

# 骨肉瘤中 MMP-2 和 PCNA 表达的意义及相关关系

云文科<sup>1</sup> 赵子会<sup>2</sup> 王瑞铎<sup>2</sup> 任希存<sup>1</sup> 邵斌<sup>3</sup> ( <sup>1</sup>武警内蒙古总队医院外二科,呼和浩特 010030; <sup>2</sup>武警内蒙古总队后勤部卫生处,呼和浩特 010010; <sup>3</sup>内蒙古医学院第一附属医院骨科,呼和浩特 010020)

**摘要** 目的 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、增殖细胞核抗原(PCNA)在骨肉瘤中表达的意义和临床价值。方法 采用免疫组织化学 S-P 法测取 32 例骨肉瘤、20 例骨软骨瘤标本的 MMP-2、PCNA 表达值,以 SPSS10.0 软件行数据处理,分析其表达的意义和相关性。**结果** MMP-2 阳性表达率在骨肉瘤为 81.25%,在骨软骨瘤为 0,两者差异显著( $P < 0.01$ );在骨肉瘤中,MMP-2 阳性表达组的软组织浸润或转移比率为 73.08%,明显高于阴性表达组( $P < 0.05$ );PCNA 的阳性表达率在骨肉瘤中为 84.38%,在骨软骨瘤中为 10.00%,两者差异显著( $P < 0.01$ );在骨肉瘤中,MMP-2 与 PCNA 呈正相关( $r_s = +0.703, P < 0.05$ )。**结论** MMP-2 的高表达可能与骨肉瘤浸润转移密切相关,PCNA 可作为骨肉瘤增殖的一个标志。

**关键词** 骨肉瘤 基质金属蛋白酶-2 增殖细胞核抗原 免疫组化

**Significance and relationships of expressions of MMP-2 and PCNA in osteosarcoma**

YUN Wenke, ZHAO Zihui, WANG Ruiduo, REN Xichun, and SHAO Bin. Department of Orthopaedic Surgery, Inner Mongolian Autonomous Region Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Forces, Huhhot 010030 China

**Abstract** **Objective** To study the significance and clinical value of expressions of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in osteosarcoma. **Methods** MMP-2 and PCNA were detected for the specimens of 32 osteosarcomas and 20 osteochondromas by immunohistochemical S-P method and SPSS 10.0 software was used to analyze the significance and relationships of their expressions. **Results** The positive rate of MMP-2 was 81.25 percent in osteosarcoma group and zero in osteochondroma group with a significant difference( $P < 0.01$ ). In osteosarcoma, the rate of invasion or metastasis was 73.08% in MMP-2 positive group, significantly higher than 16.67% in negatively expressed group( $P < 0.05$ ). The positive expression rate of PCNA was 84.38% in osteosarcoma group and 10.00% in osteochondroma group, also with a significant difference( $P < 0.01$ ). In osteosarcoma group, the expression of MMP-2 was positively correlated with the expression of PCNA ( $r_s = +0.703, P < 0.05$ ). **Conclusion** High expression of MMP-2 is closely correlated with invasion and metastasis of osteosarcoma. PCNA is one of markers of osteosarcoma proliferation.

**Keys words** Osteosarcoma Matrix metalloproteinase-2 Proliferating cell nuclear antigen Immunohistochemistry

肿瘤细胞分泌的基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)是降解细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)和破坏基底膜引起肿瘤转移和浸润的主要酶类之一。国内外仅有极少数文献报道,骨肉瘤细胞可分泌 MMP-2,但未见骨肉瘤 MMP-2 的表达率及表达意义的相关报道。增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种细胞周期调节蛋白,其合成水平反映了细胞增殖率及 DNA 合成率。本实验通过免疫组化 S-P 法对 MMP-2 和 PCNA 在骨肉瘤中的表达进行检测,分析二者在骨肉瘤中的表达意义和相关性,探讨它们在骨肉瘤浸润转移中可能的作用以及对预后评价的临床价值。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料 采用内蒙古医学院病理解剖教研

室 1984~2000 年存档石蜡包埋骨肉瘤组织标本 32 例,切片厚度 4  $\mu\text{m}$ ,其中男 21 例,女 11 例,年龄 7~30 岁,平均 14 岁。其中有浸润或转移者 20 例,无浸润或转移者 12 例。根据临床资料,按 Enneking 外科分期分为,I:7 例;II a:8 例;II b:11 例;III:6 例。采用 20 例骨软骨瘤石蜡包埋组织作为对照组,来源同前。切片厚度 4  $\mu\text{m}$ ,其中男 14 例,女 6 例,年龄 10~35 岁,平均 19 岁。所取标本的病例经临床、X 线片、病理确诊。

