

CXCR4 在大肠腺癌中的表达及临床意义

秦晓静 展晓红 时丽芳 郑淑芳

作者单位: 300162 天津市, 武装警察部队后勤学院附属医院病理科(秦晓静 时丽芳 郑淑芳)

266000 青岛市, 青岛市中心医院病理科(展晓红)

通讯作者: 郑淑芳, E-mail: zhengshf@126.com

【摘要】 目的 探讨趋化因子受体 4(C-X-C chemokine receptor 4, CXCR4)在大肠腺癌发生、发展、浸润转移中的作用及临床意义。**方法** 应用免疫组织化学(immunohistochemical, IHC)方法检测 60 例大肠腺癌患者及其 22 例患者的正常肠黏膜组织和 23 例大肠管状腺癌患者组织中 CXCR4 的蛋白表达情况;应用逆转录聚合酶链法(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测上述同期的 30 例大肠腺癌患者及其 15 例患者正常肠黏膜组织中 CXCR4 mRNA 的表达情况。**结果** IHC 方法检测结果显示大肠腺癌 CXCR4 蛋白表达较大肠管状腺癌、正常肠黏膜组织表达增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);大肠管状腺癌 CXCR4 蛋白表达较正常肠黏膜组织表达增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);RT-PCR 检测结果显示 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌组中的表达显著高于正常肠黏膜组,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。大肠腺癌组中 CXCR4 蛋白与 mRNA 的表达与癌组织的浸润深度、有无淋巴结转移有关(P 均 < 0.05),与患者的性别、年龄及癌组织的分化程度无关(P 均 > 0.05)。CXCR4 蛋白表达和 CXCR4 mRNA 表达呈正相关($r = 0.588, P < 0.01$)。**结论** CXCR4 在大肠腺癌的发生、发展、浸润转移中发挥着重要作用。

【关键词】 趋化因子受体-4;大肠腺癌;浸润;转移

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2012.02.004

The expression and clinical significance of CXCR4 in colorectal adenocarcinoma

QIN Xiao-jing, ZHAN Xiao-hong, SHI Li-fang, et al. ¹Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Logistical College of Chinese Armed Police Forces, Tianjin 300162, China ²Department of Pathology, the Central Hospital of Qingdao, Qingdao 266000, China

【Abstract】 Objective To evaluate the role and clinical significance of C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) in development, infiltration and metastasis of colorectal carcinoma. **Methods** The expressions of CXCR4 protein were detected by SP immunohistochemical(IHC) method in 60 cases of colorectal adenocarcinoma, 23 cases of colorectal adenoma and 22 cases of normal colorectal mucosa. The expressions of CXCR4 mRNA were detected by RT-PCR method in 30 cases of colorectal adenocarcinoma, 15 cases of normal colorectal mucosa. **Results** IHC results showed that the expressional quantity of CXCR4 protein in the colorectal adenocarcinoma was obviously higher than that in the colorectal canalicular adenoma and normal colorectal mucosa, and the differences all had statistical significance (P all < 0.05). The expressional quantity of CXCR4 protein in the colorectal canalicular adenoma was obviously higher than that in the normal colorectal mucosa, and the difference had statistical significance ($P < 0.01$). The results of RT-PCR showed that the expressional quantity of CXCR4 mRNA in the colorectal adenocarcinoma was obviously higher than that in the normal colorectal mucosa, and the difference had statistical significance ($P < 0.01$). The positive expressions of CXCR4 protein and mRNA were closely correlated with the depth of tumor infiltration and metastasis of lymph node (P all < 0.05), but they were not related to gender and age of patients and differentiation of cancer (P all > 0.05). There was positive correlation between the expression of CXCR4 and CXCR4 mRNA ($r = 0.588, P < 0.01$). **Conclusion** High expression of CXCR4 in colorectal adenocarcinoma may play an important role in tumorigenesis progression, infiltration and metastasis of colorectal adenocarcinoma.

