

OPN在肺鳞癌组织中高表达及其临床意义

何 嵘, 刘永煜

辽宁省肿瘤医院胸外科, 辽宁 沈阳 110042

[摘要] **背景与目的:** 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种分泌型磷酸化糖蛋白, 在多种肿瘤组织中异常高表达, 与肿瘤的发生、发展及预后有密切关系。当肿瘤细胞侵袭细胞外基质时, OPN可通过NF- κ B依赖的信号转导通路促进肿瘤细胞高表达基质金属蛋白酶(matrix metal protease, MMPs), 引起细胞基底膜和细胞外基质降解, 从而导致肿瘤发生浸润和转移。该研究通过检测肺鳞状上皮细胞癌(lung squamous cell carcinoma, SCC)患者肿瘤组织中OPN的蛋白水平, 研究其与各临床指标的关系及其意义。**方法:** 采用免疫组织化学染色法检测265例石蜡包埋的肺SCC组织和24例正常肺组织中OPN蛋白表达水平。**结果:** OPN在肺SCC组织表达阳性率为64.5%, 显著高于正常肺组织(阳性率为29.2%, $P<0.001$)。OPN在肺SCC晚期(Ⅲ+Ⅳ期)表达阳性率为78.4%, 显著高于早期(Ⅰ+Ⅱ期)组织(阳性率为54.5%, $P<0.001$)。在 T_{3-4} 分期的肺SCC组织中OPN表达阳性率为76.9%, 显著高于 T_{1-2} 分期(59.4%, $P=0.007$)。OPN的表达与肺SCC的淋巴结转移情况显著相关, 在有淋巴结转移的癌组织中表达阳性率为73.4%, 高于无淋巴结转移的癌组织(阳性率为51.4%, $P<0.001$)。**结论:** OPN参与肺SCC的发生、发展和淋巴结转移, 提示其在肺SCC的诊断、判断预后及治疗方面具有重要参考价值。

[关键词] 骨桥蛋白; 肺鳞状上皮细胞癌; 淋巴结转移

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2015.10.010

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2015)10-0812-05

Expression of OPN protein in lung squamous cell carcinoma tissue and its clinical significance HE Rong, LIU Yongyu (Department of Thoracic Surgery, Liaoning Cancer Hospital and Institute, Shenyang 110042, Liaoning, China)

Correspondence to: LIU Yongyu E-mail: profyongyuliu@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Osteopontin (OPN) is a secreted glyco-phosphoprotein, which is overexpressed by numerous human cancers, involved in tumor occurrence, development and prognosis. OPN up-regulates matrix metal proteases (MMPs) expression in a NF- κ B-dependent fashion during extracellular matrix (ECM) invasion causing degradation of cell basement membrane and ECM leading to tumor invasion and metastasis. The aim of this study was to examine the protein level of OPN in a large number of tissue samples from patients with lung squamous cell carcinoma (SCC), and evaluate its potential clinical value. **Methods:** The OPN protein levels in 265 tumor tissue samples and corresponding 24 normal lung tissue samples were examined by immunohistochemical (IHC) analysis. **Results:** IHC results showed that the positive rate of OPN was 64.5% in the SCC tissues, which was significantly higher than that in normal alveoli tissues (29.2%, $P<0.001$). The positive rate of OPN expression in late stage (Ⅲ+Ⅳ) tissues was 78.4%, significantly higher than that in early stage (Ⅰ+Ⅱ) tissue(positive rate 54.5%, $P<0.001$). The positive rate of OPN expression in T_{3-4} stage (Ⅲ+Ⅳ) tissue was 76.9%, significantly higher than that in T_{1-2} stage tissue (positive rate 59.4%, $P=0.007$). The expression of OPN was significantly correlated with the status of lymph node metastasis (LNM). The positive rate in the tumor tissue with LNM was 73.4%, significantly higher than that without (positive rate 51.4%, $P<0.001$). **Conclusion:** The level of OPN protein was overexpressed in lung cancer tissues, involved in SCC carcinogenesis and LNM. It is indicated that OPN has an important reference value in diagnosis, prognosis and therapy of SCC.

