

去整合素金属蛋白酶 10(ADAM10)在喉癌组织中的表达和临床意义

庞宇峰^{1,2} 周 梁^{1Δ} 龚洪立¹ 田 洁¹ 龚静蓉²

(¹ 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院耳鼻咽喉科 上海 200031; ² 复旦大学附属上海市第五人民医院耳鼻咽喉科 上海 200240)

【摘要】 目的 研究去整合素金属蛋白酶 10 (a disintegrin and metalloprotease 10, ADAM10) 在喉癌中的表达及其临床意义。方法 采用实时荧光定量 RT-PCR 法 ($n = 21$) 与组织芯片免疫组化法 ($n = 62$) 检测 ADAM10 在喉癌组织与正常黏膜组织中的表达情况, 并分析其差异。结果 实时荧光定量 RT-PCR 结果显示喉癌组织中 ADAM10 表达显著高于正常黏膜组织中的表达 ($P < 0.001$), 其倍数为 2.691 ± 1.568 。组织芯片结果显示 ADAM10 在喉癌组织中阳性面积百分比为 15.243 ± 7.824 , 在正常黏膜组织中则为 1.887 ± 1.918 , 喉癌组织中 ADAM10 的表达量高于正常黏膜组织 ($P < 0.001$)。ADAM10 的表达与组织学分级相关, 与其他临床参数无关。结论 ADAM10 在喉癌组织中有高表达, 其表达与肿瘤组织学分级相关。

【关键词】 喉癌; 去整合素金属蛋白酶 10 (ADAM10); 实时荧光定量 RT-PCR; 组织芯片

【中图分类号】 R 767 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2013.01.009

Expression of a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) in laryngeal cancer and its clinical significance

PANG Yu-feng^{1,2}, ZHOU Liang^{1Δ}, GONG Hong-li¹, TIAN Jie¹, GONG Jing-rong²

(¹ Department of Otorhinolaryngology, Eye Ear Nose & Throat Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China;

² Department of Otorhinolaryngology, The Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China)

【Abstract】 **Objective** To study the expression of a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) in laryngeal cancer and its clinical significance. **Methods** The expressions of ADAM10 in the tissue of laryngeal cancer and laryngeal normal mucosa were detected with RT-PCR ($n = 21$) and tissue chip ($n = 62$). The differences of ADAM10 expressions between them were analyzed. **Results** Real-time RT-PCR and tissue chip results showed that the expression of ADAM10 in laryngeal cancer was significantly higher than that in laryngeal normal mucosa ($P < 0.001$), the expression times was 2.691 ± 1.568 . The expression of ADAM10 in pathological grading in laryngeal cancer tissue (15.243 ± 7.824) were significantly higher than those in normal mucosa tissue (1.887 ± 1.918 , $P < 0.01$). However, from the clinical data we found no correlation with staging, typing and metastasis of lymph nodes. **Conclusions** The overexpression of ADAM10 in laryngeal cancer suggests that ADAM10 correlates with the progress and prognosis of laryngeal cancer.

【Key words】 laryngeal neoplasm; a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10); real-time RT-PCR; tissue chip

喉癌是常见的头颈部恶性肿瘤,随着工业化的进程与环境的污染,近 40 年来喉癌的发病率有逐渐增多的趋势,但其病因与致病机制仍有待进一步探索,深入研究喉癌的发生发展与转移等机制对患者的诊断治疗及预后有着重要意义^[1]。去整合素金属蛋白酶家族(a disintegrin and metalloprotease 10, ADAMs)是一种近年来新发现的 I 型跨膜蛋白家族,因其包含的两个主要结构基质金属蛋白酶区域与去整合素区域而得名。对 ADAMs 的逐步研究揭示这些分子广泛参与了人体中诸如细胞黏附、融合、转移,膜蛋白脱落和蛋白水解等生物学事件。研究还发现 ADAMs 在许多恶性肿瘤中有所表达,并参与了癌症发生发展与转移的病理过程^[2],其中 ADAM10 被发现在口腔鳞癌等肿瘤中有高表达^[3],但在喉癌中的表达国内外尚无相关研究报道。本研究采用实时荧光定量 RT-PCR 与组织芯片免疫组化的方法,研究 ADAM10 在喉癌中的表达及其与喉癌发生发展的相关性。