【Key words】 C-X-C chemokine receptor 4; Colorectal adenocarcinoma; Invasion; Metastasis

大肠腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率居胃肠道恶性肿瘤的第二位,易较早发生转移及复发,这也是大肠腺癌治疗效果欠佳的主要原因,因此

研究大肠腺癌的生长和转移机制,发现与大肠腺癌发生、浸润、转移相关的标记物具有很重要的临床意义。趋化因子受体 4(C-X-C chemokine receptor 4,

CXCR4) 是基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor, SDF-1) 的受体, 在大肠腺癌浸润转移中的作用在文献中报道较少, 本实验应用免疫组织化学 (immunohistochemical, IHC) 方法和逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法检测 CXCR4 蛋白和 mRNA 在大肠腺癌、管状腺瘤和正常肠黏膜组织中的表达情况, 探讨其与大肠腺癌发生、发展及浸润转移的关系, 为大肠腺癌的早期发现、预后判断及寻找可能的治疗靶点提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 IHC 标本的收集 选取 60 例手术切除大肠腺癌患者的癌组织标本 (术前均未行放疗和化疗)。其中男性 35 例, 女性 25 例; 年龄 35~84 岁, 中位年龄 63 岁。同期选取其中 22 例患者的距癌组织 6 cm 以远的正常肠黏膜组织和 23 例内窥镜切除的大肠管状腺瘤患者的标本 (经病理切片证实无增生性及肿瘤性病变)。

1.2 RT-PCR 标本的收集 选择上述同期 30 例大肠腺癌患者手术切除后 30 min 内无污染的新鲜癌组织, 其中男性 15 例, 女性 15 例; 年龄 40~84 岁, 中位年龄 60 岁。同时留取 15 例患者的距癌组织 6 cm 以远的正常肠黏膜组织 (经病理切片证实无增生性及肿瘤性改变)。取材后立即置于 -180 °C 液氮中冷冻, 后迅速移至 -80 °C 低温冰箱内保存备用。所用刀片、EP 管等取材工具均经高温高压消毒、无 RNA 酶处理, 取材环境相对无污染。

1.3 方法

1.3.1 IHC 实验方法 采用 SP 两步法。CXCR4 一抗为兔抗人多克隆抗体 (美国 R&D 公司, 稀释度 1:50)。二抗选用 SP9001 (北京中山金桥生物技术有限公司)。实验中以 PBS 液代替一抗作为阴性对照, 以试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照同批次染色。

1.3.2 RT-PCR 实验方法 按 RNArose (上海华舜生物工程有限公司) 使用说明进行 RNA 提取, 按 RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 说明进行逆转录和 PCR 扩增。PCR 扩增引物 (上海生物工程有限公司) 如下: CXCR4 cDNA 引物序列 上游: 5'-TGGCCTTATCCTGGCTGCTAT-3', 下游: 5'-GGAGTCGATGCTGATCCCAAT-3', 扩增片段长度: 173 bp; 内参 GAPDH cDNA 引物序列 上游: 5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3', 下游: 5'-GGCATGGACTGTGCTCATGAG-3', 扩增片段长度:

145 bp。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。引物扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 结果判断

1.4.1 IHC 结果判断 CXCR4 蛋白阳性表达于细胞质, 呈黄色细颗粒状。阳性判断标准: 每张切片于肿瘤区域随机选取 10 个高倍镜视野 ($\times 400$, 避开大血管和神经组织), 每个视野按白细胞计数法计数 100 个细胞, 分别按着色强度和着色细胞数赋分并求其均值, 即按着色强度: 所计数细胞无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; 按阳性细胞所占百分比: $\leq 5\%$ 为 0 分, $6\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $\geq 76\%$ 为 4 分。两者积分相乘: 0 者为阴性 (-), ≥ 1 者为阳性, 其中 1~3 为弱阳性 (+), 4~7 为阳性 (++), 8~12 为强阳性 (+++)。