[Key words] Osteopontin; Lung squamous cell carcinoma; Lymph node metastasis

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在多种正常组织和细胞中表达,包括骨骼、肾脏、血管、活化的巨噬细胞及淋巴细胞等,是一种分泌型钙结合磷酸化糖蛋白。人OPN基因位于4q13,包含7个外显子和6个内含子,相对分子质量约为 44×10^3 ^[1]。OPN蛋白含有一个精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)的特殊结构序列,此序列与细胞黏附功能相关^[2]。OPN含有凝血酶作用位点,它可被凝血酶分解暴露出隐秘的C末端以及整合素结合基序,从而可以与细胞外基质中整合素CD44v6、41、91结合,参与肿瘤细胞的浸润和转移^[3]。目前,已有大量研究表明它在多种实体瘤中异常高表达,并与肿瘤的复发和转移密切相关^[4]。

近年来随着城市工业化的进展,肺癌已经成为我国第一大癌症,其发病率和死亡率均位于各种肿瘤首位。肿瘤的复发和转移是威胁肺癌患者生存的主要因素,5年生存率仅约为15%^[5]。肺鳞状上皮细胞癌(lung squamous cell carcinoma, SCC)是非小细胞肺癌的主要病理类型,本研究使用免疫组织化学染色的方法、大样本分析肺SCC组织中OPN的蛋白水平及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象及组织样本

所有临床组织样本取自2009年11月—2012年7月辽宁省肿瘤医院胸部外科收治的肺癌患者。所有患者手术前均未接受过放射治疗或化学药物治疗。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)2004年的肺癌组织学分型标准进行肺癌组织学分型,根据国际抗癌联盟(International Union Against Cancer, UICC)2002年发布的第6版肺癌TNM分期系统进行肺癌分期。265例样本采用10%甲醛固定,石蜡包埋肺SCC组织用于免疫组织化学染色。患者男性230例,女性35例,中位年龄60岁(31~81岁);I+II期154例,III+IV期111例;低分化125例,中高分化140例;有淋巴结转移158例,无淋巴结转移

117例。另取癌组织旁的24例正常肺组织作为对照。具体临床资料信息见表1。

表1 肺SCC组织中OPN蛋白的表达情况

Tab. 1 Expression of OPN in tissue samples from SCC patients

Characteristic	N	Expression of OPN		P value
		[n(%)]		
		-	+	
Normal lung	24	17(70.8)	7(29.2)	0.001
SCC	265	94(35.5)	171(64.5)	
Gender				0.875
Male	230	82(35.7)	148(64.3)	
Female	35	12(34.3)	23(65.7)	
Age/year				0.022
> 60	147	61(41.5)	86(58.5)	
≤60	118	33(28.0)	85(72.0)	
Smoking history				0.832
Yes	223	80(35.9)	143(64.1)	
No	41	14(34.1)	27(65.9)	
Missing	1	-	-	
Family history				0.153
Yes	32	8(25.0)	24(75.0)	
No	202	77(38.1)	125(61.9)	
Missing	31			
Stage				<0.001
I + II	154	70(45.5)	84(54.5)	
III + IV	111	24(21.6)	87(78.4)	
T stage				0.007
T ₁₋₂	187	76(40.6)	111(59.4)	
T ₃₋₄	78	18(23.1)	60(76.9)	
LNM				<0.001
Yes	158	42(26.6)	116(73.4)	
No	107	52(48.6)	55(51.4)	
Grade				0.495
High/moderate	140	47(33.6)	93(66.4)	
Poor	125	47(37.6)	78(62.4)	

P value: Mann-Whitney U test; SCC: Squamous cell carcinoma; LNM: Lymph node metastasis

1.2 免疫组织化学染色方法

采用免疫组织化学SP法,鼠源OPN抗人单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,稀释度为1:100。免疫组织化学染色试剂盒购自北京中

