

骨桥蛋白与水通道蛋白-1在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性分析*

周波¹, 杨皖菁¹, 王勇¹, 崔勇²

(1. 湖北医药学院附属东风医院耳鼻喉科, 湖北十堰 442000; 广东省人民医院, 广州 510080)

摘要:目的 探讨骨桥蛋白与水通道蛋白-1在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性。方法 选择2011年8月~2014年12月湖北医药学院附属东风医院耳鼻喉科收治的80例喉癌标本, 癌旁组织标本均取自癌组织0.5 cm之外黏膜, 所有标本都进行了骨桥蛋白与水通道蛋白-1表达的免疫组化分析, 并与临床病理特征进行了相关性分析。结果 骨桥蛋白与水通道蛋白-1的染色颗粒多位于细胞间质、淡黄色染。在癌组织中, 骨桥蛋白与水通道蛋白-1阳性颗粒主要位于癌细胞的细胞浆内, 弥漫性着色, 靠近癌巢处着色更深。骨桥蛋白与水通道蛋白-1在喉癌组织的阳性表达率分别为70.0%和56.3%, 在癌旁组织中的阳性表达率分别为5.0%和7.5%, 对比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在80例喉癌组织标本中, 骨桥蛋白与水通道蛋白-1在不同临床分期、分化程度与淋巴结转移组织中的阳性表达对比差异有统计学意义($P < 0.05$); Spearman相关分析显示骨桥蛋白与水通道蛋白-1在喉癌组织中的表达呈正相关($P < 0.05$)。结论 骨桥蛋白与水通道蛋白-1在喉癌组织呈现高表达状况, 与临床分期、分化程度与淋巴结转移有明显相关性, 两者共同作用可促进肿瘤的侵袭和转移。

关键词: 骨桥蛋白; 水通道蛋白-1; 喉癌; 病理特征; 相关性

中图分类号: R739.65; R730.43 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)03-060-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.017

Correlation Analysis of Clinicopathological Features with Osteopontin and Aquaporin-1 Expression in Laryngeal Carcinoma

ZHOU Bo¹, YANG Wan-jing¹, WANG Yong¹, CUI Yong²

(1. Department of ENT, Affiliated Dongfeng General Hospital to Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China; 2. Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To investigate the correlation of clinicopathological features with osteopontin and aquaporin-1 expression in laryngeal carcinoma. **Methods** From August 2011 to December 2014 in Dongfeng General Hospital, 80 laryngeal cancer specimens and adjacent normal tissue samples were selected, all samples were carried out osteopontin and aquaporin-1 immunohistochemical analysis expression and clinicopathological characteristics and correlation analysis. **Results** Osteopontin staining particles and aquaporin-1 were located in the stromal cells, yellow dye. In cancer tissue, osteopontin and aquaporin-1 positive granules were mainly located in the cytoplasm of cancer cells, diffuse shading, coloring deeper place near nests. The positive expression rates of osteopontin and aquaporin-1 in the laryngeal carcinoma were 70.0% and 56.3% respectively, the positive rates in the adjacent tissues were 5.0% and 7.5% respectively that compared to the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In 80 cases of laryngeal carcinoma. The expression of osteopontin and aquaporin-1 in different clinical stages, differentiation and lymph node metastasis tissues were statistically significant ($P < 0.05$). Spearman correlation analysis showed that the osteopontin and aquaporin-1 in laryngeal carcinoma were positively correlated ($P < 0.05$). **Conclusion** Osteopontin and aquaporin-1 expression in laryngeal carcinoma were showed high status, and the clinical stage, degree of differentiation and lymph node metastasis were significantly correlated that can work together to promote tumor invasion and metastasis.

