

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00715

骨桥蛋白对骨髓内皮祖细胞体外增殖功能的影响

王 玥, 隋金珂, 方国恩*, 施俊义*, 苏东玮

第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察骨桥蛋白(OPN)对体外培养的人骨髓源性内皮祖细胞(EPCs)增殖功能的影响及可能的机制。**方法** 以密度梯度离心法获取人骨髓单个核细胞(MNCs), 差速贴壁法培养 8 d, 由形态学、流式细胞仪、DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白和 FITC 标记的荆豆凝集素 1 双染鉴定为 EPC 后, 免疫组化和 RT-PCR 方法检测 OPN 在 EPC 的表达。加入不同浓度人重组 OPN 和 PI3K 抑制剂 LY294002 和 Akt 抑制剂作用于 EPC, 采用 CCK-8 法观测 EPC 的增殖能力。**结果** 人重组 OPN 促进 EPC 的增殖功能, 并且呈剂量依赖性。抑制 PI3K/Akt 信号通路可以阻断 OPN 对 EPC 增殖能力的影响。**结论** 人重组 OPN 在体外可能通过 PI3K/Akt 信号通路调节人骨髓源性 EPC 的增殖能力。

[关键词] 骨桥蛋白; 内皮祖细胞; 细胞增殖

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0715-06

Effects of osteopontin on proliferation of endothelial progenitor cell *in vitro*

WANG Yue, SUI Jin-ke, FANG Guo-en*, SHI Jun-yi*, SU Dong-wei

Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of osteopontin (OPN) on the proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) and to explore the underlying mechanisms. **Methods** The total mononuclear cells (MNCs) were isolated from bone marrow by Ficoll density gradient centrifugation, and EPCs were obtained by differential attachment technique from MNCs after culture for 8 days. The EPCs were identified by morphology observation, flow cytometry and test of the ability to intake the acLDL and bind UEA-1. OPN expression in EPCs was examined by immunohistochemistry and RT-PCR. EPC proliferation was assayed by CCK-8 assay after EPCs were treated with different concentrations of OPN or the inhibitors of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and Akt (LY294002 and Akt inhibitor). **Results** The recombinant OPN protein increased EPC proliferation in a dose-dependent manner, and inhibition of the PI3K/Akt pathway blocked the influence of OPN on the proliferation of EPCs. **Conclusion** Recombinant OPN plays an important role in regulating the *in vitro* proliferation of bone marrow-derived EPCs via PI3K/Akt pathway.

[Key words] osteopontin; endothelial progenitor cells; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):715-720]

内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是内皮细胞的前体细胞。Asahara 等^[1]于 1997 年首先从外周血中分离出 CD34⁺/VEGFR2⁺的血管 EPCs, 它具有向内皮细胞分化的潜能。后来研究证实外周血 EPCs 来源于骨髓^[2], 参与成体缺血部位和肿瘤部位的血管生成。近来研究表明, EPCs 在肿瘤释放的细胞因子及趋化因子如血管内皮生长因子(VEGF)^[3]、SDF-1^[4]、G-CSF^[5]等及自身合成的细胞因子如 MMP-9^[6]、VEGF、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素样生长因子(IGF-1)^[7]等的作

下, 从骨髓动员至外周血, 跨内皮迁移, 定居到肿瘤组织, 参与肿瘤组织血管新生。肿瘤的血管新生(neovascularization)包括血管生成(vasculogenesis)和血管形成(angiogenesis)两种方式, 其形成主要靠 EPC 动员、移行、定居和功能性合并^[8]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种分泌型磷酸化糖蛋白, 它在肿瘤细胞中有较高表达。肿瘤组织和血浆血清中高表达 OPN 的乳腺癌患者容易发生转移, 预后不良^[9-10]。近来的报道指出 OPN 在肿瘤中的高表达与肿瘤血管密度(MVD)相关^[11-12],

[收稿日期] 2010-03-18 **[接受日期]** 2010-06-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30672170)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30672170)。

[作者简介] 王 玥, 博士。E-mail: sxwangyue520@163.com

* 通讯作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81870207, E-mail: fanguoen@yahoo.com.cn; Tel: 021-81873364, E-mail: shijunyi666@126.com

OPN 作为血管因子可以促进内皮细胞增生,增加肿瘤新生血管形成^[13-14]。

本研究观察 OPN 对体外培养的骨髓 EPC 增殖功能的影响,旨在从 EPC 的角度,初步探讨骨桥蛋白高表达乳腺癌的血管形成机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

