

· 论 著 ·

CXCL12 和 CXCR4 在人星形细胞瘤中的表达及意义*

刘海巍, 陶胜忠[△], 牛光明, 周 兴, 牛国策, 孙所辉

(郑州大学第二附属医院神经外科, 郑州 450014)

摘要:目的 探讨趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 在人星形细胞瘤中的表达及意义。方法 应用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)、免疫组化 SP 法检测 CXCL12 和 CXCR4 在非瘤脑组织和人星形细胞瘤组织中的表达, 分析 CXCL12 和 CXCR4 在不同病理级别人星形细胞瘤组织中的表达和它们之间的相关性。结果 经统计学分析, CXCL12 和 CXCR4 在非瘤脑组织和人星形细胞瘤组织中表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 在 WHO I ~ II 级人星形细胞瘤组织和 WHO III ~ IV 级人星形细胞瘤组织中表达比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CXCL12 和 CXCR4 表达呈现明显的正相关($P < 0.05$)。结论 CXCL12 和 CXCR4 在人星形细胞瘤中的表达高于在非瘤脑组织中的表达, 其表达水平随病理级别的升高而升高, 并且 CXCL12 和 CXCR4 之间存在明显的正相关。

关键词:星形细胞瘤; CXCL12; CXCR4; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)19-1912-03

The expressions of CXCL12 and CXCR4 in human astrocytoma and its significances*

Liu Haiwei, Tao Shengzhong[△], Niu Guangming, Zhou Xin, Niu Guoce, Sun Suohui

(Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human astrocytoma and its significances. **Methods** Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemistry SP were used to detected the expression of CXCL12 and CXCR4 in non-tumor brain tissues and human astrocytoma tissues, their expression in different pathological grades of human astrocytoma tissues and the correlation between CXCL12 and CXCR4 were analysed. **Results** By statistical analysis, the difference between the expression of CXCL12 and CXCR4 in non-tumor brain tissues and human astrocytoma tissues was statistically significant($P < 0.05$), and the difference between the expression of CXCL12 and CXCR4 in WHO I ~ II grades human astrocytoma tissues and WHO III ~ IV grades human astrocytoma tissues was statistically significant($P < 0.05$). The expression of CXCL12 and CXCR4 showed a significant positive correlation ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of CXCL12 and CXCR4 in human astrocytoma tissue is higher than the expression in non-tumor brain tissue, it increases with increasing pathological grades and there is a significant positive correlation between CXCL12 and CXCR4.

Key words: astrocytoma; CXCL12; CXCR4; reverse transcription polymerase chain reaction; immunohistochemistry

星形细胞瘤是最常见的神经上皮性肿瘤, 约占颅内肿瘤的 13.0%~26.0%, 占胶质瘤的 21.2%~51.6%^[1]。目前以手术治疗为主, 辅以放疗、化疗等的综合治疗, 虽然取得了一定的临床效果, 但并未从根本上提高星形细胞瘤患者的总体预后。研究发现趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 构成的 CXCL12/CXCR4 信号通路可能与人胶质细胞瘤的发生、发展密切相关, 本文初步探讨 CXCL12 和 CXCR4 在人星形细胞瘤中的表达及意义。

1 材料与方 法

1.1 材料 选取本院神经外科 2010 年 3 月至 2011 年 7 月手术切除并经病理证实为星形细胞瘤标本 48 例(肿瘤组)。所有患者手术前均未经放疗、化疗等治疗。其中男 31 例, 女 17 例; 年龄 7~68 岁, 平均 41.7 岁。根据 2007 年 WHO 关于中枢神经系统肿瘤的分级, I 级 8 例, II 级 17 例, III 级 16 例, IV 级 7 例。12 例非瘤组织均取自颅脑损伤等行减压术患者(非瘤组)。标本离体 30 min 内迅速放入液氮罐中, 后转入 -80℃ 冰箱中冻存备用。

1.2 逆转录聚合酶链反应法(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 半定量检测 CXCL12 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的转录水平 CXCL12 引物: 上游 5'-TAG TGC CTC CAT GGC ATA CA-3', 下游 5'-GAT GTG TAA TGG TCC CCC TG-3', 扩增片段长度为 138 bp; CXCR4 引物: 上游 5'-TGA CTC CAT GAA GGA ACC CTG-3', 下游 5'-CTT GGC CTC TGA CTG TTG GTG-3', 扩增片段长度 381 bp; 内参 β -actin: 上游 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3', 下游 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3', 扩增片段长度为 318 bp。取 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后摄像, 采用相对积分光密度(RIOD)表示 mRNA 的相对表达量。所用的引物及 β -actin 均购自郑州鼎国生物技术有限公司。

1.3 免疫组化 SP 法检测 CXCL12 蛋白和 CXCR4 蛋白的表达水平 采用免疫组化 SP 法检测 CXCL12 和 CXCR4 蛋白, 兔抗人 CXCL12 多克隆抗体(Abcam 公司), 兔抗人 CXCR4 多克隆抗体(R&D 公司), 免疫组化试剂盒(郑州鼎国生物技术有限公司)。判断标准: CXCL12 和 CXCR4 多表达于细胞质及

细胞膜, 随机选 10 个高倍视野, 依照细胞着色密度和着色强度半定量评分。(1)染色细胞百分比: 未见染色为 0 分, $\leq 25\%$ 细胞染色为 1 分, $25\% \sim 50\%$ 细胞染色为 2 分, $> 50\%$ 细胞染色为 3 分; (2) 依阳性细胞染色强度: 未见染色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分, 上述两者之和的总得分来判定结果, > 2 分定义为阳性表达(+), ≤ 2 分定义为阴性表达(-)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件包处理数据, 两独立定量样本之间的比较用 *t* 检验, 相关性用 Pearson 积矩相关系数表示。两组分类变量之间的比较和相关性分析用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

