

原发性骨肉瘤中 γ -synuclein 的表达

徐卫东^{1*}, 赵建国¹, 殷 辉¹, 焦 钢¹, 王晓燕²

(1. 第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433; 2. 长海医院实验诊断科)

[摘要] **目的:**检测 γ -synuclein 在原发性骨肉瘤组织中的表达水平, 探讨 γ -synuclein 对原发性骨肉瘤的诊断价值。 **方法:**选取我院骨科 2004 年 1 月至 2005 年 12 月收治的 31 例原发性骨肉瘤患者及 10 例良性骨肿瘤患者的病理组织, 用组织芯片技术和免疫组织化学方法检测 γ -synuclein 的表达水平。 **结果:**全部 31 例原发性骨肉瘤病例仅有 1 例女性患者无 γ -synuclein 的表达, 其余患者均有 γ -synuclein 的表达或高表达, 阳性率为 96.8%; 10 例良性骨肿瘤组织中均未见 γ -synuclein 表达。 γ -Synuclein 表达的阳性率与年龄、性别无关。 **结论:** γ -Synuclein 可能是原发性骨肉瘤的肿瘤标志物, 在原发性骨肉瘤的诊断、分型和预后中有积极的临床指导意义。

[关键词] 骨肉瘤; γ -synuclein 组织阵列分析; 免疫组织化学

[中图分类号] R 738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0427-03

Expression of γ -synuclein in primary osteosarcoma

XU Wei-dong^{1*}, ZHAO Jian-guo¹, YIN Hui¹, JIAO Gang¹, WANG Xiao-yan² (1. Department of Orthopaedics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To detect the expression of γ -synuclein in primary osteosarcoma, so as to assess the diagnostic value of γ -synuclein in diagnosis of primary osteosarcoma. **Methods:** The expression of γ -synuclein in 31 primary osteosarcoma specimens (from 31 patients in our department from Jan. 2004 to Dec. 2005) and 10 benign bone tumor specimens were investigated by tissue array and immunohistochemical method. **Results:** The expression or overexpression of γ -synuclein was found in 30 of the 31 osteosarcoma specimens; only one female patient's specimen was negative of it, with a positive rate of 96.8%. All the benign bone tumor specimens had negative expression of γ -synuclein. The positive rate of γ -synuclein was not correlated with age or gender of patients. **Conclusion:** The γ -synuclein may serve as a marker for osteosarcoma and may be valuable in diagnosis, typing, and prognosis of primary osteosarcoma.

[KEY WORDS] osteosarcoma; γ -synuclein tissue array analysis; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 427-429]

γ -Synuclein 是最早发现于外周神经系统的一种小分子可溶性蛋白质。近年来发现它在癌组织特别是乳腺癌和卵巢癌组织中有高表达, 可促进乳腺癌和卵巢癌细胞的浸润、转移, 并与该类肿瘤对化疗药物的耐受性有关。研究表明 γ -synuclein 可上调基质金属蛋白酶(MMPs)的表达, 而 MMPs 在原发性骨肉瘤中亦存在高表达, 是与细胞外基质重构过程有关的一个关键酶, 可能促进癌细胞的浸润、转移^[1], 据此推测 γ -synuclein 可能表达于原发性骨肉瘤(osteosarcoma)组织并与原发性骨肉瘤的局部侵袭和转移相关。为此本研究采用组织芯片技术及免疫组化方法, 检测了 γ -synuclein 在原发性骨肉瘤组织中的表达, 初步探讨其可否作为原发性骨肉瘤肿瘤标志物。

1 材料和方法

1.1 病理组织来源 随机选取我院骨科 2004 年 1

月至 2005 年 12 月收治的 31 例原发性骨肉瘤患者的手术切除标本作为实验组。其中男性患者 19 例, 女性患者 12 例; 年龄 10~40 岁, 中位年龄 22 岁。31 例标本中骨肉瘤 27 例, 软骨瘤样型骨肉瘤 2 例, 小细胞型骨肉瘤 2 例。另以同期收治的 10 例良性骨肿瘤患者的病理组织作为对照组。

