

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00901

• 短篇论著 •

趋化因子受体 CXCR4 核定位表达与肾癌转移及预后的相关性

叶学荣[△], 鲍一[△], 王志向, 刘冰, 宋尚卿, 曲乐, 陈俊明, 李鹏, 王林辉*, 孙颖浩
第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨肾癌组织趋化因子受体 CXCR4 核定位表达与肾癌转移及预后的相关性。**方法** 采用免疫荧光染色法检测 413 例肾癌组织 CXCR4 的亚细胞定位表达, 根据染色结果分为核定位阳性表达组及核定位阴性表达组, 对比分析两组患者的临床资料及预后。**结果** 413 例肾癌组织中 170 例 CXCR4 核定位阳性表达, 243 例 CXCR4 核定位阴性表达, 两组基线资料差异无统计学意义。统计分析结果表明: 与核定位阴性表达组相比, 核定位阳性表达组 Robson 分期高、癌栓发生率高、淋巴结转移率高、远处转移率高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。核定位阳性表达组生存率为 86.5% (147/170), 低于核定位阴性表达组 97.1% (236/243), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。**结论** 肾癌组织中 CXCR4 核定位表达与 Robson 分期高、癌栓形成、淋巴结转移、远处转移及患者预后差相关。

[关键词] CXCR4 受体; 核定位; 肾肿瘤; 肿瘤转移; 预后

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)08-0901-04

Nuclear expression of CXCR4 in renal cancer correlates with metastasis and poor survival

YE Xue-rong[△], BAO Yi[△], WANG Zhi-xiang, LIU Bing, SONG Shang-qing, QU Le, CHEN Jun-ming, LI Peng, WANG Lin-hui*, SUN Ying-hao

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the nuclear expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in renal cancer, and analyze its relation with renal cancer metastasis and prognosis. **Methods** A total of 413 patients with renal cancer who were treated in our urologic center from Mar. 2011 to Nov. 2012 were included in the present study. The subcellular expression of CXCR4 was examined by immunofluorescence staining; the correlation between CXCR4 nuclear location and clinical features, prognosis was analyzed. **Results** We found that 170 of the 413 renal cancer patients were CXCR4 nuclear staining-positive (group A), and the rest 243 cases were CXCR4 nuclear staining-negative (group B); the two groups had matchable baseline data. Compared with group B, group A had significantly higher Robson stage ($P < 0.01$), more frequent cancer embolus ($P < 0.01$), more frequent lymphatic metastasis ($P < 0.01$), and more frequent distant metastasis ($P < 0.01$). The overall survival rate of group A (86.5%, 147/170) was significantly lower than that of group B (97.1%, 236/243; $P < 0.001$). **Conclusion** Nuclear expression of CXCR4 in renal cancer tissues is associated with higher Robson stage, more frequent cancer embolus, more frequent lymphatic metastasis, more frequent distant metastasis and poor prognosis.

[Key words] CXCR4 receptors; nuclear localization; kidney neoplasms; neoplasm metastasis; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(8): 901-904]

肾细胞癌是泌尿系统常见肿瘤, 约占所有恶性肿瘤的 2%~3%^[1], 约 1/4 的患者就诊时已有转移。局限性肾癌患者术后预后良好, 而转移性肾癌对于化疗和放疗均不敏感, 免疫治疗、靶向治疗效果也不理想, 预后较差。肾细胞癌转移的影响因素复杂, 转移相关蛋白与其相关^[2]。趋化因子受体 CXCR4

[收稿日期] 2015-02-19 **[接受日期]** 2015-05-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (81272817), 军队临床高新技术重大项目 (2010gxjs057), 上海市市级医院新兴前沿技术联合攻关项目 (SHDC12010115), 上海市自然科学基金 (11ZR1447800)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81272817), Major Project for Clinical High-tech and Innovative Technology of PLA (2010gxjs057), the Municipal Hospitals' Project for Emerging and Frontier Technology of Shanghai (SHDC12010115), and Natural Science Foundation of Shanghai (11ZR1447800)。

