

## · 临床研究 ·

## 骨桥蛋白在浸润性乳腺癌组织中的表达及其与微血管密度的关系

隋金珂 王玥 施俊义 谢轶群 李曦洲

【摘要】 目的 探讨乳腺癌组织中不同骨桥蛋白(OPN)的表达水平及其与微血管密度的关系。方法 采用免疫组织化学 Envision 法检测 89 例乳腺浸润性导管癌组织 OPN 和 CD34 的表达情况,分析其表达与病理特征的关系。定性资料分析采用  $\chi^2$  检验,定量资料分析采用  $t$  检验。结果 在 89 例乳腺浸润性导管癌中,OPN 阳性表达率为 57.30% (51/89)。组织学分级 I、II、III 级浸润性导管癌 OPN 阳性表达率分别为 27.27% (6/22)、66.67% (24/36)、67.74% (21/31),三者间差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.780, P = 0.005$ );有、无淋巴结转移者 OPN 阳性表达率分别为 74.47% (35/47) 和 38.10% (16/42),伴有淋巴结转移者 OPN 阳性表达率明显高于不伴转移者( $\chi^2 = 11.993, P = 0.001$ )。乳腺癌组织 OPN 表达阴性、阳性组的肿瘤微血管密度(MVD)分别为(68.42 ± 23.45)条/每高倍视野和(94.96 ± 31.03)条/每高倍视野,二者间差异有统计学意义( $t = 4.413, P = 0.000$ )。结论 OPN 在乳腺癌组织中的高表达与肿瘤血管的生成和肿瘤的浸润及转移有一定关系,针对 OPN 的进一步研究可能为临床治疗乳腺癌转移提供新的方法。

【关键词】 骨桥蛋白;CD34;乳腺肿瘤;微血管密度;免疫组织化学

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expression of osteopontin in invasive breast carcinoma and its relationship with microvessel density SUI Jin-ke, WANG Yue, SHI Jun-yi, XIE Yi-qun, LI Xi-zhou. General Surgery Department, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: SHI Jun-yi, E-mail: shijunyi666@126.com

【Abstract】 Objective To explore the expression of osteopontin in breast carcinoma and its relationship with microvascular density. Methods Envision immunohistochemical method was used to examine the expressions of osteopontin and CD34 in 89 invasive breast carcinoma cases and analyze their relationship with clinical pathological characteristics. Qualitative data were analyzed using chi-square test. Quantitative data were analyzed using  $t$  test. Results In the 89 cases of breast invasive ductal carcinoma, the positive rate of osteopontin was 57.30% (51/89). In grade I, II and III invasive ductal carcinoma

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院普外科(隋金珂、李曦洲);030001 太原,解放军 264 医院普外科(王玥);200433 上海,上海市黄浦区中心医院乳腺外科(谢轶群)

通信作者:施俊义, E-mail: shijunyi666@126.com

patients, the positive rate of osteopontin was 27.27% (6/22), 66.67% (24/36) and 67.74% (21/31), respectively, with statistically significant difference between the three groups of patients ( $\chi^2 = 10.780, P = 0.005$ ). In patients with lymph nodes metastases and without lymph nodes metastases, the positive rate of osteopontin was 74.47% (35/47) and 38.10% (16/42) respectively, showing a high positive rate of osteopontin patients with lymph nodes metastases than without ( $\chi^2 = 11.993, P = 0.001$ ). The microvessel density was  $(68.42 \pm 23.45)$  per high-power field in patients with negative expression of osteopontin and  $(94.96 \pm 31.03)$  per high-power field in patients with positive expression of osteopontin, with statistically significant difference between the two groups ( $t = 4.413, P = 0.000$ ).

**Conclusion** High expression of osteopontin in breast cancer may have some relationship with tumor angiogenesis and tumor invasion and metastasis. Further study on the role of osteopontin in breast cancer blood vessels will provide a new method for the clinical treatment of breast cancer metastasis.