材料和方法

标本收集 收集复旦大学附属眼耳鼻喉科医院头颈外科 2011 年 1 月至 2011 年 4 月的喉癌全喉切除术或部分喉切除术标本共 21 例。每例标本均取肿瘤组织及肿瘤周围 5cm 以上的喉部正常黏膜组织,所有标本离体后均在 10 min 内置于液氮内保存待提取 RNA。组织芯片所用标本收集于复旦大学附属眼耳鼻喉科医院头颈外科 2010 年 2 月至 2011 年 4 月的喉癌全喉切除术或部分喉切除术标本共 62 例。每例标本均取肿瘤组织及肿瘤周围 5 cm 以上的喉部正常黏膜组织,标本经 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋待制组织芯片。

主要试剂及仪器 RNA 提取试剂 Trizol(美国 Invitrogen 公司);PrimeScript RT 逆转录试剂盒,实时定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq(日本 TaKaRa 公司);兔抗人 ADAM10 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)。TMA600 型博南组织芯片微阵列点样仪(上海博南生物技术有限公司)。

实验方法

实时荧光定量 RT-PCR 引物的设计与合成:在 GenBank 中查询并结合 Primer Premier 6.0 软件设计 ADAM10 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,作为内参)的引物,合成引物序列。

ADAM10 的扩增产物长度为 166 bp,其上游引物 5'-GCTGATGAGAAG-GACCCTACAA-3',下游引物 5'-ATGCTCCAACCC-AAGCCAGAC-3'。总 RNA 的提取:取组织块 50 mg 用液氮在研钵中研磨成粉末,然后移入玻璃匀浆管中加入 1mL Trizol 抽打匀浆。然后按说明书步骤提取细胞内总 RNA。用紫外分光光度仪测定 RNA 样品浓度(D_{260}/D_{280} 为 1.8~2.0)。按照实时荧光定量 RT-PCR 的两步法步骤分别进行反转录和 PCR 扩增。PCR 的反应条件为:95℃变性 1 min,然后 95℃ 10 s,58℃ 20 s,72℃ 20 s,进行 45 个循环扩增。所有反应均设 3 个复孔,以 GAPDH 为内参照,记录每个反应管中荧光信号所达设定阈值时的循环数即 Ct 值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法,以 GAPDH 为内参,计算肿瘤组织及配对正常组织中 ADAM10 的相对表达量, $\Delta Ct = Ct(ADAM10) - Ct(GAPDH)$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{肿瘤组织}) - \Delta Ct(\text{正常组织})$ 。其中 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示肿瘤组织中 ADAM10 的表达量相对于癌旁正常黏膜组织中 ADAM10 表达量的倍数。

组织芯片法 制片:(1)将 62 例 10% 甲醛溶液固定的标本石蜡包埋,显微镜下确定目标区并定位。(2)用阵列仪在标本蜡块上打孔,钻取标本组织柱,每个组织柱直径 1.5 mm,按顺序移到受体蜡块上,精确排成微孔阵列。然后将制备好的微阵列蜡块放入温箱,调定温箱温度,在半融状态下取出。随即冷却并放入 4℃ 冰箱中保存备用。(3)最后对组织芯片蜡块连续切片。切片厚度 2 μm ,共切片 100 张。染色:一抗兔抗人 ADAM10 多克隆抗体稀释浓度 1:250。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。结果判定:对染色的芯片分别进行照相。用计算机软件分析组织芯片的每张图片中的阳性面积(area)和阳性面积百分比(area%)以进行定量比较。

