

文章编号:1005-6947(2008)11-1133-04

· 简要论著 ·

# OPN 在乳腺癌淋巴结转移中的作用

马国辉, 王晓, 张秀兰, 赵东, 陈连胜, 田斌

(山东大学附属济南市中心医院 乳腺外科, 山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨骨桥蛋白(OPN)在乳腺癌中的表达及其与腋窝淋巴结转移之间的关系。方法 采用免疫组织化学方法检测 66 例乳腺癌、28 例乳腺良性肿瘤、37 例癌旁乳腺组织和 29 组腋窝转移淋巴结中 OPN 的表达,分析 OPN 表达与腋窝淋巴结转移及其他临床病理特征的关系。结果 乳腺癌组织中 OPN 的表达水平(4.83)明显高于癌旁乳腺组织(1.86)和乳腺良性肿瘤(2.18)( $P < 0.01$ );乳腺癌淋巴结转移阳性组与阴性组之间、乳腺癌原发病灶与相应的腋窝转移淋巴结之间 OPN 表达差异有统计学意义( $P = 0.048, 0.03$ )。乳腺癌 c-erbB-2 阳性表达组 OPN 表达水平(5.22)高于 c-erbB-2 阴性组(4.00),但差异无统计学意义( $P = 0.056$ )。乳腺癌 OPN 表达与患者年龄、肿瘤大小、转移淋巴结数量、组织学类型、肿瘤分级以及 TNM 分期无关( $P > 0.05$ ),而与淋巴结转移有关( $P = 0.048$ )。结论 OPN 在乳腺癌组织中高表达,且与乳腺癌腋窝淋巴结转移密切相关。

[中国普通外科杂志,2008,17(11):1133-1136]

**关键词:** 乳腺肿瘤;骨桥蛋白;淋巴转移

**中图分类号:** R 737.9

**文献标识码:** B

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种多功能分泌型钙结合磷酸化糖蛋白,在乳腺癌细胞系和多种肿瘤组织中高表达<sup>[1]</sup>,并与乳腺癌组织的钙化<sup>[1]</sup>及侵袭性有关<sup>[2]</sup>,但关于 OPN 在乳腺癌淋巴结转移中作用的报道较少。本研究应用免疫组化方法检测乳腺癌组织及腋窝淋巴结中 OPN 的表达,分析其表达的差异,以期探讨 OPN 在乳腺癌发生及淋巴结转移中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 一般资料

收集 2006 年 4 月—2007 年 7 月在本院手术切除的浸润性乳腺癌 66 例(乳癌组),其中伴有淋巴结转移者 29 例(均切取相应转移淋巴结);患者均为女性,单侧发病,年龄及其他病例参数见表 1。同时取距上述肿瘤边缘 5~7 cm 的癌旁乳腺组织 37 例(术后经病理证实均无癌细胞浸润)(癌旁组织组);取同期手术切除的乳腺良性肿瘤组织 28 例,包括 18 例乳腺纤维腺瘤、6 例浆

细胞性乳腺炎和 4 例导管内乳头状瘤(乳腺良性疾病组)。

### 1.2 OPN 免疫组化染色

采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)法。石蜡切片常规脱蜡,3%过氧化氢氧化,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,血清封闭。应用羊抗人 OPN 单克隆抗体(mab53, Santa Cruz Biotechnology, USA)(工作浓度 1:100)作为一抗,37℃ 孵育,PBS 代替一抗作为空白对照,二氨基连苯胺(DAB)显色,苏木精复染,中性树胶封片。

### 1.3 OPN 染色结果判定

乳腺细胞膜和(或)胞浆出现棕黄色颗粒为 OPN 阳性表达。染色评定标准参照 Allred 的半定量法<sup>[3]</sup>,对阳性细胞数占同类细胞的百分比(E)和阳性细胞染色强度(I)分别进行评分。E:0 = 无;1 < 1/100;2 = 1/100 ~ 1/10;3 = 1/10 ~ 1/3;4 = 1/3 ~ 2/3;5 > 2/3。I:0 = 无;1 = 轻度;2 = 中度;3 = 强染色,I + E 作为总评分,0 表示 OPN 阴性表达,2~8 表示阳性表达。

