

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00639

CXCL12/CXCR4 在涎腺腺样囊性癌及周围神经组织中的表达

孟志兵^{1,2},徐晓刚^{1*},周中华^{1*}

1. 第二军医大学长海医院口腔科,上海 200433

2. 江苏省扬州市第一人民医院口腔科,扬州 225001

[摘要] 目的:探讨趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 与涎腺腺样囊性癌嗜神经侵袭之间的关系。方法:涎腺腺样囊性癌病例标本 41 例,舌癌病例标本 30 例,腮腺多形性腺瘤病例标本 20 例,正常神经组织标本 20 例。所有标本均制成 4 μm 厚的切片。应用 EnVision 法检测 CXCR4 在腺样囊性癌肿瘤组织内的表达以及 CXCL12 在周围神经组织内的表达。结果:腺样囊性癌组织内 CXCR4 阳性表达率为 63.41%,显著高于舌癌(36.67%)及多形性腺瘤(35%) ($P < 0.05$);周围神经组织内 CXCL12 高表达(64.38%),在腺样囊性癌内的神经组织与舌癌内的神经组织及正常神经组织中 CXCL12 阳性率无显著差异。结论:趋化因子受体 CXCR4 在腺样囊性癌中高表达,趋化因子 CXCL12 在周围神经组织内高表达,提示 CXCL12/CXCR4 可能在腺样囊性癌嗜神经侵袭中发挥重要作用。

[关键词] 涎腺肿瘤;腺样囊性癌;趋化因子;受体;神经侵袭

[中图分类号] R 739.87 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0639-04

Expression of CXCL12 and CXCR4 in salivary adenoid cystic carcinoma and peripheral nerve tissues

MENG Zhi-bing^{1,2}, XU Xiao-gang^{1*}, ZHOU Zhong-hua^{1*}

1. Department of Stomatology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Stomatology, The First People's Hospital of Yangzhou, Yangzhou 225001

[ABSTRACT] **Objective:** To study the relationship between CXCL12/CXCR4 expression and the neural invasion of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC). **Methods:** Totally 41 SACC specimens, 30 tongue cancer specimens, 20 pleomorphic adenoma specimens and 20 normal nerve specimens were included in the present study. The specimens were made into sections of 4 μm and EnVision method was used to detect the expression of the chemokine receptor CXCR4 in SACC sections and the expression of the chemokine CXCL12 in the peripheral nerve tissue sections. **Results:** The chemokine receptor was highly expressed in ACC cells. The positive rate of CXCR4 was 63.41% in the SACC sections, which was significantly higher than those in the tongue cancer group (36.67%) and the pleomorphic adenoma parotid group (35%) ($P < 0.05$). The expression of CXCL12 was not significantly different between the nerve tissues of SACC, tongue cancer and the normal nerve tissues. **Conclusion:** The chemokine CXCL12 is elevated in the SACC cells and its receptor CXCR4 is elevated in the peripheral nerve tissues, indicating a role of the biological axis of CXCL12/CXCR4 in the neural invasion of salivary adenoid cystic carcinoma.

[KEY WORDS] salivary gland neoplasms; adenoid cystic carcinoma; chemokines; receptors; neural invasion

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 639-642]

涎腺腺样囊性癌易早期侵袭神经并沿神经组织向远处扩散,严重影响预后。目前关于其嗜神经侵袭的具体机制研究较多,越来越多的研究发现趋化因子及其受体在介导恶性肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。本研究通过免疫组化方法检测 CXCL12/CXCR4 在腺样囊性癌及周围神经组织内的表达,探讨其与涎腺腺样囊性癌嗜神经侵袭的关系。

1 材料和方法

1.1 病例资料 选取第二军医大学长海医院 1996 年 1 月至 2007 年 10 月涎腺腺样囊性癌病例(病理蜡块)共 41 例,其中男性 29 例,女性 12 例,年龄 35~80 岁,中位年龄 47 岁;选取 2005 年 1 月至 2007 年 6 月舌癌病例 30 例,其中男性 19 例,女性 11 例,

[收稿日期] 2008-04-09 **[接受日期]** 2008-05-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30672330). Supported by National Natural Science Foundation of China(30672330).