**1.2 主要试剂** 鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体(即用型),鼠抗人 PCNA 单克隆抗体(即用型),S-P 超敏试剂盒(即用型),DAB 显色试剂盒。所有主要试剂均购自福州迈新(MAXIM)公司。

**1.3 实验方法** 采用免疫组化 S-P 染色法标准实验流程。每个染色流程均设有对照作为质量控制标准。

### 1.4 结果判断

**1.4.1 MMP-2、PCNA 的阳性染色部位** MMP-2 阳性染色在胞浆中呈棕黄色颗粒,PCNA 阳性染色

作者简介:云文科,男,1966 年出生。硕士研究生学历,主治医师。主要从事创伤与骨肿瘤的临床工作。

在胞核中呈棕黄色颗粒。

1.4.2 综合染色强度和阳性细胞数进行分级 每张切片随机选取 10 个高倍视野,取平均染色阳性细胞数,计算阳性细胞百分率。按着色程度分为:基本未着色,为 0 分;着色浅,为 1 分;中度着色,为 2 分;强阳性着色,为 3 分。同时,计阳性细胞百分率:染色细胞数 ≤ 5% 为 0 分;6% ~ 25% 为 1 分;26% ~ 50% 为 2 分; > 51% 为 3 分。将每张切片着色程度与着色细胞百分率得分各自相乘后,为其最后得分。0 ~ 1 分为阴性(-),2 ~ 3 分为弱阳性(+);4 ~ 5 分为中度阳性(2+); ≥ 6 分为强阳性(3+)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析,两样本差别检验用  $\chi^2$  检验,两变量相关关系用 Spearman 等级相关检验,Enneking 外科分期资料用秩和检验。

## 2 结果

从图 1 ~ 3 中看出,MMP-2 着色于骨肉瘤的胞浆和胞膜,PCNA 着色于骨肉瘤和骨软骨瘤的胞核,呈棕黄色颗粒。

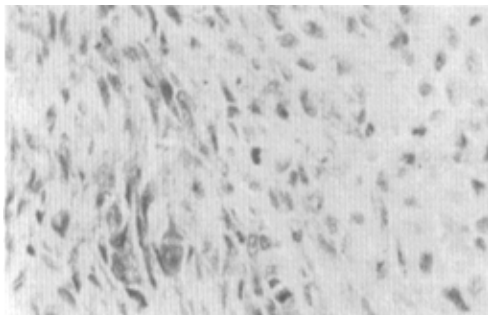


图 1 MMP-2 在骨肉瘤中的阳性表达 SP 染色 × 400

实验结果见表 1,MMP-2 和 PCNA 在骨肉瘤与骨软骨瘤中的阳性表达率均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

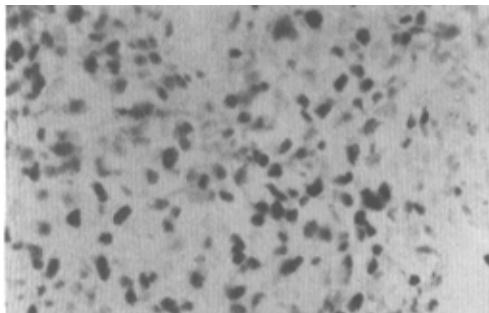


图 2 PCNA 在骨肉瘤中的阳性表达 SP 染色 × 400

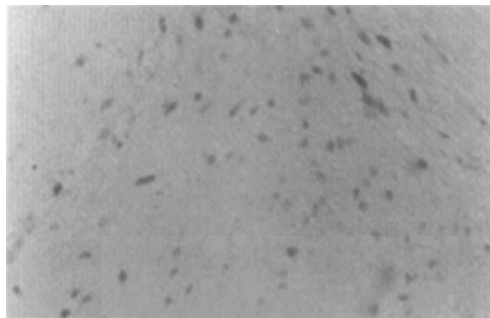


图 3 PCNA 在骨软骨瘤的阳性表达 SP 染色 × 400

表 1 MMP-2 和 PCNA 在骨肉瘤与骨软骨瘤中的表达

组别	n	MMP-2 表达		PCNA 表达	
		-	+ 表达率(%)	-	+ 表达率(%)
骨肉瘤	32	6	26 81.25 <sup>①</sup>	5	27 84.38 <sup>①</sup>
骨软骨瘤	20	20	0 0	18	2 10.00

