

CXCR4 和 MMP-9 在胃癌组织中表达及其与淋巴结转移的关系

徐 斌 韩绍伟 周笑珍 李立义 蒋 平

摘 要 目的 探讨胃癌组织中 CXCR4 和 MMP-9 的表达与淋巴转移的关系及两者的相关性。方法 S-P 免疫组化法及反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CXCR4 和 MMP-9 在 30 例无淋巴转移与 46 例有淋巴转移人胃癌组织中的表达水平。结果 CXCR4 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率为 55.26%, 其中淋巴结转移组阳性表达率分别为 73.91%, 无淋巴转移组阳性表达率为 36.37%, 差异有统计学意义($P=0.000$)。MMP-9 蛋白在胃癌组织中阳性表达率(67.11%), 其中淋巴转移组阳性表达率为 80.43%, 无淋巴转移者和 46.67%, 差异有统计学意义($P=0.002$)。CXCR4 和 MMP-9 蛋白及 mRNA 在胃癌中的阳性表达随淋巴结转移增加而增加, 且 CXCR4 阳性表达与 VEGF-C 阳性表达呈显著正相关($r=0.498, P<0.05$)。结论 胃癌 CXCR4 的表达和 MMP-9 的表达与胃癌淋巴结转移呈正相关, 而且两者之间存在一定相关性, 联合可能对预测胃癌患者淋巴结转移及判断预后具有重要临床价值。

关键词 胃癌 CXCR4 MMP-9 淋巴转移

Correlation of CXCR4 and MMP-9 Expressions with Lymph Node Metastasis in Gastric Cancer. Xu Bin, Han Shaowei, Zhou Xiaozhen, Li Liyi, Jiangping. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the correlation of CXCR4 and MMP-9 expressions with lymph node metastasis in gastric cancer. **Methods** A total of 30 cases of gastric cancer without lymphatic metastasis and 46 cases of gastric cancer with lymphatic metastasis were enrolled in this study. Immunohistochemical staining and RT-PCR were performed to detect the expression of CXCR4 and MMP-9 in gastric cancer. **Results** The total positive rate of CXCR4 expression in these samples was 55.26%. It was higher in these cases with lymph node metastasis than that of patients without lymph node metastasis (73.91% vs 36.37%, $P=0.000$). Meanwhile, the total positive rate of MMP-9 expression in these samples was 67.11%. And the positive rate with lymph node metastasis was higher than that of patients without lymph node metastasis (80.43% vs 46.67%, $P=0.002$). Furthermore, the more lymphatic metastasis, the higher positive expression of CXCR4 and MMP-9 it was. The expression level of CXCR4 and MMP-9 were consistent with each other ($r=0.406, P<0.01$). **Conclusion** Expressions of CXCR4 and MMP-9 are closely related to the lymphatic metastasis of gastric cancer, which may provide an evidence for diagnosis and assessment of prognosis in gastric cancer.

Key words Gastric cancer; CXCR4; MMP-9; Lymphatic metastasis

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均居我国消化道恶性肿瘤的首位。复发和转移是胃癌死亡最主要的原因,其中淋巴转移是最常见的转移方式之一,但分子生物学机制仍不十分明确。研究发现淋巴结转移是胃癌患者预后的独立危险因素,对肿瘤分期和治疗有重要意义^[1]。CXC 趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)是趋化因子家族重要成员,通过与其配体 CXCL12 间的

相互作用在包括胃癌在内的多种肿瘤的发生、进展和转移中发挥着重要的作用^[2]。基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)是一种能降解细胞外基膜及其他细胞外基质成分的重要蛋白酶,具有促进肿瘤浸润和转移的作用。胃癌组织中 CXCR4 与 MMP-9 表达与淋巴转移的关系及其相关性目前尚鲜见报道。本研究应用(RT-PCR)及 S-P 免疫组化方法检测 CXCR4 和 MMP-9 在 30 例无淋巴转移与 46 例有淋巴转移人胃癌组织中的表达水平,并探讨 CXCR4 和 MMP-9 的表达及与胃癌淋巴结转移的关系及两者相关性。

