

论著 · 临床研究

ADAM8 与 EGFR 在骨肉瘤中的表达及其相关性研究*

刘 岩, 温 杰

(内蒙古自治区包钢医院骨科, 内蒙古包头 014010)

摘 要:**目的** 通过观察去整合素-金属蛋白酶 8(ADAM8)与表皮生长因子受体(EGFR)在骨肉瘤中的表达特点,为骨肉瘤的靶向治疗研究或骨肉瘤发生、发展的调节机制奠定研究基础。**方法** 研究分别纳入骨肉瘤组织、骨软骨瘤组织、骨性关节炎组织及正常骨组织,采用组织芯片结合免疫组化法对上述组织中 ADAM8 与 EGFR 的表达情况进行观察对比,同时通过 Spearman 秩相关检验分析 ADAM8 与 EGFR 的相关性及与各病例的临床病理因素之间的关系。**结果** 骨肉瘤组织、骨软骨瘤组织、骨性关节炎组织及正常骨组织中,ADAM8 阳性表达率分别为 80.95%、36.36%、62.86%、24.14%,差异有统计学意义($P<0.05$);EGFR 阳性表达率分别为 66.67%、9.09%、40.00%、4.76%,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman 秩相关检验显示 ADAM8 与 EGFR 呈正相关($r=0.379, P<0.05$)。**结论** ADAM8 与 EGFR 在骨肉瘤组织中的表达明显增加,两指标联合检测能够作为临床诊断骨肉瘤的新选择。

关键词:去整合素-金属蛋白酶 8; 表皮生长因子受体; 骨肉瘤; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.15.005

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2018)15-1809-05

文献标识码:A

Research of expression and correlation of ADAM8 and EGFR in the osteosarcoma tissue*

LIU Yan, WEN Jie

(Department of Orthopaedics, Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract:**Objective** To study the expression of ADAM8 and EGFR in osteosarcoma tissue, and to lay a foundation for the research on the regulation mechanism of the therapy of osteosarcoma and the occurrence and development of osteosarcoma. **Methods** The osteosarcoma tissue, osteochondroma tissue, osteoarthritis tissue and normal bone tissue was selected. Through the tissue microarray and immunohistochemistry, the expression of ADAM8 and EGFR mentioned previously tissues was observed and compared. Spearman rank correlation test was used to analyze the correlation between ADAM8 and EGFR and the correlation with pathological factors. **Results** The positive expression rate of ADAM8 in the osteosarcoma tissue, osteochondroma tissue, osteoarthritis tissue and normal bone tissue was 80.95%, 36.36%, 62.86%, 24.14% ($P<0.05$); the positive expression rate of EGFR in the osteosarcoma tissue, osteochondroma tissue, osteoarthritis tissue and normal bone tissue was 66.67%, 9.09%, 40.00%, 4.76% ($P<0.05$); through Spearman test, ADAM8 was positively correlated with EGFR ($r=0.379, P<0.05$). **Conclusion** ADAM8 and EGFR has a much higher expression in the osteosarcoma tissue, which the joint detection of two index can be seen as a new method in the clinical diagnosis of osteosarcoma tissue.

Key words: ADAM8; EGFR; osteosarcoma; correlation

骨肉瘤是一种常见的、生长快速的原发恶性骨肿瘤。大部分骨肉瘤患者在诊断时是高表型肿瘤。15%以上患者发生肺部转移,80%以上发生局部转移。因此仅依靠手术治愈很少见。末端局部病变的年轻患者,依靠综合化学治疗可显著改善其预后^[1-2]。但是已经发生转移或辅助化学治疗无效的患者仍有

较差的预后。目前骨肉瘤的发生和发展的分子机制尚不清楚,此类研究有助于临床对骨肉瘤的诊断、判断预后、阐明分子机制并为靶向干预治疗提供新的理论依据,具有良好的社会效益。DAM8(CD156)作为 ADAMs(解整合素-金属蛋白酶)家族中的成员,其在细胞黏附分子、细胞因子受体基质组织中及疾病的诊

* 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2014MS0819)。

作者简介:刘岩,男,副主任医师,主要从事临床骨科的相关研究。

本文引用格式:刘岩,温杰. ADAM8 与 EGFR 在骨肉瘤中的表达及其相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(15):1809-1812.

