

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.02.014

# 趋化因子受体 CXCR4 及其配体 CXCL12 在胃癌组织中的表达及其意义

马向涛<sup>1</sup>, 余力伟<sup>1</sup>, 付静<sup>2</sup>

## Expression and Clinical Significance of CXCR4/CXCL12 in Gastric Carcinoma

MA Xiang-tao<sup>1</sup>, YU Li-wei<sup>1</sup>, FU Jing<sup>2</sup>

Department of Surgery, Department of Pathology, Beijing Haidian Hospital, Beijing 100080, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of CXCR4/CXCL12 and its potential role in hepatic metastasis of gastric carcinoma. **Methods** Gastric cancer tissue, adjacent normal tissue and hepatic metastatic tissue samples were collected from 40 gastric carcinoma patients. Several CXCR4/CXCL12 pathway-related proteins (CXCR4, CXCL12, cyclin D1 and Bcl-x<sub>L</sub>) expression were detected by Western blot. Correlations between CXCR4/CXCL12 expression and clinicopathological parameters in gastric carcinoma were analyzed. CXCR4 and CXCL12 expression in cell level were determined using immunohistochemistry method. **Results** The expression of CXCR4 and CXCL12 protein significantly increased in gastric cancer compared to adjacent normal mucosa ( $P < 0.05$ ), it was also highly expressed in metastatic tissue versus primary tumor tissue ( $P < 0.05$ ). Our data showed that expression of CXCR4 and CXCL12 protein are correlated with TNM colorectal cancer staging ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CXCR4/CXCL12 overexpressed in both primary and metastatic tissue of gastric carcinoma. It is implied from our results that CXCR4/CXCL12 signaling pathway plays an important role in hepatic metastasis of gastric cancer.

**Key words:** Gastric neoplasm; Signal transduction; Chemokine; Metastasis

**摘要:目的** 探讨 CXCR4/CXCL12 在胃癌组织中表达及其在肝转移中的作用。**方法** 应用 Western blot 检测 40 例胃癌患者标本中肿瘤组织、邻近正常黏膜以及肝转移组织中 CXCR4/CXCL12 通路成员的表达情况,免疫组织化学法检测 CXCR4/CXCL12 在细胞水平的分布。**结果** 胃癌组织中 CXCR4/CXCL12 表达水平明显增高(肿瘤组织 vs 正常黏膜,  $P < 0.05$ ); 10 例肝转移组织中 CXCR4/CXCL12 表达增高(转移组织 vs 原发肿瘤,  $P < 0.05$ ); CXCR4/CXCL12 表达水平与 TNM 分期晚(Ⅲ/Ⅳ)有关 ( $P < 0.05$ )。 **结论** CXCR4/CXCL12 信号转导通路可能在胃癌肝转移过程中起一定作用,详细机制尚待进一步研究。

**关键词:** 胃癌; 信号转导; 趋化因子; 转移

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2009)02-0134-03

## 0 引言

胃癌是消化道常见恶性肿瘤之一,尽管在胃癌综合治疗方面取得了许多进展,但是 5 年生存率仍然徘徊在 30%~40%左右。胃癌肝转移是治疗失败的主要原因之一,越来越多的证据表明趋化因子参与了肿瘤的转移过程。趋化因子家族成员可以激活包括 MAPK、NF- $\kappa$ B 等在内的多条信号转导通路调控细胞增殖凋亡<sup>[1-2]</sup>。本研究检测了 40 例胃癌标本中趋化因子受体 CXCR4/CXCL12 的表达,证实 CXCR4/CXCL12 在胃癌肝转移中起重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Western blot 中用的 PVDF 膜购自 Millipore 公司,显影用的胶片购自柯达公司。本研究中所有抗体购自 Santa Cruz 公司。预染标准分子量蛋白购自 GIBCO/BRL 公司。ECL 化学发光试剂盒来自 Amersham 公司。浓缩蛋白分析液来自 Bio-Rad 公司。研究中所涉及的其他试剂均为分子生物学纯度,购自 Sigma 公司或 Amresco 公司。

