

趋化因子 CXCL5 及受体 CXCR2 在肝细胞癌中的表达及其与临床预后的关系

黄 山¹, 黄盛鑫², 王 琪¹, 杨 琦¹, 刘 柯¹, 吴飞翔¹

(1. 广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021;

2. 汕头市中心医院, 中山大学附属汕头医院, 广东 汕头 515000)

摘 要: [目的] 探讨趋化因子 CXCL5 及其受体 CXCR2 与肝细胞癌(HCC)的临床病理特征和术后复发的关系。[方法] 根据随访结果, 分为早期复发组、非早期复发组和无复发组。运用荧光定量 PCR 检测 3 组肝癌患者组织中 CXCL5 和 CXCR2 的相对表达量。[结果] CXCL5 在早期复发组的相对表达量高于无复发组($P=0.011$); 与临床分期和 HBsAg 状态有关($P<0.05$)。CXCR2 在早期复发组的相对表达量高于无复发组($P<0.001$), 同时高于非早期复发组($P=0.005$); 与临床分期、肿瘤直径和 HBsAg 状态有关($P<0.05$)。CXCL5-CXCR2 共同高表达患者的 5 年累积生存率明显低于其他患者($P=0.005$)。[结论] CXCL5 和 CXCR2 在肝癌中高表达, 并与临床病理特征和术后复发有关。CXCL5 和 CXCR2 有望成为肝癌术后预后判断的指标。

关键词: 肝肿瘤; 趋化因子; CXCL5; CXCR2; 预后

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)08-0659-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.08.B010

Expression of CXCL5 and CXCR2 in Hepatocellular Carcinoma and Its Relationship with Prognosis

HUANG Shan¹, HUANG Sheng-xin², WANG Qi¹, et al.

(1. Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Shantou Central Hospital, Affiliated Shantou Hospital of Sun Yat-sen University, Shantou 515000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of chemokine CXCL5 and its receptor CXCR2 in hepatocellular carcinoma(HCC) and its relationship with clinical pathological features and prognosis. [Methods] Based on the results of follow-up, all patients were divided into early relapse group, non-early relapse group and relapse-free group. The relative expression of CXCL5 and CXCR2 in the three groups of HCC patients was detected by quantitative PCR. [Results] The relative expression of CXCL5 in early relapse group was higher than that in relapse-free group ($P=0.011$), and it related to clinical stages and status of HBsAg ($P<0.05$). The relative expression of CXCR2 in early relapse group was higher than that in relapse-free group ($P<0.001$) and non-early relapse group($P=0.005$), and it related to clinical stages, diameter of tumor and status of HBsAg($P<0.05$). 5-year cumulative survival rate in patients with co-expression of CXCL5-CXCR2 was significantly lower than that in other patients ($P=0.005$). [Conclusion] The expression of CXCL5 and CXCR2 in HCC relates to clinico-pathological characteristics and postoperative relapse. Therefore, CXCL5 and CXCR2 can be expected to become a potential index for postoperative prognosis of HCC.

Subject words: hepatocellular neoplasms; chemokine; CXCL5; CXCR2; prognosis

原发性肝细胞癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 目前肝癌的治疗主要是以外科手术切除为主的综合治疗。从长期的随访数据来看, 术后 5 年生存率仅为 11%^[1], 术后较高的复发率是提高患者生存率和延长肝癌患者生存期的主要障碍。因此, 阐明肝癌复发

转移的分子调控机制, 寻找有效的防治手段是提高肝癌疗效的关键。研究表明, 炎症已成为肿瘤细胞的十大特征之一^[2], 炎症趋化因子 (chemokine) 中以 CXCL1 为代表的 CXC 家族及其受体与多种肿瘤的发生、发展呈明显相关性。CXCL5 与多种肿瘤复发转移密切相关^[3,4], 而在肝癌方面的研究鲜有报道。因此, 本研究采用荧光定量 PCR 检测肝癌患者癌组织中 CXCL5 及其受体 CXCR2 的表达量, 初步探讨

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(2012jjAA40482)

