

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)13-1205-03

趋化因子受体 CCR7 在乳腺癌淋巴结转移中的作用

朱 旬,甄林林,郑 伟,王汉晋,王董仪,武正炎 (南京医科大学第一附属医院普外科,江苏 南京 210029)

Effect of chemokine receptor CCR7 in breast cancer tissue on lymph node metastasis

ZHU Xun, ZHEN Lin-Lin, ZHENG Wei, WANG Han-Jin, WANG Xuan-Yi, WU Zheng-Yan

Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】 AIM: To detect the expressions of chemokine receptor CCR7 protein and its mRNA in breast carcinoma, and to discuss their relationship with lymph node metastasis. **METHODS:** The expressions of chemokine receptor CCR7 mRNA and protein in 42 cases of breast carcinoma and 10 cases of breast fibroadenoma tissue were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and SP immunohistochemical technique. **RESULTS:** There were 18 cases of positive expression of CCR7 mRNA and 15 of CCR7 protein in 42 cases of breast carcinoma tissue. The positive expression rate of CCR7 protein (11.1%) in patients without lymph node metastasis was significantly lower than that (54.2%) in patients with lymph node metastasis ($P < 0.01$). The positive rate in clinical stage I, II and III were 0%, 39.1%, 60.0%, respectively ($P < 0.01$). The positive expression of CCR7 was correlated with lymph node metastasis as well as clinical stage. **CONCLUSION:** CCR7 may contribute to lymph node metastasis in breast cancer. **【Keywords】** breast carcinoma; metastasis; lymph node; CCR7

【摘要】目的 探讨趋化因子受体 CCR7 在乳腺癌中的表达意义。方法 应用 RT-PCR 及免疫组织化学方法检测 42 例乳腺癌组织和 10 例乳腺纤维腺瘤中 CCR7 的表达。结果 在乳腺癌组织中 CCR7 mRNA 表达 42.9%, CCR7 蛋白表达 35.7%, 在乳腺纤维腺瘤中仅有 1 例 CCR7 mRNA 表达。无淋巴结转移者 CCR7 蛋白阳性表达率为 11.1%(2/18), 而有淋巴结转移阳性表达率为 54.2%(13/24) ($P < 0.01$); 临床 TNM 分期 I, II, III 期的阳性表达率分别为 0%, 39.1%, 60.0% ($P < 0.01$)。结论 CCR7 可能是介导淋巴结转移和组织浸润的重要机制之一。

【关键词】 乳腺肿瘤; 转移; 淋巴结; CCR7**【中图分类号】** R730.7 **【文献标识码】** A

收稿日期 2005-08-30; 接受日期 2005-09-27

作者简介 朱 旬, 博士生(导师武正炎)。Tel (025) 83718836 Ext.

8805 Email zhuxun1023@126.com

0 引言

目前肿瘤细胞向淋巴结侵袭转移的机制仍然未完全阐明。趋化因子受体 CCR7(CC chemokine receptor 7)在多种免疫细胞上表达,它及其配体在引导这些细胞向淋巴组织或器官归巢中起主导作用。最近的研究发现,它也在恶性肿瘤细胞上表达,并且在肿瘤细胞淋巴道转移过程中起重要作用。我们检测乳腺癌细胞株和乳腺癌组织中 CCR7 的表达水平,以及与淋巴结转移的关系。

