

FZD10 在骨肉瘤组织中的表达及临床意义 *

宁 刚 高 杰 杨彤涛 文艳华 杨连甲 范清宇 马保安[△]

(第四军医大学唐都医院骨科 西安 陕西 710038)

摘要 目的 探讨骨肉瘤组织中 FZD10 的表达及其临床意义。方法 用 S-P 免疫组织化学染色法对 69 例骨肉瘤及 35 例骨软骨瘤中 FZD10 蛋白的表达进行检测,并对其与骨肉瘤临床病理及预后的关系进行统计学分析。结果: FZD10 在骨肉瘤和骨软骨瘤组织中阳性表达率分别为 89.9%和 5.7% $P < 0.01$ 。FZD10 蛋白表达与 Enneking 分期和 Price 分级呈正相关,与 WHO 分型和预后相关。结论:骨肉瘤 FZD10 蛋白的表达与肿瘤恶性程度密切相关,对骨肉瘤诊断和预后评估具有重要价值。

关键词 骨肉瘤;FZD10;免疫组织化学

中图分类号 R738 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)08-1472-04

Expression and clinical significance of FZD10 in osteosarcoma*

NING Gang, GAO Jie, YANG Tong-tao, WEN Yan-hua, YANG Lian-jia, FAN Qing-yu, MA Bao-an

(IDepartment of Orthopedic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of FZD10 in osteosarcoma and their clinical significance. **Methods:** The expression of FZD10 protein was detected by the SP immunohistochemical method in 69 cases of osteosarcoma and 35 cases of osteochondroma. Its relationship to osteosarcoma clinical pathology and prognosis was analyzed statistically. **Results:** The positive rates of FZD10 were 89.9% and 5.7% in osteosarcoma and osteochondroma, respectively ($P < 0.01$). The expression of FZD10 was correlated to Enneking grade, Price grade, WHO classification and prognosis. **Conclusion:** The expression of FZD10 protein is closely correlated to malignant degree. It may serve as a valuable marker for diagnosis and an indicator to predict the prognosis of osteosarcoma.

Key Words: osteosarcoma; FZD10; immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R738 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)08-1472-04

骨肉瘤是原发于骨组织的恶性肿瘤,青少年多发,其特点是侵袭力强、转移早且转移率高,85%~90%的患者就诊时均存在不同程度的转移灶,常导致临床治疗困难和患者死亡^[1-5]。然而,对其确切的发病机制至今尚未明了。本实验室建立了两株来自同一母系但具有不同转移潜能的骨肉瘤细胞株 F4 和 F5M2^[6],并利用全基因组芯片对其进行了表达谱的分析,发现了数十个差异表达的基因,为骨肉瘤转移的分子水平研究提供了新的基础。其中 FZD10 就是基因芯片筛选出的差异基因中的一个,它在高转移潜能骨肉瘤细胞系 F5M2 中的表达明显高于低转移潜能骨肉瘤细胞系 F4 中的表达,提示其可能与骨肉瘤转移存在正相关的关系。

FZD10 基因是 Frizzled 基因家族的一员,它在胚胎性四肢发育、神经管与中枢神经系统的发育中都有表达^[7],与滑膜肉瘤的发生与发展存在密切相关^[8],在结肠直肠癌中有高表达^[9]。本实验应用免疫组织化学方法检测 FZD10 在良性骨肿瘤、低恶性骨肉瘤和高危骨肉瘤中的表达,探讨其与骨肉瘤发生发展的关系及其临床诊断和判断预后的价值。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81072194)。

作者简介:宁刚,男,硕士,主要从事骨肿瘤的基础和临床研究工作。

Tel: 029-847777591 E-mail: ng0918@hotmail.com

[△]通讯作者:马保安,男,硕士生导师,教授,主要从事骨肿瘤临床与基础、创伤骨科及人工关节的临床与基础研究工作。

Tel: 029-847777433 E-mail: gukamba@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2011-01-21 接受日期:2011-02-17)

1.1 标本来源

收集第四军医大学附属第二医院 2000~2009 年收治的骨肉瘤标本的存档腊块 69 例。男 43 例,女 26 例。平均年龄 17.3 (7~48)岁,中位年龄 19 岁。临床分期按 Enneking 外科分期法,组织学分级参照 Price 分级法,组织学分型参照 Dahlin 标准和 1993 年 WHO 分型。全部 69 例均有随访结果,随访时间为 6 月~2 年(平均 1.2 年)。另外选取同期收治的骨软骨瘤 35 例作为对照组。男 21 例,女 14 例。平均年龄 20.6 (9~43)岁,中位年龄 22 岁。

