

• 临床研究 •

乳腺癌趋化因子受体 CXCR4 的表达及其意义

许建华 叶凯 郑正荣 许双塔 吴春霖 曾冰薇

【摘要】 目的 研究趋化性细胞因子受体 CXCR4 在乳腺癌中的表达,探讨其与淋巴结转移、远处转移及预后的关系。**方法** 84 例正常乳腺组织及 84 例乳腺癌组织、43 例区域淋巴结转移癌组织标本(依据组织类型及临床病理特性分组),取自福建医科大学附属第二医院 2000 年 1 月至 2002 年 12 月手术切除的病理存档蜡块,应用免疫组化方法(二步法)分别检测 3 组标本 CXCR4 的表达情况。对计数资料采用 χ^2 检验,对生存率采用时序检验进行统计学分析。**结果** 正常乳腺组织、乳腺癌组织、区域淋巴结转移癌组织 CXCR4 阳性率分别为 11.9%、53.6%、74.4%;转移组织 CXCR4 阳性表达率明显高于原发肿瘤。乳腺癌组织 CXCR4 阳性表达率与淋巴结转移、HER-2 表达、临床分期密切相关($P < 0.05$),而与患者年龄、肿瘤直径、ER 表达、PR 表达、组织学类型及肿瘤分化程度无关($P > 0.05$)。发生远处转移组 CXCR4 表达水平(74.1%)高于未发生远处转移组(43.9%, $P < 0.01$)。CXCR4 阳性表达组 5 年生存率 66.7%(30/45)明显低于阴性表达组 87.2%(34/39, $P < 0.05$)。**结论** CXCR4 阳性表达与乳腺癌的淋巴结转移、远处转移有关,有助于预后判断。

【关键词】 乳腺肿瘤; 趋化因子受体; 肿瘤转移; 预后

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

CXCR4 expression in breast cancer and its significance XU Jian-hua, YE Kai, ZHENG Zheng-rong, XU Shuang-ta, WU Chun-lin, ZENG Bing-wei. Department of Oncology, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer and its correlation with lymphatic and distant metastasis and prognosis. **Methods** Samples of 84 cases of normal breast tissues, 84 cases of breast cancer tissues and 43 cases of regional lymph node metastasis were obtained from the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University from January, 2000 to December, 2002. The expression of chemokine receptor CXCR4 in these samples was detected with immunohistochemistry. The results were processed with Chi-square test for paired numeration data and log-rank test for survival rate. **Results** The positive rates of CXCR4 expression in normal breast tissues, breast cancer tissues and regional lymph node metastasis were 11.9%, 53.6% and 74.4%, respectively. Positive expression of CXCR4 was correlated with lymph node metastasis, clinical staging and HER-2 status ($P < 0.05$), but not with the age of patients, tumor size, ER, PR status and differentiation. The level of CXCR4 expression in the distant metastasis group (74.1%) was far higher than that in the non-metastasis group (43.9%). The 5-year survival rate in the group with positive expression of CXCR4 (66.7%) was lower than that in the group with negative expression of CXCR4 (87.2%, $P < 0.05$). **Conclusion**

基金项目:福建省科技三项费用资助项目(2006F5037)

作者单位:362000 福建 泉州,福建医科大学附属第二医院肿瘤外科(许建华、叶凯、郑正荣、许双塔),病理科(吴春霖、曾冰薇)

Positive expression of CXCR4 in breast cancer is significantly associated with lymphatic metastasis and distant metastasis, so can be used as a potential predictive factor for prognosis of breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; CXCR4; Neoplasm metastasis; Prognosis