通讯作者: 吴飞翔, 主任, 副主任医师, 博士; 广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科一区, 广西壮族自治区南宁市河堤路 71 号(530021); E-mail: wufx2013@163.com

收稿日期: 2014-06-10; **修回日期:** 2014-07-22

两者表达量与肝癌复发及临床预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

从广西医科大学附属肿瘤医院肿瘤标本数据库中选取 2005 年 1 月至 2008 年 12 月间 63 例肝癌根治性切除标本。所有病例均属于巴塞罗那肝癌分期(BCLC)A 期或 B 期,术前均未任何治疗,标本均为首次手术标本,且经病理学检查均证实为肝细胞癌。所有患者术后定期复查,有完整的随访数据,随访时间截止至 2012 年 12 月。其中男性 53 例,女性 10 例,年龄为 23~67 岁,平均年龄为(46.1±10.6)岁。合并乙型肝炎病毒感染者 50 例。根据患者术后肿瘤复发情况分为以下 3 组^[5]:早期复发组(early recurrence,ER)25 例,即术后 2 年内出现肝内肿瘤复发者;非早期复发组(non-early recurrence,nER)20 例,即手术第 2 年后出现肝内肿瘤复发者;无复发组 18 例,即术后随访超过 5 年未出现肿瘤复发灶或转移灶者。3 组患者的基本资料具有可比性,在年龄、性别、BCLC 分期、肝硬化、肿瘤直径、HBsAg 阳性率、AFP 水平、手术方式等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。另取正常肝脏组织 10 例作为对照。

1.2 试剂及仪器

PCR 所采用的引物均采用 Primer 5.0 软件设计,由英潍捷基(上海)贸易有限公司引物合成。上、下游引物分别位于基因的两个外显子,跨越内含子区域以避免扩增基因组 DNA。将管家基因 β -actin (肌动蛋白)作为内参照(Table 1)。Trizol 总 RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司,cDNA 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司,荧光定量 PCR 试剂盒 SuperReal PreMix (SYBR Green) 购自天根生化科技有限公司,StepOne 实时定量 PCR 系统购自美国应用生物系统公司。

1.3 实验方法

1.3.1 组织总 RNA 提取

称取组织标本约 200mg,加入 1ml Trizol,按照说明书步骤提取组织标本总 RNA。所提总 RNA 经紫外分光光度计检测,并计算浓度、纯度和质量。若 A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.8~2.0 范围内,说明所提取的总 RNA 纯度好。经琼脂糖凝胶电泳实验鉴定,均可见明显的 28S、18S 两条带,说明总 RNA 质量好,未降解。-80℃冻存备用。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

根据紫外分光光度计测定的 RNA 浓度,确定 RNA 模板使用量。将上述提取的总 RNA 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。荧光定量 PCR 反应体系 20μl:cDNA 模板 2μl,SYBR GREEN PreMix 10μl,50×ROX 2μl,上下游引物 (10μmol/L 各 0.6μl),无 RNA 酶去离子水 4.8μl。每个样品均做 3 次重复或 3 个复孔同时进行。于 StepOne 实时定量 PCR 仪器上进行,反应采用 2 步法,条件为:第一步预变性 95℃ 10min,1 个循环;第二步 PCR 反应,变性 95℃ 15s,退火/延伸 60℃ 1min,40 个循环。PCR 结束后采用溶解曲线确定其产物特异性。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对荧光定量 PCR 数据进行统计,即目的基因相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{肝癌组织样本}) - \Delta Ct(\text{正常肝组织样本})$ 。同时,将 $-\Delta\Delta Ct \geq 2$ 定义为 mRNA 相对高表达, $-\Delta\Delta Ct \leq 2$ 定义为相对低表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS16.0 进行统计分析,连续性变量资料组间比较采用方差分析,二分类变量资料组间的比较采用卡方检验。基因表达在临床各项指标中的差异采用 t 检验。采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验进行生存分析, $P<0.05$ 为差别有统计学意义。