断和预后中均具有重要作用^[3]。有研究表明缺乏 ADAM8 的红细胞不能从血管腔内分离及形成,同时可以通过抑制 ADAM8 的表达进而起到抑制恶性肿瘤的生长的目的。HEMANDEZ 等^[4]报道 ADAM8 在肺癌骨转移中有显著作用,其高表达与肺癌的预后呈正相关。此外,许多学者发现不同类型的癌症肿瘤中 ADAM8 表达上调,其中 ADAM8 表达与高分期肺腺癌、非小细胞肺癌有关,并已经建议作为肺癌的血清标记物。表皮生长因子受体(EGFR),是表皮生长因子(EGF)细胞增殖和信号转导的受体,是 ErbB 受体家族中的一种。

1 资料与方法

1.1 一般资料 购买骨肉瘤组织芯片 50 例,选取其中成骨细胞型骨肉瘤 42 例,ADAM8 和 EGFR 组染色无脱片。骨软骨瘤组织 23 例,标本来源的患者年龄 5~26 岁,其中男性 13 例,女性 10 例,股骨远端 3 例,胫骨近端 20 例,ADAM8 组脱片 1 例,EGFR 组脱片 1 例。正常骨组织 35 例,标本来源者年龄 58~87 岁,其中男性 15 例,女性 20 例,均为股骨近端股骨颈基底部松质骨,ADAM8 组脱片 6 例,EGFR 组脱片 14 例。骨性关节炎 46 例,年龄 56~73 岁,其中男性 20 例,女性 26 例,均为膝关节骨性关节炎病变软骨,ADAM8 组脱片 11 例,EGFR 组脱片 21 例。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 主要试剂包括 ADAM8 (AF1031)兔抗人多克隆抗体购自上海蓝基生物科技有限公司;EGFR(ZM-0083)鼠抗人单克隆抗体购自北京中杉金桥生物公司;即用型 UltraSensitiveTMS-P 超敏试剂盒购自福建迈新生物生物技术公司;DAB 酶底物显色试剂盒购自福建迈新生物生物技术公司。主要仪器包括 RM2165 型石蜡切片机,ST5010 型全自动染色机,VBP2001 型玻片打号机,Promounter 自动封片机,MTA1 型组织微阵列仪,Excelsior 全自动脱水机,Histocentre3 包埋机,ESPES 烤箱。

1.2.2 石蜡标本组织芯片的制备 (1)组织标本的处理:取材,组织脱水,石蜡包埋,病理石蜡块切片,HE 染色;(2)HE 染色切片病理诊断,并标记病变组织的范围;(3)按照实验目的设计组织芯片阵列的组织类型和排列方式,在组织数据库中选择合适的组织病例编号;(4)按照组织病例编号从组织库中取出组织蜡块和对应的 HE 染色切片;(5)空白受体蜡块采用组织包埋机制备;(6)用组织阵列仪按照阵列设计抽提病理蜡块组织芯并有规律的排列在空白受体蜡块上,组织阵列块在 52℃ 恒温烤箱中加热融合,使组织芯与受体蜡块紧密相连;用全自动组织切片机进行蜡片修整和切片处理。(7)阵列切片置于 60℃ 恒温烤箱中烤片 16 h;5℃ 下冰箱冷藏储存。