Keywords: osteopontin; aquaporin-1; laryngeal; pathology; correlation

喉癌是来源于喉黏膜上皮组织的恶性肿瘤, 占全身恶性肿瘤的3.0%左右, 占耳鼻咽喉科恶性肿瘤的18.0%左右, 多见于中老年男性^[1,2]。近年来随着诊疗技术的进步, 喉癌患者的死亡率得到了明显降低。但由于喉癌侵袭生长和播散转移的存在, 使得患者的治愈率明显减低^[3,4]。因此揭示喉癌侵

袭及转移机制和相关标记物的早期检测, 对于评估患者的预后及相关治疗具有非常重要的意义。为此当前一些研究开始重视引起喉癌发生发展和浸润转移的分子生物学基础^[5,6]。骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)是具有连接骨细胞和骨细胞外基质功能的磷酸化糖蛋白, 其富含精氨酸-甘氨酸-

* 基金项目: 广东省医学科研基金(A2014040)。

作者简介: 周波(1978—), 男, 本科, 主治医师, 主要从事耳鼻喉科临床研究, Tel: 13972457771, E-mail: zhoubo7683@163.com。

通讯作者: 杨皖菁(1976—), 女, 本科, 主治医师, 主要从事耳鼻喉科临床研究, Tel: 13872806669, E-mail: yangwj7683@163.com。

天冬氨酸(RGD)序列,属于小整合素结合配体N端联结糖蛋白家族^[7]。当前研究表明其与细胞内的信号传递、增殖、分化有关,在肠化、异型增生的上皮中均有阳性表达,参与多种肿瘤的形成与发展^[8]。水通道蛋白-1(aquaporins-1, AQP-1)是一组跨膜转运水和小分子物质的特异通道蛋白质家族,广泛存在于各种组织和器官中^[9]。AQP-1对恶性肿瘤的生长和转移有重要作用,缺乏AQP-1蛋白表达的小鼠,肺癌细胞平均生长时间降低50.0%,肿瘤部位缺乏血管,AQP-1蛋白表达可能与肿瘤生长和血管形成有关,但是具体机制还不明确,与病理特征的相关性也还没有得到明确阐述^[10]。本文为此具体探讨了骨桥蛋白与AQP-1在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2011年8月~2014年12月选择湖北医药学院附属东风医院耳鼻喉科收治的80例喉癌标本,纳入标准:所有组织来源患者都未经放射治疗或化学治疗;并经病理证实都为喉鳞状细胞癌;年龄40~80岁;知情同意;临床资料完整;获得医院伦理委员会批准。排除标准:并发有糖尿病、自身免疫性疾病等;临床资料不完整。其中男性72例,女性8例;平均年龄 45.09 ± 6.29 岁;分化类型:高分化34例,中分化30例,低分化16例;临床分期:Ⅱ期45例,Ⅲ期20例,Ⅳ期15例;转移情况:转移50例,未转移30例。癌旁组织标本均肉眼取自癌组织0.5 cm之外黏膜,且经组织病理学检查均未见喉癌细胞浸润。

1.2 试剂和仪器 鼠抗人OPN单克隆抗体来自美国Santa Cruz生物科技公司,鼠抗人AQP-1单克隆抗体来自福州迈新生物技术科技公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。以PBS代替一抗作阴性对照,以已知阳性切片作

阳性对照。标本组织经10 ml/dl福尔马林液固定24 h,石蜡包埋,做成3 μ m左右厚的组织切片,然后进行脱蜡与水化处理,在抗原修复选择中性树脂封片,光学显微镜下观察实验结果。

1.3 判定标准 在高倍镜视野下随机选取5个视野,计数至少500个细胞,AQP-1和OPN的染色以细胞膜和/或细胞浆呈现棕黄色颗粒的环状影和/或颗粒作为阳性细胞。根据切片中阳性细胞所占观察细胞中的比例来判断阳性程度,显色细胞百分率 $\geq 25.0\%$ 代表阳性表达。本实验用PBS溶液代替一抗做阴性对照,用已知的阳性组织切片做阳性对照。

