

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.19.011

人骨肉瘤中肾上腺髓质素和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达及相关性研究支力强¹, 马巍^{1△}, 王维华², 王小平³

(1. 西安交通大学医学院第一附属医院骨科, 西安 710061; 2. 西安交通大学医学院流行病与卫生统计教研室, 西安 710061; 3. 陕西中医学院分子病理学研究室, 西安 712046)

摘要:目的 研究肾上腺髓质素(ADM)和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在人骨肉瘤组织的不同临床分期、病理分级及组织学分型中的表达情况,并探讨二者之间的关系。方法 应用免疫组化 SABC 法和图像分析技术的方法检测 30 例骨肉瘤组织中 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的阳性率、强度和平均光密度(ALD)。每张切片分别由两名病理医师在未知临床和病理资料的情况下独立观察切片,随机观察(至少 5 个具有代表性的高倍视野,计数 100 个细胞)判定肿瘤分期、分级及细胞染色程度。结果 ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的阳性率和表达强弱均随着骨肉瘤分期增加而上调($P<0.05$),并在各期之间的差异有统计学意义($P<0.05$)。ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平呈正相关。结论 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在骨肉瘤中的表达强弱与骨肉瘤的恶性程度密切相关,且二者的表达变化呈正相关。

关键词:肾上腺髓质素;整合素 $\alpha_v\beta_3$;人骨肉瘤

中图分类号:R390.11

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)19-2428-04

Study on expression and relationship between adrenomedullin and integrin $\alpha_v\beta_3$ in human osteosarcomaZhi Liqiang¹, Ma Wei^{1△}, Wang Weihua², Wang Xiaoping³

(1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Medical School Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Faculty of Epidemiology and Statistics of Medical School in Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 3. Institute of Molecular Pathology of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 712046, China)

Abstract: Objective To study the expression and relationship between adrenomedullin (ADM) and integrin $\alpha_v\beta_3$ in different pathological grades, clinical stages and histologic subtypes of human osteosarcoma. **Methods** The expression positive rate, intensity, the average optical density (ALD) of ADM and integrin $\alpha_v\beta_3$ in 30 osteosarcoma cases was detected with immunohistochemical SABC technique and image analysis system. Each pathological section observed by two pathologists respectively in the case of unknown clinical and pathological information. At least five representative high field of vision counting 100 cells observed at random, in this way the degree of tumor grade, stage and cell staining were determined by two pathologist who unknown clinical and pathological data. **Results** The positive rate and intensity of ADM and integrin $\alpha_v\beta_3$ were significantly increased with the increase of osteosarcoma stage ($P<0.05$) and the difference was significant in each stage ($P<0.05$). The expression of ADM was positive correlated with the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$. **Conclusion** The expression of ADM and integrin $\alpha_v\beta_3$ in different clinicopathological grades osteosarcoma are positive associated with malignant degree of tumor, which suggest that both of them play an important role in malignant biological behaviors of human osteosarcoma.

Key words: adrenomedullin; integrin $\alpha_v\beta_3$; osteosarcoma

骨肉瘤作为最常见的恶性成骨性肿瘤之一,高发于 10~14 岁的青少年,发病率在原发的儿童和青少年性恶性骨肿瘤中排第 1 位。具有高转移活性,恶性程度极高,主要通过血行转移到其他组织和器官。以往研究显示,肾上腺髓质素(ADM)和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤中表达异常,且其表达强度与肿瘤恶性程度有关,表明二者与肿瘤的恶性生物学行为有密切联系^[1-2]。而在人骨肉瘤中同时检测 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达,并分析二者与骨肉瘤临床病理因素之间关系的研究在国内外少见报道。为了阐述二者关系,对本院 30 例骨肉瘤患者肿瘤组织的石蜡标本中 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的水平进行了检测,并探讨二者之间的相关性及对骨肉瘤患者治疗和预后的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 取西安交通大学医学院第一、二附属医院自 2006 年 6 月至 2013 年 6 月经临床、病理、X 线片确诊为骨肉瘤的患者 30 例,入院时所有患者均未接受正规化疗,为准确诊断,所有患者的活检检查均于放化疗之前进行。以 2010 年美

