

· 临床研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.018

脊柱浆细胞骨髓瘤中骨桥蛋白的表达及其临床意义

王良哲¹, 刘惠敏^{1*}, 杨志慧², 何金¹, 曹旭¹, 刘方方¹, 孙静¹, 朱维健¹, 陈兵¹(1. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003; 2. 解放军第81医院病理科, 江苏南京 210000)

[摘要] 目的: 探讨脊柱浆细胞骨髓瘤(plasma cell myeloma, PCM)中骨桥蛋白(osteopontin, OPN)的表达及其与临床病理特征和预后的相关性。方法: 选取第二军医大学长征医院1998-2006年间41例脊柱PCM及14例脊柱良性单纯性骨囊肿手术切除标本; 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(S-P)法检测OPN的表达。结果: (1) OPN在脊柱PCM中的阳性表达率为82.93%(34/41), 而良性骨囊肿中OPN表达均呈阴性($P < 0.01$); (2) 脊柱PCM中OPN蛋白的表达程度在M蛋白分型和临床分型各组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而与患者轻链分型、病理形态学分级、年龄和性别无显著关联($P > 0.05$); (3) OPN表达阳性患者整体生存率明显高于阴性组($P < 0.01$)。结论: OPN表达阴性脊柱PCM患者的预后可能较差。联合检测OPN和M蛋白分型以及临床分型对脊柱PCM预后判断可能有一定的临床意义。

[关键词] 浆细胞骨髓瘤; 脊柱; 骨桥蛋白; 预后

[中图分类号] R733.3; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0512-04

Expression of osteopontin in spinal plasma cell myeloma patients and its clinical significance

WANG Liang-zhe¹, LIU Hui-min^{1*}, YANG Zhi-hui², HE Jin¹, CAO Xu¹, LIU Fang-fang¹, SUN Jing¹, ZHU Wei-jian¹, CHEN Bing¹(1. Department of Pathology, Affiliated Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, No. 81 Hospital of PLA, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of osteopontin (OPN) in spinal plasma cell myeloma (PCM) and its relationship with the clinicopathological characteristics and prognoses of PCM patients. **Methods:** Forty-one PCM and 14 spinal simple bone cysts samples were obtained from Affiliated Changzheng Hospital of Second Military University (1998-2006) after surgery. The expression of OPN was determined by streptavidin-peroxidase (S-P) immunohistochemical staining. **Results:** (1) The positive expression rate of OPN in spinal PCM tissues was 82.93% (34/41), and it was absent in spinal simple bone cyst tissues ($P < 0.01$). (2) The expression of OPN in spinal PCM tissues was correlated with clinical and M-component classifications of PCM ($P < 0.05$), but was not correlated with the type of light chain, pathological stage, age or gender of patients ($P > 0.05$). (3) The overall survival rate of OPN positive PCM patients was higher than that of OPN negative patients ($P < 0.01$). **Conclusion:** OPN negative PCM patients are liable to have a poor prognosis. The clinical and M-component classifications combined with detection of OPN expression in PCM patients maybe used for predication of prognoses of PCM patients.

[Key words] plasma cell myeloma; spina; osteopontin; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 512-515]

浆细胞骨髓瘤(plasma cell myeloma, PCM)是一种B细胞恶性肿瘤,常常以骨髓被分泌Ig的恶性浆细胞侵犯和溶骨性损害为表现。发生于骨的浆细胞骨髓瘤主要分为孤立性浆细胞骨髓瘤和多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)两大类。组织学上PCM属于血液系统恶性肿瘤,其发生率仅次于非霍奇金淋巴瘤^[1]。在脊柱外科临床工作中,PCM以其特征性的多发性溶骨性病变成成为脊柱外科学者极为关注

的几种脊柱恶性肿瘤之一。骨髓瘤高度的侵袭性和

[基金项目] 第二军医大学长征医院青年科研启动基金(No. 200915)。Supported by the Scientific Research Starting Foundation for Young Scholars in Affiliated Changzheng Hospital of Second Military Medical University (No. 200915)