1.2.3 免疫组化染色 将制备好的石蜡标本组织芯片进行常规免疫组化染色。

1.3 观察指标 以细胞出现浅黄、棕黄或更深的棕褐色的颗粒作为阳性细胞,采用三个参数(即染色强度、阳性细胞数和两者记分的乘积)的半定量计数方法。着色强度记分标准:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。光镜下随机观察 5 个高倍视野,记录染色阳性细胞的百分率,记分标准:0%为 0 分,1%~10%为 1 分,>10%~50%为 2 分,>50%~80%为 3 分,>80%为 4 分。染色强度记分与阳性细胞数记分之积为最后得分:0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),大于 4 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学处理 ADAM8、EGFR 在骨肉瘤、骨软骨瘤、骨性关节炎软骨及正常骨组织中的表达差异及与组织病理类型的关系采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Spearman 秩相关检验,所有结果均用 SPSS20.0 软件进行分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤、骨软骨瘤、骨性关节炎软骨及正常骨组织中 ADAM8、EGFR 的表达情况 ADAM8 在 42 例成骨细胞型骨肉瘤组织中 34 例表达阳性,染色强度不等,8 例阴性表达,阳性率为 80.95%;在 22 例骨软骨瘤组织中 8 例阳性表达,14 例阴性表达,阳性率为 36.36%;在 35 例骨性关节炎组织中 22 例阳性表达,13 例阴性表达,阳性率为 62.86%;在 29 例正常骨组织中 7 例阳性表达,22 例阴性表达,阳性率为 24.14%,见表 1、图 1~4。

表 1 ADAM8 表达情况				
组织类别	n	阳性	阴性	阳性率(%)
骨肉瘤	42	34	8	80.95
骨软骨瘤	22	8	14	36.36
骨性关节炎	35	22	13	62.86
正常骨组织	29	7	22	24.14

注:4 类组织间比较, $\chi^2=26.591,P=0.000<0.01$;3 组间差异有统计学意义的分别为骨肉瘤、骨软骨瘤、骨肉瘤与正常骨组织、正常骨组织与骨性关节炎

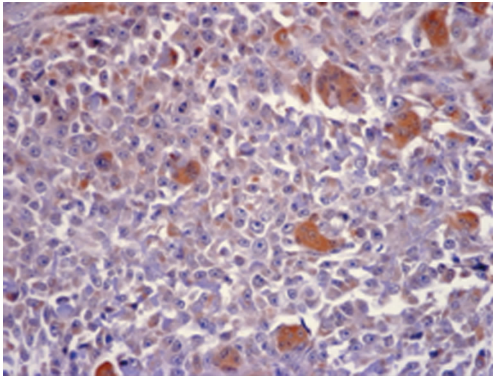


图 1 ADAM8 在骨肉瘤中表达(+++,200×)

2.2 EGFR 表达情况 EGFR 在 42 例成骨细胞型骨肉瘤组织中 28 例表达阳性,染色强度不等,14 例阴性表达,阳性率为 62.67%;在 22 例骨软骨瘤组织中 2 例阳性表达,20 例阴性表达,阳性率为 9.09%;在 25 例骨性关节炎组织中 10 例阳性表达,15 例阴性表达,阳性率为 40.00%;在 21 例正常骨组织中 1 例阳性表达,20 例阴性表达,阳性率为 4.67%,见表 2、图 5~8。

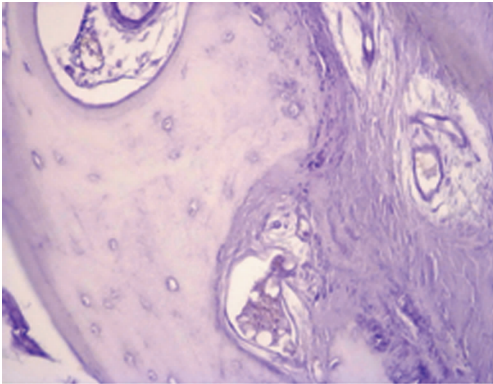


图 2 ADAM8 在骨软骨瘤中表达(-,200×)

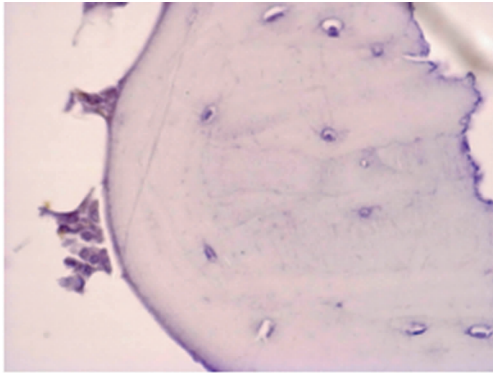


图 3 ADAM8 在骨组织中表达(-,200×)

