

骨唾液酸蛋白表达和女性乳腺癌骨转移的关系

樊勇¹ 蒋威华² 杨亮²

摘要 目的 探讨骨唾液酸蛋白(BSP)在乳腺癌组织中表达和乳腺癌骨转移的关系。方法 回顾性分析840例女性乳腺癌术后患者,根据治疗后随访是否有骨转移分为乳腺癌骨转移组和无骨转移组,用免疫组织化学染色法测定840例原发性乳腺癌石蜡标本中BSP的表达,采用 χ^2 检验和COX生存分析乳腺癌治疗后骨转移和生存的影响因素。结果 840例病例单因素分析显示:年龄、原发病灶大小、TNM临床分期、分子分型表达情况与乳腺癌术后骨转移的发生差异有统计学意义($P < 0.05$);BSP在骨转移组表达明显高于无骨转移组(无转移组+骨外转移组)($P < 0.05$);乳腺癌术后骨转移与淋巴是否转移、CerbB-2情况、是否绝经、病理类型、细胞分级无关。多因素分析显示年龄越小、肿瘤体积越大、临床分期越晚、三阴性乳腺癌、BSP高表达是乳腺癌术后骨转移的危险因素。COX生存分析提示:乳腺癌组织标本中BSP高表达和低表达术后5年生存率差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 初诊时临床分期、年龄、原发病灶大小、分子分型是乳腺癌术后发生骨转移的主要危险因素,BSP表达可能和乳腺癌术后骨转移及疾病进展相关。

关键词 乳腺癌;骨转移;骨唾液酸蛋白

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1709-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.028

目前,乳腺癌的发病率逐渐增高^[1]。部分乳腺癌患者经过综合治疗后仍出现转移,转移严重影响乳腺癌患者预后,是导致死亡的主要原因^[2]。研究^[3-4]表明乳腺癌是易转移至骨的肿瘤,而骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein, BSP)和肿瘤骨转移相关。因此,该研究拟探讨BSP在乳腺癌组织中的表达及临床意义,采用免疫组织化学染色方法检测BSP表达,分析其与骨转移、淋巴结转移、临床病理特征和

分子分型之间的关系,并探讨BSP表达在乳腺癌骨转移中的意义。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择新疆医科大学附属肿瘤医院2010年9月1日~2011年9月1日收治的乳腺癌患者,通过电话随访、门诊复查,完成随访840例。乳腺癌患者均为女性,年龄31~72岁,中位年龄43岁,其中乳腺癌综合治疗后骨转移患者75例。所有患者经病理确诊为原发性乳腺癌,其中浸润性导管癌42例,浸润性小叶癌18例,其它类型癌15例。未绝经的39例,已绝经的36例。75例乳腺癌术后骨转移患者,雌激素受体(estrogen receptor, ER)和(或)孕激素受体(progesterone receptor, PR)阳性者24例,占骨转移患者的32.00%(24/75);ER和PR阴性者29例,占骨转移患者的38.67%(29/75);CerbB-2受体阳性者23例,占骨转移患者的30.67%(23/75)。75例患者的临床特征详见表1。

1.2 研究病例纳入标准 ①由3位病理学专家进行病理会诊及结合免疫组化确诊为原发性乳腺癌;②入院前无放、化疗及内分泌治疗史;③接受穿刺、手术等综合治疗;④无其他系统恶性肿瘤及家族肿瘤病史;⑤患者本人同意标本参与实验并签署知情同意书;⑥经过新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准。

1.3 研究病例排除标准 ①排除术前行化、放疗、生物靶向或内分泌治疗患者;②排除男性乳腺癌患者;③排除家族性乳腺癌患者。

1.4 方法 免疫组织化学染色,乳腺癌标本脱蜡、水化,按试剂说明书步骤采用免疫组化染色,抗原修复采用微波法。

1.5 骨转移诊断标准 乳腺癌术后病理确诊骨转移或符合下列4个条件者诊断为乳腺癌骨转移:①有明确的乳腺癌病史;②临床骨转移症状明显,如局部骨路疼痛、恶液质、血清碱性磷酸酶异常增高;③骨显像有骨转移病灶;④X线检查、CT、MRI或PET-CT检查诊断为骨转移。

1.6 骨唾液酸染色结果的判断标准 由3位病理

2017-06-29 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2016D01C353)