**【Key words】** osteopontin; CD34; breast carcinoma; microvessel density; immunohistochemistry

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。近年来其发病率有逐年上升及年轻化的趋势,尤其是沪、京、津及沿海地区,乳腺癌已经成为女性恶性肿瘤的首位,是威胁女性身体健康的主要疾病之一<sup>[1]</sup>。乳腺癌中最常见的类型为浸润性导管癌,患者死亡的主要原因是复发与转移,乳腺癌一旦发生转移,患者的生存时间将明显缩短。因此,降低乳腺癌的复发与转移是提高乳腺癌生存率的主要途径。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种与恶性转化有关的磷酸化蛋白,由 Senger 等<sup>[2]</sup>于 1979 年提取。近年来,对它的研究日益深入。最近的研究提示,它不仅在恶性肿瘤的诊断方面可能有价值,还与肿瘤的浸润、转移及血管生成密切相关。笔者采用免疫组织化学方法检测 OPN 在 89 例浸润性乳腺癌组织中的表达,同时通过检测 CD34,计算肿瘤微血管密度(tumor microvessel density, MVD),以探讨 OPN 在乳腺癌中的表达与肿瘤组织内微血管密度的关系。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

选取第二军医大学附属长海医院甲乳外科、上海市黄浦区中心医院乳腺外科 2006 年 1 月至 2008 年 12 月手术切除的乳腺浸润性导管癌标本 89 例;患者均为女性,年龄 26~73 岁,平均年龄 46.1 岁。89 例病理切片均证实为乳腺浸润性导管癌,均行乳腺癌改良根治术或乳腺癌保留乳房手术,所有病例术前

均未接受任何治疗。年龄 $\leq 50$ 岁者 66 例, $> 50$ 岁者 23 例;按 Scarff-Bloom Richardson(SBR)分级标准进行组织学分级,I 级 22 例,II 级 36 例,III 级 31 例;伴淋巴结转移者 47 例,未发现淋巴结转移者 42 例;肿瘤直径 $\leq 2$  cm 者 30 例, $> 2$  cm 者 59 例。

## 1.2 试剂

鼠抗人单克隆抗体 OPN 购自美国 Santa-Cruz 公司、鼠抗人单克隆抗体 CD34 购自美国 Lab Vision 公司。免疫组织化学检测系统采用过氧化物酶标记的 Envision 二步法检测试剂盒,显色试剂为高敏感二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒,均购自 Dako 公司。

## 1.3 方法

所有标本均用 10% 甲醛固定,常规行石蜡包埋连续切片,厚 4  $\mu\text{m}$ ,脱蜡至水后置于柠檬酸钠缓冲液中(pH 6.0),微波加热修复抗原(2 次,5 min),自然冷却后,用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,滴加工作浓度的一抗,37  $^{\circ}\text{C}$  孵化 60 min,PBS 冲洗,滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,37  $^{\circ}\text{C}$  孵化 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色,自来水冲洗,苏木精对比染色;脱水透明后用中性树胶封固,镜下观察。

## 1.4 染色结果判断

OPN 主要均匀分布于细胞质,少量位于细胞核,光镜下呈棕黄色。参照试剂说明,采用免疫组织化学半定量法,根据胞质的染色程度及染色细胞百分率进行评分。胞质基本不着色者为 0 分,着色淡者(黄色)为 1 分,着色深者(棕色以上)为 2 分;胞质着色细胞占计数细胞百分率 $< 5\%$ 为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分各自相乘,为其最后得分(0~6 分)。0~3 分为阴性,4~6 分为阳性。

参照 Weidner 等<sup>[3]</sup>报道的方法,通过检测乳腺癌组织中 CD34 表达,进行 MVD 计数。CD34 定位于血管内皮细胞胞质,呈棕黄色。所有病例的血管内皮细胞均成功染色,先在低倍镜(40 倍)下全面观察切片并选定癌组织内血管密度最高处,然后在高倍镜(200 倍)下取 3 个视野分别计算所有染色的微血管,取 3 个测定值的平均数为该病例的 MVD 值。在计数微血管时,将与周围肿瘤细胞和结缔组织有明显区别的任何一个染成棕色的血管内皮或内皮细胞簇作为一条血管计数,只要结构不相连,其分枝结构也作为一条血管计数。

## 1.5 数据管理与统计分析

采用 Windows Excel 2003 录入和存储数据,统计处理由 SPSS 15.0 统计软件包完成。定性资料采用  $\chi^2$  检验,3 组间的两两比较采用卡方分割法,检验

水准为  $\alpha' = 0.013$ 。经检验, OPN 阳性、阴性两组的 MVD 值均符合正态分布, 经 Levene 检验,  $F$  值为 2.147,  $P$  值为 0.146, 认为方差整齐, 因此, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本成组  $t$  检验。以  $P < 0.050$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OPN 阳性表达与临床特征的关系

