

探讨大肠腺癌中 SDF-1、CXCR4 mRNA 的表达及相关性

郑淑芳 展晓红 时丽芳 秦晓静 何滔

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划面上项目(11JCYBJC13000);武警后勤学院面上项目(WYMZ201009)

作者单位:300162 天津市,武警后勤学院附属医院病理科(郑淑芳 时丽芳 秦晓静 何滔)

266042 青岛市,山东省青岛市中心医院病理科(展晓红)

通讯作者:郑淑芳, E-mail: zhengshf@126.com

【摘要】 目的 探讨基质细胞来源因子 1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)及其受体 C-X-C 家族趋化因子受体 (C-X-C chemokine receptor, CXCR4) mRNA 的表达与大肠腺癌发生及浸润转移的关系。**方法** 应用逆转录聚合酶链法检测 50 例大肠腺癌、30 例正常肠黏膜组织中 SDF-1 和 CXCR4 的 mRNA 表达情况,并进行统计学分析。**结果** SDF-1 mRNA、CXCR4 mRNA 在大肠腺癌组织中的表达量显著高于正常肠黏膜组织,且差异均有统计学意义(P 均 <0.01);SDF-1 mRNA、CXCR4 mRNA 的表达量与患者的性别、年龄、分化程度无关(P 均 >0.05),与癌组织浸润深度和淋巴结转移有关(P 均 <0.05);大肠腺癌组织中 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达呈正相关($r=0.847, P<0.01$)。**结论** SDF-1 及其受体 CXCR4 在大肠腺癌发生及浸润转移中发挥着重要作用。

【关键词】 基质细胞来源因子 1; C-X-C 家族趋化因子受体; 大肠腺癌; 浸润转移

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.03.006

The expression and correlation of SDF-1 mRNA and its receptor CXCR4 mRNA in colorectal carcinoma

ZHENG Shu-fang¹, ZHAN Xiao-hong², SHI Li-fang¹, et al. ¹Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Logistical College of CAPF, Tianjin 300162, China ²Department of Pathology, Qingdao Center Medical Group, Qingdao 266042, China

【Abstract】 Objective To evaluate the expression and correlation of SDF-1 mRNA and its receptor CXCR4 mRNA in colorectal carcinoma tissue. **Methods** The expression of stromal cell-derived factor (SDF-1) mRNA and C-X-C chemokine receptor(CXCR4) mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction method in 50 cases of colorectal adenocarcinoma and 30 cases of normal colorectal mucosa, and the results were analyzed statistically. **Results** The expressional quantities of SDF-1 mRNA and CXCR4 mRNA in colorectal adenocarcinoma tissue were obviously higher than that in the normal colorectal mucosa tissue, and the differences all had statistical significance (P all <0.01). The expressional quantities of SDF-1 mRNA and CXCR4 mRNA in colorectal adenocarcinoma tissue were closely correlated with depth of tumor infiltration and metastasis of lymph node(P all <0.05), but not correlated with gender, age and differentiation degree(P all >0.05). The expressional quantities of SDF-1 mRNA and CXCR4 mRNA were highly positively correlated in colorectal adenocarcinoma tissue($r=0.847, P<0.01$). **Conclusion** SDF-1 and its receptor CXCR4 may play an important role in tumorigenesis progression, infiltration and metastasis of colorectal adenocarcinoma.

【Key words】 SDF-1; CXCR4; Colorectal adenocarcinoma; Invasion and metastasis

大肠腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,近年在我国发病率呈明显上升趋势,患者死亡的主要原因是癌组织的浸润和转移。目前关于大肠腺癌浸润转移机制的研究较多,涉及多途径、多基因参与的信号传导通路,而趋化因子及其受体在肿瘤中的作用是近年来人们关注的热点。本文研究应用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reac-

tion, RT-PCR)检测了大肠腺癌、正常肠黏膜组织中基质细胞来源因子 1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)和 C-X-C 家族趋化因子受体(C-X-C chemokine receptor, CXCR4) mRNA 的表达情况,分析了 SDF-1 和 CXCR4 mRNA 与大肠腺癌的发生、发展、浸润转移等生物学行为的关系,探讨其可能的作用机制,为大肠腺癌的早期发现、早期干预和寻找

