

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00423

骨巨细胞瘤中骨桥蛋白的表达及临床意义

赵良瑜¹, 刘岩¹, 陈爱民¹, 苟三怀¹, 何金², 许丽英¹, 袁文^{1*}

1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] **目的:**观察骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在骨巨细胞瘤肿瘤组织中的表达并探讨其可能的临床意义。**方法:**EnVisionTM二步法检测 77 例骨巨细胞瘤患者肿瘤组织中 OPN 的表达, 比较不同临床、病理指标骨巨细胞瘤患者间 OPN 的表达差异, 分析其可能的临床意义。**结果:**OPN 在骨巨细胞瘤中表达的阳性率为 76.6%, 而在正常骨组织中呈弱阳性表达。侵袭性骨巨细胞瘤 OPN 阳性表达率明显高于非侵袭性骨巨细胞瘤, 差别具有统计学意义(95.5% vs 69.1%, $P=0.013$)。OPN 在不同 Campanacci 分级的肿瘤组织中均有阳性表达, 且随着分级的增加, 阳性表达率增加, 不同分级间阳性表达率差别有统计学意义($P=0.019$)。OPN 阳性表达率与复发与否、性别、年龄、手术方式、病程长短、发病部位等临床特征无显著相关。**结论:**骨巨细胞瘤 OPN 高表达, 且与肿瘤侵袭性及分级密切相关。

[关键词] 骨桥蛋白; 骨巨细胞瘤; 免疫组织化学

[中图分类号] R 738.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0423-04

Expression of osteopontin in giant cell tumor of bone and its clinical significance

ZHAO Liang-yu¹, LIU Yan¹, CHEN Ai-min¹, GOU San-huai¹, HE Jin², XU Li-ying¹, YUAN Wen^{1*}

1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the expression of osteopontin (OPN) in the giant cell tumor of bone (GCTB) and to discuss its clinical significance. **Methods:** OPN expression was examined in 77 GCTB samples by EnVisionTM two-step immunohistochemical method. And the expression was compared between patients with different clinical and pathological data; the implied clinical relevance was also analyzed. **Results:** The positive expression rate of OPN in the GCTB was 76.6%; only weak expression was noted in the normal bone tissues. The expression in the invasive GCTB was significantly higher than that in the non-invasive ones(95.5% vs 69.1%, $P=0.013$). The expression rate of OPN increased with the increase of Campanacci stages of GCTB, and significant difference was found between different stages($P=0.019$). The recurrence status, gender, age, surgery types, duration of illness or site of tumor were not associated with the positive rate of OPN. **Conclusion:** OPN is highly expressed in GCTB tissues, and the expression is associated with the invasiveness and the Campanacci stages of GCTB.

[KEY WORDS] osteopontin; giant cell tumor of bone; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4):423-426]

骨桥蛋白(OPN)是一种分泌型糖基化磷酸蛋白,与多种疾病有关,可由多种组织和细胞分泌,包括骨、皮肤、肌肉、膀胱、胎盘、上皮组织及自然杀伤细胞,可被分泌到血、尿、乳汁和耳蜗液等多种体液中,在肾小管等组织也有表达^[1]。它与成骨细胞的分化和骨形成有关,亦与破骨细胞的活动以及血管形成相关,在骨的修复过程中起关键作用^[2]。Sen-

ger等^[3]报道恶性转化上皮细胞能分泌 OPN;进一步的研究发现其与乳腺、肺、肝、前列腺、结肠等多种部位、多种病理类型的肿瘤侵袭和转移有关。Ghert等^[4]研究发现骨巨细胞瘤梭形细胞具有成骨特性,能够表达 OPN,但缺乏深入研究。本研究进一步观察 OPN 在人骨巨细胞瘤中的表达并分析其与患者临床病理特征的相关性,探讨其可能的临床意义。

[收稿日期] 2007-10-21 **[接受日期]** 2008-01-28

[作者简介] 赵良瑜, 博士, 主治医师. E-mail: zhaoliangyu@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73340, E-mail: higherhigher@sohu.com

1 材料和方法

1.1 材料来源及试剂 选取2000年1月至2007年7月第二军医大学长征医院连续收治的77例经手术切除和病理确诊的骨巨细胞瘤石蜡包埋组织,标本按常规进行10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋,全部蜡块作3~4 μm 的连续切片3张,其中1张行H-E染色,按诊断标准复片确诊,另2张行免疫组化备用。所用单克隆抗体OPN单抗为上海长岛生物技术公司产品。所用MaxVision™试剂盒和DAB显色液购于福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 临床病理资料