1.4.2 RT-PCR 结果判断 CXCR4 的 RT-PCR 产物 (mRNA) 凝胶电泳后经凝胶成像分析系统处理分别出现 173 bp 的泳动条带, 相应内参 GAPDH 出现 145 bp 的泳动条带。应用 Quantity One 灰度分析软件检测 CXCR4 及相应内参 GAPDH 电泳条带灰度值。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。IHC 方法的等级资料采用非参数统计秩和检验 (Mann-Whitney Test); RT-PCR 实验结果行独立样本 t 检验。相关性分析采用 Spearman 等级相关性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IHC 染色结果

2.1.1 不同组织中 CXCR4 蛋白的表达 60 例大肠腺癌患者及其 22 例患者正常肠黏膜和 23 例大肠管状腺瘤患者组织中, CXCR4 蛋白表达总体比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。其中大肠腺癌较大肠管状腺瘤、正常肠黏膜组织表达增高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.05); 大肠管状腺瘤较正常肠黏膜组织表达增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1、图 1。

2.1.2 大肠腺癌组织中 CXCR4 蛋白的表达与临床病理的关系 如表 2 所示, 60 例大肠腺癌患者组织中, CXCR4 蛋白的表达与患者的年龄、性别、肿瘤分化程度无关 (P 均 > 0.05), 但与癌组织浸润深度、淋巴结转移情况有关, 即 CXCR4 蛋白的表达在癌组织侵达浆膜组高于侵达黏膜下层和肌层组, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 两组比较差异有统计学意义

表 1 CXCR4 蛋白在不同组织中的表达

组别	例数	CXCR4				平均秩次	P 值
		-	+	++	+++		
大肠腺癌组(a)	60	1	24	23	12	65.00	0.047*
大肠管状腺瘤组(b)	23	5	8	8	2	51.09	0.001**
正常肠黏膜组织组(c)	22	13	9	0	0	22.27	0.000***
总 P 值				0.000			

注: *a 与 b 比较, **b 与 c 比较, ***a 与 c 比较

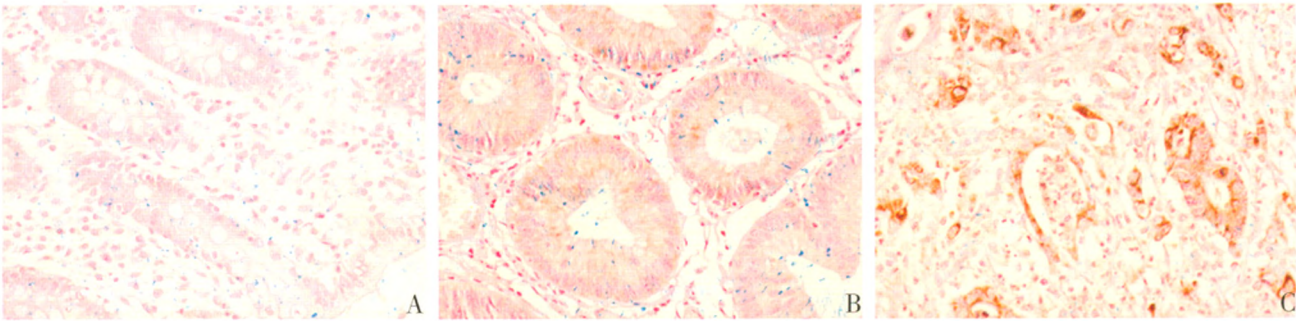


图 1 CXCR4 蛋白在不同组织中的表达(SP 法, 200×)

注: A: CXCR4 蛋白在正常肠黏膜组织中的表达; B: CXCR4 蛋白在大肠管状腺瘤组织中的表达; C: CXCR4 蛋白在大肠腺癌组织中的表达

表 2 CXCR4 蛋白在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系

临床病理 指标		例数	CXCR4				平均秩次	P 值
			-	+	++	+++		
性别	男	35	0	16	14	5	28.76	> 0.05
	女	25	1	8	9	7	32.94	
年龄	< 63	30	0	13	10	7	30.90	> 0.05
	≥ 63	30	1	11	13	5	30.10	
分化程度	高中分化	42	1	18	16	7	28.99	> 0.05
	低分化	18	0	6	7	5	34.03	
浸润深度	侵达黏膜下层和肌层	19	1	9	7	2	24.11	< 0.05
	侵达浆膜	41	1	11	16	13	33.46	
淋巴结转移	有	29	1	4	15	9	37.95	< 0.01
	无	31	0	20	8	3	23.53	