乳腺癌发病率日益增高,目前以手术为主的综合治疗虽然取得了很好的疗效,但复发和转移仍是影响患者生存率和死亡率的主要因素。恶性肿瘤转移是一个具有高度组织性和器官选择性的复杂连续过程。近年的研究发现趋化因子受体(CXCR4)在某些肿瘤细胞中表达,并在肿瘤器官特异性转移中发挥重要作用^[1-3]。本研究应用免疫组化方法检测正常乳腺组织、乳腺癌组织及淋巴结转移组织中 CXCR4 蛋白的表达,探讨乳腺癌组织中 CXCR4 表达水平与淋巴结和远处转移的关系,以及对预后的指导意义。

1 资料和方法

1.1 患者临床分期、分组及病理资料

84 例乳腺癌患者根据国际抗癌联盟(UICC)2003 年修订的临床分期标准分为:I~II 期 59 例,III 期 25 例。其中高分化 38 例,中分化 29 例,低分化 17 例;淋巴结阳性 48 例,淋巴结阴性 36 例;年龄 25~74 岁,平均 42 岁。并依据患者年龄、肿瘤直径、ER 表达、PR 表达、组织学类型及肿瘤分化程度、有否淋巴结转移、HER-2 表达、临床分期等临床病理特性分组。84 例对照标本为癌旁非癌组织(距离癌组织边缘至少 5 cm 以上),经病理确认为正常乳腺组织。43 例区域淋巴结转移癌组织随机取自本实验入组患者的转移性淋巴结。

1.2 实验材料

84 例正常乳腺组织及 84 例乳腺癌组织标本取自福建医科大学附属第二医院于 2000 年 1 月至 2002 年 12 月手术切除的病理存档蜡块,所选入组患者术前均未接受过放射治疗、化疗,诊断均经常规病理切片证实。组织均用甲醛固定,石蜡包埋后 5 μ m 连续切片,分别作 HE 和免疫组化染色。

1.3 实验试剂及方法

兔抗人 CXCR4 抗体(BA0761)购自武汉博士德公司,免疫组化 Elivision plus 试剂盒(KIT-9901)、柠檬酸组织抗原修复液、PBS、二氨基联苯胺(DAB)购自福州迈新生物技术有限公司。按试剂盒说明,应用免疫组化方法(二步法)检测正常乳腺组织、乳腺癌组织以及区域淋巴结转移癌组织中 CXCR4 的表达情况。石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,高压修复,3%过氧化氢孵育,滴加稀释的一抗(1:75),室温孵育 2 h,按说明依次滴加增强剂及二抗(鼠抗兔抗体),DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明,封片。选用提供的阳性切片在同一条件下染色作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判断

分别由两名经验丰富的病理医师在不知临床和病理资料的情况下独立观察切片,对免疫组化结果进行评估。判定标准参见许良中等^[4]的免疫组化结果的判

断标准,以细胞质中出现黄至棕黄色颗粒为阳性显色,以染色强度和阳性细胞比例评定阳性表达。光镜下每张切片中选取癌细胞较多的 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞。染色强度分级如下:无着色为 0,淡黄色为 1,棕黄色为 2,棕褐色为 3。阳性细胞数分级为:无阳性细胞为 0,阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为 1,11%~50%为 2,51%~75%为 3, $\geq 76\%$ 为 4。两项得分相乘结果 ≥ 3 为阳性表达。

1.5 临床随访及统计学方法

术后第 1~3 年每 3 个月复查 1 次,第 4、5 年每半年复查 1 次,以后每年复查 1 次或信访。复查项目包括血常规、肝肾功、胸片、钼靶片、双乳及腹部 B 超、骨扫描。用 SPSS11.5 软件包进行统计学分析。根据不同的分析目的对计数资料分别采用 χ^2 检验或线性趋势检验。生存率计算用寿命表法,各生存曲线间比较用时序检验(log-rank test)。

2 结果

2.1 CXCR4 蛋白在正常乳腺组织、乳腺癌组织、淋巴结转移组织中的表达

正常乳腺组织、乳腺癌组织及区域淋巴结转移组织中,CXCR4 表达阳性率分别为 11.9%(10/84)、53.6%(45/84)和 74.4%(32/43),3 组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1、2)。

