

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0248-04

骨桥蛋白及其受体CD44v6在口腔鳞状细胞癌中的定量表达及意义

姜 蕾¹, 赵良瑜², 何 金³, 赵云富¹, 吴 洋¹, 刘 渊¹, 姜晓钟¹

(1.第二军医大学长征医院 口腔科; 2.骨科; 3.病理科, 上海 200003)

[摘要] 目的 探讨骨桥蛋白(OPN)及其受体CD44v6在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中的蛋白定量表达、临床意义及二者之间的关系。方法 应用EnVision™法检测正常口腔黏膜(n=12)和OSCC患者(n=59)肿瘤组织中OPN和CD44v6的表达,结合图像分析系统进行定量分析,统计不同临床、病理指标下OSCC肿瘤组织中OPN的表达情况以及两种蛋白表达的相互关系。结果 OPN在OSCC肿瘤组织中的表达显著高于正常口腔黏膜(P<0.05)。OPN的表达与OSCC不同临床分期、颈淋巴结转移有相关性,在OSCC高分化和中低分化者间差异无统计学意义。CD44v6在OSCC与正常口腔黏膜中差异无统计学意义,且其表达与临床病理指标关系不密切。在OSCC中,OPN与CD44v6表达无显著相关性。结论 OPN在OSCC存在过度表达,其表达水平与肿瘤临床分期以及有无淋巴结转移存在一定的相关性,CD44v6与肿瘤临床病理特征无关,而且与OPN表达无相关性。

[关键词] 骨桥蛋白; 口腔鳞状细胞癌; 定量分析

[中图分类号] R780.2 [文献标识码] A

The expression and significance of osteopontin and its receptor CD44v6 in oral squamous carcinoma JIANG Lei¹, ZHAO Liang-yu², HE Jin³, ZHAO Yun-fu¹, WU Yang¹, LIU Yuan¹, JIANG Xiao-zhong¹. (1. Dept. of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Dept. of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Dept. of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] Objective To study the clinical significance of osteopontin(OPN) and its receptor CD44v6 expression in oral squamous cell carcinoma(OSCC). Methods OPN and CD44v6 expression were examined in OSCC(n=59) and normal oral mucosa(n=12) by EnVision™ method, the staining-grade were quantitatively studied by multiple functional image analyzer. Their expression grade of different clinical and pathological index were statistically studied. Results OPN expression grade was significantly higher in OSCC than that in normal oral mucosa(P<0.05). Significant deviation of OPN expression grade was found between different clinical stages, as well as between the groups with or without cervical lymph node metastasis. The group with cervical lymphnode metastasis had higher expression than that of the group without lymph node metastasis(P<0.05). However, there was no significant deviation between the expression grade in well-differentiated group and moderate or poorly differentiated group. The expression of CD44v6 showed no correlation with that of OPN, nor any difference between OSCC and normal oral mucosa. Conclusion OPN over expression was found in OSCC, and the expression level has correlation with the clinical staging and with cervical lymph node metastasis status. CD44v6 expression showed no difference between OSCC and normal oral mucosa nor any correlation with that of OPN.

[Key words] osteopontin; oral squamous cell carcinoma; quantitative analysis

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是细胞生长所必须的微环境,在肿瘤的发生发展过程中起重要作用。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种分泌

型细胞外基质蛋白,能促进细胞的趋化、黏附和迁移。但有关OPN及其受体之一CD44v6在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)方面的相关研究较少。本研究应用免疫组化方法结合定量分析测定OPN和CD44v6在OSCC中的表达,并结合临床资料分析二者在OSCC中的表达、临床意义以及

[收稿日期] 2007-06-07; [修回日期] 2007-10-20

[作者简介] 姜 蕾(1979-),女,江苏人,住院医师,硕士

[通讯作者] 姜晓钟, Tel: 021-63610109-73471

两种蛋白之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 试剂

单克隆抗体OPN单抗(克隆号OP3N,即用型)、单克隆抗体CD44v6(克隆号2F10,即用型)(福州迈新生物技术开发有限公司), EnVision™试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色液(DAKO公司,丹麦)。

