

· 短篇论著 ·

趋化因子受体 CXCR4 在人乳腺癌中的表达研究

余小芬 雷双根 杨世昕 雷秋模 黄小陆

【摘要】 目的 研究 CXCR4 在人乳腺癌中的表达与淋巴结转移、Her-2 蛋白表达的关系,探讨其在乳腺癌侵袭和血管生成中的作用和机制,为乳腺癌分子靶向治疗寻找新的靶点。**方法** 采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(S-P 法)检测 100 例乳腺癌手术标本中 CXCR4 蛋白的表达,统计分析 CXCR4 蛋白表达与临床病理特征如乳腺癌临床分期、淋巴结转移、Her-2 表达之间的关系。**结果** (1) CXCR4 蛋白表达于细胞质和细胞核,54 例(54.0%)乳腺癌组织可见 CXCR4 表达,且 CXCR4 在乳腺癌中的表达明显高于癌旁正常组织中的表达($P < 0.01$)。(2) CXCR4 蛋白表达与患者的年龄、病理学类型、ER 和 PR 的表达无关($P > 0.05$);与淋巴结转移数目($r = 0.452, P < 0.01$)、临床分期($r = 0.324, P = 0.01$)及 HER-2 蛋白($r = 0.461, P < 0.01$)表达正相关。**结论** (1) CXCR4 在乳腺癌组织中的表达明显高于癌旁正常组织,与乳腺癌的发生、发展密切相关。(2) 乳腺癌组织 CXCR4 蛋白表达与淋巴结转移、临床分期、Her-2 表达呈正相关,可作为乳腺癌淋巴结转移预测的指标。阻断趋化因子 CXCR4/CXCL12 通路,有望成为乳腺癌治疗的新靶点。

【关键词】 乳腺肿瘤; 免疫组织化学; CXCR4; 淋巴结转移

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,近年来发病率增长较快,且有年轻化趋势。据统计,全球每年约新增 120 万~140 万女性乳腺癌病例,每年约有 50 万患者死于该病^[1]。研究乳腺癌生物学特性、侵袭及转移的机制,发现阻断肿瘤细胞生长、转移的靶点,成为当前研究的热点。趋化因子及其受体因在肿瘤组织中表达,并与肿瘤发生、发展、侵袭和转移密切相关而成为肿瘤领域的研究热点,其中趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 在多种肿瘤的发生发展过程中发挥着重要而复杂的作用^[2],已成为近期研究的热点之一。本研究通过免疫组织化学染色方法,检测乳腺癌组织及癌旁正常组织中 CXCR4 的表达,分析其与乳腺癌患者年龄、病理类型、ER、PR、Her-2、临床分期和淋巴结转移数等临床病理特征参数的关系。探讨 CXCR4 在乳腺癌发生、发展及侵袭转移中的作用,为进一步了解乳腺癌的发生、发展及转移机制提供新思路。

一、资料与方法

1. 一般资料:收集 2009 年 1 月至 2010 年 12 月南昌市第三医院乳腺外科手术切除的乳腺癌及癌旁组织病理存档蜡块 100 例,所有病例均为女性,最低年龄 23 岁,最高年龄 69 岁,平均年龄 47.4 岁;所有入选病例均为 I~III 期可手术切除的患者,且均病理诊断证实、在术前均未接受过放、化疗。其中 I A~B 期为 9 例,II A~B 期为 62 例,III A 期 29 例;有淋巴结转移 57 例,无淋巴结转移 43 例;ER 阳性 63 例,阴性 37 例;PR 阳性 57 例,阴性 43 例;Her-2 阳性 32 例,阴性 68 例。

2. 主要材料与试剂:鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体,ER、PR、HER-2 抗体及 S-P 试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。

3. 免疫组织化学染色:采用 SP 法对 100 例女性乳腺癌石蜡标本进行 CXCR4 蛋白表达检测。将乳腺癌组织切片置于 pH 8.0 EDTA 液高压修复,实验按照 SP 检测试剂盒说明书进行,一

抗稀释度 1:50, DAB 溶液显色、复染、脱水、透明、封片。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,已知阳性病例作为阳性对照。