### 1.4 统计学处理

应用 SPSS13 统计学软件进行数据分析。乳腺癌腋窝淋巴结转移阳性组与阴性组之间 OPN 表达的差异用 Wilcoxon 两样本分析法,同法用于 c-erbB-2(我院病理科对乳腺癌标本的常规检测

收稿日期:2008-04-29; 修订日期:2008-09-01。

作者简介:马国辉,男,山东大学附属济南市中心医院硕士研究生,主要从事乳腺外科方面的研究。

通讯作者:王晓 E-mail:wangxiao@sdu.edu.cn

项目);乳腺癌原发病灶与转移淋巴结之间 OPN 表达的差异用 Wilcoxon 符号秩和检验;癌旁乳腺组织与良性肿瘤、恶性肿瘤之间以及乳腺癌 TNM 分期、肿瘤分级之间的 OPN 表达差异用 Kruskal—

Wallis 检验;OPN 与患者年龄、肿瘤大小以及淋巴结转移数量之间的关系用 Spearman 等级相关分析;其他临床病理特征与淋巴结转移之间的关系用卡方检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表1 乳腺癌淋巴结转移与临床病理特征的关系

病理学特征	例数( <i>n</i> )	淋巴结转移				$\chi^2$	<i>P</i> 值
		阳性		阴性			
		例数	%	例数	%		
组织学类型	66						
浸润性导管癌	41	17	41.5	24	58.5	0.69	0.88
浸润性小叶癌	16	7	43.8	9	56.2		
髓样癌	4	2	50.0	2	50.0		
黏液腺癌	5	3	60.0	2	40.0		
年龄	66						
$\leq 40$	14	8	57.1	6	42.9	1.97	0.37
40~55	31	14	45.2	17	54.8		
$\geq 55$	21	7	33.3	14	66.7		
肿瘤大小	66						
T <sub>1</sub>	28	9	32.1	19	67.9	5.47	0.07
T <sub>2</sub>	32	15	46.9	17	53.1		
T <sub>3</sub>	6	5	83.3	1	16.7		
肿瘤分级	66						
1	22	7	31.8	15	68.2	5.56	0.06
2	28	11	39.3	17	60.7		
3	16	11	68.8	5	31.2		
绝经状态	66						
绝经前	32	14	43.8	18	56.2	0.001	0.98
绝经后	34	15	44.1	19	55.9		

## 2 结果

### 2.1 OPN 在乳腺癌组织与癌旁乳腺组织中的表达

OPN 评分在癌旁组为 1.86,良性肿瘤组为 2.18,乳腺癌组为 4.83,癌旁乳腺组织与良性肿瘤之间 OPN 表达的差异无统计学意义( $P = 0.47$ ),但癌旁乳腺组织和良性肿瘤的 OPN 表达显著低于乳腺癌组( $P < 0.01$ )(图 1)。

### 2.2 乳腺癌组织 OPN 表达与腋窝淋巴结转移之间的关系

乳腺癌伴腋窝淋巴结转移者 OPN 平均评分为 5.35,无转移者平均评分为 4.43,两组间差异有统计学意义( $P = 0.048$ );腋窝转移淋巴结平均评分为 5.72,与相应原发灶(5.35)相比,差异亦有统计学意义( $P = 0.03$ )(表 2);但乳腺癌组织 OPN 的表达与腋窝淋巴结转移数量之间无相