1.2 标本的选取

选取2000—2006年第二军医大学长征医院收治并行手术切除的OSCC标本59例,术前未接受放疗或者化疗,临床及随访资料完整,病理诊断明确。其中男34例,女25例,年龄34~78岁。舌癌26例,牙龈癌12例,颊癌15例,硬腭癌2例,口底癌4例。高分化鳞癌38例,中低分化21例。经病理学证实伴有淋巴结转移者20例,无颈部淋巴结转移者39例。按照UICC制定的口腔颌面部恶性肿瘤TNM分期标准^[1], I期20例, II期16例, III~IV期23例。全部肿瘤标本经甲醛溶液固定,石蜡包埋,制作3~4 μm的连续切片2张,其中1张行HE染色,按诊断标准复片确诊,另1张行免疫组化备用。另取12例正常口腔黏膜作为对照。

1.3 免疫组化染色

应用EnVision™法对59例OSCC手术切除肿瘤组织进行免疫组化检测,同时取12例正常口腔黏膜作为对照。所有切片先在pH为8的EDTA中经高压热修复,以后操作按试剂盒说明进行。用已知OPN阳性表达的肝硬化组织切片作为阳性对照片,用扁桃体旁皮层组织切片作为CD44v6的阳性对照。用PBS缓冲液代替一抗作为空白对照。

1.4 结果判断及定量分析

光镜下,结构清晰,着色明显高于背景,在相应部位出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,无棕黄色颗粒者为阴性细胞。染色完毕脱水封片后,用德国远东蔡氏KS400图像分析仪,在20倍物镜下将切片视野扫描并输入计算机,根据图像结构特征,按染色浓度选取特定阳性灰度阈,每张切片随机选取3个单位面积对其范围内OPN和CD44v6阳性颗粒面积所占百分比进行定量分析。

1.5 统计学处理

在正常口腔黏膜与OSCC患者间,OSCC不同病理学分级和淋巴结转移情况之间表达情况的比较应用Wilcoxon秩和检验。OSCC不同临床分期之间表达的比较用H检验和Nemenyi检验。OPN与CD44v6之间关系用Spearman秩相关性分析,以P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常口腔黏膜中OPN和CD44v6的表达

光镜下,可见OPN在正常口腔黏膜中几乎不表达,仅有2例见少量阳性细胞位于基底层细胞,且染色浅,阳性率为16.67%,平均阳性染色面积为(0.53±0.14)%。CD44v6抗原阳性物质为棕黄色颗粒状,在12例正常口腔黏膜中均呈阳性表达。阳性颗粒位于黏膜上皮的基底层和棘层细胞的细胞膜上,光镜下可见清晰完整的细胞轮廓,角化层或表层细胞及间质成分中未见其阳性表达(图1),阳性率为100.00%,平均阳性染色面积为(23.33±5.32)%。

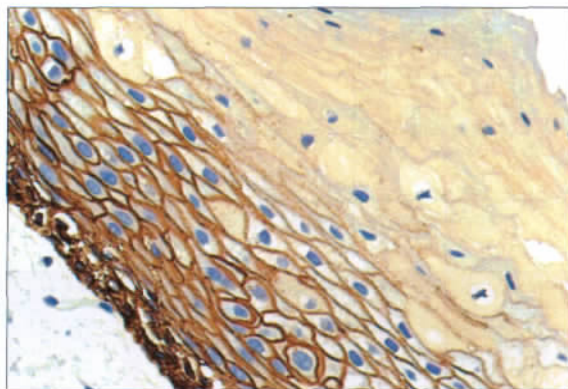


图1 CD44v6在正常口腔黏膜中的表达 EnVision™ ×200
Fig 1 CD44v6 expression in normal oral mucosa EnVision™ ×200