作者单位:¹新疆维吾尔自治区人民医院北院骨二科,乌鲁木齐830011

²新疆医科大学附属肿瘤医院乳腺外科,乌鲁木齐830011

作者简介:樊勇,男,主治医师;

杨亮,男,副主任医师,责任作者,E-mail: xjzyangliang@sina.com

医师分别判定免疫组织化学染色结果。每例免疫组织化学染色后的切片随机观察 5 个 × 400 倍视野，观察着色程度及计算镜下阳性细胞数百分比。中等以上染色阳性细胞数 0 ~ 10% 评分为 0 分，11% ~ 25% 评分为 1 分，26% ~ 50% 评分为 2 分，51% ~ 75% 评分为 3 分，> 75% 评分为 4 分；≤ 2 分认定为低表达(阴性)，≥ 3 分认定为高表达(阳性)。

1.7 随访方法 电话随访相关信息，根据患者病历记录身份证、电话、地址等信息进行随访，3 次电话随访失败，通过地址单位及街道或村委会再次联系随访，仍无法随访者根据病历记录末次出院时间或最后一次电话随访时间为截止时间。存活以月为单位，死于其他疾病、失访或随访截止时间仍然存活视为截尾数据，随访截止时间为 2016 年 9 月 1 日，随访时间为 1 ~ 60 个月。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析，单因素分析采用 χ^2 检验或确切概率方法，生存分析采用 COX 回归模型方法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌患者术后发生骨转移和临床病理关系

根据治疗后随访是否有骨转移分为乳腺癌骨转移组和无骨转移组，将患者手术确诊时年龄、清扫腋窝淋巴结阳性数目、病理类型、临床分期、局部肿块大小、是否绝经、ER 和 PR、手术方式、CerbB-2 情况等因素进行 χ^2 检验，结果显示：乳腺癌骨转移和无骨转移组在患者的年龄、原发灶大小、TNM 临床分期、分子分型等情况差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；在淋巴转移、CerbB-2、是否绝经、病理类型、细胞分级等方面差异无统计学意义。不同年龄组的患者其骨转移率不同，同一时间点 > 60 岁患者的骨转移率明显低于 < 35 岁患者；随着初诊时 TNM 临床分期的不同，骨转移率不同，I、II 期明显低于 III 期患者；原发灶 ≥ 5 cm 的患者骨转移率较原发灶 2 ~ 5 cm 及 ≤ 2 cm 者明显偏高。840 例女性乳腺癌骨转移患者其术后发生骨转移时间为 6 ~ 53 (41.0 ± 10.7) 个月。术后不同时间段发生骨转移的例数及所占比例为：术后 1 年内 5%，2 年内 25%，2 ~ 5 年内 70%。其中 2 ~ 5 年内骨转移例数最高。

2.2 BSP 在乳腺癌组织中的表达 BSP 主要分布在乳腺癌细胞胞质均匀着色，部分胞质呈阳性棕黄色颗粒着色，少数病例胞质及胞核均深度着色，见图 1。

表 1 840 例女性乳腺癌患者术后发生骨转移和临床病理关系

临床病理指标	n	骨转移发生(n)		转移率 (%)	χ^2 值	P 值
		有	无			
n	840	75	765	8.9	-	-
年龄(岁)					9.31	0.009
≤35	24	5	19	20.8		
35~60	621	61	560	9.8		
≥60	195	9	186	4.6		
淋巴结阳性数目(个)					0.192	0.908
无转移	439	40	399	9.1		
1~3	253	21	232	8.3		
≥4	148	14	134	9.5		
TNM 分期					31.043	0.001
I	445	21	424	4.7		
II	234	23	211	9.8		
III	161	31	130	19.3		
乳腺肿块大小					7.988	0.018
T1	361	23	338	6.4		
T2	205	17	188	8.3		
T3	274	35	239	12.8		
病理分型					1.006	0.316
浸润性非特殊型	706	60	646	8.5		
其他	134	15	119	11.2		
是否绝经					0.002	0.965
否	450	40	410	8.9		
是	390	35	355	9.0		
CerbB-2					3.121	0.210
阳性	178	20	158	11.2		
阴性	450	33	417	7.3		
未知细胞分级					0.758	0.684
I	58	4	54	6.9		
II	480	41	439	8.5		
III	302	30	272	9.9		
分子分型					10.139	0.017
Luminal A	190	8	182	4.3		
Luminal B	304	25	279	8.2		
HER-2 ⁺	178	20	158	11.2		
三阴性	168	22	146	13.1		