杉金桥生物科技有限公司。染色操作程序参照试剂说明书进行。以PBS代替一抗作为阴性对照。

由2位病理科医师显微镜下独立观察染色情况。OPN蛋白在细胞质着色，染色强度判断标准为：无染色0分，轻度染色(浅黄色)1分，中度染色(棕黄色)2分，强染色(黄褐色)3分；染色面积判断标准为：无细胞染色0分，<25%细胞染色1分，25%~50%细胞染色2分，>50%细胞染色3分。2种积分相乘，按照0分为“-”，1~2为“+”，3~4为“++”，6~9为“+++”的标准进行半定量判断， \geq “++”为阳性，“-、+”为阴性。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0软件(SPSS INC, IL, USA)进

行统计学分析。使用非参数检验Mann-Whitney U检验来比较免疫组织化学染色结果的组间差异。所有比较均为双侧的， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 OPN蛋白在肺癌组织中的表达显著升高

OPN蛋白的免疫组化染色显示主要为细胞质着色。OPN在SCC组织阳性表达率为64.5%(171/265，图1A)，正常肺组织的阳性表达率为29.2%(7/24，图1B，表1)，两者差异有统计学意义($P=0.001$)。OPN在 ≤ 60 岁的肺癌患者中表达阳性率显著高于>60岁者的阳性率(72.0% vs 58.5%， $P=0.022$)。而OPN的表达与肺SCC患者的性别、吸烟史和家族史无相关性($P>0.05$)。

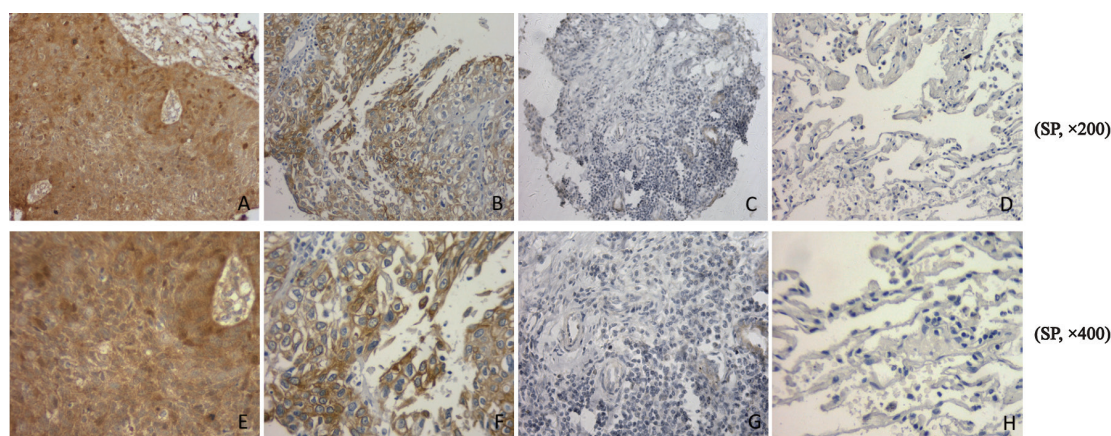


图1 利用免疫组织化学染色方法检测OPN在肺SCC细胞中的表达

Fig. 1 Detection of OPN expression in lung squamous cell carcinoma by immunohistochemistry

A,E: The strong positive expression of OPN in tumor tissues; B,F: The positive expression of OPN in tumor tissues; C,G: The negative expression of OPN in tumor tissues; D,H: The negative expression of OPN in normal lung tissues

2.2 OPN蛋白在肺癌组织中的表达与肺SCC临床病理特征的关系

OPN在SCC晚期(Ⅲ+Ⅳ期)表达阳性率为78.4%(87/111)显著高于早期(Ⅰ+Ⅱ期)组织中的阳性率(54.5% 84/154, $P<0.001$)。在 T_{3-4} 分期的肺SCC组织中OPN表达阳性率为76.9%(60/78)，显著高于 T_{1-2} 分期(59.4%，111/187, $P=0.007$)。OPN的表达与SCC的淋巴结转移情况显著相关，在有淋巴结转移的癌组织中表达阳性率为

73.4%(116/158)，高于无淋巴结转移的癌组织(阳性率为51.4%，55/107, $P<0.001$)。在低、中、高分化的肺癌组织中TIMP2的阳性率分别为62.4%(78/125)和66.4%(93/140)，两者差异无统计学意义($P=0.495$)。