1.2 材料及试剂 原发性骨肉瘤组织芯片(陕西超英生物技术有限公司), γ -synuclein 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), 免疫组织化学超敏检测试剂盒(福州迈新生物技术公司)。

1.3 组织芯片制作 首先选择所需病例存档蜡块, 根据 H-E 染色切片仔细进行形态学观察, 确定具有代表性的病变部位(避开出血坏死及纤维化区)并标记, 然后参照 Kononen 等^[2]建立的方法应用组织微

[作者简介] 徐卫东, 博士, 副教授、副主任医师, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: wdxu@smmu.edu.cn

阵列仪(Beecher Instruments, USA)制备组织芯片。方法简述如下:应用组织微阵列仪在一个新的空白蜡块(45 mm×25 mm×15 mm)中打孔(孔径2 mm,长4 mm),然后在选取的骨肉瘤及良性骨肉瘤组织蜡块中的标记部位穿刺取直径2 mm,准确放入空白蜡块小孔内,依次按序操作,直至将所有组织标本全部种植于空白蜡块中并加以记录,4 μm连续切片,敷贴于1%多聚赖氨酸处理的载玻片上。

1.4 组织芯片免疫组化染色 60℃烤片30 min,常规脱蜡水化。3% H₂O₂-甲醇封闭内源性过氧化物酶,室温10 min,蒸馏水洗3次。以0.01 mol/L CB(pH6.0)高压修复抗原,冷却至室温,PBS洗5 min。滴加正常兔血清封闭液,室温12 min,甩去多余液体。滴加一抗,4℃过夜。0.1% Tween-PBS洗10 min×2次。滴加生物素标记兔抗山羊 IgG 二抗工作液,37℃孵育12 min,PBS洗5 min×3次。滴加HRP标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育12 min,PBS洗5 min×3次。DAB显色,蒸馏水洗终止显色。苏木精复染、水洗、分化后充分水洗返蓝,常规脱水透明,中性树胶封片。

1.5 结果判定 以组织芯片免疫组化染色后细胞质或细胞核中出现黄色颗粒作为阳性判断标准。依其染色程度深浅依次分为:阴性(-),可疑阳性(±),弱阳性(+),阳性(++),强阳性(+++)。

1.6 统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件,组间比较采用χ²检验。

2 结果

2.1 γ-Synuclein在原发性骨肉瘤与良性骨肿瘤中的表达差异 γ-Synuclein免疫组化染色阳性的病理标本可见细胞质及细胞核中出现黄色颗粒(图1)。在全部31例骨肉瘤病理组织中仅有1例女性患者无表达,其余30例患者均有γ-synuclein不同程度的表达,阳性率为96.8%。其中10例为强阳性表达(32.3%),12例较高表达(38.7%),3例阳性表达(9.7%),5例可疑阳性(16.1%)。在良性骨肿瘤10例对照组中,8例病理组织未见γ-synuclein的表达,2例为可疑阳性表达。γ-Synuclein在原发性骨肿瘤与良性骨肿瘤中表达差异具有统计学意义(P<0.005,表1)。

2.2 γ-Synuclein在不同年龄组原发性骨肉瘤患者病理组织中的表达差异 年龄<30岁组患者共21例,其中γ-synuclein阴性表达1例,可疑阳性3例,弱阳性1例,阳性8例,强阳性8例。年龄≥30岁组患者10例,其中可疑阳性2例,弱阳性2例,阳性4