[作者简介] 王良哲(1980-),男,安徽省芜湖市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事骨肿瘤和血液系统肿瘤病理方面的研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: blueporpoise97@hotmail.com

较差的预后,一直是肿瘤领域的关注热点。近年来,骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在肿瘤侵袭和转移中所起的关键性作用已为人们所认识。本课题研究了脊柱浆细胞瘤组织中 OPN 的表达与浆细胞瘤的临床病理特征及预后的相互关系,试图为探索浆细胞骨髓瘤侵袭转移的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

脊柱浆细胞骨髓瘤 41 例,均为第二军医大学长征医院病理科 1998 ~ 2006 年间手术切除的脊柱浆细胞瘤石蜡包埋组织。其中男 30 例,女 11 例;年龄 28 ~ 76 岁,平均(50.17 ± 4)岁。肿瘤分类孤立性浆细胞瘤 13 例,多发性骨髓瘤 28 例。脊柱单纯性骨囊肿 14 例为对照组。

1.2 主要试验材料

OPN 兔抗人多克隆抗体(RAB-0295)、S-P 试剂盒及 DAB 显色剂均购自福州迈新生物技术公司。Olympus 显微镜 BX-41 购自日本 Olympus 公司。

1.3 PCM 细胞的病理形态观察标准

所有手术切除标本均经 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋后行 4 μm 连续切片,每例均行 H-E 染色,光镜进行病理形态学观察。根据 Bartl 等^[2]PCM 瘤细胞形态学分级标准,将 PCM 分为低度、中度和高度恶性 3 个级别。I 级(低度恶性):瘤细胞似正常浆细胞,分化成熟,大小一致。胞质丰富,嗜碱性。核偏位,卵圆形,染色质轮辐状,可见核空晕。核分裂象罕见;II 级(中度恶性):瘤细胞分化程度不一,可见大核、双核的原始或异型浆细胞及分化较成熟的浆细胞,并可见数量不等的瘤巨细胞和浆母细胞。瘤细胞有多形性,核质分化不同步,核质比增大,核周空晕可见。胞质丰富,嗜碱性。核大而不规则,见双核,核偏位,染色质分散不呈轮辐状排列,核仁可见,核分裂象可见;III 级(高度恶性):细胞呈明显的母细胞分化特点,体积大,核大或异型核、双核,可见一明显的中位红核仁,核周空晕不明显或消失,核分裂象易见。

1.4 免疫组织化学法检测 OPN 在 PCM 中的表达

将切片用 3% H₂O₂ 阻断 20 min,置于 0.01 mol/L 枸橼酸(pH 为 6.0)中,用微波炉修复 2 次,再将切片放入湿盒内。用山羊血清置 37 °C 孵育箱中封闭 30 min,甩干切片后滴加 OPN 抗体(兔抗人抗体 1:100),置 37 °C 孵育箱孵育 30 min,再放入湿盒内置 4 °C 冰箱中过夜。次日加生物素标记二抗(鼠抗兔)37 °C 30 min,链霉素抗生物素过氧化物酶溶

液 37 °C 30 min, PBS 和蒸馏水洗, DAB 液显色,苏木精复染。

1.5 免疫组化染色阳性结果判定

OPN 蛋白染色阳性为在细胞膜或胞质内出现棕黄色颗粒,且其着色强度高于背景非特异性染色者。每例切片随机选取 5 个高倍视野进行结果判定,按染色强度及阳性细胞数占肿瘤细胞总数的百分比进行综合评分。染色强度:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞数:小于总数的 5% 为 0 分,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,大于 50% 为 3 分。染色强度得分与阳性细胞数得分相加,0 分为阴性(-),1 ~ 3 分为弱阳性(+),4 ~ 5 分为中度阳性(++),大于或等于 6 分为强阳性(+++)。

1.6 统计学处理

应用 SPSS14.0 统计软件进行分析,采用等级资料的秩和检验(Kruskal wallis of nemenyis)。患者生存情况通过 Kaplan-Meier 方法分析,并采用 log-rank 法检验 OPN 的表达情况与整体生存时间的关系。

