

· 论 著 ·

CST6 蛋白的表达与骨质疏松及乳腺癌骨转移预测模型建立

张洋 李义强* 刘坤

佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154003

中图分类号: R 446 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 10-1251-06

摘要: **目的** 探讨 CST6 蛋白表达与乳腺癌骨转移的关联性、骨转移与骨质疏松间的关系。探索临床病理参数与骨转移的关联, 建立骨转移预测模型, 以期为患者进行前瞻性治疗, 减少骨不良事件, 减缓骨质疏松与骨转移两者恶性循环的进程。**方法** 收集本院乳腺癌病人术后病理标本。用免疫组化法检出癌组织及癌旁正常组织 CST6 表达水平, 统计每个病例的骨密度值、临床病理参数, 探讨 CST6 与病理参数、骨转移与骨密度、骨转移与 CST6 及病理参数间是否两两相关, 建立骨转移预测模型并判定确切率。**结果** ①骨转移组癌组织中 CST6 阳性率较无转移组及正常乳腺组织明显降低。②CST6 阳性率与肿瘤大小、临床分期及腋窝淋巴结转移情况有关。③骨转移加重骨质疏松, 且与年龄、性别相比, 其对骨质疏松影响更大。④乳腺癌骨转移与 CST6 水平、腋窝淋巴结转移情况、病程分期、病理分级、HER-2 和 ER 水平有关。**结论** 乳腺癌组织中 CST6 阳性率和癌灶大小、病程分期、腋窝淋巴结转移情况呈负相关。CST6 降低及骨质疏松与骨转移存在恶性相关, 临床Ⅲ期、组织学Ⅲ级、ER 及 HER-2 阳性增大乳腺癌骨转移风险。建立乳腺癌骨转移预测模型, 可用于临床预测患者骨转移概率。

关键词: 乳腺癌; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 M; 骨转移; 骨质疏松; 预测模型

The association of protein expression of CST6 with osteoporosis and establishment of prediction model of bone metastasis in breast cancer

ZHANG Yang, LI Yiqiang, LIU Kun

The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154003, China

Corresponding author: LI Yiqiang, Email: 719508018@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between protein expression of CST6 and bone metastasis in breast cancer, to explore the relationship between osteoporosis and bone clinical parameters with bone metastasis and to build prediction model of bone metastasis, with a view to a prospective treatment for patients, to minimize adverse events and to slow down the process of vicious cycle between osteoporosis and bone metastasis. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect CST6 expression level in cancer and adjacent normal tissue groups. BMD data and clinicopathological parameters of each case were obtained. Statistical analyses were performed to determine their relevance to bone metastasis, to establish bone metastasis prediction model and to test it accuracy. **Results** ①Positive expression rate of CST6 in bone metastases group is lower than that of the other group, including normal tissue. ② Expression of CST6 is correlated to tumor size, clinical stage and axillary lymph node metastasis. ③ Bone metastasis aggravated osteoporosis, and its effect on osteoporosis is greater than that of age and sex. ④ The bone metastasis in breast cancer is correlated to the expression of CST6, lymph node metastasis, clinical stage, histological grade, expression of HER-2 and ER. **Conclusion** The positive expression of CST6 in breast cancer is negatively correlated to tumor size, clinical stage, and axillary lymph node metastasis. The reduction of expression level of CST6 and osteoporosis are associated with bone metastases in breast cancer. Clinical stage Ⅲ, histological grade Ⅲ, ER and HER-2 expression are major risk factor for bone metastasis in breast cancer. We established breast cancer bone metastasis prediction model, and it can be used clinically to predict the risk of bone metastases in breast cancer patients.