EGM-MV2 培养基购自德国 PromoCell GmbH 公司;M199 培养基、胎牛血清(FCS)购自美国 Gibco BRL 公司;人纤维连接蛋白(FN)购自美国 Chemicon 公司;人淋巴细胞分离液(Ficoll, 1.077 g/ml)、人重组 VEGF、人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、FITC 标记的荆豆凝集素 1 (FITC-UEA-1)均购自美国 Sigma 公司;Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-acLDL)购自美国 Invitrogen;CCK-8 细胞增殖试剂盒购自日本同仁化学研究所;FITC-CD34 购自美国 Beckman Coulter 公司;PE-KDR 购自 R&D 公司;PE-CD133 购自德国 Miltenyi 公司;PI3K 抑制剂 LY294002 和 Akt 抑制剂购自 CalBiochem 公司;ABI-7500 Real-time 检测仪为美国 ABI 公司产品;754 型可见光分光光度计为上海第三分析仪器厂产品;低温冷冻离心机 1-15K 3K15 和生物安全柜 TYPE B2 均购自美国 Sigma 公司;Axiovert135 倒置显微镜为德国 ZEISS 公司产品;普通光学显微镜为日本 Olympus 公司产品。

1.2 细胞培养

健康成年人志愿者 1 名,签署知情同意书。严格遵守骨穿无菌操作,抽取志愿者骨髓 15 ml,以密度梯度离心法分离骨髓单个核细胞,以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种于包被有纤维连接蛋白的 10 cm 的培养皿中,每皿加入 6 ml EGM-MV2 培养基(含 5% FCS, VEGF 0.5 ng/ml, bFGF 5 ng/ml),放入二氧化碳孵箱(37℃, 5% CO₂, 饱和湿度)孵育 48 h 后,取出细胞悬液,仍以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度再次接种于预先包被纤维蛋白的培养皿中,48 h 后半量换液,以后每 48 h 全量换液 1 次。培养 7~9 d(即再贴壁后 5~7 d)后,观察细胞,当贴壁细胞铺满整个培养皿的底壁或部分集落生长较密集时,记为 P₀,消化传代。

1.3 EPC 鉴定

1.3.1 EPC 形态学鉴定

人骨髓来源的单个核细胞 48 h 再次贴壁后,相差显微镜每天观察细胞的形态学变化,分别于再贴壁后第 4、第 6、第 11、第 15 天拍照。

1.3.2 EPC 流式鉴定

培养 7~9 d 的细胞用 0.5% 胰酶消化后,制成密度为 $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ 的单个细胞悬液,分别加入 FITC-CD34 10 μl 、PE-KDR 20

μl 、PE-CD133 10 μl 。流式细胞仪检测细胞 CD133、CD34、KDR 的表达。

1.3.3 EPC 功能鉴定

培养 7~9 d 的细胞经胰酶消化后制成细胞悬液,放入 6 孔板中,加入 Dil-acLDL(终浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)37℃ 孵育 2 h,多聚甲醛固定 10 min 后洗涤;加入 FITC-UEA-1(终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)37℃ 孵育 1 h 后,用激光共聚焦显微镜观察,细胞质内 Dil-acLDL 和 FITC-UEA-1 双染色阳性(黄色)的细胞被认为是正在分化的 EPC。

1.4 免疫组化法测定 OPN 在 EPC 内的表达

将盖玻片放入培养皿中并用 FN 包被,取再贴壁后第 7 天的爬片细胞,甲醛固定后加入 Tryting-100 去酯化玻片后,滴加 1:50 小鼠抗人 OPN 一抗,PBS 作为对照,4℃ 孵育过夜,再滴加相应二抗,DAB 显色,显微镜下观察,阳性显示为棕色,洗涤后苏木精染色。