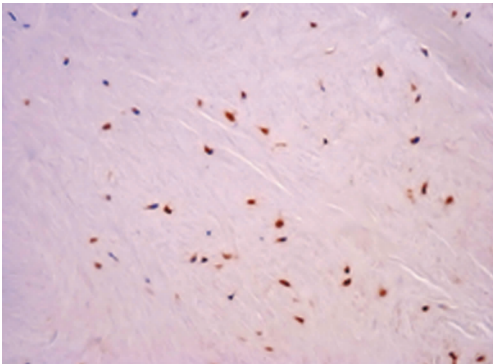


图 4 ADAM8 在骨性关节炎中表达(+,200×)

表 2 EGFR 表达情况				
组织类别	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
骨肉瘤	42	28	14	66.67
骨软骨瘤	22	2	20	9.09
骨性关节炎	25	10	15	40.00
正常松质骨	21	1	20	4.76

注:4 类组织间比较, $\chi^2=32.567, P=0.000<0.01$;3 组间差异有统计学意义的分别为骨肉瘤与骨软骨瘤、骨肉瘤与正常骨组织、正常骨组织、骨性关节炎

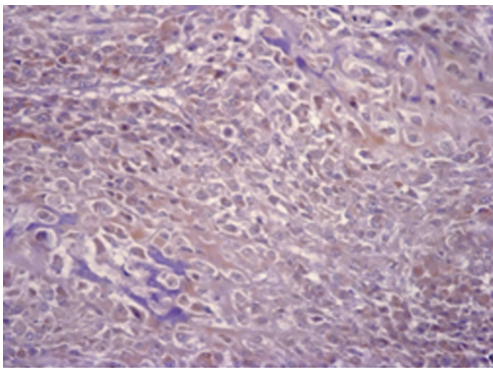


图 5 EGFR 在骨肉瘤中表达(++ ,200×)

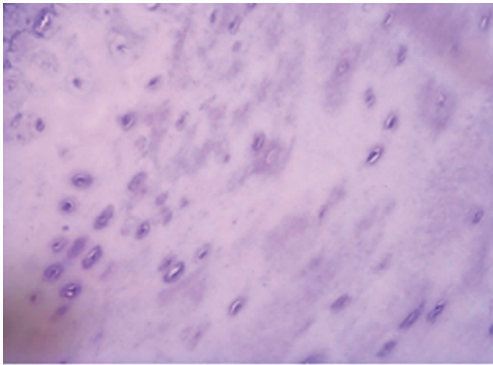


图 6 EGFR 在骨软骨瘤中表达(-,200×)

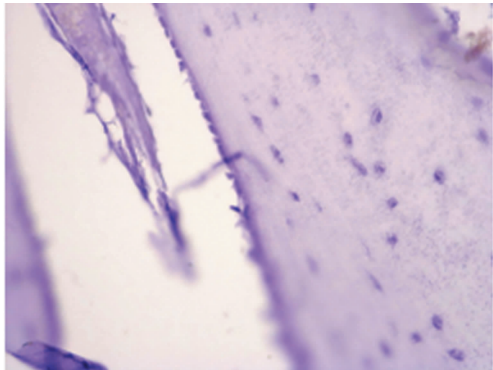


图 7 EGFR 在骨组织中表达(-,200×)

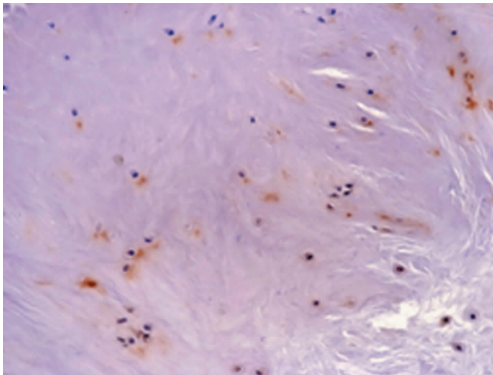


图 8 EGFR 在骨性关节炎中表达(+,200×)