1.2.1 一般资料 77例患者年龄13~73岁,平均(39.3±14.2)岁,男41例,女36例。肿瘤生长的部位:脊柱30例(颈椎7例,胸椎13例,腰椎7例,骶骨3例),肩胛骨1例,肱骨4例,骨盆3例,股骨19例,胫骨12例,腓骨4例,髌骨1例,跟骨3例。全部病例均经充分术前准备后手术治疗,行肿瘤刮除、植骨术64例,一期瘤段截除术13例,其中截肢2例,保肢治疗11例。术后随访3~64个月。复发11例,再次手术仍行瘤段刮除7例,瘤段截除重建4例。第二次复发2例,均采取截肢治疗,术后无第三次复发。

1.2.2 临床病理特征 按照Campanacci分级^[5],结合临床、影像学 and 病理结果,分为:I级18例,表示静止型,几乎无临床症状,皮质骨侵犯轻微,变薄但完整的皮质骨包裹肿瘤;II级40例,表示活跃型,临床症状明显,皮质骨变薄与膨胀,边界不清楚;III级19例,表示侵袭型,病变进展快,似恶性肿瘤,皮质骨穿破,多有病理骨折,有软组织肿块并覆以假包膜等。按照病理学分类,侵袭性骨巨细胞瘤22例,非侵袭性骨巨细胞瘤55例。

1.3 肿瘤组织OPN免疫组化染色 采用EnVision™二步法对77例骨巨细胞瘤肿瘤组织进行免疫组化检测,同时取12例病灶周围正常骨组织作对照。操作按试剂盒说明进行,具体步骤如下:标本常规脱钙、石蜡包埋、切片(4 μm),切片贴于经多聚赖氨酸处理的玻片上,置70℃烤箱上烤片2h;常规脱蜡至水(二甲苯I、II、III各10min,无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇各2min);PBS(pH 7.4)

冲洗3min×3次;每张切片加一滴3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶的活性,室温静置10min,PBS冲洗3min×3次;将切片放入0.01mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH=7.4),直接高压煮沸2min进行抗原修复,用冷水快速冷却至室温;PBS冲洗3min×3次;每张切片加一滴特异性鼠抗单克隆OPN抗体,4℃湿盒内孵育过夜;PBS冲洗3min×3次;每张切片加1滴EnVision™试剂(二抗),室温下孵育30~35min;PBS冲洗3min×3次;每张切片加2滴新鲜配制的0.05%DAB+0.03% H_2O_2 显色液,显色3~10min,显微镜下观察显色程度,流水冲洗;苏木精复染约1min,1%盐酸乙醇溶液分化数秒,热水蓝化;PBS冲洗5min×3次;经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,风干,中性树胶封片。分别用已知OPN阳性表达的胃癌组织切片作为阳性对照片,用PBS缓冲液代替一抗作为空白对照。

结果判断: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,无棕黄色颗粒或显色强度与背景无差别者为阴性细胞。采用双盲法,随机计数10个高倍视野,每高倍视野计数100个细胞,按阳性细胞所占比例记录如下:无明显阳性细胞为阴性(-);阳性细胞数<25%(+);阳性细胞数25%~50%(++);阳性细胞数>50%(+++).

1.4 统计学处理 采用SPSS 10.0统计分析软件。以Wilcoxon秩和检验比较OPN在不同病理学类型间的表达差异,以 χ^2 检验比较骨巨细胞瘤不同分级间OPN阳性表达率的差别。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OPN在骨巨细胞瘤中的表达 光镜下,骨巨细胞瘤组织结构清晰,侵袭性骨巨细胞瘤病例可见肿瘤组织突破骨皮质,侵犯骨膜和周围软组织(图1)。OPN在正常骨组织中为弱阳性表达;骨巨细胞瘤肿瘤组织中,OPN阳性颗粒主要位于梭形细胞和多核巨细胞的胞质中,肿瘤间质以及浸润入下方结缔组织内散在的癌巢内,其中多核巨细胞胞质的着色明显高于背景,侵袭性骨巨细胞瘤的阳性表达更为明显(图2)。OPN在骨巨细胞瘤中表达的阳性率为76.6%。

