

胎盘生长因子在多发性骨髓瘤活检 中的表达及临床意义

王丽彬¹ 孟繁军¹ 刘珊珊¹ 李田兰¹ 颜学中¹ 毛春霞¹ 肖淑欣¹ 高燕¹ 冯献启¹

[摘要] 目的:研究胎盘生长因子(PLGF)及骨髓微血管密度(MVD)在多发性骨髓瘤(MM)骨髓活检组织中的表达情况及临床意义。**方法:**应用免疫组织化学染色方法检测 40 例 MM 患者及 10 例正常者骨髓活检组织 PLGF 及 MVD 的表达情况,电脑采集图像并使用 Image Pro Plus6.0 软件分析结果。**结果:**与正常者骨髓活检组织比较,MM 患者骨髓活检组织的 PLGF 及 MVD 表达显著升高(均 $P < 0.05$);在 MM 患者中低血红蛋白者的 MVD 表达较高血红蛋白者显著升高($P < 0.05$),但在 MM 分期、分型、溶骨性损害、年龄之间均差异无统计学意义。**结论:**PLGF 及 MVD 在骨髓瘤较正常骨髓组织表达明显增多,骨髓血管增多在 MM 的发病中起到重要作用。

[关键词] 胎盘生长因子;骨髓瘤;免疫组织化学

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.03.011

[中图分类号] R733.3 **[文献标志码]** A

The expression and clinical significance of placental growth factor in bone marrow specimens of multiple myeloma

WANG Libin MENG Fanjun LIU Shanshan LI Tianlan YAN Xueshen
MAO Chunxia XIAO Shuxin GAO Yan FENG Xianqi

(Department of Hematology, the Affiliate Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266003, China)

Corresponding author: MENG Fanjun, E-mail: mengfanjun318@126.com

Abstract Objective: To explore the expression and clinical significance of the placental growth factor (PLGF) and microvessel density (MVD) in multiple myeloma (MM). **Method:** We analyzed the expression of PLGF and MVD in bone marrow specimens of 40 patients who diagnosed as MM and 10 normal controls, which were disposed with immunohistochemical method, the pictures were obtained by computer and analyzed by software. **Result:** In comparison with normal bone marrow specimens, the expression of PLGF and MVD in bone marrow from MM patients was significant increased ($P < 0.05$). MVD showed a higher level in the patients whose hemoglobin was lower than 85 g/L ($P < 0.05$), but there was no significant difference of MVD among different age, osteolytic lesions, type of monoclonal protein and clinical stage. **Conclusion:** PLGF and MVD are increased in MM, and bone marrow angiogenesis plays a notable role in MM.

Key words placental growth factor; myeloma; immunohistochemical

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是来源于骨髓浆细胞的单克隆性恶性血液肿瘤,常伴有骨折、骨痛、肾功能衰竭、末梢神经麻木等其他多种并发症,严重影响患者生活质量。Folkman(1971)首先证实了血管生成在肿瘤的生长中发挥重要作用,之后血管生成在恶性肿瘤中的作用受到越来越多的关注。Vacca 等(1995)研究发现,骨髓微血管密度(MVD)与 MM 的预后具有相关性。血管内皮生长因子(VEGF)家族具有促进血管生长的作用,胎盘生长因子(PLGF)作为 VEGF 家族的一员,在体内实验中外均已证明其具有促进血管生长的生物活性^[1-2]。我们在之前的实验中发现,PLGF 在

MM 患者的骨髓液及外周血中表达高于正常对照者^[3],但目前还未有文献报道 PLGF 在 MM 骨髓活检中的表达情况及其与 MVD 的关系。为进一步研究 PLGF、MVD 在 MM 发病过程中的作用及二者与 MM 分期、分型、年龄、血红蛋白含量、是否伴有溶骨性损害等临床特征之间的关系,我们应用 CD34 抗体标记骨髓组织切片的血管内皮细胞测定 MVD,应用 PLGF 单克隆抗体测定 PLGF 在骨髓活检的表达,并进行统计学分析,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 样本的采集及分组

选取 2014-01—2015-08 在我院初治的 MM 患者 40 例为实验组(MM 组),营养性贫血患者 10 例为对照组。所有的 MM 患者均符合 MM 诊断标

¹ 青岛大学附属医院血液内科(山东青岛,266003)

通信作者:孟繁军, E-mail: mengfanjun318@126.com

准^[4],根据国际分期系统 ISS 进行分期。伴有慢性疾病的患者,如高血压、糖尿病,曾经或目前合并其他恶性肿瘤,怀孕以及感染者均排除在外。取 MM 组及对照组的髂后上棘骨髓活检标本进行石蜡包埋并切片。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗人 PLGF 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),CD34 单克隆抗体(福州迈新生物技术开发有限公司),SP 免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),显微镜(LEICA DM750)。