[作者简介] 叶学荣, 博士生。E-mail: yexuerong88@126.com; 鲍一, 硕士生。E-mail: baoyi66@foxmail.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors)。

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81872077, E-mail: wlhui@medmail.com.cn

(CXC chemokine receptor 4)与肿瘤转移密切相关,其在细胞核内迁移表达与肾癌细胞高侵袭性和转移性相关^[3],但目前对其在肾癌病理组织中的表达情况尚不清楚。本研究拟观察肾癌组织 CXCR4 的表达情况,并分析其核定位表达与肾癌患者临床病理指标的相关性,为后续研究奠定基础。

1 资料和方法

1.1 一般资料 2011年3月至2012年11月,第二军医大学长海医院泌尿外科收治的肾癌患者413例,男233例,女180例,年龄27~77岁,平均(56.8±10.9)岁,平均体质指数(24.4±3.2) kg/m²。术前均未行放疗和化疗。413例患者术后肾癌病理组织学分类:透明细胞癌355例、肾乳头状细胞癌29例、嫌色细胞癌26例、肉瘤样肾细胞癌3例,其中23例伴肾静脉和(或)下腔静脉癌栓、13例伴区域淋巴结转移、20例伴远处器官转移(肺、骨、肝脏等)。随访时间截至2014年4月15日。本研究经第二军医大学长海医院医学伦理委员会审批通过。患者入院时即签署知情同意书,同意术后肿瘤标本用于科学研究。

1.2 免疫荧光染色法测定肾癌组织 CXCR4 表达 将肾癌石蜡标本以石蜡切片机取4 μm切片,蜡片贴附于多聚赖氨酸处理过的载玻片上;60℃烘片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,枸橼酸液修复抗原;PBS浸洗、透膜剂透膜、滴加封闭血清;滤纸擦去封闭液,加入CXCR4抗体4℃过夜;次日PBS充分洗涤3次,加FITC标记的二抗,室温孵育15 min, PBS洗3次,每次5 min以上;加入DAPI染色3 min后, PBS冲洗1次;50%甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.3 结果判定 制取切片,抗体包埋后,免疫荧光显微镜下观察并拍照,由两位病理科医师双盲判定。判定标准为:(1)每例肾癌病理组织石蜡标本制取4片切片,对每个切片单独评分。(2)镜下观察到癌细胞核内有CXCR4定位,则此切片评定为CXCR4核定位阳性,记1分;反之,评定为阴性,记0分。(3)对4张切片结果汇总,分数总和。总和为0~1分为CXCR4核定位阴性;2~4分为核定位阳性。

1.4 肾癌组织 CXCR4 核转移表达与临床病理指标及预后相关性分析 根据免疫荧光染色结果将患者分为核定位阳性组及核定位阴性组,比较两组

患者的临床病理指标及预后情况。

1.5 统计学处理 采用PASW Statistics 18.0软件进行统计分析,组间比较采用Pearson χ^2 检验或Mann-Whitney 检验,生存率比较采用Kaplan-Meier 检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 肾癌组织 CXCR4 的表达定位情况 免疫荧光显微镜下蓝色荧光、椭圆形的是细胞核,绿色荧光、絮状的是CXCR4蛋白。413例肾癌组织中170例核内CXCR4阳性表达(图1A),243例核内CXCR4阴性表达(图1B)。

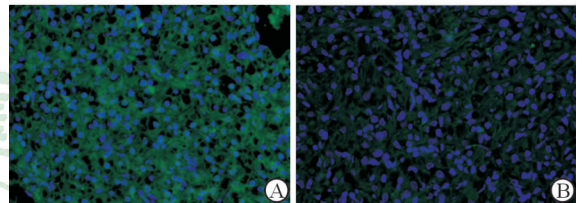


图1 免疫荧光显微镜下观察肾癌组织 CXCR4 的表达

A: CXCR4 核定位阳性表达;B: CXCR4 核定位阴性表达。Original magnification: $\times 400$

2.2 肾癌组织 CXCR4 核转移表达与临床病理指标的相关性 相关性分析结果(表1)表明:两组患者基线资料类似,差异无统计学意义;两组患者Furhman 分级差异无统计学意义($P=0.169$);与核定位阴性表达组相比,核定位阳性表达组Robson分期高、癌栓发生率高、淋巴结转移率高、远处转移率高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 肾癌组织 CXCR4 核转移表达与术后生存率的相关性 随访结果(图2)表明:核转移阳性表达组生存率为86.5%(147/170),低于核转移阴性表达组97.1%(236/243),差异有统计学意义($P<0.001$)。