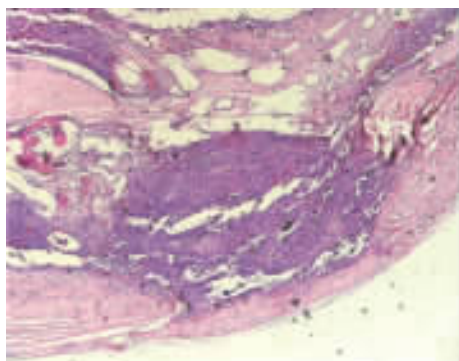


图1 侵袭性骨巨细胞瘤 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of invasive giant cell tumor of bone
Original magnification: $\times 5$

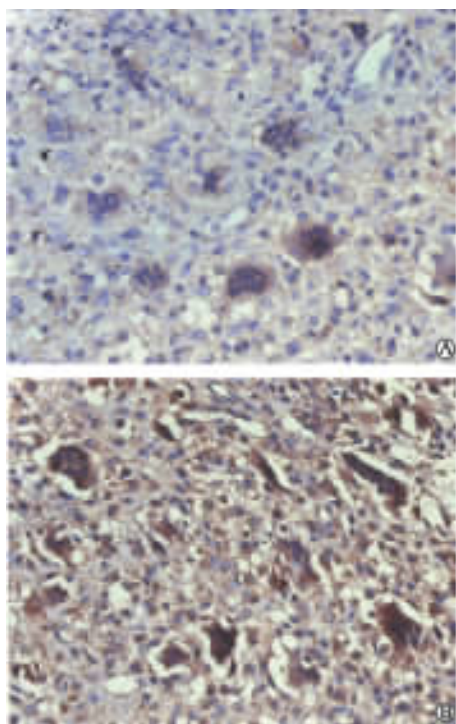


图2 OPN在非侵袭性(A)及侵袭性(B)骨巨细胞瘤肿瘤中的表达

Fig 2 Osteopontin expression in non-invasive(A) and invasive (B) giant cell tumor of bone (Immunohistochemistry)
Original magnification: $\times 40$

2.2 骨巨细胞瘤不同临床病理特征下 OPN 蛋白的表达 如表 1 所示。侵袭性骨巨细胞瘤 OPN 阳性表达率明显高于非侵袭性骨巨细胞瘤 (95.5% vs 69.1%, $P=0.013$), 差异具有统计学意义。OPN 在不同 Campanacci 分级的肿瘤组织中均有阳性表达, 且随着分级的增加, 阳性表达率增加, 不同分级间阳性表达率差别有统计学意义 ($P=0.019$)。而

OPN 与骨巨细胞瘤的其他各项临床特征 (如复发、性别、年龄、手术方式、病程长短、发病部位等) 关系不很密切。

表1 骨巨细胞瘤不同临床、病理指标下 OPN 的表达

Tab 1 Relationship of OPN with clinical and pathological characters

Variable	N	Positive rate(%)	P value
Pathological grouping			
Invasive	22	95.5	0.013
Non-invasive	55	69.1	
Campanacci staging			
I	18	55.6	0.019
II	40	77.5	
III	19	94.7	
Recurrence			
Yes	11	72.7	0.74
No	66	77.3	
Gender			
Male	41	73.2	0.44
Female	36	80.6	
Age			
≤ 50 years	52	78.8	0.51
> 50 years	25	72.0	
Operation type			
Erasion and bone graft	64	73.4	0.14
En-bloc resection	13	92.3	
Length of course			
≤ 3 months	39	69.2	0.12
> 3 months	38	84.2	
Location of tumor			
Spine	30	80.0	0.57
Limbs	47	74.5	

3 讨论

骨巨细胞瘤在我国发病率较高, 单纯行病灶刮除术后有较高的复发率。对骨巨细胞瘤病理上既往采用 Jaffe 分级, 但因组织学分级与生物行为不一致而存在争议, 因此学者们努力寻找能够对骨巨细胞瘤的复发、预后等生物学行为相关联的生化指标。Cheng 等^[6]认为 OPN 的表达具有组织细胞特异性, 并且受多种激素、生长因子、肿瘤促进剂及原癌基因表达产物的调控; OPN 在体内有多种细胞分泌, 巨噬细胞的抗肿瘤作用受其影响, OPN 敲除的肿瘤细胞侵袭性明显减弱。其作用机制主要与多种整合素和透明质酸受体 CD44 变异体有关。Allan 等^[7]在实验研究中发现 OPN 高表达的肿瘤细胞侵袭性和转移能力较强, 进一步的临床研究也发现淋巴结转移的肿瘤组织中 OPN 呈高表达, 因此认为 OPN 可

