

· 综述 ·

乳腺癌中骨桥蛋白表达的研究进展

赵菲 姜军

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是细胞外基质中重要的功能性蛋白,因其最早发现于牛骨组织的成骨细胞与破骨细胞之内,介导骨组织细胞与骨基质的连接,参与骨基质矿化和重吸收过程而得名^[1]。随着研究的深入,在许多非矿化组织如肾、内耳、蜕膜、胎盘、平滑肌及活化 T 细胞、巨噬细胞等之中亦发现有 OPN 的存在;在尿液、乳汁及已发生远处转移的肿瘤患者血液中也检测到 OPN 表达。作为一种机体反应蛋白,OPN 在泌尿系结石形成、机体感染与免疫、损伤修复、组织间质重塑、肿瘤浸润转移等过程中的作用日益受到重视,同样在乳腺癌发生、发展中的作用亦不容忽视。

1 OPN 的结构特点

OPN 蛋白是一种亲水性的分泌型酸性糖蛋白,多以磷酸化形式存在,其等电点为 3.5,相对分子质量(M_r)为 41 000 ~ 75 000,约含 300 个氨基酸残基,其中天冬氨酸、丝氨酸和谷氨酸占有很高的比例,约占总氨基酸量的一半^[2-3]。在不同物种及同一物种的不同细胞内,OPN 的大小与形式不完全相同,可能是 mRNA 的选择性剪接、蛋白质的翻译后修饰以及细胞外蛋白水解酶降解等多种修饰方式的不同所致^[4]。但这些变异体内均含有特异性的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)基序,该基序高度保守,对于 OPN 的黏附功能起着重要作用。除 RGD 基序外,OPN 分子尚含有 13 个磷酸化位点、1 个 N-糖基化位点、5 ~ 6 个 O-糖基化位点、1 个钙离子结合位点、1 个肝素结合位点以及 1 个凝血酶剪接位点。其凝血酶剪接位点位于 RGD 序列羧基端第 6 个氨基酸残基所构成的肽键上,OPN 被凝血酶裂解成 2 个大小相近的片段,以暴露其配体结合位点。目前认为,蛋白激酶的磷酸化作用、凝血酶的剪接作用等很可能是机体对 OPN 的自发性生理调节。

人体内编码 OPN 蛋白的基因位于染色体 4q13 上,含 7 个外显子与 6 个内含子,外显子 1 的 5' 上端为启动子区域,转录因子结合位点呈线性分布其中。

对鼠、人、猪、牛、鸡等 OPN 基因的 cDNA 进行对比分析后发现,不同物种的 OPN 基因呈中度同源性,但其中的一段 RGD 序列则高度保守,在不同物种的 OPN 中均普遍存在。骨桥蛋白基因的表达具有组织细胞特异性,并且受多种激素、生长因子、肿瘤促进剂及原癌基因表达产物的调控。

2 OPN 的生理功能

近年来的研究表明,OPN 的配体主要分为两大类:细胞表面的蛋白整合素(integrin)以及黏附性糖蛋白 CD44。OPN 以其 RGD 序列与前者结合,而以非 RGD 依赖性方式与后者结合,二者均通过激活细胞内特异性信号转导途径完成其生理功能。整合素是一类含 α 、 β 两条链的异二聚体跨膜糖蛋白,属细胞表面受体家族,广泛分布于多种动物细胞中。目前已发现 16 种不同的 α 亚单位和 8 种 β 亚单位,两者组合构成 22 种整合素。整合素蛋白可分为胞外区、胞质区和穿膜区三部分,其胞质区较短,缺乏与酶结合的位点。因此,整合素必须先与伴侣蛋白结合,通过伴侣蛋白连接细胞骨架、并在细胞膜的两边构成复合体后才能传递信号^[5],此即为灶性黏附(focal adhesion)。灶性黏附是细胞黏附于细胞外基质的基础,也是 OPN 通过整合素介导信号转导的结构基础。在整合素蛋白的诸多亚型中, $\alpha_v\beta_3$ 是 OPN 的主要配体,亦是与肿瘤侵袭力增强特异性相关的配体^[6]。正常情况下, $\alpha_v\beta_3$ 整合素在肿瘤细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和白细胞等均有表达,其与 OPN 的结合与微环境中的 Ca^{2+} 浓度有关,RGD 序列周围的氨基酸残基带有大量负电荷,其 β 片层结构亦对 Ca^{2+} 浓度极为敏感,提示 Ca^{2+} 是影响 OPN 分子与 $\alpha_v\beta_3$ 整合素受体结合的关键因素。