1.5 RT-PCR 法检测 EPC 中 OPN mRNA 的表达

我们用含有 VEGF 和 bFGF 培养基体外培养骨髓内皮祖细胞。在微血管内皮细胞中,VEGF 可以诱导 OPN 的表达^[15],大鼠骨肉瘤细胞中,bFGF 可以增加 OPN mRNA 的表达^[16]。考虑到在骨髓 EPC 培养的过程中,这些细胞因子可能影响 OPN 的表达,我们用 RT-PCR 法定量检测未加任何细胞因子的基础培养基 M199 和加入不同细胞因子处理后各组 EPC 中 OPN mRNA 的表达。将培养 7~9 d 的细胞经胰酶消化后制成的细胞悬液接种入 24 孔板 ($5 \times 10^4/\text{孔}$),分为 4 组,每组 6 孔,第 1 组只加入 M199 培养基,第 2 组加入含 VEGF 10 ng/ml 的 M199 培养基,第 3 组加入含 bFGF 5 ng/ml 的 M199 培养基,第 4 组加入含 OPN 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 M199 培养基,分别培养 24 h 后,消化贴壁细胞后分别抽提总 RNA,再反转录合成 cDNA,将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,上机用 ABI Prism 7500 SDS Software 分析各组细胞的 OPN mRNA 含量。GAPDH 作为内参。引物 OPN-f: 5'-TTG CAG TGA TTT GCT TTT GC-3'; OPN-r: 5'-GCC ACA GCA TCT GGG TAT TT-3'。

1.6 EPC 增殖实验

培养第 7 天的细胞经胰酶消化后制成细胞悬液,接种入 96 孔板 ($1 \times 10^4/\text{孔}$),将不同浓度的重组人 OPN 加入培养基,培养 48 h 后,加入细胞增殖试剂 CCK-8,处理 2 h 后在分光光度计上测定每孔细胞的光密度(D)值,以检测 OPN 是否有促进 EPC 增殖的效果。研究者已经确立了一些有关 OPN 调节细胞循环,抑制凋亡等生物过程中的信号转导途径,其中,磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路比较普遍^[17-18]。因

此, 我们猜测 OPN 有可能通过 PI3K/Akt 通路促进 EPC 增殖。将 PI3K 抑制剂 LY294002 和 Akt 抑制剂加入培养基中预处理 30 min, 之后再加入 OPN, 检测细胞增殖活性。

1.7 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据用 SPSS 16.0 统计软件包处理, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 EPC 鉴定

2.1.1 EPC 形态 密度梯度离心法分离出人骨髓单个核细胞后, 在 48 h 即可见有少量梭形细胞贴

壁; 弃去贴壁细胞, 取出悬浮细胞再次贴壁。第 3 天(再贴壁后 24 h 后)即可见少量贴壁细胞, 呈长梭形, 散在分布。培养 4 d 后(再次贴壁培养 48 h 后)可见散在贴壁的梭形细胞, 并有少量类圆形聚集生长(图 1A); 培养 6 d 后(再贴壁细胞培养第 4 天后), 细胞簇数明显增多, 部分呈集落样生长, 中间细胞类圆形, 周边生长出长梭形细胞(图 1B); 培养 11 d 后(再贴壁细胞培养第 9 天后), 细胞集落明显增大, 相邻集落互相融合, 大量散在梭形细胞生长明显(图 1C); 培养 15 d 后(再贴壁细胞培养第 13 天后), 细胞生长迅速, 出现典型“铺路石样”外观(图 1D)。

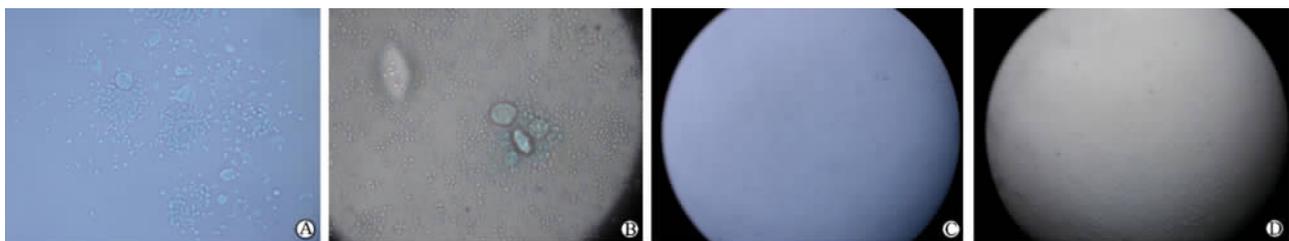


图 1 不同时间点培养细胞的形态

Fig 1 Morphology of cultivated cells at different time points

A: Scattered adherent spindle-like cells and a few round cells could be seen after culture for 4 days (cultured for 48 hours after adherent again); B: The number of cell clusters increased significantly. Colony growth and round cells were seen with spindle-like cells growing around after cultured for 6 days (cultured for 4 days after adherent again); C: Neighboring colonies grew and integrated with each other, and a large number of scattered spindle-like cells were seen after cultured for 11 days (cultured for 9 days after adherent again); D: Cells grew fast and had a typical “cobblestone” appearance

