

骨桥蛋白在卵巢肿瘤组织中的表达及其临床意义

谭同煊¹, 关 婷¹, 况玉兰¹, 张 伟²

Expression and Clinical Significance of Osteopontin in Ovarian Tumor

TAN Tong-huan¹, GUAN Ting¹, KUANG Yu-lan¹, ZHANG Wei²

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China, 2. Department of Pathology

Abstract: Objective To investigate the expression of osteopontin (OPN) and its clinicopathological significance in ovarian tumors. **Methods** The expression of OPN was detected by immunohistochemistry method. In 54 cases of ovarian malignant tumor tissues, 20 cases of ovarian borderline tumor tissues, 20 cases of ovarian benign tumor tissues and 10 cases of normal ovarian tissues. **Results** The positive expression rate of OPN was 77. 80% in ovarian malignant tumors, much higher than ovarian borderline tumors(35%)and ovarian benign tumors(15%), ($P<0. 01$). There was no OPN expression in normal ovarian tissues. The positive rate of OPN expression was dramatically higher in stage III ~ IV tumor tissues than that in stage I ~ II ones($P=0. 029$). The expression of OPN was also significantly higher in the patients with out metastasis than that in the patients with no metastasis ($P=0. 019$). The overall survival of the patients with OPN positive expression was significantly shorter than that of the negative ones($P=0. 038$). OPN expression was independent factor to decrease overall survival. **Conclusion** Overexpression of OPN may play an important role in the malignant transformation, development, invasion and metastasis of ovarian cancer. It has a potential clinical significance as a prognostic marker in ovarian cancer patients.

Key words: Osteopontin; Ovarian malignant carcinoma; Prognosis; Immunohistochemistry

摘 要:目的 探讨骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在卵巢恶性肿瘤组织中的表达及其与临床病理特征的关系。**方法** 采用免疫组化方法检测 OPN 在 54 例卵巢恶性肿瘤组织,20 例交界性卵巢肿瘤组织,20 例良性卵巢肿瘤组织和 10 例正常卵巢组织中的表达。**结果** OPN 在恶性卵巢肿瘤组织中的阳性表达率为 77. 80%,显著高于交界性卵巢肿瘤的 35%和良性卵巢肿瘤的 15%,差异有统计学意义($P<0. 01$)。OPN 在正常卵巢组织中无表达。OPN 在 III~IV 期卵巢肿瘤组织中的表达明显高于 I~II 期($P=0. 029$);在有卵巢外转移组中的表达明显高于无转移组($P=0. 019$)。OPN 表达阳性组患者的累积生存率明显低于 OPN 阴性组($P=0. 038$)。OPN 表达是患者生存时间的独立影响因素。**结论** OPN 在卵巢恶性肿瘤的发生、发展、浸润、转移中起重要作用。OPN 的表达可作为判断卵巢恶性肿瘤患者预后的指标之一。

关键词: 骨桥蛋白; 卵巢恶性肿瘤; 预后; 免疫组织化学

中图分类号: R737. 31; R711. 75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)01-0047-04

0 引言

骨桥蛋白(osteopontin OPN)是近年研究发现的一种具有多种生物学功能的磷酸化酸性分泌型糖蛋白,它能促进细胞的趋化、黏附和迁移。已发现其在肝癌、食管癌、肺癌等恶性肿瘤组织中高表达,且

与肿瘤的侵袭、转移等恶性行为密切相关^[1-3]。卵巢癌是妇科恶性肿瘤中威胁最大的疾病。关于卵巢恶性肿瘤与 OPN 的关系国内外研究较少。本研究采用免疫组化方法检测卵巢恶性肿瘤组织中 OPN 的表达并探讨其与临床病理特征和患者预后之间的关系。

收稿日期:2007-12-27;修回日期:2008-03-24
作者单位:1. 510010 广州军区广州总医院妇产科,2. 病理科
通信作者:关婷, E-mail: lxgtlht@21cn. com
作者简介:谭同煊(1982-),女,硕士在读,主要从事卵巢肿瘤研究

1 资料与方法

1. 1 资料

选择 1997 年 1 月~2007 年 3 月在我院妇科手术治疗的卵巢恶性肿瘤患者 54 例(浆液性囊腺癌

23 例,黏液性囊腺癌 9 例,子宫内膜样腺癌 7 例,移行细胞癌 6 例,透明细胞癌 5 例,内胚窦瘤 4 例),平均年龄(53 ± 7.45)岁。根据 FIGO,2000 年卵巢恶性肿瘤的临床病理分期和病理分级标准,54 例卵巢恶性肿瘤中,I 期 7 例,II 期 7 例,III 期 30 例,IV 期 10 例;高分化者 7 例,中分化者 15 例,低分化者 32 例。选择同期交界性卵巢肿瘤患者 20 例(交界性浆液性囊腺瘤 11 例,交界性黏液性囊腺瘤 9 例),平均年龄(50 ± 8.21)岁。选择良性卵巢肿瘤患者 20 例(卵巢浆液性囊腺瘤 13 例,黏液性囊腺瘤 7 例),平均年龄(52 ± 5.69)岁。选择因子宫肌瘤或一侧卵巢疾病行双侧卵巢切除的患者 10 例,取其正常卵巢组织,平均年龄(50 ± 7.29)岁。所有病例均经病理证实,均无严重内科疾病或其他恶性肿瘤,术前未接受放疗或化疗。对恶性肿瘤组中 24 例进行追踪随访,随访时间 2~95 月,平均 50.54 月。

