文章编号:1000-5404(2013)23-2565-04

论著

# 候选抑癌基因 OPCML 在人乳腺癌中的表达及其临床意义

李金平[1],王 昇[1],李 宏[1],廉 斌[1],江海峰[2],任国胜[3] (750004 银川,宁夏医科大学总医院:肿瘤医院肿瘤外科[1],病理科[2];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肿瘤分子及表观遗传学实验室[3])

[摘要] **目的** 探讨候选抑癌基因 OPCML(opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like)在人乳腺癌组织中的蛋白表达及临床意义。**方法** 应用免疫组化方法检测 117 例人乳腺癌组织、41 例癌旁组织及 24 例乳腺腺病组织中的候选抑癌基因 OPCML 蛋白表达情况,结合临床病理资料进行统计学分析。**结果** 117 例人乳腺癌组织、41 例癌旁组织及 24 例乳腺腺病组织中 OPCML 蛋白的阳性表达率分别为 19.66%(23/117)、90.24%(37/41)、70.83%(17/24),3 种乳腺组织中的表达差异有统计学意义($P<0.05$);在 117 例人乳腺癌组织中 OPCML 蛋白表达与组织学分级、淋巴结是否转移、pTNM 分期显著相关($P<0.05$);OPCML 蛋白表达与 Ki-67($r=-0.261$)、HER-2($r=-0.294$)、EGFR($r=-0.242$)呈负相关关系($P<0.05$)。**结论** 候选抑癌基因 OPCML 在人乳腺癌组织中呈现低表达或表达缺失,且与 Ki-67、HER-2 及 EGFR 的表达呈负相关,可能在乳腺癌的发展中起抑癌作用。

[关键词] 乳腺癌;OPCML;免疫组化
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

# Expression and clinical significances of candidate tumor suppressor gene OPCML in human breast cancer tissues

Li Jinping[1], Wang Sheng[1], Li Hong[1], Lian Bin[1], Jiang Haifeng[2], Ren Guosheng[3] ([1]Department of Oncological Surgery, [2]Department of Pathology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750004; [3]Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and clinical significances of the candidate tumor suppressor gene, opioid binding protein/cell adhesion molecule-like (OPCML) gene in human breast cancer tissues. **Methods** Immunohistochemical assay was used to detect the expression of OPCML in 117 tissue samples of breast cancer, 41 samples of adjacent tissue and 24 samples of normal breast tissue. The results were analyzed with clinical data. **Results** The positive rate of OPCML was 19.66% (23/117), 90.24% (37/41) and 70.83% (17/24) respectively in the breast cancer, adjacent tissue and normal breast tissue, with that in the breast cancer significantly lower than those in the other 2 tissues ($P<0.05$). Significant correlations were found in the expression of OPCML with histological grade, pTNM staging and lymph node metastasis of breast carcinoma ($P<0.05$). Significantly negative correlations were seen among the expression of OPCML with that of Ki-67 ($r=-0.261$, $P<0.05$), HER-2 ($r=-0.294$, $P<0.05$) and GFR ($r=-0.242$, $P<0.05$) respectively. **Conclusion** The candidate tumor suppressor gene OPCML is mildly expressed or deleted in the breast cancer, and its expression is negatively correlated with the expression of Ki-67, HER-2 and EGFR. It might play a role as suppressor gene in the development of breast cancer.

[**Key words**] breast cancer; opioid binding protein/cell adhesion molecule-like; immunohistochemistry

Supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (NZ1235) and the General Program of Ningxia Medical University (2010-08).
Corresponding author: Reng Guosheng, E-mail: rgs726@163.com

[基金项目] 宁夏自然科学基金(NZ1235);宁夏医科大学面上项目(2010-08)
[通信作者] 任国胜,E-mail: rgs726@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131016.1904.005.html (2013-10-16)