国癌症联合委员会(ACJJ)对于骨肉瘤 GTM 分期法为标准对病例进行分期^[3],因 GTM 分期对于肿瘤分级(G)的判定没有明确的评判标准,故参考联邦法国癌症中心(FNCLCC)关于骨与关节肿瘤分级方法中骨肿瘤分级(G)的标准作为 ACJJ 法中分级(G)的补充,即按:G_x、G₁=1 级, G₂=2 级, G_{3,4}=3 级^[4]。再以 Dahlin's 组织学分型为骨肉瘤的分型标准。其中男 18 例,女 12 例;年龄 8~47 岁,平均(18.42±9.10 岁)。股骨下段肿瘤 13 例,胫骨上段 10 例,其他部位 7 例。就诊时未发生转移者 28 例,已发生转移者 2 例;其中 II a 期 6 例, II b 期 11 例, III 期 11 例, IV 期 2 例。骨肉母细胞型 15 例,软骨母细胞型 5 例,纤维母细胞型 2 例,其他类型 8 例。

1.2 方法 应用免疫组化 SABC 法和图像分析技术的方法检测 30 例骨肉瘤组织中 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的阳性率、表达强度和平均光密度(ALD)。所有骨肉瘤标本均经 4%多聚甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋后,行 4 mm 厚连续切片。先从各组中取一张行 HE 染色确诊后,其余切片再行免疫组化法检

测。使用的两种抗体分别为:兔抗人 ADM 单克隆抗体(稀释度为 1:250,ABCAM 公司)、鼠抗人整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单克隆抗体(稀释度为 1:300,ABCAM 公司)。SABC 免疫组化试剂盒及其他试剂均购于北京中杉公司。操作步骤按试剂盒说明书进行检测,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为空白对照。

1.3 判定标准 每张切片分别由两名病理医师在未知临床和病理资料的情况下独立观察切片,随机观察(至少 5 个具有代表性的高倍视野,计数 100 个细胞),判定肿瘤分期、分级及细胞染色程度。根据染色程度及染色细胞百分率进行分析评分:(1)基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色适中者为 2 分,着色深者为 3 分;(2)着色细胞占计数细胞百分率, $\leq 5\%$ 为 0 分, $>5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $>25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\%$ 为 3 分。再将每张切片着色程度得分与着色细胞百分率得分相加,为其最后得分:0~1 分为阴性(-); $>1 \sim 4$ 分弱阳性(+); $>4 \sim 6$ 分中阳性(++); >6 分为强阳性(+++)。在每张切片的高倍视野($\times 400$)下随机选取 5 个不同视野,将所见视野输入计算机,经全自动医学彩色图像分析系统析处理,得到 5 个视野的 ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的 ALD。ALD 值越大,

说明目的蛋白的表达水平越高。

1.4 统计学处理 所有的统计分析采用 SPSS18.0 进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数及百分率表示。计量资料多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 q 检验,计数资料多组间用 χ^2 检验进行分析,ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的关系采用 Spearman 秩相关分析。检验水准=0.05,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的阳性率 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的阳性率与骨肉瘤患者的性别、年龄、原发部位、FN-CLCC 肿瘤分级、GTM 分期及 Dahlin's 组织学分型之间差异无统计学意义($P>0.05$),而与肿瘤的体积大小、肿瘤是否转移差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在骨肉瘤组织中的表达 镜下观察 ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的阳性染色均呈棕黄色或棕褐色,二者染色主要定位于细胞膜和细胞质。ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达强弱与骨肉瘤不同分期之间差异有统计学意义($P<0.05$),其表达强度随着骨肉瘤分期的上升而逐渐增加。见图 1、2,表 2、3。

