

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01300

趋化因子受体 CXCR4 在肝细胞癌中的表达

刘 辉,周伟平*,傅思源,吴孟超

第二军医大学东方肝胆外科医院肝外三科,上海 200438

[摘要] **目的:**研究趋化因子受体 CXCR4 在肝细胞癌组织、肝癌 MHCC97 细胞、人脐带血管内皮细胞(HUVEC)中的表达,同时检测肝癌患者腹水中 CXCR4 的配体 CXCL12 的含量,为进一步探讨 CXCR4 在肝癌细胞转移中的作用奠定基础。**方法:**利用半定量 RT-PCR 和蛋白印迹方法检测 MHCC97 细胞、HUVEC 细胞、21 例不同时期的肝细胞癌组织及 17 例正常肝组织中 CXCR4 的表达水平,同时 ELISA 检测 18 例肝癌患者腹水中 CXCL12 的含量。**结果:**在肝细胞癌组织、肝癌细胞株及血管内皮细胞中,CXCR4 在 mRNA 及蛋白水平的相对表达量分别为 2.21 ± 1.09 、 2.14 ± 1.15 、 1.72 ± 1.20 及 1.51 ± 0.12 、 1.76 ± 0.25 、 1.89 ± 0.24 ,正常肝脏组织在 mRNA 及蛋白水平均未检测到 CXCR4 的表达。肝细胞癌癌性腹水定量检查结果显示,CXCL12 含量为 783~8 364 pg/ml(中位数为 6 871 pg/ml)。**结论:**肝细胞癌组织和细胞中存在着 CXCR4 的高表达,但与肝癌临床分期无显著性相关,同时肝癌患者腹水中存在 CXCL12 的含量升高,这提示 CXCR4 可能在肝癌的转移中发挥重要的作用。

[关键词] 肿瘤;肝细胞癌;MHCC97 细胞;HUVE 细胞;CXCR4 受体;CXCL12

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1300-03

Expression of chemokine receptor CXCR4 in hepatocellular carcinoma

LIU Hui,ZHOU Wei-ping*,FU Si-yuan,WU Meng-chao

The Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of chemokine receptor CXCR4 in hepatocellular carcinoma tissues, hepatocellular carcinoma cell line-MHCC97, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the ascites level of CXCL12, ligand of CXCR4, so as to lay a foundation for studying the role of CXCR4 in the metastasis of hepatocellular carcinoma. **Methods:** The expression of CXCR4 mRNA and protein was examined by RT-PCR and Western blotting in 21 specimens of hepatocellular carcinoma tissues, MHCC97 cells, HUVECs, and 17 specimens of normal hepatic tissues. Meanwhile, the levels of CXCL12 in ascitic fluids were assayed by ELISA in 18 hepatic cancer patients. **Results:** The relative expression values of CXCR4 mRNA in hepatocellular carcinoma tissues, MHCC97 cells, and HVECs were 2.21 ± 1.09 , 2.14 ± 1.15 and 1.72 ± 1.20 , respectively; and those of CXCR4 protein were 1.51 ± 0.12 , 1.76 ± 0.25 , and 1.89 ± 0.24 , respectively; and those of CXCR4 protein were 1.51 ± 0.12 , 1.76 ± 0.25 , and 1.89 ± 0.24 , respectively. CXCR4 mRNA and protein were not detected in normal hepatic tissues. ELISA results showed that the 18 hepatocellular carcinoma samples had a CXCL12 concentration range of 783-8 364 pg/ml (median value 6 871 pg/ml) in ascitic fluids. **Conclusion:** CXCR4 is highly expressed in the hepatocellular carcinoma tissues and cells, which is not associated with the clinical staging of the cancer. The elevated CXCL12 level in the ascitic fluid of cancer patients indicate that CXCR4 may play an important role in the metastasis of hepatocellular carcinoma.

[KEY WORDS] liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; MHCC97 cell; HUVEC cell; CXCR4 receptors; CXCL12

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1300-1302]

肝癌是一种恶性程度极高的肿瘤,是我国及亚洲地区的常见病,90%以上肝癌为原发性肝癌,其治疗仍以手术切除为首选。肝癌早期多无临床症状,绝大部分患者发现时已属于中晚期,且70%以上已

经发生转移,丧失了手术时机,因此研究肝癌细胞的转移机制具有重要的现实意义。

最近研究表明,趋化性细胞因子及其受体的相互作用可能在癌症的定向转移过程中起着关键作

[收稿日期] 2008-04-20 **[接受日期]** 2008-06-18

[作者简介] 刘 辉,博士. E-mail:liuhuigg@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-65564166, E-mail:weiping.zhou@hotmail.com

用^[1-2],其中最令人瞩目的是趋化因子受体 CXCR4 与其配体 CXCL12 的相互作用(CXCR4/CXCL12 轴)与多种癌症发展及转移密切相关。本研究从转录和翻译水平上研究 CXCR4 在肝癌组织及肝癌细胞株中的表达情况,同时应用 ELISA 方法检测肝癌患者腹水中 CXCR4 的特异性配体 CXCL12 的含量,为深入探讨 CXCR4 在肝癌转移中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系 MHCC97 细胞株为人肝细胞癌细胞株,HUVEC 细胞株为人脐带血管内皮细胞株,均由第二军医大学生物信号转导研究室保存、提供。

