

SPARC 在子宫内膜癌组织中的表达及意义

王 蕾¹ 崔竹梅¹ 郑 烨¹ 刘芝华² 颜丽丽¹

(1 青岛大学医学院附属医院妇科 山东 青岛 266021 2 中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院 北京 100730)

摘要 目的:探讨富含半胱氨酸的酸性分泌型蛋白 (secreted protien ,acidic and rich in cysteine ,SPARC) 在子宫内膜癌组织中的表达及其临床意义。**方法:**应用组织芯片技术研究 SPARC 在正常子宫内膜、增生的子宫内膜和子宫内膜癌组织中的表达情况。**结果:**SPARC 在正常子宫内膜、增生的子宫内膜和子宫内膜癌组织中的阳性表达率分别为 96.55 %、76.79 %、59.50 % ,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在子宫内膜癌中 ,SPARC 的表达强度与手术 - 病理分期、组织学分级、肌层浸润深度和淋巴结转移相关 ,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**SPARC 表达的缺失与子宫内膜癌的发生、发展密切相关 检测 SPARC 可为子宫内膜癌的早期诊断、进一步治疗及预后判断提供一定的理论依据。

关键词:富含半胱氨酸的酸性分泌型蛋白(SPARC) ;子宫内膜癌 ;组织芯片

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)05-905-04

Expression and Significance of the SPARC Protein in Endometrial Carcinoma

WANG Lei¹, CUI Zhu-mei¹, ZHENG Ye¹, LIU Zhi-hua², YAN Li-li¹

(Department of Gynecology and Obstetrics, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China ;
Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College Institute of Oncology , Beijing 100730)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in endometrial carcinoma. **Methods:** The expressions of SPARC in normal endometrium, proliferative endometrium and endometrial carcinoma were analyzed by tissue microarray technique. **Results:** The positive rate of SPARC protein expression was 96.55 % , 76.79 % , 59.50 % in normal endometrium, proliferative endometrium and endometrial carcinoma, respectively, which had statistical significance obviously compared with other groups ($P < 0.05$). In endometrial carcinoma, the expression of SPARC was related to surgical stage, histological grade, myometrial invasion and lymph node metastasis, with a statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusions:** The expression loss of SPARC protein was related with the generation and development of endometrial carcinoma. Detection of SPARC may provide a certain theory for the early diagnosis, further treatment and prognosis of endometrial carcinoma.

Key words: Secreted protein acidic and rich in cysteine(SPARC) ;Endometrial carcinoma ;Tissue microarray

Chinese Library Classification(CLC): R737.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-905-04

前言

子宫内膜癌(endometrial carcinoma)是女性生殖道常见的三大恶性肿瘤之一,占女性生殖道恶性肿瘤的 20 % ~ 30 % ,其发生率在世界范围内呈上升趋势,但其发病机理目前仍未完全明确。现已证实子宫内膜癌的发生是一个多因素、多步骤的复杂过程,有多种癌基因参与。而子宫内膜增生与子宫内膜癌组织学有密切联系,具有一定的癌变倾向,故被列为癌前病变。子宫内膜增生与癌变的关系一直是临床研究的热点^[1]。富含半胱氨酸(Cys)的酸性分泌型蛋白(secreted protien ,acidic and rich in cysteine ,SPARC),是结合于细胞和细胞外基质的生物活性糖蛋白,在胚胎形成、组织重建和修复过程中表达,调节细胞黏附、增殖和基质合成。近几年的研究表明,SPARC 在多种恶性肿瘤中呈高表达或低表达,与肿瘤的发生、发展密切相关^[2,3,4]。

本实验采用组织芯片技术,从蛋白水平检测 SPARC 蛋白在正常子宫内膜、子宫内膜增生、子宫内膜癌组织中的表达情况,并对其表达强度与子宫内膜癌分期、分级的相关性进行分析,探讨 SPARC 蛋白与子宫内膜癌发生、发展的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集青岛大学医学院附属医院 2004 年 1 月至 2006 年 12 月手术切除、经病理确诊的子宫内膜癌组织蜡块 84 例,子宫内膜增生组织蜡块 56 例,同期因宫颈癌行广泛子宫全切除术的正常子宫内膜 29 例。子宫内膜癌患者年龄 27.2 ~ 78 岁,平均(52.67 ± 7.93)岁,所有患者术前皆未行放疗、化疗及内分泌治疗。子宫内膜癌病例依照国际妇产科联盟(FIGO 2006 年)标准进行分级、分期,其中 期 39 例、 期 30 例、 期 8 例、 期 7 例,组织学分级:G1 36 例、G2 24 例、G3 24 例。