### 1.2 患者资料与组织标本

收集北京海淀医院外科 2003 年 12 月~2005 年 12 月经手术切除的胃癌标本 40 例,于手术切除后 15~20 min 内采集胃癌组织及癌旁肠黏膜组织作为对照(距肿瘤边缘大于 5 cm),以及肝转移组织

收稿日期:2008-01-22;修回日期:2008-06-30

作者单位:1. 100080 北京海淀医院外科,2. 病理科

作者简介:马向涛(1972-),男,博士,副主任医师,主要从事消化道肿瘤分子生物学研究

(病理证实),立即置于液氮中保存。患者在手术前未接受化疗或者放疗并且签署知情同意书。临床病理资料详见表 1。肿瘤分期按照美国癌症联合委员会(AJCC)的 TNM 分期<sup>[3]</sup>。

表 1 CXCR4/CXCL12 表达与胃癌临床病理特征的关系( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Correlations between expression of CXCR4/CXCL12 and clinicopathological parameters in gastric carcinoma( $\bar{x} \pm s$ )

Item	n	CXCR4	P	CXCL12	P
Gender					
Male	23	2.5±0.3	0.827	2.7±0.4	0.846
Female	17	2.2±0.4		2.5±0.3	
Age (year)					
≥65	18	2.5±0.4	0.886	2.6±0.4	0.836
<65	22	2.7±0.3		2.2±0.3	
Stage					
Ⅲ + Ⅳ	32	2.9±0.5	0.036	3.2±0.5	0.031
I + Ⅱ	8	1.6±0.3		1.8±0.4	
Histological Grade					
G1	6	2.6±0.3	0.853	2.3±0.3	0.878
G2	11	2.8±0.3	0.839	2.4±0.3	0.845
G3	23	2.4±0.2	0.838	2.8±0.4	0.830
Distant Metastasis					
M1	10	3.9±0.4	0.170	3.6±0.4	0.338
M0	30	2.2±0.3		2.4±0.3	
Tumor Size					
≥5 cm	17	2.5±0.3	0.861	3.0±0.4	0.782
<5 cm	23	2.1±0.3		2.2±0.3	

### 1.3 研究方法

1.3.1 组织蛋白提取 组织于裂解缓冲液中裂解(150 mM 氯化钠; 1% 过氧胆酸钠; 1% Triniton X-100; 0.1% 十二烷基磺酸钠; 10 mM Tris, pH 7.2; 1 mM 正钒酸钠; 1 mM 苯甲磺酰氟; 1 mM 氟化钠; 0.1 mM 抑肽酶, 1 mM 亮抑蛋白酶肽)。裂解液在 4℃ 条件下 13 000 r/min, 离心 30 min。

1.3.2 蛋白浓度测定方法(Bradford 法) 以牛血清蛋白(BSA)作为标准品,根据蛋白定量试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)说明绘制蛋白定量标准曲线,于分光光度计 595 nm 下测光密度值,计算提取液蛋白浓度。

1.3.3 Western blot<sup>[4]</sup> 在进行 Western blot 之前将蛋白提取物与 2× 十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液按 1:1 混合(125 mM Tris·HCl, pH 6.8; 4% 十二烷基磺酸钠; 20% 甘油; 10% 2-巯基乙醇)后 100℃ 水浴下加热 5 min。取总蛋白 50 μg, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 PVDF 膜上。

电泳时在聚丙烯酰胺凝胶中加入预染标准分子量蛋白作为指示。转膜后用 TBST 缓冲液(10 mM Tris, HCl, pH 7.5, 150 mM 氯化钠, 0.5% Tween-20)与 5% 牛血清白蛋白封闭 30 min。封闭后,加入一抗 CXCR4、CXCL12、cyclin D1 与 Bcl-x<sub>L</sub>, 工作浓度 1:1 000, GAPDH 作为内参照,于 4℃ 条件下孵育过夜,用 TBST(每次 5 min)洗膜后,与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育 30 min,工作浓度 1:1 000。然后用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号。用 Phospho Imager 图像分析仪(美国 Molecular Dynamics 公司)测定条带的吸光度(A 值),以 A 值代表蛋白的相对表达量。