[作者简介] 孟志兵,硕士生,主治医师. E-mail: mengzhibing@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-25072126, E-mail: xuxiaogangsmmu2008@163.com; Tel: 021-25070637

年龄 32~78 岁,中位年龄 50 岁;选取 2006 年 12 月至 2007 年 6 月腮腺多形性腺瘤病例 20 例,其中男性 9 例,女性 11 例,年龄 22~65 岁,中位年龄 40.5 岁;收集 2006 年 3 月至 2007 年 6 月面颈部手术标本中远离原发灶的正常神经组织 20 例。

1.2 主要试剂 鼠抗人趋化因子受体 CXCR4 单克隆抗体 (MAB172, 500 $\mu\text{g}/\text{支}$), 工作浓度 1 : 250; 鼠抗人趋化因子 CXCL12 单克隆抗体 (MAB350, 500 $\mu\text{g}/\text{支}$), 工作浓度 1 : 100 (购自美国 R&D 公司); 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的即用型多聚化合物酶标记的羊抗鼠二抗 (EnVision 复合物) (购于丹麦 DAKO 公司); pH 6.0 的 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液 (CB); pH 7.4 的 0.01 mol/L PBS; pH 7.8 的 0.01 mol/L TBS; 3'/3-二氨基联苯胺盐酸盐 (DAB); 二甲苯; 无水乙醇; 95% 乙醇; 85% 乙醇; 75% 乙醇; 苏木精。

1.3 实验方法 所有标本制成 4 μm 厚石蜡切片, 应用 EnVision 法检测肿瘤组织内 CXCR4 的表达。另外从 41 例腺样囊性癌中选出包含有神经组织的病例 32 例, 30 例舌癌病例中包含有神经组织病例的 21 例、正常神经组织标本 20 例, 同样制成 4 μm 厚石蜡切片, 应用 EnVision 法检测神经组织内 CXCL12 的表达。

免疫组化实验方法: 4 μm 厚石蜡切片 (采用涂有多聚赖氨酸的载玻片), 58 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 18 h, 脱蜡; 切片置于二甲苯 I、II、III 中各 10 min; 置于无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇中各 2 min, 自来水冲洗 3 min, PBS 洗 3 \times 3 min; 用 CB 热诱导修复 (微波 3 档 20 min), 室温自然冷却; PBS 洗 3 \times 3 min; 0.3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶室温下 20 min; PBS 洗 3 \times 3 min; 滴加 20% 正常羊血清并吸去多余的血清, 室温孵育 30 min, 不洗; 加入稀释度 1 : 250 的 CXCR4 一抗 (1 : 100 的 CXCL12 一抗) 使抗体液覆盖整个组织面; 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 洗 3 min \times 3 次; 滴加即用型 EnVision 试剂 (HRP-M) 使覆盖整个组织, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; 0.05% DAB+0.03% H_2O_2 15 μl 显色 10 min 左右, 流水冲洗终止反应; 苏木精衬染, 热水蓝化; 吹干后, 常规树脂封片。实验中用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫组化阳性表达判定标准 免疫组化切片中细胞胞质、胞核内有棕黄色颗粒者为阳性表达。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示结果差异有统计学意义。

2 结果

2.1 趋化因子 CXCL12 在周围神经组织中的表达情况 趋化因子 CXCL12 在神经组织中有明显表达, 主要定位于神经组织的细胞质内, 少量位于细胞核内 (图 1)。同时在腺样囊性癌及舌癌旁组织中偶见微血管内皮细胞中有表达。从切片中观察到在腺样囊性癌及舌癌中离神经组织较近部位的肿瘤细胞内 CXCL12 表达稍高于远离神经组织的部位。通过对涎腺腺样囊性癌、舌癌中神经组织及正常神经组织 CXCL12 的表达情况分析, 腺样囊性癌切片中神经组织阳性率 (59.38%, 19/32) 低于舌癌组 (61.90%, 13/21) 和正常对照组 (75.00%, 15/20), 但无统计学意义 ($v = 2$, $\chi^2 = 1.3894$, $P = 0.4992$)。