在乳腺癌的发生、发展中一些抑癌基因发挥着重要的作用。香港中文大学的研究人员研究[1]发现，OPCML(opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like)基因在正常成人乳腺组织中呈现高表达，而在10株乳腺癌细胞株中表达缺失，推测OPCML基因的缺失与乳腺癌的发生、发展密切相关。本研究观察OPCML基因在人乳腺癌组织中的蛋白表达情况，分析其在乳腺癌组织中的表达缺失与临床病理特征间的关系，初步了解其在乳腺癌的发生、发展中所起的作用，为后续的抑癌基因甲基化及抑癌机制的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集2010年1月至2012年2月在宁夏医科大学总医院肿瘤医院肿瘤外科经手术治疗切除的原发性乳腺癌标本117例，癌旁组织(距肿瘤边缘大于5 cm的癌旁正常乳腺组织)41例，收集同期乳腺腺病组织24例。117例乳腺癌患者均为女性，年龄20～80(52.29±1.03)岁，中位年龄51岁；汉族95例，回族22例；组织学类型：浸润性导管癌114例，浸润性小叶癌3例；组织学分级：Ⅰ级6例、Ⅱ级84例、Ⅲ级27例。依据美国癌症联合委员会(AJCC) TNM分期(第7版)标准进行分期，其中Ⅰ期27例，Ⅱ期64例，Ⅲ期23例，Ⅳ期3例；有腋窝淋巴结转移者58例，无腋窝淋巴结转移59例。所有病例术前未接受放、化疗。

### 1.2 主要试剂

兔抗人阿片样物质结合蛋白/细胞粘附分子样(opcml)抗体Anti-OPCML antibody (ab100923)购于Abcam(中国香港)公司，稀释浓度为1∶350。PV-9001兔超敏二步法免疫组化检测试剂盒、DAB试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 方法

采用免疫组织化学PV-9001两步法，所有组织标本常规用10%甲醛固定，石蜡包埋，制成4 μm切片，按试剂盒说明书操作。预实验探索最佳稀释浓度，每次实验用已知阳性片作阳性对照，用已知阴性片作阴性对照，用PBS替代一抗作为空白对照，一抗的工作浓度为1∶350。

### 1.4 OPCML阳性结果判定

请两位病理学专家双盲法观察切片，采用半定量积分法判断结果，具体评分标准[2-3]：高倍镜下每张切片选择10个有代表性的视野，每个视野记数100个肿瘤细胞，共计数1 000个细胞。OPCML蛋白阳性染色为在细胞内(细胞膜、细胞质)呈黄色或棕色颗粒，界限清楚，无明显背景着色。OPCML表达阳性评估标准：①按染色强度计分：无色为0分，淡黄色为1分，棕黄为2分，黄褐色为3分。②按阳性染色细胞百分率计分：阳性细胞数≤10%为0分，10%＜阳性细胞数≤25%为1分，25%＜阳性细胞数≤50%为2分，＞50%为3分。将①×②的结果分为以下等级：0分为阴性(－)，1～2分为弱阳性(＋)，3～4分为阳性(＋＋)，＞5分为强阳性(＋＋＋)，为便于统计，2分以下为低表达，2分以上为高表达。对照实验：以PBS代替一抗作空白对照，用已知阳性切片作阳性对照。若两位专家结果相差3分则重新判定。另外依据2013版NCCN指南进行本组资料中HER-2阳性判定，HER-2阳性的标准是免疫组化检测(＋＋＋)或荧光原位杂交法(FISH)检测阳性。对于IHC检查结果为Her-2(＋＋)者再进行FISH法检测，结果(＋)为HER-2阳性，结果(－)为HER-2阴性。

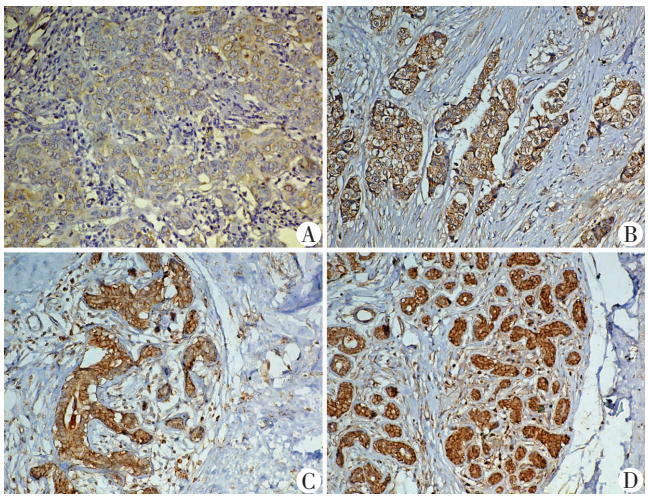
### 1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件，对数据进行$\chi^2$检验、Spearman's等级相关分析。

