

骨桥蛋白表达与结直肠癌临床病理特征及预后的关系

尹鹏飞, 常家聪

摘要 目的 探讨骨桥蛋白(OPN)在结直肠癌组织中的表达与临床病理特征及预后的关系。方法 应用免疫组化SP法测定112例结直肠癌患者癌组织及癌旁正常组织中OPN表达水平,分析OPN表达与结直肠癌患者临床病理特征及预后的关系。结果 结直肠癌组织中OPN阳性表达率明显高于相应癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),其表达水平与肿瘤直径、分化程度、TNM分期、原发肿瘤浸润深度相关;OPN阳性表达组的无病生存时间和总体生存时间均短于阴性表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。OPN的阳性表达是结直肠癌患者预后的独立影响因素。结论 结直肠癌患者癌组织中OPN呈高表达,OPN在组织中的高表达与患者的早期复发及不良预后密切相关。

关键词 结直肠癌;骨桥蛋白;免疫组织化学;预后

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)10-1493-04

结直肠癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,严

2015-05-14 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研发资助项目(编号:09A034)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

作者简介:尹鹏飞,男,硕士研究生;

常家聪,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: changjiacong13@aliyun.com

重威胁人类的生命健康,统计数据显示其发病率已升至所有恶性肿瘤的第3位^[1],死亡率也不断增高。结直肠癌患者早期缺乏特异性的表现,很多患者确诊时已属中晚期,5年生存率不足40%。肿瘤的侵袭转移成为影响预后的主要因素之一,恶性肿瘤发生侵袭和转移包括基质的降解、细胞迁移、血管生成等很多变化,骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种与肿瘤有关的蛋白质,在结直肠癌的发生发展中有着重要的作用。该实验应用免疫组织化学法检测结直肠癌组织中OPN的表达,探讨其与结直肠癌患者各临床病理特征之间的关系以及对预后的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院普外科2008年3月~2009年4月经手术治疗的112例结直肠癌患者的癌组织及距离癌组织边缘5cm以上相应的正常癌旁组织标本,癌组织均经术后病理检查确诊。所有患者术前未接受化疗、放疗等其他治疗。手术后电话或者门诊随访,并记录随访资料,所有纳入患者的末次随访时间截至2014年5月1日。

GnRH-antagonist, compared the outcomes of the two protocols. **Results** The average number of oocytes retrieved, viable embryos, high-quality embryos, consumption and duration of Gn, the serum progesterone(P) level on trigger day in the luteal phase were significantly higher than those in follicular phase. The serum luteinizing hormone(LH) level on trigger day was lower than that in follicular phase. The average number of oocytes retrieved, high-quality embryos, consumption and duration of gonadotropins(Gn) in mild stimulation combined with GnRH-antagonist were higher than those in follicular phase. LH level on trigger day was lower than those in follicular phase, while the numbers of viable embryos were similar. The consumption and duration of Gn in the luteal phase were higher than in stimulation combined with GnRH-antagonist, and there were no differences in the average number of oocytes retrieved, viable embryos, high-quality embryos between the two groups. The cycle cancellation rate, available rate of oocytes and embryos were similar between the controlled ovarian hyperstimulation. The available rate of embryos in double stimulations was higher than mild ovarian stimulation combined with GnRH-antagonist, and the abortion rate was lower. **Conclusion** Controlled ovarian hyperstimulation during luteal phase can get better outcomes in patients with decreased ovarian reserve, double stimulations in the same menstrual cycle shortens the treatment time of IVF-ET, and it is a feasible method for patients with decreased ovarian reserve.

Key words decreased ovarian reserve; double stimulations; controlled ovarian hyperstimulation on luteal phase; GnRH-antagonist

1.2 主要试剂 浓缩型鼠抗人 OPN 单克隆抗体购于北京博奥森公司;通用型免疫组化试剂盒、PBS 缓冲液、DAB 显色剂等均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 方法 采用免疫组化 SP 法检测结直肠癌组织中 OPN 的表达,所有标本经过石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。操作步骤按照免疫组化试剂盒说明书进行。用已知阳性结直肠癌组织切片作为阳性对照, PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组化结果判定 根据组织切片着色范围和强度表示结果,在高倍镜下,每张切片选择 5 个具有代表性的视野,每个视野计数 100 个癌细胞,一共计数 500 个细胞。采用半定量计分法判定: OPN 主要定位于细胞质,呈现黄色或棕黄色颗粒为阳性细胞。按阳性着色程度评分: 0 分为无着色; 1 分为浅黄色; 2 分为棕黄色; 3 分为棕褐色。按阳性细胞占比例评分: 0 分为 < 5%、1 分为 5% ~ 10%、2 分为 11% ~ 50%、3 分为 51% ~ 80%、4 分为 > 80%, 两者乘积判断阳性结果: 0 分为阴性(-); 1 ~ 4 分为弱阳性(+); 5 ~ 8 分为中度阳性(++); 9 ~ 12 分为强阳性(+++)。将(++) ~ (+++) 定义为 OPN 蛋白阳性表达组, (-) ~ (+) 定义为 OPN 蛋白阴性表达组。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件进行分析,针对结直肠癌组织与癌旁正常组织中 OPN 表达阳性率的比较以及 OPN 表达与结直肠癌患者临床病理特征之间的关系采用 χ² 检验。生存分析使用 Kaplan-Meier 曲线法,两组间差异采用 Log-rank 检验。应用 COX 比例风险回归模型进行多因素分析以确定影响结直肠癌患者生存率的独立预后因素;所有检验为双侧概率检验。

