CXCR4 基因在食管鳞癌患者术后早期复发转移中表达的研究

刘永煜,杨成良,乔　雪,孙麒翔
(1.辽宁省肿瘤医院,辽宁省食管癌重点实验室,辽宁 沈阳 110042)

摘　要:［目的］评价 CXCR4 基因在食管鳞癌术后早期复发转移患者中的表达。［方法］选择 43 例术后早期复发转移食管鳞癌标本、46 例术后 1 年内未发生复发转移食管鳞癌标本和 17 例正常食管组织标本，应用 RT-PCR 和 Western Blot 方法检测标本中 CXCR4 基因 mRNA 和蛋白的表达情况。［结果］与术后 1 年内未发生复发转移食管鳞癌组织和正常食管组织相比，术后早期复发转移食管鳞癌标本 CXCR4 基因的 mRNA 和蛋白的表达存在明显上调,差异有统计学意义(P<0.05)。［结论］在食管鳞癌组织中 CXCR4 基因表达的改变可能与肿瘤复发转移有关。

关键词:食管癌;复发;转移;CXCR4
中图分类号:R735.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1004-0242(2012)04-0306-03

The Expression of CXCR4 Gene in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Patients with Early Postoperative Recurrence and Metastasis

LIU Yong-yu, YANG Cheng-liang, QIAO Xue, et al.
(Liaoning Cancer Hospital, Liaoning Province Key Laboratory of Esophageal Cancer, Shenyang 110042, China)

Abstract: ［Purpose］ To investigate the expression of CXCR4 gene in esophageal squamous cell patients with early postoperative recurrence and metastasis. ［Methods］ Forty-three tissue samples with early postoperative recurrence and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma, 46 tissue samples with postoperative esophageal squamous cell carcinoma without recurrence or metastasis within one year, and 17 samples with normal esophageal tissue were enrolled. mRNA and protein of CXCR4 expressions were detected by RT-PCR and western blot. ［Results］ Compared to postoperative esophageal squamous cell carcinoma without recurrence within one year and normal esophageal tissues, CXCR4 mRNA and protein expression in case with early postoperative recurrence and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma tissue samples were up-regulated with statistically different (P<0.05). ［Conclusions］ CXCR4 in esophageal squamous cell carcinoma gene expression changes may be related to tumor recurrence and metastasis.
Key words: esophageal carcinoma; recurrence; metastasis; CXCR4

手术治疗是目前治疗食管癌公认的有效方式之一，经过彻底的原发病灶切除和规范的系统淋巴结清扫,却有相当一部分肿瘤分期低、术前无明显转移证据的食管癌患者在行肿瘤根治术后早期发生复发转移,预后更差[1]。近年研究显示,肿瘤细胞可以表达某些趋化因子或趋化因子受体，并且趋化因子及其受体可能通过与炎症细胞浸润相似的机制参与肿瘤细胞的发生、发展与侵袭转移过程。已证实趋化因子(chemokines)在为炎症细胞提供迁移信号、并使之活化，进而启动其定向移动并使之准确定位中扮演着至关重要的角色。CXC 趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor 4,CXCR4) 与其配体趋化因子 CXCL12 相互作用构成一个细胞信息传递的生物学轴,决定着肿瘤细胞的生长与转移过程。目前,在肺癌、卵巢癌、乳腺癌、白血病和食管癌等恶性肿瘤中均发现 CXCR4 的异常表达[2,3]。本研究应用 RT-PCR

收稿日期:2012-01-02
基金项目:辽宁省医学高峰建设工程项目(2010079);
辽宁省食管癌重点实验室建设专项基金(2011-20);
辽宁省"百千万人才工程"资助项目(2009-390);
辽宁省医学重点专科建设项目(200824)
通讯作者:刘永煜,E-mail: liuyongyu_china@126.com

和 Western Blot 方法检测 CXCR4 基因在人食管恶性肿瘤的表达改变，明确其与食管癌术后早期复发转移的相关性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

43 例术后早期复发转移食管鳞癌标本、46 例术后 1 年内未发生复发转移食管鳞癌标本和 17 例正常食管组织标本来源于 2009 年 1 月至 2010 年 10 月辽宁省肿瘤医院胸外科住院患者，其中男性 73 例，女性 33 例，平均年龄 57 岁。根治性手术切除原发肿瘤组织均经病理诊断证实，且临床资料完整，所有患者术前均未接受任何放化疗等抗肿瘤治疗。组织标本切除后在辽宁省肿瘤医院食管癌标本库液氮中保存。