Key words: Breast cancer; CST6; Bone metastasis; Osteoporosis; Prediction model

基金项目: 佳木斯大学研究生科技创新项目(YZ2016_029)

* 通讯作者: 李义强, Email: 719508018@qq.com

骨是乳腺癌远处转移最常见部位^[1,2], 且骨髓可掩护癌细胞躲避人体自身免疫行为和药物治疗,

导致复发转移。

细胞外基质 (ECM) 是防止肿瘤侵袭转移的重要藩篱, 可被多种酶如基质金属蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶等降解, 从而促使癌细胞转移^[3]。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine proteinase inhibitor, cystatin, CST) 超家族通过与半胱氨酸蛋白酶结合, 阻止其水解 ECM 而发挥抑制作用^[4]。半胱氨酸蛋白酶抑制剂 M (CST6 或 cystatin M/E) 是乳腺癌的候选抑癌基因, 抑制癌细胞分裂增殖、浸润及细胞黏附, 可能在乳腺癌骨转移中参与重要调控^[5-10]。

骨质疏松源于骨吸收形成失衡。转移瘤细胞侵入骨髓腔后, 干扰细胞间调控。成骨细胞和破骨细胞释放生长因子改变骨髓微环境, 刺激迁移至此的癌细胞增殖且产生相关因子提升破骨细胞活性, 破坏骨质; 而骨质破坏后也可释放生长因子促进癌细胞分裂增殖, 继而造成恶性循环^[11,12]。

研究表明^[13], 在软组织、骨、内脏转移三者中, 骨转移具有较好预后, 这也更加坚实了我们探索如何预测及尽可能延缓骨不良事件的意义。

1 材料和方法

1.1 一般资料

收集佳木斯大学附属第一医院 2011 年 12 月至 2016 年 5 月, 术前未经治疗的乳腺癌患者改良根治术后病理石蜡标本, 分为术后发生骨转移组和未发生骨转移组各 40 例。每例标本均采集癌组织及术后切自癌细胞阴性的乳腺组织。收集每个病例最近一次的骨密度数据 (骨转移组采集经确诊为骨转移时的骨密度值即可)。

1.2 方法

1.2.1 试验方法: 免疫组化法: 标本均经福尔马林固定, 石蜡包埋存档, 2 μm 切片。EliVisionTM super/HRP (放大聚合法/辣根过氧化物酶) 免疫组化染色检测 CST6 在组织中的表达。实验方法严格按照说明书进行操作。骨密度测量: 患者骨密度数据均由我院 XR-46 双能 X 线骨密度仪 (美国, Norland) 测得。检测时患者采用统一标准体位, 扇形扫描人体腰椎及全髋区的 BMD 值。

1.2.2 结果判定: 参照最新全国免疫组化技术与诊断专题研讨会标准, 判断细胞着色强度及着色率。

骨质疏松诊断标准遵循中国老年学学会骨质疏松委员会 (OCCGS) 标准差诊断法: 一个或一个以上部位 T 值低于同性别峰值骨量 2 标准差 (-2.0SD), 也可依照 OCCGS 百分率诊断法, 即骨量下

降 25%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析数值, 运用四格表卡方 (χ^2) 检验、Fisher's 精确检验、行 $\times$ 列表的 χ^2 检验、Spearman 相关分析以及 Logistic 回归模型多因素分析, $P < 0.05$ 为标准, 建立骨转移预测模型。

2 结果

2.1 CST6 在乳腺正常组织、癌组织中的差异性表达

CST6 镜下呈现为均匀细小棕褐色或棕黄色颗粒, 主要位于胞质, 其在乳腺正常组织、未发生骨转移组癌组织及转移组乳腺癌组织中阳性率分别为: 85.00% (68/80)、75.00% (30/40)、42.50% (17/40)。CST6 在正常乳腺组织、未发生骨转移组乳腺癌组织中表达明显高于骨转移组的乳腺癌组织, 差异有统计学意义 (χ^2 分别为 23.31 和 8.72, $P < 0.0125$)。

