

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.04.05

• 临床研究 •

OPN、CD44v6 及 MMP-2 在肺鳞癌、腺癌中的表达及其临床意义

喻钧 潘铁成 李军 魏翔 陈涛 胡敏 宋定伟 刘立刚 陈鹏

【摘要】 背景与目的 近年来关于细胞表面黏附分子(CD44)、基质金属蛋白酶(MMP)与肿瘤关系的研究比较多,而对骨桥蛋白(OPN)的研究却很少。本研究的目的是通过研究 OPN、CD44v6 及 MMP-2 在肺鳞癌、腺癌中的表达水平,了解它们与肺鳞癌、腺癌生长、浸润及转移的关系。方法 采用免疫组化方法,对 69 例肺鳞癌、腺癌患者手术标本 OPN、CD44v6 和 MMP-2 进行检测。结果 OPN、CD44v6 和 MMP-2 表达率与患者组织学类型、TNM 分期及淋巴结转移有密切关系($P < 0.05$),与细胞分化程度则无明显关系($P > 0.05$)。OPN 与 CD44v6、MMP-2 的表达均呈正相关,CD44v6 与 MMP-2 表达之间无相关性。结论 OPN、CD44v6 和 MMP-2 的表达同肺癌病理类型、分期、淋巴结转移有密切关系,可能作为临床评估肺鳞癌、腺癌进展及预测肿瘤转移潜能的指标。

【关键词】 肺肿瘤/鳞癌 肺肿瘤/腺癌 骨桥蛋白 MMP-2 CD44v6 免疫组化

【中图分类号】 R734.2

Expression and clinicopathologic significance of OPN, CD44v6 and MMP-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung YU Jun, PAN Tiecheng, LI Jun, WEI Xiang, CHEN Tao, HU Min, SONG Dingwei, LIU Ligang, CHEN Peng. *Cardiothoracic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, P. R. China*

Corresponding author: YU Jun, E-mail: eagleren2000@hotmail.com

【Abstract】 **Background and objective** There are a lot of studies on relationship of surface adhesion molecule (CD44) and matrix metalloproteinase (MMP) with tumors in recent years, however study on osteopontin (OPN) is still few. The aim of this study is to investigate the levels of OPN, CD44v6 and MMP-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung, and to clearly understand their roles in growth, invasion and metastasis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **Methods** OPN, CD44v6 and MMP-2 were detected in 69 patients with squamous cell carcinoma and adenocarcinoma by immunohistochemical method. **Results**

The expression rate of OPN, CD44v6 and MMP-2 was significantly related to histological classification, TNM stages and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not to cell differentiation ($P > 0.05$). There was a positive correlation between OPN and CD44v6 expression ($P < 0.001$), as well as between OPN and MMP-2 expression ($P < 0.001$). There was no correlation between CD44v6 and MMP-2 expression. **Conclusion** OPN, CD44v6 and MMP-2 expression is related to the histology, TNM stages and lymph node metastasis of lung cancer. They might be used as clinical indicators to predict the progress and metastatic potential for squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung.

【Key words】 Lung neoplasms/squamous cell carcinoma Lung neoplasms/adenocarcinoma OPN
MMP-2 CD44v6 Immunohistochemistry

近年来,我国肺癌发病率和病死率均升至恶性肿瘤首位,肿瘤侵袭转移是非小细胞肺癌最重要的生物学行为。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种分泌性钙结合磷酸化糖蛋白,其中含有特异的与细胞黏附有关的 RGU(Arg→Gly→Asp)序列,通过与其受体整合

素、CD44 等结合来促进细胞的趋化、黏附和迁移,从而介导肿瘤细胞的侵袭转移,在肿瘤的复发与转移中起到重要作用^[1,2]。CD44 是细胞表面的黏附分子,影响细胞的浸润和转移^[3],其中以 CD44v6 与肿瘤浸润转移的关系尤为密切。肿瘤组织对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜的降解是恶性肿瘤浸润和转移发生过程中的重要步骤,目前研究认为基

质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)系统是参与此过程的最重要的酶系统^[4],而 MMP-2 在此过程中尤为重要。本研究中我们对组织切片中的 OPN、CD44v6 和 MMP-2 作定性分析,观察它们与肺鳞癌、腺癌的发生、发展及转移等一系列肿瘤生物学行为的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例来自华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科 2001~2005 年间手术治疗的肺癌患者。所有患者术前均未放化疗或化疗治疗。标本均常规取材,甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片。全组共 69 例,男 49 例,女 20 例;年龄 32~78 岁,平均 57 岁;鳞癌 35 例,腺癌 34 例;32 例伴淋巴结转移。另取肿瘤旁 5 cm 的正常肺组织 20 例作对照。