1.2 主要试剂

PV-9000 二步法试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中山金桥生物技术有限公司,SPARC 鼠抗人单克隆抗体购自美国

作者简介:王蕾(1981-),女,硕士,医师,妇科肿瘤,E-mail: wanglei20100815@126.com

△通讯作者:崔竹梅 E-mail: cuizhumei1993@yahoo.com.cn

(收稿日期 2010-11-20 接受日期 2010-12-15)

SANTA CRUZ 公司,实验滴度为 1:200。

1.3 组织芯片的制作

(1) 收集蜡块, HE 染色复核诊断, 在玻片上作标记相关区域;(2) 在受体蜡块上打孔, 直径 2 mm;(3) 借助玻片上的标记找准受体蜡块上的相应部位, 打孔采集组织芯;(4) 将组织芯转移到受体蜡块的孔中, 制成组织芯片蜡块。蜡块 4 μm 连续切片(载玻片经过 APES 处理)制成即组织芯片。

1.4 免疫组织化学染色法

组织芯片经过 60℃ 孵箱过夜, 具体步骤按照 PV-9000 试剂盒说明书操作, 以食管癌组织切片作为阳性对照, 以磷酸缓冲盐(PBS)代替一抗(SPARC 抗体)做阴性对照。SPARC 抗体的稀释倍数是 1:200。抗原修复液为 0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液, 微波热修复煮沸 10 min。

1.5 SPARC 阳性的评价标准

低倍镜下观察切片, 选择癌巢较密集处, 换至高倍视野(×400) 随机观察 5 个视野, 每个视野计数 100 个细胞, 计算每个视野中阳性细胞数, 取平均数。不足 5 个高倍视野者, 计数组织中全部细胞数。SPARC 阳性表达为细胞核和细胞浆呈棕黄色染色。参照参考文献^[9]的判定标准, 根据着色强度及阳性细胞百

分比进行评分如下: ①依据染色强度进行半定量判定, 分数标准, 无色为 0 分; 淡黄色, 即弱阳性为 1 分; 棕黄色, 即中等染色强度为 2 分; 棕褐色, 即强阳性为 3 分(染色深浅与背景着色对比)。②根据阳性细胞所占的百分比可分为 5 个等级: <1% 为 0 分; 1%~24% 为 1 分; 25%~49% 为 2 分; 50%~74% 为 3 分; 75%~100% 为 4 分。③免疫反应的得分即每个标本的加权分数(Bax weighted score, BaxWS) 为阳性细胞的百分率得分与免疫染色的强度得分的乘积^[9]。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 11.5 软件对 SPARC 蛋白表达量与分期、分级的关系进行分析, 分析采用 X² 检验, P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SPARC 蛋白在不同子宫内膜组织中的表达情况

SPARC 在正常子宫内膜组织、增生的子宫内膜组织和子宫内膜癌组织中的阳性表达率分别为 96.55%、76.79%、59.50%(见图 1、2), SPARC 的阳性表达率呈显著下降的趋势, 差异具有统计学意义(P<0.05), 见表 1。

表 1 SPARC 蛋白在不同子宫内膜组织中的表达
Table 1 the expression of SPARC in different endometrium

group	SPARC protein expression				
	cases	negative	positive	rate(%)	P
normal endometrium	29	1	28	96.55 %	P< 0.05
hyperplasia tissue	56	13	43	76.79 %	P< 0.05
carcinoma	84	34	50	59.50 %	P< 0.05

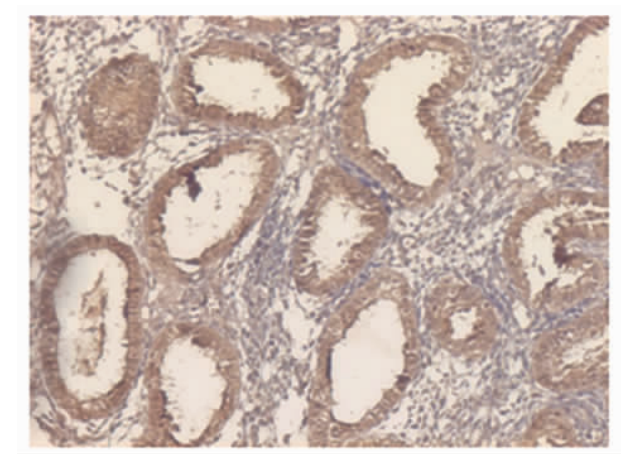


图 1, SPARC 在正常子宫内膜组织中的阳性表达 HE×100
Fig. 1 the positive expression of SPARC in normal endometrium HE×100