统计学处理 所有数据均采用 Stata 9 软件处理,进行统计分析。其中数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,表达结果采用配对 *t* 检验,临床参数分析采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

实时荧光定量 RT-PCR 结果

ADAM10 mRNA 的表达 通过实时荧光定量 RT-PCR 方法检测,经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法分析,其中

肿瘤组织中与正常黏膜组织中 ADAM10 的 $-\Delta\Delta Ct$ 值见表 1,由此测定 ADAM10 mRNA 在 21 例喉癌肿瘤组织与正常黏膜组织中表达的倍数(表 1、图 1)。其相应的倍数为 2.691 ± 1.568 ,95% CI 为 1.978~3.405。对其倍数进行对数转换,然后进行配对 t 检验,差异有统计学意义($t = 5.633, P < 0.001$)。说明喉癌组织中 ADAM10 的表达量高于正常黏膜组织。

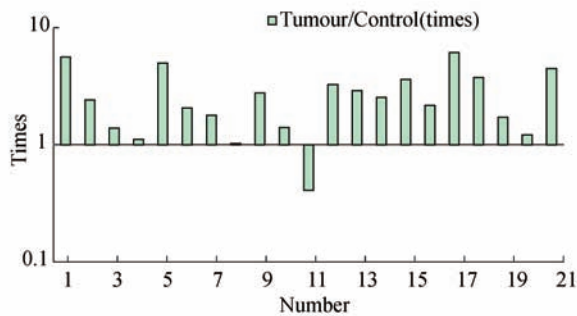


图 1 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 ADAM10 在肿瘤组织/对照正常组织中表达的倍数

Fig1 The times of ADAM10 expressed in tumor tissues and control tissues detected by real time RT-PCR

表 1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 ADAM10(肿瘤/癌旁)相对表达量
Tab 1 The times of ADAM10 expressed in tumor tissues and control tissues calculated by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method

Number	$-\Delta\Delta Ct$	ADAM10 (T/C)	Number	$-\Delta\Delta Ct$	ADAM10 (T/C)
1	2.48	5.58	12	1.70	3.25
2	1.27	2.41	13	1.53	2.89
3	0.47	1.38	14	1.33	2.53
4	0.15	1.11	15	1.85	3.61
5	2.32	4.97	16	1.11	2.16
6	1.03	2.05	17	2.61	6.11
7	0.83	1.78	18	1.90	3.72
8	0.03	1.03	19	0.77	1.71
9	1.47	2.76	20	0.28	1.21
10	0.49	1.40	21	2.15	4.45
11	-1.29	0.41			

$-\Delta\Delta Ct = -\{[Ct(\text{tumor tissues ADAM10}) - Ct(\text{tumor tissues GAPDH})] - [Ct(\text{control tissues ADAM10}) - Ct(\text{control tissues GAPDH})]\}$; ADAM10 (T/C): The times of adam10 expressing in tumor tissues and in control tissues.

实时荧光定量 RT-PCR 检测喉癌组织中 ADAM10 mRNA 的表达与临床病理特征的关系 ADAM10 在

喉癌组织中的表达在不同的病理组织学分级中有差异 ($P < 0.01$)。本次 21 组病例中有 5 例 I 级(高分化),16 例 II 级(中分化),没有 III 级(低分化)病例。喉癌肿瘤组织与正常黏膜组织中 ADAM10 表达的倍数 I 级明显低于 II 级,其中位表达值分别为 I 级 1.401、II 级 2.826。此外,ADAM10 在喉癌组织中的表达在不同 TNM 分组、临床分型、淋巴结转移与否等各组中均无明显统计学差异(表 2、图 2)。

表 2 ADAM10 表达与喉癌临床病理指标的关系
Tab 2 Relationship between the expression of ADAM10 in laryngeal cancer and clinical or pathology parameters