1 材料和方法

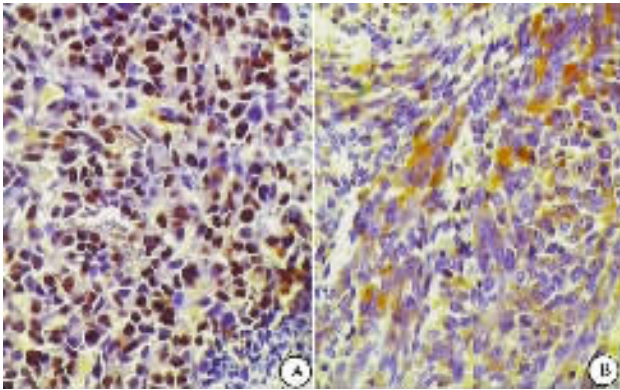
1.1 材料 人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435s 细胞培养用含 100 mL/L 胎牛血清的 L15 培养液(Gibco 公司),人乳腺癌 MCF-7 细胞培养用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液(Gibco 公司),培养条件为 37℃, 50 mL/L CO₂ 饱和湿度。2004-03/2004-12 在江苏省人民医院行乳腺癌手术 42 例,乳腺纤维腺瘤 10 例,均为女性,乳腺癌患者年龄 29~72(中位 43)岁,手术后常规病理诊断确诊为乳腺癌,并进行免疫组织化学检测 ER, PR。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 组织 100 mg 在液氮中研碎后,用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)提取总 RNA,并用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。采用逆转录试剂盒(Promega 公司, A3500)合成 cDNA, 配制 20 μL 反应体系: RNasin 20 U, Oligo (dT) 15 0.5 μg, RNA 模板 1.5 μg, 逆转录缓冲液 1 mmol/L, AMV 反转录酶 15 U, dNTPs 1 mmol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, 混匀后 42℃ 反应 1 h, 95℃ 5 min, 4℃ 放置 10 min。PCR 反应体系 50 μL, 模板 cDNA(约 50 ng), 上、下游引物(各 50 pmol/L), 94℃ 4~5 min, 立即冰浴, 瞬时离心, 加入 PCR 缓冲液(4.8 μL), MgCl₂(3.8 μL), dNTPs(0.9 μL), Taq 酶(Promega 公司, M1661) 2.5 U, 最后加无核酸酶的水定容为 50 μL。RT-PCR 引物: 上游 5'-AAGGGTCAGGAGGAAGAGGA-3', 下游 5'-GGCTG-GTCGTGTTGACCTAT-3' (102 bp)。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 60 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s 30 个循环。同时应用 β-actin 作为内对照, 引物 5'-CG-

GTTGGCCTTGGGGTTCAGGGGG-3', 下游 5'-ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' (242 bp), 引物由上海华诺生物科技有限公司合成. PCR 产物 5 μ L 经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察.

1.2.2 免疫组织化学 采用 SP 法, 鼠抗人 CCR7 一抗 (R & D 公司), 其他试剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司. 用已知阳性结果标本切片作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照. ER, PR 以细胞核有黄色颗粒为阳性细胞, CCR7 以细胞膜或细胞质呈现棕黄色为阳性细胞 (图 1). 高倍镜下连续计数 5 个视野, 染色细胞数 >25% 定为阳性, \leq 25% 为阴性.



A: ER 阳性; B: CCR7 阳性.

图 1 乳腺癌免疫组织化学结果 \times 200

统计学处理 采用统计学软件 SPSS 11.5 进行 χ^2 检验.

2 结果

经 RT-PCR 扩增后, 产物为 102 bp 的片段, 在乳腺癌组织中有 18 例 (42.9%) 检测出 CCR7 mRNA 的表达 (图 2), 在 3 种乳腺癌细胞株中, MDA-MB-435s 表达阳性, 而乳腺纤维腺瘤中仅有 1 例 (10.0%) 表达阳性. 乳腺纤维腺瘤 10 例无 CCR7 蛋白表达, 在乳腺癌组织中 35.7% (15/42) 表达阳性. CCR7 阳性表达与肿瘤大小、ER 和 PR 阳性表达无关 ($P > 0.05$). 无淋巴结转移者 CCR7 阳性表达率为 11.1% (2/18), 而有淋巴结转移阳性表达率为 54.2% (13/24), 其中淋巴结转移数 3 个以内者阳性率 46.2% (6/13) 4 个以上者阳性率 63.6% (7/11), 有统计学意义 ($P = 0.007$); 临床 TNM 分期 I, II, III 期的阳性表达率分别为 0%, 39.1%, 60.0% ($P = 0.005$, 表 1). 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s 的 CCR7 mRNA 表达与蛋白表达均为阳性, 乳腺癌组织

中 CCR7 mRNA 表达与蛋白表达也有很高的一致性, 18 例 CCR7 mRNA 表达阳性病例中 14 例蛋白表达阳性, 24 例 CCR7 mRNA 表达阴性病例中 23 例蛋白表达阴性.