治疗的靶点提供可靠的实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 50 例大肠腺癌患者, 其中男性 28 例, 女性 22 例; 年龄 40~84 岁, 中位年龄 62 岁, 手术切除后 30 min 内相对无污染的新鲜大肠腺癌组织; 同时留取距癌组织 6 cm 以远的正常肠黏膜组织(均经病理切片证实无增生性及肿瘤性病变)30 例。取材后立即置于-180℃液氮中冷冻, 后迅速移至-80℃冰箱内保存备用。所用刀片、EP 管等取材工具均经高温高压消毒、无 RNA 酶处理。

1.2 方法

1.2.1 试剂 RNArose Reagent 购自上海华舜生物工程有限公司, Prime Script TMRT-PCR Kit 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, SDF-1、CXCR4、GAPDH 引物序列均由上海生物工程有限公司合成。
1.2.2 RT-PCR 反应 50 例大肠腺癌及 30 例正常肠黏膜组织的总 RNA 抽提及 RT-PCR 反应严格按其试剂盒说明书进行。PCR 扩增引物如下: SDF-1 cDNA 引物序列上游: 5'-GAGCCAACGTCAAG-CATCTCA-3', 下游: 5'-TTCGGGTCAATGCA-CACTTGT-3', 扩增片断长度: 103 bp; CXCR4 cDNA 引物序列上游: 5'-TGGCCTTATCCTGCCTGGTAT-3', 下游: 5'-GGAGTCGATGCTGATCCCAAT-3', 扩增片断长度: 173 bp; 内参 GAPDH cDNA 引物序列上游: 5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3', 下游: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3', 扩增片断长度: 145 bp。PCR 反应程序: 94℃预变性 1 min, 94℃30 s, 55℃30 s, 72℃1 min, 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。引物扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.3 结果判断 RT-PCR 产物凝胶电泳后经凝胶成像分析系统处理, SDF-1、CXCR4 分别出现 103

bp、173 bp 的泳动条带, 相应内参 GAPDH 出现 145 bp 的泳动条带。应用 Quantity One 灰度分析软件检测 SDF-1、CXCR4 及相应内参 GAPDH 电泳条带灰度值, 并计算相对系数。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。RT-PCR 实验结果行独立样本 *t* 检验。相关性分析采用 Pearson 相关性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌与正常肠黏膜组织中的表达 50 例大肠腺癌和 30 例正常肠黏膜组织中, SDF-1 mRNA 的表达量, 两组间比较差异具有统计学意义 ($t = 7.808, P < 0.01$); CXCR4 mRNA 的表达量, 两组间比较差异有统计学意义 ($t = 8.073, P < 0.01$)。见表 1, 图 1~2。

表 1 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌与正常肠黏膜组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组织类型	例数	SDF-1 mRNA	CXCR4 mRNA
大肠腺癌组织	50	0.709±0.082	0.814±0.081
正常肠黏膜组织	30	0.560±0.085	0.663±0.082
<i>t</i> 值	-	7.808	8.073
<i>P</i> 值	-	0.000	0.000

2.2 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系 50 例大肠腺癌中 SDF-1 和 CXCR4 mRNA 的表达量与患者的性别、年龄、分化程度无关 (P 均 > 0.05), 但与癌组织浸润深度、淋巴结转移情况有关 (P 均 < 0.05)。见表 2。

2.3 SDF-1 mRNA 与 CXCR4 mRNA 表达的相关性分析 在选取的 50 例大肠腺癌组织中, 随着 SDF-1 mRNA 表达量的增加, CXCR4 mRNA 表达量也逐渐增加, 经 Pearson 相关性分析, SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达量呈高度正相关关系 ($r = 0.847$,