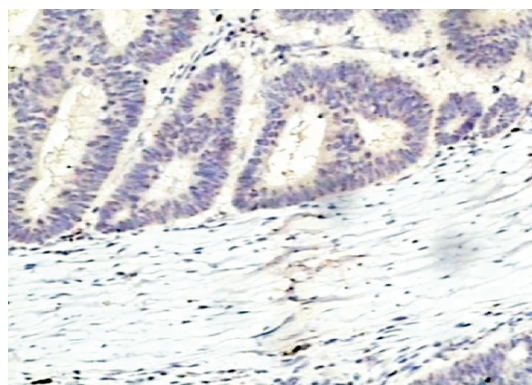


图 1 CXCR4 在乳腺癌组织中呈阴性表达(S-P 染色 $\times 100$)

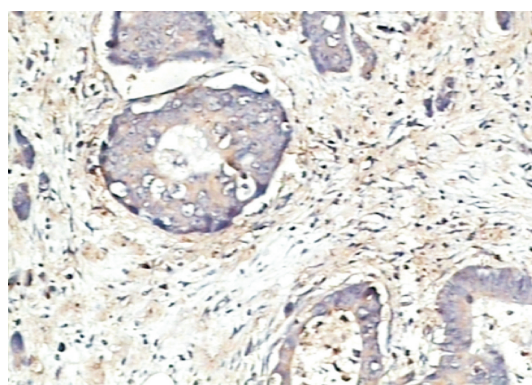


图 2 CXCR4 在乳腺癌组织中呈阳性表达(S-P 染色 $\times 100$)

2.2 CXCR4 蛋白表达与乳腺癌临床病理特性的关系

乳腺癌组织 CXCR4 阳性表达率与淋巴结转移、HER-2 表达、临床分期密切相关($P < 0.05$),与患者年龄、肿瘤直径、ER 表达、PR 表达、组织学类型及肿瘤分化程度等临床病理特性间无相关性($P > 0.05$,表 1)。

表 1 乳腺癌 CXCR4 与临床病理因素之间的关系

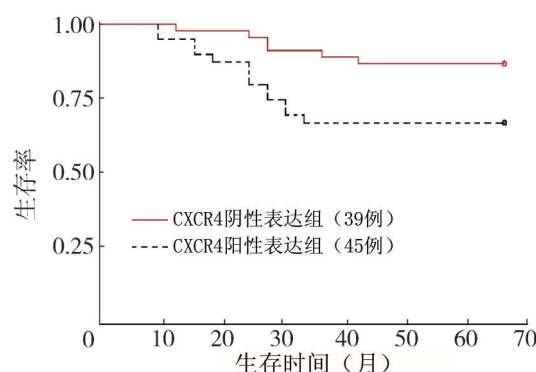
临床病理因素	例数	阳性例数	阴性例数	χ^2 值	P 值
年龄				0.09	0.76
<50 岁	51	28	23		
>50 岁	33	17	16		
肿瘤大小				0.04	0.85
<2 cm	28	15	13		
2~5 cm	44	23	21		
>5 cm	12	7	5		
肿瘤分化程度				0.40	0.52
高分化	38	19	19		
中分化	29	16	13		
低分化	17	10	7		
组织学类型				1.30	0.26
浸润性导管癌	65	37	28		
其他	19	8	11		
ER				0.36	0.55
阳性	46	26	20		
阴性	38	19	19		
PR				1.13	0.29
阳性	44	26	18		
阴性	40	19	21		
HER-2				5.06	0.02
阳性	30	21	9		
阴性	54	24	30		
淋巴结转移				5.46	0.02
有	48	31	17		
无	36	14	22		
远处转移				6.72	0.01
有	27	20	7		
无	57	25	32		
分期				4.86	0.03
I + II 期	59	27	32		
III 期	25	18	7		