2.2 趋化因子受体 CXCR4 在涎腺腺样囊性癌肿瘤组织内的表达情况 CXCR4 在腺样囊性癌、舌癌及多形性腺瘤细胞中均有表达, 主要定位于细胞质内, 少数位于胞核内 (图 2)。部分肿瘤间质内亦有 CXCR4 表达, 在两种癌周组织中血管内皮细胞内偶见有 CXCR4 表达。腺样囊性癌细胞中 CXCR4 阳性表达率 (63.41%, 26/41), 舌癌细胞阳性表达率 (36.67%, 11/30), 多形性腺瘤细胞阳性表达率 (35.00%, 7/20)。统计学分析表明腺样囊性癌细胞阳性率明显高于舌癌细胞阳性率 ($\chi^2 = 4.9667$, $P = 0.0258$); 腺样囊性癌细胞阳性率明显高于多形性腺瘤 ($\chi^2 = 4.3707$, $P = 0.0366$), 舌癌细胞的阳性率与多形性腺瘤细胞的阳性率相比无统计学意义 ($\chi^2 = 0.0145$, $P = 0.9043$)。

3 讨论

趋化因子 CXCL12 又称基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 或前 B 细胞刺激因子 (pre B cell stimulatory factor, PBSF), 属于 non-ELR-CXC 类趋化因子。CXCR4 是趋化因子受体超家族的重要成员之一, 是具有高度保守的 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体, 是 CXCL12 的特异性受体。

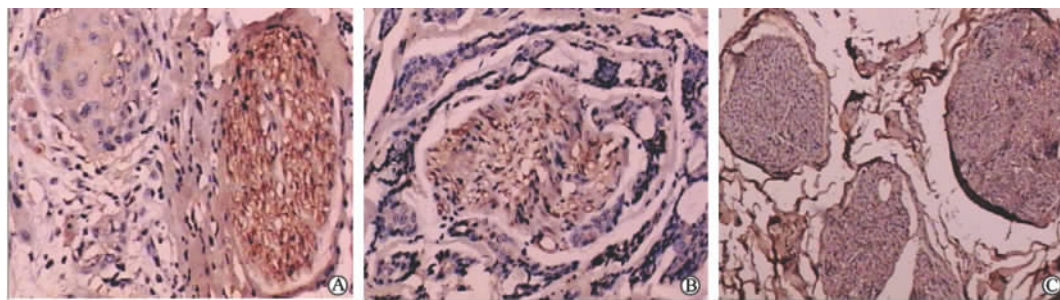


图1 三组标本中CXCL12的表达

Fig 1 CXCL12 expression in 3 groups (Immunohistochemistry)

A: Negative expression of CXCL12 in the tongue cancer cells and positive expression in the nerve tissue. Original magnification: $\times 100$; B: Negative expression of CXCL12 in the SACC cells and positive expression in the nerve tissue. Original magnification: $\times 100$; C: Positive expression of CXCL12 in the normal nerve tissue. Original magnification: $\times 40$

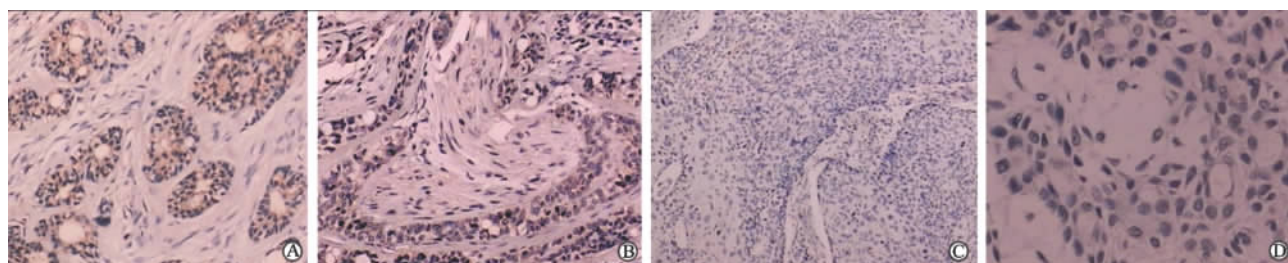


图2 四组标本中CXCR4的表达

Fig 2 CXCR4 expression in 4 groups (Immunohistochemistry)

