

骨巨细胞瘤中 MMP-9 和 TIMP-3 的表达及临床意义

曾 弘¹, 文剑明², 李海刚¹, 沈溪明¹, 吴东霞¹

(1. 中山大学附属第二医院病理科, 广东 广州 510120; 2. 中山大学附属第一医院病理科, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究骨巨细胞瘤组织中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及其特异性抑制剂金属蛋白酶组织抑制因子-3(tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP-3)的表达及临床意义。【方法】用免疫组化 SP 法检测 45 例骨巨细胞瘤组织中 MMP-9、TIMP-3 的表达情况,以 CD31 标记检测微血管密度(micro vessel density, MVD)。【结果】骨巨细胞瘤组织中 MMP-9、TIMP-3 阳性率分别为 100%和 91%,MMP-9 表达与 MVD 水平存在正相关性 ($\chi^2 = 14.812, P = 0.001$),而且两者在复发组均显著高于非复发组($\chi^2 = 18.250, P = 0.000; t = -8.14, P = 0.000$),但 TIMP-3 在两组的表达在统计学上无明显差异,此外 MMP-9、TIMP-3 及 MVD 与组织学分级无关。【结论】MMP-9、TIMP-3 表达的不平衡可能会加速肿瘤血管形成并影响骨巨细胞瘤的复发。

关键词: 骨巨细胞瘤; 基质金属蛋白酶; 金属蛋白酶组织抑制因子; 新生血管化

中图分类号:R738.1 文献标识码:A 文章编号:1672-3554(2009)01-0074-04

Clinical Significance of Matrix Metalloproteinase-9, Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-3 Expression in Human Giant Cell Tumor of Bone

ZENG Hong¹, WEN Jian-ming^{2*}, LI Hai-gang¹, SHEN Xi-ming¹, WU Dong-xia¹

(1. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 This study was designed to investigate the clinical significance of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitors of metalloproteinase-3 expression in human giant cell tumor of bone. 【Methods】 The expression of MMP-9, TIMP-3 and micro vessel density were detected by immunohistochemical staining with monoclonal antibodies against MMP-9, TIMP-3 and CD31 in 45 cases of giant cell tumor of bone. 【Results】 The positive rates of expression of MMP-9, TIMP-3 were 100% and 91%, respectively. The expression levels of MMP-9 was correlated positively with MVD ($\chi^2 = 14.812, P = 0.001$), and both of them were significantly higher in recurrence group than in non-recurrence group of the tumor ($\chi^2 = 18.250, P = 0.000; t = -8.14, P = 0.000$), but no statistically difference was found in the expression level of TIMP-3 between the two groups. Moreover expressions of MMP-9, TIMP-3 and MVD have no relationship with histological grading of the tumor. 【Conclusion】 The imbalance between the changes of MMP-9 and TIMP-3 may accelerate angiogenesis and affect the recurrence of giant cell tumor of bone.

Key words: giant cell tumor of bone (GCT); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); tissue inhibitors of metalloproteinase-3 (TIMP-3); angiogenesis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(1): 74-77]

骨巨细胞瘤(GCT)在 WHO 新分类中被描述为“侵袭性的潜在恶性病变”,表现为高侵袭性、高复发率,但是目前尚无确切的组织学指标能反映

其生物学行为。肿瘤细胞侵袭和肿瘤新生血管的形成均需要蛋白酶的作用,基质金属蛋白酶 MMP-9 和金属蛋白酶组织抑制因子 TIMP-3 的表达失

收稿日期:2008-08-25

基金项目:广东省自然科学基金(001315)

作者简介:曾弘,病理学硕士,主治医师; * 通讯作者:文剑明,教授,项目负责人, E-mail: wenjm@mail.sysu.edu.cn

衡与多种肿瘤的侵袭转移和复发有关^[1-2],本研究采用免疫组化的方法,检测 45 例骨巨细胞瘤组织 MMP-9、TIMP-3 的表达,并探讨它们与肿瘤血管形成及复发的关系,为判断骨巨细胞瘤预后寻找可靠的指标。

