

· 临床研究 ·

HIF-1 α 和HIF-2 α 上调非小细胞肺癌中CCR7的表达

李洋 张清富 江黎黎 邱雪杉 王恩华

【摘要】背景与目的 CCR7与非小细胞肺癌的淋巴结转移密切相关,但CCR7的上调机制却不是很清楚。本研究通过观察趋化因子受体CCR7和缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、缺氧诱导因子2 α (HIF-2 α)在非小细胞肺癌组织中的表达及相互关系,探讨非小细胞肺癌CCR7上调机制。方法 应用免疫组织化学染色(SP法)检测94例非小细胞肺癌组织中CCR7、HIF-1 α 和HIF-2 α 的表达,并联合运用RNAi技术沉默人肺腺癌A549细胞中HIF-1 α 、HIF-2 α 表达,采用RT-PCR和免疫荧光方法观察CCR7的变化情况,分析CCR7表达与HIF-1 α 、HIF-2 α 之间的关系。结果 免疫组织化学结果显示:CCR7主要表达于癌细胞质和(或)胞膜,HIF-1 α 、HIF-2 α 主要表达于癌细胞核和(或)细胞质,非小细胞肺癌中CCR7、HIF-1 α 和HIF-2 α 的表达率分别为75.53% (71/94)、54.25% (51/94)和70.21% (66/94), χ^2 检验显示CCR7表达与非小细胞肺癌的临床病理分期($P<0.001$)和淋巴结转移($P=0.001$)有密切关系,而与年龄、性别、组织学类型无关($P>0.05$)。此外,CCR7和HIF-1 α 、HIF-2 α 表达正相关($r=0.272$, $P<0.01$)($r=0.225$, $P<0.05$)。向A549细胞中转染HIF-1 α 、HIF-2 α 特异性siRNA,分别抑制HIF-1 α 、HIF-2 α 表达后发现CCR7的mRNA和蛋白水平均下调($P<0.05$)。结论 CCR7表达与非小细胞肺癌侵袭转移密切相关,CCR7在NSCLC中过表达受HIF-1 α 和HIF-2 α 调控。

【关键词】 CCR7 HIF-1 α HIF-2 α 肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.05.024

Upregulation of the Chemokine Receptor CCR7 expression by HIF-1 α and HIF-2 α in non-small cell lung cancer

LI Yang, ZHANG Qingfu, JIANG Lili, QIU Xueshan, WANG Enhua

Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University and Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, 110001, China

Corresponding author: QIU Xue-shan, E-mail: qiuxues@hotmail.com

【Abstract】 Background and objective CCR7 is closely related with the lymph node metastasis of non-small cell lung cancer. The objective of this work is to investigate the expressions of chemokine receptor CCR7, hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and hypoxia inducible factor 2 α (HIF-2 α) protein in non small cell lung cancer and the relationships of their expression, and to study the mechanism of CCR7 upregulation in NSCLC. **Methods** The levels of expressions of CCR7, HIF-1 α and HIF-2 α protein were detected in 94 specimens of human primary non small cell lung cancer by immunohistochemical S-P method. Human lung adenocarcinoma cell line A549 cells were transfected by lipofection with HIF-1 α siRNA、HIF-2 α siRNA, the change of CCR7 was observed by RT-PCR and immunofluorescence staining. Correlations between the expression of CCR7 and HIF-1 α , HIF-2 α were respectively analyzed. **Results** Immunohistochemistry showed that CCR7 was distributed in cytoplasm and/or membrane of tumor cells, HIF-1 α , HIF-2 α was distributed in nucleus and/or cytoplasm of tumor cells. The levels of expressions of CCR7, HIF-1 α and HIF-2 α protein were found to be 75.53% (71/94), 54.25% (51/94) and 70.21% (66/94) in non small cell lung cancer, respectively. the levels of expression of CCR7 protein were closely related to the clinical stages ($P<0.001$) and lymph node metastasis ($P<0.001$) of non small cell lung cancer, but there was no correlation with age, gender, histology ($P>0.05$). Furthermore, A significant correlation were found among CCR7, Hif-1 α and HIF-2 α ($r=0.272$, $P<0.01$) ($r=0.225$, $P<0.05$). In addition, the expression of CCR7 mRNA and protein levels were decreased in the transfected specific HIF-1 α , HIF-2 α siRNA group ($P<0.05$). **Conclusion** CCR7 expression is significantly associated with non small cell lung cancer invasion and metastasis. The upregulation of CCR7 is regulated by HIF-1 α and HIF-2 α in non small cell lung cancer.