CD44 是一种硫酸化的黏附性糖蛋白。由于剪切和糖基化形式的不同,CD44 以多种变异体的形式存在于成熟 T 细胞、成熟 B 细胞、巨噬细胞及红细胞等表面。在体外实验中,已观察到能分泌 CD44 的纤维母细胞向 OPN 移动,这一趋化性可被抗 OPN 或 CD44 的抗体所阻断。CD44 与 OPN 的结合与 Ca^{2+} 浓度无关,但能够被透明质酸盐竞争性抑制,说明 CD44 分子与 OPN 的结合为非 RGD 依赖性。Katagiri 等^[7]报道变异型 CD44 能与 OPN 的 C 端或 N 端结合,而不依赖于 RGD 序列,表明 OPN 有多个结构域与 CD44 变异体相结合,它们间的结合能够被抗整合素 β 亚基的抗体所抑制。

OPN 的生理功能广泛,涉及细胞生命活动的诸多方面,主要包括:(1)通过灶性黏附介导细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间的黏附,可以说,这是

OPN 后续功能的基础;(2)参与细胞的迁移;(3)调节矿化组织的形成与重建,维持骨组织与周围组织的完整性^[8];(4)在血管生成中,通过调节内皮细胞的黏附和迁移能力参与血管管腔的形成和血管网络构建^[9];(5)OPN 对基因的表达、钙调节和 NO 的产生都有影响;(6)参与针对微生物感染的非特异性反应,刺激巨噬细胞和淋巴细胞活化^[10]。

3 OPN 与乳腺癌

3.1 OPN 参与正常乳腺发育

有关 OPN 与乳腺的报道最早见于 20 世纪 90 年代,Rittling 等^[11]检测小鼠乳腺发育不同阶段的 OPN 表达状况,结果发现,乳腺由静止期发育至妊娠期时,OPN 的表达由低水平发展至中等水平,至泌乳第 2 天时达到高峰,此后则缓慢下降并在乳腺复旧期内保持一个较高的水平。Nemir 等^[12]培育的转基因小鼠可在其乳腺上皮细胞内表达 OPN 反义 RNA,此小鼠在妊娠期无乳腺腺泡发育,分泌 β -酪蛋白及乳清酸乳汁蛋白显著降低,丧失泌乳能力。实际上,哺乳期女性的乳腺上皮细胞与乳汁中亦可检测到 OPN 的高水平表达^[13-14]。上述研究表明 OPN 参与乳腺组织的正常发育和分化,而乳汁中 OPN 的持续高表达甚至可能与母乳喂养婴儿的免疫能力有关^[15]。

3.2 OPN 诱导乳腺肿瘤形成

OPN 在肿瘤发生过程中受到多种信号转导途径、细胞表面受体、生长因子、转录因子等的调节,而并非以突变激活的方式发挥功能。良性细胞 OPN 表达上调可能诱导其出现侵袭、转移等恶性表型;反之,OPN 表达下调则可减弱细胞的增殖速度和成瘤能力^[16]。Shevde 等^[17]采用 RNA 干扰技术抑制人转移性乳腺癌细胞株 MD-MBA-435 内 OPN 表达,此“静默细胞”在裸鼠体内的成瘤性减弱,在改良 Boyden 小室内的侵袭性和迁移力明显下降。

乳腺癌微钙化灶多由骨特异性矿化物羟基磷灰石构成,是癌肿的早期征象之一。1995 年,Bellahene 等^[18]首先检测出乳腺癌组织表达 OPN 和骨连接素(osteonectin)两种骨基质蛋白,并大胆提出可能与乳腺癌内羟基磷灰石结晶的形成和沉积有关。Castronovo 等^[19]观察了 10 例以微钙化为主要特征的乳腺癌标本,发现微钙化灶主要由矿化的乳腺癌细胞构成,其内甚至可见部分细胞结构。Oyama 等^[20]以 20 例乳腺癌及 16 例不典型小叶增生标本为对象,应用免疫组化方法证实 OPN 蛋白在导管腔内分泌物、坏死碎屑、细胞外基质及钙结节染色(Kossa 法)阳性的组织中均有表达,原位杂交显示 OPN mRNA