3 讨论

趋化因子受体CXCR4是趋化因子CXCL12的唯一生理性受体,二者共同表达于心、脑、肾、肺、肝等组织,相互作用构成了与细胞信息传递、迁移密切相关的CXCL12/CXCR4生物轴,在肿瘤、炎症、HIV感染^[4-5]等多种生理、病理过程中发挥重要作用。近年来,CXCL12/CXCR4轴被发现在多种肿瘤的转移中扮演重要角色,与乳腺癌、胃癌、肺癌等肿瘤的转移密切相关^[6-12]。进一步的CXCR4亚细胞

表1 两组患者基线资料的对比

参数	CXCR4 核定位阳性组(N=170)	CXCR4 核定位阴性组(N=243)	P 值
年龄(岁), $\bar{x} \pm s$ (min-max)	56.1 \pm 11.2 (29-77)	57.8 \pm 10.4 (27-76)	0.681 ^a
性别 n(%)			0.459 ^b
男性	100(58.8)	133(54.7)	
女性	70(41.2)	110(45.3)	
体质指数(kg·m ⁻²), $\bar{x} \pm s$ (min-max)	23.9 \pm 2.0(20.8-26.1)	25.0 \pm 3.9(21.2-29.0)	0.218 ^a
Robson 分期 n			0.000 ^a
I	110	226	
II	32	12	
III	14	2	
IV	14	3	
Furhman 分级 n			0.169 ^a
I	21	30	
II	113	179	
III	33	32	
IV	3	2	
癌栓 n			0.000 ^b
阳性	21	2	
阴性	149	241	
淋巴结转移 n			0.001 ^b
阳性	11	2	
阴性	159	241	
远处转移 n			0.000 ^b
阳性	17	3	
阴性	153	240	

a: Mann-Whitney 检验; b: χ^2 检验

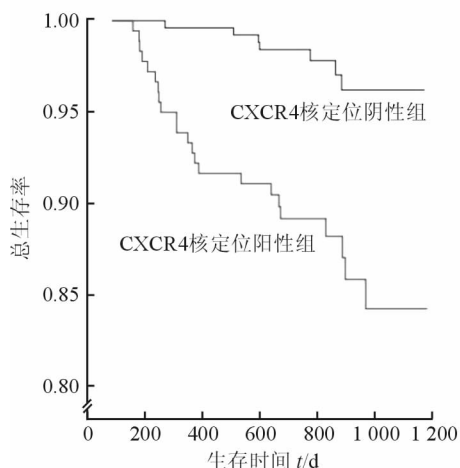


图2 两组患者总生存曲线的对比

定位研究表明, CXCR4 的核转移定位表达与结直肠癌^[13]、肝癌^[14]等的转移及预后密切相关。

目前关于 CXCL12/CXCR4 轴在肾癌中的作用研究较少。我们的前期研究对 97 例肾癌标本进行分析, 检测原发灶、癌旁组织及转移灶 CXCR4 的表达, 发现转移灶 CXCR4 表达最高, 其次是原发灶, 癌

旁组织最少, 并且 CXCR4 高表达提示患者预后差^[15]。进一步应用 RNA 干扰技术降低肾癌 A498 细胞株 CXCR4 基因表达水平, 细胞体外侵袭力明显受抑^[16]; 通过不同浓度 CXCL12 β 刺激体外培养的肾癌 A498 细胞, 进行免疫荧光染色原位观察, 发现经过 CXCL12 β 的刺激, 出现 CXCR4 向细胞核内迁移的现象, 并且这种细胞株侵袭能力明显增高^[3]。这些研究结果提示肾癌组织 CXCR4 核转移定位表达可能与肾癌转移及侵袭相关。