表 2 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在大肠腺癌中的表达与临床病理的关系

临床病理指标	例数	SDF-1 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	CXCR4 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
性别	男	28	0.718±0.0827	0.848	0.824±0.0809	0.961	0.341
	女	22	0.698±0.0813		0.802±0.0795		
年龄	≤ 62	25	0.697±0.0939	-1.038	0.800±0.0911	-1.208	0.233
	> 62	25	0.721±0.0675		0.828±0.0668		
分化程度	高、中分化	30	0.700±0.0855	-1.006	0.804±0.0828	-1.045	0.301
	低分化	20	0.724±0.0758		0.829±0.0759		
浸润深度	侵达黏膜下层、肌层	26	0.682±0.0760	-2.639	0.786±0.0752	-2.690	0.010
	侵达浆膜	24	0.739±0.0787		0.844±0.0760		
淋巴结转移	有	27	0.732±0.0729	2.258	0.836±0.0702	2.167	0.035
	无	23	0.682±0.0849		0.788±0.0851		

$P < 0.01$)。见表 3。

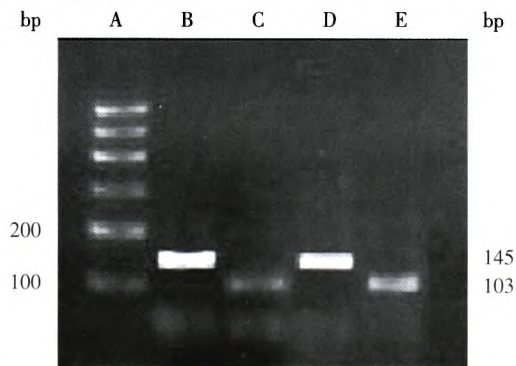


图 1 SDF-1 mRNA 在正常肠黏膜和大肠腺癌组织中的表达
注: A 为 100 bp DNA Ladder Marker; B、D 分别为正常肠黏膜和大肠腺癌中 GAPDH mRNA 的表达(145 bp); C、E 分别为正常肠黏膜和大肠腺癌中 SDF-1 mRNA 的表达(103 bp)

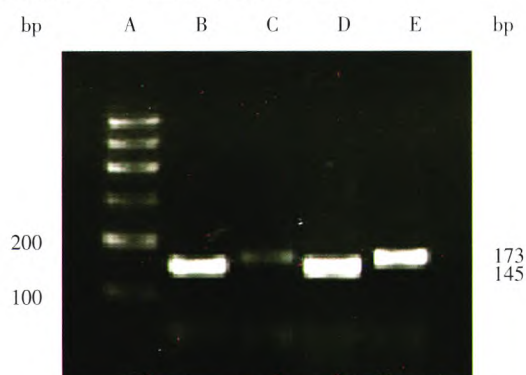


图 2 CXCR4 mRNA 在正常肠黏膜和大肠腺癌组织中的表达
注: A 为 100 bp DNA Ladder Marker; B、D 分别为正常肠黏膜和大肠腺癌中 GAPDH mRNA 的表达(145 bp); C、E 分别为正常肠黏膜和大肠腺癌中 CXCR4 mRNA 的表达(173 bp)

表 3 SDF-1 mRNA 与 CXCR4 mRNA 表达的相关性($\bar{x} \pm s$)

SDF-1 mRNA	CXCR4 mRNA	r 值	P 值
0.709±0.0818	0.814±0.0802	0.847	0.000

3 讨论

SDF-1 及其受体 CXCR4 作为趋化因子家族的重要成员具有广泛的生物学作用,其在肿瘤的浸润和器官特异性转移中的作用正倍受关注。通常二者以密切相关的偶联分子对参与细胞间信号传递和细胞迁移,故有人称其为 SDF-1/CXCR4 生物学轴。

3.1 SDF-1/CXCR4 与肿瘤的浸润转移 本文研究应用 RT-PCR 方法检测了 50 例大肠腺癌中 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达情况,结果显示 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达量与患者的年龄、性别、分化程度无关(P 均 > 0.05),而与癌组织浸润深度、淋巴结转移有关,即癌组织侵达浆膜组的 SDF-1 mRNA、CXCR4 mRNA 的表达量均显著高于