主要存在于靠近微钙化灶的细胞中。以上结果均证实 OPN 在乳腺癌羟基磷灰石结晶的形成中发挥重要作用,推测其原因,可能是由于磷酸化蛋白的表达为磷酸盐沉积提供了适宜的微环境^[21]。

3.3 OPN 促进乳腺癌浸润转移

Tuck 等^[22]曾报道一例患者因双侧浸润性乳腺癌行手术治疗,病理检查显示双侧病变的病理类型一致,术后 4 年该患者出现右胸壁肿瘤复发及全身广泛转移,取以上标本行免疫组织化学分析显示:左乳包块 OPN 低表达,右乳包块、右腋窝淋巴结转移灶、右胸壁复发灶及远处转移灶等均高表达 OPN;最后一次入院时患者血清 OPN 水平显著增高,提示右乳包块为原发病灶,余者系右乳癌导致的全身转移。Kreunin^[23]等提取在裸鼠体内有不同的转移表型的 MDA-MB-435 细胞亚系,体外培养后应用质谱技术检测培养液中的蛋白表达,发现 OPN 及细胞外基质蛋白 1(EMP1)与细胞的转移能力相关。Suzuki 等^[24]应用一对 OPN 表达水平不同的同源乳腺癌细胞株构建裸鼠原位移植瘤模型,观察发现 OPN 表达上调的肿瘤易出现淋巴结转移和肺转移,而 OPN 表达抑制的肿瘤则转移能力显著下降,充分证实了 OPN 是乳腺癌浸润转移的重要因素。

目前已知,一些乳腺癌细胞株可表达 $\alpha_1 \sim \alpha_5(\beta_1)$ 和 $\alpha_v(\beta_3)$ 整合素,如高侵袭力的细胞株 MDA-MB-231 即可表达高水平的 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 和 $\alpha_v\beta_3$,易在体内产生溶骨性转移。针对上述现象,Hullinger 等^[25]研究了肿瘤上调成骨细胞 OPN mRNA 表达、破坏骨骼内环境稳定性的作用。将乳腺癌细胞 MCF-7 和 PC-3 的溶骨性条件培养基和 LNCaP 的成骨性培养基分别作用于成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1,结果发现前者在抑制成骨细胞增生与分化的同时上调了 OPN 的表达,而后者则无此功能。因此,OPN 可能在恶性肿瘤骨质溶解性破坏的发生过程中发挥重要作用。而金黄色葡萄球菌分泌的细胞外黏附蛋白则可通过阻断 OPN 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的相互作用而抑制乳腺癌细胞的黏附和骨转移^[26]。

为明确乳腺肿瘤中 OPN 表达上调的机制,Tuck 等^[27]选取 4 株乳腺上皮细胞株(21PT:永生化,无成瘤性;21NT:弱成瘤性,无转移力;21MT-1:成瘤性,弱转移力;MDA-MB-435:成瘤性,高转移力)转染外源性人重组 OPN,以研究 OPN 表达水平与细胞侵袭力之间的关系。结果发现,转染后的 21PT 和 21NT 细胞较亲本细胞具有更强的迁移与侵袭力;同时,尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)的表达与尿激酶的活性亦有所增

强,且二者之间具有相关性。由此推断,OPN 很可能是通过诱导 uPA 的表达来提高肿瘤细胞的侵袭转移能力^[28]。进一步的研究显示,OPN 可通过激活 PI3K/Akt/ I κ B α 激酶(IKK) 途径活化核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B),诱导 uPA 分泌^[29-30],亦可通过 c-Src 依赖性表皮生长因子受体的转录激活(即 c-Src/EGFR/ERK 途径)活化激活蛋白-1(activator protein, AP-1),介导 uPA 分泌^[31]。

目前,OPN 相关信号转导通路是研究的热点。Tuck^[32] 等认为,OPN 诱导的乳腺上皮细胞迁移至少涉及肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)受体和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)受体通路及其下游的多重信号转导途径。生物信息学分析表明,OPN 启动子区域含有 β 连环蛋白相关 T 细胞因子、Ets 及 AP-1 结合基序,T 细胞因子、Ets 或 AP-1 转录因子均可促进 OPN 活化及过表达^[33],在此过程中 AP-1 的作用最为突出。关于 AP-1 与 OPN 的相互作用,除前述 c-Src/EGFR/ERK 途径外^[31],AP-1 蛋白 c-Jun 的 N 端激酶依赖性磷酸化可导致 c-Jun 二聚体与 OPN 启动子结合^[34],上调 OPN 基因转录与蛋白表达;此外,OPN 表达的变化同样涉及丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK),磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)及蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)等^[32]。在此基础之上,设计阻断信号转导通路的药物,或应用 OPN 特异性反义寡核苷酸^[35]可能成为转移性乳腺癌治疗的新方向。