关性( $P = 0.10$ )(表 3)。

### 2.3 乳腺癌组织 OPN 表达与其他临床病理特征之间的关系

乳腺癌组织中 OPN 的表达与组织学类型、肿瘤分级及 TNM 分期无关( $P > 0.05$ );乳腺癌 c-erbB-2 阳性表达组 OPN 表达水平明显高于 c-erbB-2 阴性表达组,但差异无统计学意义(表 2)。另外,乳腺癌组织 OPN 的表达与患者的发病年龄、肿瘤大小、淋巴结转移数目之间均无相关性(表 3)。

### 2.4 影响乳腺癌淋巴结转移的因素

随肿瘤最大直径及分级的增大,伴有淋巴结转移的病例所占的比例虽有所升高,但均无统计学意义(表 1)。分析还显示乳腺癌的组织学类型、发现年龄及患者绝经状态均对淋巴结转移没有影响( $P > 0.05$ )(图 2)。

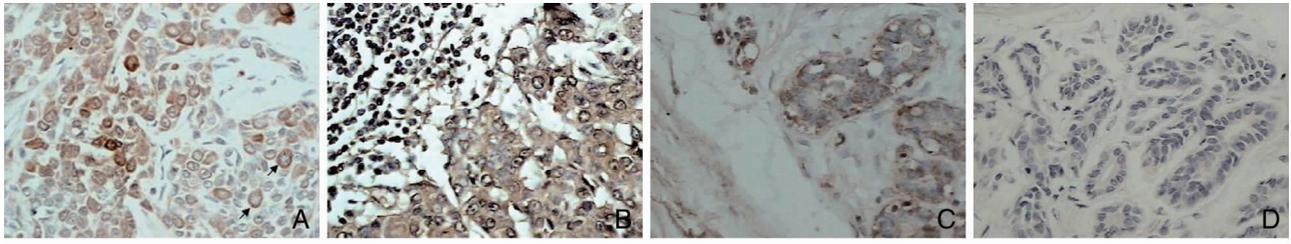


图 1 OPN 在乳腺组织中的表达 A:乳腺浸润性导管癌 OPN 阳性表达(7 分) ×100; B:乳腺癌腋窝转移淋巴结(8 分) ×200; C:乳腺纤维腺瘤(4 分) ×200; D:癌旁乳腺组织(0 分) ×200

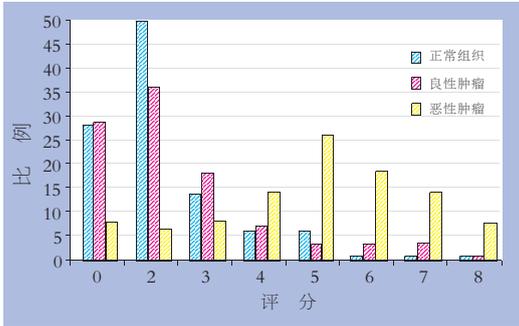


图 2 乳腺正常组织、良性肿瘤及乳腺癌在各评分分段的病例分布

表 2 乳腺癌组织 OPN 表达与临床病理特征的关系

	病例数(n)	OPN 评分	统计量	P 值
<b>组织学类型</b>				
浸润性导管癌	41	4.95 ± 2.16		
浸润性小叶癌	16	4.93 ± 1.88	H = 1.38 <sup>2)</sup>	0.50
其他	9	4.11 ± 2.15		
<b>肿瘤分级</b>				
1	22	4.31 ± 2.17		
2	28	5.07 ± 1.94	H = 1.8 <sup>2)</sup>	0.41
3	16	5.12 ± 2.19		
<b>TNM 分期</b>				
I, IIa	30	4.87 ± 2.18		
IIb	26	4.62 ± 2.24	H = 0.45 <sup>2)</sup>	0.80
III	10	5.30 ± 0.82		
<b>c-erbB-2</b>				
阳性	21	4.00 ± 2.21		
阴性	45	5.22 ± 1.91	T = 3.67 <sup>3)</sup>	0.056
<b>腋窝淋巴结转移</b>				
有	29	5.35 ± 2.20		
无	37	4.43 ± 2.02	T = 3.90 <sup>3)</sup>	0.048
转移淋巴结	29	5.72 ± 1.85	T = -2.13 <sup>4)</sup>	0.03 <sup>1)</sup>