1.2 方法

切除标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,2 μ m 连续切片,一张行 HE 染色,一张行免疫组化检测。免疫组化采用 Envision 法,Envision 试剂盒由基因公司提供。具体方法:切片脱蜡水化,双氧水阻断内源性酶,EDTA8.0 缓冲液微波修复,室温冷却 20 min,加鼠抗人 OPN 单克隆抗体(北京中杉公司),置湿盒 37℃ 孵育 40 min,加 Envision 试剂盒的二抗,置湿盒 37℃ 孵育 30 min,DAB 显色液显色 1~2 min,加入苏木素复染液中复染 4 min,盐酸分化,酒精干燥,TO 透明,中性树胶封片。试剂要求的乳腺癌组织的免疫组化片作为阳性对照,PBS 代替一抗所做的免疫组化片作为阴性对照。

1.3 结果判断

OPN 定位于细胞浆中,呈棕黄色,细胞核不着色。阳性染色指显微镜下观察细胞内具有清晰可见的定位准确的棕黄色颗粒而背景清晰。参照 Mattern

等^[4]提出的半定量方法,从两方面进行评分:(1)染色深浅度。未见染色为 0,轻度染色为 1,中度染色为 2,深度染色为 3。(2)染色细胞的百分比。未见染色细胞为 0,染色细胞 <25% 为 1,染色细胞 25%~50% 为 2,染色细胞 >50% 为 3。将这两方面评分相加计总分。0~1 分为(-),2~4 分为(+),>4 分为(++)。每例的评分均为高倍($\times 400$)镜下观察 10 个视野求得的平均分。

1.4 统计学方法

等级资料用秩和检验,Kaplan-Meier 法计算累积生存率及中位生存时间,并绘制生存曲线,Log-rank 检验比较各组生存曲线有无差异,Cox 模型进行生存分析,所有数据分析均在 SPSS 14.0 统计软件上进行。

2 结果

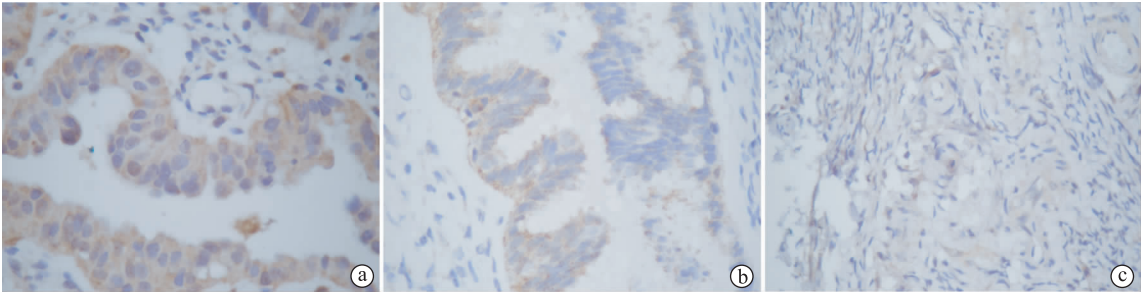
2.1 OPN 在恶性、交界性及良性卵巢肿瘤组织中的表达

OPN 定位于胞浆中,在恶性卵巢肿瘤组织中的阳性表达率高于交界性、良性卵巢肿瘤组织和正常卵巢组织,OPN 在交界性和良性卵巢肿瘤组织中的表达差异无统计学意义,但均高于在正常卵巢组织中的表达,见表 1、图 1。

表 1 OPN 在恶性、交界性及良性卵巢肿瘤组织中的表达
Tab 1 The expression of OPN in different ovarian tumor

Group	n	OPN expression			Positive rate (%)
		++	+	-	
Malignant	54	22	20	12	77.80*
Borderline	20	1	6	13	35.00**
Benign	20	1	2	17	15.00 Δ
Normal	10	0	0	10	0 $\Delta\Delta$