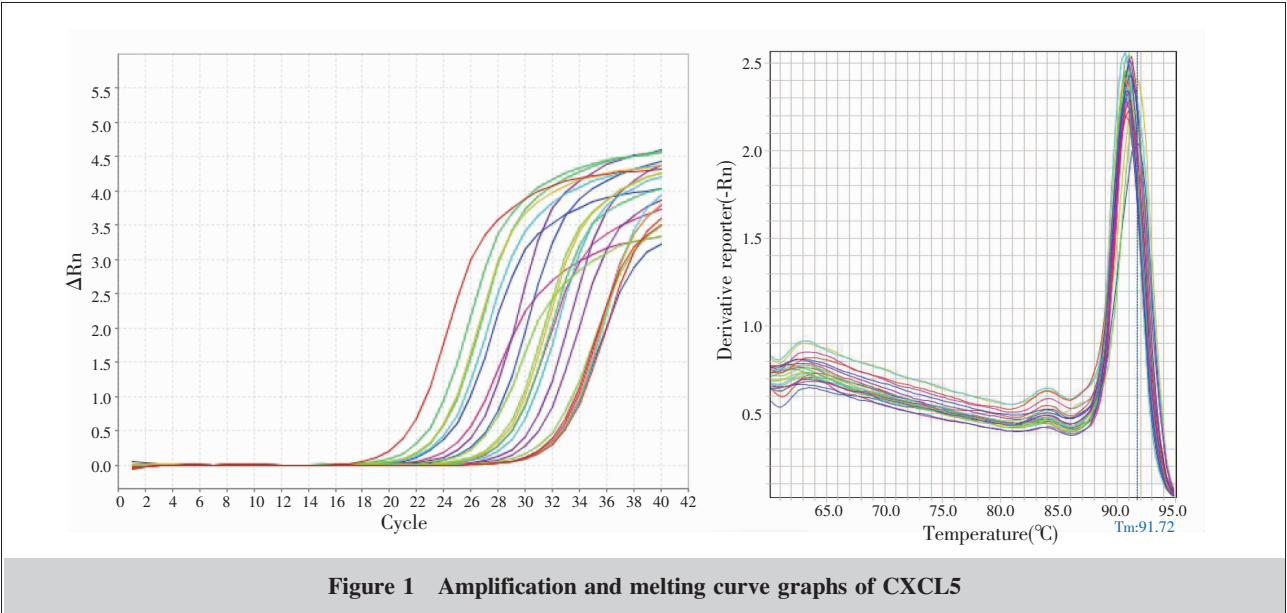
Table 1 Primer sequence of study genes

Genes	Sequence(5' to 3')	Bases	Length of fragment(bp)
β -actin	FW TGGCACCACACCTTCTACAAT	21	180
	RV AGAGGCGTACAGGGATAGCAC	21	
CXCL5	FW ACCACTATGAGCCTCCTGTCC	21	191
	RV ATTTTGGGATGAACTCCTTGC	21	
CXCR2	FW GACCCAGTCAGGATTTAAGTTTACC	25	245
	RV CCAGCATCACGAGGGAGTTT	20	

2 结果

2.1 三组肝癌患者 CXCL5 及 CXCR2 的相对表达量比较

CXCL5 和 CXCR2 基因的扩增曲线光滑完整,说明本研究中各两者扩增产物没有非特异性产物的干扰。溶解曲线只有一



个峰,说明特异性强,且出峰的温度与预测的产物 T_m 值相近(Figure 1)。

早期复发组、非早期复发组、无复发组中 *CXCL5* 和 *CXCR2* mRNA 相对表达量较正常肝组织均升高,三组间的表达量差异亦存在统计学意义(*CXCL5*: $P=0.036$; *CXCR2*: $P=0.001$)。三组间方差齐性检验 $P<0.001$, 采用 Games-Howell 法进行两两比较,结果显示, *CXCL5* 和 *CXCR2* 在无复发组与早期复发组的表达量差异存在统计学意义 ($P=0.011$ 和 $P<0.001$), 而 *CXCR2* mRNA 在早期复发组的表达量高于非早期复发组($P=0.005$)(Table 2)。

2.2 *CXCL5* 和 *CXCR2* 表达量与临床特征的关系

CXCL5 和 *CXCR2* 的表达量与肝癌分期、肿瘤直径以及 HBsAg 状态存在相关性 ($P<0.05$)。在 BCLC B 期和 HBsAg 阳性的肝癌组织中, *CXCL5* 和 *CXCR2* 的相对表达量