3 讨 论

恶性肿瘤的一个重要特征是浸润和转移。肿瘤细胞通过降解基底膜和细胞外基质，在这

种降解过程中发挥重要作用的是基质金属蛋白酶(matrix metal protease, MMPs)^[6]。当肿瘤细胞侵袭细胞外基质时, OPN可促进肿瘤细胞产生MMPs, 引起细胞基底膜和细胞外基质降解, 从而导致肿瘤发生浸润和转移^[4]。Gao等^[7]研究显示OPN与其受体CD44v6和 $\alpha v \beta 3$ 结合后也可促进肿瘤细胞发生浸润和转移。

在本研究中, OPN表达与肺SCC的淋巴结转移情况相关, 有淋巴结转移的肺SCC组织OPN表达的阳性率显著升高。而经淋巴结转移往往是肺癌细胞发生转移的主要途径, 预示了患者的不良预后。Sun等^[8]研究非小细胞肺癌组织中OPN和CD44v6的表达情况, 发现两者的联合检测是肿瘤复发和生存率的独立预后因素。此外, Chen等^[9]针对OPN基因多态性与非小细胞肺癌生存率及发生骨转移概率关系的研究, 指出OPN-443C/T是潜在的判断肺癌患者预后及预测其是否发生骨转移的指标。喻钧等^[10]采用免疫组织化学方法研究显示OPN在肺癌组织中显著高于在正常肺组织中的表达水平, 并且与肺癌的组织学类型有关, 在肺SCC组织中(阳性率为82.9%, 29/35)表达明显高于肺腺癌(阳性率为29.4%, 10/34), 但是样本量较小。在本研究中, 通过大样本(265例)检测肺SCC组织中OPN的表达情况, 阳性表达率为64.5%。

本研究中, 晚期SCC患者肿瘤组织中表达量显著升高($P < 0.001$), 并与患者的T分期显著呈正相关($P = 0.007$)。该结果与文献报道一致。Rud等^[11]研究表明, OPN在非小细胞肺癌中的表达水平与肿瘤临床分期及肿瘤大小有关, 并且肿瘤组织中OPN阳性表达的患者血浆中OPN的蛋白水平高于肿瘤组织中OPN阴性表达的患者。Likui等^[12]研究结果显示, OPN mRNA的表达水平与肿瘤的TNM分期及是否有淋巴结转移相关, OPN mRNA高表达的结肠癌患者的无病生存期及总生存期都较OPN mRNA低表达的结肠癌患者短, 提示OPN可作为判断结肠癌预后的独立因素。这些结果提示OPN在促进肿瘤的进展过程中发挥着重要作用。

OPN在其他肿瘤中的表达情况。Nabih

等^[13]研究结果显示, 检测OPN在丙肝感染的肝癌患者血浆中的蛋白水平可以提高肝癌患者的诊断率和预后判断。此外, Zhu等^[14]针对374例肝癌患者的研究表明, 肿瘤OPN的表达水平联合微环境相关的瘤周巨噬细胞(peritumoral macrophages, PTMs)浸润程度, 对于判断肝癌患者尤其是早期病变患者的复发具有意义。肿瘤相关巨噬细胞可促进癌细胞的血行播散尤其是肝脏转移。Imano等^[15]研究表明, 在结肠直肠癌的中央区域的巨噬细胞产生OPN, 促进肿瘤新血管形成, 导致结肠癌发生肝脏转移, 故OPN也可能成为潜在的抗肿瘤血管形成的作用位点。此外, 多项研究显示, OPN在卵巢癌细胞中呈异常高表达^[16-17]。

最近大量研究表明, OPN在肿瘤的进展和转移中发挥重要作用, 在肿瘤组织中的异常高表达及与肿瘤复发转移的明显关系, 使它可以成为诊断恶性肿瘤及判断预后的潜在标志物。本研究中, 通过检测OPN在大样本肺SCC组织中的表达情况, 发现其与TNM分期、淋巴结转移情况呈显著正相关, 提示其可能作为SCC预后的标志物以及潜在治疗靶点。