*: $P < 0.01$, vs. borderline, benign and normal group;
**: $P > 0.05$, vs. benign group; Δ : $P > 0.05$, vs. normal;
 $\Delta\Delta$: $P < 0.05$, vs. borderline



a: The strong positive expression of OPN in the ovarian malignant carcinoma(++)
b: The moderate positive expression of OPN in the ovarian borderline tumors(+)
c: The moderate positive expression of OPN in the ovarian benign tumors(+)

图 1 OPN 在不同卵巢肿瘤组织中的表达(Envision, $\times 400$)

Fig 1 The expression of OPN in different ovarian tumor(Envision, $\times 400$)

2.2 OPN 在卵巢恶性肿瘤组织中的表达及其与临床病理特征的关系

2.2.1 OPN 在不同类型卵巢恶性肿瘤组织中的表达 OPN 在不同类型卵巢恶性肿瘤组织中的表达差异无统计学意义,见表 2。

表 2 OPN 在不同类型卵巢恶性肿瘤组织中的表达
Tab 2 The expression of OPN in different types of ovarian tumor

Histological category	n	OPN expression			P
		++	+	-	
Serous	23	7	11	5	0.935
Mucinous	9	5	3	1	
Endometrioid	7	3	1	3	
Transitional cell	6	2	4	0	
Clear cell	5	3	1	1	
Endodermal sinus	4	2	0	2	

2.2.2 OPN 表达与卵巢恶性肿瘤临床病理特征的关系 OPN 在Ⅲ~Ⅳ期卵巢恶性肿瘤组织中的表达高于Ⅰ~Ⅱ期($P=0.029$),见表 3。在有卵巢外

表 3 OPN 在卵巢恶性肿瘤组织中的表达与临床病理特征的关系

Tab 3 The expression of OPN and its relationship with clinicopathological character in ovarian cancer

Clinicopathological character	n	OPN expression			P
		++	+	-	
Clinical stage					
I ~ II	14	3	5	6	0.029
III ~ IV	40	19	15	6	
Age					
>50	35	13	14	8	0.560
<50	19	9	6	4	
Cell grade					
high	7	3	1	3	0.220
middle	15	4	6	5	
low	32	15	13	4	
Adhesion					
yes	40	17	16	7	0.341
no	14	5	4	5	
Ascitic fluid					
yes	38	15	13	10	0.477
no	16	7	7	2	
Envelop					
intact	45	18	18	9	0.733
no	9	4	2	3	
Metastasis*					
yes	35	15	14	6	0.019
no	12	1	6	5	

*:because of long time,a small pieces of message are lost

转移组中的表达高于无转移组,差异有统计学意义($P=0.019$)。OPN 表达与年龄、细胞分化、卵巢与周围组织有无粘连、有无腹水、肿瘤包膜完整与否无关($P>0.05$)。

2.3 OPN 表达与患者生存情况的关系

OPN 阳性组的累积生存率明显低于阴性组,OPN 阳性表达组的中位生存时间为 44 个月,而阴性组为 58 个月(Log-rank 检验, $\chi^2=4.288$, $P=0.038$),见图 4。

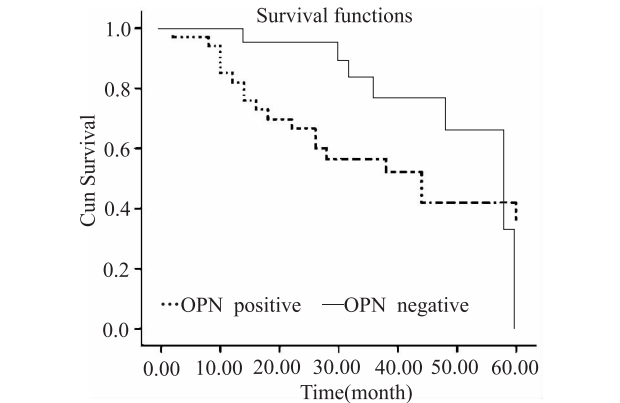


图 4 OPN 阳性组和阴性组的生存曲线
Fig 4 Survival curves of OPN positive and negative expression groups

2.4 OPN 的表达对判断预后的意义

Cox 模型多因素分析结果显示,年龄、有无卵巢外转移、肿瘤包膜是否完整及 OPN 阳性表达对患者生存时间的影响差异有统计学意义,见表 4。

表 4 影响患者生存时间因素的 Cox 模型分析

Tab 4 The Cox model to investigate factors affected the survival time of patients						
	B	SE	Wald	df	Sig	Exp(B)
Clinical stage	-0.227	0.217	1.101	1	0.294	0.797
Age	0.045	0.005	79.526	1	0.000	1.046
Metastasis	4.172	0.425	96.439	1	0.000	64.844
Adhesion	-0.384	0.237	2.634	1	0.105	0.681
Ascitic fluid	0.160	0.215	0.549	1	0.459	1.173
Envelop	-2.587	0.219	139.209	1	0.000	0.075
Cell grade	-0.197	0.186	1.113	1	0.292	0.821
OPN	-0.239	0.094	6.499	1	0.011	0.788