【Key words】 CCR7 HIF-1 α HIF-2 α Lung neoplasms

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学基础医学院病理教研室, 中国医科大学附属第一医院病理科(通讯作者: 邱雪杉, E-mail: qiuxues@hotmail.com)

缺氧是不同来源的实体肿瘤内常见现象, 缺氧时肿瘤细胞中HIF表达上调, HIF可以调控一些与肿瘤侵袭转移密切相关的基因表达从而导致肿瘤细胞的生物学特性的变化。CCR7为CC族趋化因子受体, 在许多肿瘤中高表达且与肿瘤淋巴结转移密切相关^[1-5]。Julia L等^[6]研究发现, 缺氧可诱导CCR7上调, 然而关于CCR7在肿瘤细胞中的上调机制目前尚不清楚, 本实验拟探讨CCR7、HIF-1 α 和HIF-2 α 蛋白在非小细胞肺癌表达情况及相互关系, 并对肺癌中CCR7的上调机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源 94例非小细胞肺癌组织蜡块来自中国医科大学附属第一医院2001-2006年间手术切除肺癌组织, 病史回顾无其他恶性肿瘤史。所有标本均经病理确诊。所有标本均经10%福尔马林液固定, 石蜡包埋, 行4 μ m连续切片, 备用。

1.2 临床病理资料 94例非小细胞肺癌组织中 I A/ I B期32例, II A/ II B期38例, III期24例; 鳞癌43例, 腺癌51例; 有淋巴结转移56例, 无淋巴结转移38例; 男性60例, 女性34例; 年龄18岁-72岁, 平均(54 \pm 19)岁。所有患者术前均未接受过任何的放疗和化疗, 术后均经两疗程的系统化疗。

1.3 免疫组织化学染色 羊抗人CCR7多克隆抗体购自Santa Cruz公司; 鼠抗人HIF-1 α 抗体购自BD公司; 鼠抗人HIF-2 α 抗体购自Novus Biological Science公司SP免疫组化试剂盒、DAB酶底物显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司。染色方法按试剂盒说明书步骤进行, 用PBS代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组织化学结果判断标准 结果判定在双盲法下进行, 每张切片由两名病理医师分别判断。CCR7评分标准: 随机选取肿瘤细胞(或炎症细胞)分布密集区域的10个高倍视野进行记数, 至少记数600个肿瘤细胞(或炎症细胞), 观察其阳性表达情况。阳性表达率<50%设为阴性, >50%为阳性。HIF-1 α 和HIF-2 α 的评分标准同参考文献^[7]。

1.5 RNA干扰 依据siRNA设计原则, 选取人HIF-1 α mRNA (GeneID: NM001530)和HIF-2 α mRNA (GeneID: NM001430)中的特异性核苷酸片断为靶标, 应用Ambion公司在线siRNA设计软件设计HIF-1 α 和HIF-2 α 的RNAi序列, 经Blast确定所选靶向的基因是特异的, 序列由上海吉凯基因化学技术有限公司合成。实验分三组: 空白对照组、非特异性siRNA转染组、特异