2.3 乳腺癌组织 CXCR4 表达水平与远处转移的关系

经中位随访 66 个月,84 例乳腺癌患者中 27 例发生远处转移(其中肺转移 9 例、肝转移 7 例、骨转移 6 例、其他器官和组织转移 5 例),57 例未发生远处转移。发生远处转移组的患者原发乳腺癌组织中 CXCR4 阳性率为 74.1%(20/27),高于未发生远处转移组 43.9%(25/57),两组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 乳腺癌组织 CXCR4 表达水平与生存率的关系

CXCR4 阳性表达组患者 5 年生存率为 66.7%(30/45),明显低于 CXCR4 阴性表达组 87.2%(34/39),两组生存率间差异有统计学意义($P=0.028$,图 3)。



$P=0.028$, CXCR4 阳性组与阴性组比较

图 3 乳腺癌组织 CXCR4 表达水平与生存率的关系

3 讨论

肿瘤的转移、复发是导致肿瘤患者死亡的重要原因。趋化因子受体 CXCR4 在肿瘤转移的作用已分别在乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、大肠癌等研究中得到证实^[1-3]。Muller 等^[5]在 Nature 上撰文指出乳腺癌组织高表达趋化因子受体 CXCR4,其特异性配体 CXCL12 与乳腺肿瘤细胞 CXCR4 结合后,可转导调节肌动蛋白聚合和伪足形成的信号,导致肿瘤细胞趋化和侵袭,从而导致肿瘤细胞选择性地向相应器官转移。肿瘤细胞从母瘤上脱落后,经迁移,容易趋向并滞留于表达 CXCR4 配体的部位(淋巴结、肝、肺等),在其内增殖而形成转移瘤。特异性封闭 CXCR4 可使癌的淋巴结转移及骨髓转移受到抑制。本实验在蛋白质水平对乳腺癌 CXCR4 研究发现:乳腺癌组织 CXCR4 阳性表达率明显高于正常乳腺组织;转移淋巴结组织阳性表达率明显高于原发肿瘤,提示: CXCR4 阳性表达与乳腺癌的生长、转移有关。Salvucci 等^[6]利用组织学芯片技术分析正常乳腺组织、原位癌、浸润性癌 CXCR4 的表达,分别为 20%、30%、67%,呈逐渐上升趋势,显示 CXCR4 表达与乳腺癌发生、发展密切相关。进一步研究 CXCR4 的阳性表达与乳腺癌临床病理特性的关系发现: CXCR4 的表达与乳腺癌淋巴结转移、HER-2、临床分期密切相关,而与患者年龄、肿瘤直径、ER 表达、PR 表达、组织学类型及肿瘤分化程度等临床病理特性等无关。国内亦有学者通过免疫组织化学法对乳腺癌组织标本进行检测,结果显示:淋巴结转移组与淋巴结未转移组 CXCR4 阳性表达率间差异有统计学意义;淋巴结未转移组与淋巴结 1~3 枚转移及 4 枚以上淋巴结转移组间比较,差异有统计学意义;不同组织学分级的乳腺癌标本 CXCR4

