

文章编号:1005-6947(2006)04-0250-03

· 乳腺外科专题研究 ·

乳腺钙化组织中骨桥蛋白的表达及其临床意义

郇金亮¹, 王强², 邢丽¹, 秦贤举¹, 马旺扣¹, 彭御冰¹, 高志光¹

(1. 上海市第八人民医院 普通外科, 上海 200235; 2. 第二军医大学附属长征医院 普通外科, 上海 200003)

摘要:目的 检测骨桥蛋白(osteopontin protein, OPN) mRNA在含钙化灶乳腺组织中的表达,及其在乳腺癌转移发生发展中的意义。方法 采用RT-PCR法检测128例乳腺病变组织及相应癌旁乳腺组织和9例乳腺癌转移淋巴结中骨桥蛋白mRNA的表达。结果 骨桥蛋白mRNA表达在含钙化灶乳腺癌组织及转移淋巴结组织中表达最高,良性钙化灶乳腺组织次之,而在癌旁乳腺组织及良性无钙化病变组织中表达最低,差异有显著意义($P < 0.05$)。结论 骨桥蛋白的表达与乳腺癌组织钙化有关,并可能与乳腺癌的发生有关,检测其表达水平,可望能指导临床治疗,评判患者预后。

关键词:乳房肿瘤/病因学;钙化,病理学;骨桥蛋白

中图分类号: R737.9; R730.231.3

文献标识码: A

Expression and clinical significance of osteopontin in calcified breast tissue

HUAN Jin-liang¹, WANG Qiang², XING Li, QIN Xian-ju¹, MA Wang-kou¹,
PENG Yu-bing¹, GAO Zhi-guang¹

(1. Department of General Surgery, The Eighth People's Hospital, Shanghai 200235, China; 2. Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200235, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of osteopontin(OPN) mRNA in breast tissues containing microcalcifications and the significance of OPN in tumor pathogenesis and metastasis of breast cancer. **Methods**

The expression of OPN mRNA in 128 samples of tissues of breast lesions and adjacent breast tissues and 9 samples of metastatic lymph nodes were examined. **Results** The expression of OPN mRNA was highest in calcified foci of breast cancer tissues and in metastatic lymph nodes, lower in calcified foci of benign breast tissues and lowest in breast tissues adjacent to breast cancer and in benign tissues without calcification. The differences between the different tissues were significant (all $P < 0.05$). **Conclusions** Expression of OPN mRNA is related to calcification of breast cancer tissue and to the development of breast cancer. Determination of OPN mRNA expression can be expected to be a guide to clinical therapy and prediction of the prognosis of breast cancer patients.

Key words: Breast Neoplasms/etiol; Calcification, Pathologic; Osteopontin

CLC number: R737.9; R730.231.3

Document code: A

文献报道^[1],行乳腺X线检查的妇女,有1/3~2/3可发现钙化;而乳腺癌患者,钙化的发生率高达35%~70%。因此确定乳腺内钙化是早期发现乳腺癌及制定正确治疗方案的可靠保证之一。此外,研究还发现,含钙化组织的乳腺恶性肿瘤,其

骨桥蛋白(OPN)表达明显增高^[2]。

为研究乳腺钙化与乳腺癌的关系及其骨桥蛋白的表达情况,笔者对128例乳腺病变组织及其癌旁乳腺组织和9例乳腺癌转移淋巴结进行骨桥蛋白mRNA的检测,报告如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料

标本来源于第二军医大学附属长征医院普通外

收稿日期:2006-02-21; 修订日期:2006-03-11。

作者简介:郇金亮,男,山东青州人,上海市第八人民医院主治医师,博士,主要从事肿瘤外科和微创外科方面的研究。

通讯作者:郇金亮 E-mail:huanjl2000@126.com。

科,患者均为2002年11月—2003年7月就诊的128例女性乳腺疾病患者(表1)。

按病变性质分组。

(1)乳腺癌组:41例,均经病理检查证实。其中含钙化病灶的36例。(2)癌旁组织组:41例,标本取自上述患者距肿瘤边缘5cm以远的乳腺组织,经病理检查证实无癌浸润。(3)转移淋巴组:9例,均为病理证实有淋巴结转移者。(4)乳腺良性病变:87例,包括乳腺囊性增生病38例,乳房纤维腺瘤18例,乳腺囊性增生伴腺瘤形成12例,乳管内乳头状瘤7例,乳腺腺病12例。其中含钙化病灶的70例。(5)正常乳腺组:87例,标本取自良性病变2cm以远的乳腺组织,经病理检查证实为无病变的正常乳腺组织。