材料与方法

1. 材料:76 例胃癌组织标本取自 2009 年 12 月~2010 年

基金项目:温州市科技计划基金资助项目(Y20090061);温州市瓯海区科技计划资助项目(20090137)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院外科(徐斌、韩绍伟、李立义、蒋平);325027 温州市瓯海区人民医院(周笑珍)

通讯作者:蒋平,硕士生导师,电子邮箱:wzoyubin@yahoo.com.cn

12 月在笔者医院普外科行手术切除术患者,其中男性 52 例,女性 24 例,患者年龄 26~79(57.0±1.8)岁,术前均未行放疗,所有病例术前病例学证实为胃癌。肿瘤分期按照 2002 年国际抗癌联盟(UICC)颁布的胃癌 TNM 分期方案:PN₀30 例,PN₁35 例,PN₂6 例,PN₃5 例。每份标本于术后 10min 内取材于肿瘤组织,正常组织(距肿瘤组织边缘>5cm,做正常对照)。全部标本取材后迅速分成两份,分别置于 10% 中性甲醛中固定和-80℃ 冰箱保存,备用。

2. 试剂:鼠抗人 CXCR4 抗体购至美国 Sigma 公司,兔抗人 MMP-9 抗体购自美国 Epitomics 公司,免疫组化 S-P 试剂盒购自德国宝灵曼公司。CXCR4, MMP-9 引物由北京奥科生物技术公司设计。总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购于美国 Gibico BRL 公司。

3. 方法:(1)S-P 法进行免疫组织化学染色法检测 CXCR4 和 MMP-9 蛋白表达:组织切片脱蜡、脱水及双氧水室温孵育后,组织抗原修复 10min(用 pH 6.0 的 0.01mol/L 柠檬酸缓冲液,于微波炉中 94℃ 加热,每次 5min,共 2 次),滴加一抗和二抗。DAB 显色,显微镜下控制染色程度。操作过程中严格质控。用已知阳性的胃癌切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗,作为阴性对照。(2)免疫组织化学结果判断: CXCR4 和 MMP-9 均为胞膜或胞质表达,以细胞膜和(或)细胞质呈棕黄或棕褐色者为阳性细胞,随机计数 10 个高倍视野(×400),每个视野读取 200 个细胞计数阳性细胞数,计算阳性率,并取平均值。所有切片均用盲法计数。阳性表达判断参照 Mattern 等^[3]的计数方法。(3)反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 CXCR4mRNA 和 MMP-9mRNA 表达:胃癌标本从-80℃ 冰箱内取出后,迅速置于研钵中,在液氮中研磨为粉末状,按试剂盒操作说明提前总 RNA。取 2μg 总 RNA,用 MMLV 反转录酶试剂盒(GIBCO-BRL)合成 cDNA,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内对照。扩增引物为: CXCR4 前向引物 5'-AAGAACTGAGAAGCATGACC-3',后向引物 5'-GAAACTGGAACACAAC-CACC-3',扩增片段大小为 406bp。MMP-9 前向引物 5'-TCAGGGAGACGCCCATTT-3',后向引物 5'-TCGGGCAGAAGC-CGAAG-3',扩增片段大小为 398bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统成像,并确定条带光密度值。

4. 统计学方法:应用 SPSS 15.0 统计软件对实验数据进行分析。采用 Fisher 确切概率法分析 MMP-9 和 CXCR4 表达与淋巴结转移的相关性;MMP-9 与 CXCR4 相关性检验采用 Spearman 等级相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 CXCR4 和 MMP-9 在不同淋巴结转移胃癌组织中的表达

组织来源	n	CXCR4		χ ²	P	MMP-9		χ ²	P
		-	+			-	+		
① 癌旁组织	76	76	0			64	12		
② pN ₀	30	22	8 ^a	1	0.000	16	14 ^d	11.078	0.001
③ pN ₁	35	12	23 ^b	9.873	0.002	9	26 ^e	5.206	0.023
④ pN ₂ +pN ₃	11	0	11 ^c	5.103	0.024	0	11 ^f	3.517	0.061

CXCR4: ① vs ②^a P<0.01; ③ vs ①、②^b P<0.05; ④ vs ①、②、③^c P<0.05。MMP-9: ① vs ②^d P<0.01; ③ vs ①、②^e P<0.05; ④ vs ③^f P>0.05