## 2 结果

### 2.1 OPCML在人乳腺癌组织、癌旁组织和乳腺腺病组织中的表达

OPCML蛋白主要表达于细胞膜，部分表达于细胞质，以黄色、棕黄色着色为主，见图1。117例人乳腺癌组织中，OPCML蛋白阳性表达率为19.66%(23/117)，41例癌旁组织中，OPCML蛋白阳性表达率为90.24%(37/41)，24例乳腺腺病组织中，OPCML蛋白阳性表达率为70.83%(17/24)。OPCML在人乳腺癌组织中的蛋白阳性表达明显低于其在癌旁组织和乳腺腺病组织中的表达，差异具有统计学意义($\chi^2=71.190$，$P<0.01$)。




A：在乳腺癌组织中的阴性表达；B：在乳腺癌组织中的阳性表达；C：在癌旁组织中的阳性表达；D：在乳腺腺病组织中的阳性表达

**图1 免疫组织化学检测OPCML在人乳腺组织中的表达** (PV ×200)

### 2.2 人乳腺癌组织中OPCML蛋白表达与乳腺癌临床病理特征间的关系

117例乳腺癌组织中OPCML蛋白表达与组织学分级、淋巴结是否转移、pTNM分期显著相关，表达差异有统计学意义($P<0.05$)，而在年龄、民族(回、汉族)、肿瘤最大径、病理类型等差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

**表1 人乳腺癌组织中OPCML蛋白表达与乳腺癌临床病理特征的关系**

| 临床病理参数 | 例数 | OPCML | | $\chi^2$ | $P$值 |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 阴性 | 阳性 | | |
| 年龄（岁） | 117 | 94 | 23 | 3.087 | 0.378 |
| ≤35 | 4 | 3 | 1 | | |
| >35~50 | 54 | 47 | 7 | | |
| >50~65 | 42 | 32 | 10 | | |
| >65 | 17 | 12 | 5 | | |
| 民族 | | | | 1.916 | 0.137 |
| 汉族 | 95 | 74 | 21 | | |
| 回族 | 22 | 20 | 2 | | |
| 肿瘤最大径(cm) | | | | 2.966 | 0.227 |
| ≤2 | 57 | 48 | 9 | | |
| >2~5 | 53 | 42 | 11 | | |
| >5 | 7 | 4 | 3 | | |
| 病理类型 | | | | 4.308 | 0.098 |
| 浸润性导管癌 | 114 | 93 | 21 | | |
| 浸润性小叶癌 | 3 | 1 | 2 | | |
| 组织学分级 | | | | 8.893 | 0.012 |
| Ⅰ级 | 6 | 2 | 4 | | |
| Ⅱ级 | 84 | 70 | 14 | | |
| Ⅲ级 | 27 | 22 | 5 | | |
| 淋巴结转移情况 | | | | 4.194 | 0.034 |
| 有 | 58 | 51 | 7 | | |
| 无 | 59 | 43 | 16 | | |
| pTNM 分期 | | | | 10.742 | 0.013 |
| Ⅰ | 27 | 16 | 11 | | |
| Ⅱ | 64 | 54 | 10 | | |
| Ⅲ | 23 | 21 | 2 | | |
| Ⅳ | 3 | 3 | 0 | | |

### 2.3 OPCML蛋白和乳腺常规检测分子标记物在乳腺癌组织中表达的相关性分析

在乳腺癌组织中OPCML蛋白表达与Ki-67（$r=-0.261$）、HER-2（$r=-0.294$）、EGFR（$r=-0.242$）呈负相关关系，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表2。