2.2 OSCC中OPN和CD44v6的表达

在OSCC中,OPN阳性颗粒不仅在浅层的癌细胞表达,同时在浸润入深层结缔组织内的癌细胞中也有表达。OPN阳性率为71.19%(42/59),平均阳性染色面积为(54.65±18.20)%,OPN在OSCC患者肿瘤组织中表达显著高于正常口腔黏膜(P<0.05)。CD44v6阳性率为86.44%(51/59),平均阳性染色面积为(25.27±5.10)%,与正常口腔黏膜相比差异无统计学意义,CD44v6在OSCC中阳性颗粒主要位于肿瘤细胞膜,部分位于细胞浆中,细胞核和细胞间质中无着色(图2),提示CD44v6存在于细胞膜上。

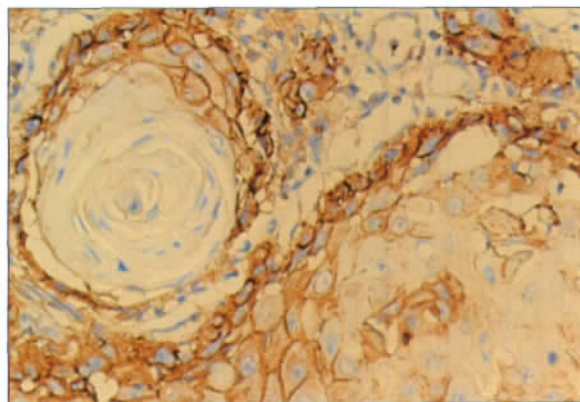


图2 CD44v6在口腔鳞状细胞癌中的表达 EnVision™ ×200
Fig 2 CD44v6 expression in OSCC EnVision™ ×200

2.3 不同临床病理指标下OSCC患者OPN和CD44v6的表达

为了进一步研究在OSCC中OPN表达与临床病理学之间的关系，分别按临床分期、淋巴结转移和病理分级对OPN和CD44v6的表达情况进行统计分析，具体分析结果见表1。在OSCC中OPN的表达强度与

临床分期正相关，即 ~ 期肿瘤组织中OPN表达明显多于 期，后者表达又高于 期。有淋巴结转移者的阳性染色面积显著高于无淋巴结转移者(图3)。然而，不同病理分化程度的OSCC，其OPN染色强度没有明显差异。在OSCC中CD44v6与临床分期、淋巴结转移以及病理分级关系均不密切。

表 1 OSCC中OPN和CD44v6表达与临床病理指标的关系

Tab 1 The Relations between the expression of OPN, CD44v6 and clinical pathology index in OSCC

临床病理指标	分类	例数	OPN阳性染色面积(%)	P值	CD44v6阳性染色面积(%)	P值
临床分期	期	20	35.85 ± 7.21		23.73 ± 6.29	
	期	16	45.79 ± 8.18	0.045*	25.24 ± 4.83	0.632
	~ 期	23	74.58 ± 10.84	0.036*	26.28 ± 7.13	0.778
淋巴结转移	有	20	64.37 ± 17.01		24.53 ± 4.96	
	无	39	40.07 ± 16.52	0.008*	26.12 ± 7.19	0.512
病理分级	高分化	38	50.59 ± 23.18		27.63 ± 6.22	
	中低分化	21	58.21 ± 13.18	0.456	23.95 ± 4.28	0.473

注：*为P<0.05，具有统计学意义

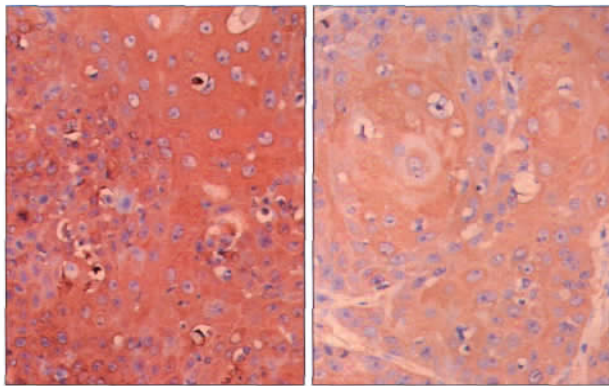


图 3 OPN在伴淋巴结转移(左)及不伴淋巴结转移(右)的OSCC肿瘤组织中的表达 EnVision™ × 200

Fig 3 OPN expression in metastasis(left) and nonmetastasis group(right) of OSCC EnVision™ × 200