($P < 0.01$)。

2.2 RT-PCR 实验结果

2.2.1 CXCR4 mRNA 在不同组织中表达的比较如表 3 所示, 30 例大肠腺癌患者及其 15 例患者正常肠黏膜组织中, CXCR4 mRNA 的表达量分别为 0.854 ± 0.213 和 0.665 ± 0.155 , 两组比较差异有统计学意义 ($t = 3.044, P < 0.01$)。CXCR4 mRNA 在正常的肠黏膜和大肠腺癌组织中表达的电泳图见图 2。

表 3 CXCR4 mRNA 在不同组织中表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组织类型	例数	CXCR4 mRNA 表达量	t 值	P 值
大肠腺癌	30	0.854 ± 0.213	3.044	< 0.01
正常肠黏膜组织	15	0.665 ± 0.155		

2.2.2 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌中的表达与临床

病理的关系 如表 4 所示, 大肠腺癌中, CXCR4 mRNA 的表达与患者的性别、年龄、分化程度无关(P 均 > 0.05), 但与癌组织浸润深度、淋巴结转移情况有关, 即 CXCR4 mRNA 的表达在癌组织侵达浆膜组高于侵达黏膜下层和肌层组, 两组比较差异有统计学意义 ($t = -2.537, P < 0.05$); 在有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组, 两组比较差异有统计学意义 ($t = 6.383, P < 0.01$)。

2.3 CXCR4 蛋白和 mRNA 表达的相关性分析 如表 5 所示, 经 Spearman 等级相关性分析, CXCR4 蛋白表达和 CXCR4 mRNA 表达呈正相关 ($r = 0.588, P < 0.01$)。

3 讨论

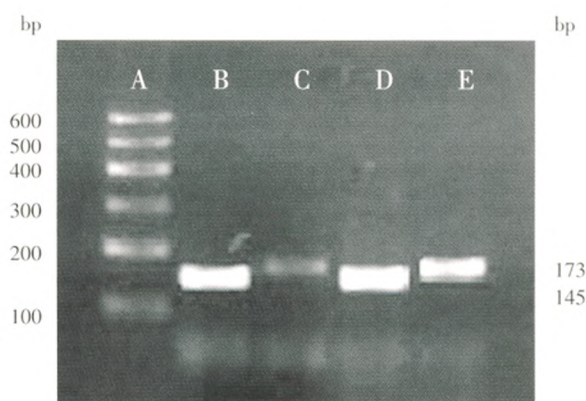


图 2 CXCR4 mRNA 在正常肠黏膜和大肠腺癌组织中的表达
注: A: Marker; B, D 分别为正常肠黏膜和大肠腺癌中 GAPDH mRNA 的表达 (145 bp); C, E 分别为正常肠黏膜和大肠腺癌中 CXCR4 mRNA 的表达 (173 bp)

CXCR4 是 SDF-1 的受体, 是一个编码 352 个氨基酸且高度保守的 G 蛋白偶联七次跨膜受体^[1]。SDF-1 与 CXCR4 具有高度的亲和力, 两者特异性结合后形成的 SDF-1/CXCR4 轴是其生物学功能实现的分子基础, 与细胞间信息传递、细胞迁移有密切关系。