本研究中肾癌组织 CXCR4 总表达率为 92.0%, CXCR4 核定位占 61.0%, 胞质定位占 37.5%, 与既往文献^[15]报道相符。统计分析显示, 肾癌组织 CXCR4 核定位与 Robson 分期、淋巴结转移、癌栓形成、远处转移都有关; 生存率随访显示, CXCR4 核定位与低的总体生存率相关。本研究结果提示 CXCR4 入核后, 肾癌分期、转移性、侵袭性增加, 预后变差, 但其具体的分子机制尚无明确结论。后续研究主要关注于以下几个问题: (1) 核定位的

CXCR4 来源问题。它与肿瘤细胞胞膜、胞质内的 CXCR4 是否同一来源,如果是同一来源,入核是由什么机制诱导?(2)核定位的 CXCR4 在核内是否与特异性 DNA 片段或蛋白结合,可能的片段或位点是什么?(3)核定位的 CXCR4 在核内是否激活了其他信号转导通路?

综上所述,本研究结果表明,CXCR4 核定位与肾癌 Robson 分期、静脉癌栓发生、肿瘤淋巴转移、肿瘤远处转移相关,并且提示预后较差;CXCR4 肾癌细胞核定位可能是肾癌患者预后的潜在判断指标;对 CXCL12/CXCR4 轴的阻断,可能成为肾癌靶向治疗的新策略。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
- [2] Cohen H T, McGovern F J. Renal-cell carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 2477-2490.
- [3] Wang L, Wang L, Yang B, Yang Q, Qiao S, Wang Y, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26: 1049-1054.
- [4] Feng Y, Broder C C, Kennedy P E, Berger E A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [J]. *Science*, 1996, 272: 872-877.
- [5] Müller 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.
- [6] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14: 171-179.
- [7] Chu Q D, Panu L, Holm N T, Li B D, Johnson L W, Zhang S. High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome[J]. *J Surg Res*, 2010, 159: 689-695.
- [8] Chu Q D, Holm N T, Madumere P, Johnson L W, Abreo F, Li B D. Chemokine receptor CXCR4 overexpression predicts recurrence for hormone receptor-positive, node-negative breast cancer patients [J]. *Surgery*, 2011, 149: 193-199.
- [9] Otsuka S, Klimowicz A C, Kopciuk K, Petrillo S K, Konno M, Hao D, et al. CXCR4 overexpression is associated with poor outcome in females diagnosed with stage IV non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6: 1169-1178.
- [10] Chen G, Wang Z, Liu X Y, Liu F Y. High-level CXCR4 expression correlates with brain-specific metastasis of non-small cell lung cancer[J]. *World J Surg*, 2011, 35: 56-61.
- [11] Ying J, Xu Q, Zhang G, Liu B, Zhu L. The expression of CXCL12 and CXCR4 in gastric cancer and their correlation to lymph node metastasis [J]. *Med Oncol*, 2012, 29: 1716-1722.
- [12] Feil C, Augustin H G. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247: 38-45.
- [13] Wang S C, Lin J K, Wang H S, Yang S H, Li A F, Chang S C. Nuclear expression of CXCR4 is associated with advanced colorectal cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25: 1185-1191.
- [14] 向作林, 曾昭冲, 汤钊猷, 樊嘉, 孙惠川, 吴伟忠, 等. 趋化因子受体 4 核阳性以及血管内皮生长因子 C 和细胞角蛋白 19 的表达水平与肝细胞癌淋巴结转移风险的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2010, 32: 344-349.
- [15] Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma[J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10: 212.
- [16] 王林辉, 黄霆, 杨庆, 陈伟, 吴震杰, 孙颖浩. 稳定沉默 CXCR4 表达的肾癌 A498 细胞株的构建[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32: 1103-1107.
- Wang L H, Huang T, Yang Q, Chen W, Wu Z J, Sun Y H. Establishment of a renal carcinoma cell line A498 with CXCR4 stably silenced[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32: 1103-1107.

[本文编辑] 贾泽军