2.3 BSP 表达和骨转移关系 在 840 例浸润性乳腺癌导管癌组织中 BSP 高表达比率为 74.88%，其中在 765 例无转移的癌组织中高表达比率为 73.86% (565/765)，而在 75 例有骨转移(或骨转移伴骨外转移)的癌组织中的高表达比率为 85.33% (64/75)，表明 BSP 在骨转移的乳腺浸润性导管癌组织中表达高，两组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.783, P < 0.05$)，见表 1。BSP 的高表达可能与乳腺癌骨转移相关。骨转移乳腺癌组织中 BSP 多呈高表达状态。见表 2。

2.4 BSP 在乳腺癌中的表达与乳腺癌生存及预后的关系 将患者年龄、是否绝经、肿块大小、病理类型、腋窝淋巴结阳性数目、临床分期、ER 和 PR、CerbB-2 情况等因素代入 COX 模型中进行多因素变

量分析 结果显示: 年龄越年轻、肿瘤体积越大、临床分期越晚、三阴性乳腺癌、BSP 高表达是乳腺癌术后骨转移的危险因素。乳腺癌 BSP 免疫组化染色高表达和低表达 5 年生存分析差异有统计学意义 ($P = 0.015$)。见表 3、4 和图 2。

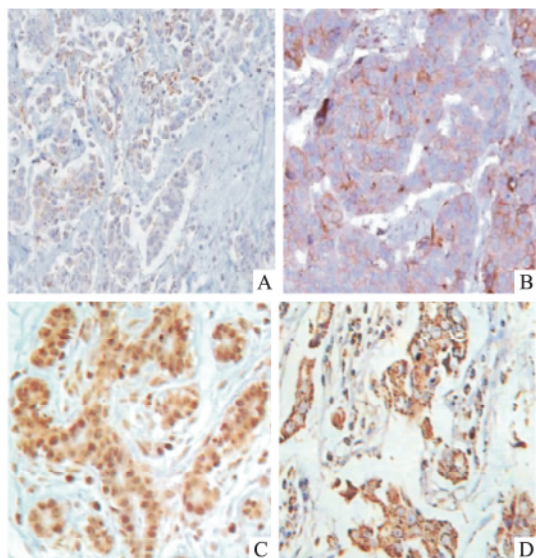


图 1 BSP 在乳腺癌组织中表达 免疫组化染色 $\times 400$

A: 阴性表达(-); B: 弱阳性表达(+); C: 阳性表达(++) ; D: 强阳性表达(+++)

表 2 BSP 表达与乳腺骨转移的关系

BSP	n	乳腺癌术后骨转移 [n(%)]		χ^2 值	P 值
		有	无		
低表达(-/+)	211	11(5.2)	200(94.8)	4.783	0.029
高表达(++/+++)	629	64(10.2)	565(89.8)		

注: BSP -, + 为低表达或阴性表达, ++, +++ 为高表达或阳性表达

表 3 乳腺癌骨转移相关临床病理因素 COX 回归变量赋值表

变量	变量分类及赋值
BSP	BSP 低表达 = 0, BSP 高表达 = 1
肿瘤大小	$T_1 = 0, T_2 = 1, T_3 = 2$
年龄	≤ 35 岁 = 1, 36 ~ 59 岁 = 2, ≥ 60 岁 = 3
临床分期	I 期 = 1, II 期 = 2, III 期 = 3
腋窝淋巴结转移	$N_0 = 0, N_1 = 1, N_2 = 2, N_3 = 3$
分子分型	Luminal A = 1, Luminal B = 2, HER-2(+) = 3, 三阴性 = 4

表 4 骨转移相关因素的 COX 多因素回归分析

变量	B 值	SE 值	Wald 值	P 值	HR 值	95% CI 值
年龄	-0.631	0.212	11.380	0.001	0.714	0.425 ~ 1.580
肿块大小	1.555	0.191	8.495	0.004	1.943	1.023 ~ 2.662
TNM 分期	1.764	0.270	13.168	0.001	3.148	1.343 ~ 5.436
分子分型	1.148	0.201	7.959	0.026	1.465	1.055 ~ 2.322
BSP	1.435	0.287	7.893	0.001	1.823	1.265 ~ 3.532

