

# 趋化因子 CXCL16 在乳腺癌中的表达及其意义

汤红平 刘芳 陈国艳 卢翔宇 陈莹莹 黄犁

**【摘要】 目的** 探讨趋化因子 CXCL16 在乳腺癌中的表达及其意义。**方法** 收集 2012 年 3 月至 2013 年 12 月深圳市妇幼保健院 94 例浸润性乳腺癌、20 例乳腺原位癌以及 20 例乳腺良性病变组织标本,应用免疫组织化学方法检测 CXCL16 的表达情况,并分析其表达与乳腺癌患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、TNM 分期及淋巴结转移等临床病理特征之间的关系。数据分析采用  $\chi^2$  检验及秩和检验。**结果** 在乳腺浸润性癌、原位癌和良性病变组织 3 组之间, CXCL16 蛋白表达的差异具有统计学意义 ( $\chi^2=22.058, P=0.000$ )。浸润性乳腺癌中 CXCL16 蛋白的表达均高于原位癌和良性病变组织 ( $P=0.007, 0.000$ )。并且,在不同肿瘤大小、不同 TNM 分期和有无区域淋巴结转移的浸润性乳腺癌之间, CXCL16 蛋白表达的差异均有统计学意义 ( $Z=-2.013, -2.166, -2.222, P=0.035, 0.030, 0.026$ ),而在不同年龄及组织学分级者之间,其差异均无统计学意义 ( $Z=-0.418, P=0.676; \chi^2=0.011, P=0.995$ )。**结论** CXCL16 在乳腺癌的发生、发展过程中可能起一定的作用。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 趋化因子类; CXCL16

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

**Expression of chemokine CXCL16 and its significance in breast cancer** Tang Hongping\*, Liu Fang, Chen Guoyan, Lu Xiangyu, Chen Yingying, Huang Li. \* Department of Pathology, Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen 518028, China

Corresponding author: Tang Hongping, Email: tony1998@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the expression of chemokine CXCL16 in human breast cancer and its clinical significance. **Methods** The tissue samples were collected from 94 cases of invasive breast cancer, 20 cases of carcinoma *in situ* and 20 cases of breast benign lesions in Shenzhen Maternity and Child Healthcare Hospital from March 2012 to December 2013. The expressions of CXCL16 protein in samples were detected by immunohistochemical method. The relationships between the expression of CXCL16 and the clinicopathological characteristics of breast cancer patients including patients' age, tumor size, histological grade, TNM stage and lymph node metastasis status were also analyzed. The data was processed using  $\chi^2$  test and rank sum test. **Results** The expression of CXCL16 protein was statistically different among invasive breast cancer group, carcinoma *in situ* group and benign lesion group ( $\chi^2=22.058, P=0.000$ ). CXCL16 protein expression in invasive breast cancer was significantly higher than that in carcinoma *in situ* or in benign lesions ( $P=0.007, 0.000$ ). CXCL16 protein expression showed a statistical difference among invasive breast cancer patients with different tumor sizes, TNM stages and with or without lymph node metastasis ( $Z=-2.013, -2.166, -2.222; P=0.035, 0.030, 0.026$ ), but no significant difference was observed between different age groups and between the patients with different histological grades ( $Z=-0.418, P=0.676; \chi^2=0.011, P=0.995$ ). **Conclusion** CXCL16 may play a certain role in the development and metastasis of breast cancer.

**【Key words】** Breast neoplasms; Chemotactic factors; CXCL16

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.06.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101537);深圳市科技计划项目(201303072)

作者单位:518028 深圳,南方医科大学附属深圳市妇幼保健院病理科(汤红平、陈国艳、卢翔宇、陈莹莹、黄犁); 528000 佛山,广东省佛山科学技术学院基础医学院(刘芳)

通信作者:汤红平, Email: tony1998@126.com

乳腺癌是目前发病率占首位的女性恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。在中国,乳腺癌发病率也逐年上升,并呈年轻化趋势<sup>[2]</sup>。乳腺癌的发生、发展过程受诸多因素调控,研究乳腺癌发生、发展中新的分子机制,对其诊断和治疗都有十分重要的意义。趋化因子(chemokine)是一类小分子活性肽,广泛参与机体的生理及病理过程<sup>[3]</sup>。将趋化因子及其受体分子作为疾病的控制靶标,已成为临床治疗一个新的方向。CXCL16 是新近发现的趋化因子,在人类疾病中的报道最初集中在动脉粥样硬化、风湿免疫、肝炎、AIDS 等免疫及炎症相关疾病中<sup>[4]</sup>。近年来,CXCL16 及其受体 CXCR6 在恶性肿瘤中的表达及其作用正受到越来越多的重视,但与其与乳腺癌关系的研究较为少见。本研究采用免疫组织化学方法检测 CXCL16 蛋白在乳腺癌中的表达情况,并探讨其与乳腺癌临床病理特征的关系,为判断乳腺癌的生物学行为提供参考指标。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本