表 1 骨肉瘤患者一般资料(n)

项目	n	ADM		整合素 $\alpha_v\beta_3$		P_{ADM}	$P_{整合素}$
		阳性	阴性	阳性	阴性		
性别							
男	18	14	4	13	5	0.255	0.745
女	12	7	5	8	4		
年龄							
<20 岁	20	15	5	13	7	0.770	0.784
≥ 20 岁	10	7	3	7	3		
肿瘤体积							
<8 cm	16	10	6	11	5	0.019	0.029
≥ 8 cm	14	14	0	12	2		
Dahlin's 分型							
骨母细胞型	15	12	3	13	2	0.671	0.248
纤维母细胞型	2	1	1	1	1		
软骨母细胞型	5	3	2	3	2		
其他(小细胞型、上皮样型、骨旁骨肉瘤)	8	5	3	4	4		
FNCLCC 肿瘤分级							
1 级	0	0	0	0	0	0.642	0.732
2 级	8	6	2	5	3		
3 级	22	18	4	17	5		
GTM 分期							
Ⅱ A 期	6	4	2	3	3	0.503	0.423
Ⅱ B 期	11	8	3	8	3		
Ⅲ 期	11	10	1	9	2		
Ⅳ 期	2	2	0	2	0		
肿瘤原发部位							
股骨下段	13	9	4	10	3	0.839	0.896
胫骨上段	10	8	2	8	2		
其他部位(肱骨中段、腓骨中段、骨盆内)	7	5	2	6	1		
是否转移							
是	2	2	0	2	0	0.038	0.025
否	28	8	20	7	21		

表 2 ADM 表达强度与骨肉瘤分期的关系							
分期	阴性 (n)	弱阳性 (n)	中阳性 (n)	强阳性 (n)	阳性率 (%)	Z	P
Ⅱ a 期	2	2	2	0	66.67	16.278	0.001
Ⅱ b 期	3	2	3	3	72.73		
Ⅲ 期	1	0	3	7	90.90		
Ⅳ 期	0	0	0	2	100.00		

表 3 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达强度与骨肉瘤分期的关系							
分期	阴性 (n)	弱阳性 (n)	中阳性 (n)	强阳性 (n)	阳性率 (%)	Z	P
Ⅱ a 期	3	2	1	0	50.00	20.156	0.017
Ⅱ b 期	3	3	3	2	72.73		
Ⅲ 期	2	1	2	6	81.82		
Ⅳ 期	0	0	0	2	100.00		

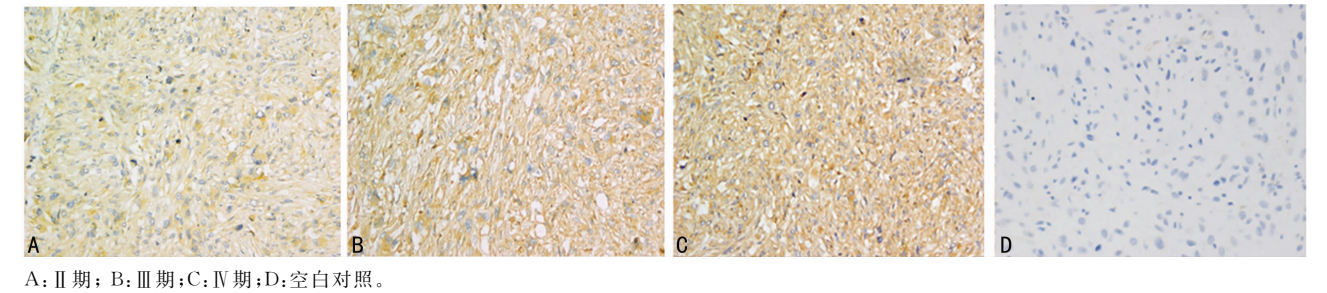


图 1 ADM 在不同分期骨肉瘤中的表达情况 (SABC 法, $\times 200$)