1.4 统计学分析 选择SPSS14.0软件进行数据分析,阳性表达率的比较以及在各种临床病理特征间的比较采用卡方分析检验,相关性分析用Spearman相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨桥蛋白与AQP-1在喉癌中的表达情况

在癌旁组织中,骨桥蛋白与AQP-1的染色颗粒多位于细胞间质、淡黄色染。在癌组织中,骨桥蛋白与AQP-1阳性颗粒主要位于癌细胞的细胞浆内,弥漫性着色,靠近癌巢处着色更深,见图1。

2.2 骨桥蛋白与AQP-1在不同组织的阳性表达率对比 经过观察,在80例喉癌组织中,骨桥蛋白与AQP-1在喉癌组织的阳性表达率分别为70.0%(56/80)和56.3%(45/80),在癌旁组织中的阳性表达率分别为5.0%(4/80)和7.5%(6/80),对比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 骨桥蛋白与AQP-1在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性 见表1。在80例喉癌组织中,骨桥蛋白与AQP-1在不同临床分期、分化程度与淋巴结转移组织中的阳性表达率对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 骨桥蛋白与AQP-1在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性[n(%)]

病理特征	n	骨桥蛋白表达阳性率	χ^2	P	水通道蛋白-1表达阳性率	χ^2	P
分化类型-高分化	34	18(52.9)	8.133	<0.05	12(35.3)	11.623	<0.05
中分化	30	24(80.0)			20(66.7)		
低分化	16	14(87.5)			13(81.3)		
临床分期-Ⅱ期	45	26(57.8)	7.099	<0.05	17(37.8)	12.873	<0.05
-Ⅲ期	20	16(80.0)			15(75.0)		
-Ⅳ期	15	14(93.3)			13(86.7)		
转移情况-转移	50	45(90.0)	10.933	<0.05	42(84.0)	24.298	<0.05
未转移	30	11(36.7)			3(10.0)		