在患者知情同意的前提下,收集深圳市妇幼保健院 2012 年 3 月到 2013 年 12 月经手术切除的浸润性乳腺癌标本 94 例(包括浸润性导管癌 85 例、浸润性小叶癌 5 例、黏液癌 2 例、大汗腺癌 1 例以及神经内分泌癌 1 例),乳腺原位癌 20 例(导管原位癌 15 例、小叶原位癌 5 例),以及乳腺良性病变标本 20 例(包括纤维腺瘤 10 例、导管上皮普通型增生 5 例、乳腺腺病 5 例)。此外,本研究还从有腋窝淋巴结转移的浸润性乳腺癌患者中选取了 10 例转移性腋窝淋巴结组织标本。患者均为女性。浸润性乳腺癌患者年龄为 30.0~75.0 岁,平均年龄为 46.5 岁,术前均未接受化疗、放射治疗或其他针对肿瘤的治疗;乳腺原位癌患者年龄为 32.0~65.0 岁,平均年龄为 45.0 岁;乳腺良性病变患者年龄为 31.0~65.0 岁,平均年龄为 44.5 岁。3 组间年龄经单因素方差分析,差异无统计学意义( $F=0.454, P=0.636$ )。

### 1.2 实验试剂及方法

**1.2.1 试剂** CXCL16 浓缩型兔抗人多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,免疫组织化学二抗采用即用型免疫组织化学 MaxVision 试剂盒,二抗试剂盒柠檬酸钠缓冲盐及 PBS 均购自福州迈新公司。

**1.2.2 实验方法** 免疫组织化学染色参照抗体说明书操作,采用 MaxVision 两步法。实验步骤如下:石蜡切片经常规脱蜡、水化后,置于柠檬酸钠缓冲液中高压抗原修复,用 3%  $H_2O_2$  孵育 10 min

以去除内源性过氧化酶,然后滴加 CXCL16 一抗(稀释浓度 1:100),室温孵育 60 min。用 PBS 洗去一抗后滴加二抗,室温孵育 30 min,再用 DAB 显色,苏木精对比染色,常规梯度脱水、透明,中性树脂封片。用已知的阳性表达组织作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。

### 1.3 染色结果判读

切片染色后由两位主治以上病理医师采用双盲法观察并打分。CXCL16 蛋白表达于细胞质及胞膜上,以出现清晰棕黄色颗粒为标准。在低倍镜下( $\times 100$ )选择背景清晰、染色定位准确且无非特异性染色的区域,再在高倍镜( $\times 400$ )下随机选取 5 个视野,结合阳性细胞百分率及染色强度进行综合判断:阳性细胞数 $<10\%$ 为阴性(-);阳性细胞数在 10%~50% 之间,染色较浅为弱阳性(+);阳性细胞数 $>50\%$ ,染色较深为强阳性(++)<sup>[5]</sup>。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。等级资料组间比较采用  $\chi^2$  检验和秩和检验,两个独立样本采用 Mann-Whitney U 检验,多个独立样本采用 Kruskal-Wallis H 检验,以  $P<0.050$  为差异具有统计学意义,两两比较的检验水准为  $\alpha=0.05/3=0.0167$ 。