注:与骨软骨瘤组比较,①  $P < 0.01$

将 MMP-2 和 PCNA 在骨肉瘤中的表达率作相关性检验。MMP-2 与 PCNA 的表达呈正相关 ( $P < 0.05$ ),相关系数  $r_s = +0.703$ ,MMP-2 阳性表达强度越高,PCNA 阳性表达也越高。

骨肉瘤浸润软组织或转移的比率在 MMP-2 阳性表达组为 73.08%,在阴性表达组为 16.67%,二者之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),MMP-2 与骨肉瘤浸润软组织或转移有密切关系。

由表 2 可见,在骨肉瘤临床 Enneking 外科分期中,MMP-2 阳性表达在各 Enneking 外科分期中有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),结合表中数据可以看出,随着 Enneking 外科分期的增高,MMP-2 阳性表达强度也呈增强趋势。

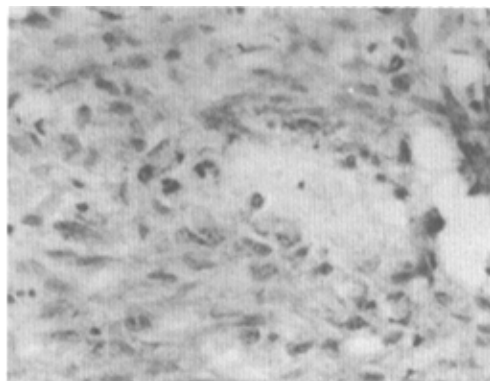


图 4 MMP-2 在骨肉瘤中呈灶状表达 SP 染色 × 400

由图 4 可见,MMP-2 在骨肉瘤中的阳性表达有时呈灶状分布,明显强于周围区域,且大多数位于骨肉瘤边缘或浸润活跃处。图 5 显示,在骨肉瘤血

管周围可见大量 MMP-2 阳性表达的骨肉瘤细胞积聚,且表达强度明显高于周围区域。

表 2 MMP-2 在骨肉瘤 Enneking 外科分期中的表达

Enneking 外科分期	n	MMP-2 表达			
		-	+	2+	3+
I	7	4	2	1	0
II a	8	2	2	3	1
II b	11	0	4	4	3
III	6	0	0	4	2

注: H 值 = 11.12,  $P < 0.05$

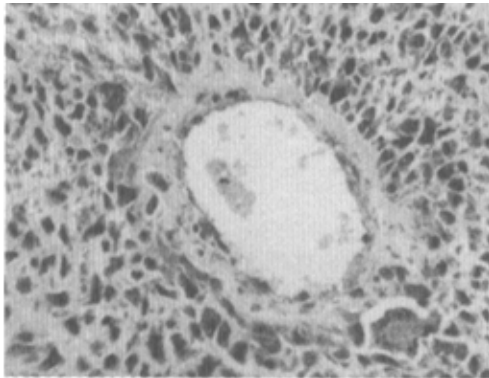


图 5 MMP-2 表达阳性细胞在骨肉瘤血管周围积聚  
SP 染色  $\times 400$

### 3 讨论

3.1 MMP-2 在骨肉瘤中的表达 在肿瘤浸润转移过程中,肿瘤细胞穿越细胞外基质(ECM)和基底膜这些自然屏障时,必须依赖于能降解 ECM 和基底膜成分的酶的分泌<sup>[1]</sup>。基质金属蛋白酶(MMPs)是肿瘤细胞分泌的主要基质降解酶之一,它能降解所有 ECM 成分,其中 MMP-2 在肿瘤介导的 ECM 降解中起关键作用<sup>[2]</sup>。MMP-2 能降解 IV 型胶原,促进肿瘤血管形成和影响细胞间黏附作用。华成舸等<sup>[3]</sup>研究显示,骨和软组织恶性肿瘤与良性肿瘤中的 MMP-2 表达率有显著性差异。刘光等<sup>[4]</sup>的实验证明,人骨肉瘤细胞株可表达一定量的 MMP-2。本研究结果表明, MMP-2 在骨肉瘤中的表达率明显高于在骨软骨瘤中的表达率( $P < 0.01$ )。MMP-2 在骨肉瘤中呈高表达状态,这可能与它具有高度浸润转移的生物学行为特性有关。