2.4 喉癌组织中骨桥蛋白与AQP-1表达的相关性分析 在80例喉癌组织中,骨桥蛋白与AQP-1均呈阳性表达的为40例,均无阳性表达的10例,

Spearman相关分析的相关系数 $r = 0.663$, $P < 0.05$,骨桥蛋白与AQP-1在喉癌组织中的表达呈正相关。

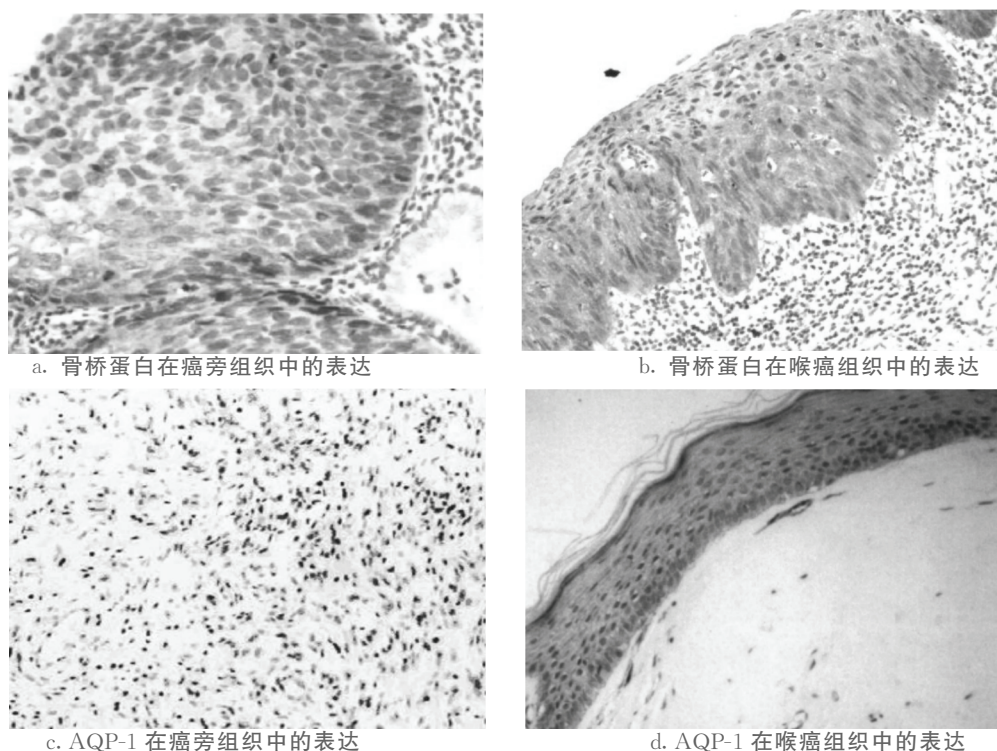


图1 骨桥蛋白与 AQP-1 在喉癌中的表达

3 讨论 喉癌是发生于喉腔黏膜上皮组织的恶性肿瘤,也是耳鼻喉科常见的肿瘤疾病之一^[11]。当前由于各种因素的影响,我国喉癌的发病率有增多的趋势,同时喉癌的发病率城市高于农村,男性较女性多见,约为 7~10:1,其中以鳞状细胞癌多见,约占 95.0%以上^[12]。研究表明喉癌的发生、发展、转移是一个涉及多分子和多基因相互作用的复杂过程,其中肿瘤抑制基因的突变,早幼粒细胞性白血病基因蛋白表达过低,血管内皮生长因子的过表达等均与喉癌发生发展相关^[13]。

研究表明骨桥蛋白与 AQP-1 在恶性肿瘤的发生发展特别是侵袭和转移过程中扮演着重要的角色,影响细胞的黏附和迁移等过程。其中骨桥蛋白是一种能与骨组织中的羟磷灰石紧密结合,参与调节骨钙的沉积并具有多种功能分泌型钙结合磷酸化糖蛋白^[14]。骨桥蛋白与 AQP-1 参与了细胞的分裂、生长和浸润过程,其在机体多种组织和体液中均有所表达,可引导肥大细胞定位和细胞免疫应答,诱导新生血管生成,抗氧化而抑制细胞凋亡。而目前已有研究证实 AQP-1 在喉部疾病、哮喘、肺水肿及鼻息肉等呼吸道疾病中具有重要作用^[15]。本研究显示在癌旁组织中,骨桥蛋白与 AQP-1 的染色颗粒多位于细胞间质、淡黄色染。在癌组织中,骨桥蛋白与 AQP-1 阳性颗粒主要位于癌细胞的细胞浆内,弥漫性着色,靠近癌巢处着色更深。

骨桥蛋白是一种多功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白,通过与多种受体结合而发挥不同的作

用。骨桥蛋白可通过与整合素受体结合,可以提高基质金属蛋白酶的表达和激活,增强其降解细胞外基质的能力,在肿瘤的侵袭和转移中发挥至关重要的作用^[16]。本研究骨桥蛋白与 AQP-1 在喉癌组织的阳性表达率分别为 70.0%和 56.3%,在癌旁组织中的阳性表达率分别为 5.0%和 7.5%,对比差异均有统计学意义($P<0.05$),主要在于在恶性肿瘤发生和生长过程中,新陈代谢异常活跃,对水的需求也将增加,细胞内外渗透压的变化频率加快,使得 AQP-1 阳性表达率增加。而骨桥蛋白转录活性的增强与细胞转移潜能的增加有关,肿瘤细胞或正常细胞产生的骨桥蛋白均可刺激细胞的转移能力。肿瘤的侵袭和转移主要涉及细胞黏附、基质分解和细胞转移等方面,是一个多因素参与、多步骤逐步累积变化的结果。本研究在 80 例喉癌组织中,骨桥蛋白与 AQP-1 在不同临床分期、分化程度与淋巴结转移组织中的阳性表达对比差异有统计学意义($P<0.05$)。主要在于肿瘤细胞的代谢较正常组织偏高,需要更高的血供来保证其的生长增殖,骨桥蛋白能够诱导新生血管的生成,其可能是活化癌基因的效应器,肿瘤细胞产生骨桥蛋白后刺激肿瘤细胞生长和转移^[17]。