1.3.4 免疫组织化学法 组织标本在 4% 的福尔马林中固定,用石蜡包埋。胃癌与正常黏膜组织切成厚 5 μm,附着于载玻片上,在空气中干燥,然后在 60℃ 烤箱中加热 2 h。切片于二甲苯中脱腊后经梯度乙醇水化,用 0.3% 的过氧化氢-甲醇溶液抑制内源性过氧化物酶。然后进行抗原修复:切片在 10 mM 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中加热 10 min 后,用 PBS (pH 7.4)缓冲液清洗并使切片冷却,然后将切片与 5% 的血清在湿盒内室温下孵育 30 min 阻断非特异结合位点。切片在 4℃ 条件下与一抗 CXCR4 孵育过夜,稀释比 1:75。DAB 显色,苏木素复染,阴性对照中用 TBS 替换一抗。

### 1.4 统计学方法

统计学分析用 SPSS 12.0 软件完成, P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

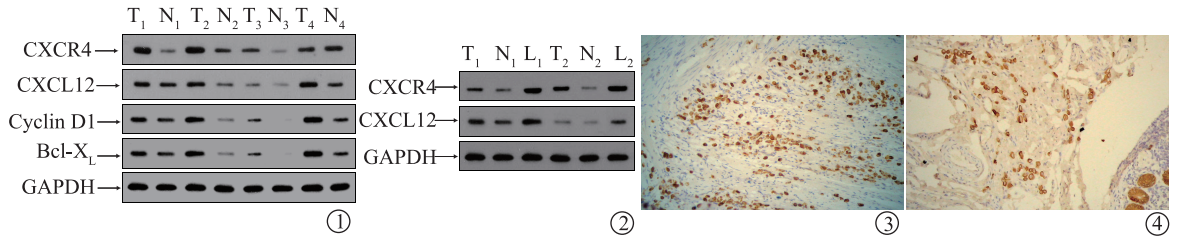
2.1 CXCR4 通路各成员在胃癌组织中的表达情况 CXCR4、CXCL12、cyclin D1 与 Bcl-x<sub>L</sub> 在胃癌组织中表达明显升高(P < 0.05)。CXCR4 与 CXCL12 在肝转移组织中表达高于原发肿瘤,但无统计学意义,可能与标本量较少有关,见图 1~4。

2.2 CXCR4 与 CXCL12 表达水平与各临床病理特征的关系

CXCR4 与 CXCL12 表达与 TNM 分期较晚有关。Ⅲ + Ⅳ 胃癌组织中 CXCR4 与 CXCL12 表达明显高于 I + Ⅱ 胃癌, P 值分别为 0.036 与 0.031 (P < 0.05)。CXCR4 与 CXCL12 表达与患者性别、年龄、肿瘤分化、远处转移、肿瘤大小无关,见表 1。

2.3 CXCR4 与 CXCL12 表达相关性分析

经 Pearson 相关性分析显示 CXCR4 与 CXCL12 在胃癌组织中表达情况呈线性相关, r = 0.463, P < 0.05。



GAPDH represents the internal protein control. Elevated levels of CXCR4, CXCL12, cyclin D1, and Bcl-x<sub>L</sub> in tumor (T) tissues were compared to adjacent normal mucosae (N); GAPDH represents the internal protein control. Elevated levels of CXCR4 and CXCL12 in tumor (T) tissues and liver metastasis (L) were compared to adjacent normal mucosae (N)

图 1 CXCR4、CXCL12、cyclin D1 与 Bcl-x<sub>L</sub> 在胃癌组织中的表达 图 2 CXCR4、CXCL12 在胃癌肝转移组织中的表达

图 3 胃癌组织中 CXCR4 染色阳性(×200) 图 4 胃癌组织中 CXCL12 染色阳性(×200)