3.4 OPN 调控乳腺癌新生血管形成

新生血管形成是肿瘤细胞生长存活和浸润转移的基础,这一复杂过程需要生长因子及其受体、细胞外蛋白、黏附分子和蛋白水解酶等多种因子的协同作用^[36-39]。Brooks 等^[40-41]发现血管发生过程中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达增加,阻断其表达可抑制血管形成;血管修复和再生时 OPN 与 $\alpha_v\beta_3$ 的表达亦显著增强,OPN 可能通过刺激内皮细胞黏附和迁移而加速血管修复^[42],血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)亦参与此过程^[9, 43]。此外,OPN 可诱导骨保护素(一种肿瘤坏死因子受体)表达,进而活化 NF- κ B,减少血管内皮细胞凋亡^[44]。在乳腺癌组织中,OPN 通过自分泌和旁分泌方式,激活乳腺肿瘤激酶/核因子诱导激酶/核因子- κ B/激活转录因子-4(Brk/NFIK/NF- κ B/ATF-4)信号途径,启动 VEGF 依赖性的肿瘤新生血管形成^[45]。

3.5 OPN 介导肿瘤细胞的多药耐药现象

Aoudjit 等^[46]在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 的研究中发

现, OPN 与其细胞外基质配体 $\alpha\beta_1$ 整合素间的相互作用可显著降低紫杉醇和长春新碱所诱导的细胞凋亡。针对卵巢癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤以及神经胶质瘤的多药耐药性研究亦发现 OPN-整合素所参与的通路^[47-48]。此外, Graessmann 等^[49]发现小鼠乳腺癌细胞株 WAP-SVT/t 的亚型 ME-C 可耐受化疗药物(阿霉素)的作用, 进一步研究显示, ME-C 细胞选择性高表达 OPN, OPN 通过 MAPK/ERK 途径抑制 caspase-3 及其下游级联反应, 从而减少细胞凋亡; 而激酶抑制剂 PD98059 可逆转此凋亡抑制效应。因此, 深入探讨 OPN 与多药耐药之间的联系, 可能促进对肿瘤化疗耐药及逆转的认识。

3.6 OPN 的临床应用及意义

由于 OPN 与乳腺癌的浸润、转移密切相关, 大量研究表明其可作为一项有意义的预后指标。Rudland 等^[50]对 333 名 I、II 期乳腺癌患者进行了长达 19 年的随访后发现: 癌组织 OPN 表达阴性患者的中位存活时间大于 228 个月, 而 OPN 阳性患者仅为 68 月; 前者存活率达 94%, 后者仅为 26%, 两者间的差异非常显著($P < 0.01$), 提示乳腺癌组织 OPN 的表达水平与患者预后密切相关。Patani 等^[51]亦得到相似的结论。

除肿瘤组织外, 正常人循环血液中也存在一定水平的 OPN, 而转移性癌症患者——包括乳腺癌、肺癌、前列腺癌等——的血浆 OPN 水平则较正常值高 4~10 倍, 且增高程度与肿瘤分级相关^[52-53]。对健康人群的研究表明, 女性循环 OPN 水平在月经周期内不受性激素变化的影响, 在绝经前后亦无显著差异^[54]。Singhal 等^[55]比较了转移性乳腺癌患者、处于无病生存期的原发性乳腺癌患者及健康志愿者血浆 OPN 水平, 发现 OPN 表达上调提示预后不良。Bramwell 等^[56]连续测定 158 例转移性乳腺癌患者血浆 OPN 水平, 前瞻性分析显示 OPN 浓度越高, 患者无瘤生存期及总生存期越短, 且易发生体内脏器转移。Plumer 等^[57]改良了现有用于血浆 OPN 检测的商业化 ELISA 试剂盒, 大大提高了临床检测手段的精度和敏感性, 甚至可检测出浓度仅为 13.9 pg/ml 的循环 OPN。但由于 OPN 的可变性较大, 如何识别其变异体是临床检测面临的挑战。

