



· 论 著 ·

CCL2在骨肉瘤组织中的表达及其临床意义

巩润泽, 胡海燕

上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科, 上海 200233

[摘要] 背景与目的: 骨肉瘤是一种原发于骨组织的恶性肿瘤, 主要发病于青少年, 发生肺转移的患者预后较差。CC族趋化因子配体2 (CC chemokine ligand 2, CCL2) 及其受体CC族趋化因子受体2 (CC chemokine ligand receptor 2, CCR2), 与肿瘤的发生、发展密切相关。已经有学者证实, CCL2会促进乳腺癌的转移。探讨CCL2在骨肉瘤组织中的表达及其与预后的关系。**方法:** 应用GEXSCOPE®组织解离液将11例骨肉瘤组织解离成单细胞悬液, 应用美国10x Genomics公司试剂盒 (Chromium Single Cell Gene Expression Kit、Gel Bead Kit及Multiplex Kit) 建立单细胞RNA测序 (single cell RNA sequence, scRNA-seq) 文库, 分析样本CCL2表达。收集2017年1月—2019年12月在上海交通大学附属第六人民医院治疗的骨肉瘤患者90例的石蜡组织, 制备组织芯片, 采用免疫组织化学方法检测CCL2的表达并评分, 以所有结果的平均分为高表达和低表达的划分值, 采用COX回归分析其与临床病理学特征及预后的关系。**结果:** scRNA-seq单细胞检测结果显示, 与肿瘤原发灶相比, 骨肉瘤肺转移的患者CCL2表达更高。组织芯片分析可评价的80例患者中CCL2高表达患者33例, 低表达47例, CCL2的表达与临床分期和远处转移相关 ($P<0.05$), 与年龄、性别、肿瘤大小、病理学类型及肿瘤坏死率无明显相关性 ($P>0.05$)。**结论:** CCL2可能是判断骨肉瘤转移及预后的指标之一。

[关键词] CC族趋化因子配体2; 单细胞测序; 组织芯片; 骨肉瘤; 预后

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.06.003

中图分类号: R738.6 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)06-0455-05

Clinical significance of CCL2 expression in osteosarcoma tissue GONG Runze, HU Haiyan (Department of Oncology, the 6th People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

Correspondence to: HU Haiyan E-mail: xuri1104@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Osteosarcoma is a primary malignant tumor in bone tissue, mainly in adolescents. The prognosis of patients with lung metastasis is poor. CC chemokine ligand 2 (CCL2) and its receptor CC chemokine ligand receptor 2 (CCR2) may take part in tumor. Some scholars have confirmed that CCL2 can promote the metastasis process of breast cancer and worsen the prognosis. The main purpose of this article was to study the expression of CCL2 in osteosarcoma tissue and its relationship with prognosis. **Methods:** GEXSCOPE® tissue dissociation solution was used to dissociate 11 osteosarcoma samples into single cell suspension. The single cell sequencing library (scRNA-seq) was established by Chromium Single Cell Gene Expression Kit, Gel Bead Kit and Multiplex Kit from 10x Genomics Company. The expression of CCL2 was analyzed by scRNA-seq. The CCL2 level in lesions from tissue microarray was detected in 90 osteosarcoma patients, who were diagnosed and treated in the 6th People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University from January 2017 to December 2019, using immunohistochemical method. According to the median value of the CCL2 histochemical score, 90 patients were divided into two groups, high expression and low expression. COX regression was used to analyze the CCL2 level and its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of patient. **Results:** The results of scRNA-seq indicated that CCL2 expression was higher in lung metastasis lesions than in primary tissues. The immunohistochemical results displayed that of the 80 cases, 33 had high CCL2 expression level and 47 had low CCL2 expression level. CCL2 expression was associated with clinical stage and lung metastasis ($P<0.05$). There was no significant correlation among the CCL2 level and age, gender, tumor size, pathological type and tumor necrosis rate ($P>0.05$). **Conclusion:** CCL2 may be one of the poor indicators to predict the metastasis and prognosis of osteosarcoma.