例,强阳性2例。两组间差异无统计学意义(χ²=2.93,P>0.05)。

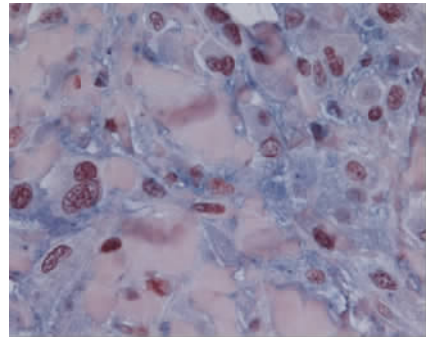


图1 γ-Synuclein在骨肉瘤中的阳性表达
Fig 1 Expression of γ-synuclein in osteosarcoma(IHC,×400)

表1 γ-Synuclein在原发性骨肿瘤与良性骨肿瘤中表达差异

Tab 1 Difference in expression of γ-synuclein between osteosarcoma and benign bone tumor

Group	n	-	±	+	++	+++
Osteosarcoma	31	1	5	3	12	10
Benign bone tumor	10	8	2	0	0	0

χ²=28.43,P<0.005

2.3 γ-Synuclein在不同性别原发性骨肉瘤患者病理组织中表达的差异 男性骨肉瘤患者共19例,其中可疑阳性4例,弱阳性2例,阳性5例,强阳性8例;女性骨肉瘤患者共12例,其中阴性、可疑阳性、弱阳性各1例,阳性7例,强阳性2例。不同性别组间差异无统计学意义(χ²=5.78,P>0.05)。

2.4 γ-Synuclein在不同类型原发性骨肉瘤病理组织中表达的差异 骨肉瘤共27例,其中阴性1例,可疑阳性3例,弱阳性3例,阳性11例,强阳性9例;软骨瘤样型骨肉瘤2例,阳性、强阳性各1例;小细胞型骨肉瘤2例皆为可疑阳性。

3 讨论

骨肉瘤是一种起源于间叶组织的由肉瘤性成骨细胞及其产生的骨样组织和骨小梁构成的高度恶性骨肿瘤。其好发于男性,多见于30岁以下青少年(占73.3%),大多数好发于膝关节周围(股骨、胫骨),是最常见的骨恶性肿瘤。患者预后差,即使行截肢手术,术后5年生存率仅为10%~20%。骨肉瘤的早期症状不明显,某些病例如小细胞性骨肉瘤等即使通过病理学检查也很难确诊,患者在确诊时

约 80%~90% 已存在微小的远处转移灶,术后 6 个月内便可发生转移,这是导致治疗失败的主要原因。因此积极寻找特异性表达于骨肉瘤病理组织中的分子作为标志物,并建立敏感的检测方法,对于骨肉瘤的早期普查、早期诊断,以使骨肉瘤患者得到及时有效的治疗,从而提高骨肉瘤患者的术后生存率无疑具有重要的意义^[3]。

自 1997 年起, synuclein 蛋白家族因其诱导神经细胞变性坏死及与乳腺肿瘤恶性病变明显相关而逐渐引起重视^[4]。该家族中的 γ -synuclein 是最早发现于外周神经系统的一种小分子可溶性蛋白质,在脑、视网膜亦有高表达。近年来发现该基因在癌组织特别是乳腺癌和卵巢癌组织中有高表达^[5],并与乳腺癌和卵巢癌细胞的浸润、转移以及该类肿瘤对化疗药物的耐受性有关,而在相应的正常组织中则没有 γ -synuclein 的表达。

γ -Synuclein 可藉其第一内含子中的两个 AP1 位点^[6]及该基因中的 CpG 岛的去甲基化^[7]而促进该基因的表达。其高表达可促进 MMPs 的表达,而后者可使 AP-1 磷酸化后活化,进而使得 MMP2 和 MMP9 的表达也增加^[8]。 γ -Synuclein 还可通过与细胞周期的检验点(checkpoint)激酶 BubR1^[9]结合,促进癌细胞的转移和浸润,并通过抑制 JNK 途径抑制化疗药物长春新碱和紫杉醇诱导的癌细胞凋亡^[10]。阻断内源性 γ -synuclein 的表达则可显著减弱培养的乳腺癌细胞的生长。值得注意的是, γ -synuclein 在雌激素存在的情况下可增强雌激素受体 alpha 的基因转录激活作用,这种转录激活可被雌激素拮抗剂所阻断^[11]。