注:1) 腋窝转移淋巴结与相应原发病灶比较; 2) Kruskal-Wallis H 检验; 3) Wilcoxon 秩和检验; 4) Wilcoxon 符号秩检验

表 3 乳腺癌组织 OPN 的表达与患者年龄、肿瘤直径、淋巴结转移数目的相关性

病理特征	平均数	r 值	P 值
发病年龄	51.21 ± 10.68	0.08	0.50
肿瘤大小 (cm)	2.79 ± 1.45	-0.02	0.88
淋巴结转移数目	10.59 ± 6.59	0.31	0.10

### 3 讨论

骨桥蛋白基因定位于染色体 4q13 上,其编码的蛋白质的 N 端含有一个精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 序列。分泌型 OPN 的 RGD 序列能与肿瘤细胞的膜受体整合素  $\alpha v \beta 3$  结合,引起尿激酶型纤溶酶原启动物 A (UPA) 的分泌增加,从而使肿瘤细胞的运动能力增强<sup>[4]</sup>。Marroquin 等<sup>[5]</sup>在 RAW2647 细胞株的培养基中加入外源性 OPN,发现通过与 CD44 的结合,OPN 同样可显著提高肿瘤细胞的黏附能力。

OPN 在多种人类恶性肿瘤组织中高表达<sup>[6]</sup>,同样,在乳腺癌患者的血清和原发病灶中也能检测到高表达的 OPN<sup>[7]</sup>。研究发现,OPN 能通过改变基因表达的状态<sup>[8]</sup>,或其他途径影响肿瘤的生长速度、侵袭性及转移<sup>[9]</sup>。本研究显示乳腺正常组织、良性肿瘤中 OPN 的表达显著低于乳腺癌组织。

淋巴结转移被认为是恶性肿瘤最重要的转移途径。Ganmann 等<sup>[10]</sup>通过研究肺血管平滑肌瘤及其周围基质中的肿瘤相关淋巴细胞,推测肿瘤组织中高表达的 OPN 可能通过与 CD44 的结合而促进肿瘤细胞的淋巴转移。有学者认为 OPN 能促进乳腺癌细胞的淋巴结转移<sup>[11]</sup>;也有认为肿瘤的淋巴结转移受肿瘤生长时间及分化程度等因素的影响,与 OPN 表达的强弱无关<sup>[12]</sup>。本组资料显示:OPN 在淋巴结转移阳性组中的表达明显高于阴性组,且差异有统计学意义,提示 OPN 表达与乳腺癌腋窝淋巴结转移之间有密切关系。同时,

转移淋巴结中 OPN 的表达也要明显高于原发病灶,这可能是 OPN 具有促进肿瘤淋巴结转移的作用,也可能与淋巴结中的特殊微环境有关,比如淋巴结中存在多种生长因子和细胞因子,当淋巴结发生刺激反应时,其中一些因子(如白细胞介素  $1\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$ )能够改变细胞中 OPN 的分泌<sup>[13]</sup>,促进淋巴结 OPN 的高表达。另外 T 细胞和巨噬细胞也能分泌 OPN,亦可导致转移淋巴结 OPN 的高表达<sup>[12]</sup>。

本资料结果显示,肿瘤的大小和分级是淋巴结转移的潜在危险因素(表 1)。Coppola 等<sup>[14]</sup>认为,OPN 的表达与肿瘤的临床分期有关,而本研究显示 OPN 在乳腺癌各期之间的表达差异无统计学意义,可能与肿瘤的类型和发现时间有关。