2 结果

2.1 OPN 在结直肠癌组织及癌旁组织中的表达水平 OPN 在结直肠癌组织及癌旁正常组织中有不同程度的阳性表达,结直肠癌组织中 OPN 阳性表达 65 例,阳性表达率为 58.0% (65/112); 癌旁正常组织 OPN 阳性表达 11 例,阳性表达率为 9.80% (11/112)。结直肠癌组织中 OPN 阳性表达率明显高于癌旁正常组织,两组差异有统计学意义(χ² = 58.07, P < 0.05)。见图 1。

2.2 结直肠癌组织中 OPN 表达与临床病理参数的关系 结直肠癌患者的组织中 OPN 阳性表达率与肿瘤直径、TNM 分期、肿瘤的分化程度、原发肿瘤浸

润深度相关(P < 0.05),而与性别、年龄、肿瘤部位、淋巴结转移无关。见表 1。

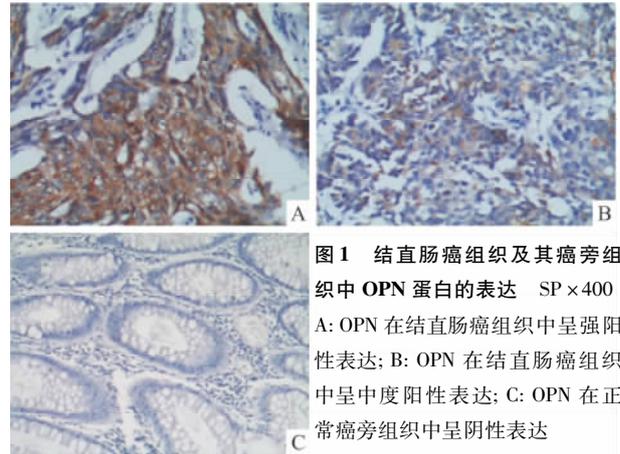


图 1 结直肠癌组织及其癌旁组织中 OPN 蛋白的表达 SP × 400 A: OPN 在结直肠癌组织中呈强阳性表达; B: OPN 在结直肠癌组织中呈中度阳性表达; C: OPN 在正常癌旁组织中呈阴性表达

表 1 OPN 阳性表达与结直肠癌患者临床病理参数的关系(n)

项目	n	OPN 表达		χ ² 值	P 值
		阴性	阳性		
性别					
男	71	26	45	2.275	0.165
女	41	21	20		
年龄(岁)					
< 60	42	16	26	0.413	0.558
≥ 60	70	31	39		
TNM 分期					
I + II	47	29	18	12.955	< 0.001
III + IV	65	18	47		
原发肿瘤浸润深度					
T1 + T2	42	23	19	4.519	0.048
T3 + T4	70	24	46		
淋巴结转移					
有	69	24	45	3.806	0.076
无	43	23	20		
分化程度					
中、高	65	33	32	4.931	0.033
低	47	14	33		
肿瘤部位					
结肠	61	30	31	2.864	0.124
直肠	51	17	34		
肿瘤直径(cm)					
< 5	62	36	26	14.782	< 0.001
≥ 5	50	11	39		

2.3 OPN 蛋白表达与结直肠癌患者生存预后的分析 截至 2014 年 5 月随访结束时,112 例结直肠癌患者获得完整的随访资料,随访时间为 4 ~ 69 个月,中位随访时间为 38 个月;随访期间 72 例患者死亡,5 年累积生存率为 36.1%。应用 Kaplan-Meier 方法分析 OPN 蛋白在组织中的表达水平与结直肠癌患者预后之间的相关性。结果显示,OPN 蛋白阳性表达组的结直肠癌患者的中位生存期为 18.6 个月,OPN 蛋白阴性表达组的患者中位生存期为 47.9 个