M Marker 1 MDA-MB-435s 乳腺癌细胞株 2 3 乳腺癌组织 4 乳腺纤维腺瘤 5 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株 6 MCF-7 乳腺癌细胞株.

图 2 CCR7 RT-PCR 扩增电泳图

表 1 乳腺癌组织 CCR7 蛋白表达与临床病理的关系

临床病理	CCR7 蛋白表达 (+)
肿瘤大小	
T1	2/11
T2	9/24
T3 以上	4/7
淋巴结转移数	
0	2/18 ^b
1~3	6/13
\geq 4	7/11
临床分期	
I	0/9 ^b
II	9/23
III	6/10
病理	
非浸润癌	0/2
浸润癌	15/40
ER	
+	6/24
-	9/18
PR	
+	10/22
-	5/20
CCR7 mRNA	
+	14/18 ^b
-	1/24

^b $P < 0.01$ vs 相应项目.

3 讨论

肿瘤细胞由原发灶向区域淋巴结转移与一些蛋白水解酶和生长因子有关, 如金属基质蛋白酶 (matrix metalloproteinases MMPs), 血管生长因子 C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C) 等^[1-3], 然而内在趋化吸引因子可能在此过程中起着至关重要的步骤. Mashino 等^[4]用半定量 RT-PCR 的方法检测了 64 例胃癌组织标本, 其中 68.8% CCR7 mRNA 表达, 免疫组织化学结果 60% 为阳性, 并且 CCR7 表达阳性与淋巴结转移、淋巴管浸润、组织学分级差、分期晚和预后差相关, 由此提示 CCR7 及其配体的相互作用与胃癌淋巴结转移有关. 有学者通过胃镜活检组织检测 CCR7 和 VEGF-C 预测淋巴结转移情况并指

导手术范围的可能性^[5]。在非小细胞肺癌中,CCR7 mRNA 表达也是判断淋巴结转移独立的预后指标^[6]。乳腺癌细胞株 CCR7 有不同程度表达,且与趋化活性和侵袭力相关^[7]。在本组乳腺癌组织中 CCR7 蛋白阳性表达与淋巴结转移和临床分期有关,而与肿瘤大小、ER 和 PR 阳性表达不相关。由于淋巴结转移状况是影响乳腺癌预后的重要因素,因而 CCR7 表达可能也是影响因素之一。Tamamura 等^[8]发现在体外 CXCR4 拮抗剂 T140,可以抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的移行,在人乳腺癌裸鼠动物模型中,可以降低肺转移的发生。因此,淋巴细胞归巢途径与恶性肿瘤细胞淋巴结转移途径相似,CCR7 及其配体的相互作用可能是介导淋巴结转移和组织浸润的重要机制之一,针对性的拮抗剂有望成为恶性肿瘤治疗新的靶点。

【参考文献】

[1] 王新友,王岭,王辉等. 乳腺癌患者血浆基质金属蛋白酶-2、-9 的明胶酶谱分析[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(11): 1015-1017.

- [2] 李伟,张建国. 乳腺癌中肿瘤相关淋巴管生成[J]. 中国现代普通外科进展, 2005, 8(2): 67-68.
- [3] Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(8): 617-628.
- [4] Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma [J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2937-2941.
- [5] Yan C, Zhu ZG, Yu YY, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(6): 783-790.
- [6] Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: Correlation with lymph node metastasis [J]. Int J Cancer, 2003, 105(2): 186-189.
- [7] 马飞,宁力,张颖妹等. 趋化因子受体 CCR7 促进乳腺癌细胞的趋化与侵袭[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(20): 1883-1886.
- [8] Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer [J]. FEBS Lett, 2003, 550(1-3): 79-83.