## 2 结果

### 2.1 CXCL16 在乳腺浸润性癌、原位癌及良性病变组织中的表达情况

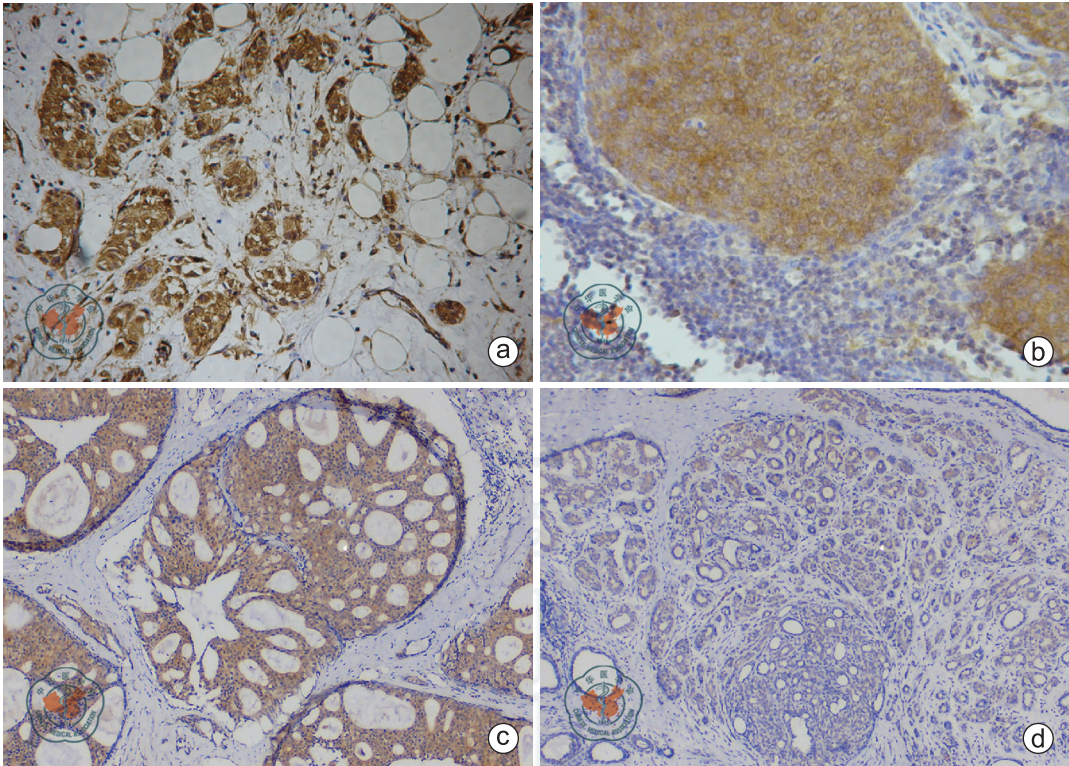
CXCL16 蛋白在浸润性乳腺癌组织中表达,在间质炎细胞中呈弱表达(图 1a),并且,在淋巴结转移灶中也明显表达(图 1b)。乳腺原位癌也可见 CXCL16 蛋白表达,但表达强度较弱(图 1c)。乳腺良性病变中 CXCL16 蛋白表达多为弱阳性或阴性(图 1d)。

在乳腺浸润性癌、原位癌及良性病变组织中,CXCL16 蛋白表达的差异存在统计学意义(表 1)。进一步进行两两比较显示,CXCL16 蛋白在浸润性乳腺癌中的表达均高于后两者,而在乳腺原位癌和乳腺良性病变中表达的差异并无统计学意义(表 1)。在 10 例发生乳腺癌转移的淋巴结标本中,有 9 例淋巴结转移癌存在 CXCL16 高表达。

### 2.2 乳腺癌中 CXCL16 表达与临床病理特征之间的关系

CXCL16 蛋白表达与肿瘤大小、淋巴结转移情况和 TMN 分期有关。在肿瘤直径 $>2$  cm、TNM 分期为 III/IV 期的浸润性乳腺癌中,CXCL16 的表





a:浸润性乳腺癌中 CXCL16 蛋白呈强阳性表达(MaxVision ×200);b:癌转移的淋巴结中 CXCL16 蛋白呈强阳性表达(MaxVision ×200);c:乳腺导管原位癌中 CXCL16 蛋白呈弱阳性表达(MaxVision ×100);d:乳腺腺病组织中 CXCL16 蛋白呈阴性表达(MaxVision ×100)

图 1 CXCL16 蛋白在不同组织中的免疫组织化学染色结果

表 1 浸润性乳腺癌、乳腺原位癌和乳腺良性病变中 CXCL16 的表达

病变类型	例数	CXCL16(例)		
		-	+	++
浸润性乳腺癌 <sup>ab</sup>	94	9	15	70
乳腺原位癌 <sup>c</sup>	20	2	10	8
乳腺良性病变	20	5	11	4
$\chi^2$ 值		22.058		
P 值		0.000		

a:  $P=0.007$ ,与乳腺原位癌比较;b:  $P=0.000$ ,与乳腺良性病变比较;c:  $P=0.107$ ,与乳腺良性病变比较

达比肿瘤直径 $\leq 2$  cm、TNM 分期为 I/II 期者高;在伴有淋巴结转移的浸润性乳腺癌中,CXCL16 的表达也高于无转移组;但在不同年龄和不同组织学分级者之间,CXCL16 蛋白表达的差异并无统计学意义(表 2)。