4. 结果判定:所有切片均由两名高年资的乳腺病理医师分别于低倍和高倍镜下观察, CXCR4 阳性表达主要定位于细胞核和(或)细胞质,为棕黄色细颗粒状,而阴性表达的细胞中细胞核被苏木素蓝染,棕黄色颗粒少见。CXCR4 判定标准:参见许良中等^[3]的免疫组化结果的判断标准,采用双盲法阅片, Olympus 光镜下每张切片中选取癌细胞较多的 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞。染色强度分级如下:无着色为 0,淡黄色为 1,棕黄色为 2,棕褐色为 3。阳性细胞数分级为:无阳性细胞为 0,阳性细胞数 ≤ 10 为 1, 11~50 为 2, 51~75 为 3, ≥ 76 为 4。两项得分相乘结果 ≥ 3 为阳性表达。

5. 统计学分析:数据用 SPSS 12.0 统计软件包处理,乳腺癌标本 CXCR4 蛋白表达与其临床病理特征用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Spearman 相关分析 CXCR4 表达情况与 Her-2、临床分期、腋窝淋巴结转移情况的相关性。

二、结果

1. CXCR4 蛋白表达在乳腺癌标本与癌旁正常组织中的关系(表 1,图 1,2):本试验 100 例女性乳腺癌患者石蜡标本, CXCR4 阳性表达 54 例(54.0%),阴性表达 46 例(46.0%)。癌旁正常乳腺导管上皮细胞中 CXCR4 阳性表达 18 例(18.0%),阴性表达 82 例(82.0%)。两者具有显著差异($P < 0.001$)。

表 1 CXCR4 在浸润性乳腺癌及癌旁正常组织中的表达

组别	CXCR4 的表达(例)		P 值
	阳性	阴性	
乳腺癌组织	54	46	0.000
癌旁组织	18	82	

2. 乳腺癌标本 CXCR4 蛋白表达与临床病理特征的关系(表 2):本研究发 现 CXCR4 蛋白表达与患者的年龄、病理学类型、ER

表2 CXCR4 蛋白表达与乳腺癌患者临床病理特征的关系

项目	例数	CXCR4 蛋白表达			χ^2 值	P 值
		阴性(例)	阳性(例)	阳性表达率(%)		
年龄					0.023	0.879
45岁及以下	47	22	25	53.2		
45岁以上	53	24	29	54.7		
病理类型					0.054	0.817
浸润性导管癌	95	43	52	54.7		
其他类型 ^a	5	3	2	40.0		
ER					1.575	0.209
阴性	37	14	23	62.2		
阳性	63	32	31	49.2		
PR					3.753	0.053
阴性	43	15	28	65.1		
阳性	57	31	26	45.6		
Her-2 ^b					21.261	0.000
阴性	68	42	26	38.2		
阳性	32	4	28	87.5		
临床分期					10.976	0.004
I期	9	6	3	33.3		
II期	62	34	28	45.2		
III A期	29	6	23	79.3		
淋巴结转移数					20.471	0.000
0个	43	30	13	30.2		
1~3个	27	11	16	59.3		
≥4个	30	5	25	83.3		

注:^a:包括3例髓样癌,2例浸润性小叶癌;^b:Her-2阳性;免疫组化+++或FISH基因扩增

和PR的表达无关($r=0.015, P=0.88; r=-0.5, P=0.632; r=-0.126, P=0.213; r=-0.194, P=0.053$);乳腺癌组织CXCR4蛋白表达与Her-2表达、临床分期、淋巴结转移呈正相关($r=0.461, P<0.01; r=0.324, P=0.01; r=0.452, P<0.001$)。

三、讨论

CXCR4是CXCL12的特异性受体,是一个由352个氨基酸构成的7次跨膜G蛋白偶联受体^[4,5],其编码基因位于人染色体2q21,主要分布在淋巴组织、脑、脾脏、胃、小肠和胸腺等组织中。研究表明,CXCL12/CXCR4生物学轴能通过激活多种信号通路而介导肿瘤细胞的运动、趋化、黏附、分泌、血管生成、生长及增殖等生物学行为^[6],在肿瘤的发生、发展、侵袭和转移过程中起着重要作用。国内外大量临床研究发现^[7-8],大多数乳腺癌组织中存在CXCR4的高表达,且其表达水平与病变程度相关,而CXCR4在正常乳腺上皮细胞中是低表达或缺失的。本研究发现,趋化因子受体CXCR4在乳腺癌中表达水平较高(56.0%),而在癌旁正常乳腺组织中的表达程度低,CXCR4在两组间表达的差异存在显著差异($P<0.01$)。与郭满盈等^[9]报道相似,其采用免疫组化方法检测发现,乳腺癌组织中CXCR4表达率62.2%,而乳腺纤维腺瘤组织中未发现CXCR4的表达。Schmid等^[10]研究发现CXCR4在正常乳腺组织、乳腺导管上皮增生、重度不典