[Key words] CC chemokine ligand 2; Single-cell RNA sequencing; Tissue microarray; Osteosarcoma; Prognosis

骨肉瘤是一种来自于骨的原发恶性肿瘤, 占骨原发肿瘤的56%, 发病率约为3/10⁵, 发病年

龄在10~14岁^[1-3], 临床表现以患处的疼痛、肿胀以及病理性骨折为主。大多数骨肉瘤患者只存

在单一病变, 最常见的是肢体骨肉瘤, 尤其是股骨远端, 其他常见部位依次是近侧胫骨的干骺端和肱骨近端、头颈部、脊柱及骨盆。值得注意的是, 近10%~20%的患者因转移灶被确诊。常见的部位是肺(85%), 其次是骨骼(8%~10%), 偶尔也有淋巴结^[4]。其余80%~90%的患者可考虑具有亚临床转移或微转移, 目前无法准确检测^[5]。手术联合大剂量、密集、多药序贯化疗为骨肉瘤标准治疗方法, 与单纯手术治疗相比, 患者的保肢率、生存率获得了大幅提高^[6]。然而, 伴有转移的患者生存率仍不容乐观^[7]。肿瘤微环境与肿瘤转移密切相关, CC族趋化因子配体2(CC chemokine ligand 2, CCL2)是一种与肿瘤密切相关的趋化因子, 通过识别CC族趋化因子受体2(CC chemokine ligand receptor 2, CCR2), 调节免疫细胞向肿瘤的迁移^[7]。转移相关的巨噬细胞在细胞表面表达高水平的CCR2。CCL2与CCR2的结合促进巨噬细胞招募到转移位点, 从而加速癌细胞的播散和扩张。CCL2可以增加乳腺癌、肠癌、肺癌等肿瘤的转移和侵袭性^[8-10]。本研究在单细胞测序分析骨肉瘤微环境时发现骨肉瘤细胞高表达CCL2, 进而通过组织芯片分析CCL2表达与预后的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集上海交通大学附属第六人民医院肿瘤内科2017年1月—2019年12月收治的11例骨肉瘤患者手术切除的骨肉瘤组织和80例(90例的组织芯片, 10例因有组织脱落未纳入分析)采用骨肉瘤原发灶石蜡包埋组织制备的组织芯片。本研究为回顾性分析, 经上海交通大学附属第六人民医院伦理委员会批准, 患者均签署知情同意书。

1.2 单细胞测序

应用GEXSCOPE[®]组织解离液[新格元(南京)生物科技有限公司]将11例骨肉瘤组织解离成单细胞悬液, 使用铬控制器(美国10x Genomics公司)将单个细胞封装成乳状液滴。使

用美国10x Genomics公司的试剂盒(Chromium Single Cell Gene Expression Kit、Gel Bead Kit及Multiplex Kit)并按照说明书构建单细胞RNA测序(single cell RNA sequence, scRNA-seq)文库。在Chromium[™]控制仪中将细胞分成乳状液中的凝胶珠, 裂解细胞并进行RNA条形码反转录。利用Nextera XT DNA sample Pre-Kit(美国Illumina公司)扩增的cDNA构建测序文库, 并使用高灵敏度DNA试剂盒在安捷伦生物分析仪(美国Agilent Technologies公司)上评估个体样本的最终文库。在Illumina HiSeq X测序平台上收集75个周期运行试剂盒进行测序, 每个试剂盒具有150 bp的配对端reads。使用Read10x()函数对具有个体样本基因表达数据的Seurat对象进行处理。对于每个样本, 将基因表达量表示为该基因的百分数乘以10 000, 转换为自然对数, 加1后归一化, 避免取对数0。从归一化表达矩阵中筛选出前3 000个高变异基因, 居中并按比例进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。基于前50个PCA成分, 采用R Harmony软件包(1.0版)消除批处理效果。

1.3 免疫组织化学检测

免疫组织化学检测采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(strept-avidin-biotin-peroxidase complex, SABC)法进行染色, 步骤参考试剂盒说明书。兔抗人CCL2抗体(ab8101, 英国Abcam公司)浓度为1:100, 山羊抗兔二抗浓度为1:500。免疫组织化学试剂盒及二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, CCL2为细胞质阳性。免疫组织化学评分=染色强度评分×阳性区染色比例评分。

颜色强度: 不着色0分, 弱着色1分, 中着色2分, 强着色3分。阳性细胞百分率0~5%计0分, 阳性率6%~25%计1分, 阳性率26%~50%计2分, 阳性率51%~74%计3分, 阳性率≥75%计4分。阳性染色主要位于肿瘤细胞的细胞质中。最终结果以染色强度和染色范围评分的乘机表示: 阴性为0分, 弱阳性为1~4分, 阳性为5~8分, 强阳性为9~12分, 取中位值分为高表达组>5.97分, 低表达组≤5.97分。