Fig 1 Expressions of CXCR4, CXCL12, cyclin D1, and Bcl-x<sub>L</sub> in gastric carcinoma Fig 2 Expressions of CXCR4 and CXCL12 in liver metastasis gastric carcinoma Fig 3 Positive staining of CXCR4 in gastric carcinoma (×200) Fig 4 Positive staining of CXCL12 in gastric carcinoma (×200)

### 3 讨论

趋化因子(Chemokines)是一类最早发现与免疫细胞具有控制细胞向炎症定向迁移的细胞因子<sup>[1]</sup>。目前已经发现几十种趋化因子,根据半胱氨酸残基位置不同,趋化因子分为 4 个亚族:C、CC、CXC 与 CX3C,相应的受体称为 XCR、CCR、CXCR 与 CX3CR。肿瘤细胞在生长过程中能够自主分泌多种趋化因子并且表达其受体,进而刺激肿瘤细胞生长。某些趋化因子不仅可以直接刺激肿瘤细胞生长,还可以通过促进血管新生而间接促进肿瘤生长<sup>[5-6]</sup>。

研究表明 CXCR4 及其配体 CXCL12 与肿瘤转移关系密切<sup>[7]</sup>。Kato 等<sup>[8]</sup>对 79 例手术切除的乳腺浸润性导管癌组织进行的研究表明,所有患者癌组织均表达 CXCR4,其中高表达尤其是局灶性高表达者伴有广泛淋巴结转移,CXCR4 可能在乳腺癌淋巴结转移中起促进作用。研究发现乳腺癌细胞中 CXCR4 表达异常增高,应用 CXCR4 抑制剂可以明显下调乳腺癌细胞中 CXCR4 表达,抑制动物模型中乳腺癌转移发生<sup>[9]</sup>。使用 CXCR4 拮抗剂 T140 或通过 RNA 干扰技术抑制 CXCR4 基因均可抑制乳腺癌细胞在体外的迁移反应<sup>[10]</sup>。目前关于胃癌中趋化因子 CXCR4 表达及其在转移中的作用尚不清楚。本研究发现 CXCR4/CXCL12 在胃癌组织中高表达,正常黏膜 CXCR4/CXCL12 呈低表达,CXCR4 在肝转移组织中高于原发肿瘤(10/10)。可能的机制为肝细胞选择性高表达 CXCL12 与高表达 CXCR4 肿瘤细胞结合<sup>[11]</sup>。研究显示趋化因子家族影响着肿瘤的生长、浸润、远处转移。检测胃癌细胞趋化因子受体 CXCR4 成员有助于判断患者转移或者复发,这将完善胃癌分子生物学期系统,并且有助

于筛选治疗胃癌的靶基因。

### 参考文献:

- [1] Bendall L. Chemokines and their receptors in disease[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(3): 907-926.
- [2] Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, et al. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(11): 1652-1658.
- [3] Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al, editors. American Joint Committee on Cancer Staging manual[M]. 6th edition. Philadelphia: Springer, 2002: 91-98.
- [4] 马向涛,余力伟,王杉,等. Stat3 信号转导通路调控 Caspase-3 表达促进结肠癌细胞凋亡的机制[J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(11): 808-810.
- [5] 马向涛,余力伟,王杉,等. 结直肠癌淋巴结转移与趋化因子受体 CXCR4/CXCL12 信号转导通路的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(1): 60-61.
- [6] 马向涛,余力伟,付静. 趋化因子受体 CCR6/CCL20 在结直肠癌肝转移中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(8): 910-912.
- [7] Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3-4): 453-467.
- [8] Kato M, Kitayama J, Kazama S, et al. Expression pattern of CXCR4 chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma[J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5(5): 144-150.
- [9] Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, et al. Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer[J]. *Cancer*, 2007, 109(12): 2392-2404.
- [10] Arya M, Ahmed H, Silhi N, et al. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand-receptor) interaction in cancer cell migration[J]. *Tumour Biol*, 2007, 28(3): 123-131.
- [11] Ishigami S, Natsugoe S, Okumura H, et al. Clinical implication of CXCL12 expression in gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(11): 3154-3158.

[编辑:贺文;校对:刘红武]