### 3 讨论

CXCL16 属于 CXC 型趋化因子家族,因其同时具有受体的功能,也被称为磷脂酰丝氨酸和氧化脂蛋白的清道夫受体(scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein, SR-PSOX)<sup>[6]</sup>。人类 CXCL16 基因定位于染色体 17p13

表 2 94 例浸润性乳腺癌患者的临床病理特征与 CXCL16 表达的关系

临床病理特征	例数	CXCL16(例)			检验值	P 值
		-	+	++		
年龄					-0.418	0.676
≤50.0 岁	51	5	7	39		
>50.0 岁	43	4	8	31		
肿瘤直径					-2.013	0.035
≤2 cm	45	6	10	29		
>2 cm	49	3	5	41		
组织学分级					0.011 <sup>a</sup>	0.995
I	20	2	3	15		
II	47	4	8	35		
III	27	3	4	20		
TNM 分期					-2.166	0.030
I/II	48	6	11	31		
III/IV	46	3	4	39		
淋巴结转移					-2.222	0.026
无	45	7	9	29		
有	49	2	6	41		

a:  $\chi^2$  值,其余为 Z 值

上,编码 254 个氨基酸,分子质量约为 30 000。CXCL16 蛋白以跨膜型和可溶型两种存在形式。具

有完整分子结构的 CXCL16 是跨膜型趋化因子,解整合素金属蛋白酶(A disintegrin and metalloprotease, ADAM)10、17 可对其进行蛋白水解,使趋化结构域从细胞表面脱落形成可溶型的 sCXCL16<sup>[7-8]</sup>。CXCL16 在生理状态下发挥着多种生物学功能。其除了在先天性免疫和获得性免疫介导的机体防御中起重要作用外,还可介导细胞间黏附、细胞定向迁移以及血管生成<sup>[9-11]</sup>。在妊娠早期,滋养细胞中存在着 CXCL16 的自分泌调节,并且与绒毛膜细胞滋养细胞的侵袭和增殖相关<sup>[12]</sup>。

有关 CXCL16 及其受体 CXCR6 与人类疾病关系的研究,多集中在动脉粥样硬化、风湿免疫、肝炎、获得性免疫缺陷综合征等免疫及炎症相关的疾病。近年来,研究发现 CXCL16 可刺激结直肠癌、胰腺癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、宫颈癌等肿瘤细胞体外增殖、迁移、侵袭、转移或复发<sup>[13-21]</sup>。CXCL16 还参与神经胶质瘤的恶性转化<sup>[22]</sup>以及淋巴瘤的分化<sup>[23]</sup>。

本研究对 CXCL16 与乳腺疾病的关系进行了分析,结果显示,相比乳腺原位癌和良性病变,CXCL16 在乳腺癌中表达更高,且 CXCL16 表达与肿瘤大小、TNM 分期和区域淋巴结转移均有一定关系,提示 CXCL16 表达可能参与乳腺癌发生、发展过程。Lin 等<sup>[24]</sup>发现乳腺癌淋巴结转移灶高表达 CXCR6,并且,CXCR6 在缺氧状态下可促进细胞迁移,提示 CXCL16 与其受体 CXCR6 相互作用可促进乳腺癌转移。方业颖等<sup>[25]</sup>发现非分泌型 CXCL16 表达可抑制体外培养的乳腺癌细胞株的迁移和侵袭能力,提示其在乳腺癌临床进展中起促进作用。Matsumura 等<sup>[26]</sup>发现对体外培养乳腺癌细胞进行电离放射后,肿瘤细胞 CXCL16 蛋白表达上调,并能吸引更多效应 T 淋巴细胞,推测这可能是乳腺癌放射治疗的作用机制之一。这也提示 CXCL16 在乳腺癌的肿瘤免疫和治疗中发挥了一定作用。

CXCL16 与其受体 CXCR6 结合,可激活细胞质内一系列下游信号转导通路,从而发挥其生物学效应。目前已知相关信号通路有 AKT/mTOR 信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路等。CXCL16 可通过 CXCR6/AKT/mTOR 通路促进前列腺癌临床进展,阻断 CXCR6/AKT/mTOR 通路可抑制其转移,提高治疗效果<sup>[19]</sup>。如在肝细胞肝癌中,血管内皮细胞通过释放多种细胞因子(包括 CCL2、IL-8 和 CXCL16 等)作用于肝癌细胞,通过激活后者中 AKT 和 NF- $\kappa$ B 通路促进其侵袭和转移<sup>[20]</sup>。在乳腺癌中,CXCL16 通过何种分子机制发挥作用目