较高, *CXCR2* 在直径 ≥ 5 cm 肝癌中的相对表达量较高 ($P=0.027$)。与是否存在包膜、AFP 浓度以及是否有肝硬化等临床指标间不存在相关性 ($P>0.05$)(Table 3)。

Table 2 The relative expression of *CXCL5* and *CXCR2* in all groups

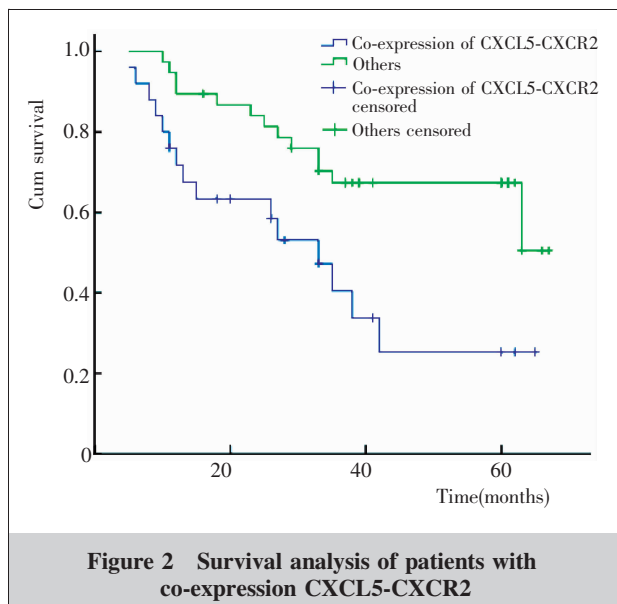
Groups	N	<i>CXCL5</i>			<i>CXCR2</i>		
		$2^{-\Delta\Delta Ct}$	F	P	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	F	P
Relapse-free group	18	4.70±6.11			3.82±3.33		
Non-early relapse group	20	6.56±8.00	3.481	0.036	4.23±3.02	8.094	0.001
Early relapse group	25	11.58±56.26			7.37±5.88		

Table 3 The relationship between the expression of *CXCL5*, *CXCR2* and clinical features in hepatocellular carcinoma

Factors	N	<i>CXCL5</i>	t	P	<i>CXCR2</i>	t	P
BCLC stage							
A	12	5.045±3.362			2.846±2.397		
B	51	8.086±4.915	-2.028	0.047	7.614±6.054	-2.665	0.009
Envelope of tumor							
Complete	53	7.523±5.695			6.217±5.012		
Uncomplete	10	7.854±6.514	-0.164	0.869	5.717±5.691	0.283	0.777
Diameter of tumor(cm)							
<5	19	6.612±5.621			4.624±3.401		
≥ 5	44	7.274±5.536	-0.433	0.666	7.594±5.242	-2.266	0.027
HBsAg							
+	50	8.361±4.814			6.951±4.212		
-	13	5.061±5.623	2.127	0.038	4.062±3.552	2.268	0.027
AFP (μg/L)							
<400	22	7.345±4.962			5.015±4.916		
≥ 400	41	7.614±5.351	-0.195	0.846	6.584±5.469	-1.123	0.265
Cirrhosis							
With	35	7.184±5.754			5.789±5.686		
Without	28	7.598±6.156	-0.275	0.784	6.466±5.153	-0.489	0.626

2.3 CXCL5 与 CXCR2 共同高表达患者的生存分析

CXCL5 mRNA 相对高表达 32 例, 相对低表达 31 例, 而 CXCR2 mRNA 相对高表达 38 例, 相对低表达 25 例, 两者共同相对高表达 25 例。将共同高表达 25 例与其余 38 例患者的生存时间进行生存分析比较。生存分析发现 CXCL5-CXCR2 共同高表达患者的 5 年累积生存率明显低于非共同高表达患者 (Log-rank 检验: $\chi^2=7.71$, $P=0.005$) (Figure 2), 提示肝癌组织中 CXCL5 基因及其受体 CXCR2 共同高表达的患者术后预后较差。