1 材料和方法

1.1 材 料

骨巨细胞瘤标本取自 1993 年 3 月至 2000 年 5 月中山大学附属一院及二院骨外科手术切除的组织,选择肿瘤复发病例 19 例,非复发病例 26 例,共 45 例,男 21 例,女 24 例,年龄 15 ~ 67 岁(中位年龄 30 岁)。肿瘤组织用 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片,进行免疫组化染色。

1.2 免疫组化

小鼠抗人 MMP-9(GE-213)和 CD31(JC70A)购自 DAKO 公司,TIMP-3(IM43L)购自 Oncogene 公司,SP 试剂盒均购自福州迈新公司。石蜡切片厚 4 μm ,其中 CD31 染色前先行高温高压抗原修复。其余步骤按 SP 法进行,最后 DAB 显色,苏木素对比染色。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以结肠癌及绒毛组织做阳性对照。

1.3 结果判断及统计分析

对于 MMP-9 和 TIMP-3,细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞。随机选择有代表性的 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,着色程度(基本不着色、着色淡、着色适中和着色深者分别为 0、1、2、3 分)与着色细胞百分率(着色细胞百分率 < 5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,> 50% 为 3 分)的乘积, ≤ 1 分为(-),2 ~ 4 分为(+),5 ~ 7 分为(++), ≥ 8 分为(+++)。微血管密度(micro vessel density, MVD)计数^[3]:任何被 CD31 染成棕黄色的内皮细胞或与邻近微血管、肿瘤细胞之间存在明显分离的内皮细胞团,均按独立的微血管计数,是否有血管腔不作为判断微血管的必要条件,但血管腔大于 8 个红细胞面积或血管周围有平滑肌包绕的较大血管不纳入计数范围。低倍镜下选择血管密度最高的区域,400 倍镜下(0.216 mm^2 /视野)计数,取 5 个视野的平均值。统计采用方差分析, t 检验和非参数检验,在 SPSS8.0 统计软件包中进行。

2 结 果

2.1 组织学分级

根据常规的骨巨细胞瘤病理形态分级法^[4],本组病例 I 级 8 例,II 级 27 例,III 级 10 例。

2.2 复发追踪

复发病例 19 例,占本组病例 42.2%,其中最短复发时间为 3 个月,最长为 84 个月,平均为 27.6 个月。另 26 例追踪时间长达 60 个月,未见复发。

2.3 免疫组化

免疫组化显示 MMP-9 表达于大部分的多核巨细胞及个别的单核基质细胞胞浆。在多核巨细胞的胞浆内,MMP-9 的表达分布不均匀,在细胞皱褶缘处表达强烈,具有明显的极向性。还可以见到 MMP-9 表达阳性的多核巨细胞进入血管,此外,MMP 的表达在肿瘤与周围组织的交界处更为明显。TIMP-3 表达于多数单核基质细胞及多核巨细胞的胞质和胞膜。在肿瘤周围反应性成骨灶的成骨细胞和骨细胞,也可见 TIMP-3 呈强阳性。统计结果显示:MMP-9 和 TIMP-3 阳性率分别为 100% 和 91%,MMP-9 的表达和 MVD 在复发组和非复发组之间的差异有显著性意义($\chi^2 = 18.250, P = 0.000; t = -8.14, P = 0.000$),MMP-9 与 MVD 存在正相关性($\chi^2 = 14.812, P = 0.001$),但 TIMP-3 的表达在复发组和非复发组之间的差异无显著性意义($\chi^2 = 0.059, P > 0.05$)。MMP-9、TIMP-3 的表达及 MVD 与组织学分级无关(非参数检验 $P > 0.05$; 表 1、图 1)。

3 讨 论

骨巨细胞瘤虽然是一种潜在恶性的肿瘤,但其侵袭性生长,术后复发率高达 20% ~ 50%^[5-6]。在临床病理诊断中,沿用多年的 Jaffe 病理组织分级法^[4]不能正确反映其生物学行为的良恶性,对指导治疗和判断预后无明显价值。临床上,由于手术方式选择不当,相当数量的患者要经历多次复发及手术,严重影响了生活和生产。因此,需要寻找一种可靠的指标来判断该肿瘤的生物学行为。

MMP 是一类与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切的蛋白水解酶,其中以 MMP-9 尤其重要,研

表 1 MMP-9、TIMP-3 和 MVD 在 45 例骨巨细胞瘤的表达
Table 1 Expression of MMP-9, TIMP-3, and MVD in 45 giant cell tumors of bone