Parameters	Real-time RT-PCR			Tissue chip		
	n	T/C	P	n	area% difference	P
Pathology grade						
Grade I	5	1.401	0.007	10	5.89	0.004
Grade II	16	2.826		52	14.27	
Clinical stage						
Stage I	5	1.778	0.558	7	10.98	0.298
Stage II	8	2.826		19	13.32	
Stage III	6	2.479		23	15.44	
Stage IV	2	3.871		13	11.99	
Types						
Supraglottis	7	2.764	0.655	27	14.30	0.527
Glottis	14	2.231		32	12.23	
Subglottis				3	13.26	
Lymphatic metastasis						
No lymphatic metastasis	18	2.469	0.446	42	13.37	0.587
Lymphatic metastasis	3	2.163		20	13.01	

T/C: Using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method to calculate the times of adam10 which is expressing in tumor tissues and control tissues, and the value is the median; area% difference = the difference of positive area percentage in tumor tissues and control tissues, and the value is the median.

组织芯片结果

ADAM10 蛋白的表达 ADAM10 为跨膜蛋白,在人喉癌组织中主要表达于肿瘤细胞,阳性着色于细胞膜与胞质中,组织芯片照片见图 3。染色后对每对肿瘤组织与正常黏膜组织中阳性细胞面积百分比(area%)进行定量比较,比较其area%差值。经 Stata 软件计算,ADAM10 在喉癌组织中 area %

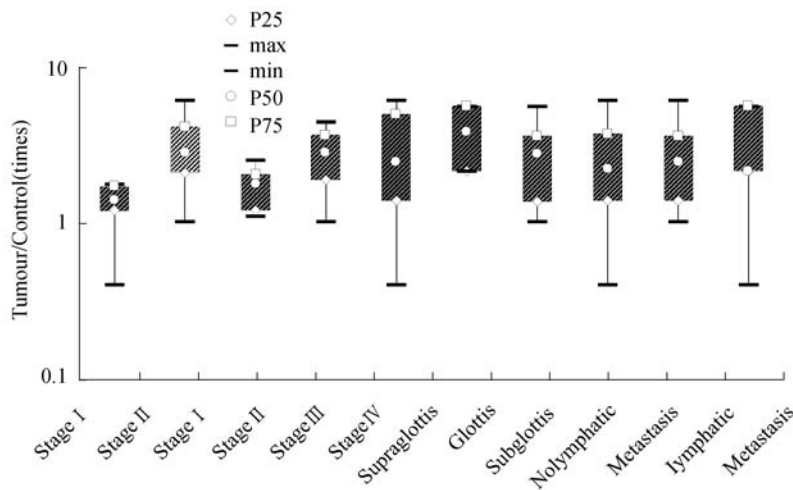


图 2 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 ADAM10 在肿瘤组织中与正常黏膜组织中表达倍数的临床分类比较
 Fig 2 The times of ADAM10 expressed in tumor tissues and control tissues detected by real time RT-PCR, and showed by/as the clinical stage and the pathology grades

Tumour/control(times);the times of adam10 expressing in tumor tissues and in control tissues;P25;First Quartile;P50;Second Quartile;P75; Third Quartile;min;minimun;max;maximum.

为 15.243 ± 7.824 , ADAM10 在正常黏膜组织中 area% 为 1.887 ± 1.918 , 两者差值为 13.356 ± 8.430 , 95%CI 为 $11.215 \sim 15.497$ 。进行配对 *t* 检