1.2 免疫组化染色

所有新鲜标本均经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,连续 4μm 厚度切片。所有病例均经临床、病理、X 线确诊。采用链酶抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)方法检测,SP 试剂盒购自上海基因科技有限公司,鼠抗人 FZD10 单克隆抗体(工作浓度 1:150),购自美国 Abcam 公司。用已知阳性切片做阳性对照,PBS 取代一抗作阴性对照。

1.3 结果判定标准

每张切片均由 2 位病理科医生分别随机观察具有代表性的 10 个高倍视野($\times 400$)。FZD10 阳性染色者在细胞膜和(或)

浆有棕黄色颗粒沉着。根据染色程度及染色细胞百分率进行分析评分^[10]。基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色适中者为 2 分,着色深者为 3 分,着色细胞占计数细胞百分率≤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得分与着色细胞百分率得分相乘为其最后得分,0~1 分为阴性(-) 2~3 分为弱阳性(+) ≥ 4 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件包进行统计,骨肉瘤组织中 FZD10 表达情况,采用 Chisquare 和 Fisher’s 确切概率法进行 χ^2 检验。

按上述评分从 0~9 分以中位数将 69 例标本分为高表达与低表达两组,统计两组骨肉瘤存活期,并行 Log-rank 检验。

2 结果

2.1 FZD10 在骨肉瘤组织和骨软骨瘤组织中的表达

FZD10 的表达部位在细胞膜和(或)胞浆,染成棕色为阳性(图 1- 图 6)。在骨肉瘤和骨软骨瘤组织中阳性表达率分别为 89.9%和 5.7%($P<0.01$)。FZD10 阳性表达率在骨肉瘤组织中明显高于良性骨软骨瘤组织,见表 1

表 1 骨肉瘤及骨软骨瘤组织 FZD10 蛋白的表达
Tab1 FZD10 expression in osteosarcoma and osteochondroma tissues [n(%)]

组织分类 (Tissue Typing)	n	FZD10 表达程度 (Expression of FZD10)			P
		-	++	+++	
骨肉瘤 (Osteosarcoma)	69	7(10.1)	23(33.3)	39(56.6)	
骨软骨瘤 (Osteochondroma)	35	33(94.3)	2(5.7)	0(0)	<0.01

2.2 FZD10 的表达与临床病理的关系

FZD10 表达与骨肉瘤患者的性别、年龄、Dahlin 组织分型未见明显关系($P>0.05$),但与 Enneking 分期、Price 分级以及

WHO 分型密切相关,即随着 Enneking 分期和 Price 分级级别的增高,FZD10 表达也在增高 ($P<0.01$);WHO 分型中高分化型的 FZD10 表达明显低于其他类型($P<0.05$),见表 2。

表 2 骨肉瘤组织 FZD10 蛋白表达与临床病理的关系
Tab 2 The relationship between the expression of FZD10 and clinicopathological data in osteosarcoma

项目 (Items)	阴性 (Negative) (-)	弱阳性(Weak positive) (+)	强阳性 (Strong positive) (+++)	P
性别				
男(Male)	5	18	24	
女(Female)	2	5	15	>0.05
平均年龄(岁) (Average Age)	32.3± 16.5	17.4± 7.8	14.8± 7.5	>0.05
Enneking 分期 (Enneking Staging)				
期	4	2	1	
a 期	2	5	9	
b 期	1	9	14	
期	0	7	15	<0.01
Dahlin 组织分型 (Dahlin Typing)				
骨母细胞型 (Osteoblast)	2	10	16	
软骨母细胞型 (Chondroblast)	1	5	9	
纤维母细胞型 (Fibroblast)	3	6	12	
其他 (Others)	1	2	2	>0.05
Price 分级 (Price Gradation)				
	4	7	5	
	2	7	12	
	1	9	22	<0.01
WHO 分型 (WHO Typing)				
普通型 (Popular Type)	2	9	17	
高分化型 (Well-differentiated Type)	3	7	2	
毛细血管扩张型 (Angioectasis Type)	1	3	11	
圆形细胞型 (Round-cells Type)	1	4	9	<0.05