2.1.2 EPC 流式检测结果 细胞培养第 7 天 CD133 的阳性率(10.53 ± 6.15)%; CD34 的阳性率

(62.17 ± 12.19)%; KDR 的阳性率(94.82 ± 1.23)%(图 2)。

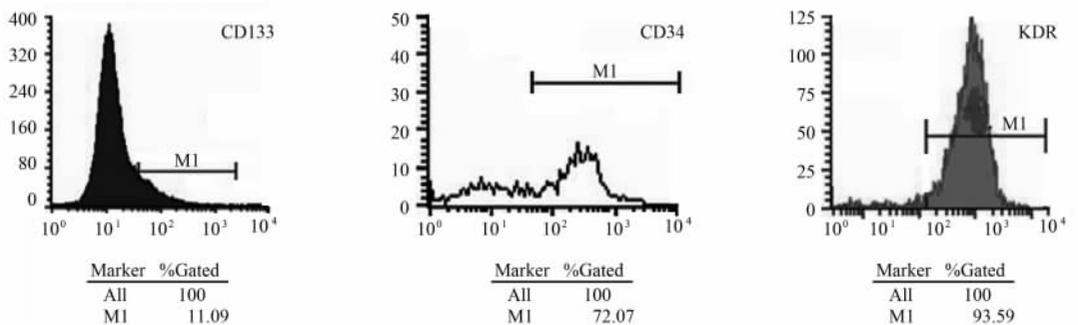


图 2 培养第 7 天细胞表面标记的流式检测

Fig 2 Cell surface marker detected by flow cytometry on the 7th day of culture

2.1.3 EPC 功能鉴定 荧光显微镜显示, 培养 7~9 d 的细胞吞噬 DiI-acLDL, 激发红色荧光(图 3A), 细胞吸附 FITC-UEA-1, 激发绿色荧光(图 3B), 双染色阳性细胞呈黄色为正在分化的 EPC(图 3C)。

2.2 EPC 表达 OPN

2.2.1 OPN 免疫细胞化学染色结果 OPN 呈棕

色颗粒均匀分布于 EPC 胞质内, 而对照组染色不明显(图 4)。

2.2.2 RT-PCR 在 EPC 中 VEGF 和 bFGF 均可以提高 OPN mRNA 的表达($P < 0.05$)。加入外源性 OPN 不能改变 EPC 中内生性 OPN mRNA 的表达($P > 0.05$), 说明 OPN 不能反馈调节自身的表达(图 5)。

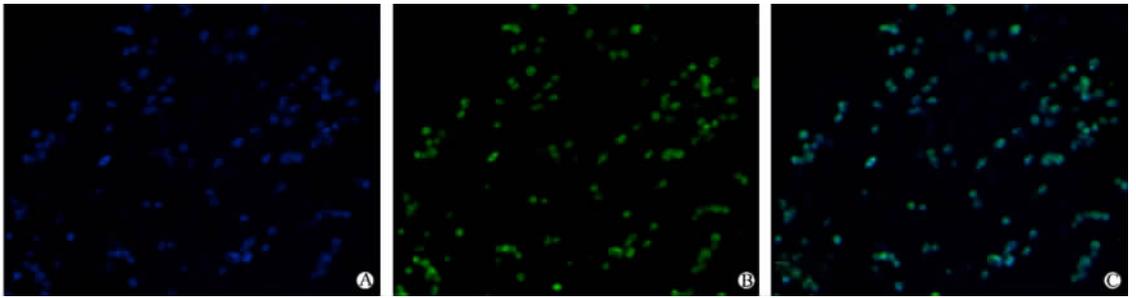


图3 EPC的功能鉴定

Fig 3 Functional identification of EPCs

A: EPCs emitting red fluorescence when they absorbed Dil-acLDL; B: EPCs emitting green fluorescence when they absorbed FITC-UEA-1; C: Double-positive EPCs emitting yellow fluorescence. Original magnification: $\times 100$