型增生、乳腺导管内癌、浸润性乳腺癌的组织中的表达随病变恶性程度加重而增加。Smith等^[11]采用RNA干扰的方法降低CXCR4在4T1小鼠乳腺癌细胞系中的表达,当将RNA干扰与正常的乳腺癌细胞接种到同源免疫活性的Balb/c小鼠中时,发现RNA干扰的肿瘤生长缓慢。而在稳定干扰的情况下甚至会出现肿瘤的退化或消失。提示CXCR4与乳腺癌的发生、发展密切相关。

早期发现和综合治疗的应用使得乳腺癌患者生存期有所提高,但是转移仍是乳腺癌最主要的死亡原因。研究证实,CXCR4表达水平与腋窝淋巴结和远处转移存在显著性相关。2001年Muller等^[12]研究发现乳腺癌常转移至高表达CXCL12的部位(如淋巴结、骨髓、肺和肝脏等),而很少转移到低表达CXCL12的部位(如肾脏、皮肤、肌肉等)。Yasuoka等^[13]研究发现CXCR4高表达与区域淋巴结及远处转移呈正相关,而与总生存期呈负相关。本研究发现,在乳腺癌淋巴结转移数多的患者标本中CXCR4蛋白表达水平明显高于淋巴结转移数少或无淋巴结转移组($P<0.001$),临床分期(III期)晚的患者组明显高于分期早(I期)的患者组($P=0.004$)。提示CXCR4蛋白表达与乳腺癌的转移有关。陈智勇等^[14]应用免疫组化检测发现,乳腺癌伴淋巴结转移组CXCR4的阳性表达率高于无淋巴结转移组,与本研

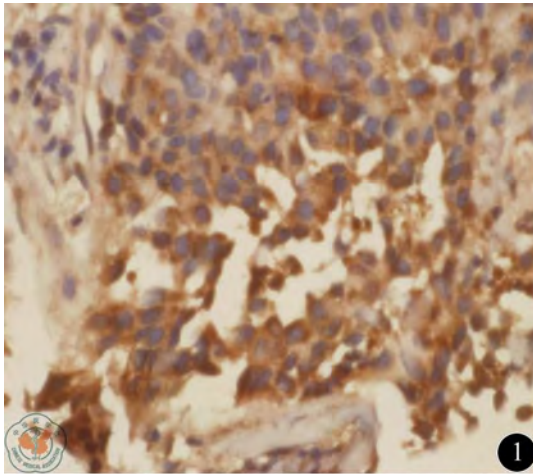


图1 乳腺癌细胞中CXCR4阳性表达(SP × 400)

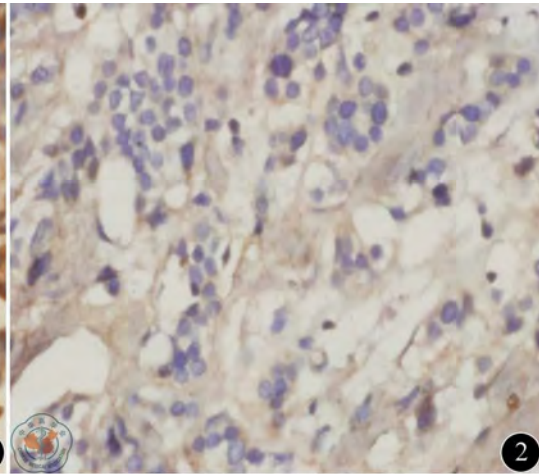


图2 乳腺癌细胞中CXCR4阴性表达(SP × 400)