Group	n	MVD	MMP-9[n/(%)]			TIMP-3[n/(%)]			
		$\bar{x} \pm s$	+	++	+++	-	+	++	+++
Non-recurrence	26	21 ± 6 ¹⁾	7(26.92)	15(57.69)	4(15.38) ²⁾	2(7.69)	11(42.31)	8(30.77)	5(19.23) ³⁾
Recurrence	19	42 ± 10	0(0)	4(21.05)	15(78.95)	2(10.53)	7(36.84)	5(26.32)	5(26.32)

1) $t = -8.14$, $P = 0.000$; 2) $\chi^2 = 18.250$, $P = 0.000$; 3) $\chi^2 = 0.059$, $P = 0.809$

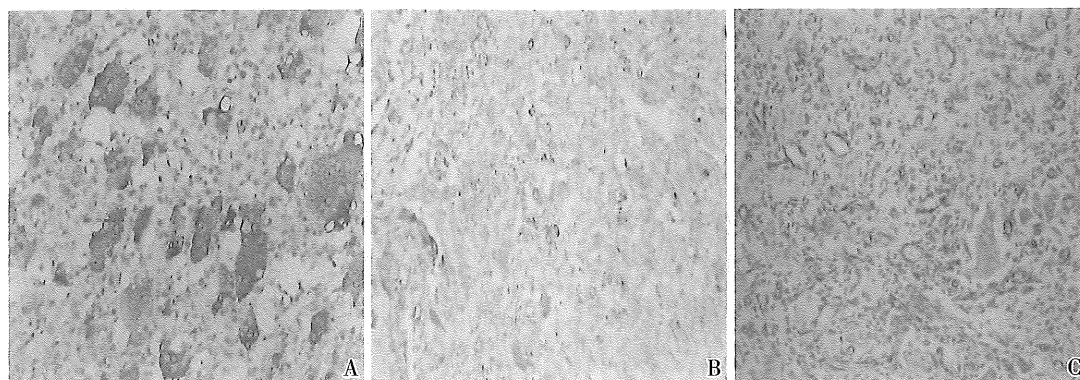


图 1 骨巨细胞瘤组织免疫组化染色

Fig.1 Immunohistochemical stain of giant cell tumor of bone

1A: Positive expression of MMP-9 was localized in the cytoplasm of most multinucleated giant cells (MGCs) and some mononuclear stromal cells (MSCs). (SP, ×200); 1B: Positive expression of TIMP-3 was distributed in the cytoplasm and membrane of most MSCs, MGCs. (SP, ×100); 1C: Monoclonal antibody against CD31 shows the micro vessels in GCT. (SP, ×200)

究证实 MMP-9 高表达与多种肿瘤的恶性行为和预后有关^[1,7-8]。它属于 IV 型胶原酶(明胶酶),在肿瘤浸润转移过程中,不仅可以发挥蛋白水解酶的作用,降解以 III 型、IV 型胶原为主要成分的细胞外基质和血管壁基膜,它对肿瘤血管的形成也是必不可少的。研究^[9]显示 MMP 除了直接参与组织破坏外,还是人体内重要的血管生成诱导和调控因子,它能诱导血管内皮细胞生长因子 VEGF 的生成,进而刺激内皮细胞合成蛋白酶,促进了内皮细胞的增殖和迁移。因此,可以认为 MMP 是介导肿瘤恶性生物过程的重要介质。本研究结果也显示预后不良的复发病例 MMP-9 表达和肿瘤血管形成均高于非复发病例,而且 MMP-9 表达与 MVD 正相关。

TIMP-3 是 TIMP 家族的新成员^[10],与其它成员的不同之处在于它是一种非可溶性蛋白,与细胞外基质成分紧密结合,在局部发挥作用,因此其对 MMP 活性的抑制及其它生物学功能的发挥比其它 TIMP 更有针对性。TIMP-3 可与 MMP-9 按 1:1 的比例形成特异性复合物,阻断后者活性的发挥。在肿瘤血管形成方面,TIMP-3 可通过对 MMP-9

