

骨桥蛋白在口腔鳞状细胞癌中的定量表达及临床意义

姜 蕾¹, 姜晓钟^{1*}, 何 金², 吴 洋¹, 赵云富¹

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

[摘要] 目的:探讨骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)肿瘤组织中的表达及其临床意义。方法:EnVision™法检测正常口腔黏膜($n=12$)和 OSCC 患者肿瘤组织($n=59$)中 OPN 的表达,应用图像分析系统对染色结果进行定量分析,统计不同临床、病理指标下 OSCC 肿瘤组织 OPN 的表达情况。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 表达在 OSCC 不同临床分期、有无颈淋巴结转移间均有显著差异:临床 I 期($n=23$)表达高于临床 II 期($n=16$),后者表达高于临床 III 期($n=20$)者(P 均 <0.05);颈淋巴结转移患者($n=20$)表达高于未转移者($n=39$, $P<0.05$)。而其表达水平在 OSCC 高分化($n=38$)和中低分化患者($n=21$)间无显著差异。结论:OPN 在 OSCC 中存在过度表达,其表达水平与肿瘤临床分期以及有无颈淋巴结转移存在一定的相关性(临床晚期患者、颈淋巴结转移患者表达程度较高),而与肿瘤分化程度无关。

[关键词] 骨桥蛋白;口腔肿瘤;癌,鳞状细胞;免疫组织化学

[中图分类号] R 739.85 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1222-04

Quantitative analysis of osteopontin expression in oral squamous cell carcinoma tissues and its clinical significance

JIANG Lei¹, JIANG Xiao-zhong^{1*}, HE Jin², WU Yang¹, ZHAO Yun-fu¹ (1. Department of Stomatology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To quantitative analyze the expression of osteopontin (OPN) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissues and its clinical significance. **Methods:** OPN expression was examined in 59 OSCC (with different clinical and pathological characteristics) and 12 normal oral mucosa (NOM) samples by using immunohistochemical method. The staining results were quantitatively studied by image analyzer. **Results:** OPN expression was much higher in OSCC sample than that in NOM sample ($P<0.05$). OPN expression was significantly different in OSCC samples of different clinical stages and with or without cervical lymphatic metastasis: with the expression at stage I ($n=16$) lower than that at stage II ($n=23$) but higher than that at stage III ($n=20$) (both $P<0.05$), and the expression higher with metastasis ($n=20$) than that without metastasis ($n=39$, $P<0.05$). There was no significant difference between highly differentiated ($n=38$) and poorly differentiated ($n=21$) OSCC samples. **Conclusion:** OPN is over expressed in OSCC tissues and its expression is associated with the clinical stage and the presence of metastasis (with higher expression in late clinical stages and with metastasis), but not with the differentiation of the tumor.

[KEY WORDS] osteopontin; mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1222-1225]

细胞外基质是细胞生长所必需的微环境,在肿瘤发生发展过程中起重要作用。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是细胞外基质中的一种非胶原蛋白,在骨组织矿化、细胞黏附、信号转导、细胞免疫和血管再塑等方面具有多种生物功能。近年来越来越多的研究发现 OPN 与全身多种肿瘤转移的发生发展及预后相关,但其与口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)的相关研究报道较少。本研究应用免疫组化方法结合定量分析测定 OSCC 患者肿瘤组织 OPN 的表达,探讨其在 OSCC 中的临床意义。

1 材料和方法

1.1 临床资料 2000~2006 年我院收治并手术切除的口腔鳞状细胞癌共 59 例,临床及随访资料完

整,病理诊断明确。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。其中,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, I 期 20 例, II 期 16 例, III 期 23 例。全部肿瘤标本经甲醛溶液固定,石蜡包埋,做 3~4 μm 的连续切片 2 张,其中 1 张做 H-E 染色,按诊断标准复片确诊,另 1 张做免疫组化备用。另取 12 例正常口腔黏膜染色作对照。

1.2 免疫组化染色 应用 EnVision™法对 59 例口

[作者简介] 姜 蕾,硕士生。E-mail:vikalei@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail:jenjiang@263.net