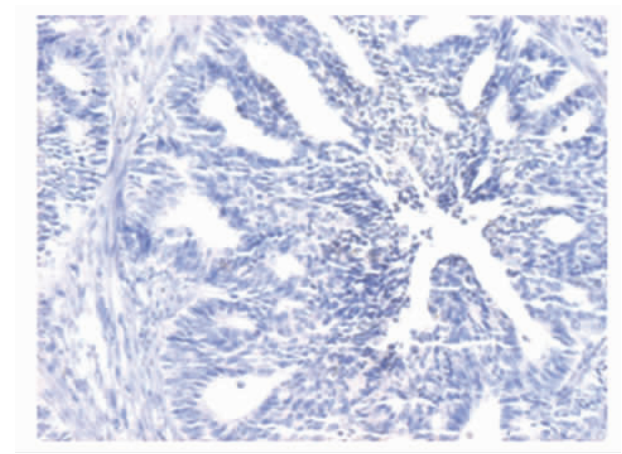


图 2, SPARC 在子宫内膜癌组织中的阴性表达 HE×100
Fig. 2 the negative expression of SPARC in normal endometrium HE×100

2.2 SPARC 蛋白在子宫内膜癌组织中的表达情况

子宫内膜癌组织中 SPARC 蛋白的阳性表达率与手术分期、组织学分级、肌层浸润深度及淋巴结转移有关。子宫内膜癌手术-病理分期越晚, 分化越差, 肌层浸润越深, 且伴有淋巴结转移者, SPARC 蛋白的表达水平越低, 见表 2。

2.3 SPARC 表达与子宫内膜癌术后生存期的关系

84 例子宫内膜癌患者中, 对 79 例患者成功随访 50 个月, 其中 SPARC 高表达者 45 例, 中位生存期 42 个月, SPARC 低表达者 34 例, 中位生存期 26 个月。用 Kaplan-Meier 法绘制生存率曲线(见图 3), 可见 SPARC 低表达组的生存率低于高表达组, 两组的生存率差异经 log-rank 时序检验具有统计学意义(P<0.05)。

表 2 SPARC 蛋白的表达与子宫内膜癌分期、分级的关系

Table 2 the relation between the expression of SPARC and the stage and rating of endometrial carcinoma

project	cases	negative	positive	p
Surgical staging				0.05
Stage	39	8	31	
Stage	30	14	16	
Stage	8	6	2	
Stage	7	6	1	
differentiation				0.05
well-differentiated	36	4	32	
differentiated	24	11	13	
poorly-differentiated	24	19	5	
myometrial invasion				0.05
superficial	64	22	42	
deep	20	12	8	
lymph node metastasis				0.01
negative	69	22	47	
positive	15	12	3	