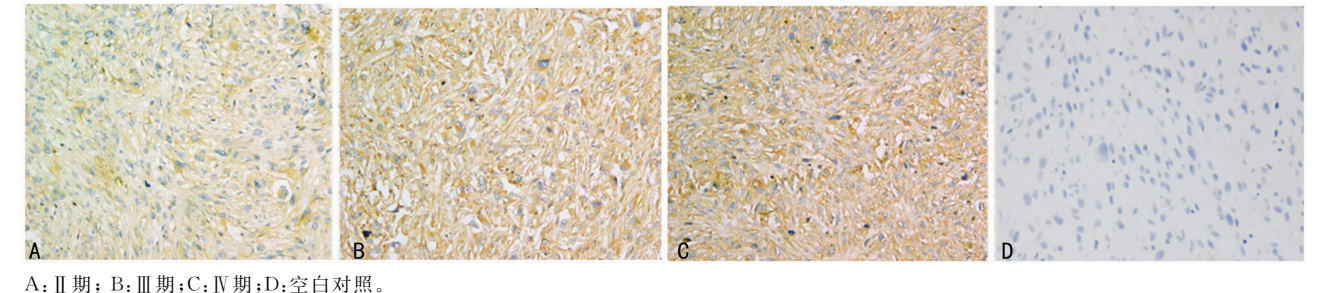


图 2 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在不同分期骨肉瘤中的表达情况 (SABC 法, $\times 200$)

2.3 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在骨肉瘤组织中 ALD 的表达 结果发现其 ALD 数值也随着肿瘤分期上升而逐渐增高,且在不同分期之间的差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在不同分期骨肉瘤组织中 ALD 表达($\bar{x}\pm s$)			
分期	n	ADM	整合素 $\alpha_v\beta_3$
Ⅱ a 期	6	0.038 13 $\pm$ 0.014 45	0.031 12 $\pm$ 0.015 32
Ⅱ b 期	11	0.060 21 $\pm$ 0.012 68	0.047 58 $\pm$ 0.016 22
Ⅲ 期	11	0.078 91 $\pm$ 0.024 38	0.062 35 $\pm$ 0.025 78
Ⅳ 期	2	0.096 02 $\pm$ 0.032 01	0.086 09 $\pm$ 0.021 90

2.4 ADM 与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的相关性 应用 Spearman 直线相关法计算两者在不同分期骨肉瘤组织中表达的相关性,求得相关系数为 $r=0.817, P<0.01$ 。二者的表达变化水平呈正相关关系。

3 讨 论

3.1 骨肉瘤的分期标准 骨与软组织肉瘤的种类繁多,治疗方式也与其病理类型密切相关,但真正影响治疗决策的则是肉瘤分期,它直接决定了是否应该进行放化疗或手术。Enneking 临床分期法虽然可以对骨肉瘤做出大概的分期,主要是用来评估患者群体的治疗效果,但对每个患者制订手术治疗方案的帮助并不大^[5]。而 2010 年制定的 AJCC 分期系统是依据肿瘤的组织学分级(G)、肿瘤大小(T)、淋巴结状态(N)和有无远处转移(M)进行分期的。其中,后三者的评判标准都非常明确,但

对于组织学分级的标准仍存在争议^[6-8]。而 FNCLCC 分级法则是依据肿瘤的分化程度、有丝分裂计数和肿瘤坏死程度对肿瘤进行量化地分级评定,是对 AJCC 法分级标准的量化和补充。本实验将两种标准结合在一起使用,可以从宏观和微观的角度判断骨肉瘤的分级和分期,有助于制定下一步的个体化治疗方案。