2.3 骨肉瘤组织中 ADAM8 与 EGFR 共同表达的情况 综合分析成骨细胞型骨肉瘤 42 例 ADAM8 和 EGFR 染色结果,采用 Spearman 秩相关检验显示两者呈正相关, $r=0.379, P=0.033<0.05$,结果见表 3。

表 3 ADAM8 与 EGFR 在骨肉瘤中共同表达情况

ADAM8	EGFR			合计
	++	+	-	
++	5	1	2	8
+	6	12	8	26
-	1	3	4	8
合计	9	19	14	42

3 讨 论

骨肉瘤是由增殖肿瘤细胞直接产生骨或骨样组织为特点的恶性肿瘤，是一种最常见的、生长快速的原发恶性骨肿瘤。ADAM8 是 ADAMs 家族中的一员，白细胞分化抗原名为 CD156。ADAM8 表达异常在一些疾病中具有显著的生理学意义，例如一些炎症性疾病、肿瘤细胞基质的重塑、哮喘、脑损伤、骨质破坏、神经退行性病变等。许多学者发现不同类型的癌症肿瘤中 ADAM8 表达上调。ADAM8 在类风湿性关节炎的软骨破坏中发挥作用，可能是通过促使破骨细胞成熟或是水解软骨基质蛋白来破坏关节软骨。关于 ADAM8 在骨肉瘤、良性骨肿瘤、骨组织中的表达情况，相关文献并不多。本课题的前期研究^[5-6]，分析了 69 例骨肉瘤患者组织标本中 ADAM8 的表达上调与骨肉瘤患者的预后及转移情况有关。本研究通过检测 42 例成骨细胞型骨肉瘤组织标本、22 例骨软骨瘤组织标本和 29 例正常骨组织标本及 35 例骨性关节炎组织标本中 ADAM8 的表达情况。发现骨性关节炎组织中 ADAM8 表达明显高于正常骨组织，差异具有统计意义，结合相关参考文献推测 ADAM8 在关节软骨炎性病变中发挥功能，具有破坏关节软骨功能；骨破坏作用可能与 ADAM8 促进破骨细胞成熟有关。本研究发现骨肉瘤中 ADAM8 表达水平明显高于骨软骨瘤和正常骨组织，且差异具有统计学意义($P<0.05$)，而骨软骨瘤和正常骨组织之间的差别无统计学意义($P>0.05$)，提示 ADAM8 可能是骨肉瘤发展过程中的影响因素之一，其破坏关节软骨及促进破骨细胞成熟的功能可能在骨肉瘤中同样发挥作用^[7]。

表皮生长因子受体是 ErbB 受体家族中的一种。EGFR 是原癌基因 c-erbB-1 的表达产物，属 1 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体。EGFR 在上皮组织、间质、神经源性组织、血管组织中都有表达，目前研究表明 EGFR 的过表达在恶性肿瘤的演进中其重要作用，如神经胶质细胞瘤^[8]、胆管癌、结肠癌、癌等组织中都有 EGFR 的表达上调。EGFR 已成为目前抗肿瘤分子靶向研究中关注最为广泛、研究最为深入、最有前途的治疗靶点之一^[9-10]。本实验检测 42 例成骨细胞型骨肉瘤组织标本、22 例骨软骨瘤组织标本、21 例正常骨组织和 25 例骨性关节炎组织中 EGFR 的表达情

况。发现骨性关节炎组织中 EGFR 的表达水平高于正常骨组织，差异同样有统计学意义，提示 EGFR 可能参与关节软骨的破坏，但目前尚无相关报道 EGFR 在关节软骨破坏中是否有调节作用，在今后的研究中可增加标本数量或在动物试验中进一步研究。本研究发现骨肉瘤中 EGFR 表达水平明显高于骨软骨瘤和正常骨组织，且差异具有统计学意义，而骨软骨瘤和正常骨组织之间的差异无统计学意义，实验结果与相关文献报道结构一致，提示骨肉瘤的发展中 EGFR 与 ADAM8 一样可能是调节因素之一^[11]。