A: Positive expression of CXCR4 in the SACC cells. Original magnification: $\times 100$; B: Positive expression of CXCR4 in the ACC cells and negative expression in the nerve tissue. Original magnification: $\times 100$; C: Negative expression of CXCR4 in the tongue cancer tissue. Original magnification: $\times 40$; D: Negative expression of CXCR4 in the mixed tumor of parotid gland. Original magnification: $\times 100$

趋化因子CXCL12与受体CXCR4结合后发挥多种功能,除了参与细胞器官的生长发育、分化与凋亡,炎症细胞向炎症部位的聚集迁移,中枢神经系统的发育及其损伤后的再生修复过程^[1-2]等外,还参与肿瘤的发生、发展、侵袭与转移^[3-4]。趋化因子和受体结合后诱导G蛋白复合物中的G α 亚基和G $\beta\gamma$ 亚基解离,G $\beta\gamma$ 亚基结合和活化磷脂酶C、磷脂酰肌醇3激酶和腺苷环化酶等引起一系列细胞内信号传递,使细胞活化,产生趋化运动即细胞定向迁移至趋化因子浓度较高的组织器官部位,并侵入这些器官分裂、增殖。这些器官就是特异性侵袭转移的靶器官。近年来已发现在乳腺癌、卵巢癌、直肠癌等20多种肿瘤细胞内有受体CXCR4明显表达,并发现CXCR4在介导肿瘤细胞侵袭转移中发挥重要作用^[5-6]。有文献提出CXCR4作为检测直肠结肠癌^[7]、膀胱癌^[8]、前列腺癌^[9]、恶性黑色素瘤^[10]等恶性肿瘤转移及预后的重要指标。

Muller等^[11]在乳腺癌研究中发现,在乳腺癌细胞系、乳腺癌患者肿瘤原发灶和转移灶中的癌细胞均见CXCR4高表达,在其最常见的转移部位肺、肝

脏部位相应地高表达其配体CXCL12。肺、肝脏组织的蛋白提取物对乳腺癌细胞有明显的趋化作用。体外实验中运用CXCR4拮抗剂T140或采用RNA技术干扰CXCR4基因表达,发现对乳腺癌细胞迁移有抑制作用。Li等^[12]用RT-PCR和Western印迹等方法检测了卵巢上皮癌患者CXCR4 mRNA的表达水平及作用,发现CXCL12与CXCR4可促进癌细胞和上皮细胞的迁移使卵巢癌发生转移。Phillips等^[13]在手术切除的非小细胞性肺癌(NSCLC)组织和细胞系中均可检测到CXCR4高表达。体外实验发现在CXCL12的作用下,CXCR4阳性的NSCLC细胞会向CXCL12浓度高的部位定向趋化迁移,而在其特异性转移的靶器官如肾上腺、骨髓、肺和肝中有CXCL12高表达,所以NSCLC细胞容易向肾上腺、肺内其他部位、肝内等部位转移。在小鼠NSCLC动物模型中用CXCL12的特异性抗体可显著性地抑制原位肿瘤向肺中其他部位的转移。证实了CXCL12/CXCR4在NSCLC的器官特异性转移中也发挥重要作用。这些均证实了CXCL12/CXCR4生物轴与肿瘤侵袭转移有重要关联。