结 果

1. CXCR4 和 MMP-9 蛋白在胃癌组织中的表达: CXCR4 在癌旁正常胃组织中无阳性表达,在 pN₀ 组胃癌组织中阳性表达率 26.67% (8/30)。MMP-9 在癌旁正常胃组织阳性表达率为 15.79% (12/76),在 pN₀ 组胃癌组织中阳性表达率 46.67% (14/30),差异有统计学意义(P<0.05)。依据 2002 年国际抗癌联盟(UICC)颁布的胃癌 TNM 分期, pN₀ 胃癌组织中 CXCR4 和 MMP-9 的阳性表达率(15.79% 和 46.67%)与 pN₁ 组(65.71% 和 74.29%)差异有统计学意义(χ² = 9.873, P = 0.002 和 χ² = 5.206, P = 0.023);且显著低于 pN₂ + pN₃ 组,差异有统计学意义(P<0.05)(MMP-9 阳性表达在 pN₁ 和 pN₂ + pN₃ 间差异无统计学意义, P = 0.061)。pN₂ 组, pN₃ 组 CXCR4 和 MMP-9 在胃癌组织中的阳性表达率分别为,差异无统计学意义(P>0.05)。各组肿瘤组织切片经 PBS 代替特异性一抗作为空白对照,肿瘤组织镜下均无阳性表达。见图 1、图 2、表 1。

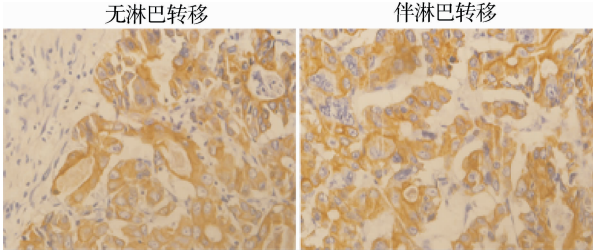


图 1 CXCR4 在胃癌组织中的表达(×400)

免疫组织化学染色法见癌细胞的细胞膜和细胞质被染成淡黄色至棕黄色

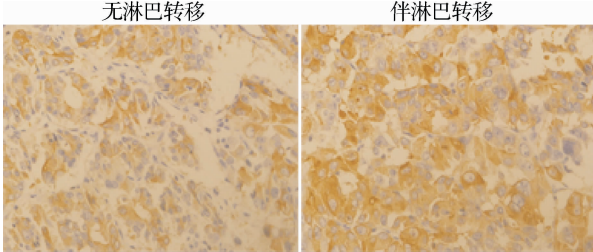


图 2 MMP-9 在胃癌组织中的表达(×400)

免疫组织化学染色法见癌细胞的细胞质被染成呈棕黄、棕褐色

2. CXCR4mRNA 和 MMP-9mRNA 在胃癌组织中的表达: 如图 3 所示, MMP-9mRNA 和 CXCR4mRNA 在胃癌组织中的表达随淋巴转移增加而表达明显上调。

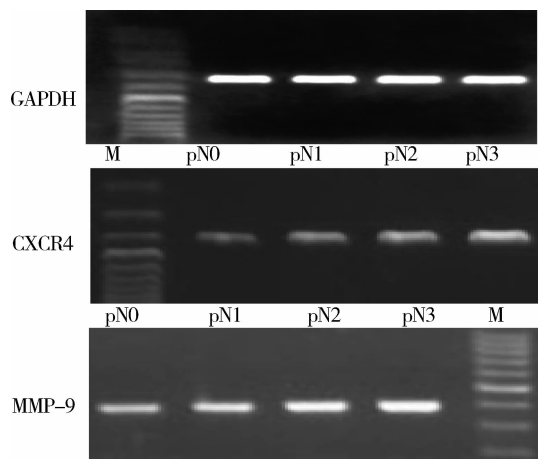


图 3 CXCR4 和 MMP-9 的表达与淋巴转移关系

3. 经 Spearman 等级相关分析: 胃癌组织 CXCR4 的阳性表达水平与 MMP-9 的阳性表达水平呈正相关($r=0.406, P<0.01$), 见表 2。