推测 ADAM8 促进破骨细胞成熟及破坏关节软骨的功能可能是骨肉瘤组织周围骨质破坏的原因之一。骨肉瘤增殖和侵袭的机制之一可能是通过 ADAM8 胞外功能区的脱落，影响 EGFR 与其配体的结合，从而激活 EGFR 介导的信号转导通路实现的。

本研究不足方面是对研究的 2 个因子仅仅从形态学方面进行了研究和分析，并未研究其在骨肉瘤中不同的组织学亚型中表达是否具有差异。在今后的研究中可从骨肉瘤细胞系观察中 ADAM8 与 EGFR 的表达情况，并在此基础上加入激动剂和(或)拮抗剂，以进一步研究两者之间的表达机制及其相关性。还可以应用基因技术利用体外化学合成 siRNA 和构建质粒载体的方法沉默骨肉瘤细胞 ADAM8 和 EGFR 基因的表达，从而阻断 ADAM8 和 EGFR 所介导的恶性生物学行为，从而为骨肉瘤的基因治疗提供新策略。

4 结 论

关于骨肉瘤组织中 ADAM8 和 EGFR 联合表达情况目前尚无相关报道，本研究通过组织芯片结合免疫组化技术对 42 例成骨细胞型骨肉瘤组织中 ADAM8 和 EGFR 的表达情况进行分析，通过统计学计算发现骨肉瘤组织中 ADAM8 和 EGFR 表达具有相关性。

参考文献

[1] YAO Y,DONG Y,LIN F,et al. The expression of CRMI is associated with prognosis in human osteosarcoma[J]. Oncol Rep,2009,21(1):229-235.

[2] JAFFE N. Adjuvant chemotherapy in osteosarcoma: an odyssey of rejection and vindication[J]. Cancer Treat Res,2009,152(152):219.

[3] DIJKSTRA A,POSTMA D S,NOORDHOEK J A,et al. Expression of ADAMs ("a disintegrin and metalloprotease")in the human lung[J]. Virchows Arch,2009,454(4):441-449.

[4] HERNANDEZ I,MORENO J L,ZANDUETA C,et al. Novel alternatively spliced ADAM8 isoforms contribute to the aggressive bone metastatic phenotype of lung cancer[J]. Oncogene,2010,29(26):3758-3769.

(下转第 1816 页)

对照组,与李桂梅等^[18]报道基本相似。

4 结 论

桂枝茯苓胶囊联合米非司酮有助于改善异位妊娠临床症状,提高治疗效果,可能与调节血清激素水平、抑制炎症因子释放等因素有关。本文研究的局限性在于缺乏对激素水平、炎症因子的动态观察,且未对不良反应进行比较,有待于今后扩大样本进行多中心前瞻性研究去求证。

参考文献

[1] DEBNATH J, GULATI S K, MATHUR A, et al. Spectrum of sonographic findings and our experience in a tertiary care service hospital of India[J]. J Obstet Gynaecol India, 2013, 63(6): 388-393.

[2] 张欢欢, 付衡, 王慧. 甲氨蝶呤联合米非司酮不同给药方式治疗异位妊娠患者临床研究[J]. 中国性科学, 2016, 25(10): 127-130.

[3] GOMEZ GARCIA M T, RUIZ SANCHEZ E, et al. Caesarean scar ectopic pregnancy successfully treated with methotrexate and mifepristone[J]. J Obstet Gynaecol, 2015, 35(1): 105-106.

[4] 陈燕娥, 闫雪, 钟业超, 等. 米非司酮联合桂枝茯苓对子宫肌瘤的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(15): 1374-1377.

[5] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 2847.

[6] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 109.

[7] 张雪梅, 王松涛, 刘玲, 等. 阴道超声下子宫内膜厚度联合β绒毛膜促性腺在早期鉴别诊断异位妊娠中的应用价值[J]. 中国医药, 2016, 11(8): 1240-1243.

[8] KALAMPOKAS E, BOUTAS I, PANOULIS K, et al. Novel medical therapy of cesarean scar pregnancy with a viable embryo combining multidose methotrexate and mifepristone: a case report[J]. Medicine, 2015, 94(41): e1679.