2 结果

2.1 脊柱 PCM 的病理形态学分级

依据文献[2]标准,本次选取的 41 例 PCM 中, I 级 14 例(34.1%), II 级 17 例(41.5%), III 级 10 例(24.4%)。

2.2 OPN 在脊柱 PCM 和单纯性骨囊肿中的表达

OPN 阳性表达定位于胞质,呈淡黄、棕黄或棕褐色颗粒。OPN 在 PCM 中有较高的阳性表达率,为 82.93%(34/41),其中“+”为 24.39%(10/41),“++”为 56.10%(23/41),“+++”为 2.44%(1/41)。单纯性骨囊肿中 OPN 全呈阴性(图 1)。

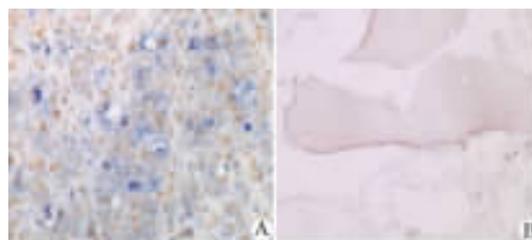


图 1 OPN 在脊柱浆细胞骨髓瘤和单纯性骨囊肿组织中的表达(×200)

Fig. 1 Expression of OPN in spinal PCM and spinal simple bone cyst tissues as detected by immunohistochemical staining (×200)

A: PCM; B: Simple bone cyst

2.3 脊柱 PCM 中 OPN 的表达与临床病理参数的关系

脊柱 PCM 中 OPN 蛋白的表达程度在 M 蛋白分型和临床分型各组之间均有显著差异 ($P < 0.05$), 其阳性表达率在 M 蛋白分型各组间关系具体为: 未分泌组的 100% (9/9) = IgG 型组的 100% (14/14) > IgA 型组的 50% (2/4) > 其他类型组的 35.7% (5/14); 在临床分型中孤立性浆细胞瘤组的 92.3% (12/13) 表达强度明显高于多发性骨髓瘤组的 78.6% (22/28)。而 OPN 阳性表达与患者轻链分型、病理形态学分级、年龄和性别无显著关系 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 脊柱 PCM 中 OPN 的表达与临床病理参数的关系

Tab. 1 Relationship between OPN expression and clinicopathologic features in spinal PCM

Feature	n	OPN				Z	P
		(-)	(+)	++	+++		
Focus							
Solitary	13	1	1	10	1	-2.327	0.020*
Multiple	28	6	9	13	0		
Histological grade							
I	14	3	2	9	0	4.889	0.087
II	17	1	4	11	1		
III	10	3	4	3	0		
M-component							
Non-secrete	9	0	1	7	1	12.040	0.007**
IgG	14	0	4	10	0		
IgA	4	2	0	2	0		
Others	14	5	5	4	0		
Light chain							
Non-secrete	9	0	1	7	1	5.652	0.059
κ chain	12	2	4	6	0		
λ chain	20	5	5	10	0		
Age							
≥ 50	22	6	5	11	0	-1.647	0.100
< 50	19	1	5	12	1		
Sex							
Male	30	6	6	17	1	-0.098	0.922
Female	11	1	4	6	0		

* $P < 0.05$, Solitary vs Multiple; ** $P < 0.01$, Non-secrete + IgG vs IgA + Others

2.4 脊柱 PCM 中 OPN 的表达与患者预后的关系
患者整体生存时间(overall survival, OS)为从

诊断明确开始计算直到死亡或最后一次随访所经历的时间。所有患者均行脊柱肿瘤切除减压术, 术前未接受任何化疗, 且术后均未接受过骨髓干细胞移植治疗。本组患者随访时间为 3.0 ~ 109.5 个月, 6 例失访。其间死亡 12 例, 占随访者的 29.3%。最短存活时间仅为 3.0 个月, 平均生存时间为 (79.5 ± 7.5) 个月, 中位存活时间为 48.7 个月。