3.2 MMP-2 与骨肉瘤侵袭力的关系 MMP-2 能切断 IV 型胶原,而后者是基底膜的支架,破坏了小血管、淋巴管的基底膜,则会引起血行和淋巴转移。同时, MMP-2 还能降解 ECM,造成骨肉瘤的浸润。Koshikawa 等<sup>[5]</sup>发现,肿瘤细胞接触基底膜时,由 MMPs 引发了肿瘤细胞转移。Miyake 等<sup>[6]</sup>实验显示,

表达 MMP-2 的肿瘤细胞株穿越重组基底膜的数量远远大于对照组,说明 MMP-2 降解基底膜能力与细胞浸润转移能力密切相关。Hua 等<sup>[7]</sup>发现特异性抑制 MMP-9 基因表达后,骨肉瘤细胞株依然表达成瘤性,但不再发生浸润和转移。本研究显示,骨肉瘤中 MMP-2 阳性表达者,肿瘤浸润软组织或转移的比率明显高于 MMP-2 阴性表达者( $P < 0.05$ ),提示 MMP-2 与骨肉瘤的侵袭能力呈正相关。

3.3 MMP-2 与骨肉瘤的生物学行为的关系 本研究发现骨肉瘤中 MMP-2 阳性细胞有时呈不均匀灶状分布,分布于肿瘤边缘和浸润活跃处,提示具有浸润潜能的骨肉瘤细胞,多位于骨肉瘤周边。在骨肉瘤内血管处可见 MMP-2 阳性表达骨肉瘤细胞聚集,且表达强度明显高于周围区域。有资料显示,在骨肉瘤血管壁常可见基底膜连续性中断或基底膜阳性反应带变浅、变窄,而这些相应部位或邻近处常可见聚集的 MMP-2 阳性肿瘤细胞。由此推测,这些灶状分布和血管周围聚集的 MMP-2 阳性肿瘤细胞可能与骨肉瘤细胞浸润和穿越血管壁的生物学行为有关。

3.4 MMP-2 与骨肉瘤外科分期的关系 Zuckers 等<sup>[8]</sup>发现,通过转染 MMP-2 诱导因子,促使肿瘤中 MMP-2 生成增多,结果肿瘤的浸润转移能力明显增强。本实验结果显示, MMP-2 在骨肉瘤 Enneking 外科分期各期中的阳性表达率有显著差异( $P < 0.05$ ),同时结合实验结果,可以看出随着 Enneking 外科分期的增高, MMP-2 的阳性表达强度也增高,说明 MMP-2 表达的增强,有可能促进了骨肉瘤的浸润转移。

3.5 PCNA 与骨肉瘤增殖 PCNA 在增殖细胞周期中含量变化与 DNA 复制时相变化一致,较高的 PCNA 表达率反映了高水平的细胞增殖状态。杨雯等<sup>[9]</sup>发现 PCNA 高表达与骨肉瘤组织中微血管密度(MVD)呈正相关,骨肉瘤 MVD 与骨肉瘤的生长、转移和复发有密切关系。本研究结果表明, PCNA 在骨肉瘤和骨软骨瘤中的表达率有显著性差异( $P < 0.01$ )。说明 PCNA 与骨肉瘤细胞的增殖状态密切相关,其高表达是骨肉瘤增殖活跃的重要指标。

3.6 MMP-2 与 PCNA 的相关性 本实验结果表明,在骨肉瘤中 MMP-2 和 PCNA 的表达呈正相关( $P < 0.05$ ),提示骨肉瘤细胞增殖能力越强, MMP-2 表达越多,其降解 ECM 的能力也越强,侵袭力越大。说明生长迅速的骨肉瘤其早期转移和浸润的可能性更大,预后更差。