[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 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(23): 8819-8823.
- [2] PRINCE C W, OOSAWA T, BUTLER W T, et al. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone [J]. J Biol Chem, 1987, 262(6): 2900-2907.
- [3] SHARIF S A, DUX, MYLES T, et al. Thrombin-activatable carboxypeptidase B cleavage of osteopontin regulates neutrophil survival and synoviocyte binding in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(10): 2902-2912.
- [4] WAI P Y, KUO P C. The role of osteopontin in tumor metastasis [J]. J Surg Res, 2004, 121(2): 228-241.
- [5] CHEN W, ZHENG R, ZHANG S, et al. Annual report on status of cancer in China, 2010 [J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(1): 48-58.
- [6] STETLER-STEVENSON W G, LIOTTA L A, KLEINER D E Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis [J]. FASEB J, 1993, 7(15): 1434-1441.
- [7] GAO C, GUO H, DOWNEY L, et al. Osteopontin-dependent

- CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(12): 1871-1878.
- [8] SUN B S, LI Y, ZHANG Z F, et al. Osteopontin combined with CD44v6, a novel prognostic biomarker in non-small cell lung cancer undergoing curative resection [J]. *Ann Thorac Surg*, 2013, 96(6): 1943-1951.
- [9] CHEN Y, LIU H, WU W, et al. Osteopontin genetic variants are associated with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients and bone metastasis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32: 45.
- [10] 喻 钧, 潘铁成, 李 军, 等. OPN、CD44v6及MMP-2在肺鳞癌、腺癌中的表达及临床意义 [J]. *中国肺癌杂志*, 2006, 11(4): 325-328.
- [11] RUD A K, BOYE K, OIJORDSBAKKEN M, et al. Osteopontin is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 540.
- [12] LIKUI W, HONG W, SHUWEN Z. Clinical significance of the upregulated osteopontin mRNA expression in human colorectal cancer [J]. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14(1): 74-81.
- [13] NABIH M I, AREF W M, FATHY M M. Significance of plasma osteopontin in diagnosis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Arab J Gastroenterol*, 2014, 15(3-4): 103-107.
- [14] ZHU W, GUO L, ZHANG B, et al. Combination of osteopontin with peritumoral infiltrating macrophages is associated with poor prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(4): 1304-1313.
- [15] IMANO M, OKUNO K, ITOH T, et al. Increased osteopontin-positive macrophage expression in colorectal cancer stroma with synchronous liver metastasis [J]. *World J Surg*, 2010, 34(8): 1930-1936.
- [16] SONG G, CAI Q F, MAO Y B, et al. Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival and increases HIF-1 α expression through the PI3-K/Akt pathway [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(10): 1901-1907.
- [17] MOSZYNSKI R, SZUBERT S, SZPUREK D, et al. Role of osteopontin in differential diagnosis of ovarian tumors [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2013, 39(11): 1518-1525.

(收稿日期: 2014-11-05 修回日期: 2015-05-21)

《抗癌》杂志征稿启事

《抗癌》杂志于1988年创刊, 主管单位为上海市科学技术协会, 主办单位为上海市抗癌协会。杂志刊号: CN31-1664/R, ISSN 1008-3065。征稿栏目及内容如下。

一、《抗癌博客》栏目

记录癌症患者自强不息、热爱生活、勇敢面对病痛和生活压力的故事, 以启发其他患者自信和勇敢的精神, 帮助他们树立积极、知足、感恩和达观的生活态度。可以是你的亲身经历, 也可以是医生治疗患者时的所见所闻, 或是你身边发生的故事。

二、《正谊明道、大医精诚》栏目

真实记录医生对患者关怀的动人事迹, 或是爱岗敬业、精益求精的专业精神, 以让更多医道同仁敬重和学习。可以讲述患者眼里的医生, 也可以记录你的同事。

以上稿件《抗癌》杂志编辑部在发表时有修改的权力, 如果不同意修改请注明, 谢谢! 欢迎各位作者踊跃投稿。

来稿请寄: 上海市东安路270号6号楼3楼《抗癌》杂志社

邮 编: 200032

电 话: 021-64043766

传 真: 021-64043766

E-mail: anti-cancer@163.com