cath-D expression is closely related to survival in osteosarcoma patients, which suggests that Cath-D LI is an useful prognostic indicator for osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; cathepsin D; immunohistochemistry; prognosis

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

15例高原红细胞增多症患者骨髓组织病理学变化的初步观察*

15 cases of initial observation of change in pathology of marrow tissues of patients of erythrocyte erythropoiesis in plateau

李素芝** 孙克勤 牟信兵 薛增军 (西藏军区总医院) 拉萨, 850003

1 临床资料

15名男性患者,均长期居住在海拔 4 520 m高原地区,其中移居者 12名,均为汉族,世居藏族 3名,平均年龄 25岁。经详细询问病史、查体、排除心肺等疾患,并除外真性红细胞增多症和继发性红细胞增多。参照文献 [1]的标准: RBC≥ 6.5×10^{12}、HB≥ 200 g/L、Hct≥ 65%者。诊断为高原红细胞增多症。15名高原红细胞增多症患者均行一次性骨髓检查,于髂前上棘作一步法抽吸,活检取材,标本制作用不脱钙的塑料包埋法,经 HE、Comori嗜银染色及 Masson胶原纤维染色。观察造血组织面积及增生程度,造血三系及间质的变化。

判定标准参照文献 [2]进行: 增生极度活跃 (+++),造血组织面积≥ 90 vol%,增生明显活跃 (++),造血组织面积≥ 50~89 vol%,增生活跃 (+)≥ 35~ 49 vol%,增生减退 (+) < 34 vol%。

2 结果

造血组织面积: 造血组织面积 13例在 75 vol%以上 (其中 5例达 90 vol%、3例达 95 vol%),2例最低者为 65 vol%。增生程度均处于明显活跃和极度活跃水平,均以红系增生为主。

红细胞系统: 15例红系增生旺盛。不同发育阶段的幼红细胞聚集成簇,各期幼红细胞之胞核呈圆形、位于细胞中央,染色较深,胞浆粉红色,边界清晰,个别晚幼红细胞核不规整,中晚幼红细胞明显高于正常均值达 60% ~ 65% (正常骨髓造血组织均为 40% ± 9%)。原红细胞及早幼红细胞在正常均值内,2例可见成熟红细胞形态呈棘球状。

粒细胞及巨核细胞系统: 不同发育阶段的粒细胞呈弥散分布,各期粒细胞百分率均正常。巨核细胞无明显改变。

间质: 15例均有不同程度的血管增生,静脉窦扩张,但无纤维组织增生。淋巴细胞、脂肪细胞略有减低,但以脂肪细胞减低明显。

3 讨论

高原红细胞增多症的发生机制目前尚未完全清楚。本组 15例高原红细胞增多症骨髓活检提示: 骨髓细胞增生极度活跃或增生明显,并以红系增生为主,不同时期的幼红细胞其明显增生是在中晚幼红细胞阶段。这可能是某些造血生长因子 (如促红细胞生长素)刺激了不同分化阶段的骨髓细胞,使之生成超出正常水平的红细胞,而且这种作用过程发生在红系前体细胞阶段。促红细胞生成素的效应细胞主要包含了从红系定向干细胞早期的成红细胞等一系列的红细胞的生成细胞。高原红细胞增多症患者,红细胞增多的机制可能是促细胞生成素增高的结果。这种病理生理学的改变,可能是引起高原红细胞增多症骨髓形态变化的主要因素。

关键词 高原红细胞增多症; 骨髓; 病理学

中图法分类号 R555.1

参考文献

1 中华医学会高原医学学会推荐稿. 全国高原病命名、分型及诊断标准. 高原医学杂志, 1996, 6(1): 2

2 浦 权 编. 骨髓活组织的检查与诊断. 桂林: 广西师范大学出版社, 1988. 50~ 52

(收稿: 1998-05-27; 修回: 1998-11-30)

(编辑 仇玉福)

* 军队"九五"医药卫生基金资助项目, No. 96MD30

** 李素芝, 男, 47岁, 主任医师

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