Mammotome 微创旋切系统切取含钙化组织,液氮保存。

表1 128例病变患者的一般资料

| 局部病变特点 | 病例数 | 病理性质 | | 年龄(岁) | |
|--------|-----|------|----|-------|-----|
| | | 良性 | 恶性 | <45 | ≥45 |
| 含钙化灶病变 | 106 | 70 | 36 | 70 | 36 |
| 无钙化灶病变 | 22 | 17 | 5 | 10 | 12 |
| 合计 | 128 | 87 | 41 | 80 | 48 |

1.2 实验方法

1.2.1 样本处理 样本加入1 000 μL Trizol,匀浆后室温放置5min;加400 μL 三氯甲烷,振荡混匀,室温放置5min;4℃ 12 000 r/min 离心15min;将上清移入新的离心管,加入800 μL 异丙醇,旋涡振荡,室温沉淀10min;4℃ 12 000 r/min 离心10min,弃上清;加入600 μL 预冷的75%乙醇洗涤,4℃ 10 000 r/min 离心5min;吸干上清,沉淀在室温干燥后使用。

1.2.2 逆转录和多聚酶链反应(PCR)扩增 取随机引物(2 μmd/L) 1 μL,组织总RNA 2 μg,加水至12 μL,70℃ 10min后快速插入冰水中。离心后,加入缓冲液4 μL,二硫苏糖醇(DTT)(100 mmol/L) 1 μL, dNTP(10 mmol/L) 1 μL, SuperScript II 酶(200 U/μL) 1 μL,混匀后在42℃反应50 min。70℃ 15min 灭活逆转录酶。-20℃保存。

1.2.3 PCR引物及反应条件 OPN引物序列为5'-AGC AAC CGA AGT TTT CAC TCC-3'(上游),5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG CTC TCA TCA TTG

GCT TTCC -3'(下游)。β-肌动蛋白(beta-actin)引物为5'-TTC CAG CCT TCC TTC CTGGG-3'(上游),5'-TTG CGC TCA GGA GGA GCAAT-3'(下游)。PCR反应体系:dNTP(each 10 mmol/L) 1 μL,缓冲液5 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 3 μL,上游引物(50 μmol/L) 0.5 μL,下游引物(50 μmol/L) 0.5 μL,反转录产物5 μL, Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.3 μL,加水至50 μL。PCR反应条件为94℃ 2min, 93℃ 15s, 58℃ 15s, 72℃ 30s, 40个循环。尔后72℃ 5min, 4℃保存。

1.2.4 电泳、图像处理 PCR产物20 μL与上样缓冲液5 μL混匀后,在2%琼脂糖凝胶中电泳;电压5 V/cm。电泳结果经上海天能(Tanon)公司凝胶图像处理系统(3.73)拍照。

1.3 统计学处理

所测结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异的显著性用配对t检验,用SPSS软件包自动统计。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN mRNA在各组织中的表达

半定量RT-PCR扩增产物电泳结果(图1)显示;OPN mRNA在恶性钙化组织中的表达量与在转移淋巴结骨桥蛋白mRNA表达量无明显差异;良性钙化组织中表达量明显低于前两者,癌旁组织中OPN mRNA表达微量,正常乳腺组织几乎无OPN mRNA表达。

M:标准分子量 DL2000; 1:恶性钙化组织; 2:转移淋巴结; 3:无钙化乳癌组织; 4:癌旁乳腺组织; 5:正常乳腺组织

图1 RT-PCR检测OPN mRNA在各组织中的表达

2.2 不同组织中OPN mRNA的表达量

恶性钙化组织 Opn/ beta-actin 值为 1.58 ± 0.10 ,转移淋巴结为 1.36 ± 0.14 ,良性钙化组织为 1.25 ± 0.13 ,癌旁乳腺组织为 1.07 ± 0.10 ,正常乳腺