4 结语

综上所述, 骨桥蛋白 OPN 在乳腺癌的发生、发展及转归中具有重要作用, 对 OPN 及其抑制剂的研究可能为肿瘤治疗带来新的前景。但是, 目前对于 OPN 自身及其作用机制仍有许多问题尚不明瞭, 有待于进一步证实。

【关键词】 骨桥蛋白;乳腺癌

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

参考文献

- [1] Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 8819 – 8823.
- [2] Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, *et al.* Osteopontin; a molecule for all seasons. *Q J M*, 2002, 95: 3 – 13.
- [3] Christensen B, Nielsen M S, Haselmann K F, *et al.* Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem J*, 2005, 390: 285 – 292.
- [4] Christensen B, Petersen T E, Sørensen E S. Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J*, 2008, 411: 53 – 61.
- [5] Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*, 1999, 285: 1028 – 1032.
- [6] Furger K A, Allan A L, Wilson S M, *et al.* Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 810 – 819.
- [7] Katagiri Y U, Sleeman J, Fujii H, *et al.* CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res*, 1999, 59: 219 – 226.
- [8] Denhardt D T, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl*, 1998, 30 – 31: 92 – 102.
- [9] Hamada Y, Yuki K, Okazaki M, *et al.* Osteopontin-derived peptide SVVYGLR induces angiogenesis *in vivo*. *Dent Mater J*, 2004, 23: 650 – 655.
- [10] Ashkar S, Weber G F, Panoutsakopoulou V, *et al.* Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell mediated) immunity. *Science*, 2000, 287: 860 – 864.
- [11] Rittling S R, Novick K E. Osteopontin expression in mammary gland development and tumorigenesis. *Cell Growth Differ*, 1997, 8: 1061 – 1069.
- [12] Nemir M, Bhattacharyya D, Li X, *et al.* Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J Biol Chem*, 2000, 275: 969 – 976.
- [13] Brown L F, Berse B, Van de Water L, *et al.* Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*, 1992, 3: 1169 – 1180.
- [14] Senger D R, Perruzzi C A, Papadopoulos A, *et al.* Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 996: 43 – 48.
- [15] Nagatomo T, Ohga S, Takada H, *et al.* Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138: 47 – 53.
- [16] El Tanani M K, Campbell F C, Kurisetty V, *et al.* The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17: 463 – 474.
- [17] Shevde L A, Samant R S, Paik J C, *et al.* Osteopontin knockdown suppresses tumorigenicity of human metastatic breast carcinoma, MDA-MB-435. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23: 123 – 133.
- [18] Bellahene A, Castronovo C. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins in human breast cancer. *Am J Pathol*, 1995, 146: 95 – 100.
- [19] Castronovo V, Bellahcene A. Evidence that breast cancer associated microcalcifications are mineralized malignant cells.

- Int J Oncol, 1998, 12: 305 – 308.
- [20] Oyama T, Sano T, Hikino T, *et al.* Microcalcifications of breast cancer and atypical cystic lobules associated with infiltration of foam cells expressing osteopontin. *Virchows Arch*, 2002, 440: 267 – 273.
- [21] Tse G M, Tan P H, Cheung H S, *et al.* Intermediate to highly suspicious calcification in breast lesions: a radio-pathologic correlation. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 110: 1 – 7.
- [22] Tuck A B, O'Malley F P, Singhal H, *et al.* Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*, 1997, 121: 578 – 584.
- [23] Kreunin P, Urquidi V, Lubman D M, *et al.* Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis model using the mass-mapping technique. *Proteomics*, 2004, 4: 2754 – 2765.
- [24] Suzuki M, Mose E, Galloy C, *et al.* Osteopontin gene expression determines spontaneous metastatic performance of orthotopic human breast cancer xenografts. *Am J Pathol*, 2007, 171: 682 – 692.
- [25] Hullinger T G, Taichman R S, Linseman D A, *et al.* Secretory products from PC-3 and MCF-7 tumor cell lines upregulate osteopontin in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem*, 2000, 78: 607 – 616.
- [26] Schneider D, Liaw L, Daniel C, *et al.* Inhibition of breast cancer cell adhesion and bone metastasis by the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357: 282 – 288.
- [27] Tuck A B, Arsenault D M, O'Malley F P. Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells. *Oncogene*, 1999, 18: 4237 – 4246.
- [28] Fisher J L, Field C L, Zhou H, *et al.* Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases—a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 61: 1 – 12.
- [29] Das R, Mahabeleshwar G H, Kundu G C. Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28 593 – 28 606.
- [30] Das R, Philip S, Mahabeleshwar G H, *et al.* Osteopontin; its role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression. *IUBMB Life*, 2005, 57: 441 – 447.
- [31] Das R, Mahabeleshwar G H, Kundu G C. Osteopontin induces AP-1-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2004, 279: 11051 – 11064.
- [32] Tuck A B, Hota C, Wilson S M, *et al.* Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene*, 2003, 22: 1198 – 1205.
- [33] El Tanani M, Platt Higgins A, Rudland P S, *et al.* Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem*, 2004, 279: 20 794 – 20 806.
- [34] Mi Z, Guo H, Wai P Y, *et al.* Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *J Biol Chem*, 2004, 279: 46 659 – 46 667.
- [35] Adwan H, Bauerle T J, Berger M R. Downregulation of osteopontin and bone sialoprotein II is related to reduced colony formation and metastasis formation of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11: 109 – 120.
- [36] Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, 2004, 112: 402 – 412.
- [37] Soares R, Reis Filho J, Gartner F, *et al.* VEGF, TGF α and estrogen receptors: possible crosstalks and interactions. *Am J Pathol*, 2002, 160: 381 – 382.
- [38] Soares R, Guo S, Russo J, *et al.* Role of the estrogen antagonist ICI 182 780 in vessel assembly and apoptosis of endothelial cells. *Ultrastruct Pathol*, 2003, 27: 33 – 39.
- [39] Soares R, Balogh G, Guo S, *et al.* Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Mol*