本研究 Spearman 相关分析显示骨桥蛋白与 AQP-1 在喉癌组织中的表达呈正相关,提示骨桥蛋白的异常高表达可能导致 AQP-1 的敏感性增强,从而更加促进细胞的增殖、分化,最终导致了细胞的过度增殖、分化甚至恶化,与肿瘤细胞的侵袭

和转移密切相关,二者的协同表达在喉癌的发生发展中发挥重要作用。从分子水平上来说,骨桥蛋白能介导细胞结合,肿瘤细胞能更好的与骨桥蛋白结合,增强肿瘤的侵袭能力。骨桥蛋白与 AQP-1 的表达增加,导致了细胞的移动性增强,蛋白溶解酶的分泌增加,促进了肿瘤的侵袭和转移^[18]。

总之,骨桥蛋白与 AQP-1 在喉癌组织呈现高表达状况,与临床分期、分化程度与淋巴结转移有明显相关性,两者可共同作用促进肿瘤的侵袭和转移。

参考文献:

- [1] 李丽娟,温树信,王斌全,等. 肿瘤干细胞标记物 US-P22 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达及预后分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,49(6):479-482.
Li LJ, Wen SX, Wang BQ, et al. Expression of cancer stem cell marker USP22 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2014, 49(6):479-482.
- [2] Etiz D, Ataizi FC, Bayman E, et al. Prognostic value of osteopontin in patients treated with primary radiotherapy for head and neck cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(9):5175-5178.
- [3] 张春明,高伟,卢岩,等. E-cadherin 和 Smad4 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2014,22(3):199-202.
Zhang CM, Gao W, Lu Y, et al. E-cadherin and Smad4 in laryngeal squamous carcinoma: Expression and clinical significance[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology Integrative Medicine, 2014, 22(3):199-202.
- [4] 张美佳,张爱华,万歆,等. 喉癌组织中 survivin 和 caspase-7 的表达与相关性研究[J]. 黑龙江医药科学, 2014, 37(5):110-111.
Zhang MJ, Zhang AH, Wan X, et al. Expression and correlation of Survivin and caspase-7 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2014, 37(5):110-111.
- [5] Wachters JE, Schrijvers ML, Slagter-Menkema L, et al. Prognostic significance of HIF-1 α , CA-IX, and OPN in T1-T2 laryngeal carcinoma treated with radiotherapy[J]. Laryngoscope, 2013, 123(9):2154-2160.
- [6] 盛旺,吕晓君,安汉祥. 肺癌组织中水通道蛋白的表达及其与上皮-间质转化的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(2):362-363.
Sheng W, Lü XJ, An HX. Expression of water channel protein in lung cancer and its correlation with matter transformation between epithelial[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(2):362-363.
- [7] 刘咏,吴秀葵,黄昕,等. 基质金属蛋白酶-9 和骨桥蛋白在甲状腺癌和腺瘤组织中的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(1):151-153.
Liu Y, Wu XK, Huang X, et al. Expression and role of matrix metalloproteinase -9 and osteopontin in thyroid carcinoma and thyroid benign tumor[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2015, 32(1):151-153.
- [8] Liu Y, Xi H, Xing W, et al. Aquaporin changes in compound 48/80 induced inflammatory sublingual edema in rat[J]. J Voice, 2012, 26(6):815. e17.
- [9] 吕柏楠,石晓明,吴胜春,等. 水通道蛋白-5 对结直肠癌淋巴结转移的作用及机制[J]. 河北医药, 2015, 37(3):346-348.
Lu BN, Shi XM, Wu SC, et al. Effect and action mechanism of AQP-5 on Lymphatic metastasis of colorectal cancer[J]. Hebei Medical Journal, 2015, 37(3):346-348.