验, 差异有统计学意义 ($t = 12.474, P < 0.001$)。说明组织芯片检测喉癌组织中 ADAM10 的表达量高于正常黏膜组织(图 3、4)。

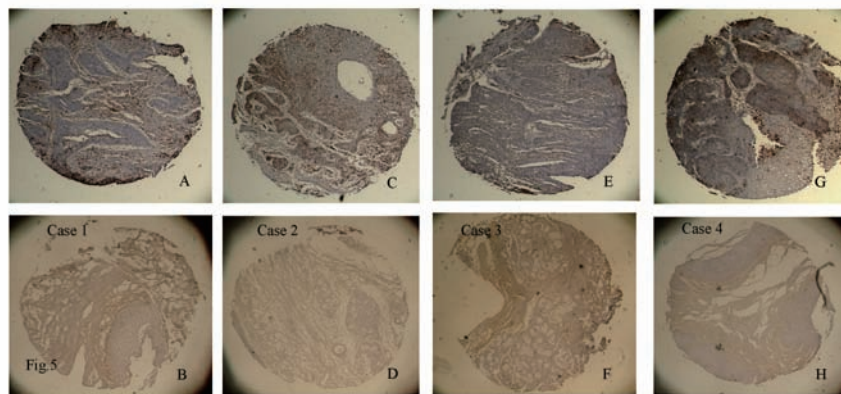


图 3 ADAM10 蛋白在喉癌组织中(A、C、E、G)与正常黏膜组织中(B、D、F、H)的表达 (×200)

Fig 3 The photos of ADAM10 expressed in tumor tissues(A,C,E,G) and control tissues (B,D,F,H) (×200)

The area% data of the cases are recorded as follows;Case 1,A:17.95%,B:0.84%;Case 2,C:41.19%,D:0.56%;Case 3,E:29.29%,F:10.8%;Case 4,G:29.28%,H:1.59%.

组织芯片检测喉癌组织中 ADAM10 蛋白的表达与临床病理特征的关系 与实时荧光定量 RT-PCR 结果类似, ADAM10 蛋白在喉癌组织中的表达在不同的病理组织学分级中有差异 ($P < 0.01$)。本次 62 组病例中有 10 例 I 级(高分化), 52 例 II 级(中分化), 没有 III 级(低分化)病例。喉

癌肿瘤组织与正常黏膜组织中 ADAM10 表达的 area% 差值 I 级明显低于 II 级, 其中位表达值分别为 I 级 5.885、II 级 14.265。此外, ADAM10 在喉癌组织中的表达在不同 TNM 分组、临床分型、淋巴结转移与否等各组中均无明显统计学差异(表 2、图 5)。

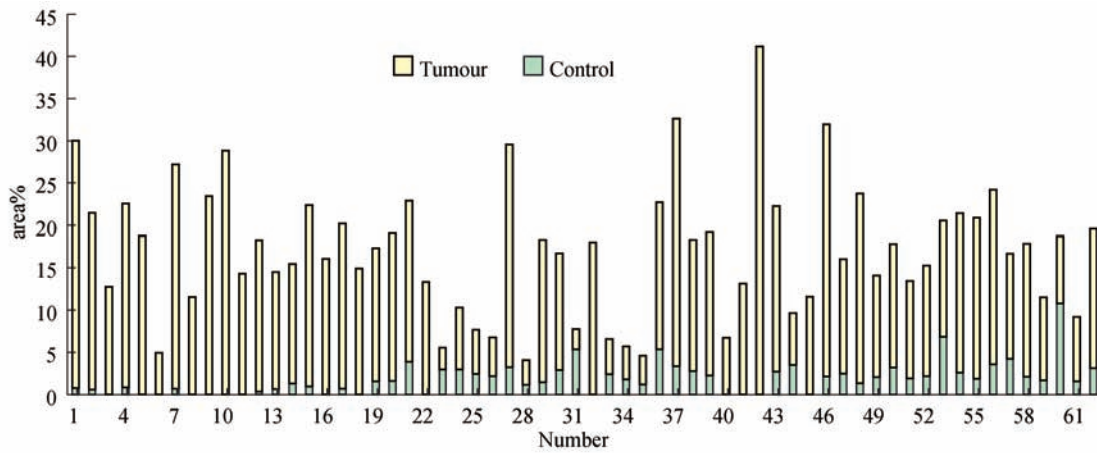


图4 组织芯片检测肿瘤组织与正常黏膜组织中 ADAM10 的表达

Fig 4 The difference of ADAM10 expressed in tumor tissues and control tissues detected by tissue chip

area% = positive area percentage.