1.4 统计学处理

采用SSPS 22.0软件进行数据分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，以CCL2蛋白表达的免疫组织化学评分中位数划分定义高、低表达组，以患者性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期及复发作为协变量，进行多因素方差分析（COX回归分析）。Kaplan-Meier法计算生存率，差异性分析采用log-rank检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单细胞分析骨肉瘤细胞CCL2表达

基于R Harmony与Louvain算法我们定义了骨肉瘤的肿瘤细胞，将测序数据植入Seurat包的“FindClusters”函数后，用t-SNE方法在二维地图上显示识别出的聚类，阈值设定为3，CCL2呈高表达（图1）。

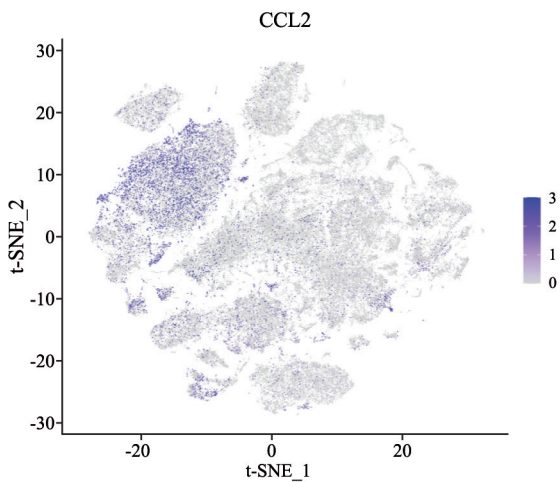


图1 单细胞分析11例骨肉瘤细胞CCL2表达

Fig. 1 Single cell analysis of CCL2 expression in 11 samples of osteosarcoma cells

2.2 骨肉瘤组织中CCL2的表达与临床病理特征分析及免疫组织化学检测

CCL2表达高低与骨肉瘤患者临床病理学特征分析结果见表1，CCL2的表达评分与患者的年龄、性别、肿瘤大小、化疗坏死率、病理学类型间差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ），但与临床分期及有无转移之间差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

根据免疫组织化学结果的评分标准将80例骨肉瘤原发灶的组织芯片评分按方法描述的公式计算出来并取中位值，患者被分为低表达组和高表达组（ 5.29 ± 0.95 vs 11.45 ± 4.24 ）（图2）。

2.3 生存分析

本研究的随访时间为12~36个月，80例患者中31例因死亡而终止随访，其余患者至终点时仍生存。经Kaplan-Meier生存统计分析结果显示，CCL2高表达组患者的总生存率较低表达组患者组低（ $P = 0.042$ ，图3）。

表1 骨肉瘤组织中CCL2的表达与临床病理特征分析

Tab. 1 The correlation between CCL2 expression and clinical features of osteosarcoma patients

Clinical feature	CCL2 expression		P value
	Low expression (n=47)	High expression (n=33)	
Gender			0.399
Male	24	21	
Female	23	12	
Age/year			0.524
≤15	29	19	
>15	18	14	
Tumor size D/cm			0.053
≤10	29	12	
>10	18	21	
Clinical stage			0.039
I - II	21	7	
III	26	26	
Pathological type			0.911
Normal	37	27	
Abnormal	10	6	
Lung metastasis			0.020
Yes	29	14	
No	18	19	
Tumor necrosis rate/%			0.222
≤90	22	21	
>90	25	12	

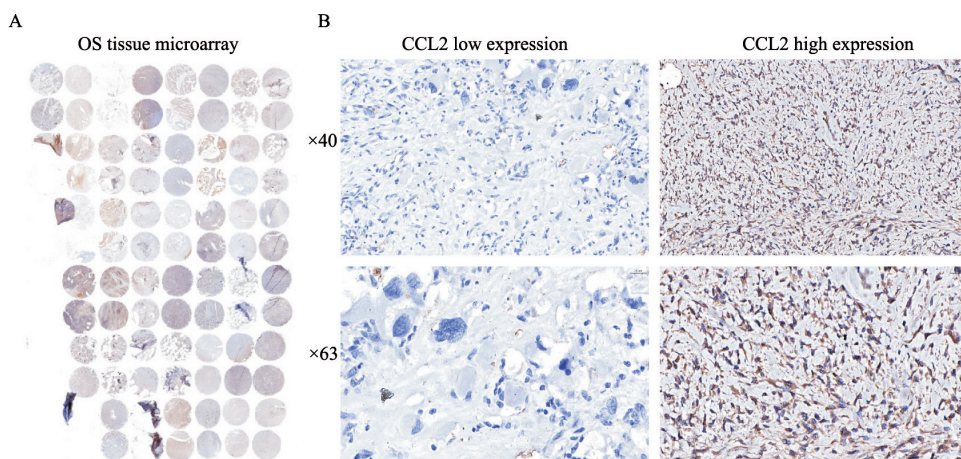


图2 免疫组织化学SABC法分析骨肉瘤组织CCL2表达

Fig. 2 Immunohistochemical analysis of CCL2 expression in osteosarcoma by SABC method