1.2 实验用品 抗 OPN 鼠抗人单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 生物科技公司,抗 CD44v6 鼠抗人单克隆抗体及抗 MMP-2 鼠抗人单克隆抗体均购于晶美生物工程有限公司,免疫组织化学染色试剂盒购于北京中杉金桥生物科技公司。每批染色均用已知阳性切片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断标准 观察阳性反应采用双盲法,并由两位高年资病理科医师独立观察每张切片后一起作出判断。用低倍镜和高倍镜观察切片,判断标准:每张切片随机选取 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,

观察阳性细胞染色强度,计数阳性细胞百分数。按着色细胞百分数计分:着色细胞<10%为 0 分,≥10%但<40%为 1 分,≥40%但<70%为 2 分,≥70%为 3 分。按着色强度计分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分。将着色细胞百分数计分与着色强度计分相乘作为总计分。总计分为 0 分为阴性(-),1~3 分为弱阳性(+),4 分以上为强阳性(++)。统计时以(-)判定为阴性,(+)和(++)判定为阳性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS11.0 软件进行 χ^2 检验和相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN、CD44v6 和 MMP-2 在正常肺组织、肺癌组织中的表达 OPN、CD44v6 和 MMP-2 在肺鳞癌、腺癌中的表达见图 1。OPN、CD44v6 和 MMP-2 在正常肺组织中分别有 3 例(15.00%)、1 例(5.00%)和 5 例(25.00%)呈阳性表达,在肺癌组织中分别有 39 例(56.52%)、38 例(55.07%)和 38 例(55.07%)呈阳性表达。肺癌组织中 OPN($\chi^2=10.727, P<0.05$)、CD44v6($\chi^2=15.792, P<0.05$)、MMP-2($\chi^2=5.615, P<0.05$)阳性表达率显著高于正常肺组织。

2.2 OPN、CD44v6 和 MMP-2 的表达与临床病理特征的关系 69 例患者中,OPN、CD44v6 和 MMP-2 表达与肺鳞癌、腺癌的组织学类型、临床分期及淋巴结转移有密切关系,而与分化程度未见明显关系(表 1、2)。

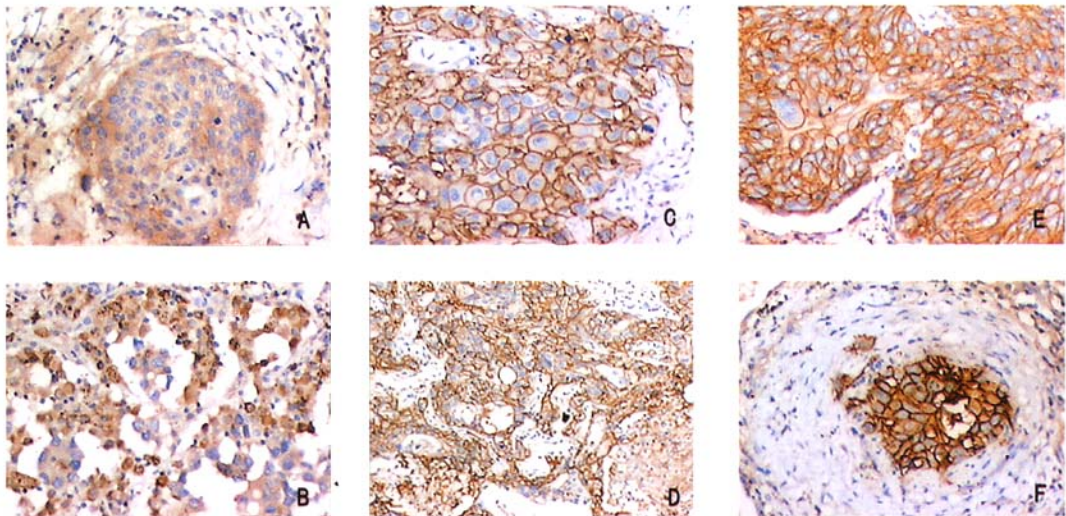


图 1 免疫组化染色结果

Fig 1 Results of immunohistochemical staining

A: OPN expression in squamous cell carcinoma (original magnification×400); B: OPN expression in adenocarcinoma (original magnification×400); C: CD44v6 expression in squamous cell carcinoma (original magnification×400); D: CD44v6 expression in adenocarcinoma (original magnification×100); E: MMP-2 expression in squamous cell carcinoma (original magnification×400); F: MMP-2 expression in adenocarcinoma (original magnification×400)

表 1 肺鳞癌、腺癌中 OPN、CD44v6 和 MMP-2 蛋白表达与临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship among OPN, CD44v6 and MMP-2 expression and clinicopathologic characteristics in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma

Characteristic	n	OPN (+)	χ^2 value	P value	CD44v6 (+)	χ^2 value	P value	MMP-2 (+)	χ^2 value	P value
TNM stage			8.695	0.013		8.087	0.018		9.354	0.009
I	26	9			20			10		
II	16	10			7			7		
III	27	20			11			21		
Histology			20.046	0.000		7.680	0.006		13.983	0.000
Squamous cell carcinoma	35	29			25			27		
Adenocarcinoma	34	10			13			11		
Differentiation			1.493	0.524		2.078	0.395		3.925	0.140
Well	6	2			5			1		
Moderate	7	4			4			4		
Poor	56	33			29			33		
Lymphatic metastasis			8.291	0.004		16.528	0.000		4.512	0.034
Positive	32	24			26			22		
Negative	37	15			12			16		

表 2 肺鳞癌、腺癌中 OPN、CD44v6 和 MMP-2 蛋白表达与临床分期的关系

Tab 2 Relationship among OPN, CD44v6 and MMP-2 expression and TNM stages in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma

TNM stage	OPN		CD44v6		MMP-2	
	χ^2 value	P value	χ^2 value	P value	χ^2 value	P value
I vs II	3.019	0.078	4.747	0.029	0.115	0.735
I vs III	8.323	0.004	7.142	0.008	8.433	0.004
II vs III	0.789	0.502	0.037	0.847	5.121	0.024

2.3 OPN、CD44v6 及 MMP-2 表达的相关性 69 例患者中,OPN 阳性表达 39 例,其中 CD44v6 阳性表达 30 例,MMP-2 阳性表达 34 例;而 30 例 OPN 阴性的患者中 CD44v6 阳性表达 8 例,MMP-2 阳性表达 4 例。OPN 与 CD44v6 表达呈正相关($\chi^2 = 17.309, P < 0.001$),OPN 与 MMP-2 表达呈正相关($\chi^2 = 37.372, P < 0.001$)。38 例 CD44v6 阳性表达的患者中 MMP-2 阳性表达 24 例,而 31 例 CD44v6 阴性的患者中 MMP-2 阳性表达 14 例,CD44v6 与 MMP-2 表达间无相关性($\chi^2 = 2.235, P > 0.05$)。

3 讨论

OPN 是一种磷酸化糖蛋白,具有多种生理功能,包括细胞黏附、化学趋附和免疫调节等。随着对该蛋白研究的日益深入,人们发现它与肿瘤的浸润和转移关系密切^[1,2]。Zhang 等^[5]在对 50 例肺癌组织标本进行免疫组化和 Northern blot 测定时发现,小细胞肺癌中 OPN 表达率(11.1%)明显低于非小细胞肺癌(37.5%);非小细胞肺癌中,鳞癌表达率(68.8%)又明显高于腺癌(20.8%)。Shijubo 等^[6]对 87 例 I 期肺癌患者进行免疫组化测定,结果发现肺腺癌患者 OPN

阳性的复发率(46.7%)与 OPN 阴性的复发率(8.0%)差异有统计学意义,提示 OPN 可作为肺腺癌的预后因素。Pan 等^[7]研究发现 OPN 过表达与肝癌的复发和转移有关,并认为是早期预测肝癌复发的一个指标。我们通过研究发现,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期之间 OPN 表达率差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 OPN 在中、晚期肺鳞癌、腺癌的表达率更高,与肺癌的临床分期密切相关;而且鳞癌中的阳性表达率也明显高于腺癌($P < 0.05$)。另外,发生淋巴结转移的肺癌组织中 OPN 的阳性表达率明显高于未发生转移的肺癌组织,说明 OPN 阳性表达的肺鳞癌、腺癌可能更容易发生淋巴结转移。

CD44 是细胞表面的跨膜糖蛋白,是介导细胞与细胞、细胞与基质间相互作用的黏附分子,其功能是 CD44 在 ECM 与透明质酸结合,维持组织或器官的结构,促进细胞浸润和介导细胞迁移^[8]。CD44v6 是 CD44 的一种拼接变体,CD44v6 的表达可能改变肿瘤的构成和功能,有助于肿瘤细胞获得转移潜能。近年来研究发现 CD44v6 的异常表达与许多人类恶性肿瘤的发生、发展和侵袭转移及预后密切相关^[9]。本研究结果显示,CD44v6 表达水平与肺癌分化程度无明显