20 世纪 80 年代后期开始认识到 c-erbB-2 对乳腺癌预后的价值<sup>[15]</sup>,美国癌症协会于 2002 年推荐 c-erbB-2 作为乳腺癌高侵袭性和预后不良的独立预测因子,并要求在所有新近诊断为浸润性乳腺癌的患者中常规检测。Xie 等研究表明 c-erbB-2 在跨膜部位编码区的多态性会诱发乳腺癌<sup>[16]</sup>。本组资料中乳腺癌 c-erbB-2 阳性表达组 OPN 表达水平明显高于 c-erbB-2 阴性表达组,虽然表达的差异无统计学意义,但 OPN 与 c-erbB-2 之间的关系仍值得进一步研究。

Koopmann 等<sup>[17]</sup>和 Wong 等<sup>[18]</sup>在研究胰腺癌和鼻咽癌患者血清中 OPN 的表达时,发现恶性肿瘤患者外周血 OPN 水平明显高于正常人群,且具有高度的敏感性和特异性,可以作为肿瘤标记物用于恶性肿瘤的诊断和筛选,由此可见,检测乳腺癌患者外周血中 OPN 的表达水平也可能用于乳腺癌的病情监测,但对此仍需进一步实验证实。鉴于研究证明 OPN 可以促进肿瘤的浸润、转移<sup>[6-9]</sup>,结合本组资料,不难推测针对 OPN 作为靶点阻断其表达及信号传导有可能成为新的肿瘤治疗方法。

#### 参考文献:

- [1] Yang G, Zhang XH, Zhang ZG, et al. Correlation of X-ray features in mammography and expression of OPN and ON of breast carcinoma [J]. *J Clin Radiol*, 2006, 25 (2): 134 - 137.
- [2] Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, et al. Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences [J]. *J Cell Biochem* 2002, 84 (2): 420 - 432.
- [3] Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, et al. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients [J]. *Int J Cancer* 1998, 79 (5): 502 - 508.
- [4] Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC. 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]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (12): 11051 - 11064.
- [5] Marroquin CE, Downey L, Guo H, et al. Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cells [J]. *Immunol Lett*, 2004, 95 (1): 109 - 122.
- [6] Coppola D, Szabo M, Boulware D, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (1): 184 - 190.
- [7] Hotte SJ, Winquist EW, Stitt L, et al. Plasma osteopontin: association with survival and metastasis to bone in men with hormone-refractory prostate carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 95 (3): 506 - 512.
- [8] Cook AC, Tuck AB, McCarthy S, et al. Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six 'hallmarks of cancer' in a model of breast cancer progression [J]. *Mol Carcinog*, 2005, 43 (4): 225 - 236.
- [9] Shevde LA, Samant RS, Paik JC, et al. Osteopontin knock-down suppresses tumorigenicity of human metastatic breast carcinoma [J], MDA-MB-435, *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23 (2): 123 - 133.
- [10] Gaumann A, Petrow P, Mentzel T, et al. Osteopontin expression in primary sarcomas of the pulmonary artery [J]. *Virchows Arch*, 2001, 439 (5): 668 - 674.
- [11] Allan AL, George R, Vantyghe 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.
- [12] Tókés AM, Krausz J, Kulka J, et al. Role of osteopontin in the formation of microcalcifications in breast cancer [J]. *Orv Hetil*, 2002, 143 (31): 1841 - 1846.
- [13] Vantyghe SA, Allan AL, Postenka CO, et al. A new model for lymphatic metastasis: development of a variant of the MDA-MB-468 human breast cancer cell line that aggressively metastasizes to lymph nodes [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22 (4): 351 - 361.
- [14] Coppola D, Szabo M, Boulware D, et al. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10 (1): 184 - 190.
- [15] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235 (4785): 177 - 182.
- [16] Xie D, Shu XO, Deng Z, et al. Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92 (5): 412 - 417.
- [17] Koopmann J, Fedarko NS, Jain A, et al. Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13 (3): 487 - 491.
- [18] Wong TS, Kwong DL, Sham J, et al. Elevation of plasma osteopontin level in patients with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2005, 31 (5): 555 - 558.