月。OPN 阴性表达组患者的生存时间明显高于 OPN 阳性表达组, Log-rank 检验提示, 两组患者的无病生存期和总体生存期差异有统计学意义 (Log-rank = 12.666、13.250, $P < 0.001$), 表明 OPN 蛋白阳性表达组的结直肠癌患者无病生存期和总体生存期明显比 OPN 蛋白阴性表达组的结直肠癌患者的无病生存期和总体生存期短。见图 2。

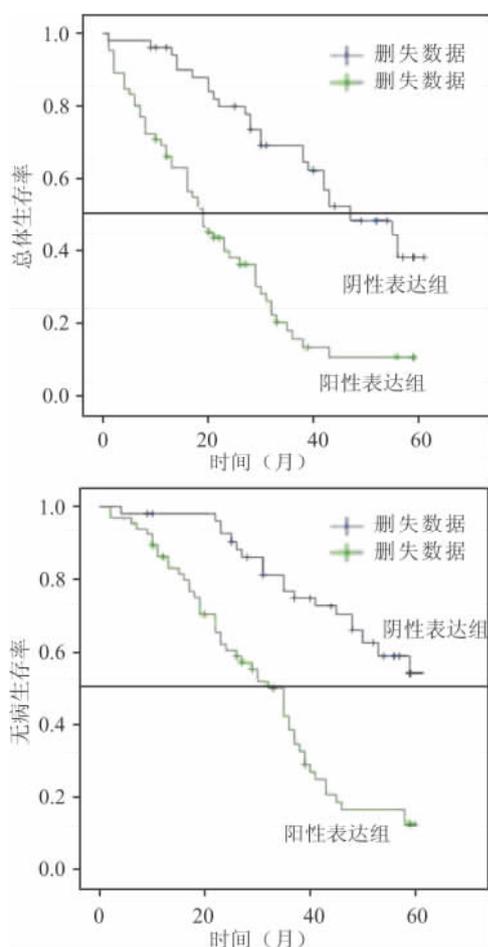


图2 两组结直肠癌患者的总体生存曲线和无病生存曲线

2.4 结直肠癌患者术后生存时间的多因素回归分析 将性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移 TNM 分期、肿瘤分化程度和 OPN 表达(阴性表达和阳性表达)等因素引入 COX 模型进行分析。结果显示, OPN 表达阳性与原发肿瘤直径是影响结直肠癌患者无病生存期的独立影响因素 ($P < 0.05$)。其中 OPN 表达和原发肿瘤直径的回归系数均为正, 表明 OPN 表达阳性和肿瘤直径大于 5 cm 的结直肠癌患者术后无病生存时间短; 同时, OPN 表达阳性、TNM 分期和原发肿瘤直径是影响结直肠癌患者总体生存期的独立影响因素, 其中 OPN 表达、TNM 分期和原

发肿瘤直径的回归系数均为正, 表明 OPN 表达阳性、TNM 分期为 III、IV 期和肿瘤直径大于 5 cm 的结直肠癌患者术后总体生存时间短。见表 2。

表2 无病生存率和总体生存率的单因素及多因素 COX 比例风险回归分析

项目	无病生存率		总体生存率	
	HR(95% CI)	P 值	HR(95% CI)	P 值
单变量				
性别	1.290(0.843 ~ 2.006)	0.257	1.540(0.924 ~ 2.619)	0.099
年龄	1.037(0.664 ~ 1.686)	0.894	1.176(0.653 ~ 1.765)	0.767
肿瘤浸润深度	1.369(0.896 ~ 2.189)	0.147	1.421(0.860 ~ 2.274)	0.124
分化程度	1.141(0.742 ~ 1.755)	0.547	1.229(0.764 ~ 1.979)	0.396
TNM 分期	1.616(1.097 ~ 2.556)	0.032	1.837(1.120 ~ 2.983)	0.014
淋巴结转移	1.257(0.809 ~ 1.936)	0.315	1.535(0.936 ~ 2.526)	0.089
OPN 表达	2.103(1.339 ~ 3.304)	0.001	2.527(1.551 ~ 4.118)	<0.001
肿瘤直径	3.250(2.040 ~ 5.178)	<0.001	3.267(2.004 ~ 5.328)	<0.001
多变量				
TNM 分期	1.529(0.968 ~ 1.924)	0.053	1.827(1.126 ~ 3.182)	0.038
OPN 表达	2.096(1.331 ~ 3.296)	0.001	2.525(1.533 ~ 4.134)	<0.001
肿瘤直径	3.269(2.041 ~ 5.237)	<0.001	3.267(2.008 ~ 5.358)	<0.001