组织为 1.05 ± 0.11 。

恶性钙化组织与良性钙化组织,转移淋巴结与良性钙化组织,良性钙化组织与癌旁乳腺组织,良性钙化组织与正常乳腺组织间差异均有显著性(均 $P < 0.05$)。恶性钙化组织与转移淋巴结及癌旁乳腺组织与正常乳腺组织之间差异无显著性($P > 0.05$)(图2)。

1:恶性钙化组织;2:转移淋巴结;3:良性钙化组织;4:癌旁乳腺组织;5:正常乳腺组织

图2 不同组织中 OPN 表达量比较

3 讨论

OPN 是一种含精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸 (Arg - Gly - Asp, RGD) 的分泌型糖基化磷蛋白^[3]。此序列是蛋白质分子中与细胞黏附有关的重要物质,自骨基质最先分离。同时它又是具有多种功能分泌型钙结合磷酸化糖蛋白,能与骨组织中的羟磷灰石紧密结合,参与调节骨钙的沉积。近年来,OPN 作为一种新型的细胞因子,在早期细胞免疫应答、肉芽肿炎症、肿瘤发生及转移中的作用倍受关注^[4]。OPN 不仅与骨组织的矿化,冠状动脉粥样硬化及泌尿系统结石密切相关,而且可能是肿瘤发生发展的一个重要标志物。

乳汁是乳腺的生理性分泌物,含有丰富的 OPN。OPN 在乳腺癌的存在可能反映泌乳期 OPN 生产的正常过程发生畸变。OPN 在乳汁中存在的功能尚不清楚,但可显示它抑制羟磷灰石结晶生长^[5]。钙化的抑制需要分子的磷酸化作用^[6],乳汁含有骨桥结素(OP)的高度磷酸化形式^[7]。有研究者^[5]认为 OP 从钙盐、磷酸盐及富含蛋白液中抑制羟磷灰石结晶的生长和沉积,正如 OPN 在低

分化导管原位癌所起的作用一样。

OPN 的表达与乳腺组织钙化有关。Altundag 等^[8]研究发现,乳腺癌患者 X 线检测微钙化发现病率低可能与小叶组织中 OPN 水平低有关。

本研究结果提示,OPN 表达与乳腺组织钙化及乳腺病变恶性化有关。半定量 RT-PCR 扩增产物电泳结果显示,恶性钙化组织 OPN mRNA 表达量与转移淋巴结 OPN mRNA 表达量无明显差异。良性钙化组织 OPN mRNA 表达量明显低于前两者,而癌旁乳腺组织中 OPN mRNA 表达微量,正常乳腺组织几乎无此表达;差异有显著意义。RT-PCR 法检测乳腺病变组织中 OPN 表达的强弱与其乳腺病变恶性程度有关,提示 OPN 与乳腺组织钙化有关。本文从分子生物学角度揭示 OPN 可作为乳癌的预测指标之一。

参考文献:

- [1] Castronovo V, Bellahcene A. Evidence that breast cancer associated microcalcification are mineralized malignant cells [J]. *Int J Oncology*, 1998, 12(2): 305 - 308.
- [2] Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins in human breast cancer [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(1): 95 - 100.
- [3] Chabas D. Osteopontin, a multi-faceted molecule [J]. *Med Sci (Paris)*, 2005, 21(10): 832 - 838.
- [4] Das R, Philip S, Mahabeleshwar GH, *et al.* Osteopontin: it's role in regulation of cell motility and nuclear factor kappa B-mediated urokinase type plasminogen activator expression [J]. *IUBMB Life*, 2005, 57(6): 441 - 447.
- [5] Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, *et al.* Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins [J]. *Biochem J*, 1996, 317(1): 59 - 64.
- [6] Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(26): 20197 - 20203.
- [7] Sorensen ES, Petersen TE. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198(1): 200 - 205.
- [8] Altundag K, Altundag O, Turen S, *et al.* Low incidence of mammographically detected microcalcification in breast cancer patients with lobular histology may be attributed to low levels of osteopontin [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 26(10): 423 - 427.