性siRNA (20 nm/L) 转染组, 每个实验均重复三次, 转染具体步骤按LipofectamineTM2000 (Invitrogen, USA) 试剂说明书进行。HIF-1 α RNAi序列: sense 5' -CUG AUG ACC AGC AAC UUG AdTdT-3' and antisense 5' -UCA AGU UGC UGG UCA UCA GdTdT-3'。HIF-2 α RNAi序列: sense 5' -CAG CAU CUU UGA UAG CAG UdTdT-3' and antisense 5' -ACU GCU AUC AAA GAU GCU GdTdT-3'。非特异性siRNA序列: sense 5' -AGU UCA ACG ACC AGU AGU CdTdT-3' and antisense 5' -GAC UAC UGG UCG UUG AdTdT-3'。

1.6 RT-PCR 取对数生长期的细胞用TRIZO (Invitrogen, USA) 提取总RNA。逆转录条件为30 $^{\circ}$ C、10 min, 42 $^{\circ}$ C、40 min, 99 $^{\circ}$ C、5 min, 5 $^{\circ}$ C、5 min。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C、5 min, 94 $^{\circ}$ C、40 s, 53 $^{\circ}$ C (HIF-1 α 、CCR7) /60 $^{\circ}$ C (HIF-2 α) 40 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s, 72 $^{\circ}$ C、5 min。取扩增产物5 μ L, 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 用Image J软件进行表达强度分析。引物均由辽宁博春天生物技术有限公司合成。PCR引物为: β -actin上游5' -AAA TCG TGC GTG ACA TTA A -3', 下游5' -CTC GTC ATA CTC CTG CTT G-3', 513 bp。CCR7上游5' -GAG GCT ATT GTC CCC TAA ACC -3', 下游5' -TGG AGG ACA GTG AAG AAA ACG -3', 304 bp。HIF-1 α 上游5' -TAA GAA ACC ACC TAT GAC CTG C-3', 下游5' -GTC GTG CTG AAT AAT ACC ACT C -3', 411 bp。HIF-2 α 上游5' -GAA AAC GAG TCC GAA GCC -3', 下游5' -CCC AAA ACC AGA GCC ATT -3', 242 bp。

1.7 免疫荧光 细胞爬片后, PBS洗3次, 5 min/次, 40 g/L多聚甲醛室温下固定30 min, 用2 g/L TritonX-100在4 $^{\circ}$ C下透膜, 非免疫动物血清封闭37 $^{\circ}$ C、30 min; 滴加一抗(羊抗人CCR7抗体, 1:200), 4 $^{\circ}$ C过夜, PBS清洗; 同时滴加荧光素标记兔抗羊IgG (Rb anti-Goat IgG/FITC) (1:100, chemicon, USA), 37 $^{\circ}$ C反应30 min, PBS清洗; Hoechst 33342 (1 μ g/ μ L) 染核, 37 $^{\circ}$ C、20 min, PBS清洗后50%甘油封片于荧光显微镜下观察结果。

1.8 细胞培养和缺氧处理 本研究采用人肺癌细胞系A549, 用含10%新鲜小牛血清的DMEM (Gibco, USA)、100 U/mL的青霉素、100 U/mL的链霉素的培养基, 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的条件下培养。细胞缺氧培养在37 $^{\circ}$ C、1%O₂、5%CO₂和94%N₂条件下进行。

1.9 统计学分析 采用SPSS13.0统计学分析软件, 对CCR7表达与临床病理因素的关系用 χ^2 检验, 其中CCR7表达与病理分期的关系用方差分析; CCR7与HIF-1 α 、