表 2 胃癌中 CXCR4 与 MMP-9 表达的关系

CXCR4	MMP-9				合计
	-	+	++	+++	
-	18	6	5	5	34
+	3	5	4	2	14
++	2	4	5	6	17
+++	2	0	4	5	11
合计	25	15	18	18	76

讨 论

淋巴结转移是影响胃癌患者根治术后生存率的最重要因素之一, 并且淋巴管浸润是独立的死亡危险因素之一, 其中 MLR 与胃癌患者术后生存时间存在直线关系^[4]。因此早期发现及阻断胃癌淋巴结转移, 从而提高患者预后值得我们进一步研究。

CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor4, CXCR4) 是一个编码 352 个氨基酸且高度保守的 G 蛋白偶联 7 次跨膜受体, 与其特异性配体 CXCL12 所构成的 CXCL12/CXCR4 生物学轴 (CXCL12/CXCR4 biological axis) 在多种肿瘤的侵袭与转移中发挥重要作用^[5]。恶性肿瘤细胞高表达趋化因子受体 CXCR4, 并可能在 CXCL12 趋化、牵引下致使肿瘤细胞转移至作为配体产生源的某些器官 (如肺、骨、肝、

肾、淋巴结等), 从而形成器官特异性的转移^[6]。Kato 等^[7]研究发现 CXCR4 与乳腺癌的侵袭及转移相关, 并且可能促进乳腺癌的淋巴转移。有研究证明 CXCR4 促进子宫颈癌向盆腔淋巴结组织转移^[8]。本实验中, 免疫组织化学法检查结果显示, CXCR4 阳性在伴有淋巴结转移的胃癌组织中阳性表达率为 73.91%, 明显高于无转移者 (36.37%), 并且在 pN₂ + pN₃ 组表达明显高于 pN₁ 组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。笔者还发现, 随淋巴结转移增加 CXCR4 mRNA 表达明显上调 ($P<0.05$)。以上结果提示趋化因子受体 CXCR4 的表达可能促进胃癌的淋巴结转移, 其可能机制为胃癌组织高表达 CXCR4 与淋巴结选择性高表达 CXCR4 特异性配体 CXCL12, 从而促进肿瘤的淋巴转移。另外, Iwanaga 等发现, 表达 CXCR4 的人胃癌裸鼠模型经 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 治疗后的, 肿瘤容积较对照组减小 27.6%, 且未见明显的毒性症状。因此, 阻断 CXCR4 蛋白信号途径可能是治疗胃癌及其转移的有效策略。

MMP-9 (基质金属蛋白酶-9) 是 MMP-s (基质金属蛋白酶) 家族的重要成员之一, 在多种肿瘤的发生、发展中起重要作用。激活状态的 MMP-9 调节 ECM 的降解过程, 水解细胞基膜及外基质中的 IV 型、V 型胶原和凝胶、弹力蛋白成分, 导致基膜破坏, 肿瘤细胞浸润结缔组织基质, 侵入小血管和淋巴管而发生转移。最近发现, MMP-9 在胃黏膜的表达是胃癌发生的晚期事件, 是胃黏膜上皮细胞发生恶变的标志, 其过度表达对胃癌的发生、发展起重要作用^[9]。本实验中, 免疫组化结果显示, MMP-9 在人胃癌组织的阳性表达率明显高于正常胃组织 ($P<0.05$), 伴有淋巴结转移者高于无转移组 ($P<0.05$)。本实验还发现, 随淋巴结转移增加 MMP-9 mRNA 表达明显上调 ($P<0.05$)。说明 MMP-9 与胃癌的发生及淋巴结转移有关, 且 MMP-9 高表达的胃癌组织具有较强的淋巴管侵袭及淋巴结转移能力; MMP-9 可作为评估胃癌恶性程度的及淋巴结转移情况的一个指标。

分析 CXCR4 和 MMP-9 的表达与胃癌淋巴转移的关系发现, 伴有淋巴转移的胃癌组织的 CXCR4 和 MMP-9 的阳性表达明显高于无转移者, 随着胃癌淋巴转移的分期增加, CXCR4 和 MMP-9 的表达相应上调。在 CXCR4 表达上调的胃癌组织, MMP-9 表达亦相应上调。以上结果提示 CXCR4 和 MMP-9 的高表达可能是胃癌淋巴转移的重要分子标志。两者在介导胃癌的淋巴转移间具有协同效应, 然而关于两