能与肿瘤侵袭性和转移有关。本研究检测了 OPN 在骨巨细胞瘤中的表达情况,结果发现其在骨巨细胞瘤组织中有表达,且随肿瘤分级的增加,阳性表达率增加。

OPN 与骨巨细胞瘤病理学类型的相关性尚有争议。本研究结果发现非侵袭性骨巨细胞瘤肿瘤组织 OPN 阳性表达率低且多为弱阳性,而侵袭性骨巨细胞瘤的阳性表达率高、多为强阳性,侵袭性和非侵袭性骨巨细胞瘤 OPN 阳性表达率具有统计学差异 ($P < 0.05$)。这表明 OPN 可能与骨巨细胞瘤的侵袭性有关。进一步的深入观察发现 OPN 表达阳性的部位,主要位于单核细胞和多核巨细胞的胞质中,肿瘤间质以及浸润入下方结缔组织内散在的癌巢内。而 Atkins 等^[8]研究认为,骨巨细胞瘤单核基质细胞体现了骨巨细胞瘤的肿瘤特征,破骨细胞的前体即为单核细胞,这些单核细胞不但存在于骨髓中,也存在于外周血中。Tanaka 等^[9]在多发骨髓瘤的研究中发现,破骨细胞能够产生 OPN,并且和骨髓瘤细胞产生的血管内皮生长因子协同,诱导肿瘤的侵袭。综上所述,OPN 在骨巨细胞瘤的破骨活动以及侵袭性方面可能起重要作用。

本研究结果还发现,OPN 阳性表达率与患者术后复发率、性别、年龄、病程、发病部位等临床特征之间无明显相关,与 Mendenhall 等^[10]的研究结果类似,提示影响骨巨细胞瘤复发与否的最重要的因素可能是肿瘤切除方式。

Wai 等^[11]将 OPN 作为骨巨细胞瘤的治疗靶点进行了一系列体外研究,为将来可能的基因治疗提供了依据;本研究结果再次证实了 OPN 对骨巨细胞瘤的发生、发展及其侵袭性具有一定意义,为进一步的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Matusan K, Dordevic G, Stipic D, Mozetic V, Lucin K. Os-

teopontin expression correlates with prognostic variables and survival in clear cell renal cell carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2006,94: 325-331.

- [2] Duvall C L, Taylor W R, Weiss D, Wojtowicz A M, Guldberg R E. Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2007,22:286-297.
- [3] Senger D R, Wirth D F, Hynes R O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins[J]. *Cell*, 1979,16:885-893.
- [4] Ghert M, Simunovic N, Cowan R W, Colterjohn N, Singh G. Properties of the stromal cell in giant cell tumor of bone[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2007,459:8-13.
- [5] Campanacci M. Giant-cell tumor and chondrosarcomas: grading, treatment and results (studies of 209 and 131 cases)[J]. *Recent Results Cancer Res*, 1976(54):257-261.
- [6] Cheng J, Huo D H, Kuang D M, Yang J, Zheng L, Zhuang S M. Human macrophages promote the motility and invasiveness of osteopontin-knockdown tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2007,67: 5141-5147.
- [7] Allan A L, George R, Vantuyghem S A, Lee M W, Hodgson N C, Engel C J, et al. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer[J]. *Am J Pathol*, 2006,169:233-246.
- [8] Atkins G J, Kostakis P, Vincent C, Farrugia A N, Houchins J P, Findlay D M, et al. RANK Expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone[J]. *J Bone Miner Res*, 2006,21:1339-1349.
- [9] Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A, et al. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13:816-823.
- [10] Mendenhall W M, Zlotnicki R A, Scarborough M T, Gibbs C P, Mendenhall N P. Giant cell tumor of bone[J]. *Am J Clin Oncol*, 2006,29:96-99.
- [11] Wai P Y, Mi Z, Guo H, Sarraf-Yazdi S, Gao C, Wei J, et al. Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses *in vitro* and *in vivo* CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis[J]. *Carcinogenesis*, 2005,26:741-751.

[本文编辑] 贾泽军