通过 Kaplan-Meier 方法分析脊柱 PCM 中 OPN 的表达与患者预后的关系, 结果显示: OPN 阴性表达患者平均生存期为 (21.5 ± 1.5) 个月, 阳性表达患者平均为 (82.5 ± 7.7) 个月, Log Rank 时序检验提示两组间生存期差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

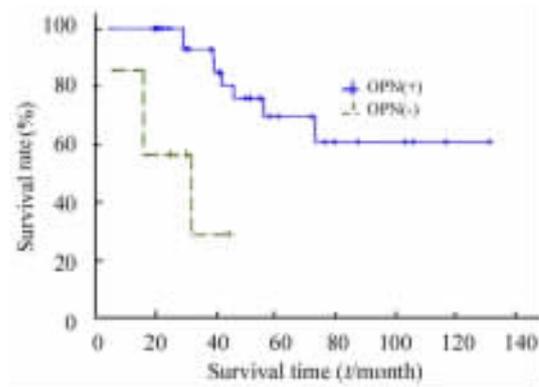


图 2 脊柱浆细胞骨髓瘤患者 Kaplan-Meier 生存曲线
Fig. 2 Kaplan-Meier survival curves of spinal PCM patients

3 讨论

人类 OPN 基因定位于 4q13 上, 由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 所编码的蛋白为带负电荷的糖基化磷蛋白, 相对分子质量为 41 500。OPN 中含有一个特异的与细胞黏附有关的 RGD 序列、一个 SV-VYGLR 序列、一个 RS 位点结构(凝血酶的裂解位点)、部分基质金属蛋白酶的酶切位点以及钙结合位点和肝素结合位点^[3]。最初关于 OPN 的研究主要在骨骼和肾脏疾病中的作用。尽管, 研究发现 OPN 在肝癌、肺癌及乳腺癌等实体瘤组织中的表达上调, 并影响肿瘤的发生及侵袭转移^[4,5]。但是在血液系统肿瘤中, 尤其是骨髓瘤的发生发展中, OPN 的作用却可能存在着和实体瘤中相反的作用。Robbiani^[6]等发现多发性骨髓瘤中 OPN 的高表达和溶骨性骨病负相关; 而且 OPN 在有 maf 基因易位的多发性骨髓瘤患者中, 尤其是那些不伴有骨损害的患者中表达明显上调, 故认为 OPN 在骨髓瘤骨损害的

保护中具有极为重要的作用。

本研究应用免疫组化法分析 41 例 PCM 组织,结果显示脊柱 PCM 的 OPN 表达明显高于单纯性骨囊肿组织 ($P < 0.05$),这一结果与 Saeki^[7]等的结果一致。然而在随后的 OPN 和肿瘤临床特征之间的关系研究中我们并未发现其有明确的相关性。Kang^[8]等认为血清 OPN 水平不具有临床监测指标的价值。而 Caers^[9]等在体外研究中发现 OPN 可促进 MM 细胞增殖和迁徙,并可激活 MMP-9。Abe^[10]等发现破骨细胞可以分泌 IL-6 和 OPN,两者联合作用于 MM 细胞,促进其生长与存活。本研究结果发现 OPN 表达强度在孤立组患者中明显高于多发组,据此推测 OPN 和脊柱 PCM 的发展和侵袭呈负相关。此外,研究还发现 OPN 阳性表达和脊柱 PCM 的 M 蛋白分型密切相关,未分泌组和 IgG 型组 PCM 表达明显高于 IgA 型组和其他类型组。先前已有研究表明未分泌型和 IgG 型骨髓瘤预后相对较好^[11]。更令人感兴趣的是,经 Kaplan-Meier 生存分析显示,OPN 阳性表达组患者生存期高于阴性表达组 ($P < 0.05$)。提示 OPN 在脊柱浆细胞瘤患者的预后中可能具有保护作用,这一结果与其在其他常见的实体瘤中的作用恰恰相反^[11-16],但和 Robbiani 等^[6]的研究结果一致。尽管仍有研究认为破骨细胞和骨髓瘤细胞均可以分泌 OPN,并协同骨髓瘤细胞分泌的 VEGF 协同促进肿瘤微环境中的血管发生,引起骨质破坏,从而参与骨髓瘤的演进^[7,17-19]。