本实验通过 EnVision 方法检测发现本组腺样囊性癌癌细胞内 CXCR4 表达阳性率显著高于舌癌及多形性腺瘤对照组 ($P < 0.05$), 说明 CXCR4 是腺样囊性癌区别于舌癌及多形性腺瘤的特殊物质之一。同时该实验中发现趋化因子 CXCL12 在周围神经组织胞质、胞核内有明显表达, 并且可以观察到在离神经较近的部位肿瘤细胞内 CXCL12 表达稍多, 远离部位癌细胞内表达较少。考虑 CXCL12 可能来源于神经组织, 神经组织分泌产生 CXCL12 后向周围组织内释放造成该浓度梯度表现, 符合文献提出的神经系统中神经元细胞、神经膜细胞是 CXCL12 的主要来源的说法^[14]。在腺样囊性癌、舌癌病灶内神经组织及正常神经组织中 CXCL12 阳性表达中以腺样囊性癌阳性率稍低 (59.38%), 但统计分析结果无显著差异 ($P > 0.05$)。分析认为神经组织中 CXCL12 的表达与肿瘤组织类型没有明显关系, 肿瘤组织的存在并没有影响到神经组织中 CXCL12 的表达。另外实验中腺样囊性癌病例中的 CXCL12 表达阳性率低于对照组, 可能与实验中采用的标本放置时间长短不一有关。由于腺样囊性癌标本较少见, 所以实验中腺样囊性癌标本有的放置时间已经很久, 标本抗原部分丢失, 而对照组标本相对时间较短。另外本实验中发现在腺样囊性癌、舌癌病灶的微血管内皮细胞内偶见有 CXCR4、CXCL12 的表达, 有文献报道有同样的现象^[15], 考虑与肿瘤内的血管形成、维持微环境的稳定及癌细胞向血管内趋化迁移有关, 但具体意义仍不清楚。

总之, 本实验检测出涎腺腺样囊性癌与周围神经组织内有趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 这一生物轴存在, 神经组织上表达的 CXCL12 可能吸引、捕获有 CXCR4 显著表达的腺样囊性癌细胞, 这种趋化作用可能与腺样囊性癌细胞特异性神经侵袭有关。但 CXCL12/CXCR4 在嗜神经侵袭中具体作用、作用大小以及具体机制等仍需要进一步的深入研究。

[参考文献]

[1] Stumm R, Hollt V. CXC chemokine receptor 4 regulates neuronal migration and axonal pathfinding in the developing nervous system: implications for neuronal regeneration in the adult brain [J]. *J Mol Endocrinol*, 2007, 38: 377-382.

[2] 时小燕, 刘少君. 趋化因子及其家族在中枢神经生长发育、损伤修复中的作用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10: 148-150.

[3] Kumar A, Humphreys T D, Kremer K N, Bramati P S, Bradford L, Edgar C E, et al. CXCR4 physically associates with the

T cell receptor to signal in T cells[J]. *Immunity*, 2006, 25: 213-224.

[4] Majka M, Ratajczak M Z. Biological role of the CXCR4-SDF-1 axis in normal human hematopoietic cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 332: 103-114.

[5] Burger J A, Kipps T J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment [J]. *Blood*, 2006, 107: 1761-1767.

[6] Dewan M Z, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer [J]. *Biomol Pharmacother*, 2006, 60: 273-276.

[7] Schimanski C C, Schwald S, Simiontonaki N, Jayasinghe C, Gonner U, Wilsberg V, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1743-1750.

[8] Eisenhardt A, Frey U, Tack M, Lummen G, Rubben H, Siffert W. Expression analysis and potential functional role of the CXCR4 chemokine receptor in bladder cancer [J]. *Eur Urol*, 2005, 47: 111-117.

[9] Mochizuki H, Matsubara A, Teishima J, Mutaguchi K, Yasumoto H, Dahiya R, et al. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320: 656-663.

[10] Scala S, Ottaiano A, Ascierto P A, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, et al. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 1835-1841.

[11] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M E, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410: 50-56.

[12] Li F, Zhu H S, Han Z Q, Chen G, Gao Q L, Jia P, et al. Effects of chemokine receptor and its ligand on migration of ovarian cancer cells [J]. *Ai Zheng*, 2005, 24: 23-27.

[13] Phillips R J, Burdick M D, Lutz M, Belperio J A, Keane M P, Strieter R M. The stromal derived factor-1 PCXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1676-1686.

[14] Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, et al. Cloning and characterization of SDF-1 γ , a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12: 1857-1866.

[15] Jiang Y P, Wu X H, Shi B, Wu W X, Yin G R. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: An independent prognostic factor for tumor progression [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 103: 226-233.

[本文编辑] 孙岩