1.2 临床标本 选取 2006 年 3 月至 2006 年 5 月间在我院住院手术治疗的病例 21 例,在手术中无菌收集肝细胞癌患者的肝细胞癌组织,同时收集无血液污染的上述肝细胞癌患者的腹水置于无菌离心管,-70℃ 保存(检测 CXCL12 的含量)。所有病例均经术后病理学检查证实为肝细胞癌,其中肝细胞癌粗梁型 12 例,肝细胞癌细梁型 7 例,肝细胞癌团块型 2 例;按国际抗癌联盟(UICC)肝细胞癌 TNM 分期标准分期,其中 I 期 15 例,II 期 5 例,III 期 1 例,患者年龄 23~72 岁,中位年龄 51 岁。正常对照组选取同期手术的良性肝脏肿瘤患者 17 例,其中患者年龄 31~60 岁,中位年龄 43 岁,取其正常肝脏组织(经术后病理学检查证实)进行实验。

1.3 CXCR4 mRNA 表达水平的测定 用 TRIzol 试剂一步法提取肝细胞癌组织、正常肝组织、MHCC97、HUVEC 细胞中的总 RNA,然后用 MMLV 逆转录酶进行逆转录,PCR 扩增 CXCR4,同时扩增 GAPDH 作为内参照。整个 RT-PCR 过程独立重复 3 次,以 3 次实验所得光密度值(D)的平均数表示 mRNA 含量。CXCR4 引物序列为:正义链 5'-AGC TGT TGG TGA AAA GGT GGT CTA TG-3',反义链 5'-GCG CTT CTG GTG GCC CTT GGA GTG TG-3'。

1.4 蛋白免疫印迹分析 CXCR4 表达 将同样大小肝细胞癌组织及正常肝脏组织匀浆,参照文献方法^[3]提取蛋白。取 80 μg 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭 1 h 后,加入含 0.05% Tween20 的 TBS 缓冲液稀释的 CXCR4 兔抗人单克隆抗体(1:500,R&D 公司产品),4℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次后,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000),37℃ 温育 1 h,增强化学发光系统显色。利用投射仪图像分析系统扫描确定 X

线片上杂交条带的光密度值,实验独立重复 3 次,以平均值表示蛋白含量。

1.5 ELISA 检测肝细胞癌患者腹水中 CXCL12 水平 肝细胞癌患者腹水中趋化因子 CXCL12 的含量用 ELISA 试剂盒(Ferment 公司产品)检测,按照试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件对实验数据进行处理,CXCR4 mRNA 和蛋白在不同组织中的表达的比较用 χ^2 检验,CXCR4 的表达与临床病理分期的相关性分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 CXCR4 mRNA 水平的表达 肝细胞癌 MHCC97 细胞和血管内皮 HUVEC 细胞 CXCR4 的 mRNA 相对表达量分别为 2.14 ± 1.15 和 1.72 ± 1.20 ,21 例肝细胞癌组织表达 CXCR4 mRNA,其相对表达量为 2.21 ± 1.09 ,并且与临床分期无显著性相关。正常对照组未检测出 CXCR4 mRNA 的表达。电泳结果见图 1。

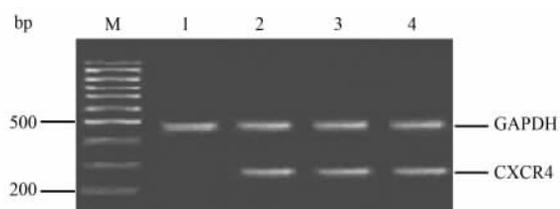


图 1 不同组织和细胞系中 CXCR4 mRNA 的表达

Fig 1 Expression of CXCR4 mRNA in different tissues and cell lines

M: DNA marker; 1: Normal liver tissue; 2: Hepatocellular carcinoma tissue; 3: MHCC97 cells; 4: HUVEC cells

2.2 CXCR4 蛋白的表达 21 例肝细胞癌组织均可见 CXCR4 蛋白表达,其蛋白相对表达量为 1.51 ± 0.12 。MHCC97 细胞、HUVEC 细胞的 CXCR4 蛋白相对表达量分别为 1.76 ± 0.25 和 1.89 ± 0.24 ,正常对照组未检测到 CXCR4 蛋白表达(图 2)。

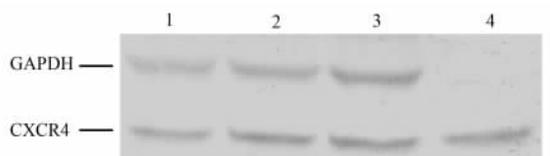


图 2 肝细胞癌组织、MHCC97 细胞、HUVEC 细胞 CXCR4 蛋白的表达

Fig 2 Expression of CXCR4 protein in hepatocellular carcinoma tissue, normal liver tissue, MHCC97 and HUVEC cells
1: Hepatocellular carcinoma tissue; 2: MHCC97 cells; 3: HUVEC cells; 4: Normal liver tissue