目前, γ -synuclein 与肿瘤相关性的研究主要集中在乳腺癌和卵巢癌,而 γ -synuclein 在骨肉瘤组织中的表达情况尚无报道。本项研究检测到 γ -synuclein 在原发性骨肉瘤组织中的高表达,而在良性骨肿瘤中未发现 γ -synuclein 的表达,提示 γ -synuclein 在原发性骨肉瘤中具有高度表达和高度特异性。

本研究还发现 γ -synuclein 在不同年龄、性别骨肉瘤患者组织中表达无明显统计学差异,提示 γ -synuclein 的表达不受年龄和性别因素的影响,具有较高的稳定性和可重复性,以 γ -synuclein 作为骨肉瘤的标志物应用于骨肉瘤的诊断便于临床操作和推广应用。

据报道^[12] γ -synuclein 在高分化和预后好的肿瘤中的表达相对较高。本研究也发现 γ -synuclein 在皮质旁骨肉瘤的表达高于小细胞型骨肉瘤,而皮

质旁骨肉瘤相对于小细胞型骨肉瘤分化程度高、预后好,提示 γ -synuclein 的表达与骨肉瘤的分化程度及预后亦存在相关性,但本研究的样本量较少,尚需进一步实验的验证。

综上所述, γ -synuclein 在原发性骨肉瘤组织中具有高度的表达和高度的特异性,不受年龄及性别因素的影响,因此可能成为一种理想的骨肉瘤标记物,应用于骨肉瘤的诊断。

[参考文献]

- [1] Felix M, Guyot M C, Isler M, et al. Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF- κ B in human osteosarcoma[J]. Clin Sci (Lond), 2006, 110: 645-654.
- [2] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for highthroughput molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med, 1998, 4: 844-847.
- [3] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2005: 18-21.
- [4] Ninkina N N, Bukhman V L. Synucleins: to have or not to have [J]. Genetika, 2000, 36: 1487-1492.
- [5] Wu K J, Weng Z Y, Tao Q H, et al. Stage-specific expression of breast cancer specific gene gamma-synuclein [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12: 920-925.
- [6] Lu A, Zhang F, Gupta A, et al. Blockade of AP1 transactivation abrogates the abnormal expression of breast cancer-specific gene 1 in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 31364-31372.
- [7] Czekierdowski A, Czekierdowska S, Wielgos M, et al. The role of CpG islands hypomethylation and abnormal expression of neuronal protein synuclein-gamma (SNCG) in ovarian cancer [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2006, 27: 381-386.
- [8] Surgucheva I G, Sivak J M, Fini M E, et al. Effect of γ -synuclein overexpression on matrix metalloproteinases in retinoblastoma Y79 cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 410: 167-176.
- [9] Inaba S, Li C, Shi Y E, et al. Synuclein gamma inhibits the mitotic checkpoint function and promotes chromosomal instability of breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 94: 25-35.
- [10] Jiang Y F, Liu Y L, Lu A P, et al. Stimulation of estrogen receptor signaling by synuclein [J]. Cancer Res, 2003, 63: 3899-3903.
- [11] Olivera P, Perez E, Ortega A, et al. Estrogen receptor expression in giant cell tumors of the bone [J]. Hum Pathol, 2002, 33: 165-169.
- [12] Wu K, Quan Z, Weng Z, et al. Expression of neuronal protein synuclein gamma gene as a novel marker for breast cancer prognosis [J]. Breast Cancer Res Treat, 2007, 101: 259-267.

[收稿日期] 2006-08-26

[修回日期] 2007-02-29

[本文编辑] 曹静