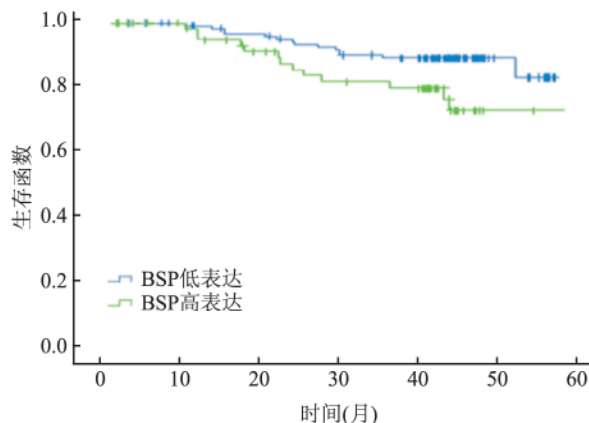


图 2 乳腺癌 BSP 高表达和低表达 5 年生存分析

3 讨论

近年来, 乳腺癌的发病率在世界范围内呈上升趋势, 乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤^[5], 也是常见的女性肿瘤死亡原因。虽然人们对乳腺癌认识不断增强, 开展早期发现、早期诊断、及早治疗, 死亡率开始有所下降, 但乳腺癌的治疗常以转移和复发而失败。乳腺癌最常见的转移部位为淋巴结、骨、肝、肺^[6]。因此对乳腺癌骨转移防治的研究有重要的临床意义。

关于乳腺癌术后骨转移的相关危险因素, 有研究^[7]表明, 乳腺癌术后 ER、PR 状况、腋窝淋巴结阳性数目、CerbB-2 表达及术后辅助化疗等属于乳腺癌骨转移的独立影响因素。熊玲静等^[8]研究发现, 乳腺癌骨转移与临床分期、CerbB2、腋窝淋巴结状况及 ER 有相关性, 与年龄、手术方式、PR 无相关性。另有学者持不同意见, 认为乳腺癌骨转移与患者年龄、TNM 分期、肿瘤大小情况有关, 与淋巴结转移无明显相关性^[9]。本研究显示乳腺癌患者病灶大小、年龄、分子分型、TNM 临床分期是影响乳腺癌患者术后骨转移发生的重要因素, 而与 CerbB-2、是否绝经、病理类型、细胞分级等无明显相关性。本研究亦显示确诊时患者的年龄也是乳腺癌发生骨转移的一个主要危险因素。对此, 文献报道不一, 石根明等^[9]认为随着患者年龄增加, 骨转移发生率增高, 并认为可能与患者全身免疫状况有关, 老年乳腺癌患者机体免疫功能低下为乳腺癌骨转移的发生创造了有利条件。安芬芳等^[10]观点却不同, 认为随着年龄的增加, 骨转移危险性逐步降低。根据本研究结果: 患者的年龄越大, 其骨转移发生率越低, 青年组患者的发病率明显高于老年组, 可能原因如下: 老年乳腺癌一般进展缓慢; 淋巴结转移率相对年轻乳

腺癌较低; ER 阳性比率较青年组高; 青年组乳腺癌具有更强的侵袭性,易发生淋巴结转移。关于乳腺癌患者诊断时的年龄与其预后是否有关也始终存在争论。大多数认为肿瘤的侵袭性随着年龄的增加而下降。

BSP 是典型的具有分泌性、高度糖基化和磷酸化细胞基质蛋白,主要分布在牙齿、骨骼及钙化的软骨组织和骨的交界区域。自发现 BSP 在乳腺癌细胞中表达后^[11] 在其他易发生骨转移的癌细胞中也确定有 BSP 的表达。BSP 引起研究者广泛关注。研究^[12-14] 显示 BSP 与肿瘤侵袭转移相关,参与肿瘤细胞的黏附、血管生成、抗细胞凋亡和骨破坏等过程,并与肿瘤骨转移存在密切关系。本研究提示 BSP 高表达和乳腺癌术后骨转移相关,与杜玉娟等^[3] 的研究结果一致。为研究 BSP 在乳腺肿瘤侵袭转移中的作用提供了理论基础。但是细胞的蛋白表达对肿瘤细胞骨转移作用是一系列具有内在联系的多个基因及蛋白作用的综合结果^[15] 肿瘤转移复杂性决定了转移进程的发展并不单纯依赖某一种因子的变化。虽然有少量 BSP 在乳腺肿瘤侵袭转移机制方面的研究^[4] ,但具体机制还有待进一步大量研究阐明。

参考文献

[1] Siegel R L , Miller K D , Jemal A . Cancer statistics , 2016 [J]. *CA cancer J Clin* , 2016 , 66(1) : 7 - 30.