腔鳞癌患者手术切除肿瘤组织进行免疫组化检测,同时取 12 例正常口腔黏膜做对照。所用单克隆抗体 OPN 单抗(克隆号 OP3N,即用型)为上海长岛生物技术公司产品。所用 EnVision™ 试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色液购于丹麦 DAKO 公司。所有切片先在 pH = 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阳性对照片,用 PBS 缓冲液代替一抗作空白对照。

1.3 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,每张切片随机选取 3 个单位面积对其范围内 OPN 免疫组化阳性颗粒面积所占百分比进行测定和定量分析。

1.4 统计学处理 正常口腔黏膜与 OSCC 患者间 OPN 表达的比较,OSCC 不同病理学分级和淋巴结转移情况之间 OPN 表达的比较应用 Wilcoxon 秩和检验。OSCC 不同临床分期之间 OPN 表达的比较用 *H* 检验和 Nemenyi 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN 在 OSCC 以及正常口腔黏膜中的表达

光镜下,可见 OPN 在正常口腔黏膜几乎不表达,仅有 2 例见少量阳性细胞位于基底细胞,且染色浅。在 OSCC 中,OPN 阳性细胞主要位于肿瘤细胞、细胞间质及浸润入下方结缔组织内散在的癌巢内。而且在癌巢内,肿瘤细胞染色深,在部分过度角化或角化不良的部分,染色淡而且稀疏(图 1)。OPN 在 12 例正常口腔黏膜中阳性表达仅 2 例(2/12),阳性率 16.67%,平均阳性染色面积(0.53 ± 0.14)%;在 59 例 OSCC 中阳性表达 42 例(42/59),阳性率 71.19%,平均阳性染色面积(54.65 ± 18.2)% ,OPN 在 OSCC 患者肿瘤组织中表达显著高于正常口腔黏膜($P < 0.05$)。

2.2 不同临床、病理指标下 OSCC 患者 OPN 的表达

2.2.1 OPN 表达与 OSCC 临床分期 在 59 例 OSCC 患者中,临床 I 期的 OSCC 20 例,OPN 平均阳性染色面积约(35.85 ± 7.21)%;临床 II 期共 16 例,平均阳性染色面积约(45.79 ± 8.18)%;在 23 例临床 III ~ IV 期的 OSCC 中,其平均阳性染色面积约(74.58 ± 10.84)%。临床 III ~ IV 期表达高于临床 I 期,后者表达高于临床 II 期(P 均 < 0.05)。



图 1 OPN 在 OSCC 肿瘤组织中的表达

Fig 1 OPN expression in OSCC samples (En Vision™, ×100)

2.2.2 OPN 表达与淋巴结转移 根据颈部淋巴结转移与否将 59 例 OSCC 病例分为淋巴结转移组(20 例)和无淋巴结转移组(39 例)。OPN 在 OSCC 淋巴结转移组中染色深,部位广(图 2A),平均阳性染色面积为(64.37 ± 17.01)%;在无淋巴结转移组中 OPN 染色浅且着色部位散在(图 2B),平均阳性染色面积为(40.07 ± 16.52)%。OPN 在淋巴结转移组中的表达显著高于无淋巴结转移组($P < 0.05$)。

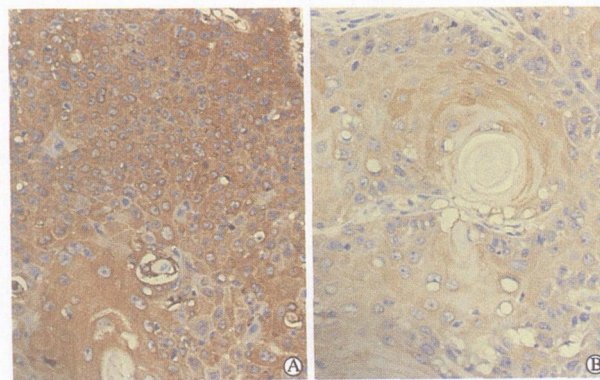


图 2 OPN 在伴淋巴结转移(A)及不伴淋巴结转移(B) OSCC 肿瘤组织中的表达

Fig 2 OPN expression in metastasis(A) and non-metastasis group(B) of OSCC (En Vision™, ×200)