的抑制而阻止细胞外基质的降解和 MMP 的促血管生成作用,进而抑制内皮细胞的增殖和迁移,同时 TIMP-3 还能通过抑制微血管内皮细胞对生长因子的反应而抑制肿瘤血管形成,并通过调节细胞增殖、促进细胞凋亡,进而抑制肿瘤的发展^[11]。

通过对肺癌、前列腺癌、黑色素瘤等几组肿瘤细胞系的研究显示瘤细胞产生 MMP-9 的能力与其侵袭转移能力密切相关,通过选择性抑制 MMP-9 基因表达或增强 TIMP-2、TIMP-3 基因表达均可在一定程度上达到抑制肿瘤侵袭转移的目的^[2]。吕国丽等^[12]发现骨巨细胞瘤 TIMP-3 基因启动子的甲基化导致的 TIMP-3 表达水平下调促进了肿瘤的恶性进程。但也有研究表明 TIMP-3 在部分肿瘤中表达并非降低,而是升高^[1]。而本项研究中 TIMP-3 的表达在骨巨细胞瘤复发组与非复发组之间无明显差异。由于 TIMPs 主要是作为 MMPs 的抑制因子而发挥作用的,因此研究 MMPs/TIMPs 的相对水平与肿瘤预后的关系可能更为重要。本实验结果也显示,虽然 TIMP-3 在复发组无明显升高,但是复发病例 MMP-9 高表达,两者表达的失衡,可能是肿瘤细胞局部浸润生长、肿瘤血管形成

并导致复发的主要原因之一。

综上所述,骨巨细胞瘤是一种潜在恶性和高复发性的骨肿瘤,我们建议对该肿瘤进行金属蛋白酶 MMP-9 和 MVD 检测,其表达的增高可能对预示复发有一定作用。

参考文献:

- [1] 朱宏刚,张 军,傅 斌,等. MMP-2、MMP-9 及 TIMP-3 在膀胱移行细胞瘤中的表达及临床意义 [J]. 现代泌尿外科杂志,2007,12(1):15-17.
- [2] 方伟岗,李红梅,孔灵玲,等. 肿瘤侵袭转移过程中基质机制金属蛋白酶作用机制系列研究 [J]. 北京大学学报:医学版,2003,35(4):441-443.
- [3] Fukata S, Inoue K, Kamada M, et al. Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ specific metastasis of renal cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(5):931-942.
- [4] Jaffe HL, Lichtenstein L, Portis RB. Giant cell tumor of bone: its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment [J]. *Arch Pathol*, 1940, 30:993-1031.
- [5] Szendroi M. Giant-cell tumor of bone [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2004, 86(1):5-12.
- [6] 王 林,董书堃,文剑明,等. 端粒酶及蛋白亚单位在

骨巨红细胞瘤中的表达 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3S):125-126.

- [7] 李劲松,李海刚,蔡华雄,等. 明胶酶在舌鳞癌发生、演进中的表达和意义 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(1):109-115.
- [8] Komatsu K, Nakanishi Y, Nemoto N, et al. Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2004, 21(3):105-112.
- [9] Declerck YA, Mercurio AM, Stack MS, et al. Proteases, extra cellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(4):1131-1139.
- [10] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *CircRes*, 2003, 92(8):827-839.
- [11] Yabushita H, Shimazu M, Noguchi M, et al. Vascular endothelial growth factor activating matrix metalloproteinases in ascitic fluid during peritoneal dissemination of ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(1):89-95.
- [12] 吕国丽,文剑明,曾 弘,等. 骨巨细胞瘤 TIMP-3 启动子甲基化的研究 [J]. *临床与实验病理学*, 2003, 19(1):15-18.

(编辑 徐 杰)

(上接第 73 页 from page 73)

2007, 6(1):54-65.

- [9] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9):2003-2007.
- [10] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers [J]. *PNAS*, 2004, 101(9):2399-3004.
- [11] Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia [J]. *PNAS*, 2002, 99(24):15524-15529.
- [12] Cimmino A, Ferracin M, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. *PNAS*, 2005, 102(39):13944-13949.

- [13] Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues [J]. *PNAS*, 2004, 101(26):9740-9744.
- [14] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16):7065-7070.
- [15] Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells [J]. *Biol Chem*, 2008, 283(2):1026-1033.
- [16] Chen CF, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20):e179.

(编辑 徐 杰)