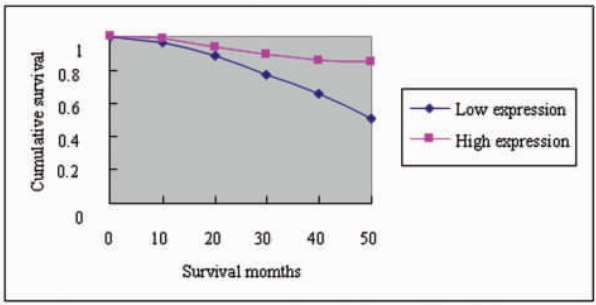


图 3 Kaplan-Meier 生存曲线
Fig. 3 Kaplan-Meier Survival Curves

3 讨论

SPARC (secreted protien ,acidic and rich in cysteine) ,即富含半胱氨酸(Cys) 的酸性蛋白,又称作骨连接蛋白(osteonectin) 、基膜 -40 (BM-40) 、43 kD 蛋白 ,最初是作为人骨和牛骨主要非胶原成份于 1981 年被纯化的^[7]。SPARC 是结合于细胞和细胞外基质的生物活性糖蛋白,在胚胎形成、组织重建和修复过程中都有表达,主要作用为调节细胞黏附、增殖和基质合成。在正常人的甾体细胞、软骨细胞、胎盘滋养层细胞、血管平滑肌细胞中,SPARC 呈限制性中度表达;在与组织修复有关的纤维母细胞和内皮细胞以及在具有侵袭性的恶性肿瘤细胞中则呈高度表达^[8,9]。在很多恶性肿瘤被 SPARC 表达上调,如结直肠癌^[2]、乳腺癌^[3]、卵巢癌^[4]、膀胱癌^[10]、鼻咽癌^[11]等 ,也有些肿瘤组织呈低水平表达或不表达 ,如非小细胞肺癌^[12] 等。

近年来 ,人们对肿瘤生长的条件及病理变化进行了大量的研究 ,早期有学者提出实性肿瘤生长要超过一定体积 ,须有血管生成。在子宫内膜癌方面的研究也越来越多 ,Guldi AJ^[13]应用血管介入技术在子宫切除标本中发现内膜癌组织周围有混乱

丰富的血管 ,认为子宫内膜癌有血管生成活性。Abulafis O 等^[14]报道 ,子宫内膜不典型增生和子宫内膜癌具有血管生成特性 ,并且在宫内膜癌中 ,肌层浸润深度和病理分级与血管生成相关。SPARC 是具有多种生物功能的分泌糖蛋白 ,与多种肿瘤的病程有关。Yiu 等^[15]的体外研究显示 SPARC 阻断血管内皮细胞由 G1 期向 S 期转化,能够诱导血管内皮细胞凋亡,低剂量的 SPARC 抑制血管内皮细胞迁移; SPARC 亦能抑制血管内皮生长因子(VEGF)在人类微血管内中的有丝分裂作用 ,还可通过减少被 VEGF 激活的蛋白激酶的酪氨酸磷酸化 ,进一步削弱 VEGF 的活性。本研究结果显示,正常子宫内膜组织中 SPARC 多为阳性表达,子宫内膜癌组织中存在表达降低或缺失现象,可能是这种表达降低或缺失削弱了 SPARC 对子宫内膜癌组织的血管生成活性的阻抑作用 ,进而促进了子宫内膜癌组织的浸润和转移。

Gary KY Yiu 等^[15]的体内研究显示 SPARC 阻断碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导大鼠角膜血管形成,通过抗血管形成作用来抑制接种于裸鼠上的神经母细胞瘤的生长,SPARC 缺失的老鼠呈现高水平的肿瘤浸润和血管形成。Neveen ASSaid 等^[4]报道, SPARC 抑制溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid ,LPA)诱导的白介素 -6(IL-6)产生和其功能 ,从而减少卵巢癌引发的腹膜转移及腹水形成。本研究表明 :在子宫内膜癌组织中 ,SPARC 表达降低与手术 - 病理分期、组织学分级、肌层浸润深度、淋巴结转移有关。临床 I 期、组织学分级 I 级与伴有浅肌层浸润和无淋巴结转移者阳性表达率高 ,随着临床分期升高、组织学分级增高、伴有深肌层浸润及淋巴结转移则阳性表达率降低 ,提示 SPARC 的表达下降将促使子宫内膜上皮细胞向肿瘤细胞转化, SPARC 对细胞生长的负调控减弱 ,进而促进细胞癌变的发生和肿瘤组织具有的侵袭和转移的能力 ,其可作为恶性

肿瘤诊断与预后评价的依据。

有研究指出,SPARC 具有促血管形成作用,在转移的黑色素瘤和侵袭性的脑膜瘤中有丰富表达。这些矛盾的结果可以用 SPARC 对血管内皮细胞的双向作用来解释:高浓度的 SPARC 能促进血管内皮细胞迁移。根据 SPARC 剂量依赖性的双向作用特性提示血管内皮细胞可能存在两种效应受体:低亲和力和高亲和力受体。低亲和力受体被高浓度 SPARC 配体激活,传导促血管形成效应;高亲和力受体被低浓度的 SPARC 配体激活,传导抑制血管形成效应。在既定的微环境中,血管的生长和稳定是由促血管形成因子和抗血管形成因子形成的网络来控制的。这些因子水平异常失衡将会导致肿瘤生长-转移和许多血管性疾病发生^[6]。所以在黑色素瘤中 SPARC 的表达增高能促进肿瘤的发生、发展,而在子宫内膜癌中 SPARC 的表达降低能促进肿瘤组织的侵袭和转移。