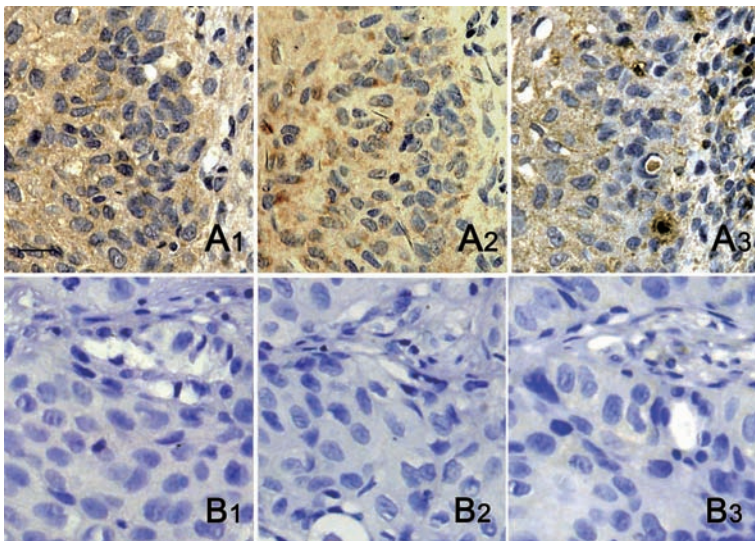


图1 免疫组化S-P法检测94例NSCLC患者CCR7、HIF-1α、HIF-2α表达
A组为有淋巴结转移组, B组为无淋巴结转移组。CCR7阳性表达(A1), CCR7阴性表达(B1), HIF-1α阳性表达(A2), HIF-1α阴性表达(B2), HIF-2α阳性表达(A3), HIF-2α阴性表达(B3)。SP法×400, bar=50 μm

Fig 1 The expressions of CCR7, HIF-1α and HIF-2α protein were detected in 94 specimens of human primary non small cell lung cancer by immunohistochemical S-P method
Group A is positive for lymphatic metastasis, Group B is negative for lymphatic metastasis. CCR7 positive expression (A1), CCR7 negative expression (B1), HIF-1α positive expression (A2), HIF-1α negative expression (B2), HIF-2α positive expression (A3), HIF-2α negative expression (B3). SP method ×400, bar=50 μm

HIF-2α 表达的关系采用Spearman等级相关分析, 干扰前后CCR7表达变化及干扰效率的检测采用t检验, 用Mean ± SD表示, P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 CCR7和HIF-1α、HIF-2α蛋白的免疫组化检测结果
CCR7主要表达于肿瘤细胞的胞质和(或)胞膜(图1, A1), 在肿瘤间质部分血管内皮亦有表达。CCR7阳性率为75.53%(71/94)。HIF-1α、HIF-2α蛋白则定位在肿瘤细胞胞核和(或)胞质, 在间质部分淋巴细胞也有不同程度着色。HIF-1α阳性率为54.25%(51/94)(图1, A2), HIF-2α阳性率为70.21%(66/94)(图1, A3)。CCR7、HIF-1α和HIF-2α在有淋巴结转移的肿瘤组织中高表达(图1, A组), 而在无淋巴结转移的肿瘤组织中低表达(图1, B组)。对CCR7的表达情况及其与NSCLC临床病理特征的相关性进行统计分析, 结果显示: CCR7表达与非小细胞肺癌的临床病理分期(P<0.001)和淋巴结转移(P=0.001)有密切关系, 而与年龄、性别、组织学类型无关(P>0.05)(表1, 图2)。

2.2 NSCLC中CCR7的表达与HIF-1α和HIF-2α的关系 对CCR7和HIF-1α、HIF-2α阳性和阴性的数据进行比较, 结果发现: CCR7与HIF-2α的表达相关(r=0.225, P<0.05), CCR7与HIF-1α的表达显著相关(r=0.272, P<0.01)(表2)。

2.3 缺氧通过HIF-1α和HIF-2α上调CCR7的表达 A549细胞分别转染特异性的siRNA沉默HIF-1α(siHIF-1α)和HIF-2α(siHIF-2α)表达后, 缺氧培养A549细胞12 h, RT-PCR方法检测CCR7 mRNA表达, 与对照