2.2 乳腺癌中 CST6 的表达与临床病理的关系

分析 CST6 水平与患者临床病理间的关系, 见表 1 可知: CST6 阳性率与癌灶大小、临床分期、腋窝淋巴结转移均有显著相关 ($P < 0.05$); 与年龄、孕激素受体 (PR)、组织分级、雌激素受体 (ER)、人类表皮生长因子受体 2 (HER-2)、抑癌基因 (p53)、细胞增殖相关核抗原 (Ki-67) 和钙黏蛋白 (E-cadherin) 无显著相关 ($P > 0.05$)。

表 1 乳腺癌中 CST6 蛋白的表达及与临床病理的关系

Table 1 Expression of CST6 protein in breast cancer and its relationship with clinicopathological parameters

病理参数	组别	例数	CST6		阳性率%	χ^2	P
			+	-			
年龄 (岁)	≤ 45	16	7	9	43.75	2.89	> 0.05
	45 ~ 60	32	18	14	56.25		
	≥ 60	32	22	10	68.75		
肿瘤大小 (cm)	≤ 2	32	26	6	81.25	15.01	< 0.05
	2 ~ 5	40	20	20	50.00		
	≥ 5	8	1	7	12.50		
组织学分级	I	12	10	2	83.33	1.42	> 0.05
	II	30	16	14	53.33		
	III	38	21	17	55.26		
临床分期	I + II	56	38	18	67.86	16.64	< 0.05
	III	24	9	15	37.50		
腋窝淋巴结转移	+	32	10	22	31.25	16.64	< 0.05
	-	48	37	11	77.08		
ER	+	30	16	14	53.33	0.58	> 0.05
	-	50	31	19	70.00		
PR	+	32	22	10	68.75	0.0435	> 0.05
	-	48	25	23	52.08		

病理参数	组别	例数	CST6		χ^2	P
			+	-		
Her-2	+	16	8	8	50.00	0.6318 >0.05
	-	64	39	25	60.94	
Ki67	+	52	32	20	61.54	0.4767 >0.05
	-	28	15	13	53.57	
P53	+	12	6	6	50.00	0.1224 >0.05
	-	68	41	27	60.29	
E-cad	+	24	11	13	45.83	2.3604 >0.05
	-	56	36	20	64.29	

2.3 骨质疏松与骨转移的相关性分析

采用卡方检验和 Spearman 相关分析,结果显示:骨质疏松与骨转移显著相关,与年龄、性别无明显相关。见表 2、3。

表 2 骨质疏松与性别、年龄、骨转移卡方检验相关性分析

Table 2 Correlation between osteoporosis and sex, age and bone metastasis by chi-square test

因素	水平	疏松 (个数)	未疏松 (个数)	合计	χ^2	P
性别	男	3	2	5	0.1685	>0.05
	女	44	31	75		
	合计	47	33	80		
年龄	≤45	8	8	16	0.6963	>0.05
	45~60	19	13	32		
	≥60	20	12	32		
转移情况	骨转移	30	10	40	8.72	<0.05
	未骨转移	17	23	40		
	合计	47	33	80		

表 3 骨质疏松与性别、年龄、骨转移 Spearman 检验相关性分析

Table 3 Correlation between osteoporosis and sex, age and bone metastasis by Spearman test

因素	水平	骨质疏松情况		合计	r	P
		+	-			
性别	男	3	2	5	-0.000656	>0.5
	女	44	31	75		
	合计	47	33	80		
年龄(岁)	≤45	8	8	16	0.085167	0.7764
	45~60	19	13	32		
	≥60	20	12	32		
	合计	47	33	80		
骨转移情况	+	30	10	40	0.7704	<0.05
	-	17	23	40		
	合计	47	33	80		

2.4 CST6 与乳腺癌骨转移的 spearman 相关分析

癌灶中 CST6 阳性的患者里只有 17(17/47)例出现骨转移(36.17%),而在 CST6 阴性的患者里,则是 23(23/33)例骨转移(69.70%)。Spearman 相关分析结果显示:乳腺癌中的 CST6 表达与骨转移事件呈负相关($r = -0.3301, P = 0.0017, P < 0.05$),有显著统计学意义。