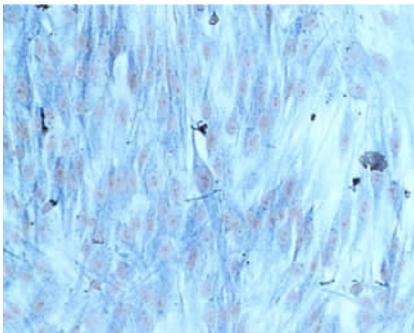


图4 EPC胞质内OPN的免疫组化染色

Fig 4 Immunohistochemical staining for OPN in cytoplasm of EPCs

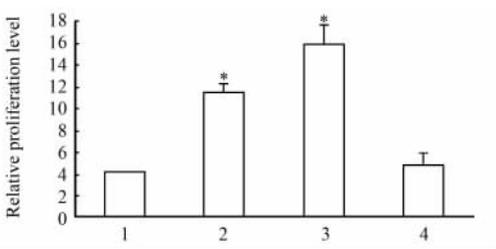


图5 不同生长因子对EPC中OPN mRNA水平的影响

Fig 5 Effects of different growth factors on OPN mRNA expression in EPCs as assessed by real-time RT-PCR

1: M199; 2: M199+10 ng/ml VEGF; 3: M199+5 ng/ml bFGF; 4: M199+4 $\mu\text{g/ml}$ OPN. * $P < 0.05$ vs M199 group; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.3 OPN促进EPC增殖 我们发现4 $\mu\text{g/ml}$ OPN加入含有VEGF 0.5 ng/ml、bFGF 10 ng/ml的EGM-MV2培养基培养EPC,其增殖能力并未明显提高($P = 0.068$,图6)。用含有VEGF和bFGF的EGM-MV2培养基培养EPC,这些细胞因子可以增加外分泌到培养基中的OPN,这有可能使外源性OPN对EPC的增殖作用显示得不明显。为了观察OPN在没有这些生长因子的作用下是否可以单独促进EPC的增殖,我们分别将0.5、1.2、4 $\mu\text{g/ml}$

OPN加入不含有VEGF和bFGF的M199培养基中,结果显示OPN可以独立促进EPC的增殖($P < 0.05$),并呈剂量依赖性(图7)。

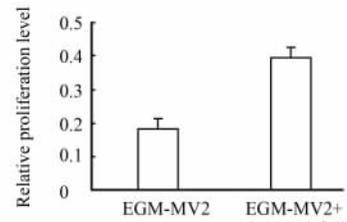


图6 EGM-MV2培养基中加入

4 $\mu\text{g/ml}$ OPN后EPC增殖量的变化

Fig 6 Proliferation of EPCs cultured with EGM-MV2 or EGM-MV2 plus 4 $\mu\text{g/ml}$ OPN

EPCs were treated with or without 4 $\mu\text{g/ml}$ OPN in the culture medium EGM-MV2 containing 0.5 ng/ml VEGF and 10 ng/ml bFGF. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

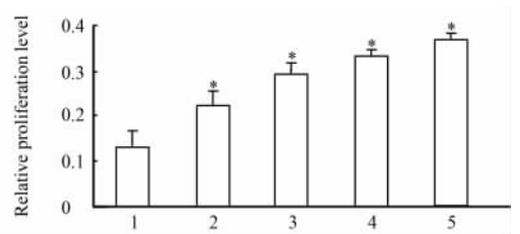


图7 M199培养基加入不同浓度OPN后EPC增殖量的变化

Fig 7 Proliferation of EPCs after treatment with different concentrations of OPN in M199

1: M199; 2: M199+0.5 $\mu\text{g/ml}$ OPN; 3: M199+1 $\mu\text{g/ml}$ OPN; 4: M199+2 $\mu\text{g/ml}$ OPN; 5: M199+4 $\mu\text{g/ml}$ OPN. * $P < 0.05$ vs M199 group; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.4 OPN通过PI3K/Akt信号通路促进EPC的增殖 CCK-8实验显示:LY294002和AKT inhibitor都抑制了OPN诱导的EPC增殖(图8),说明OPN