编辑 潘伯荣

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)13-1207-01

黄芪川芎嗪注射液加化疗治疗恶性肿瘤 36 例

韩子敏,王巧凤,高福音,任玉川,王玉涛,杨凯军
(阳泉市第三人民医院肿瘤科,山西 阳泉 030100)

【关键词】恶性肿瘤;化疗;中药治疗;免疫功能

【中图分类号】R730.52 【文献标识码】B

1 临床资料 2001-11/2004-06 经细胞或病理学确诊且不宜手术或拒绝手术的肿瘤患者 72 例,按入院先后分单纯化疗(对照)组和黄芪、川芎嗪注射液加化疗(治疗)组。治疗组 36 (男 28,女 8)例,年龄 60~79(平均 69.1)岁,病程 2~18(平均 6.5)mo,其中肺癌 17 例,食管癌 5 例,肝癌 10 例,乳腺癌 2 例,卵巢癌 2 例。对照组 36(男 29,女 7)例,年龄 60~77 岁(平均 69.3)岁,病程 2~16(平均 6.2)mo,其中肺癌 18 例,食管癌 3 例,肝癌 12 例,乳腺癌 1 例,卵巢癌 2 例。两组预计生存期 ≥ 3 mo,肝肾功能、生化检验及血象正常,临床特征相似($P > 0.05$)。对照组选择 2~3 种药物联合化疗(NVB,DDP,VDS,5-FU,MMC,CTX,VP16,PTX);治疗组在化疗基础上加黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂生产)20 mL(相当黄芪 40 g),川芎嗪注射液(山西大同惠达制药有限公司生产)320 mg,各加入 50 g/L 葡萄糖 250 mL,iv,1 次/d,疗程 4 wk。结果治

疗组 36 例,CR 1 例,PR 15 例,NC 18 例,PD 2 例,有效率(CR+PR)44.4%;对照组 36 例,PR 12 例,NC 15 例,PD 9 例,有效率 33.3%;两组有效率无差异($P > 0.05$)。治疗组 55.6% 质量评分提高,8.3% 下降,对照组分别为 27.8% 和 33.3% ($P < 0.05$)。治疗组 CD3、CD4、CD8 及 CD4/CD8 治疗前后无差异($P > 0.05$),对照组治疗后均下降($P < 0.05$)。白细胞下降 III~IV 度中,治疗组 6 例(16.7%),对照组 20 例(55.6%) ($P < 0.05$);胃肠道反应 I~IV 度中,治疗组 12 例(33.3%),对照组 24 例(66.7%) ($P < 0.05$)。

2 讨论 黄芪具有扶正固本、补中益气等药理作用,有降低化疗药物不良反应、增强化疗疗效、提高机体免疫功能和改善患者生活质量等作用^[1]。川芎嗪可调节实验动物免疫功能,能显著增强小鼠单核巨噬细胞的吞噬功能,增强抗肿瘤效果^[2]。黄芪、川芎嗪注射液联合化疗治疗恶性肿瘤可延长患者的生存期。治疗组 T 淋巴细胞及亚群治疗前后无明显变化,说明黄芪、川芎嗪对患者的免疫功能有保护作用,白细胞下降例数明显低于对照组,说明黄芪、川芎嗪能减少骨髓抑制。治疗组生活质量明显高于对照组,与黄芪提高免疫功能、增强化疗耐受性有关。

【参考文献】

- [1] 潘峰,齐元富. 黄芪注射液辅助化疗增效减毒临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2003, 27(2): 137-139.
- [2] Pan BR, Cheng T, Nan KJ, et al. Effect of Fuzheng Yiliu decoction combined with chemotherapy on patients with intermediate and late stage gastrointestinal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(3): 439-442.

收稿日期 2005-08-21; 接受日期 2005-09-29

作者简介 韩子敏. 主治医师. Tel: (0354)68869619

编辑 潘伯荣