- [10] 王银霞,任金龙,张富生,等. HIF-1 α , MMP-1 和 VEGF-C 在喉鳞癌组织中的表达及其与颈转移的相关性研究[J]. 中国实用医刊, 2014, 41(24):6-9.
Wang YX, Ren JL, Zhang FS, et al. Expression of HIF-1 α , MMP-1 and VEGF-C, and its relationship with node metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Chinese Journal of Practical Medicine, 2014, 41(24):6-9.
- [11] 魏炜,肖康,张宝云,等. 喉鳞状细胞癌患者 p53 表达、突变及 72 位氨基酸多态性及其与 HPV 感染的关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(2):135-138.
Wei W, Xiao K, Zhang BY, et al. Analyzation of TP53 expression, mutation, codon 72 polymorphism and the relationship with human papillomavirus infection of the chinese laryngeal squamous cell carcinoma patients[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2014, 28(2):135-138.
- [12] 王刚平,梅岚,徐凤亮,等. 分子标记物 CEA, TS-GF, OPN 及 CA125 在乳腺癌及增生性病诊断中的应用[J]. 中国实用医刊, 2014, 41(8):1-4.
Wang GP, Mei L, Xu FL, et al. Application of the combined detection of molecular markers of CEA, TS-GF, OPN and CA125 in the diagnosis of breast cancer and intraductal proliferative lesions[J]. Chinese Journal of Practical Medicine, 2014, 41(8):1-4.
- [13] 刘权忠,黄国鹏. 血清水通道蛋白-1 在喉癌中的表达及临床病理特征的关系[J]. 河北医学, 2015, 21(1):118-122.
Liu QZ, Huang GP. Expression of serum aquaporins-1 and the relationship with clinicopathological characteristics in patients with laryngeal carcinoma[J]. Hebei Medicine, 2015, 21(1):118-122.
- [14] 杜名,辛军,赵周社,等. 水通道蛋白理论在疾病诊断中的应用[J]. 国际医学放射学杂志, 2015, 38(1):58-61.
Du M, Xin J, Zhao ZS, et al. The application of water channel protein theory in disease diagnosis[J]. International Journal of Medical Radiology, 2015, 38(1):58-61.
- [15] 康从利,徐日,徐凤亮,等. 血清肿瘤标志物的联合动态检测在原发性肝癌诊断中的价值[J]. 肿瘤研究与临床, 2014, 26(8):531-534.
Kang CL, Xu R, Xu FL, et al. The value of dynamic combined detection of serum tumor biomarkers in diagnosing primary hepatic carcinoma[J]. Cancer Research and Clinic, 2014, 26(8):531-534.
- [16] Kakigi A, Nishimura M, Takeda T, et al. Expression of aquaporin1, 3, and 4, NKCC1, and NKCC2 in the human endolymphatic sac[J]. Auris Nasus Larynx, 2009, 36(2):135-139.
- [17] 卢明东,李丕宏,孙维建,等. 胃癌组织中水通道蛋白1、微血管密度与细胞凋亡的关系及临床意义[J]. 浙江医学, 2014, 4(12):274-277.
Lu MD, Li PH, Sun WJ, et al. Relationship between AQP-1/MVD and oncosis in gastric carcinoma and its clinical significance[J]. Zhejiang Medical Journal, 2014, 4(12):274-277.
- [18] 安慧敏. OPN 和 CD44V6 在结直肠癌和结直肠腺瘤中的表达及意义[J]. 浙江创伤外科, 2014, 19(1):26-28.
An HM. The expression levels and significance of OPN and CD44V6 in colorectal cancer and colorectal adenoma[J]. Zhejiang Journal of Traumatic Surgery, 2014, 19(1):26-28.