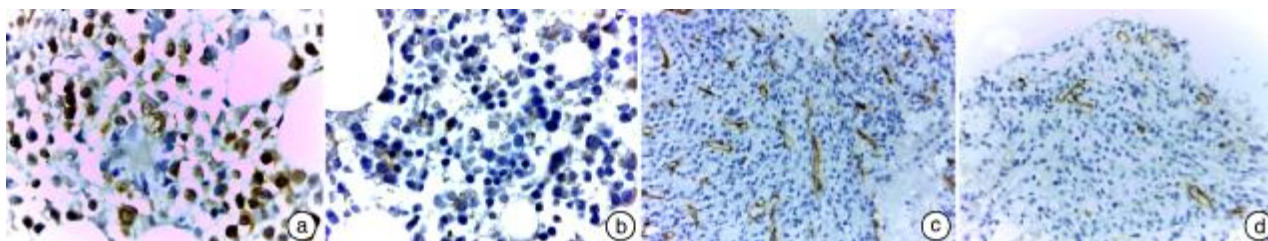
1.3 免疫组织化学染色

实验步骤按试剂盒说明书进行。高压修复缓冲液为枸橼酸钠缓冲液(pH 6.0),兔抗人 PLGF 抗

体工作浓度 1 : 500,CD34 抗体为即用型抗体。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。DAB 显色,封片,镜检。

1.4 PLGF 及 MVD 表达判定

PLGF 的表达以胞质/胞核内出现棕黄色颗粒为阳性(图 1a),高倍镜($\times 400$)下随机选取 5 个视野(图 1a、b)并计算光密度值,结果用平均光密度表示。以棕黄色内皮细胞及内皮细胞簇为微血管区,排除大血管及骨膜血管,低倍镜($\times 100$)下寻找“热点”区并于高倍镜($\times 400$)下选取 5 个视野(图 1c、d),测定血管数量并取平均值作为每例标本的 MVD。图像数据应用图像分析软件 Image Pro Plus6.0 分析得出。



a:MM 骨髓标本切片中 PLGF 高表达($\times 1000$);b:正常骨髓标本切片中 PLGF 低表达($\times 1000$);c:MM 骨髓活检切片 CD34 染色,MVD 高($\times 400$);d:正常骨髓活检切片 CD34 染色,MVD 低($\times 400$)。

图 1 PLGF 及 MVD 表达判定

1.5 统计学处理

采取 SPSS17.0 分析数据。定量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较应用独立样本 *t* 检验,3 组及以上比较应用 One-Way ANOVA 检验分析;Pearson 相关分析评价 MVD 与 PLGF 的相关性。检验水准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 MM 组与对照组 PLGF 及 MVD 的表达比较

与对照组比较,MM 组骨髓活检组织的 PLGF 及 MVD 表达显著升高[(0.219 4 $\pm$ 0.035 0):(0.129 0 $\pm$ 0.059 7),(24.0 $\pm$ 10.4):(9.8 $\pm$ 3.3),均 $P < 0.05$]。

2.2 MM 组内不同临床病理特征与 PLGF 及 MVD 的关系

PLGF 在 MM 组内不同年龄、血红蛋白值、是否伴有溶骨性损害、MM 分期、分型之间均差异无统计学意义;而 MVD 在血红蛋白 < 85 g/L 及 ≥ 85 g/L 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),在年龄、是否伴有溶骨性损害、MM 分期、分型之间均差异无统计学意义。详见表 1。

2.3 PLGF 与 MVD 的相关性分析

对 MM 组的 PLGF 与 MVD 进行相关性分析, $r = 0.79$,二者呈显著正相关。

表 1 MM 组内不同临床病理特征与 PLGF 及 MVD 的关系

病理特征	例数	MVD	PLGF
年龄			
<65 岁	26	25.3 $\pm$ 11.4	0.225 4 $\pm$ 0.036 5
≥ 65 岁	14	21.5 $\pm$ 8.1	0.208 1 $\pm$ 0.030 1
血红蛋白			
≥ 85 g/L	18	20.2 $\pm$ 5.3	0.207 2 $\pm$ 0.022 8
< 85 g/L	22	27.1 $\pm$ 12.5 ¹⁾	0.229 2 $\pm$ 0.040 4
骨损害			
无	7	22.0 $\pm$ 5.8	0.207 3 $\pm$ 0.024 3
有	33	22.4 $\pm$ 11.1	0.221 9 $\pm$ 0.036 7
分期			
1	6	26.2 $\pm$ 12.5	0.023 6 $\pm$ 0.096 3
2	7	21.9 $\pm$ 7.1	0.207 3 $\pm$ 0.031 8
3	27	24.05 $\pm$ 10.4	0.221 8 $\pm$ 0.038 1
分型			
IgG	18	22.6 $\pm$ 8.7	0.214 6 $\pm$ 0.030 6
IgA	6	31.1 $\pm$ 11.3	0.247 0 $\pm$ 0.045 6
轻链型	13	24.3 $\pm$ 12.0	0.218 1 $\pm$ 0.035 3
其他	3	16.9 $\pm$ 5.6	0.219 4 $\pm$ 0.035 0