表1 CCR7在非小细胞肺癌中的表达及其与临床病理参数的关系
Tab 1 Relationship between CCR7 expression in NSCLC and clinicopathological parameters

Variable	n	CCR7		P value
		Negative	Positive	
Sex				
Male	60	13	47	0.401
Female	34	10	24	
Age				
≥60	51	12	39	0.818
<60	43	11	32	
Stage				
I A/IB	32	18	14	<0.001
II A/II B	38	4	34	
III	24	1	23	
Lymphatic invasion				
Negative	38	16	22	0.001
Positive	56	7	49	
Histology				
Adenocarcinoma	51	11	40	0.476
Squamous cancer	43	12	31	

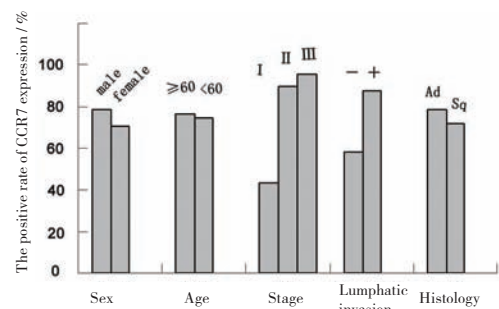


图2 各组间的CCR7表达阳性率
Fig 2 The positive rate of CCR7 expression in different groups

表 2 非小细胞肺癌中HIF-1 α 、HIF-2 α 表达与CCR7表达的关系

Tab 2 Relationship of the expressions of HIF-1 α , HIF-2 α with CCR7

CCR7	HIF-1 α		<i>r</i>	<i>P</i> value	HIF-2 α		<i>r</i>	<i>P</i> value
	Negative	Positive			Negative	Positive		
Negative	16	7	0.272	0.008	11	12	0.225	0.03
Positive	27	44			17	54		

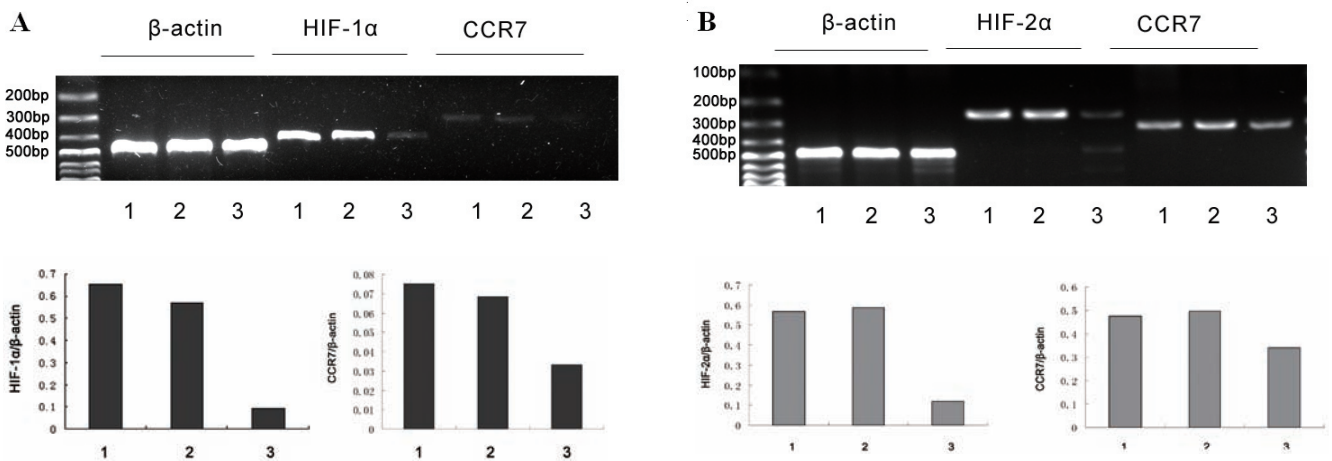


图 3 HIF-1 α 和HIF-2 α 调控A549细胞CCR7 mRNA表达

A: 转染HIF-1 α siRNA后A549细胞中HIF-1 α 和CCR7 mRNA水平的表达情况; B: 转染HIF-2 α siRNA后A549细胞中HIF-2 α 和CCR7 mRNA水平的表达情况。1: Control group; 2: Control siRNA group; 3: specific siRNA group