阳性表达率间差异有统计学意义,从而提示 CXCR4 在促进乳腺癌生长及增加转移能力方面可能有重要作用^[7]。

淋巴结转移是影响乳腺癌预后的重要因素。本研究显示,伴区域淋巴结转移的乳腺癌组织 CXCR4 阳性率显著高于无区域转移的乳腺癌患者($P < 0.05$),淋巴结组织 CXCR4 阳性率显著高于乳腺癌组织($P < 0.05$),提示 CXCR4 阳性表达与乳腺癌的淋巴结转移密切相关。Kato 等^[8]对 79 例手术切除的乳腺浸润性导管癌组织进行的研究表明,所有患者的癌组织均表达 CXCR4,而高表达尤其是局灶性高表达者伴有广泛的淋巴结转移,提示 CXCR4 可能促进乳腺癌通过淋巴转移。丁勇兴等^[9]研究了乳腺癌标本中 CXCR4 的不同表达水平以及生物学标记物 HER-2 的表达,进而评估这些生物学标记物能否预测乳腺癌腋窝淋巴结转移潜能,经过实验认为趋化因子受体 CXCR4 在乳腺癌中是预测腋窝淋巴结转移的一种新型的生物标记物,联合其他标记物,如 HER-2 可提高预测受累淋巴结状态的准确性。Katayama 等^[10]对头颈部鳞癌研究后发现,CXCR4 表达量的差异也与转移程度相关,伴有 N₂ 转移头颈部鳞癌 CXCR4 表达明显高于伴有 N₀~N₁ 转移组($P = 0.0131$)。Liang 等^[11]通过小分子干扰核糖核酸技术从 mRNA 水平阻断 CXCR4 的表达,从而削弱了乳腺癌细胞在重组细胞基底膜侵袭抑制实验中的侵袭能力,阻止了乳腺癌转移的发生。CXCR4 与其相应的配体 CXCL12 结合能诱导乳腺癌细胞迁移,并呈现剂量效应关系;而抗 CXCR4 抗体或用 RNA 干扰技术抑制 CXCR4 基因的表达,均可抑制乳腺癌细胞的体外迁移。

HER-2/*neu* 基因是乳腺癌常表达的一种癌基因,它的表达提示预后差,易于发生转移。本研究发现乳腺癌 HER-2 阳性组 CXCR4 阳性表达率明显高于 HER-2 阴性组;Li 等^[12]研究发现 CXCR4 表达上调在 HER-2 促进肿瘤转移中发挥重要作用。HER-2 通过刺激乳腺癌细胞高表达 CXCR4 并且阻止 CXCR4 的降解而影响 CXCL12/CXCR4 轴对乳腺癌细胞侵袭能力的影响;22%乳腺癌 HER-2 和 CXCR4 共同表达,这些患者的生存期较短。Cabioglu 等^[13]的研究也证明乳腺癌原发灶 CXCR4 和 HER-2 共同表达者易发生骨髓转移,且促进转移灶增殖,并且在淋巴结阳性病例中与淋巴结转移数目超过 4 枚以上密切相关。

部分乳腺癌预后不佳的原因是手术时血液、肝、骨髓已有了微转移灶。由于手术中无法准确判断有否微小转移灶存在,因此如何预测微转移并早期诊断、及时治疗是目前影响乳腺癌治疗效果的主要环节。本研究显示,发生远处转移的乳腺癌组织 CXCR4 阳性表达率(74.1%)显著高于无远处转移的患者(43.9%),CXCR4 阳性表达组 5 年生存率为 66.7%,明显低于 CXCR4 阴性表达组的 87.2%,提示乳腺癌组织 CXCR4 阳性表达与远处转移密切相关,

CXCR4 阳性表达患者预后较差。Schimanski 等^[14]对大肠癌的研究亦证实 CXCR4 阳性表达与大肠癌肝转移、复发率、3 年生存期密切相关。Kim 等^[15]发现 CXCR4 阳性表达增加 I/II 期结直肠癌局部复发、远处转移的几率; IV 期 CXCR4 阳性组患者中位生存期(9 个月)明显低于阴性组(25 个月),而肝转移灶 CXCR4 阳性含量明显高于原发灶。Tamamura 等^[16]的研究发现 CXCL12 的抑制剂 T140 类似物在体外实验中能有效的抑制 CXCL12 诱导的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭,体内实验中可以降低 MDA-MB-231SCID 小鼠接种后肺转移的发生。Zeelenberg 等^[17]用 CXCL12 基因转染结肠癌细胞,在癌细胞内产生 CXCL12 融合蛋白,这样 CXCL12 在细胞内结合 CXCR4,使之不能到达细胞表面,不表达 CXCR4 的癌细胞向肝、肺转移显著减少。这种在细胞内捕获趋化因子受体的方法为抗肿瘤转移提供了新的思路,改变癌细胞上 CXCR4 的表达水平,可以减少或抑制癌细胞的迁移。厉红元等^[18]通过 shRNA-CXCR4 沉默 CXCR4 基因后,应用 RT-PCR、Western blotting 检测 3 株人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s 的 CXCR4 mRNA 及其蛋白的表达,结果 shRNA-CXCR4 作用于人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s 后能明显抑制其 CXCR4 基因的 mRNA 及蛋白表达水平($P < 0.05$),因此得出结论 shRNA-CXCR4 能特异性抑制乳腺癌细胞的 CXCR4 mRNA 及其蛋白的表达。故 CXCR4 有望成为抑制乳腺癌生物学行为的治疗靶点。