与血红蛋白 ≥ 85 g/L 比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

血管生成在生理情况下受多种血管生长因子的调节,在病理情况下刺激血管生长的因子表达增

加,使血管生成过度并伴有组织学特征改变^[5]。血管生成是肿瘤生长的必须条件,抗血管生成使肿瘤处于营养匮乏状态,能在一定程度上控制肿瘤的生长及扩散,成为未来肿瘤靶向治疗的重要手段。贝伐他汀等抗血管生成药物已经通过FDA批准并应用于临床肺癌、乳腺癌等肿瘤的治疗^[6]。

MM为血液系统恶性肿瘤,硼替佐米等多种新型药物的出现及自体造血干细胞移植使MM预后得到明显改善,对近30年的患者进行统计分析,总生存期呈升高趋势^[7],但耐药及复发仍是MM治疗中亟待解决的难题。本实验中MM的MVD较正常者明显升高,有研究显示MM患者治疗后MVD较治疗前有所减少,抗血管治疗可能在MM的治疗上有一定疗效^[8]。本研究结果提示MVD与MM各分期之间无明显差异,需更大样本量及进一步的跟踪随访阐明MVD与MM预后的关系。目前尚未有抗血管生成的靶向药物应用于MM的治疗。

PLGF为VEGF家族中的一员,选择性结合VEGFR-1,Nrp1,Nrp2等受体,在肝癌、膀胱癌、黑色素瘤、前列腺癌等多种肿瘤患者体内检测到PLGF较正常组织有所升高^[9],并在肿瘤发生、发展中抑制免疫系统功能^[10]。Fischer等(2007)证实了抗PLGF仅抑制肿瘤血管的生成,对正常血管的生长不造成影响。近年来人源化的PLGF单克隆抗体TB-403已进入临床试验,受试者显示出较抗VEGF更好的耐受性^[11],这些特点使抗PLGF药物的应用相对于其他抗血管生成药物具有很大优势。目前一部分研究认为PLGF直接或间接与VEGFR-1结合促进血管生成,因此抗PLGF抗体具有抗肿瘤作用^[12],另有研究认为抗PLGF并不能抑制肿瘤血管生长^[13]。为检测PLGF在MM的表达情况,我们将MM与正常骨髓进行对比,结果显示PLGF的表达量在MM明显增高并差异具有统计学意义,与之前在外周血中的表达结果一致^[3],提示PLGF在MM的发展中起到一定作用。对PLGF与MVD进行相关性分析发现,二者呈正相关,PLGF可以促进血管生长,为抗PLGF药物在MM中的应用提供了一定的理论基础。

综上所述,PLGF及MVD在MM中表达升高,在MM的病程进展中发挥作用,但本实验标本量有限,需要更大标本量的统计分析及循证医学证据阐述PLGF在MM疾病进程中的作用及其临床

价值。

参考文献

- [1] De Falco S. The discovery of placenta growth factor and its biological activity[J]. *Exp Mol Med*, 2012, 44: 1-9.
- [2] Dewerchin M, Carmeliet P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2: a011056.
- [3] 张彦, 孟繁军, 颜学申, 等. 胎盘生长因子在多发性骨髓瘤中的表达及临床意义[J]. *临床血液学杂志*, 2015, 28(5): 416-418.
- [4] 张之南, 沈悌. 血液病诊断和疗效标准[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1998: 373-380.
- [5] Gacche RN, Meshram RJ. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846: 161-179.
- [6] Tarallo V, De Falco S. The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 64: 185-189.
- [7] Rios-Tamayo R, Sánchez MJ, Puerta JM, et al. Trends in survival of multiple myeloma: a thirty-year population-based study in a single institution[J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39: 693-699.
- [8] Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Antiangiogenic therapeutic approaches in multiple myeloma[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12: 768-775.
- [9] Dewerchin M, Carmeliet P. Placental growth factor in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18: 1339-1354.
- [10] Voron T, Marcheteau E, Pernot S, et al. Control of immune response by pro-angiogenic factors[J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 70.
- [11] Martinsson-Niskanen T, Riisbro R, Larsson L, et al. Monoclonal antibody TB-403: a first-in-human, Phase I, double-blind, dose escalation study directed against placental growth factor in healthy male subjects[J]. *Clin Ther*, 2011, 33: 1142-1149.
- [12] Heindryckx F, Coulon S, Terrie E, et al. The placental growth factor as a target against hepatocellular carcinoma in a diethylnitrosamine-induced mouse model[J]. *J Hepatol*, 2013, 58: 319-328.
- [13] Bais C, Wu X, Yao J, et al. PlGF blockade does not inhibit angiogenesis during primary tumor growth[J]. *Cell*, 2010, 141: 166-177.

(收稿日期: 2015-12-14)