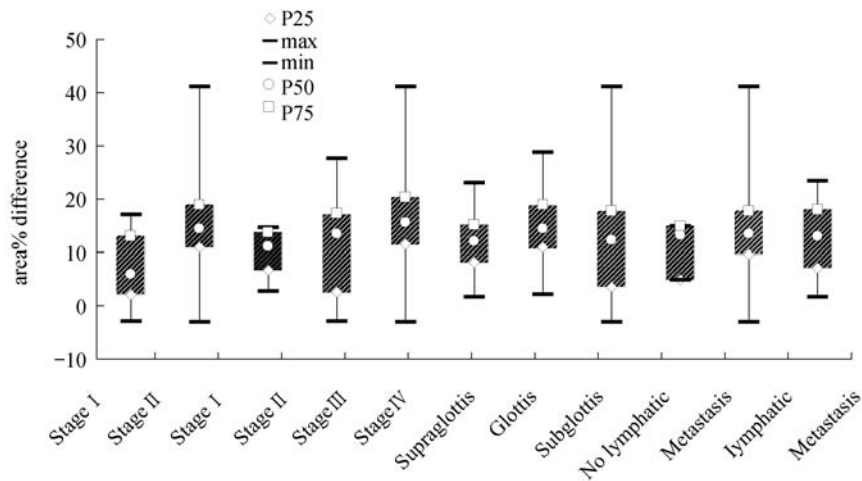


图5 组织芯片检测 ADAM10 在肿瘤组织与正常黏膜组织中表达差值比较的临床分析

Fig 5 The difference of ADAM10 expressed in tumor tissues and control tissues detected by tissue chip, and showed by Clinical stages and pathology grades

area% difference; the difference of positive area percentage in tumor tissues and control tissues; P25: First Quartile; P50: Second Quartile; P75: Third Quartile; min; minimum; max; maximum.

讨 论

1989年科学家在牛髓鞘碱性蛋白水解酶研究中发现了ADAM10,因发现其具有与ADAMs家族相似的结构与功能,故命名之^[2]。目前将ADAM家族成员分为两组:跨膜型ADAM和分泌型ADAMTS(带凝血酶敏感蛋白模体的ADAM)。ADAM家族成员多含有共同的前肽段,由金属蛋白酶区域、去整合素区域、表皮生长因子样区域、跨膜

区和细胞质区域组成^[4]。近年,ADAMs家族引起了科学家的广泛关注,它们的功能不断得到研究。ADAMs是一种有多个功能区域的蛋白,不同的功能区域各司其职。它不仅参与其他膜蛋白的蛋白水解过程,同时也参与了细胞黏附与细胞信号传导。ADAMs的金属蛋白酶区域的功能如同一把“剪刀”,能特异地剪切许多膜蛋白酶底物。诸如许多生长因子如表皮生长因子、转化生长因子 α 、肝素结合表皮生长因子以及细胞因子如肿瘤坏死因子 α 等,所有这些蛋白在合成时需要从相应的前体一步

步水解才能转化为不同的生物功能结构。许多研究显示 ADAMs 广泛参与这些蛋白的水解,同时包括许多受体(如肿瘤坏死因子 α 受体 I、II, CD44, L-选择素和 Erb4/HER4 等)在细胞膜表面的胞外脱落也有赖于 ADAMs 的剪切作用。通过这一过程, ADAMs 广泛参与细胞的信号传导,从而影响肿瘤的发生发展^[2]。ADAMs 的另一个功能是作为整合素的配体与基质蛋白竞争。另外, ADAMs 的富半胱氨酸域可以通过形成如多配体聚糖和纤维连接蛋白而达到细胞黏附功能^[5]。