2.2.3 OPN 表达与 OSCC 分化程度 根据鳞癌组织病理学分化程度不同,将所有 OSCC 病例分为高分化组(38 例)和中低分化组(21 例),比较各自的平均阳性染色面积。结果显示,高分化组为(50.59 ± 23.18)%,中低分化组为(58.21 ± 13.18)%,两者无显著性差异。

3 讨论

肿瘤的发生是一个多因素、多阶段、多基因参与

的复杂过程。OSCC 是口腔颌面部常见的恶性肿瘤,其发病因素与烟酒等不良嗜好、环境污染、机械刺激及生物学因素等有关,并涉及多种基因的改变^[1]。OPN 是一种具有分泌性、黏附性的糖基化磷酸化蛋白,受多种激素、生长因子、肿瘤促进剂及原癌基因表达产物的调控^[2]。肿瘤细胞分泌 OPN,可促进肿瘤生长和转移^[3]。其作用机制主要是与多种整合素和透明质酸受体 CD44 变异体有关,具体包括:(1)通过激活 NF- κ B 系统使细胞分泌尿激酶纤溶酶原激活酶(uPA)^[4,5]和基质金属蛋白酶(MMP)^[6],从而降解细胞外基质和细胞膜促进细胞浸润,引起肿瘤转移;(2)通过引起内皮细胞迁移、抗凋亡和血管腔形成来诱导肿瘤血管生成^[2]。越来越多的研究证明其与喉癌^[7]、食道癌^[8]等多种肿瘤的发生、转移、预后密切相关。关于 OPN 与 OSCC 临床病理的关系,国外有学者对细胞系和动物模型进行了部分研究,国内尚缺乏相关报道。

本实验采用免疫组化方法结合定量分析,检测了 59 例 OSCC 患者肿瘤组织及 12 例正常黏膜样本,结果发现 OPN 在正常口腔黏膜几乎不表达,而在 OSCC 中表达明显升高,阳性率为 71.19%,与 Devoll 等^[9]报道的 67%类似。此外,我们发现 OPN 的表达与临床分期呈正相关,即临床 I~II 期患者的肿瘤组织中 OPN 表达明显多于临床 III 期,后者表达又高于临床 IV 期者。这表明,在口腔鳞癌的发生发展过程中,OPN 的表达可能起了重要的作用。针对淋巴结转移情况的研究结果显示:存在淋巴结转移的肿瘤组织中 OPN 表达明显高于无转移组,这与大多数报道一致。以往的研究多集中于身体其他部位的鳞癌^[7],涉及口腔鳞癌者多采用动物实验^[10]或细胞系培养^[9],偶有采用免疫组化检验人类口腔鳞癌组织者仅仅采用阳性率或半定量的统计方法^[9]。本实验采用免疫组化结合定量分析的方法,在蛋白水平证实了 OPN 在人类口腔鳞癌组织的发生和淋巴结转移过程中发挥了重要的作用。临床分期和淋巴结转移情况与肿瘤的生物行为密切相关。因此,本研究结果提示 OPN 可能是判断 OSCC 预后的参考指标。

口腔鳞癌有无颈部淋巴结转移是影响患者术后生存率的一个重要因素。对于临床检查淋巴结阳性的患者进行根治性颈淋巴结清扫术,已成为重要而且有效的治疗手段。而对于临床检查颈淋巴结阴性的患者是否需要淋巴结清扫术,选择何种术式,迄今仍有不同意见。我们的研究结果可以为颈淋巴结清扫术的适应证提供一定的依据。

在 OPN 与肿瘤病理分级的问题上,以往的研究

尚有争议。Celetti 等^[7]在 58 例喉鳞癌中用免疫组化、免疫印迹及 RT-PCR 研究 OPN 的表达,发现与正常黏膜相比,OPN 的表达水平与肿瘤病理分级显著相关。Devoll 等^[9]用免疫组化分别检测口腔黏膜正常上皮与 43 例 OSCC 肿瘤组织,发现在 OSCC 不同病理分级上,OPN 表达无显著差异。我们观察到,按照肿瘤分化程度分组后,高分化组和中低分化组的平均阳性面积分别为 50.59%和 58.21%,两者无显著差异,提示 OPN 可能无法反映 OSCC 肿瘤分化程度。