促进 EPC 的增殖是通过 PI3K/Akt 信号通路。

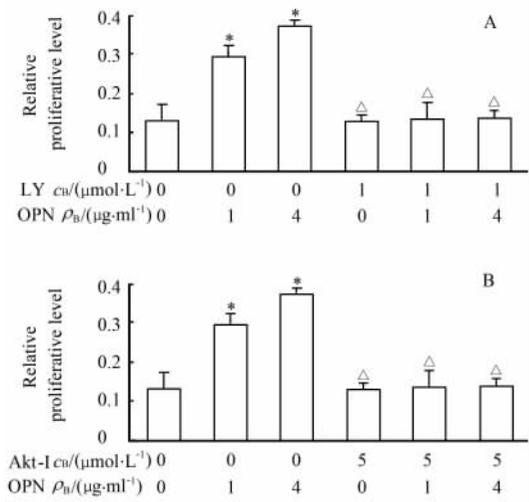


图 8 骨桥蛋白通过 PI3K/Akt 信号通路促进 EPC 增殖

Fig 8 OPN stimulates proliferation of EPCs through PI3K/Akt signaling pathway

Cell proliferation induced by OPN was inhibited by pretreatment with LY294002, a PI3K inhibitor (A), or Akt inhibitor (B). LY: LY294002; Akt-I: Akt inhibitor. * $P < 0.05$ vs control (without LY and OPN, or Akt-I and OPN); $\Delta P < 0.05$ vs 4 $\mu\text{g/ml}$ OPN group; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

OPN 首先由 Senger 等 1979 年作为一种与恶性转化有关的磷酸化蛋白提取的^[19]。它具有多种功能,在生理和病理条件下参与细胞黏附、凋亡、血管形成、炎症反应、肿瘤转移等过程^[20]。近来研究表明,OPN 在恶性肿瘤转移过程中发挥重要作用,被称为“恶性肿瘤转化因子”^[21]。血管生成是恶性肿瘤生长和转移的基础,在许多类型肿瘤中,OPN 的表达和肿瘤的血管密度及内皮细胞标志如 CD31、vWF 等的表达密切相关^[22-24]。OPN 选择性参与压力依赖性血管生成。在体外血管生成实验中,OPN 是 3 个差异表达基因之一^[25]。这些研究表明,OPN 作为潜在的成血管因子参与肿瘤血管生成。来源于骨髓的外周血 EPC 的分化与增殖是肿瘤发展过程中的关键步骤,EPC 从骨髓释放到进入肿瘤组织内形成新生血管,一般分为 3 个阶段^[8]:(1)骨髓动员,指 EPC 从骨髓中释放进入外周血;(2)血液迁徙,指 EPC 在血循环中运动,并倾向于向肿瘤组织或组织缺血移行与迁徙;(3)血管形成,指 EPC 聚集后形成新的血管,这种新的血管可以形成于已经存在血管生长的延伸(血管形成),也可以是原位生成的(血管生成)。抑制 EPC 能明显减缓肿瘤的

发展^[26-27]。已有研究表明重组 OPN 在体外可以促进人脐静脉内皮细胞增殖^[14]。因此,我们观察了 OPN 对于内皮细胞的前体细胞 EPC 的增殖作用,结果显示:体外培养的骨髓内皮祖细胞可以分泌 OPN,OPN 可以通过 PI3K/Akt 信号转导通路促进 EPC 增殖。

OPN 经凝血酶水解后暴露出的残基与各种整合素 β 和 CD44 受体结合介导相关的细胞信号途径^[28]。OPN 通过与 $\alpha\text{v}\beta3$ 整合素和 CD44 受体结合从而激活 PI3K/Akt 信号通路^[17-18]。而且 CD44 可以协助 $\beta1$ 整合素与 OPN 结合^[29]。因此我们猜测 EPC 可能表达整合素和 CD44 受体,它们介导了 OPN 诱导的 PI3K/Akt 信号转导通路的激活,从而促进了 EPC 的增殖。

乳腺癌患者的肿瘤组织及血浆血清中均可以发现高表达的 OPN。转移性乳腺癌患者血浆 OPN 水平越高患者无瘤生存期及总生存期越短,并且容易发生脏器转移,预后不佳^[9]。乳腺癌组织标本中 OPN 的表达,与生存率、肿块大小、肿瘤组织分级、淋巴结转移状况等临床病理因素相关,乳癌组织中 OPN 阳性的患者容易发生转移因此预后不良^[10]。最近研究发现 EPC 与乳腺癌诺丁汉预后指数密切相关^[30]。我们观察到重组 OPN 可以促进体外骨髓来源 EPC 的增殖,结合已有文献和我们的研究,我们认为高表达 OPN 的转移性乳腺癌可能通过肿瘤细胞分泌的 OPN 作用于肿瘤血管形成的重要参与者 EPC,促进其增殖,从而增加肿瘤新生血管的形成,而利于乳腺癌的生长与转移。OPN 及促进 EPC 增殖的相关信号通路的分子可能作为潜在的标志物,用以检测肿瘤抗血管靶向治疗的疗效。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275: 964-967.
- [2] Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. Circ Res, 1999, 85: 221-228.
- [3] Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera M L, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells[J]. Circ Res, 2001, 88: 167-174.
- [4] Peichev M, Naiyer A J, Pereira D, Zhu Z, Lane W J, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors[J]. Blood, 2000, 95: 952-958.
- [5] Kong D, Melo L G, Gnechhi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew

- C C. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries[J]. *Circulation*, 2004, 110: 2039-2046.
- [6] Tamura M, Unno K, Yonezawa S, Hattori K, Nakashima E, Tsukada H, et al. *In vivo* trafficking of endothelial progenitor cells their possible involvement in the tumor neovascularization [J]. *Life Sci*, 2004, 75: 575-584.
- [7] Rehman J, Li J, Orschell C M, March K L. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. *Circulation*, 2003, 107: 1164-1169.
- [8] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker P H, Verfaillie C M. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109: 337-346.
- [9] Bramwell V H, Doig G S, Tuck A B, Wilson S M, Tonkin K S, Tomiak A, et al. Serial plasma osteopontin levels have prognostic value in metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(11 Pt 1): 3337-3343.
- [10] Rudland P S, Higgins A P, El-Tanani M, De Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley J H, et al. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 3417-3427.
- [11] Shijubo N, Uede T, Kon S, Maeda M, Segawa T, Imada A, et al. Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160: 1269-1273.
- [12] Tang H, Wang J, Bai F, Zhai H, Gao J, Hong L, et al. Positive correlation of osteopontin, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastric cancer [J]. *Cancer Invest*, 2008, 26: 60-67.
- [13] Scatena M, Almeida M, Chaisson M L, Fausto N, Nicosia R F, Giachelli C M. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival [J]. *J Cell Biol*, 1998, 141: 1083-1093.
- [14] Cui R, Takahashi F, Ohashi R, Gu T, Yoshioka M, Nishio K, et al. Abrogation of the interaction between osteopontin and alphavbeta3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice [J]. *Lung Cancer*, 2007, 302-310.
- [15] Senger D R, Ledbetter S R, Claffey K P, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi C A, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha\beta 3$ integrin, osteopontin, and thrombin [J]. *Am J Pathol*, 1996, 149: 293-305.
- [16] Rodan S B, Wesolowski G, Yoon K, Rodan G A. Opposing effects of fibroblast growth factor and pertussis toxin on alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and type I collagen mRNA levels in ROS 17/2.8 cells [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 19934-19941.
- [17] Das R, Mahabeleshwar G H, Kundu G C. Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28593-28606.
- [18] Lin Y H, Yang-Yen H F. The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 46024-46030.
- [19] Senger D R, Wirth D F, Hynes R O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins [J]. *Cell*, 1979, 16: 885-893.
- [20] Haylock D N, Nilsson S K. Osteopontin: a bridge between bone and blood [J]. *Br J Haematol*, 2006, 134: 467-474.
- [21] Weber G F. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1552: 61-85.
- [22] Tang H, Wang J, Bai F, Hong L, Liang J, Gao J, et al. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85: 103-110.
- [23] Jain S, Chakraborty G, Kundu G C. The crucial role of cyclooxygenase-2 osteopontin-induced protein kinase C α/c -Src/IkappaB kinase α/β -dependent prostate tumor progression and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 6638-6648.
- [24] Chakraborty G, Jain S, Kundu G C. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis *via* autocrine and paracrine mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 152-161.
- [25] Pröls F, Loser B, Marx M. Differential expression of osteopontin, PC4, and CEC5, a novel mRNA species, during *in vitro* angiogenesis [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 239: 1-10.
- [26] Harraz M, Jiao C, Hanlon H D, Hartley R S, Schattman G C. CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors [J]. *Stem Cells*, 2001, 19: 304-312.
- [27] Rafii S. Circulating endothelial precursor cells, mystery, reality and promise [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105: 17-19.
- [28] Rangaswami H, Bulbule A, Kundu G C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression [J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16: 79-87.
- [29] Katagiri Y U, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 219-226.
- [30] Goon P K, Lip G Y, Stonelake P S, Blann A D. Circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in breast cancer: relationship to endothelial damage/dysfunction/apoptosis, clinicopathologic factors, and the Nottingham Prognostic Index [J]. *Neoplasia*, 2009, 11: 771-779.