者在介导胃癌淋巴转移的具体机制的研究未见报道。进一步研究 CXCR4 和 MMP-9 在胃癌淋巴转移中的相互作用及其机制,有助于进一步阐明胃癌淋巴转移的具体机制,可能为评估胃癌的淋巴转移情况提供分子标志物,并为进一步治疗和预防胃癌的淋巴转移提供实验数据和理论基础。

综上所述,本研究表明 CXCR4 和 MMP-9 的表达与胃癌的淋巴结转移显著相关,并随淋巴转移的分期增加其阳性表达明显上调,而且两者之间存在协同效应。因此笔者推测, CXCR4 和 MMP-9 可能共同介导胃癌的淋巴转移。但其具体机制尚未明确,有待进一步研究。

参考文献

- 1 Degiuli M, Borasi A, Forchino F, *et al.* Lymph-nodal ratio in gastric cancer staging system [J]. *Minerva Chir*, 2011, 66(3):177-182
- 2 Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14:171-179
- 3 Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial

growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 1996, 73(7):931-934

- 4 吴巨钢,倪晓春,俞继卫,等. 胃癌淋巴转移率和预后的关系[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2009, 12(2):202-203
- 5 吕明,赵文华. CXCL12-CXCR4 生物学轴在肿瘤侵袭与转移中的研究进展[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2008, 35(2):90-92
- 6 Saur D, Seidler B, Schneider G, *et al.* CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(4):1237-1250
- 7 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):R144-R150
- 8 苏一乐,宋静慧,吉亚南. 子宫颈癌和盆腔淋巴结组织中趋化因子受体 CXCR4 及其配体 CXCL12 基因 DNA 的表达及其意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2006, 41(10):717-719
- 9 姬瑞,周永宁,任涛文,等. MMP-9 在胃癌及其淋巴结组织中表达的临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2010, 37(7):377-380

(收稿:2011-08-16)

(修回:2011-09-05)

运动血压变异性与蛋白尿、动脉硬化的关系

陈如杰 林孟相 庄荣 金胜威 杨鹏麟

摘要 目的 探讨原发性高血压患者运动血压变异性与尿蛋白、动脉硬化的关系。**方法** 50 例健康人,男性女性各半,平均年龄 64.5 ± 5.1 岁,作为对照组。高血压患者 80 例,平均年龄 65.3 ± 5.7 岁,男性女性各半,作为高血压组。分别测运动血压与 24h 尿蛋白、踝臂动脉脉搏波传导速度(baPWV)。**结果** 高血压组运动血压变异性明显大于对照组($P < 0.05$)。高血压组的 24h 尿蛋白含量、baPWV 均大于对照组($P < 0.05$)。运动血压变异性与 24h 尿蛋白含量、baPWV 均正相关($P < 0.05$)。**结论** 运动血压变异性增大是高血压病的重要特征。运动血压变异性增大易导致动脉硬化及肾功能损害。

关键词 运动血压变异性 蛋白尿 动脉硬化

Exercise Blood Pressure Variability, Albuminuria, and Arterial Stiffness in Essential Hypertension. Chen Rujie, Lin Mengxiang, Zhuang Rong, Jin Shengwei, Yang Penglin. *Intensive Care Unit, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China*

Abstract Objective To explore the relationship of exercise blood pressure variability with urinary albumin excretion and arterial stiffness in patients with essential hypertension. **Methods** Fifty normal persons 64.5 ± 5.1 years old were evenly divided by gender as control group. The study group 65.3 ± 5.7 years old consisted of eighty patients with essential hypertension. Exercise blood pressure was measured by treadmill exercise. 24-hour urine protein was detected with Coomassie brilliant blue method, and arterial stiffness was evaluated on the basis of brachial-ankle pulse wave velocity. **Results** Patients with essential hypertension exhibited greater urine protein and higher pulse wave velocity and exercise blood pressure variability compared with those with normal pressure. In hypertensive group,

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院重症监护病房(陈如杰、林孟相、庄荣、金胜威);心血管内科(杨鹏麟)

通讯作者:杨鹏麟,电子信箱:Yangpln@163.com