以往研究结果显示,OPN 可以被其抗体或合成的多肽抑制,包括细胞毒性和免疫治疗的方法。Muramatsu 等^[11]用反义寡核苷酸检测了口腔癌细胞系中 OPN 的表达和功能,结果表明 OPN 被抑制后的细胞组较对照组生长明显缓慢,侵袭能力也明显下降。

综上所述,虽然目前对于将 OPN 作为靶点的口腔鳞癌的治疗仅限于体外的研究,但其作为阻止口腔鳞癌进展和转移的靶点仍有十分重要的意义,应用免疫组化检测其表达对指导临床综合治疗方案以及预后的判断具有积极意义。

[参考文献]

[1] Scully C, Field J K, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36:404-413.

[2] 范哲,李鸿,龙毅,等.骨桥蛋白的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2005, 9:307-309.

[3] Castellone MD, Celetti A, Guarino V, et al. Autocrine stimulation by osteopontin plays a pivotal role in the expression of the mitogenic and invasive phenotype of RET/PTC-transformed thyroid cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23:2188-2196.

[4] Angelucci A, Festuccia C, D'Andrea G, et al. Osteopontin modulates prostate carcinoma invasive capacity through RGD-dependent upregulation of plasminogen activators [J]. *Biol Chem*, 2002, 383:229-234.

[5] Tuck AB, Hota C, Chambers AF. Osteopontin(OPN)-induced increase in human mammary epithelial cell invasiveness is urokinase (uPA)-dependent [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 70:197-204.

[6] Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, et al. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:28261-28267.

[7] Celetti A, Testa D, Staibano 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, 11:8019-8027.

[8] Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, et al. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with common tumor markers[J]. *Oncology*, 2005, 68(2-3):285-292.

[9] Devoll RE, Li W, Woods KV, et al. Osteopontin (OPN) distri-



bution 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: 97-101.

[10] 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: 236-245.

[11] Muramatsu T, Shima K, Ohta K, et al. Inhibition of osteopontin expression and function in oral cancer cell lines by antisense oligonucleotides[J]. Cancer Lett, 2005, 217: 87-95.

[收稿日期] 2006-10-09 [修回日期] 2006-11-06
[本文编辑] 李丹阳, 贾泽军

· 短篇报道 ·

含镧制剂对离体牙釉质和牙骨质抗酸效果的影响

Influence of lanthanum on acid-resistant abilities of isolated human teeth enamel and root surface

刘 筠¹, 刘国勤¹, 虞国君², 李 江³, 金 晖⁴

(1. 中国人民解放军第 411 医院口腔中心, 上海 200081; 2. 复旦大学附属中山医院口腔科, 上海 200032; 3. 上海市第九人民医院口腔病理科, 上海 200011; 4. 中国人民解放军第 85 医院口腔科, 上海 200052)

[关键词] 镧; 脱矿质; 牙釉质; 牙根

[中图分类号] R 781.1

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2006)11-1225-01

1 材料和方法

1.1 标本 收集因正畸原因拔除的第一双尖牙 2 枚, 沿纵轴将牙根分 4 部分, 每部分均包括釉质及牙根, 共切得 8 块, 用指甲油覆盖每块牙面各部分, 仅留釉牙骨质交界线的上下各 3 mm 釉质及牙骨质带, 留出 6 mm × 4 mm 的窗口以备实验。