综上,OPN 在肿瘤发生机制上是复杂的,可能随不同的肿瘤类型而变化。由于骨髓瘤微环境中的骨髓瘤细胞、破骨细胞、成骨细胞和免疫细胞等多种细胞均可以分泌 OPN,各种细胞分泌的 OPN 作用机制是否相同尚无定论,而且 OPN 作为骨基质的主要蛋白成分可以作用于整合素(integrins)和 CD44 等多种受体进而影响肿瘤细胞的粘附、迁移、免疫逃逸以及成骨-溶骨的动态平衡等。推测 OPN 可能作为脊柱 PCM 的进展的某些关键因子之一,影响脊柱 PCM 的进展和预后。然而其具体分子作用机制如何,尚待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] Kyle RA. Plasma cell proliferative disorders. In: Hoffman R, editor. Hematology: basic principles and practice (3rd edition). New York: Churchill Livingstone, 1999: 1021-1038.
[2] Bard R, Frisch B, Fateh-Moshadam A, et al. Histological classification and staging of multiple myeloma: A retrospective and prospective study of 674 cases [J]. Am J Clin Pathol, 1987, 87 (3): 342-355.

[3] Ye QH, Qin LX, Forgues M, et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression-profiling and supervised machine learning [J]. Mat Med, 2003, 94(4): 416-423.
[4] Irby RB, McCarthy SM, Yeatman TJ. Osteopontin regulates multiple functions contributing to human colon cancer development and progression [J]. Clin Exp Metastasis, 2004, 21(6): 515-523.
[5] Saeki Y, Mima T, Ishii T, et al. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications [J]. Br J Haematol, 2003, 123 (2): 263-270.
[6] Kang SY, Lee JJ, Lee WI. Clinical significance of serum osteopontin in patients with multiple myeloma [J]. Korean J Lab Med, 2007, 27(6): 400-405.
[7] Caers J, Günthert U, De Raeve H, et al. The involvement of osteopontin and its receptors in multiple myeloma cell survival, migration and invasion in the murine 5T33MM model [J]. Br J Haematol, 2006, 32(4): 469-477.
[8] Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion [J]. Blood, 2004, 104(8): 2484-2491.
[9] Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, et al. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62(12): 3417-3427.
[10] Boldrini L, Donati V, Dell'Omodarme M, et al. Prognostic significance of osteopontin expression in early-stage non-small-cell lung cancer [J]. Br J Cancer, 2005, 93(4): 453-457.
[11] 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.
[12] 丘敏梅, 易石坚, 钟德珩, 等. 骨桥蛋白在肝细胞癌中的表达与临床病理特征的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18 (1): 90-92.
[13] Matusan K, Dordevic G, Stipic D, et al. Osteopontin expression correlates with prognostic variables and survival in clear cell renal cell carcinoma [J]. J Surg Oncol, 2006, 94(4): 325-331.
[14] Forootan SS, Foster CS, Aachi VR, et al. Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer [J]. Int J Cancer, 2006, 118(9): 2255-2261.
[15] Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, 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(3): 816-823.
[16] Abe M. Link between osteoclastogenesis, angiogenesis and myeloma expansion [J]. Clin Calcium, 2008, 18(4): 473-479.
[17] Zdzińska B, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A, et al. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2008, 56(3): 207-221.
[18] Robbiani DF, Colon K, Ely S, et al. Osteopontin dysregulation and lytic bone lesions in multiple myeloma [J]. Hematol Oncol, 2007, 25(1): 16-20.

[收稿日期] 2009-06-03

[修回日期] 2009-08-15

[本文编辑] 王莹