2.3 FZD10 的表达与预后的关系

FZD10 在骨肉瘤中表达打分的中位数为 3.82 ,依此将骨肉瘤分为 FZD10 高表达组和低表达组(见表 3) ,行 Log-rank 检

验，结果表明 FZD10 高表达组骨肉瘤患者的生存期较低表达组显著缩短($P<0.05$)。

表 3 骨肉瘤组织 FZD10 蛋白表达与随访结果的关系

Tab 3 The relationship between the expression of FZD10 and follow-up results in osteosarcoma

随访时间(月) (Follow-up period)	起始人数 (Initial Amount)		期间死亡人数 (Deaths of period)	
	高表达组 (High)	低表达组 (Low)	高表达组 (High)	低表达组 (Low)
0~6	43	26	6	2
7~12	37	24	13	4
13~18	24	20	9	6
19~24	15	14	5	4

图 1- 图 6 为 FZD10 在骨肉瘤和骨软骨瘤中的的表达(S-P×400)

Picture 1- Picture 6 FZD10 expression in osteosarcoma and osteochondroma tissues(S-P×400)

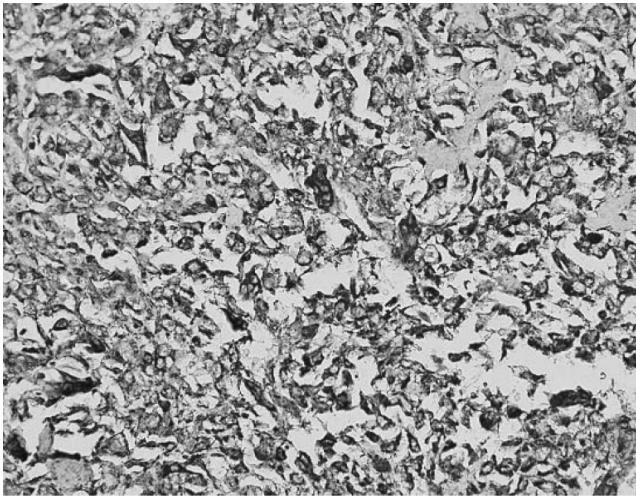


图 1 骨肉瘤 FZD10 表达强阳性 1 号(S-P× 400)

Picture 1 The high expression of FZD10 in osteosarcoma number 1 (S-P×400)

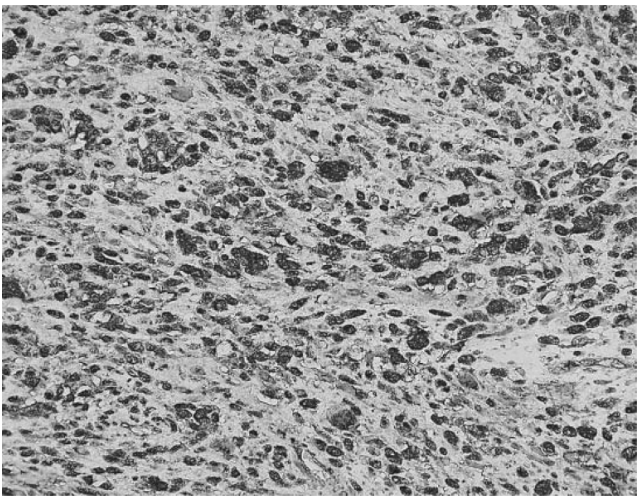


图 3 骨肉瘤 FZD10 表达强阳性 3 号(S-P× 400)

Picture 3 The high expression of FZD10 in osteosarcoma number 3 (S-P×400)

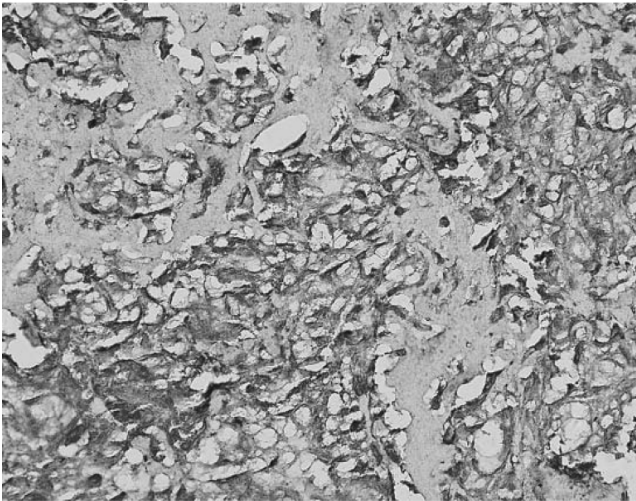


图 2 骨肉瘤 FZD10 表达强阳性 2 号(S-P×400)