## 4 参考文献

- [1] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999, 43(1): 42-51
- [2] 封国生, 谭毓铨. 基质金属蛋白酶及 IV 型胶原在胃癌中的表达及意义. *中华外科杂志*, 2000, 38(9): 775-777
- [3] 华成柯, 温玉明, 王昌美等. 骨和软组织肿瘤中明胶酶的定位与活性分析. *华西医科大学报*, 2002, 31(1): 82-85
- [4] 刘光, 高奉浚, 王东等. 干扰素对骨肉瘤细胞 MMP-2 和 Cath-D 表达的调节作用. *中华骨科杂志*, 1999, 19(7): 434-436
- [5] Koshikawa N, Giannevi G, Ciruli V *et al*. Role of cell surface metalloproteinases MT-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *Cell Biol*, 2000, 148(3): 615-624
- [6] Miyake H, Hara I, Gohji K *et al*. Relative expression of matrix metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in mouse renal cell carcinoma cells regulates their metastatic potential. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(10): 2824-2829
- [7] Hua J, Muschel RJ. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res*, 1996, 56(2): 5279-5288
- [8] Zuckers, Hymowitz M, Rollo EE *et al*. Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase induce. *Am J Pathol*, 2001, 156(6): 1921-1928
- [9] 杨雯, 克丽别娜·吐尔逊, 张巍等. 骨肉瘤、骨巨细胞瘤的 P53 蛋白、PCNA 表达与肿瘤组织微血管密度的关系. *新疆医科大学学报*, 2000, 23(1): 44-46  
(2004-01-28 收稿, 责任编辑 尤伟杰)

## 武警部队 35 岁以上人群血浆纤维蛋白原水平及其与脑血管病关系的调查

刘绪宏<sup>1</sup> 马维亚<sup>2</sup> 张辉<sup>1</sup> 钱华珍<sup>1</sup> 束慧清<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 武警江苏总队医院内一科, 扬州 225003; <sup>2</sup> 武警总医院神经内科, 北京 100039)

**摘要** 目的 了解武警部队 35 岁以上人群血浆纤维蛋白原(Fg)水平, 进一步阐述其与脑卒中及相关危险因素之间的关系。方法 在武警部队 12 个省 24 站点共 231 308 人中, 以整体抽样的方法, 随机抽取 35 岁以上的个体进行卒中相关因素的基线调查, 包括脑卒中史、高血压病史、糖尿病史及吸烟史等, 同时检测血浆 Fg、空腹血糖、血脂、血压、红细胞压积、血小板等, 分析 Fg 与脑卒中及其危险因素之间的关系。结果 武警部队 35 岁以上人群平均血浆 Fg 水平为  $(2.83 \pm 0.67)$  g/L, 较国内常人水平稍低。缺血性脑卒中患者血浆 Fg 水平则明显偏高。Fg 增高与缺血性卒中, 年龄、高血压、高胆固醇、红细胞压积及血小板水平密切相关。结论 武警部队 35 岁以上人群血浆 Fg 总体水平较国内常人水平稍低。Fg 增高与缺血性脑卒中及其相关危险因素关系密切。

**关键词** 纤维蛋白原 脑卒中 危险因素

**Investigation of serum fibrinogen levels in Armed Police Forces personnel aged 35 years and over, and relationships between fibrinogen levels and stroke and associated risk factors**

LIU Xuhong, MA Weiya, ZHANG Hui, QIAN Huazhen, and SHU Huiqing. First Department of Internal Medicine Jiangsu Provincial Corps Hospital, Yangzhou 225003, China

**Abstract Objective** To investigate the serum fibrinogen (Fg) levels in Armed Police Forces (APF) personnel aged 35 years and over, and the relationships between Fg levels and stroke and associated risk factors. **Methods** A cohort study was carried out in 2 731 subjects randomly sampled from APF. A baseline survey was conducted, including history of stroke, and hypertension, and stroke-associated diseases, and laboratory profile, such as Fg, glucose, triglycerides, cholesterol, and hematocrit. The relationships between Fg and stroke and associated risk factors were analyzed. **Results** Serum Fg level in APF personnel was  $(2.83 \pm 0.67)$  g/L, slightly lower than that in general population in China. Fg was increased in patients with cerebral infarction. Increase in Fg level was also closely associated with hypertension, age, hypercholesterolemia, hematocrit, platelet, and smoking. **Conclusion** The serum Fg level in APF personnel aged 35 year and over is slightly lower than that in general population in China. Fg level correlates closely with ischemic stroke and associated risk factors.

基金项目: 武警部队立项课题(WKH2001082)

**Key words** Fibrinogen Stroke Risk factors

作者简介: 刘绪宏, 男, 1961 年出生。大专学历, 副主任医师, 科主任。主要从事神经内科临床工作。