许多研究已经证明 ADAMs 参与了肿瘤的发生与增值,而 ADAM10 也被发现在许多肿瘤细胞和肿瘤组织中有高表达^[2]。近年的研究证实 ADAM10 的过表达能促进口腔鳞状细胞癌和胃癌的生长,同样发现通过干扰 ADAM10 使之表达下调可使肿瘤细胞减缓增殖,所以 ADAM10 被认为是肿瘤治疗的新的潜在靶点^[2-3]。本研究通过实时荧光定量 RT-PCR 与组织芯片的方法,分别从基因与蛋白的层面检测了 ADAM10 在喉癌中的表达情况。研究表明喉癌组织中 ADAM10 mRNA 与 ADAM10 蛋白较正常黏膜组织的表达量均有上升 ($P < 0.001$),提示 ADAM10 参与了喉癌的病理进展。这与 ADAM10 在胃癌、卵巢癌、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌等不同组织中的表达状况基本相同^[6-9]。通过临床参数的分析发现,RT-PCR 与组织芯片方法均提示 ADAM10 的表达与喉癌组织学分级明显相关 ($P < 0.01$)。虽然本次研究未有组织学分级 III 级的病例,影响了实验结果的完整性,但仍能提示 ADAM10 的表达与肿瘤的分化程度相关,其表达随肿瘤的恶性程度增加而上调。这也同 Ko 等^[3]在口腔鳞癌中检测 ADAM10 的表达结果一致。另据文献报道 ADAM10 可通过释放激活 L1 细胞黏附分子(L1-CAM)来加强卵巢和子宫肿瘤细胞的转移能力。L1-CAM 是一种神经细胞黏附分子,在许多肿瘤细胞中也有表达,它可参与黑色素瘤、肺癌等肿瘤的转移与侵袭,而 ADAM10 被视作是这些细胞系主要的 L1 脱落酶,从而促进肿瘤的转移^[10-11]。本次研究中实时荧光定量 RT-PCR 与组织芯片方法均提示 ADAM10 的表达与 TNM 分期、是否淋巴结转移、肿瘤临床分型无明显相关。这一结果与文献不尽相同,所以关于 ADAM10 同肿瘤转移的关系还有待深入研究。

综上所述,本研究结果显示 ADAM10 在喉癌组织中有高表达,但本研究只是 ADAM10 与喉癌关系的初步探究,并未涉及其参与癌症发展的具体机制探索,有待于进一步研究明确。

参 考 文 献

- [1] 黄选兆,汪吉宝,孔维佳,等. 实用耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:488-489.
- [2] Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5):621-628.
- [3] Ko SY, Lin SC, Wong YK, et al. Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2007, 245(1-2):33-43.
- [4] Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(1):7-30.
- [5] Iba K, Albrechtsen R, Cilpin B, et al. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(5):1143-1156.
- [6] Yoshimura T, Tomita T, Dixon MF, et al. ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) messenger RNA expression in Helicobacter pylori-infected, normal, and neoplastic gastric mucosa[J]. *J Infect Dis*, 2002, 185(3):332-340.
- [7] Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, et al. L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas[J]. *Lancet*, 2003, 362(9387):869-875.
- [8] Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers[J]. *J Cell Biol*, 2005, 68(4):633-642.
- [9] McCulloch DR, Akl P, Samaratunga H, et al. Expression of the disintegrin metalloprotease, ADAM-10, in prostate cancer and its regulation by dihydrotestosterone, insulin-like growth factor I, and epidermal growth factor in the prostate cancer cell model LNCaP[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1 Pt 1):314-323.
- [10] Gutwein P, Oleszewski M, Mechttersheimer S, et al. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(20):15490-15497.
- [11] Mechttersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, et al. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins[J]. *J Cell Biol*, 2001, 155(4):661-673.

(收稿日期:2012-05-04;编辑:王蔚)