综上所述,对乳腺癌侵袭、转移相关指标的研究在预测肿瘤预后和指导临床治疗方面具有重要的意义^[19]。趋化因子及其受体在肿瘤细胞迁移、侵袭和转移过程中有着重要的作用。CXCR4/CXCL12 生物轴可能介导乳腺癌细胞的迁移,与肿瘤的淋巴结转移和远处转移密切相关,通过检测 CXCR4 有助于了解乳腺癌的淋巴、远处转移情况,有助于判断预后。阻断趋化因子 CXCR4/CXCL12 通路,有望成为肿瘤治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Spano J P, Andre F, Morat L, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol*, 2004, 15: 613—617.
- [2] Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, *et al.* Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 3530—3535.
- [3] Kang H, Watkins G, Douglas Jones A, *et al.* The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer. *Breast*, 2005, 14: 360—367.
- [4] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志*, 1996, 6: 229—231.
- [5] Muller A, Homey B, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 2001, 410: 50—56.
- [6] Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, *et al.* The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 13: 1291.
- [7] 李文仿, 王耕, 王明华. 乳腺癌患者 CXCR4 的表达及其与组织学分级和淋巴结转移的关系. *中国全科医学*, 2008,

11 :833—835.

- [8] Kato M, Kitayama J, Kazama S, *et al.* Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res*, 2003, 5 : R144—R150.
- [9] 丁勇兴,李成华,杨清玲,等. CXCR4 表达水平对判断乳腺癌淋巴结转移潜能的意义. *中国肿瘤临床*, 2008, 35: 88—91.
- [10] Katayama A, Ogino T, Bandoh N, *et al.* Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN-gamma in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005, 11:2937—2946.
- [11] Liang Z, Yoon Y, Votaw J, *et al.* Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2005, 65: 9672—9711.
- [12] Li Y M, Pan Y, Wei Y, *et al.* Up-regulation of CXCR4 is essential for HER-2 mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, 2004, 6 : 459—469.
- [13] Cabioglu N, Sahin A, Doucet M, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22 : 39—46.
- [14] Schimanski C C, Schwald S, Simiontonaki N, *et al.* Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behaviour of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11:1743—1750.
- [15] Kim J, Takeuchi H, Lam S T, *et al.* Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *Clin Oncol*, 2005, 23:2744—2753.
- [16] Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, *et al.* T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett*, 2003, 550: 79—83.
- [17] Zeelenberg I S, Ruuls Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res*, 2003, 63 :3833—3839.
- [18] 厉红元,任国胜,谭金详. siRNA 沉默人乳腺癌细胞株 CXCR4 基因的实验研究. *第三军医大学学报*, 2007, 29: 728—730.
- [19] 王欣,闫哲,李晓青,等. Cystain M 在乳腺癌及转移瘤中的表达和临床意义. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2008, 2: 294—300.

(收稿日期:2008-07-04)

(本文编辑:陈莉)

许建华,叶凯,郑正荣,等. 乳腺癌趋化因子受体 CXCR4 的表达及其意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2009, 3(3):309—316.