Fig 3 The expression of CCR7 mRNA was regulated by HIF-1 α and HIF-2 α in A549 cells

A: Expression of HIF-1 α and CCR7 in A549 cells after HIF-1 α siRNA transfection; B: Expression of HIF-2 α and CCR7 in A549 cells after HIF-2 α siRNA transfection. 1: Control group; 2: Control siRNA group; 3: specific siRNA group

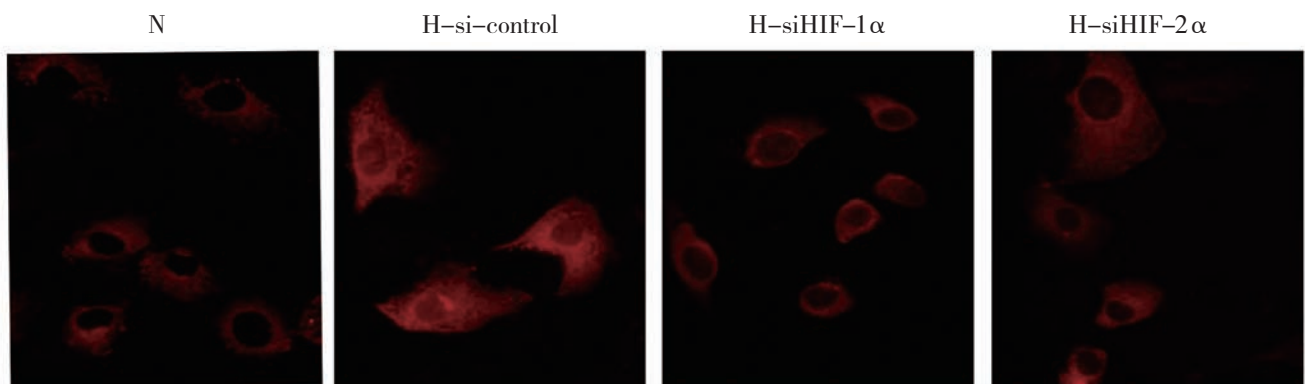


图 4 免疫荧光方法检测不同处理因素下A549细胞中CCR7表达情况

常氧(N), 缺氧(H-si-control), 转染HIF-1 α 后缺氧培养(H-siHIF-1 α), 转染HIF-2 α 后缺氧培养(H-siHIF-2 α) ($\times 400$)

Fig 4 Expression of CCR7 under different conditions was detected by Immunohistochemical staining

Normoxia(N), Hypoxia(H), Hypoxia culture after transfected HIF-1 α siRNA (H-siHIF-1 α), Hypoxia culture after transfected HIF-2 α siRNA (H-siHIF-2 α)

组、转染非特异性RNA组相比siHIF-1 α 组(图3A)和siHIF-2 α 组(图3B)的CCR7mRNA表达明显降低,差异具有显著性($P<0.05$)。同时采用免疫荧光方法检测常氧(N)、缺氧(H)、HIF-1 α 干扰组(siHIF-1 α)、HIF-2 α 干扰组(siHIF-2 α)CCR7表达,结果发现缺氧组CCR7表达明显增强,但与缺氧组相比siHIF-1 α 组和siHIF-2 α 组CCR7表达降低(图4),干扰HIF-1 α 、HIF-2 α 可抑制缺氧引起的CCR7表达上调。这些结果表明缺氧通过HIF-1 α 和HIF-2 α 上调CCR7表达。