2.4 OSCC中OPN和CD44v6蛋白表达的相关性分析

每例病理标本分别记录OPN和CD44v6表达的阳性染色面积。以OPN阳性染色面积为X轴，CD44v6阳性染色面积为Y轴绘制散点图(图4)。

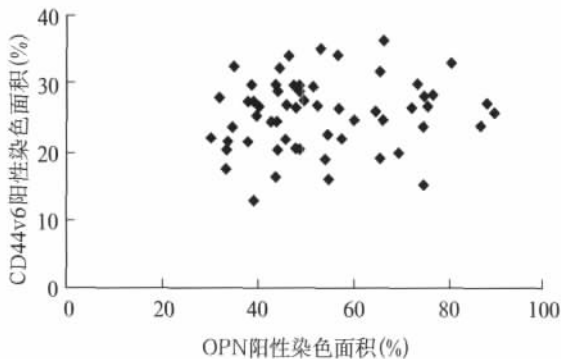


图 4 OSCC中OPN与CD44v6的相关关系

Fig 4 Relationship between OPN and CD44v6 in OSCC

两组数据进行Spearman秩相关性分析，分析结果为相关系数r=0.088，P>0.05，即OPN与CD44v6蛋白在OSCC组织中的表达无显著相关关系。

3 讨论

OPN是一种存在于ECM的磷酸化蛋白，主要通过整合素和多种细胞黏附分子CD44变异体来担当细胞黏附蛋白和细胞因子的功能，在全身多种恶性肿瘤的侵袭性和转移性上发挥重要作用^[2-3]。已知OPN结合CD44与埃兹蛋白、根蛋白和膜突蛋白作用可修饰细胞骨架，引起细胞运动，但诱导肿瘤转移的机制尚不清楚^[4]。CD44v6是黏附分子CD44的一种剪接变异体，是淋巴细胞的归巢受体和透明质酸的主要受体，对细胞之间、细胞与基质之间的黏附有重要作用。关于OPN在OSCC的表达情况及其意义目前研究较少，已有的国外研究多集中在细胞系和动物体内。已有的研究对CD44v6在口腔鳞癌中的表达及意义存在较大争议，目前尚缺乏有关OSCC中二者关系的报道。

以往的研究表明OPN与头颈部鳞癌有明确的联系^[5]。Jin等^[6]通过金黄地鼠颊囊癌变的过程中证实，在口腔黏膜癌变过程中，OPN mRNA表达逐渐升高。本实验结果显示，OPN在正常口腔黏膜中几乎不表达，而在OSCC中表达明显升高，阳性率为71.19%，与Devdl等^[7]报道的67%类似。此外，本研究发现OPN的表达与临床分期和淋巴结转移正相关，表明在OSCC的发生发展和转移的过程中，OPN的表达可能起重要作用，该结果与以往OPN在其他部位的研

究结果类似。以往的研究结果显示,在非小细胞肺癌^[9]和肝癌^[9]中,OPN的表达与侵袭性、转移性正相关;在喉鳞癌中^[10],OPN的表达水平与肿瘤分期和分级、淋巴结转移及远处转移情况显著相关,OPN与总体生存率负相关。

关于OPN与病理分化程度的研究尚存在争议^[7,10],本实验结果显示在OSCC中高分化和中低分化的阳性染色面积没有显著差异,提示OPN可能无法反映OSCC的肿瘤分化程度。

CD44v6在正常口腔黏膜中呈阳性表达,这与大部分的研究结果相同^[11-12]。然而,关于它在OSCC中的表达及意义争议较大。部分学者认为OSCC组织中CD44v6呈低表达,且与肿瘤分化程度、侵袭性、淋巴结转移呈负相关。近年来,越来越多的学者对上述观点产生了质疑,新的研究结果显示在鳞癌中,它与临床生物学行为无关,仅仅反映了一种无序的上皮成熟方式^[13]。田臻等^[14]也证实了CD44v6在OSCC中主要参与维持上皮结构的完整性和肿瘤细胞的鳞状上皮分化特征,而与侵袭和转移没有明确关系。本实验结果显示CD44v6在正常口腔黏膜和OSCC之间无显著差异,且其表达与肿瘤的侵袭和转移等关系不密切。