本组 89 例患者中, OPN 阳性表达者 51 例(图 1), 阳性表达率为 57.30% (51/89), OPN 阴性表达者 38 例(图 2)。

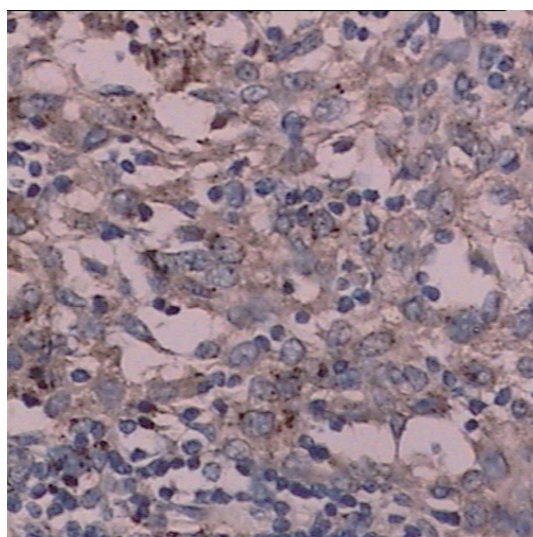


图 1 骨桥蛋白阳性表达(免疫组织化学染色  $\times 200$ )

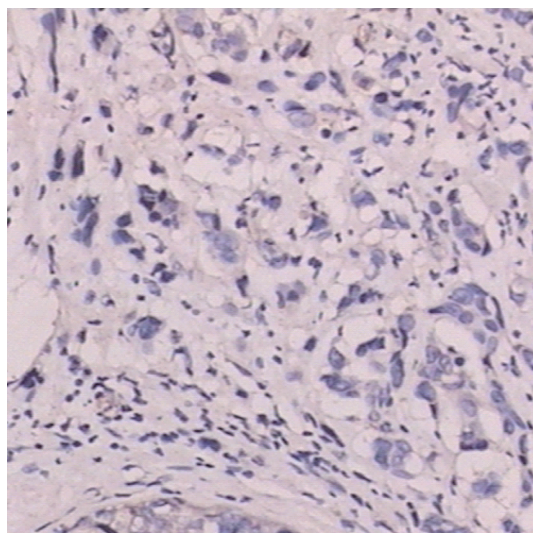


图 2 骨桥蛋白阴性表达(免疫组织化学染色  $\times 200$ )

I、II、III 级浸润性导管癌中 OPN 阳性表达率分别为 27.27% (6/22)、66.67% (24/36)、67.74% (21/31), 三者间差异有统计学意义 ( $P < 0.050$ ); 有、无淋巴结转移者的 OPN 阳性表达率分别为 74.47% (35/47) 和 38.10% (16/42), 两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.050$ ); OPN 的阳性表达与患者年龄、肿瘤直径均无明显关系 ( $P > 0.050$ , 表 1)。

表 1 骨桥蛋白阳性表达与临床特征的关系

临床特征	例数	OPN[例(%)]		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性	阴性		
年龄				0.794	0.373
≤50	66	36(54.55)	30(45.45)		
>50	23	15(65.22)	8(34.78)		
肿瘤大小				0.673	0.412
≤2	30	19(63.33)	11(36.67)		
>2	59	32(54.24)	27(45.76)		
组织学分级				10.780	0.005
I 级	22	6(27.27) <sup>a</sup>	16(72.73)		
II 级	36	24(66.67)	12(33.33)		
III 级	31	21(67.74)	10(32.26)		
淋巴结				11.993	0.001
无	42	16(38.10)	26(61.90)		
有	47	35(74.47)	12(25.53)		

a:  $P < 0.013$ , 与 II、III 级比较

## 2.2 OPN 表达与 MVD 的关系

89 例癌组织标本 MVD 为 34.3 ~ 163.3 条, 平均为 83.63 条。乳腺浸润性导管癌组织中 OPN 阴性表达组(图 3)和阳性表达组(图 4)的 MVD 平均值分别为  $(68.42 \pm 23.45)$  条/HP、 $(94.96 \pm 31.03)$  条/HP, 二者间差异有统计学意义 ( $P < 0.050$ , 表 2)。