**表2 OPCML蛋白和乳腺常规检测分子标记物在乳腺癌组织中的表达**

| 病理参数 | 例数 | OPCML | | $r$ | $P$值 |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 阴性 | 阳性 | | |
| CK5/6 | 117 | 94 | 23 | 0.092 | 0.325 |
| 阴性 | 18 | 16 | 2 | | |
| 阳性 | 99 | 78 | 21 | | |
| EGFR | | | | -0.242 | 0.008 |
| 阴性 | 23 | 14 | 9 | | |
| 阳性 | 94 | 80 | 14 | | |
| ER | | | | 0.002 | 0.984 |
| 阴性 | 46 | 37 | 9 | | |
| 阳性 | 71 | 57 | 14 | | |
| PgR | | | | -0.026 | 0.783 |
| 阴性 | 58 | 46 | 12 | | |
| 阳性 | 59 | 48 | 11 | | |
| HER-2 | | | | -0.294 | 0.001 |
| 阴性 | 62 | 43 | 19 | | |
| 阳性 | 55 | 51 | 4 | | |
| Ki-67 | | | | -0.261 | 0.005 |
| 阴性(≤14%) | 9 | 4 | 5 | | |
| 阳性(>14%) | 108 | 90 | 18 | | |

## 3 讨论

OPCML是新近发现的与细胞粘附和浸润相关的候选抑癌基因[4-5]，最早于1989年由中国学者从大鼠脑组织中分离纯化，定位于人染色体11q25，全长600 kb，包含7个外显子，相对分子质量为$60\times10^3$，属于免疫球蛋白家族中的IgLon家族，在调节鸦片受体和信号传导、促进细胞分化及改变细胞膜性质上具有重要的作用[6]。诸多研究[7-10]已证实OPCML基因在成人正常组织中呈现高表达，而在多种肿瘤细胞株和肿瘤组织中异常低表达或表达缺失，其表达缺失与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。

本研究结果显示，OPCML蛋白阳性表达主要集中在中老年乳腺癌患者，可能与乳腺癌高发年龄段有关；组织学分级显示OPCML阳性表达主要集中在Ⅰ、Ⅱ级，提示OPCML阳性表达与组织学分级呈负相关，可能在乳腺癌的发生过程中起着负调节作用；在pTNM临床分期中发现OPCML蛋白阳性表达也集中在Ⅰ、Ⅱ期，而在Ⅲ期中阳性表达率很低，进一步验证了OPCML可能在乳腺癌的发生、发展中起负性调节作用；另外发现无腋窝淋巴结转移患者中OPCML表达阳性率明显高于有淋巴结转移患者，提示OPCML可能在乳腺癌的发生，癌细胞的增殖、侵袭恶化、转移中发挥着重要作用。

本研究还发现在人乳腺癌组织中OPCML蛋白表达明显低于癌旁组织和乳腺腺病组织，差异有统计学意义（$P<0.01$），说明OPCML基因在正常乳腺组织和乳腺良性增生性组织中普遍表达，而在乳腺癌组织中其表达明显下调或表达缺失，这与Cui等[1]发现OPCML蛋白在成人正常乳腺组织中高表达而在乳腺癌细胞株中表达缺失一致。本研究进一步对OPCML基因表达缺失与临床病理特征进行统计学分析，发现组织学分级越高，病理分期越晚，OPCML表达下调越明显，伴有淋巴结转移的患者OPCML表达缺失的发生概率明显低于不伴有淋巴结转移的患者。组织学分级、病理分期和淋巴结转移是影响乳腺癌预后的重要因素，而本研究发现OPCML的表达恰好与这三者有密切关系，提示OPCML基因在乳腺癌的发生、发展中起重要作用。本研究还发现OPCML基因在乳腺癌组织中的表达与乳腺癌分子标记物Ki-67、HER-2、EGFR呈负相关，即Ki-67、HER-2、EGFR阳性表达患者的OPCML基因表达明显下调，而Ki-67、HER-2、EGFR均为乳腺