2.3 肝细胞癌患者腹水中 CXCL12 的含量 对 18 例肝细胞癌患者腹水中 CXCL12 的含量进行定量检测,在所有的标本中均发现趋化因子 CXCL12,其含量为 783~8 364 pg/ml(中位数为 6 871 pg/ml)。

3 讨论

趋化因子受体 CXCR4 是一种表达于多种细胞上的含有 7 个跨膜区的 G 蛋白偶联受体,其在免疫系统和中枢神经系统的细胞中广泛表达^[4]。目前大部分学者认为 CXCR4 是 CXCL12 唯一的受体,CXCR4 通过作用于特异性的配体 CXCL12 参与多种生理和病理过程。CXCL12 由基质细胞持续产生,为持续表达性趋化因子,无病原侵入时体内就有稳定表达,只是表达量较低。趋化因子主要由肿瘤细胞和肿瘤间质细胞产生,其中肿瘤间质细胞包括血管内皮细胞和趋化因子介导浸润的巨噬细胞、树突状细胞、淋巴细胞和 NK 细胞等^[5]。研究表明 CXCR4/CXCL12 在机体免疫系统中如造血干细胞归巢、淋巴细胞迁移和 HIV 感染等方面发挥着重要作用^[6-7]。

近来研究发现,肿瘤细胞过表达的趋化因子 CXCR4 及其配体 CXCL12 不仅直接促进细胞增殖,还通过促血管生成及抗凋亡的间接作用来促进肿瘤细胞的生长。Müller 等^[8]在研究中发现 CXCR4 在人类乳腺癌中高表达,而 CXCR4 的特异性配体 CXCL12 在乳腺癌容易发生转移的器官中高表达,如肺、骨和脑,而这些部位也是肝癌的转移好发部位。Orimo 等^[9]发现在乳腺癌中,CXCL12 以剂量依赖方式促进高表达 CXCR4 的乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,抗 CXCR4 抗体能抑制 CXCL12 诱导的细胞增殖效应。Yang 等^[10]发现 CXCL12 依赖的肿瘤是通过持续抑制 cAMP 的产生来促进肿瘤细胞生长,CXCR4 拮抗剂 AMD 3465 的抗肿瘤活性与阻断 cAMP 的抑制作用有关,提示 CXCR4 的促细胞增殖作用可能与 cAMP 有关。本研究中发现肝癌组织中均有不同程度的 CXCR4 的表达,而正常肝组织 CXCR4 表达阴性,而在肝癌患者的腹水中,均发现有 CXCL12,提示 CXCR4 的高表达与肝癌的恶性表现有关,标志着肿瘤细胞恶性转化,可能通过上述机制参与了肿瘤的发生、发展。

Jiang 等^[11]研究发现,CXCR4 是内皮细胞表达的一种主要的趋化性细胞因子受体。一些细胞因子可以明显上调 CXCR4 在内皮细胞上的表达,使内皮细胞对 CXCL12 的反应性增加。反过来,CX-

CL12/CXCR4 也可以增加内皮细胞合成和释放 VEGF,从而形成一个正反馈过程,促进血管的生成。本实验中发现除了肝癌组织高表达 CXCR4 外,肝癌细胞 MHCC97 和血管内皮细胞 HVUEC 也高表达 CXCR4,提示肝癌的侵袭和转移有可能与 CXCR4 通过促进血管生成有关。

综上所述,CXCR4/CXCL12 受体配体系统可能与肝细胞癌的转移有密切关系,因此,研究肿瘤细胞迁移的机制、探讨 CXCR4 在肝细胞癌细胞迁移中的作用有助于我们寻找肝细胞癌治疗的分子靶点。

[参考文献]

- [1] Benovic J L, Marchese A. A new key in breast cancer metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6: 429-430.
- [2] Smith M C, Luker K E, Garbow J R, Prior J L, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 8604-8612.
- [3] Payne A S, Cornelius L A. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis[J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 118: 915-922.
- [4] Raman D, Baugher P J, Thu Y M, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth[J]. *Cancer Lett*, 2007, 256: 137-165.
- [5] Li M, Ransohoff R M. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology[J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 84: 116-131.
- [6] Nie Y, Han Y C, Zou Y R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells [J]. *J Exp Med*, 2008, 205: 777-783.
- [7] Lapidot A, Peled A, Berchanski A, Pal B, Kollet O, Lapidot T, et al. NeoR6 inhibits HIV-1-CXCR4 interaction without affecting CXCL12 chemotaxis activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780: 914-920.
- [8] 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.
- [9] Orimo A, Gupta P B, Sgroi D C, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Neaem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. *Cell*, 2005, 121: 335-348.
- [10] Yang L, Jackson E, Woerner B M, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin J B. Blocking CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 651-658.
- [11] 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.