A: Tissue microarray analysis of 80 cases of primary osteosarcoma stained by CCL2 antibody; B: Comparison of high and low expressions of CCL2 by immunohistochemistry; SABC: Strept-avidin-biotin-peroxidase complex

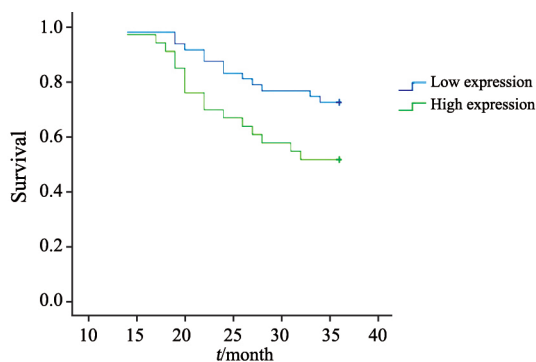


图3 Log-rank检验分析骨肉瘤组织CCL2表达与生存率分析

Fig. 3 Analysis of CCL2 expression and survival rate in osteosarcoma by log-rank test

3 讨 论

骨肉瘤的发生率呈双峰分布模式：在10~14岁（青春期发育阶段）出现第一次发病高峰，然后在60岁后出现第二次发病高峰。骨肉瘤的病因尚不清楚，基因组异质性强，目前尚未找到驱动基因，报告较多的突变基因包括定位于染色体13q14的*Rb*基因和定位于染色体17p13的*p53*基因。在20世纪70年代，骨肉瘤的标准治疗方式是截肢，但5年生存率<20%。20世纪80年代大剂量化疗药物引入术前新辅助和术后辅助化疗使骨肉瘤患者的5年生存率提高到65%~70%。但伴发转移的患者5年生存率仍然≤25%^[11]。

骨肉瘤细胞与周围肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）之间的交流是肿瘤

生长和随后转移所必需的。TME的主要影响成分是肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages, TAM），它是参与炎症反应和组织稳态的免疫细胞。我们前期应用单细胞技术分析了骨肉瘤组织及免疫微环境的异质性^[12]，结果发现，骨肉瘤细胞CCL2高表达。与原发骨肉瘤相比，在肺转移瘤中发现了更高比例的M2型TAM，这与促炎分子导致肿瘤侵袭能力增加有关。TAM尤其是M2型TAM的浸润增加长期以来一直与各种肿瘤，包括骨肉瘤预后不良有关^[13]。CC族趋化因子是趋化因子超家族中的一个亚家族（包括4个小鼠源趋化因子CCL6、CCL9、CCL10和CCL12），是细胞间信号转导的组成部分，对肿瘤微环境的功能至关重要。在大多数实体瘤中，这突出了其在癌组织中作为潜在的诊断和预后生物标志物的价值。许多CC族趋化因子是多种受体的配体，CCL2即单核细胞趋化蛋白-1（monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1），其受体包括CCR1、CCR2、CCR3、CCR4和CCR5，募集单核细胞包括巨噬细胞、嗜碱性粒细胞、T细胞和NK细胞。但不同的肿瘤组织内CCL2的作用不同，在乳腺癌、多形性胶质母细胞瘤中，CCL2是预后不良指标^[14]。肿瘤细胞CCL2的表达可能在生长因子、放疗、缺氧及化疗的刺激下分泌增加。由肿瘤细胞分泌的CCL2还通过激活细胞外信号转导通路提高肿瘤细胞自身的侵袭能力，促进肿瘤细