3 讨论

肿瘤的发生、发展、侵袭转移等都是多因素、多步骤、多基因参与的复杂病理过程。而肿瘤血管的生成是肿瘤生长的基础, 在肿瘤生长、浸润和转移中起着非常重要的作用。自 1863 年德国病理学家 Virchow 提出肿瘤可起源于慢性炎症, 长期的刺激和组织损伤可促进炎症形成, 因而提高了局部的细胞增殖; 这一假说提出后, 炎症与肿瘤的关系成为肿瘤学领域内的研究热点^[6]。研究表明, 高达 15% 肿瘤的发生、发展与长期的慢性炎症有关。

CXCL5 即趋化因子生长调节基因 5, 又称为上皮来源的中性粒细胞活化肽 78 (ENA-78), 属于促血管生成性 ELR+CXC 趋化因子的一员, 可由上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞等分泌, 与 G 蛋白耦联受体

CXCR2 识别并结合, 趋化免疫细胞或肿瘤细胞的运动, 激活 PI3K-Akt 和 ERK1/2 信号通路^[4], 激活一系列与肿瘤形成相关的基因表达, 促进多种肿瘤的血管新生, 加快肿瘤的生长和转移。

研究表明, CXCL5 的过度表达与非小细胞癌的生长呈正相关^[7]。Li 等^[8]研究发现 CXCL5 的过表达与胰腺癌的肿瘤分化、临床分期及生存率均呈负相关。在胆管癌、大肠癌、前列腺癌组织中, CXCL5 呈高表达水平, 均与肿瘤的血管生成相关, 应用 CXCL5 抗体可以抑制肿瘤生长和肿瘤血管生成^[7]。其原因可能是 CXCL5 与其受体 CXCR2 结合后作用于酪氨酸激酶受体, 引起血管内皮细胞增殖、趋化运动及抑制内皮细胞凋亡等一系列促进肿瘤血管新生的生物学效应^[9]。Okabe 等^[10]应用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 分析发现, CXCL5 在人类胆管细胞癌组织中高表达, 且与患者较低 5 年生存率有关。Zhou 等^[4]通过检测不同侵袭能力的肝癌细胞系, 发现 CXCL5 在侵袭能力较强的肝癌细胞系中高表达; 在患者体内, CXCL5 的高表达可促进肝癌的肺转移, 以及肿瘤灶内中性粒细胞的浸润; 相反地, CXCL5 的低表达可减少肝癌的转移以及瘤内的中性粒细胞的浸润。Saintigny 等^[11]通过 CXCR2 基因敲除细胞实验, 以及肺癌患者蛋白质定量分析发现 CXCR2 过表达的患者预后较差, 而且与 CXCL5 基因驱动有关。

本研究通过分析 3 组肝细胞癌患者手术标本中 CXCL5 及其受体 CXCR2 mRNA 的相对表达量, 以探讨两者与肝癌术后复发的关系。两者的 mRNA 相对表达量均高于正常肝组织, 说明 CXCL5 和 CXCR2 与肝癌的发生之间存在密切关系。CXCL5 和 CXCR2 在早期复发组的相对表达量均高于无复发组, CXCR2 在早期复发组的相对表达量高于非早期复发组, 说明两者与肝癌的复发存在相关性, 尤其是早期复发患者。临床因素分析发现 CXCL5 和 CXCR2 的表达量与肝癌临床分期、乙肝病毒感染状态有关。BCLC B 期和 HBsAg 阳性患者中的相对表达量均高于 BCLC A 期和 HBsAg 阴性患者。说明长期的慢性炎症可能通过 CXCL5-CXCR2 介导肝癌血管的生成, 促进肝癌的发生发展。生存分析发现 CXCL5 与 CXCR2 共同高表达的患者, 大多数在较短的时间内出现肝癌复发, 其 5 年累积生存率明显低于其他非共同表达高