侵达黏膜下层和肌层组(P 均 < 0.05),有淋巴结转移组 SDF-1 mRNA、CXCR4 mRNA 的表达量均显著高于无淋巴结转移组(P 均 < 0.05)。上述结果提示 SDF-1 和 CXCR4 与大肠腺癌的生物学行为密切相关,在大肠腺癌的浸润、转移过程中发挥了重要的作用。展晓红等^[1]应用免疫组织化学法研究了 SDF-1 和 CXCR4 蛋白的表达支持本文研究结果。SDF-1/CXCR4 生物轴活性增高促进大肠腺癌的生长、浸润、转移可能是以下原因:①SDF-1/CXCR4 的高表达和二者以受体的形式特异性结合,激发了细胞内信号转导,导致下游效应分子的聚集,使肿瘤细胞表面整合素及 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白表达增高,激活了黏附斑激酶,使胞内的肌动蛋白结合蛋白(如辅肌动蛋白、黏附斑蛋白和张力蛋白等)等表达量增高,导致细胞内骨架蛋白(F-肌动蛋白)束的数量和厚度增加^[2,3];或由于 CXCR4 的表达增高使其胞内部分的羧基末端与 G 蛋白相互作用增强,使偶联的 G 蛋白构象发生改变^[4],激活磷脂酶,水解二磷酸磷脂酰肌醇生成肌醇三磷酸和二酰基甘油,引发细胞的钙内流增多,调节肌动蛋白的组装,引起肿瘤细胞内骨架蛋白的聚合与再分布,提高了肿瘤细胞的运动能力,增加了肿瘤侵袭性;Muller 等^[3]体外实验中用激光共聚焦显微镜观察到:100 nmol/L 的 SDF-1 在 20 s 内可使乳腺癌细胞内的丝状肌动蛋白(F-肌动蛋白)增加 2.2 倍,20 min 后可观察到乳腺癌细胞形成伪足,定向移动证实了 SDF-1/CXCR4 轴与肿瘤细胞的运动迁徙有关。②CXCR4 表达增高可与 Scr 家族激酶结合或直接与磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)γ 调节亚基结合活化 PI3K,进而激活其下游信号分子^[5],如 NF-κB、蛋白激酶 B、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)及细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular-signal regulated kinase, ERK1/2),上调基质金属蛋白酶 9 的表达^[6,7],促进 IV 型胶原、基底膜的降解并诱发新生血管形成^[8],有利于癌细胞的生长、侵袭和转移。③SDF-1/CXCR4 可诱导 Akt 磷酸化,进而上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA 和蛋白水平的表达,促进肿瘤血管生成。利用 siRNA 沉默技术下调 CXCR4 表达后,可以明显抑制乳腺癌细胞株 VEGF 的生成^[8]。④肿瘤细胞可自主分泌或旁分泌 SDF-1 使其局部浓度增高^[9],可激活 PI3K/Akt/mTOR^[10]和 MAPK p42/44 信号转导通路,肿瘤细胞的增殖能力增强^[11,12]。

3.2 SDF-1/CXCR4 与肿瘤发生 本文研究结果发现大肠腺癌组织 SDF-1 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达均高于正常肠黏膜组织, 差异均具有统计学意义(P 均 <0.01)。上述结果提示 SDF-1 和 CXCR4 可能与大肠腺癌的发生有关。展晓红等^[1]应用免疫组织化学法研究发现, 大肠腺癌组织中 SDF-1 和 CXCR4 的蛋白表达明显高于正常肠黏膜组织和腺瘤组织。Ottaiano 等^[13]的研究报道也支持这一结论。SDF-1/CXCR4 促进大肠腺癌发生, 可能是由于①SDF-1 与其受体 CXCR4 结合能间接活化转录, 因子 cAMP 反应元件结合蛋白上调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 抑制细胞凋亡^[14]。②SDF-1 可增加磷酸化 Akt 和 ERK1/2 的表达, 激活 PI3K/Akt 通路和 ERK1/2 通路, 阻止线粒体膜电位的升高, 抑制细胞色素 C 从线粒体释放至胞浆, 降低细胞凋亡蛋白酶-3 的活性, 抑制细胞凋亡^[15]。