2.5 乳腺癌骨转移与临床病理因素的相关性分析

乳腺癌骨转移的高发与组织学分级高、临床分期晚、腋窝淋巴结转移、ER 和 HER-2 的阳性表达、CST6 的阴性表达有关($P < 0.05$);而与年龄、肿瘤大小、绝经情况、PR、p53、E-cadherin 和 Ki-67 不相关($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 乳腺癌骨转移与临床病理资料的关系

Table 4 Relationships between bone metastasis in breast cancer and clinical pathological data

病理参数	组别	例数	骨转移		转移率%	分析	
			有	无		χ^2	P *
年龄(岁)	≤45	16	8	8	50.00	3.09	>0.05
	45~60	32	10	22	31.25		
	≥60	32	22	10	68.75		
肿瘤大小(cm)	≤2	32	13	19	40.63	2.03	>0.05
	2~5	40	22	18	55.00		
	≥5	8	5	3	62.50		
组织学分级	I	12	2	10	16.67	11.69	<0.05
	II	30	12	18	40.00		
	III	38	26	12	68.42		
临床分期	I + II	56	22	34	39.29	8.57	<0.05
	III	24	18	6	75.00		
腋窝淋巴转移	+	32	22	10	68.75	7.5	<0.05
	-	48	18	30	37.50		
ER	+	30	20	10	66.67	5.33	<0.05
	-	50	20	30	40.00		

病理参数	组别	例数	骨转移		转移率%	分析	
			有	无		χ^2	P^*
PR	+	30	14	16	46.67	0.2133	>0.05
	-	50	26	24	52.00		
Her-2	+	36	26	10	72.22	12.93	<0.05
	-	44	14	30	31.82		
Ki-67	+	52	30	22	57.69	3.52	>0.05
	-	28	10	18	35.71		
P53	+	12	8	4	66.67	1.57	>0.05
	-	68	32	36	47.06		
E-cad	+	24	10	14	41.67	0.95	>0.05
	-	56	30	26	53.57		

注：卡方检验、行×列表卡方检验， $\alpha=0.05$ ，* $P<0.05$

2.6 乳腺癌骨转移的非条件 Logistic 回归多因素分析

对骨转移有统计学相关的病理因素：CST6、组织学分级、临床分期、腋窝淋巴结转移情况、ER、HER-2。对其进行 Logistic 回归多因素分析，根据表 5 和 6 建立 Logistic 回归模型，其方程为： $\text{Logit}(P) = -81.245 + 21.948X_1 + 10.043X_2(1) + 17.836X_2(2) + 1.352X_3 + 10.467X_4 + 8.315X_5 - 7.838X_6$ 。结果显示：腋窝淋巴转移未进入方程 ($P>0.05$)，CST6、组织学分级、临床分期、ER、HER-2 进入方程 ($P<0.05$)，组织学 III 级、临床 III 期、ER 及 HER-2 阳性表达均是增加乳腺癌骨转移概率的危险因子，CST6 阳性表达是其保护因素。对模型进行似然比 G 检验 ($\alpha=0.05$)，模型成立 ($G=13.525$ ， $P<$

0.05)。将以上病例代入此模型进行判定，概率 $P=1/1+\exp[-(\alpha+\sum b_jx_j)]$ ，判别为可能不发生和可能发生骨转移时分别为 $P<0.5$ 和 $P\geq 0.5$ 。对上述病例未发生及发生骨转移的判定准确率分别为 85% 和 95%，平均切确率为 90%。

表 5 变量及哑变量赋值

Table 5 Variable and dummy variable assignment		
变量名	变量	赋值 (“=”为赋值符号)
X_1	临床分期	I 期 + II 期 = 0, III 期 = 1
X_2	组织学分级	I 级 = 1, II 级 = 2, III 级 = 3
X_3	ER	阴性 = 0, 阳性 = 1
X_4	Her-2	阴性 = 0, 阳性 = 1
X_5	腋窝淋巴结转移	无 = 0, 有 = 1
X_6	CST6 表达	阴性 = 0, 阳性 = 1
Y	有无骨转移	无 = 0, 有 = 1