表达患者。因此,提示 *CXCL5*、*CXCR2* 高表达的肝癌患者,术后复发风险较高,生存率低。

综上所述,*CXCL5* 和 *CXCR2* 在肝癌组织中高表达,与肝癌的临床分期、肿瘤直径以及 HBsAg 的状态存在相关性,两者的共同高表达与患者临床预后差存在明显相关。以上结果提示 *CXCL5* 和 *CXCR2* 可能参与了肝癌发生发展的过程。因此,*CXCL5* 和 *CXCR2* 可有望成为肝癌患者术后预后判断的潜在指标。然而,其中涉及的分子信号机制有待于更深入的研究。

参考文献:

- [1] Blechacz B, Mishra L. Hepatocellular carcinoma biology [J]. Recent Results Cancer Res, 2013, 190: 1–20.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646–674.
- [3] Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis [J]. N Engl J Med, 2001, 345(11): 833–835.
- [4] Zhou SL, Dai Z, Zhou ZJ, et al. Overexpression of *CXCL5* mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2242–2254.
- [5] Ibrahim S, Roychowdhury A, Hean TK. Risk factors for intrahepatic recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma [J]. Am J Surg, 2007, 194(1): 17–22.
- [6] Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? [J]. Lancet, 2001, 357(9255): 539–545.
- [7] Arenberg DA, Keane MP, DiGiovine B, et al. Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer [J]. J Clin Invest, 1998, 102(3): 465–472.
- [8] Li A, King J, Moro A, et al. Overexpression of *CXCL5* is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer [J]. Am J Pathol, 2011, 178(3): 1340–1349.
- [9] Wu JL, Abe T, Inoue R, et al. IkappaBalphaM suppresses angiogenesis and tumorigenesis promoted by a constitutively active mutant EGFR in human glioma cells [J]. Neurol Res, 2004, 26(7): 785–791.
- [10] Okabe H, Beppu T, Ueda M, et al. Identification of *CXCL5*/ENA-78 as a factor involved in the interaction between cholangiocarcinoma cells and cancer-associated fibroblasts [J]. Int J Cancer, 2012, 131(10): 2234–2241.
- [11] Saintigny P, Massarelli E, Lin S, et al. *CXCR2* expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2013, 73(2): 571–582.

《肿瘤学杂志》投稿须知

1. 文稿务必材料可靠,数据准确,论点清楚,论据充足,结论明确。
2. 文字通顺、准确和简练,重点突出,层次清楚。论著需附结构式摘要,包括目的、方法、结果、结论四部分。中文摘要 200~300 字;英文摘要务必与中文摘要一一对应翻译。英文摘要前加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在城市名及邮政编码。
3. 图表请附中英文各一份,包括图表的题目、内容及注释。
4. 所列参考文献限作者亲自阅读的已发表的近 3 年文献为主,按文内引用先后顺序列于文末,并在正文内引文处右上角以 [] 号注明序号。具体格式举例如下:
期刊:[序号]作者(3 位以下全部写出,不同作者姓名中间加逗号,英文文献作者为姓全称,加名缩写;3 位以上时只写前 3 位,于后加“等.”或“et al.)文题[J].刊名(英文为缩写),年,卷(期):起页-止页。
书籍:[序号]作者.书名[M].版本.出版地(即城市名):出版者,出版年.起页-止页。
学位论文:[序号]作者.学位论文名[D].城市:培养单位,年。
电子文献:[序号]作者.题名[电子文献类型].可获得的网址,发表或更新的日期。
其中,电子文献类型,是网上期刊时,用[J/OL];是网上电子公告时,用[EB/OL];是网上联机数据库时,用[DB/OL]。特别注意的是,所有中文文献,需同时附原刊物中的英文翻译。
5. 有通讯作者的文稿,请在文章首页左下角注明通讯作者职务、职称、学位、工作单位(详细到科室)、详细通讯地址(邮编)和 E-mail。
6. 本刊启用稿件远程处理系统,只接受网上投稿,网址 <http://www.chinaoncology.cn>。不再接收电子邮件投稿和纸质稿。
7. 编辑部对来稿有文字修改权,凡涉及内容的修改,则提请作者考虑,文责自负。文稿一般不退,请作者自留底稿。来稿一经录用,收取一定版面费,发表后寄赠当期杂志 2 册并酌付稿酬。