1.2 研究方法

1.2.1 RT-PCR

采用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取食管癌组织中的总 RNA，利用 RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 试剂盒(TaKaRa)进行 RT-PCR，应用 Primer5.0 设计引物，引物由上海生工生物技术公司合成，CXCR4 引物序列上游为 5′-AGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGAT-3′，下游为 5′-AGGATGGGGATGATTGTGGTCTTGA-3′，以管家基因(GAPDH)为内参，序列上游为 5′-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3′，下游为 5′-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3′。RT-PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳，用自动电泳凝胶成像分析系(Biolmaging Systems)，测定扩增带灰度值，得到 mRNA 的相对表达量。每组实验重复 3 次。

1.2.2 Western Blot

取适量组织加入 500μl 预冷裂解液（含蛋白酶抑制剂)中冰浴下超声处理制成匀浆，低温高速离心(4℃，13 000rpm，45min)后收集上清。用 BCA 法进行蛋白定量，计算各样品蛋白浓度。加入样品缓冲液，沸水煮 5min。进行 SDS-PAGE 电泳 1.5h 后，转印至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 1h，经 TTBS(20mmol/L Tris-HCl，500mmol/L NaCl，0.05% Tween-20)冲洗 3 次，单克隆抗体 CXCR4(1:500)4℃孵育过夜后，辣根过氧化物酶标记二抗 37℃孵育 1h，TTBS 洗 3 次后 ECL 发光显影。以 GAPDH 为内参，用凝胶成像分析系统(Biolmaging Systems，美国)测定条带灰度值，并取其与 GAPDH 的比值作为相对表达量。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

计量资料以均数±标准差表示，数据分析采用 SPSS 13.0 进行 t 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

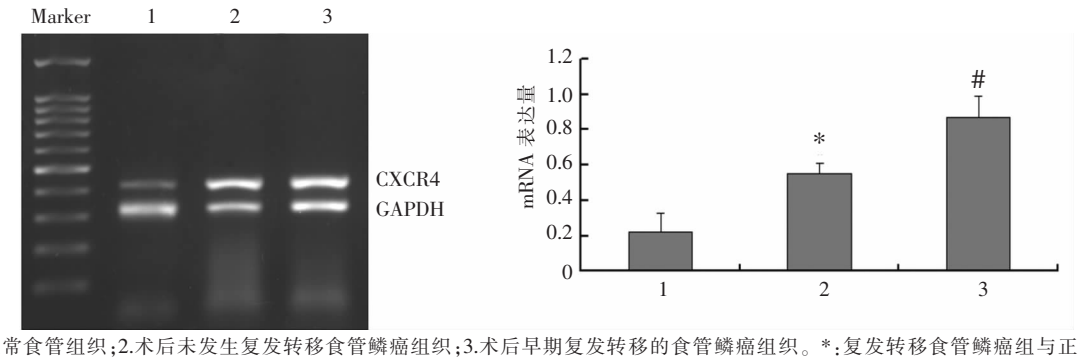
2 结 果

2.1 RT-PCR 结果

在术后早期复发转移的食管鳞癌组织中 CXCR4 mRNA 表达显著高于术后 1 年内未发生复发转移食管鳞癌组织和正常食管组织标本（图 1)，差异有统计学意义($P<0.05$)。

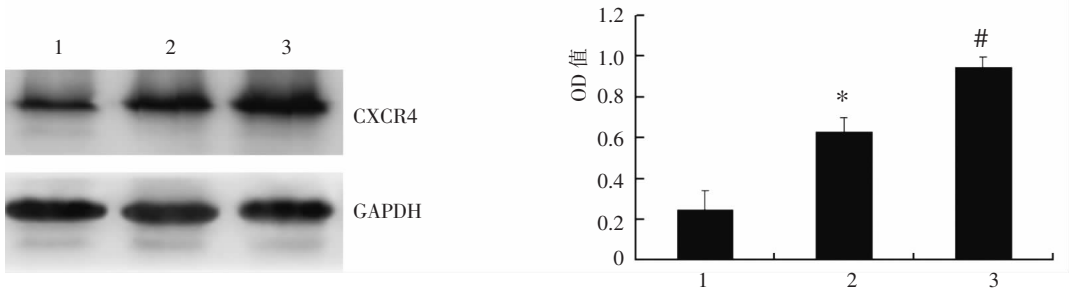
2.2 Western Blot 结果

Western Blot 结果也证实了在 RT-PCR 中观察到的结果，术后早期复发转移的食管鳞癌组织中 CXCR4 的蛋白表达明显增强(图 2)，显著高于术后 1 年内未发生复发转移食管鳞癌组织和正常食管组织 CXCR4 蛋白的表达($P<0.05$)。