表 6 乳腺癌骨转移 Logistic 回归模型分析

Table 6 Logistic regression analysis of bone metastasis in breast cancer

影响因素	偏回归系数 (β 值)	标准误 (SE)	Wald 值 (Wald)	自由度 地方	P 值 (Sig)	相对危险度 (RR)
X_1 临床分期			7.523	2	0.023	
X_1 临床分期(1)	2.195	0.733	8.967	1	0.014	7.460
X_1 临床分期(2)	1.564	0.751	4.337	1	0.031	4.821
X_2 组织学分级			7.262	2		
X_2 组织学分级(1)	2.104	0.756	7.745	1	0.003	8.478
X_2 组织学分级(2)	1.178	0.414	8.096	1	0.002	3.084
X_3 ER	0.352	0.078	20.366	1	0.004	1.674
X_4 Her-2	0.467	0.243	3.693	1	0.005	2.149
X_5 腋窝淋巴结转移	1.831	0.354	26.753	1	0.058	5.373
X_6 CST6	-2.783	0.729	14.574	1	0.001	0.072
常数项	1.812	0.181	100.221	1	0.004	0.216

3 讨论

目前已有较多研究尝试从基因和细胞层面探寻乳腺癌骨转移的机制，虽有一定进展，但能真正应用

到临床解决骨转移实际问题的方法仍然很少^[14]。

3.1 乳腺组织中 CST6 的表达

CST6 表达于正常乳腺上皮细胞，多项研究表明其在乳腺癌细胞系中的表达下调或缺失。本实验显

示 CST6 在病变中的表达虽较正常组织低,但无统计学意义,而值得一提的是,骨转移组癌组织中 CST 阳性率较无骨转移组癌组织及癌旁组织低,且有显著差异。可设想 CST6 在乳腺癌原发过程中的参与并不占重要地位,而在转移的恶性生物学行为中发挥重要作用,Shridhar 等^[7]的研究也是一个很好的佐证。

3.2 CST6 的表达与临床病理的关系

本实验显示 CST6 表达与肿瘤大小、临床分期、腋窝淋巴结转移状况有关,与其他临床病理因素的关系无统计意义。Vigneswaran 等^[15]的研究指出,乳腺癌标本中 CST6 的表达随肿瘤增大而升高。这与本文结论相反。提示 CST6 可能抗肿瘤细胞凋亡。Shridhar 等^[7]的研究将 CST6 克隆入人乳腺癌细胞,发现其能显著地抗肿瘤细胞增殖,而 CST6 的原核表达产物同天然 cystatin M 一样,具备半胱氨酸蛋白酶抑制作用但无抗增殖作用。因此,CST6 抗增殖不是通过抑制半胱氨酸蛋白酶的路径,CST6 翻译后修饰可能在抗增殖作用的发挥中起着关键作用。综上,要想明确肿瘤大小与 CST6 表达的关系及 CST6 抗增殖的机制,需要更多样本和不同检测方法。

3.3 骨质疏松与骨转移

骨转移和骨质疏松间有一定相互性,这与 Zheng^[20]等的结论一致。控制骨质疏松可能治疗骨转移有协同作用,甚至可能会延缓乳腺癌骨转移的病情发展。Grady 等^[21]使用治疗骨质疏松的雷洛昔芬,发现其能降低患浸润性乳腺癌的绝经妇女的骨转移率。双膦酸盐作为一种破骨细胞抑制剂,降低破骨细胞数目并控制其活动,抑制骨吸收,从而控制骨痛。通过如上论述,其在骨转移方面的效用有望进行新的评估。