3 讨论

CCR7(CC chemokine receptor 7)是CC家族趋化因子受体的成员之一,通过与其配体CCL21相互作用在淋巴细胞的归巢过程中起重要作用。近来研究发现,CCR7在非小细胞肺癌^[1-3]、乳腺癌^[4]、头颈部鳞癌^[5]等多种肿瘤细胞中过表达,并且与这些肿瘤的淋巴结转移密切相关,可见CCR7在肿瘤的恶性进展中发挥重要作用。

非小细胞肺癌中存在低氧区,细胞的趋化功能受氧浓度影响^[8,9]。Julia L等^[6]研究发现,缺氧可上调乳腺癌细胞中CCR7表达,但CCR7的上调机制尚不清楚,基于以上理论基础,我们认为非小细胞肺癌中CCR7上调可能与NSCLC处于低氧环境有关。

缺氧诱导因子(HIFs)是缺氧反应的关键分子,HIF可以调控一些在肿瘤转移中发挥重要作用的基因表达,其中HIF-1 α 和HIF-2 α 的作用最为重要。为此,我们运用免疫组化方法检测了94例NSCLC组织中CCR7和HIF-1 α 、HIF-2 α 的表达。结果显示CCR7与非小细胞肺癌患者的临床分期和淋巴结转移密切相关,这与Iwao Takanami^[3]的报道相一致;此外,我们还发现CCR7高表达组HIF-1 α 、HIF-2 α 高表达,统计学分析表明CCR7与HIF1 α 和HIF2 α 蛋白表达呈正相关($P<0.01$)($P<0.05$)。上述结果表明HIF1 α 和HIF2 α 可能通过上调肿瘤细胞表面CCR7表达从而促进非小细胞肺癌的淋巴结转移。

为了进一步阐明是否HIF1 α 和HIF2 α 上调非小细胞肺癌CCR7的表达,我们采用缺氧培养的方法,体外培养肺癌细胞系A549细胞,同时通过RNAi技术沉默A549细胞中HIF-1 α 、HIF-2 α 表达。我们发现HIF-1 α 、HIF-2 α 的mRNA表达水平明显降低,CCR7的mRNA表达

水平在HIF-1 α 和HIF-2 α 干扰组均降低;同时免疫荧光结果表明缺氧可以上调A549细胞CCR7表达,然而干扰HIF-1 α 和HIF-2 α 后,缺氧诱导的CCR7上调被抑制。因此,我们认为HIF1 α 和HIF2 α 是诱导CCR7表达的重要调节因子,但HIF1 α 和HIF2 α 在非小细胞肺癌进展中调控CCR7表达的精确机制有待更进一步的研究。

综上所述,缺氧-HIF1 α 、HIF2 α -CCR7通路可以调控非小细胞肺癌的淋巴结转移,同时本实验也为HIF1 α 、HIF2 α 和CCR7成为非小细胞肺癌干预治疗靶点提供了新的有力证据。

参考文献

- 1 Maekawa S, Iwasaki A, Shirakusa T, et al. Association between the expression of chemokine receptors CCR7 and CXCR3, and lymph node metastatic potential in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep*, 2008, 19(6): 1461-1468.
- 2 Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, et al. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2007, 25(35): 5562-5569.
- 3 Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer*, 2003, 105(2): 186-189.
- 4 Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
- 5 Wang J, Xi L, Hunt JL, et al. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1861-1866.
- 6 Wilson JL, Burchell J, Grimshaw MJ. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11802-11807.
- 7 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer*, 2001, 85(6): 881-890.
- 8 Grimshaw MJ, Balkwill FR. Balkwill, Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation—a potential mechanism. *Eur J Immunol*, 2001, 31(2): 480-489.
- 9 Turner L, Scotton C, Negus R, et al. Hypoxia inhibits macrophage migration. *Eur J Immunol*, 1999, 29(7): 2280-2287.

(收稿: 2008-06-10 修回: 2008-08-22)

(本文编辑 南娟)