显关系,但与组织学类型、临床分期及淋巴结转移状态有密切关系。

MMP 是一组锌离子依赖性内肽酶,几乎能降解 ECM 的所有成分,参与胎儿发育过程中的组织重构和伤口愈合过程中的胶原重构等生理过程。而在病理情况下,MMP 一方面通过降解基底膜和包绕肿瘤的基质,突破基质屏障,促进肿瘤侵袭转移;另一方面则通过毛细血管增生、新生血管生成等促进肿瘤生长和扩散^[10]。MMP-2 作为降解基底膜和 ECM 主要结构的关键酶,对恶性肿瘤的发展及间质血管生成起着重要作用。有研究表明 MMP-2 与多种恶性肿瘤的发展和侵袭转移密切相关^[11,12]。李红梅等^[13]的研究显示,转移能力相对较高的细胞系产生 MMPs 的能力强于转移能力相对较低的细胞系。MMP-2 等通过对 ECM 及基底膜中Ⅳ型胶原的特异性降解,使肿瘤细胞浸润能力增强,发生转移的可能性增加。我们的研究表明 MMP-2 的表达与淋巴结转移有密切关系,这与 Zucker、Gouzaler-Avila 等^[14,15]的实验结果相符。

在本研究中,我们发现肺癌组织中可以出现 OPN、CD44v6 和 MMP-2 的两种或三种蛋白联合表达,数据分析显示 OPN 和 CD44v6、MMP-2 之间存在着显著的相关性。这些联合表达可能与肺癌的侵袭和转移有很大的关系。CD44v6 的表达使癌细胞容易发生细胞黏附,MMP-2 的表达又使癌细胞容易进入血管形成癌栓,并促进肿瘤的血管生成,而 OPN 对两者的表达有促进作用^[16],多因素的综合作用使肺癌的转移更容易发生。由此我们大胆地假设:肺癌进展过程中,体内的 OPN 表达量增加,从而促进 CD44v6、MMP-2 的表达,MMP-2 降解 ECM 使癌细胞容易进入血液系统,CD44v6 使这些癌细胞黏附到血管内皮,促进癌栓的形成,促进肺癌的侵袭及转移。国外学者也有过类似的报道^[17]。

参 考 文 献

- Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41 : 723-749.
- Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, et al. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 1996, 271 (5248) : 509-512.
- Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells*, 1991, 3(9) : 347-350.
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr. Extracellular matrix 6; role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*, 1993, 7(15) : 1434-1441.

- Zhang J, Takahashi K, Takahashi F, et al. Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett*, 2001, 171(2) : 215-222.
- Shijubo N, Uede T, Kon S, et al. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(4) : 1269-1273.
- 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. *Cancer*, 2003, 98(1) : 119-127.
- Gao C, Guo H, Downey L, et al. Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis*, 2003, 24(12) : 1871-1878.
- Hefler LA, Concin N, Mincham D, et al. The prognostic value of immunohistochemically detected CD44v3 and CD44v6 expression in patients with surgically staged vulvar carcinoma: a multicenter study. *Cancer*, 2002, 94(1) : 125-130.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999, 43(Suppl) : S42-S51.
- Jiang DF, Lu YL, Qiu ZY, et al. Study on differentially expressed molecules influencing the metastatic potential between highly and poorly metastatic human lung giant cell carcinoma. *Chin J Oncol*, 2003, 25(6) : 531-534. [蒋代凤, 陆应麟, 邱卓荫, 等. 肺巨细胞癌高低转移株转移能力差异相关分子的研究. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(6) : 531-534.]
- Yuan LX, He WM, Zhang B, et al. Is the expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2 related to metastasis and recurrence of breast cancer? *Tumor*, 2002, 22(4) : 294-296. [袁莲香, 何伟民, 张斌, 等. 乳腺癌组织 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 蛋白表达与肿瘤的转移及预后. *肿瘤*, 2002, 22(4) : 294-296.]
- Li HM, Fang WG, Zheng J, et al. Zymographic analysis of MMPs in human carcinoma cell lines with different metastasis potential. *Chin J Pathol*, 1998, 27(5) : 341-343. [李红梅, 方伟岗, 郑杰, 等. 不同转移潜能的人肿瘤细胞系金属蛋白酶活性分析. *中华病理学杂志*, 1998, 27(5) : 341-343.]
- Zucker S, Lysik RM, Malik M, et al. Secretion of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by human lung cancer cell lines and revertant cell lines: not an invariant correlation with metastasis. *Int J Cancer*, 1992, 52(3) : 366-371.
- Gonzalez-Avila G, Iturria C, Vadillo F, et al. 72-kD (MMP-2) and 92-kD (MMP-9) type IV collagenase production and activity in different histologic types of lung cancer cells. *Pathobiology*, 1998, 66(1) : 5-16.
- Lin Q, Wang LX. The progress of the study on the relationship of the OPN and blood vessel remodeling. *Med Recapitulate*, 2004, 10(12) : 731-733. [林全, 王良兴. 骨桥蛋白与血管重塑的关系研究进展. *医学综述*, 2004, 10(12) : 731-733.]
- Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, et al. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer*, 1996, 15(3) : 311-323.

(收稿:2005-11-27 修回:2006-03-11)

(本文编辑 李蓓兰)