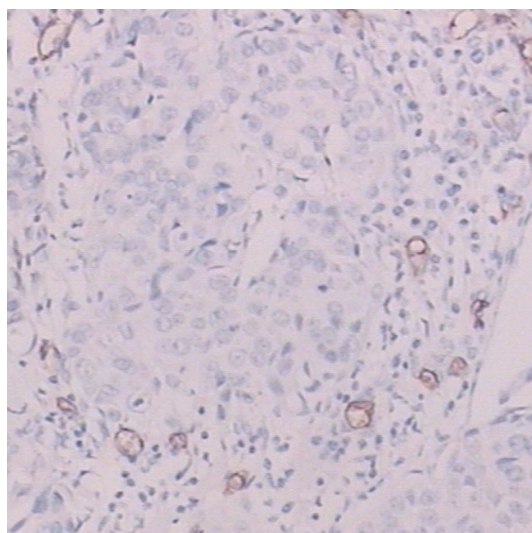


图 3 骨桥蛋白阴性标本的 CD34 表达(免疫组织化学染色 ×200)



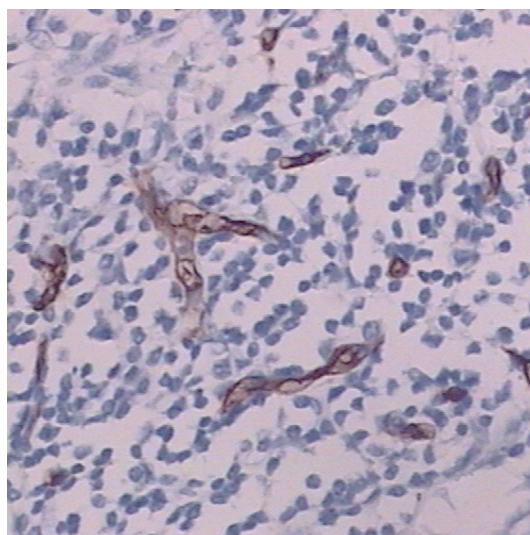


图 4 骨桥蛋白阳性标本的 CD34 表达(免疫组织化学染色 ×200)

表 2 乳腺浸润性导管癌组织中骨桥蛋白表达与 MVD 的关系

骨桥蛋白表达	例数	MVD(条/HP)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
阳性	51	94.96 ± 31.03	4.413	0.000
阴性	38	68.42 ± 23.45		

MVD:微血管密度;HP:高倍视野

### 3 讨论

OPN 是一种分泌型细胞外基质蛋白,广泛分布于人体组织中且具有多种功能,它在肿瘤细胞中有较高表达。现已在许多恶性肿瘤中发现了 OPN,并证实它在肿瘤浸润转移、血管形成、抑制凋亡等过程中发挥重要作用。

本研究显示,OPN 在 57.30% (51/89) 的浸润性乳腺癌组织中过表达,并且不同肿瘤组织学分级和不同淋巴结转移组之间 OPN 表达的差异有统计学意义,提示 OPN 阳性表达的乳腺癌患者可能更容易复发、转移,其预后不良。国外学者 Rudland 等<sup>[4]</sup>研究 333 例乳腺癌组织标本中 OPN 的表达,术后随访 14~20 年,其中 OPN 表达阴性者 112 例,生存率为 94%,平均生存期 >228 个月;OPN 表达阳性者 221 例,生存率为 26%,平均生存 68 个月;随访时间越长,差异越显著。目前,不仅在乳腺癌患者的肿瘤组织内发现 OPN 高表达,在患者的血浆血清中也发现 OPN 高表达。Bramwell 等<sup>[5]</sup>通过前瞻性临床研究连续测量 158 例转移性乳腺癌患者血浆 OPN 水平,发现 OPN 浓度越高患者无瘤生存期及总生存期越短,并且容易发生脏器转移。

目前,OPN 对乳腺癌侵袭和转移的作用机制已经被国外的研究所证实。

Allan 等<sup>[6]</sup>在体外将转染了野生型 OPN 基因的乳腺癌细胞种植于裸鼠后发现其淋巴管浸润,淋巴结转移及肺转移明显增加。EI Tanani 等<sup>[7]</sup>将乳腺肿瘤细胞 DNA 片段转入良性乳腺上皮细胞中,可引起 OPN 表达和肿瘤细胞转移。Mi 等<sup>[8]</sup>报道转移性乳腺癌细胞株 4T1 细胞中,OPN 结合整合素  $\alpha v \beta 3$  通过整合素连接激酶(ILK)激活 AP-1, AP-1 又结合 MMP-2 和 uPA 启动子,促进乳腺癌细胞侵袭和转移。