[9] OHANNESSIAN A, LOUNDOU A, COURBIERE B, et

al. Ovarian responsiveness in women receiving fertility treatment after methotrexate for ectopic pregnancy: a systematic review and meta-analysis[J]. Hum Reprod, 2014, 29(9): 1949-1956.

[10] 韦艳萍, 潘秀丽, 余秋平, 等. 桂枝茯苓胶囊联合米非司酮和甲氨蝶呤治疗输卵管异位妊娠的疗效观察[J]. 北方药学, 2016, 13(5): 65-66.

[11] 陈彩琴. 宫外孕Ⅱ号方联合西药治疗异位妊娠疗效及对血清 LH、FSH 和 E2 水平的影响[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(6): 793-795.

[12] 衡晴晴, 曹亮, 李娜, 等. 桂枝茯苓胶囊及其活性成分组合物抗大鼠子宫肌瘤作用研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2206-2209.

[13] 张立新, 古月娟. 桂枝茯苓汤加味联合米非司酮保守治疗异位妊娠临床观察[J]. 西部中医药, 2013, 26(2): 93-95.

[14] SHAO R, FENG Y, ZOU S, et al. Quantitative analysis of hormones and inflammatory cytokines in Chlamydia trachomatis-infected women with tubal ectopic pregnancy and early intrauterine pregnancy[J]. Data Brief, 2015, 6(2): 135-142.

[15] LI H W, LIAO S B, CHIU P C, et al. Effects of adrenomedullin on the expression of inflammatory cytokines and chemokines in oviducts from women with tubal ectopic pregnancy: an in-vitro experimental study[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2015, 13(2): 120.

[16] 吴修红, 何录文, 朴成玉, 等. 桂枝茯苓丸对子宫内膜异位大鼠血清 IL-2 及 IL-8 的影响[J]. 中药材, 2014, 37(6): 1036-1039.

[17] 崔明华, 李龙珠, 刘家军, 等. 桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症模型大鼠血管内皮生长因子的影响[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(9): 1023-1026.

[18] 李桂梅, 庄婵娟, 吴美红. 桂枝茯苓胶囊对异位妊娠患者 CA125、TNF-和 IL-8 水平的影响[J]. 中国中医药科技, 2016, 23(1): 19-21.

(收稿日期: 2018-01-03 修回日期: 2018-03-26)

(上接第 1812)

[5] LI Z H, LIAO Q D, WU Y C, et al. Upregulation of a disintegrin and metalloprotease 8 influences tumor metastasis and prognosis in patients with osteosarcoma[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(3): 657-661.

[6] ISHIZUKA H, GARCA-PALACIOS V, LU G, et al. ADAM8 enhances osteoclast precursor fusion and osteoclast formation in vitro and in vivo[J]. J Bone Miner Res, 2012, 26(1): 169-181.

[7] 王建澍, 移志刚, 蒲彦川, 等. ERK5 和 MMP-9 在骨肉瘤中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(14): 689-694.

[8] 孟雪梅, 于世风, 陆敏, 等. 巨噬细胞炎症蛋白 1-a、解整合

素样-金属蛋白酶 8、12 和 CD68 蛋白在颌骨巨细胞病变及长骨骨巨细胞瘤中的表达[J]. 中华病理学杂志, 2005, 34(7): 393-396.

[9] 李莹, 任翠萍, 程敬亮, 等. 低度和高度恶性原发性骨肉瘤患者磁共振 DWI、MRS、DCE 检查结果对比分析[J]. 山东医药, 2017, 57(23): 80-83.

[10] 肖鑫, 王臻, 许骋, 等. 基于高通量测序技术的骨肉瘤基因研究与个体化治疗[J]. 中华骨科杂志, 2014, 34(4): 466-471.

[11] 黄振华, 张甫婷, 邓琼, 等. 非经典型高级别骨肉瘤 60 例临床分析[J]. 广东医学, 2017, 38(16): 2506-2510.

(收稿日期: 2018-01-12 修回日期: 2018-03-27)