本文研究应用 IHC 方法和 RT-PCR 方法检测了大肠腺癌和正常肠黏膜组织中 CXCR4 蛋白及其 mRNA 的表达, 结果显示 CXCR4 蛋白及其 mRNA 的表达在大肠腺癌组显著高于正常肠黏膜组, 且两者呈正相关, 提示 CXCR4 可能与大肠腺癌的发生有关。关于 CXCR4 如何参与了大肠腺癌的发生尚未见确切报道。Brigati 等^[2]研究发现, 幽门螺杆菌感染的胃黏膜上皮组织内 CXC 家族的趋化因子表达增高, 吸引大量白细胞在局部聚集, 白细胞在杀灭病原菌的同时导致胃黏膜的炎性损伤, 增加了损伤黏膜的癌变概率。因此推测, CXCR4 作为趋化因子家族的重要成员, 其分泌增高, 在调节白细胞参与组织损

表 5 CXCR4 蛋白与 CXCR4 mRNA 表达的相关性

例数	CXCR4 蛋白 表达	CXCR4 mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s$)	r 值	P 值
0	-	0	0.588	$P < 0.01$
7	+	0.705 ± 0.156		
8	++	0.788 ± 0.190		
15	+++	0.958 ± 0.202		

伤修复的同时, 可能进一步导致某些组织细胞的肿瘤性损伤。另外, SDF-1 和 CXCR4 结合激活 MAPK 及 PI-3K 通路, 可能在细胞的过度增殖分化及抗凋亡中发挥作用^[3]。这些机制都有待于进一步探讨。

另外本文对 CXCR4 与大肠腺癌的浸润、转移相关性研究发现, CXCR4 的表达与患者的年龄、性别及癌组织的分化程度无关, 而与癌组织的浸润深度、淋巴结转移情况有关, 提示 CXCR4 参与了大肠腺癌的浸润、转移。Schimanski 等^[4]研究发现有肝脏和淋巴结转移的大肠腺癌组织中 CXCR4 表达增高, 支持本实验结果。

关于 CXCR4 促进大肠腺癌浸润、转移的机制可能是: (1) 加速细胞外基质降解, 促进肿瘤细胞的浸润、转移。CXCR4 与 SDF-1 结合后可使肿瘤细胞分泌更多的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP), 如 MMP-2^[5]和 MMP-9^[6], 该作用可能与 NF- κ B 相关通路关联^[3,7]。MMP 能降解 IV 型、V 型胶原和层黏连蛋白等, 破坏细胞外基质及基底膜的完整性。肿瘤细胞沿着降解、缺失的细胞外基质和基底膜向周围组织迁徙, 是肿瘤浸润、转移的必备条件。(2) 诱导细胞骨架重排, 促进肿瘤细胞的运动迁移。肿瘤细胞上的受体 CXCR4 与 SDF-1 结合后可激活细胞表面的整合素^[8], 进而激活黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK), FAK 活化后激活一系列肌动蛋白结合蛋白(如辅肌动蛋白、黏附斑蛋白、张力蛋白等), 使

表 4 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系

临床病理指标		例数	CXCR4 mRNA 表达量	t 值	P 值
性别	男	15	0.894±0.221	1.040	> 0.05
	女	15	0.813±0.205		
年龄	≤ 60	16	0.861±0.186	0.191	> 0.05
	> 60	14	0.845±0.248		
分化程度	中高分化	17	0.887±0.216	0.987	> 0.05
	低分化	13	0.809±0.210		
浸润深度	侵达肌层	15	0.763±0.212	-2.537	< 0.05
	侵达浆膜	15	0.944±0.179		
淋巴结转移	有	15	1.015±0.153	6.383	< 0.01
	无	15	0.692±0.123		