HR: 风险比; 95% CI: 95% 置信区间

3 讨论

OPN 是由 Senger et al^[2] 从恶性转化的上皮细胞株中提取出来的, 研究^[3]表明, OPN 在人类恶性肿瘤组织中过度表达, 与肿瘤分期密切相关, 参与肿瘤的发生发展, 但确切的致癌机制尚不明确, 可能通过促进肿瘤细胞的黏附、转移^[4] 以及通过促进肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞的凋亡^[5]、促进肿瘤血管形成^[6] 等多种途径促进恶性肿瘤的发生发展。研究^[7]显示抑制 OPN 的表达能够减缓肿瘤的生长及侵犯进程。研究^[8]表明, OPN 的过度表达与乳腺癌、胃癌、前列腺癌等肿瘤的恶性程度侵袭、转移、复发有关。

本研究显示结直肠癌组织中 OPN 阳性表达率明显高于癌旁正常组织, 提示高表达的 OPN 可能与结直肠癌发生发展关系密切。本研究探讨了 OPN 的表达与结直肠癌生物学特性之间的关系, 结直肠癌组织 OPN 的表达水平在 TNM 分期 III/IV 期明显高于 I/II 期, 这表明 OPN 的水平随着结直肠癌进展而表达逐渐增强; 因此可以对组织进行检测 OPN 水平来判断和评估结直肠癌的侵袭程度、转移情况, 与研究^[9]结果相似。OPN 的表达还与结直肠癌的原发肿瘤直径明显相关, 提示 OPN 不仅参与了肿瘤的浸润、转移, 也可能参与了肿瘤的发生。研究^[10]显示 OPN 不仅能通过与整合素受体结合而且

能与 CD44 家族受体相结合,从而促进了肿瘤细胞的趋化、黏附、转移;由上表明高表达的 OPN 可能成为判断结直肠癌侵袭转移程度的一个指标,研究^[11]显示,缺失 OPN 的模型小鼠形成肺内转移性结节明显减少,因此研究新型的以 OPN 为基础的抗肿瘤治疗可能为结直肠癌的治疗提供新的分子靶向途径。

本研究的创新之处在于通过对 112 例有完整随访资料的结直肠癌患者术后生存时间进行分析,结果显示 OPN 阳性表达组的无病生存时间和总体生存时间均短于 OPN 阴性表达组。应用 COX 比例风险模型多因素生存分析,显示 OPN 阳性表达是结直肠癌患者术后无病生存率和总体生存率的独立影响因素,有可能成为判断和评估结直肠癌患者预后的一种新的生物学指标。

参考文献

- [1] Steward B W, Kleihues P. Word Cancer Report [M]. Lyon: IARC Press, 2003: 198 - 202.
- [2] Senger D R, Wirth D F, Hynes R O. Transformed mammalian cells secrete specific protein and phosphoproteins [J]. *Cell*, 1979, 16(4): 885 - 93.
- [3] 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 Pt 1): 184 - 90.
- [4] Samant R S, Clark D W, Fillmore R A, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF- κ B activation [J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 6.
- [5] Courter D, Gao H, Kmok S, et al. The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9633.
- [6] Dai J, Peng L, Fan K, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(38): 3412 - 22.
- [7] Li Kui 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.
- [8] Guarino V, Faviana P, Salvatore G, et al. Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(9): 5270 - 8.
- [9] 王庆娜, 朱海杭, 刘 军. 结直肠癌中骨桥蛋白与环氧合酶-2 的表达及临床意义 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2012, 21(2): 137 - 9.
- [10] Tuck A B, Arsenault D M, O'Malley F P, et al. Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells [J]. *Oncogene*, 1999, 18(29): 4237 - 46.
- [11] Nemoto H, Rittling S R, Yoshitake H, et al. Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(4): 652 - 9.

Expression of osteopontin in colorectal cancer with clinical pathological characteristics and prognosis

Yin Pengfei, Chang Jiacong

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the relationship between the osteopontin (OPN) expression of colorectal cancer tissues with the clinical characteristics and prognosis. **Methods** The expressions of OPN in colorectal cancer tissues and their corresponding para-cancerous tissues from 112 cases of colorectal cancer patients were detected by immunohistochemistry. The relationship between the expressions of OPN and the clinicopathological features in patients with colorectal cancer were analyzed. **Results** The OPN expression of colorectal cancer tissues was significantly higher than their corresponding adjacent normal tissues, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Its expression was significantly associated with tumor size, histological differentiation, TNM stage, tumor status. Disease-free survival, and overall survival time of OPN protein positive expression group were lower than that of the negative group, respectively, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression of OPN in colorectal cancer tissues was an independent prognostic factor. **Conclusion** The expression of OPN is significantly increased in colorectal cancer tissues, and the positive expression of OPN is associated with the prognostic of patients with colorectal cancer.

Key words colorectal cancer; osteopontin; immunohistochemistry; prognostic