[2] Milioli H H , Santos Sousa K , Kaviski R , et al . Comparative proteomics of primary breast carcinomas and lymph node metastases outlining markers of tumor invasion [J]. *Cancer Genomics Pro-*

teomics , 2015 , 12(2) : 89 - 101.

[3] 杜玉娟,刘 巍. 骨唾液酸蛋白与乳腺癌骨转移相关性的研究进展[J]. *临床肿瘤学杂志* , 2011 , 16(11) : 1048 - 51.

[4] 石 羽,张 彦,林丽莎,等. 骨唾液酸蛋白对破骨细胞前体 RAW264.7 增殖、分化作用的信号通路[J]. *实用医学杂志* , 2016 , 32(11) : 1734 - 7.

[5] 蒋威华,李涌涛,张明帅,等. 汉族与维吾尔族三阴性乳腺癌流行病学特征差异探讨[J]. *安徽医科大学学报* , 2016 , 51(5) : 724 - 7.

[6] 周力恒,殷文瑾,陆劲松,等. 乳腺癌患者术后不同部位复发转移的风险分布[J]. *中国癌症杂志* , 2008 , 18(2) : 124 - 8.

[7] 王莉莉,米彦霞,郑永明,等. 乳腺癌骨转移 97 例临床特点分析[J]. *肿瘤研究与临床* , 2016 28(10) : 707 - 8.

[8] 熊玲静,梁昌华,李新辉,等. 乳腺癌骨转移与其生物学标记因子的关系[J]. *中华核医学杂志* 2003 23(4) : 208 - 10.

[9] 石根明,王跃珍. 乳腺癌骨转移的危险因素分析[J]. *浙江医学* 2005 27(1) : 19 - 22.

[10] 安芬芳,刘庆媛. 乳腺癌骨转移临床病理预后相关因素的研究[J]. *中华临床医学实践杂志* 2004 3(2) : 113 - 5.

[11] Sharp J A , Waltham M , Williams E D , et al . Transfection of MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with bone sialoprotein (BSP) stimulates migration and invasion *in vitro* , and growth of primary and secondary tumors in nude mice [J]. *Clin Exp Metastasis* , 2004 , 21(1) : 19 - 29.

[12] Wang J , Wang L , Xia B , et al . BSP gene silencing inhibits migration , invasion , and bone metastasis of MDA-MB-231BO human breast cancer cells [J]. *Plos One* , 2013 , 8(5) : e62936.

[13] 王玉栋,杜玉娟,王 龙,等. 浸润性乳腺癌早期骨转移的预后影响因素分析[J]. *肿瘤* , 2014 , 34(7) : 616 - 22.

[14] 张菁华,崔国忠,李永生,等. 乳腺癌组织中 BSP 表达及意义[J]. *现代肿瘤医学* , 2014 , 22(3) : 564 - 6.

[15] 陈伟玲,韩向晖. 骨形态发生蛋白与乳腺癌的研究进展[J]. *癌症进展* , 2016 , 14(4) : 293 - 5.

The relationship between the expression of bone sialoprotein and the bone metastasis in women with breast cancer

Fan Yong¹ , Jiang Weihua² , Yang Liang²

(¹Second Dept of Orthopaedics North Hospital , Xinjiang Autonomous Region People's Hospital , Urumqi 830011; ²Dept of Breast Surgery Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University , Urumqi 830011)

Abstract Objective To investigate the relationship between the expression of bone sialoprotein(BSP) and the bone metastasis of breast cancer. **Methods** 840 cases of female breast cancer patients were retrospectively analyzed. The patients were divided into breast cancer bone metastasis group and no bone metastasis group according to whether the patients had bone metastasis after treatment ,BSP expression in paraffin specimens of 840 cases of primary breastcancer was determined by immunohistochemical method , χ^2 test and COX survival analysis was used in analysis of influencing factors of bone metastasis and 5 years survival after treatment of breast cancer. **Results** 840 cases of breast cancer postoperatively of single factor analysis showed that age , primary tumor size , clinical stage , TNM and molecular typing were statistically significant($P < 0.05$) . BSP in bonemetastasis group was significantly