癌预后不良的分子标记物,它们在乳腺癌发生、发展及浸润过程中起促进作用[11-14],进一步揭示 OPCML 的表达缺失可能参与了乳腺癌的发生和病情演变。

OPCML 基因抑制肿瘤生长的机制尚不清楚,它属于 IgLON 家族,已有的一些实验证实 IgLON 家族是上皮粘附分子 CHD1 的重要调节因子,在细胞粘附及细胞间相互识别中起调节作用[15-17]。上皮粘附分子 CHD1(E-cadherin)与 β-catenin 结合,抑制其聚集在核内,从而影响 β-catenin 细胞内定位而负性调节 Wnt/β-catenin 信号通路。当 OPCML 基因表达缺失或被沉默后就失去了对上皮粘附分子 CHD1 的调节作用,导致 Wnt/β-catenin 信号通路异常活化,从而参与肿瘤的发生、发展。由此可以推测 OPCML 基因作为 IgLON 家族成员之一,可能与其他成员一样通过此途径在肿瘤细胞浸润转移中发挥负调节作用。另外,细胞表面的粘附分子通常参与形成和维护正常细胞间的联接,其表达的缺失可使细胞转为高侵袭性表型,明显提高细胞的转移能力。由于 OPCML 基因在乳腺癌中的相关研究缺乏,本研究仅就其在乳腺癌组织中的表达做一初步分析,其表达缺失的原因及其在乳腺癌中的具体作用机制仍需进一步探讨,以期找到乳腺癌的基因治疗的理想靶点。

## 参考文献:


[1] Cui Y, Ying Y, van-Hasselt A, *et al*. OPCML is a broad tumor suppressor for multiple carcinomas and lymphomas with frequently epigenetic inactivation[J]. PLoS One, 2008, 3(8): e2990.

[2] Ray J M, Stetler-Stevenson W G. TIMP-2 expression modulates human melanoma cell adhesion and motility[J]. Ann N Y Acad Sci, 1994, 732: 233-247.

[3] Chambers A F, Matrisian L M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 1997, 89(17): 1260-1270.

[4] McKie A B, Vaughan S, Zanini E, *et al*. The OPCML tumor suppressor functions as a cell surface repressor-adaptor, negatively regulating receptor tyrosine kinases in epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Discov, 2012, 2(2): 156-171.

[5] Tsou J A, Galler J S, Siegmund K D, *et al*. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 70.

[6] Akeel M, McNamee C J, Youssef S, *et al*. DIgLONs inhibit initiation of neurite outgrowth from forebrain neurons *via* an IgLON-containing receptor complex[J]. Brain Res, 2011, 1374: 27-35.

[7] Ye F, Zhang S F, Xie X, *et al*. OPCML gene promoter methylation and gene expression in tumor and stroma cells of invasive cervical carcinoma[J]. Cancer Invest, 2008, 26(6): 569-574.

[8] Li B, Liu W, Wang L, *et al*. CpG island methylator phenotype associated with tumor recurrence in tumor-node-metastasis stage I hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(7): 1917-1926.

[9] 张宁, 许继德, 元刚, 等. 启动子甲基化致 OPCML 基因失活在胃癌发病中的作用[J]. 广东医学, 2012, 33(16): 2367-2371.

[10] Duarte-Pereira S, Paiva F, Costa V L, *et al*. Prognostic value of opioid binding protein/cell adhesion molecule-like promoter methylation in bladder carcinoma[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(7): 1106-1114.

[11] Islam T, Matsuo K, Ito H, *et al*. Reproductive and hormonal risk factors for luminal, HER2-overexpressing, and triple-negative breast cancer in Japanese women[J]. Ann Oncol, 2012, 23(9): 2435-2441.

[12] Vascellari M, Giantin M, Capello K, *et al*. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis[J]. Vet Pathol, 2013, 50(1): 110-121.

[13] Jin W, Chen B B, Li J Y, *et al*. TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(1): 50-63.

[14] 王姝姝, 张毅, 齐晓伟, 等. 乳腺癌新辅助化疗后残留灶分型与 ER、PR、HER-2 的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(21): 2336-2339.

[15] Vogelstein B, Kinzler K W. Cancer genes and the pathways they control[J]. Nat Med, 2004, 10(8): 789-799.

[16] Han J I, Kim Y, Kim D Y, *et al*. Alteration in E-cadherin/β-catenin expression in canine melanotic tumors[J]. Vet Pathol, 2013, 50(2): 274-280.

[17] Sugimoto C, Morita S, Miyata S. Overexpression of IgLON cell adhesion molecules changes proliferation and cell size of cortical astrocytes[J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(5): 400-405.


(**收稿**:2013-05-26;**修回**:2013-09-18)

(编辑 汪勤俭)