3 讨论

OPN 是首先在骨基质中发现的,它存在于正常人的所有体液和矿化组织的蛋白基质中,但含量很少,仅发挥其生理作用。人 OPN 共有 314 个氨基酸,分子量为 41~75 Kda,依分子中磷酸化及糖基

化而定,OPN 有一个 N 端信号序列及甘-精-甘-天冬-丝氨酸细胞黏附序列,并且含多个功能结合区,如钙结合域、凝血酶裂解位点及整合素结合序列等,在细胞的黏附、迁移、炎症反应、信号转导、组织修复及细胞凋亡中起重要作用^[5]。

近年研究发现,在人类多种恶性肿瘤组织中出现 OPN 蛋白过量表达的现象。但关于卵巢肿瘤组织中 OPN 表达的研究报道较少,国内仅见少数报道^[6]。本研究结果显示 OPN 在卵巢恶性肿瘤组织中高表达,阳性表达率为 77.80%,明显高于交界性卵巢肿瘤的 35%和良性卵巢肿瘤的 15%,差异有统计学意义。OPN 在正常卵巢组织中无表达。提示 OPN 的高表达与细胞的恶性转化密切相关。OPN 在正常卵巢组织、良性、交界性和恶性卵巢肿瘤组织中的表达逐渐增高,说明 OPN 与卵巢恶性肿瘤的发生、发展密切相关。OPN 在Ⅲ~Ⅳ期卵巢肿瘤组织中的表达明显高于Ⅰ~Ⅱ期,在有卵巢外转移组中的表达明显高于无转移组,提示 OPN 在肿瘤发展及浸润、转移中起重要作用。对 24 例病人的追踪随访结果显示,OPN 阳性组的累积生存率明显低于 OPN 阴性组,其中位生存期分别为 44 个月和 58 个月。多因素分析显示 OPN 阳性表达是影响患者生存时间的独立因素,提示 OPN 的表达可作为判断预后的指标之一。OPN 在不同类型卵巢恶性肿瘤组织中的表达差异无统计学意义,说明 OPN 的表达与肿瘤组织来源无关,是肿瘤所共有的。这与 OPN 在其他器官的恶性肿瘤组织中也高表达相符合。

关于 OPN 在肿瘤发生、发展中的具体作用机制目前仍不很清楚。有研究发现 OPN 通过信号转导途径促使肿瘤细胞快速通过生长周期,加快增殖。OPN 能介导肿瘤细胞黏附,并且结合整合素激活相关信号通路引起肿瘤细胞分泌基质金属蛋白酶等降解细胞外基质,引发细胞骨架蛋白和信号蛋白等磷酸化,促进细胞迁移,进一步促进肿瘤细胞的浸润、转移。OPN 还通过改变宿主免疫反应,削弱免疫细胞肿瘤杀伤作用。还可以通过增强细胞抗凋亡作用,促进肿瘤新生血管形成等促进肿瘤的发生、发展^[7-10]。

目前骨桥蛋白正引起肿瘤学者的关注。相信随着研究的不断深入,OPN 可能会成为辅助肿瘤诊断和判断预后的一个标志物,并且可能为肿瘤的治疗提供一个新靶点。

参考文献:

[1] Xie H, Song J, Du R, et al. Prognostic significance of osteopontin in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. Dig Liver Dis, 2007, 39(2):167-172.

[2] Kita Y, Natsugoe S, Okumura H. Expression of osteopontin in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. Br J Cancer, 2006, 95(5):634-638.

[3] Hu Z, Lin D, Yuan J, et al. Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(13):4646-4652.

[4] Mattem J, Koomagi R, Volmm. Association of vascular endothelial PTBE growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma [J]. British J of Cancer, 1996, 73(7):931-934.

[5] Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling [J]. Exp Wncol, 2004, 26(3):179-184.

[6] 朱耀魁, 王晓玉, 夏明翰, 等. 骨桥蛋白在卵巢肿瘤组织的表达及其与恶性肿瘤侵袭转移的关系 [J]. 暨南大学学报, 2006, 27(2):251-256.

[7] Das R, Mahabeleshwar GH, Krndu GC. Osteopontin induces APE-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2004, 19, 279(12):11051-11064.

[8] Tahara E. Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer [J]. Verb Dtsch Ges Pathol, 2000, 84:43-49.

[9] Fruger KA, Allan AL, Wilson SM, et al. Beta(3) integrin expression increase breast carcinoma cell responsive to the malignancy-enhancing effects of osteopontin [J]. Mol-Cancer-Res, 2003, 1(11):810-819.

[10] Sulzbacher I, Bimer P, Trieb K, et al. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors [J]. Virchows Arch, 2002, 441(4):345-349.

[编辑:周永红;校对:马福元]