- Endocrinol, 2004, 18:2333 – 2343.
- [40] Brooks P Cc, Clark R A, Cheresh D A. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science*, 1994, 264: 569 – 571.
- [41] Brooks P Cc, Montgomery A M, Rosenfeld M, *et al.* Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, 79:1157 – 1164.
- [42] Liaw L, Lindner V, Schwartz S M, *et al.* Osteopontin and $\beta 3$ integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium *in vivo* and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration *in vitro*. *Circ Res*, 1995, 77:665 – 672.
- [43] Senger D R, Ledbetter S R, Claffey K P, *et al.* Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha v \beta 3$ integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol*, 1996, 149:293 – 305.
- [44] Malyankar U M, Scatena M, Suchland K L, *et al.* Osteoprotegerin is an $\alpha v \beta 3$ -induced, NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem*, 2000, 275:20 959 – 20 962.
- [45] Chakraborty G, Jain S, Kundu G C. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis *via* autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res*, 2008, 68:152 – 161.
- [46] Aoudjit F, Vuori K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, 2001, 20: 4995 – 5004.
- [47] Zhang Z, Vuori K, Reed J C, *et al.* The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:6161 – 6165.
- [48] Damiano J S, Cress A E, Hazlehurst L A, *et al.* Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, 1999, 93:1658 – 1667.
- [49] Graessmann M, Berg B, Fuchs B, *et al.* Chemotherapy resistance of mouse WAP-SVT/t breast cancer cells is mediated by osteopontin, inhibiting apoptosis downstream of caspase-3. *Oncogene*, 2007, 26:2840 – 2850.
- [50] Rudland P S, Platt Higgins A, El Tanani M, *et al.* Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res*, 2002, 62:3417 – 3427.
- [51] Patani N, Jiang W, Mokbel K. Osteopontin C mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer. *Int J Cancer*, 2008, 122:2646.
- [52] Senger D R, Perruzzi C A, Gracey C F, *et al.* Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res*, 1988, 48:5770 – 5774.
- [53] Brown L F, Papadopoulos Sergiou A, Berse B, *et al.* Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol*, 1994, 145:610 – 623.
- [54] Bautista D S, Saad Z, Chambers A F, *et al.* Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and post-menopausal women. *Clin Biochem*, 1996, 29:231 – 239.
- [55] Singhal H, Bautista D S, Tonkin K S, *et al.* Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res*, 1997, 3:605 – 611.
- [56] Bramwell V H, Doig G S, Tuck A B, *et al.* Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:3337 – 3343.
- [57] Plumer A, Duan H, Subramaniam S, *et al.* Development of fragment-specific osteopontin antibodies and ELISA for quantification in human metastatic breast cancer. *BMC Cancer*, 2008, 8:38 – 48.

(收稿日期:2007-12-10)

(本文编辑:周艳)