3.4 CST6 与乳腺癌骨转移

CST6 对半胱氨酸蛋白酶中的 Legumain(豆蔻蛋白)和 cathepsin B、L(组织蛋白酶 B、L)具有强效抑制,而二者活性与乳腺癌的侵袭转移存在正相关。因此,CST6 与半胱氨酸蛋白酶的调节失衡在乳腺癌的侵袭转移中扮演重要角色^[16-19]。CST6 的表达水平与乳腺癌骨转移存在显著负相关。至此便可在临床上针对不同患者个体化治疗,对高风险者提前干预,以降低肿瘤骨转移率,改善患者预后。我们大胆假设,重组 CST6 能作为一种药物,用于抑制临床上的骨转移。

3.5 乳腺癌骨转移与临床病理因素

关于乳腺癌骨转移的临床病理危险因素的研究,各学者结论不尽相同。分析本实验病例资料发现骨转移与临床分期、组织学分级、HER-2、ER、CST6 有关。临床分期是转移的主要高危因素之一,组织学的高分级、HER-2 的阳性表达代表肿瘤具有更高的恶性程度和侵袭性,这与国内外多数研究观点一致。ER 状态与骨不良事件的关联则存在争议,部分学者认为 ER 阳性患者术后经内分泌治疗后无病生存期长,复发转移率较低,预后较好。

3.6 骨转移高危性的预测模型

本模型主要运用于预测乳腺癌骨转移,以便指导临床个体化的前瞻性治疗。但本模型的建立所用样本数目较少,更精确的模型需要基于更多样本资料。可将新样本代入模型来预测转移可能,并通过临床实践进一步修正模型。

综上所述,该实验探讨了 CST6 在乳腺正常组织和癌组织中的表达水平及临床病理因素与骨转移间的关联,建立了转移预测模型,为研发能预防或延缓其骨转移的药物提供了新的思路。另一方面,本研究病例数目较少,研究方法相对单一,针对 CST6 在乳腺癌进展过程中发挥的明确作用的探索,还需更多临床样本,不同检测方法来更深入的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Mundy GR. Metastasis to bone : causes, consequences and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8) : 584-593.
- [2] Lee SJ, Park S, Ahn HK, et al. Implications of bone- only metastases in breast cancer: favorable preference with excellent out-comes of hormone receptor positive breast cancer [J]. Cancer Res Treat, 2011, 43(2): 89- 95.
- [3] 王欣,闫哲. Cystatin M 在乳腺癌及转移癌中的表达和临床意义[J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2008, 2(3): 294-300.
Wang X, Yan Z. Expression of cystatin M in breast cancer and metastatic cancer and its clinical significance[J]. Chin J Breast Dis(Electronic Version), June 2008, 2(3): 294-300.
- [4] Yano M, Hirai K, Naito Z, et al. Expression of cathepsin band cystatin C in human breast cancer. Surg Today, 2001, 31(5) : 385-389.
- [5] 葛爱敏,万榕. Cystatin M 与乳腺癌关系的研究进展[J]. 医学综述, 2007, 13(7): 506-508.
Ge AM, Wan R. The Relationship between Cystatin M and Breast Cancer[J]. Medical Recapitulate, 2007, 13, (7): 506-508.
- [6] Sotiropoulou G, Anisowicz A, Sager R. Identification cloning, and characterization of cystatin M, a novel cysteine proteinase inhibitor, down-regulated in breast cancer[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 903-910.