3.2 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与骨肉瘤的关系 侵袭和转移是骨肉瘤重要的恶性生物学行为之一,是一个极其复杂的过程,主要包括:原发癌肿瘤细胞的大量增殖、肿瘤血管生成、瘤细胞脱落并侵入基质、进入脉管系统和瘤细胞在转移组织、器官上的定位生长。这其中每一步都包含着多种细胞因子及多种细胞信号传导通路的复杂调节作用。ADM 可作为循环激素、旁分泌激素及自分泌激素参与体内多种生理、病理过程^[9]。且在多种肿瘤中高表达,表现出强大的抑制肿瘤细胞凋亡和参与新生血管形成的能力,能够促进肿瘤细胞增殖和血管生成,缓解肿瘤内部相对缺氧的环境,有利于肿瘤的局部浸润和转移^[10]。前期研究也发现,ADM 在骨肉瘤组织中的表达水平明显高于正常组织,且在患者血浆中的水平也明显高于健康人,尤其是转移组的血浆水平更是远高于未转移组^[11]。后来又发现 ADM 可以通过上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达而参与新生血管的生成,促进肿瘤发展,且沉默 ADM 基因后,VEGF 的表达降低,裸鼠的瘤体增殖也受到明显抑制。

而整合素 $\alpha_v\beta_3$ 作为肿瘤细胞上的一类受体,在正常骨组织中不表达或表达程度很低,但在骨肉瘤中表达明显,也随骨肉瘤恶性程度增加而增高^[12]。可与 I、Ⅳ型胶原、LM、FN、纤

维蛋白原等结合,增加瘤细胞的异质黏附力,参与细胞内外信息的传递过程,并在肿瘤的新生血管生成和转移中起了重要的作用^[13]。Lakshmikanthan 等^[14]在研究整合素与肿瘤血管之间关系时发现,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 可以通过多条途径最终激活 VEGF 信号通路来调控肿瘤血管的生成。Lorger 等^[15]也发现,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 可以与 VEGF 受体(VEGFR)发生交联,协同强化 VEGF 对其受体的激活作用,促进血管的生成,从而促进肿瘤的侵袭转移。因此,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 被认为是在肿瘤中新血管中一种重要而独立的预后标志。

本实验通过联合采用免疫组化 SABC 法和测定蛋白 ALD 的方法,发现了骨肉瘤组织中 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达与患者的性别、年龄、原发部位、GTM 分期、FNCLCC 肿瘤分级及组织学分型之间差异无统计学意义($P>0.05$),但与肿瘤的体积大小和肿瘤是否转移有关联。还证明了 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的表达强弱随着骨肉瘤分期的上升逐渐增加,在不同的分期之间差异均有统计学意义($P<0.05$),且二者在不同分期骨肉瘤组织中的表达水平呈正相关。这可能是由于 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 都在肿瘤新生血管的过程中发挥着作用。分析其机制可能是:肿瘤细胞旺盛的增殖能力导致了肿瘤体积地快速增大,而仅靠其渗透作用而来的营养无法满足自身需要,故需要形成大量的新生血管对肿瘤进行营养支持,此外肿瘤细胞还不断分泌各种促进血管生成的细胞因子,如 ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 来缓解这种相对缺氧的状态。目前已证实,ADM 可抑制细胞的凋亡及促进肿瘤新生血管的产生^[10,16];整合素 $\alpha_v\beta_3$ 可参与新生的肿瘤血管内皮细胞的迁移、黏附并形成管形,同时也为肿瘤转移的提供了新通道^[17]。

综上所述,ADM 和整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤的发展过程中均发挥着重要作用,且二者在肿瘤新生血管功能上有着相似的表现,提示二者之间可能存在协同促进作用,共同影响着肿瘤发生和发展。这也为联合检测骨肉瘤中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与 ADM 的表达以预测骨肉瘤转移潜能及预后的研究提供了研究方向;对研究 ADM 和整合素在骨肉瘤中的作用机制及其相互关系,以及对进一步揭示骨肉瘤的转移机理有着重要理论价值。

参考文献:

- [1] 韩晓鹏. 肾上腺髓质素的研究进展[J]. 中山大学学报:医学科学版,2009(S4):275-279.
 - [2] 谢先木,王华毅,王虹. 结直肠癌中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达的意义及其评估预后的价值[J]. 广东医学,2012,30(6):817-819.
 - [3] Rice TW, Blackstone EH, Rusch VW. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: esophagus and esophagogastric junction[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(7): 1721-1724.
 - [4] 徐万鹏,李佛保. 骨与软组织肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008.
 - [5] 凌励立,过邦辅. 软组织肿瘤分期系统的近代概念及其评估[J]. 肿瘤,1999,20(6):319-322.
 - [6] Miwa S, Takeuchi A, Ikeda H, et al. Prognostic value of histological response to chemotherapy in osteosarcoma patients receiving tumor-bearing frozen autograft [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71362.
 - [7] Yuan D, Liu B, Liu K, et al. Overexpression of fibroblast activation protein and its clinical implications in patients with osteosarcoma[J]. J Surg Oncol, 2013, 108(3): 157-162.
 - [8] Gong L, Liu W, Sun X, et al. Histological and clinical characteristics of malignant giant cell tumor of bone[J]. Virchows Arch, 2012, 460(3): 327-334.
 - [9] 张晓霏,彭芝兰. 肾上腺髓质素与肿瘤血管生成的研究进展[J]. 中华妇幼临床医学杂志,2007,15(1):56-58.
 - [10] Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, et al. Adrenomedullin and tumour angiogenesis[J]. Brit J Cancer, 2005, 94(1): 1-7.
 - [11] Dai X, Ma W, He XJ, et al. Elevated expression of adrenomedullin is correlated with prognosis and disease severity in osteosarcoma[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 347.
 - [12] 曾恒,陈安民,李锋,等. 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 对体外骨肉瘤细胞增殖与侵袭力的影响[J]. 医药导报,2008,27(11):1292-1294.
 - [13] Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC. Integrins: masters and slaves of endocytic transport[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(12): 843-853.
 - [14] Lakshmikanthan S, Sobczak M, Chun C, et al. Rap1 promotes VEGFR2 activation and angiogenesis by a mechanism involving integrin $\alpha_v\beta_3$ [J]. Blood, 2011, 118(7): 2015-2026.
 - [15] Lorger M, Krueger JS, O'Neal M, et al. Activation of tumor cell integrin $\alpha_v\beta_3$ controls angiogenesis and metastatic growth in the brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(26): 10666-10671.
 - [16] Liu AG, Zhang XZ, Li FB, et al. RNA interference targeting adrenomedullin induces apoptosis and reduces the growth of human bladder urothelial cell carcinoma[J]. Med Oncol, 2013, 30(3): 616.
 - [17] Lonsdorf AS, Kramer BF, Fahrleitner M, et al. Engagement of $\alpha_v\beta_3$ (GPIIb/IIIa) with $\alpha_v\beta_3$ integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets: a connection to hematogenous metastasis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(3): 2168-2178.
- (收稿日期:2014-02-14 修回日期:2014-03-16)
-
- (上接第 2427 页)
- [11] 谢阳桂,于秀,张玉泉,等. 经阴道彩色多普勒超声对子宫内膜癌筛查及术前分期评估的作用[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(32): 2250-2250.
 - [12] 邓庆梅. 经阴道超声对 56 例宫腔病变鉴别诊断的临床价值[J]. 重庆医学, 2009, 38(7): 855-857.
 - [13] Jacobs I, Gentry-Maharaj A, Burnell M, et al. Sensitivity of transvaginal ultrasound screening for endometrial cancer in postmenopausal women: a case-control study within the UKCTOCS cohort[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(1): 38-48.
 - [14] 李丹,王平,张燕. 经阴道超声对子宫内膜病变的超声鉴别诊断价值[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(12): 1737-1738.
- (收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-03-27)