胞迁移^[15]。CCL2还能通过其受体CCR2介导TAM和骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cell, MDSC)进入肿瘤区, CCL2也是M2型巨噬细胞极化的因素之一。它还可以招募CCR2表达的Treg亚群^[16]、辅助型T细胞Th17^[17]。Qian等^[18]使用小鼠乳腺癌骨转移模型对CCL2进行研究, 结果发现, CCL2会有效地募集炎症单核细胞, 进而促进小鼠乳腺癌骨转移。Wang等^[19]对268例非转移性透明细胞肾细胞癌患者术后取得的组织芯片进行CCL2免疫组织化学染色并评分, 然后结合患者的生存信息进行预后分析, 结果发现, CCL2高表达患者的10年生存率要明显低于CCL2低表达患者。本研究采用免疫组织化学染色的方法检测了骨肉瘤组织芯片的CCL2表达情况, 结果发现, 高表达CCL2的患者3年生存率低于低表达组患者, CCL2表达与临床分期及远处转移密切相关。本研究和上述其他瘤种的研究一致, 表明肿瘤细胞可以分泌CCL2, 募集以巨噬细胞为主的单核细胞, 促进肿瘤的转移。

总之, CCL2在骨肉瘤转移的过程中起着重要作用, 对预测骨肉瘤患者预后有着重要的意义。本研究结果显示, CCL2与骨肉瘤肺转移密切相关, 但具体机制仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] ANWAR M A, EL-BABA C, ELNAGGAR M H, et al. Novel therapeutic strategies for spinal osteosarcomas [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 64: 83–92.
- [2] ZHAO X, WU Q R, GONG X Q, et al. Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches [J]. *Biomed Eng Online*, 2021, 20(1): 24.
- [3] PUSHPAM D, GARG V, GANGULY S, et al. Management of refractory pediatric sarcoma: current challenges and future prospects [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5093–5112.
- [4] MATEU-SANZ M, TORNÍN J, GINEBRA M P, et al. Cold atmospheric plasma: a new strategy based primarily on oxidative stress for osteosarcoma therapy [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(4): 893.
- [5] QUADROS M, MOMIN M, VERMA G. Design strategies and evolving role of biomaterial assisted treatment of osteosarcoma [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 121: 111875.
- [6] BOZORGI A, SABOURI L. Osteosarcoma, personalized medicine, and tissue engineering; an overview of overlapping fields of research [J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2021, 27: 100324.
- [7] IWAMOTO H, IZUMI K, MIZOKAMI A. Is the C–C motif ligand 2–C–C chemokine receptor 2 axis a promising target for cancer therapy and diagnosis? [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9328.
- [8] XIONG W, TAN J Y, GUO Y X, et al. Notch3 knockout suppresses mouse mammary gland development and inhibits the proliferation of 4T1 murine mammary carcinoma cells via CCL2/CCR4 axis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 594372.
- [9] TANG H, ZHENG J, BAI X, et al. Forkhead box Q1 is critical to angiogenesis and macrophage recruitment of colorectal cancer [J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 564298.
- [10] ZHENG Y, WANG Z H, WEI S M, et al. Epigenetic silencing of chemokine CCL2 represses macrophage infiltration to potentiate tumor development in small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2021, 499: 148–163.
- [11] BROOKES M J, CHAN C D, BALJER B, et al. Surgical advances in osteosarcoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3): 388.
- [12] ZHOU Y, YANG D, YANG Q C, et al. Author correction: single-cell RNA landscape of intratumoral heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in advanced osteosarcoma [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2567.
- [13] YANG C, TIAN Y, ZHAO F, et al. Bone microenvironment and osteosarcoma metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 6985.
- [14] QIU C, LI J Y, LUO D, et al. Cortistatin protects against inflammatory airway diseases through curbing CCL2 and antagonizing NF-κB signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 531(4): 595–601.
- [15] SANTARELLI R, ARTENI A M B, GILARDINI MONTANI M S, et al. KSHV dysregulates bulk macroautophagy, mitophagy and UPR to promote endothelial to mesenchymal transition and CCL2 release, key events in viral-driven sarcoma genesis [J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(12): 3500–3510.
- [16] HUANG X M, CAI Y N, DING M, et al. Human chorionic gonadotropin promotes recruitment of regulatory T cells in endometrium by inducing chemokine CCL2 [J]. *J Reprod Immunol*, 2020, 137: 102856.
- [17] KAUSHANSKY N, BAKOS E, BECKER-HERMAN S, et al. Circulating picomolar levels of CCL2 downregulate ongoing chronic experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of regulatory mechanisms [J]. *J Immunol*, 2019, 203(7): 1857–1866.
- [18] QIAN B Z, LI J F, ZHANG H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis [J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 222–225.
- [19] WANG Z W, XIE H Y, ZHOU L, et al. CCL2/CCR2 axis is associated with postoperative survival and recurrence of patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51525–51534.

(收稿日期: 2021-02-06 修回日期: 2021-04-30)