Picture 2 The high expression of FZD10 in osteosarcoma number 2 (S-P×400)

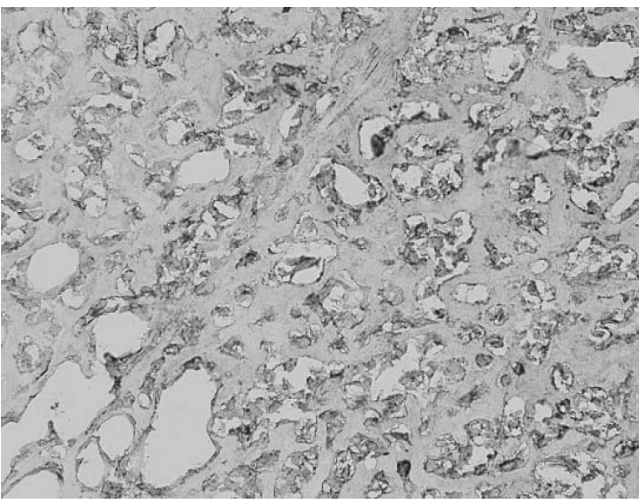


图 4 骨肉瘤 FZD10 表达弱阳性(S-P×400)

Picture 4 The low expression of FZD10 in osteosarcoma (S-P×400)

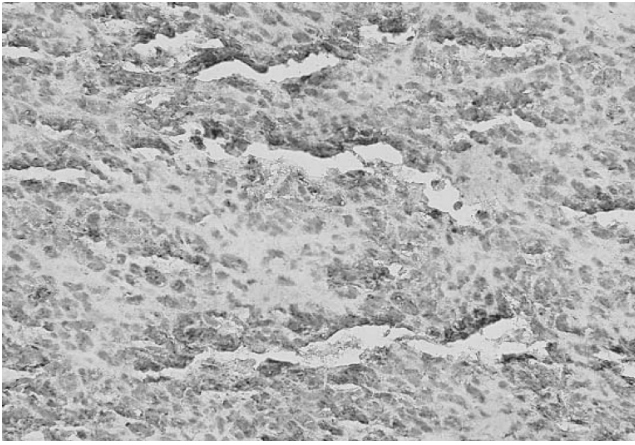


图5 骨肉瘤 FZD10 表达阴性(S-P×400)

Picture 5 The negative expression of FZD10 in osteosarcoma (S-P×400)

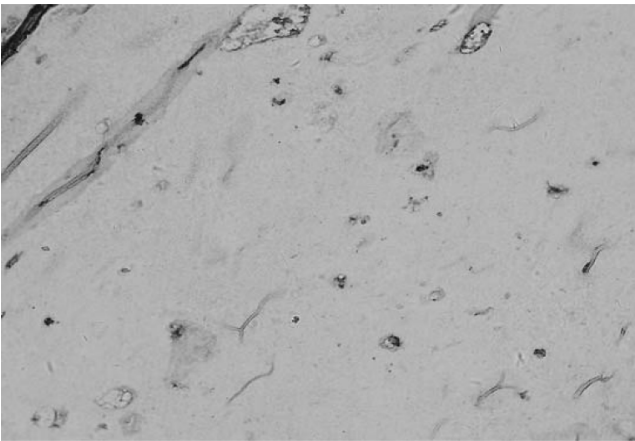


图6 骨软骨瘤 FZD10 表达阴性(S-P×400)

Picture 6 The negative expression of FZD10 in osteochondroma (S-P×400)

3 讨论

Frizzles 基因家族的成员编码了一个 7 次跨细胞膜的跨膜蛋白,而这个蛋白则是 Wnt 信号通路的组成成员,并在其中发挥了重要的作用^[11]。Wnt 途径的异常活化在细胞癌变、肿瘤发生及肿瘤侵袭性过程中具有重要作用,当基因本身或通路其他任一成员因素发生变化使其不正常活化时,均有可能引起肿瘤的发生,其中 FZD 受体的异常表达可见于多种恶性肿瘤^[12-13],而通过抑制这一通路,可能对肿瘤的治疗取得新的突破^[14]。目前有多篇文献表明,通过竞争性抑制 FZD 与 Wnt 蛋白结合,从而抑制肿瘤形成和发展并促进细胞凋亡^[15-16]。因此我们认为可能 FZD10 通过 Wnt 通路对肿瘤的发生、发展、转移等一系列生物学行为起一定作用。