肿瘤细胞增殖活性在一定程度上反映肿瘤的恶性程度,与患者预后有关。Watkins G 等^[17]分析子宫内膜癌 SPARC 表达的预后意义时认为 SPARC 的表达是判断内膜癌预后的一个有用因素。据本资料随访统计,SPARC 阴性表达组患者的生存率低于 SPARC 阳性表达组患者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。这提示 SPARC 低表达或表达缺失者可能具有较高的恶性行为和较差的预后,与文献报道一致^[12]。本研究表明 SPARC 蛋白失活对细胞增殖和负调控作用的丧失,在肿瘤细胞的增殖和发展中起重要作用,SPARC 所反映的增殖活性对于分析和判断子宫内膜癌的生长、分化程度及预后有重要意义。由于 SPARC 表达易于用免疫组化的方法检测,使用于临床可判断肿瘤恶性程度及患者预后。对 SPARC 低表达或表达缺失者,需加强术后辅助治疗,并严密随访。

总之,在子宫内膜癌的发生及演进过程中,SPARC 表达降低下调是一个重要的分子事件。对 SPARC 作用机制与功能的全面认识,将会为肿瘤的早期诊断和预后提供新的指标,为肿瘤的临床治疗开辟新的思路。但 SPARC 参与生理、病理活动的具体过程和机制仍不十分清楚,需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Sherman ME, Ronnett BM, Ioffe OB, et al. Reproducibility of biopsy diagnoses of endometrial hyperplasia: evidence supporting a simplified classification [J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2008;27:318-325
- [2] MacDonald TJ, Brown KM, La Fleur B, et al. Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease [J]. *Nat Genet*, 2001, 29 (2): 143-152
- [3] Helleman J, Jansen MP, Ruigrok RK, et al. Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response [J]. *Clin Cancer Res*, 2008,14(17): 55-64
- [4] Neveen AS, Najwer I, Matthew JS, et al. SPARC Inhibits LPA-Mediated Mesothelial-Ovarian Cancer Cell Crosstalk [J]. *Neoplasia*, 2007, 9(1):23 - 35
- [5] Gary KY, Wood YC, et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159:609-622
- [6] Sarbia M, Loberg C, Wolter M, et al. Expression of bcl- 2 and amplification of c - myc are frequent in basaloid squamous cell carcinomas of the esophagus [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155 (6): 1027-1032
- [7] Termine JD, Kleinman HK, Witson SW, et al. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen [J]. *Cell*, 1981, 26: 99-105
- [8] Miragliotta V, Rapha?l K, Ipi?a Z, et al. Equine thrombospondin II and secreted protein acidic and cysteine-rich in a model of normal and pathological wound repair [J]. *Physiol Genomics*, 2009 38(2):149-57
- [9] Rath B, Nam J, Knobloch TJ, et al. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts [J]. *J Biomech*, 2008, 41(5):1095-103
- [10] Ahn HW, Farmer JL, Bazer FW, et al. Progesterone and interferon tau-regulated genes in the ovine uterine endometrium: identification of periostin as a potential mediator of conceptus elongation [J]. *Reproduction*, 2009, 138(5):813-25
- [11] Huang DY, Lin YT, Jan PS, et al. Transcription factor SOX-5 enhances nasopharyngeal carcinoma progression by down-regulating SPARC gene expression [J]. *J Pathol.*, 2008, 214(4):445-55
- [12] Michael IK, Alexandra G, Rolf A, et al. Enhanced Expression of SPARC/Osteonectin in the Tumor - associated Stroma of Non -Small Cell Lung Cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (1): 5376-5380
- [13] Guldi AJ, Abu JG, Tognazzi K, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma [J]. *Cancer*, 1996, 78:454-460
- [14] Abulafis O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract [J]. *Gynecol Oncol*, 1999;72(2): 220-230
- [15] Gary KY, Wood YC, et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159:609-622
- [16] Kupption C, Motamed K, Sage EH, et al. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1998,273: 29635-29640
- [17] Watkins G, Douglas JA, Bryce R, et al. Increased levels of SPARC (osteonectin) in human breast cancer tissues and its association with clinical outcomes [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, 72 (4):267-272