细胞内骨架蛋白 F-肌动蛋白束数量和厚度增加,引起肿瘤细胞内骨架蛋白的聚合与再分布,从而调节细胞的运动和迁移。Muller 等^[9]研究发现加入过量的 SDF-1 能使乳腺癌细胞形成伪足,乳腺癌细胞发生侵袭和定向迁移,而抗 CXCR4 抗体可以阻断这一效应。这表明 CXCR4 与 SDF-1 结合后能促进肿瘤细胞的运动和迁徙。(3)促进肿瘤血管生长,加速肿瘤细胞的增殖、浸润和转移。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一类血小板源性蛋白,能选择性地促进血管内皮细胞分裂进而促进血管新生,同时还具有增加血管尤其是微血管渗透性的功能。组织中 CXCR4 和 SDF-1 的合成增加可上调 VEGF 的表达。VEGF 的高表达可以刺激血管内皮细胞增殖、迁移并以出芽的方式形成新生血管,从而增加肿瘤细胞的营养供给,促进肿瘤细胞的生长和增殖;同时,由于新生血管的基膜不完整,通透性大,肿瘤细胞容易侵入并形成转移。有文献^[10]报道,在敲除 CXCR4 基因的小鼠可见严重的胃肠血管形成障碍。Salvucci 等^[11]对微血管发生形成的研究发现:阻断 SDF-1/CXCR4 的功能,可以起到抑制血管生长因子依赖的血管形成作用,表明 CXCR4 在血管形成中发挥重要作用。

总之, CXCR4 在大肠腺癌方面的研究刚起步,有关基因调控机制、侵袭和转移动力学过程及治疗均未明确。随着研究的不断深入,检测 CXCR4 可望成为用于评估大肠腺癌患者是否发生转移的一个新的分子病理辅助诊断指标;另外 CXCR4 极有潜力成为抗肿瘤治疗的新靶点。有研究^[12]发现通过转染 KDFL 序列到 SDF-1 基因可以在细胞质内阻断 CXCR4 向细胞膜上表达,明显抑制结直肠癌肝肺转移。另外,目前实验常用的 CXCR4 抑制剂如 AMD3100、T140 等可以抑制肿瘤细胞增殖与迁移,故小分子量 CXCR4 拮抗剂的研究可能将为大肠腺癌的治疗带来突破。

4 参考文献

- 1 Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. Immunol Rev, 2000, 177: 175-184.
- 2 Brigati C, Noonan DM, Albini A, et al. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? Clin Exp Metastasis, 2002, 19: 247-258.
- 3 Beverly AT, Simon PF. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. Clin Cancer Res 2010, 16: 2927-2931.
- 4 Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. Clin Cancer Res, 2005, 11: 1743-1750.
- 5 杜雅冰, 樊青霞. CXCR4、MMP-2 在食管鳞癌中的表达及其与淋巴结转移的关系. 世界华人消化杂志, 2010, 18: 2322-2326.
- 6 Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Majka M, et al. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. Stem Cells, 2001, 19: 453-466.
- 7 侯峰, 郑淑芳, 秦晓静, 等. NF- κ B 在大肠腺癌组织中的表达与大肠腺癌浸润及转移关系的研究. 实用检验医师杂志, 2011, 3: 18-22.
- 8 Peled A, Kollet O, Ponomarev T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD. SCID mice. Blood, 2000, 95: 3289-3296.
- 9 Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 2001, 410: 50-56.
- 10 Tachibana K, Hirota S, Lizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. Nature, 1998, 393: 591-594.
- 11 Salvucci O, Yao Lei, Villalba S, et al. Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. Blood, 2002, 99: 2703-2711.
- 12 戴伟刚, 董文广, 王天宝. SDF-1/CXCR4 轴在结直肠癌中的研究进展. 中华普通外科学文献, 2009, 3: 520-523.

(收稿日期: 2012-03-26)

(本文编辑: 杨军)

消 息

《实用检验医师杂志》开通网上采编系统

为了更好地服务于读者、作者及审稿专家,方便查询论文信息、投稿、询稿及审稿,提高编辑部工作效率,现已开通网上采编系统(www.cjocp.com)。欢迎作者网上投稿,优秀的文章将优先处理并且免收版面费。如果您在使用采编系统时有任何问题或者对开发编辑平台有更好的建议,欢迎您联系我们,我们将热情为您服务。感谢您对编辑部工作的支持!

联系人: 张志成; 联系电话: 15900366486, 022-60577729; E-mail: jianyanyishi@163.com