- [7] Shridhar R, Zhang J, Song J, et al. Cystatin M suppresses the malignant phenotype of human MDA-MB-435S cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (12) : 2206-2215.
- [8] Zhang J, Shridhar R, Dai Q, et al. Cystatin M: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (19) : 6957-6964.
- [9] Song J, Jie C, Polk P, et al. The candidate tumor suppressor CST6 alters the gene expression profile of human breast carcinoma cells: downregulation of the potent mitogenic, monogenic, and angiogenic factor autotaxin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340 (1) : 175-182.
- [10] 白毅.分泌蛋白 CST6 在乳腺癌骨转移中发挥重要作用. *中国医药报*, 2012-11-20 (6).
Bai Y. Secreted protein CST6 play an important role in breast cancer bone metastasis, *China Pharmaceutical News*, 2012-11-20 (6).
- [11] Jeroen T, Bui JS, G Abri, et al. Osteotropic cancers: From primary tumor to bone [J]. *Cancer Letters*, 2009, 273 : 177-193.
- [12] 陈慧,沈赞.乳腺癌骨转移机制研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2009, 19 (12) : 963-969.
Chen H, Shen Z. Progress in research on mechanisms of bone metastasis in breast cancer [J]. *China Oncology*, 2009, 19 (12) : 963-969.
- [13] 闫敏,宋三泰.乳腺癌骨转移的临床病程[J]. *中国骨肿瘤骨病*, 2003, 2 (4) : 221-224.
Yan M, Song ST. The clinical course of bone metastases of breast cancer [J]. *China J Bone Tumor & Bone disease*, 2003, 2 (4) : 221-224.
- [14] Thibaudeau L, Quent VM, Holzapfel BM, et al. Mimicking breast cancer-induced bone metastasis in vivo: current transplantation models and advanced humanized strategies [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33 (2-3) : 721-735.
- [15] Vigneswaran N, Wu J, Muller S, et al. Expression analysis of cystatin C and M in laser-capture microdissected human breast cancer cells—a preliminary study [J]. *Pathol Res Pract*, 2005, 200 (11-12) : 753-762.
- [16] Taupin P, Ray J, Fischer WH, et al. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine paracrine cofactor [J]. *Neuron*, 2000, 28 (2) : 385-397.
- [17] Liu C, Sun C, Huang H, et al. Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (11) : 2957-2964.
- [18] Jagodic M, Vrhovec I, Borstnar S, et al. Prognostic and predictive value of cathepsins D and L in operable breast cancer patients [J]. *Neoplasma*, 2005, 52 (1) : 1-9.
- [19] Maguire TM, Shering SG, Duggan CM, et al. High levels of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast cancer [J]. *J Biol Markers*, 1998, 13 (3) : 139-144.
- [20] Zheng Y, Zhou H, Modzelewski JR, et al. Accelerated bone resorption, due to dietary calcium deficiency, promotes breast cancer tumor growth in bone. *Cancer Res*, 2007, 67 (19) : 9542-9548.
- [21] Grady D, Cauley JA, Geiger MJ, et al. Reduced incidence of invasive breast cancer with raloxifene among women at increased coronary risk [J]. *Natl Cancer Inst*, 2008, 100 (12) : 854-861.

(收稿日期: 2016-08-04)

(上接第 1240 页)

- [4] Aryaei A, Jayasuriya AC. The effect of oscillatory mechanical stimulation on osteoblast attachment and proliferation [J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2015, 52 : 129-134.
- [5] Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CE, et al. ERK5: structure, regulation and function [J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24 (11) : 2187-2196.
- [6] Yang Q, Deng X, Lu B, et al. Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18 (3) : 258-267.
- [7] Li P, Ma YC, Shen HL, et al. Cytoskeletal reorganization mediates fluid shear stress-induced ERK5 activation in osteoblastic cells [J]. *Cell Biology International*, 2012, 36 (3) : 229-236.
- [8] Jiang J, Zhao LG, Teng YJ, et al. ERK5 signalling pathway is essential for fluid shear stress-induced COX-2 gene expression in MC3T3-E1 osteoblast [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 406 (1-2) : 237-243.
- [9] Lee DY, Li YS, Chang SF, et al. Oscillatory flow-induced proliferation of osteoblast-like cells is mediated by α 5 β 3 and β 1 integrins through synergistic interactions of focal adhesion kinase and Shc with phosphatidylinositol 3-kinase and the Akt/mTOR/p70S6K pathway [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (1) : 30-42.
- [10] Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, et al. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2006, 290 (3) : C776-784.

(收稿日期: 2016-01-04; 修回日期: 2016-02-28)