前尚不明确。

综上所述,本研究发现 CXCL16 在乳腺癌中存在高表达,其表达与乳腺癌肿瘤大小、TNM 分期及转移有关。同时笔者也注意到,在乳腺良性病变中 CXCL16 也存在一定程度的表达。作为一个炎症因子,CXCL16 在人体生理及病理状况下发挥着比较广泛的作用,特别是在炎症和免疫反应中。这些都提示,CXCL16 在乳腺癌中的作用比较复杂,可能涉及到肿瘤细胞本身和机体肿瘤免疫两个方面,其在乳腺癌中的作用、所涉及的分子机制以及应用前景尚需进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, et al. WHO classification of tumors of the breast [M]. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2012, 14-16.
- [2] 汤红平,谢闰娥,黄犁,等. 106 例青年女性乳腺癌临床病理特点回顾性分析[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013,7(6):28-31.
- [3] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity [J]. Immunity, 2000, 12(2): 121-127.
- [4] 刘芳. CXCL16/CXCR6 与炎症性疾病[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30(5):426-430.
- [5] Darash-Yahana M, Gillespie JW, Hewitt SM, et al. The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammation-associated cancers [J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6695.
- [6] Kume N. New oxidized LDL receptors and their functions in atherogenesis [J]. Nihon Ronen Igakkai Zasshi, 2002, 39(3): 264-267.
- [7] Matloubian M, David A, Engel S, et al. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo [J]. Nat Immunol, 2000, 1(4):298-304.
- [8] Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, et al. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain[J]. J Immunol, 2003, 171(4): 1647-1651.
- [9] Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, et al. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells [J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(2): 267-274.
- [10] Hattermann K, Ludwig A, Gieselmann V, et al. The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via its receptor CXCR6 [J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(1): 133-141.
- [11] Zhuge X, Murayama T, Arai H, et al. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 331(4): 1295-1300.
- [12] Huang Y, Zhu XY, Du MR, et al. Chemokine CXCL16, a scavenger receptor, induces proliferation and invasion of first-trimester human trophoblast cells in an autocrine manner [J]. Hum Reprod, 2006, 21(4): 1083-1091.
- [13] Wägsäter D, Hugander A, Dimberg J. Expression of CXCL16



- in human rectal cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 14(1): 65-69.
- [14] Wente MN, Gaida MM, Mayer C, et al. Expression and potential function of the CXC chemokine CXCL16 in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(2): 297-308.
- [15] Gao Q, Zhao YJ, Wang XY, et al. CXCR6 upregulation contributes to a proinflammatory tumor microenvironment that drives metastasis and poor patient outcomes in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(14): 3546-3556.
- [16] Lee JT, Lee SD, Lee JZ, et al. Expression analysis and clinical significance of CXCL16/CXCR6 in patients with bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(1): 229-235.
- [17] Guo L, Cui ZM, Zhang J, et al. Chemokine axes CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 correlate with lymph node metastasis in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(5): 336-343.
- [18] 周雯慧, 胡卫东, 徐闻博. 趋化因子及其受体 CXCL16 / CXCR6 体外促前列腺癌增殖、侵袭作用[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2010, 31(4): 479-482.
- [19] Wang J, Lu Y, Wang J, et al. CXCR6 induces prostate cancer progression by the AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10 367-10 376.
- [20] Wang YH, Dong YY, Wang WM, et al. Vascular endothelial cells facilitated HCC invasion and metastasis through the Akt and NF-kappaB pathways induced by paracrine cytokines [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32(1): 51.
- [21] Huang Y, Zhang J, Cui ZM, et al. Expression of the CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 axes in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(5): 289-296.
- [22] Hattermann K, Held-Feindt J, Ludwig A, et al. The CXCL16-CXCR6 chemokine axis in glial tumors [J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 260(1-2): 47-54.
- [23] Deutsch AJ, Steinbauer E, Hofmann NA, et al. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(2): 182-194.
- [24] Lin S, Sun L, Hu J, et al. Chemokine C-X-C motif receptor 6 contributes to cell migration during hypoxia [J]. *Cancer Lett*, 2009, 279(1): 108-117.
- [25] 方业颖, 雷倩倩, 李燕, 等. 非分泌型 CXCL16 在乳腺癌细胞系中的表达及对其生物学特性的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2013, 44(4): 522-525, 530.
- [26] Matsumura S, Wang B, Kawashima N, et al. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells [J]. *J Immunol*, 2008, 181(5): 3099-3107.

(收稿日期:2014-11-18)

(本文编辑:罗承丽 宗贝歌)

汤红平, 刘芳, 陈国艳, 等. 趋化因子 CXCL16 在乳腺癌中的表达及其意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2014, 8(6): 391-395.