1.正常食管组织；2.术后未发生复发转移食管鳞癌组织；3.术后早期复发转移的食管鳞癌组织。*：复发转移食管鳞癌组与正常食管组织组比较 $P<0.05$；#：复发转移食管鳞癌组与正常食管组织组和未发生复发转移食管鳞癌组织组比较 $P<0.05$。

图 1 CXCR4 mRNA 在食管鳞癌中的表达(RT-PCR)



1.正常食管组织;2.术后未发生复发转移食管鳞癌组织;3.术后早期复发转移的食管鳞癌组织。*:复发转移食管鳞癌组与正常食管组织组比较 $P<0.05$;#:复发转移食管鳞癌组与正常食管组织组和未发生复发转移食管鳞癌组织组比较 $P<0.05$。

图 2　CXCR4 蛋白在食管鳞癌中的表达(Western Blot)

3　讨　论

侵袭、转移是恶性肿瘤的重要生物学特征,也是大部分肿瘤治疗失败的重要原因之一。侵袭是指肿瘤细胞侵犯和破坏其周围的正常组织，进入循环系统的过程。转移是指肿瘤细胞迁徙到特定组织器官并发展成为继发性肿瘤病灶的过程，这两个过程是肿瘤发展不可分割的两个阶段,前者为前奏,后者为结果。研究表明趋化因子受体及其配体与肿瘤细胞的定向迁移、侵袭和转移有着密切的关系,在肿瘤发生发展过程中,趋化因子参与了肿瘤细胞的移动、归巢和转移的控制[4]。趋化因子受体 4(CXCR4)又称 Fusin,基因位于 ZqZI,mRNA 约 1.7kb,是一个编码 352 个氨基酸且高度保守的 G 蛋白耦联的 7 次跨膜蛋白受体。N 端在胞膜外,7 个跨膜(transmembrane-domain,TMD)为 α 螺旋,形成了胞内及胞外 3 个环链结构,受体 N 端为配体的主要结合部位,对两者亲和力及结合物稳定性起重要作用的还包括胞内第二环链及胞外第三环链,前者存在“DRY”区域与 G 蛋白耦联维持结合物的稳定性,后者在除辅助 N 端结合配体外还对信号传导有着重要作用[5]。

本研究应用 RT-PCR 和 Western Blot 检测发现,CXCR4 基因的 mRNA 和蛋白的表达在正常食管组织、术后 1 年内未发生复发转移食管鳞癌组织和术后早期复发转移食管鳞癌组织标本中呈明显梯度式上调表达。提示 CXCR4 基因与食管癌复发转移有关。Darash 等[6]的体外研究发现 CXCR4 可以上调前列腺癌细胞株中转移相关蛋白 MMP-9、VEGF 表达,从而促进肿瘤的血管新生,侵袭和转移。Hao 等[7]发现手术切除的乳腺癌标本中 CXCR4 和 VEGF、MMP-9 的表达之间有明显的相关性,并且与淋巴结转移相关。Gockel 等[8]研究认为无论是鳞癌还是腺癌,CXCR4 蛋白高表达均提示不良预后，但两种组织类型间的差异无统计学意义，证明其表达与病理类型无关。Kaifi 等[9]研究也认为 CXCR4 表达是食管癌的独立预后因子，与无瘤生存和总生存时间呈负相关。我们的研究认为,CXCR4 可能参与了食管癌复发转移的过程，是一个有前景的抗肿瘤药物作用靶点，但 CXCR4 基因在食管癌中发挥的确切的分子机制需要进一步深入研究。

参考文献:

[1] Chen J, Zhu J, Pan J, et al. Postoperative radiotherapy improved survival of poor prognostic squamous cell carcinoma esophagus[J]. Ann Thorac Surg, 2010, 90(2): 435-442.
[2] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4 [J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(3):71-179.
[3] Sasaki K,Natsugoe S, Ishigami S, et al. Expression of CXCLl2 and its receptor CXCR4 correlates with lymph node metastasis in submucosal esophageal cancer [J]. J Surg Oncol, 2008, 97(5): 433-438.
[4] Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis[J]. N Engl J Med, 2001, 345(11): 833-835.
[5] Kryczek I, Wei S, Keller E, et al. Stroma-derived factor (SDF-/CXCLl2)and human tumor pathogenesis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(3): 987-995.
[6] Darash Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis [J]. Faseb J, 2004, 18 (11): 1240-1242.
[7] Hao L, Zhang C, Qiu Y, et al. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP29 predicting lymph node metastasis in human breast cancer[J]. Cancer Lett, 2007, 253(1): 34-42.
[8] Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell-land adenocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 290.
[9] Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P, et al. Tumor-cellhoming to lymph nodes and bonemarrow and CXCR4 expression in esophageal caneer [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(24): 1840-1847.