无论通过何种途径来促进乳腺肿瘤细胞的侵袭和转移,血管生成是前提,新生血管丰富的肿瘤有较高的转移率。在许多肿瘤类型中,OPN 的表达和肿瘤的血管密度及内皮细胞标志如 CD31、CD34、vWF 等的表达密切相关<sup>[9-11]</sup>。肿瘤内微血管密度已成为预测肿瘤转移、复发和判断预后的一项重要指标<sup>[12]</sup>。本研究通过对 89 例浸润性乳腺癌组织中 CD34 的检测,再根据 OPN 的分组情况进行对比发现,MVD 在 OPN 阳性组和阴性组之间差异有统计学意义( $P < 0.050$ ),提示 OPN 可能通过某些途径促进了血管生成。在促进血管生成的因子中,VEGF 被认为是最重要的因子之一。国内学者孟令华等<sup>[13]</sup>研究发现,VEGF 在乳腺癌组织中的表达较正常乳腺组织中明显上调。国外学者的诸多研究,从肿瘤血管的发生机制方面提供了有力证据。Hirama 等<sup>[14]</sup>发现 OPN 能上调内皮细胞的 VEGF 表达,促进内皮细胞增生,诱导新生血管形成,有利于肿瘤细胞的生长及转移;Chakraborty 等<sup>[15]</sup>将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株在体外用 OPN 处理培养后发现,OPN 与乳腺肿瘤细胞表面的整合素  $\alpha v \beta 3$  受体结合后通过旁分泌等引起肿瘤细胞 VEGF mRNA 翻译增强,VEGF 合成与分泌增多,导致内皮细胞趋化、黏附和迁移增强,肿瘤新生血管形成增多<sup>[16-17]</sup>。以上研究说明 OPN 有可能通过上调 VEGF 的表达促进肿瘤的血管生成,并在肿瘤的复发、转移中发挥作用。目前已有通过特异性抑制 VEGF 从而抑制肿瘤生长和转移的贝伐珠单抗抗体应用于临床肿瘤治疗。

进一步研究 OPN 作用于血管、淋巴管促进肿瘤转移、侵袭的机制,深入探索乳腺癌组织中血管和淋巴管的生成环节,可能为乳腺癌患者的治疗提供新的途径。

## 参考文献

- [1] 邵志敏. 乳腺癌外科治疗发展趋势[J]. 外科理论与实践, 2006, 11(2): 89-91.
- [2] Senger DR, Wirth DF, Hynes RO, et al. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins[J]. Cell, 1979, 16(4): 885-893.
- [3] Weindner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1887.

- [4] Rudland PS, Higgins AP, Tanani ME, et al. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(12):3417-3427.
- [5] Bramwell VH, Doig GS, Tuck AB, et al. Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(7):3337-3343.
- [6] Allan AL, George R, Vantyghem SA, et al. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(1):233-246.
- [7] El Tanani M, Barraclough R, Wilkinson MC, et al. Metastasis-inducing DNA regulates the expression of the osteopontin gene by binding the transcription factor Tef-4[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(14):5619-5629.
- [8] Mi ZY, Guo HT, Philip Y, et al. Integrin linked kinase regulates osteopontin dependent MMP-2 and uPA expression to convey metastatic function in murine mammary epithelial cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(6):1134-1145.
- [9] Tang H, Wang J, Bai F, et al. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer[J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(1):103-110.
- [10] Jain S, Chakraborty G, Kundu GC. The crucial role of cyclooxygenase-2 in osteopontin-induced protein kinase C  $\alpha$ /c-Src/IkappaB kinase  $\alpha$ /beta-dependent prostate tumor progression and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6638-6648.
- [11] Chakraborty G, Jain S, Kundu GC. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1):152-161.
- [12] Cavallam U, Christofori G. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression[J]. *Neuro Oncol*, 2000, 50(1/2):63-70.
- [13] 孟令华, 刘巍, 宋丽楠, 等. BCSG1、C-erbB-2、VEGF 表达与乳腺癌临床病理因素相关性研究[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2007, 1(4):29-36.
- [14] Hiram M, Takahashi F, Takahashi K, et al. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198(1):107-117.
- [15] Chakraborty G, Jain S, Kundu GC. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1):152-161.
- [16] Takahashi F, Akatagawa S, Fukumoto H, et al. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(5):707-712.
- [17] Cheriya V, Hussein MA. Osteopontin, angiogenesis and multiple myeloma[J]. *Leukemia*, 2005, 19(12):2203-2205.

(收稿日期:2010-03-22)

(本文编辑:罗承丽)

隋金珂, 王玥, 施俊义, 等. 骨桥蛋白在浸润性乳腺癌组织中的表达及其与微血管密度的关系 [J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2011, 5(4):426-433.