22 MHz 高频超声在健康人群中皮肤声像研究

谢雄风^{1,2} 高金平^{1,2} 汤华阳^{1,2} 杨森^{1,2} 张学军^{1,2}

摘要 目的 用无创高频超声自动测量中国健康人群各年龄组皮肤厚度、皮肤回声密度及皮肤声像图研究。方法 应用 22 MHz 高频超声分别对 830 例健康人群前额、面颊、前臂、手背、手掌、腹部、小腿、脚背 8 个不同解剖部位进行自动测量皮肤厚度、皮肤回声密度及皮肤声像图观察,并详细记录各组数据。结果 22 MHz 高频超声可以清晰地显示皮肤各层结构:表皮层为一细状高回声,真皮层为中等回声,真皮下层可见管状低回声的皮下静脉,皮下脂肪层为低回声,浅筋膜为规则纵向走行的线状高回声。部位不同、性别不同均影响皮肤厚度且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。除面颊与手掌、前臂与手背、小腿与脚背,其它部位两两之间皮肤回声密度比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。除脚背部,其它部位性别不同其皮肤回声密度差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 22 MHz 高频超声可以清晰地显示皮肤各层结构及精确地测量皮肤厚度和皮肤回声密度。

关键词 高频超声;自动测量;皮肤厚度;皮肤回声密度;皮肤声像图

中图分类号 R-751

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1713-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.029

1979 年 Alexander et al^[1] 首次应用脉冲超声检测人类皮肤厚度,引起医学界的关注。早期超声的分辨率只能达到 0.2 ~ 0.5 mm,不足以分辨皮肤各

层结构。这也是过去超声很少用于皮肤疾病诊断的原因之一。随着超声技术和计算机技术的发展,高频超声应运而生。高频超声是指探头频率在 10 MHz 以上的超声,通常将探头频率在 50 MHz 以上的高频超声称为高频超声生物显微镜^[2]。随着超声探头频率增加,其分辨率增加,但探测皮肤的深度越来越低。同时超声新技术如弹性成像^[3]、3D 成像^[4]和系统自动测量^[5]等应用,使得高频超声在皮肤疾病的诊断更加准确,应用更加广泛。该研究应用 22 MHz 高频超声自动测量 830 例健康人群不同部位全层皮肤厚度、皮肤回声密度和皮肤声像图,进一步研究皮肤厚度、皮肤回声密度及皮肤声像图在健康人群中差异。

1 材料与方法

1.1 病例资料 830 例汉族健康志愿者,其中男 426 例,女 404 例,年龄 1 ~ 79(32.38 ± 1.94)岁。根据 Nedelec et al^[6] 年龄分组标准,分为 8 个不同年龄组:1 ~ 9 岁、10 ~ 19 岁、20 ~ 29 岁、30 ~ 39 岁、40 ~ 49 岁、50 ~ 59 岁、60 ~ 69 岁、70 ~ 79 岁。排除因素:测试部位有日光性皮炎、痤疮、脂溢性皮炎、急性或慢性湿疹、过敏性皮炎、特应性皮炎、寻常型银屑病、关节病型银屑病、红皮病型银屑病、脓疱型银屑病、结缔组织病如红斑狼疮、皮炎、硬皮病;慢性内科系统疾病者;处于孕期或正在哺乳的女性;近期服用糖皮质激素或者免疫调节或抑制剂患者;长期做紫外线治疗患者。本研究通过安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准,所有检测者签署知情同意书。

1.2 测定部位 选择全身具有代表性 8 个部位进

2017-06-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81361128014)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院皮肤性病科,合肥 230022

²安徽医科大学皮肤病研究所,合肥 230022

作者简介:谢雄风,男,硕士研究生;

张学军,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: ayzxj@vip.sina.com

higher than that in patients without bone metastasis(non metastasis group and bone metastasis group) ($P < 0.05$). However, CerbB-2, lymph node metastasis, whether menopause, pathological type, cell grading showed no correlation. Multivariate analysis revealed that age, tumor volume, clinical stage, three negative breast and high expression of BPS were risk factors for bone metastasis. COX survival analysis of breast cancer 5 year survival rate, BSP high expression group and low expression group was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** The clinical stage, age, primary lesion size and molecular type are the main risk factors for bone metastasis after breast cancer treatment. Bone sialoprotein expression is closely related to breast cancer bone metastasis.

Key words breast cancer; bone metastasis; bone sialoprotein