1.2 处理过程 配制含 500×10^{-6} La 的处理液 (pH 7.0)、含 0.05 mmol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.5) 的脱矿液、含 2.0 mmol/L Ca、1.5 mmol/L P 和 0.2 mol/L 中性电解质的再矿化液 (pH 7.0)。每日先将各牙块浸泡于 15 ml 的脱矿液中 1 h, 再浸入含 500×10^{-6} La 处理液 5 min, 最终浸于再矿化液中, 循环 2 次。次日更换新鲜处理液及脱矿和再矿化液, 重复以上步骤。整个实验均在 37℃ 中进行, 共处理 30 d, 牙块在处理液中实际浸泡时间为 5 h。取出样本后用丙酮洗去指甲油, 牙块磨至 100 μm 厚, 系列乙醇脱水, 二甲苯透明, 以喹啉作浸润介质封片, 在偏光显微镜 (OPTON 9920, West Germany) 下观察后将样本一侧抛光至镜面, 另一侧固定于样品台, 喷碳 200 Å, 利用 EPMA 870QHZ 电子探针 (日本岛津制作所), 以放大倍数 200, 工作电压 20 kV, 样本电流 0.5 mA, 采集时间 60 s 进行扫描, 测量釉质及根面脱矿深度, 同时在釉质及牙骨质的正常及脱矿区内用能谱分析测定 Ca、P 两种元素的平均原子核数, 后者表示脱矿量。统计学比较采用 *t* 检验。

2 结果

釉质和根面处理后的脱矿深度 (μm) 分别为 52.8 ± 16.7 和 48.1 ± 12.2 , 两者无显著差异; 实验前后釉质的脱矿量 (原子核数/μm²) 为 $24\ 113.9 \pm 3\ 833.4$, 明显大于根面的脱矿量 $22\ 525.6 \pm 3\ 217.1$ ($P < 0.05$)。

3 讨论

以往对 La 防龋作用的研究^[1]由于选择的实验条件不同, 造成了对 La 的防龋作用有不同的认识。我们的前期研

究^[2]发现用含 500×10^{-6} La、pH 7.0 的漱口液每日漱口 1 次即能达到有效的防龋效果, 因此本研究选择此条件处理同一牙体的釉质和根面。一般认为引起牙骨质脱矿的临界 pH 值 (6.0 ~ 6.8) 较造成牙釉质中脱矿的临界 pH 值高, 因此牙根组织对环境中的 pH 变化更为敏感, 暴露的牙骨质更易受菌斑中酸的侵袭而脱矿。本研究结果却显示酸性环境所造成的釉质和根面的脱矿深度无显著差异, 但实验前后釉质的脱矿量却明显大于根面的脱矿量。

我们认为这可能是由于釉质与根面内的磷灰石晶体种类、数量、结构的差异所致。首先由于根面含有类质晶体比例较釉质中多, 因此根部的 La^{3+} - Ca^{2+} 之间的交换反应较釉质更容易, 且易在较短时间内达到饱和的平衡状态, 形成稳定的 La -HAP。而釉质中的 HAP 晶体数量较多, 且密度比根面高, 因此釉质中需要 La 置换的 Ca 较根面多, 即用于置换的 La 需求也较多, La^{3+} - Ca^{2+} 之间的置换反应进行得较慢, 一直处于不饱和的置换状态, 可能需要更高的 La 浓度才能使反应达到平衡。小林 やすふ等^[1]曾用 2% ~ 8% 的 $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 处理釉质, 取得了满意的抗酸效果, 而本研究所用的 500×10^{-6} 含 La 浓度可能无法满足釉质的置换需求。另一方面由于根部含有较多的胶原纤维, 且表面呈蜂窝状, 可能使形成的含 La 磷酸化合物更容易沉积在表面及纤维间隙间, 甚至封闭牙本质小管, 增强了根面的抗酸溶解性。因此我们推断釉质要获得有效的防龋效果, 可能需要更高的 La 浓度, 这要进一步系统研究。

[参考文献]

- [1] 小林 やすふ, 尾关正美. テンタツ处理歯牙の耐酸性について[J]. 口腔卫生会志, 1980, 30: 82-98.
- [2] 金 晖, 张伟国, 李 江, 等. 用正交设计筛选含镧防龋剂的最佳应用模式[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2004, 2: 65-69.
- [收稿日期] 2006-09-05 [修回日期] 2006-11-08
[本文编辑] 孙 岩

[作者简介] 刘 筠, 主治医师. E-mail: seamus2430@163.com