CD44v6是OPN的受体之一,二者结合能够启动一系列细胞信号表达,对于细胞的迁移、分化等生理功能具有重要影响。关于OPN与CD44v6之间的关系,以往的研究主要集中在肝癌和肺癌中,认为在肺小细胞癌和肝癌中二者具有相关性,而在肺鳞癌中关系不密切^[15]。本研究结果显示,在OSCC中OPN表达显著增高的同时,CD44v6无显著性增高。提示OPN可能不是通过其受体CD44v6发挥其在肿瘤转移和侵袭性等生物学行为方面影响作用的。OPN除可与CD44v6结合以外,还可以与整合素等其他因子结合,其导致的肿瘤转移、侵袭性增加等细胞生物学行为可能与之相关。OPN介导的肿瘤转移和侵袭性增强,是通过何种信号系统传递和介导,以及其更深层次的细胞生物学机制,有待于进一步的实验研究。

[参考文献]

[1] Hermanek P, Sobin LN. TNM classification of malignant tumors of oral and maxillofacial region[M]. Geneva: World Health Organization, 2002.
[2] Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumor progression[J]. Br J Cancer, 2004, 90(10):1877-1881.
[3] Wai PY, Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis[J].

J Surg Res, 2004, 121(2):228-241.
[4] Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, et al. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration[J]. J Cell Physiol, 2000, 184(1):118-130.
[5] 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(1Pt1):184-190.
[6] Jin H, Valverde P, Chen J. Cloning of hamster osteopontin and expression distribution in normal tissues and experimentally induced oral squamous-cell carcinoma[J]. Arch Oral Biol, 2006, 51(3):236-245.
[7] Devoll RE, Li W, Woods KV, et al. Osteopontin(OPN) distribution in premalignant and malignant lesions of oral epithelium and expression in cell lines derived from squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. J Oral Pathol Med, 1999, 28(3):97-101.
[8] 李永怀, 桂淑玉, 周青, 等. 肺癌骨桥蛋白和CD44v6的表达与转移关系的研究[J]. 肿瘤, 2006, 26(1):55-58.
LI Yong-huai, GUI Shu-yu, ZHOU Qing, et al. The expression and significance of osteopontin and CD44v6 in lung cancer[J]. Tumor, 2006, 26(1):55-58.
[9] Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2003, 98(1):119-127.
[10] Celetti A, Testa D, Saibano S, et al. Overexpression of the cytokine osteopontin identifies aggressive laryngeal squamous cell carcinomas and enhances carcinoma cell proliferation and invasiveness[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(22):8019-8027.
[11] Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, et al. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer[J]. Auris Nasus Larynx, 2004, 31(1):35-41.
[12] 朱虹, 曾庆华, 白淑清, 等. CD44v6在口腔鳞状细胞癌中表达的意义[J]. 华西口腔医学杂志, 1998, 16(3):198-200.
ZHU Hong, ZENG Qing-hua, BAI Shu-qing, et al. The expression and significance of CD44v6 in OSCC[J]. West China J Stomatol, 1998, 16(3):198-200.
[13] Rautava J, Soukka T, Inki P, et al. CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia[J]. Oral Oncol, 2003, 39(4):373-379.
[14] 田臻, 郭伟, 张伟国. CD44v6在不同生物学行为的口腔癌中的表达[J]. 上海口腔医学, 2002, 11(4):353-355.
TIAN Zhen, GUO Wei, ZHANG Wei-guo. The expression of CD44v6 in oral cancer with different biological behavior[J]. Shanghai J Stomatol, 2002, 11(4):353-355.
[15] 陈荣新, 叶胜龙. 骨桥蛋白与肿瘤转移的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2006, 33(1):16-18.
CHEN Rong-xin, YE Sheng-long. The research progress of OPN and tumor metastasis[J]. Int J Surg, 2006, 33(1):16-18.

(本文编辑 王 晴)