目前,尚未见到有关于 FZD10 在骨肿瘤组织中的表达及其相关临床意义的研究。因此,本实验中运用免疫组织化学法检测了 FZD10 蛋白在骨肉瘤组织及骨软骨瘤组织中的表达情况。结果表明,骨肉瘤组织中 FZD10 蛋白表达强度明显增加,且随着肿瘤临床分期和病理分级的增高, FZD10 的表达也增强,这说明 FZD10 的表达与肿瘤的转移和恶性程度有关。WHO 分型中高分化型的 FZD10 的表达明显低于其他几型,这也从另一侧面说明肿瘤恶性程度高者 FZD10 的表达也高。而 FZD10 表达与骨肉瘤患者的性别、年龄、组织分型未见明显关系,这说明不同年龄、性别、组织类型的骨肉瘤都可以表达 FZD10。同时对随访资料的研究结果表明 FZD10 高表达组骨肉

瘤预后较差,提示 FZD10 可能是一项评估骨肉瘤病人预后的有价值的指标。

但是,本研究只对 69 例骨肉瘤及 35 例骨软骨瘤进行了 FZD10 的表达分析,样本数量及良性骨肿瘤种类有限,所以还需要在更大量的临床样本中进行验证。同时, FZD10 作为一个新的与骨肉瘤发生发展相关的基因,其具体作用机制也还有待于我们的进一步研究。

参考文献(References)

- [1] BACCI G, LARI S. Current treatment of high grade osteosarcoma of the extremity: review[J]. J Chemother, 2001, 13(3):235-243
- [2] FERGUSON W S, GOORIN A M. Current treatment of osteosarcoma [J]. Cancer Invest, 2001, 19(3):292-315
- [3] WITTING J C, BICKELS J, PRIEBAT D, et al. Osteosarcoma: a multi-disciplinary approach to diagnosis and treatment [J]. Am Fam Physician, 2002, 65(6):1123-1132
- [4] 刘吉兵, 李敏, 原晓红, 等. 骨肉瘤组织中 VEGF 和 BMP22 表达及微血管密度与转移关系的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(10): 776-778
- [5] Link M P, Goorin A M, Miser A W, et al. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity[J]. N Engl J Med, 1986, 314(25):1600-1606
- [6] Xiang Chen, Tong-Tao Yang, Wei Wang, et al. Establishment and characterization of human osteosarcoma cell lines with different pulmonary metastatic potentials. Cytotechnology, 2009; 11 (29): published on line
- [7] Y. Yan, Y. Li, C. Hu, X. Gu, J. Liu, Y. A. Hu, Y. Yang, Y. Wei and C. Zhao. Expression of Frizzled10 in mouse central nervous system[J]. Gene Expr Patterns 2009, 9 (3) :173-7
- [8] Nagayama, S, Fukukawa, C, Katagiri, T, et al. Therapeutic potential of antibodies against FZD10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas [J]. Oncogene, 2005, 24 (41):6201-12
- [9] Nagayama, S, Yamada, E, et al. Inverse correlation of the up-regulation of FZD10 expression and the activation of beta-catenin in synchronous colorectal tumors[J]. Cancer Sci, 2009, 100(3) : 405-12
- [10] Kawasaki H, Altieri D C, Lu C D, et al. Inhibition of apoptosis by Survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1998, 58(22):5071-5074
- [11] Rulifson E J, Wu C H, Nusse R. Pathway specificity by the bifunctional receptor Frizzled is determined by affinity for wingless [J]. Mol Cell, 2000, 6 :1172126
- [12] To KF, et al. Alterations of frizzled(FzE3) and secreted frizzled related protein(hsFRP) expression in gastric cancer[J]. Life Sci, 2001, 70(4): 483
- [13] Winn RA, et al. Antitumorigenic effect of Wnt 7a and Fzd9 in non-small cell lung cancer cells is mediated through ERK-5-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. J Biol Chem, 2006, 281(37):26943
- [14] Dihlmann S, von Knebel Doeberitz M. WNT/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics[J]. Int J Cancer, 2005, 113(4):515-524
- [15] Lee AY, He B, You L, et al. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. Oncogene, 2004, 23(39):6672-6676
- [16] Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. Nat. Genet, 2004, 36(4):417-422