究结果一致。本研究进一步分析了 CXCR4 表达水平与乳腺癌常用临床病理特征指标(患者年龄、病理类型、ER、PR、Her-2)的关系。其中,Her-2/neu 基因为乳腺癌常表达的原癌基因,位于染色体 17q12 ~ 21,编码分子量为 185 kD 的跨膜蛋白。Her-2 在乳腺癌中表达为 10% ~ 40%。临床上,HER-2 过表达的乳腺癌患者往往生存率低、病情进展迅速、易复发及转移、对化疗缓解期缩短^[15],无病生存期及总生存期均较短。大量临床研究发现,CXCR4 的表达水平与 Her-2 密切相关。Li 等^[16]研究发现 CXCR4 的表达上调在 Her-2 介导的肿瘤转移中发挥重要作用,Her-2 可增强 CXCR4 的表达并阻止其降解,从而影响 CXCL12/CXCR4 生物轴对乳腺癌细胞迁移、侵袭能力的影响。本研究结果显示,CXCR4 的表达与患者年龄、病理类型、ER、PR 无关,与 Her-2 显著正相关。这与许建华等^[17]研究结果相一致。

CXCL12/CXCR4 在调节乳腺癌细胞的生长、增殖及转移中发挥重要作用。AMD3100、TI40、TN14003 等 CXCR4 小分子拮抗剂等能竞争性参与 CXCL12 骨架蛋白的表达,从而抑制肌动蛋白的多聚化和解离,同时促使伪蛋白体的形成和抑制乳腺癌细胞在体外的迁移反应^[18-19]。同时 RNA 干扰研究也发现,直接沉默 CXCR4 能够显著降低乳腺癌细胞的生长和增殖,甚至能够减少乳腺癌肺及骨转移^[20]。阻断 CXCL12/CXCR4 生物轴可能成为乳腺癌治疗的新靶点。

参 考 文 献

[1] Li J, Zhang BN, Fan JH, et al. A nation-wide multicenter 10-year (1999-2008) retrospective clinical epidemiological study of female breast cancer in China. *BMC Cancer*, 2011, 11: 364.

[2] Iwasa S, Yanagawa T, Fan J, et al. Expression of CXCR4 and its ligand SDF-1 in intestinal-type gastric cancer is associated with lymph node and liver metastasis. *Anticancer Res*, 2009, 29: 4751-4758.

[3] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志*, 1996, 6: 229-231.

[4] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, 12: 121-127.

[5] David NB, Sapède D, Saint-Etienne L, et al. Molecular basis of cell migration in fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 16297-16302.

[6] Gassmann P, Haier J, Schluter K, et al. CXCR4 regulates the early ex-

travasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia*, 2009, 11: 651-661.

[7] 安松林, 于泳, 刘君, 等. CXCR4 在乳腺癌中的表达及意义. *中国中西医结合外科杂志*, 2009, 15: 360-363.

[8] 唐晓燕, 仇生龙, 刘俊. CXCR4 在乳腺癌生长和转移中的意义. *现代肿瘤医学*, 2009, 17: 2438-2440.

[9] 郭满盈, 陈扬, 王栋, 等. 乳腺癌患者外周血中趋化因子及其受体的研究. *国际检验医学杂志*, 2010, 31: 54-55.

[10] Schmid BC, Rudas M, Reznicek GA, et al. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. *Breast Cancer Res Treat*, 2004, 84: 247-250.

[11] Smith MC, Luker KE, Garbow JR, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 2004, 64: 8604-8612.

[12] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001, 410: 50-56.

[13] Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, et al. Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. *BMC Cancer*, 2008, 8: 340.

[14] 陈智勇, 陈文有, 杨爱国, 等. 乳腺癌 CXCR4 的表达与淋巴结转移及预后的关系. *福建医药杂志*, 2009, 31: 104-105.

[15] Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, et al. A case of metastasis breast cancer with outgrowth of HER-2 positive cells by humanized anti-HER-2 monoclonal antibody (trastuzumab) combined with docetaxel. *Hum Pathol*, 2004, 35: 379-381.

[16] Li YM, Pan Y, Wei Y, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, 2004, 6: 459-469.

[17] 许建华, 叶凯, 郑正荣, 等. 乳腺癌趋化因子受体 CXCR4 的表达及其意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2009, 3: 37-41.

[18] Hatse S, Princen K, Bridger G, et al. Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett*, 2002, 527: 255-262.

[19] Liang Z, Yoon Y, Votaw J, et al. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2005, 65: 967-971.

[20] Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*, 2008, 451: 147-152.

(收稿日期: 2012-04-24)

(本文编辑: 戚红丹)