3.3 SDF-1 mRNA 与 CXCR4 mRNA 表达的相关性分析 本文研究结果显示, 肿瘤组织中 SDF-1 mRNA 与 CXCR4 mRNA 的表达量呈高度正相关 ($r=0.847, P<0.01$), 其可能的机制是 SDF-1/CXCR4 相互作用的过程中一些细胞因子如核转录因子等即可上调 SDF-1 mRNA 的表达, 也可上调 CXCR4 mRNA 的表达, 并增加相互作用的敏感性, 因而提示 SDF-1/CXCR4 生物轴与这些调节因子间可能构成环路, 相互影响, 调节着各自的生物学功能, 这样的环路和作用机制还需要进一步探讨。

上述结果提示 SDF-1/CXCR4 生物学轴在肿瘤的转移中有重要的作用, 但其动力学过程如何, 表达的强度能否作为对肿瘤术后复发高危人群预测的指标等有待于进一步探讨。

4 参考文献

- 1 展晓红, 周蓉蓉, 郑淑芳, 等. 基质细胞衍生因子 1 及其受体 CXCR4 在大肠癌中的表达及临床意义. 中国全科医学, 2009, 12: 1066-1068.
- 2 Leelawat K, Leelawat S, Narong S, et al. Roles of the MEK1/2 and AKT pathways in CXCL12/CXCR4 induced cholangiocarcinoma cell invasion. World J Gastroenterol, 2007, 13: 1561-1568.
- 3 Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature, 2001, 410: 50-56.
- 4 Veldkamp CT, Ziarek JJ, Su J, et al. Monomeric structure of the cardioprotective chemokine SDF-1/CXCL12. Protein Sci, 2009, 18: 1359-1369.
- 5 Huang CY, Lee CY, Chen MY, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCR4 enhanced motility of human osteosarcoma cells involves MEK1/2, ERK and NF-kappaB-dependent pathways. J Cell Physiol, 2009, 221: 204-212.
- 6 Samara GJ, Lawrence DM, Chiarelli CJ, et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Lett, 2004, 214: 231-241.
- 7 Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, et al. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. Blood, 2006, 108: 3143-3151.
- 8 Liang Z, Brooks J, Willard M, et al. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359: 716-722.
- 9 Orimo A, Sgroi DC, Gupta PB, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1 (CXCL12) secretion. Cell, 2005, 21: 335-348.
- 10 Chen G, Chen SM, Wang X, et al. Inhibition of chemokine (CXC motif) ligand 12/chemokine (CXC motif) receptor 4 axis (CXCL12/CXCR4)-mediated cell migration by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in human gastric carcinoma cells. J Biol Chem, 2012, 287: 12132-12141.
- 11 Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, et al. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. Cancer Res, 2003, 63: 1969-1974.
- 12 Wu MH, Chen Q, Li D, et al. LRRC4 Inhibit Human Glioblastoma Cells Proliferation, Invasion and proMMP-2 Activation by Reducing SDF-1alpha/CXCR4-Mediated ERK1/2 and Akt Signaling Pathways. J Cell Biochem, 2008, 103: 245-255.
- 13 Ottaiano A, Palma A, Napolitano M, et al. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. Cancer Immunol Immunother, 2005, 54: 781-791.
- 14 Yang L, Jackson E, Woerner BM, et al. Blocking CXCR4-mediated cyclic AMP suppression inhibits brain tumor growth in vivo. Cancer Res, 2007, 67: 651-658.
- 15 尹琪, 金培峰, 李玲玲, 等. SDF-1alpha 通过 PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路抑制缺氧和无血清诱导的骨髓基质干细胞凋亡. 中国细胞生物学学报, 2010, 32: 215-222.

(收稿日期: 2013-07-10)

(本文编辑: 杨军)