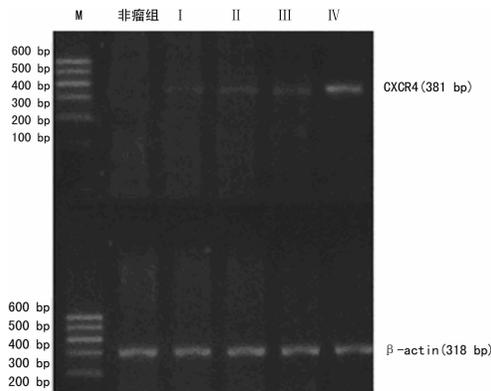
2.1 CXCL12 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达 CXCL12 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在非瘤组和肿瘤组中的表达见表 1, 图 1、2。CXCL12 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在肿瘤组中的表达高于在非瘤组中的表达($P<0.05$); 在 III~IV 级星形细胞瘤组织中的表达高于在 I~II 级星形细胞瘤组织中的表达($P<0.05$)。Pearson 积矩相关系数表明 CXCL12 mRNA 和 CXCR4 mRNA 的表达呈明显正相关($r=0.697, P<0.05$)。

表 1 CXCL12 mRNA 和 CXCR4 mRNA 在各组患者中的表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CXCL12mRNA	CXCR4mRNA
		RIOD 值	RIOD 值
非瘤组	12	0.381 ± 0.198	0.226 ± 0.117
肿瘤组	48	0.799 ± 0.219 [△]	0.677 ± 0.231 [△]
I~II 级星形细胞瘤组织	25	0.680 ± 0.201	0.516 ± 0.183
III~IV 级星形细胞瘤组织	23	0.930 ± 0.158 [☆]	0.853 ± 0.124 [☆]

[△]: $P<0.05$, 与非瘤组比较; [☆]: $P<0.05$, 与 I~II 级星形细胞瘤组织比较。

蛋白和 CXCR4 蛋白在肿瘤组中的表达高于非瘤组的表达($P<0.05$)。CXCL12 蛋白和 CXCR4 蛋白在 III~IV 级星形细胞瘤组织中的表达高于在 I~II 级星形细胞瘤组织中的表达($P<0.05$)。且 CXCL12 蛋白和 CXCR4 蛋白的表达呈正相关($r=0.499, P<0.05$)。



M: Marker; I: I 级星形细胞瘤组织; II: II 级星形细胞瘤组织; III: III 级星形细胞瘤组织; IV: IV 级星形细胞瘤组织。

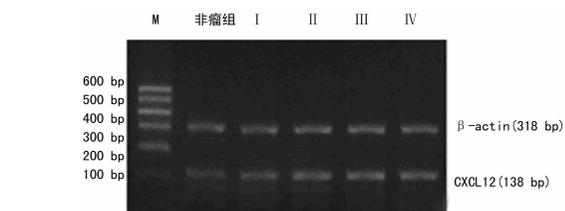
图 2 CXCR4 mRNA 电泳图

3 讨 论

CXCL12 属于趋化因子 CXC 亚家族, 首先在 P6 系小鼠骨髓基质细胞分泌的细胞因子中被发现, CXCR4 是存在于细胞膜上的具有 7 个跨膜结构的 G 蛋白耦联受体。CXCL12 与 CXCR4 具有高度的亲和力, CXCL12 与 CXCR4 的 N 端特异性结合并与 CXCR4 第 2 胞外环相互作用才能启动下游信号, 启动基因表达和细胞周期进程的改变, 引起趋化性、细胞增殖和基因转录等多种反应。

本研究检测了 CXCL12 和 CXCR4 在非瘤脑组织和星形细胞瘤各病理级别组织中的表达, 结果显示 CXCL12 和 CXCR4 在星形细胞瘤中的表达明显高于在非瘤脑组织中的表达, 它们的表达水平随星形细胞瘤病理级别的升高而升高, 并且二者的表达水平呈现明显的正相关。这些表明 CXCL12 和 CXCR4 构成的 CXCL12/CXCR4 信号通路与星形细胞瘤的恶性发展和恶性程度均有密切的关系, 可能是星形细胞瘤发生、发展过程中的关键环节。

Barbero 等^[2]发现外源性的 CXCL12 能诱导神经胶质瘤细胞的增殖, 其机制可能与 ERK 的活化相联系, 并且 CXCL12 能诱导白细胞和血管内皮细胞等迁移到肿瘤组织, 这些细胞不但参与了肿瘤环境的炎症和免疫反应, 还能产生多种生物因子刺激肿瘤的生长, 并通过产生促血管生成因子刺激血管的生成从而促进肿瘤的增殖。CXCL12 还能通过激活核因子- κ B(NF- κ B)来抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的产生和肿瘤细胞的凋亡间接促进肿瘤细胞的增殖。实验表明高级别胶质瘤中 CXCL12 和 CXCR4 的表达较低级别胶质瘤及正常脑组织均明显升高。CXCL12 是不具有谷氨酰胺-亮氨酸-精氨酸序列的趋化因子, 但却显示较强出血管生成的活性。体内病理浓度的 CXCL12 在伴有低浓度的血管内皮生长因子(VEGF)的情况下能有效诱导血管的生成^[3], 这揭示了它们之间存在巨大的协同作用, 其机制可能与 CXCL12 和 CXCR4 结合后通过 PI3K/Akt 途径促进内皮细胞释放 VEGF 有关。此外, CXCL12 能吸引树突状细胞进入肿瘤环境, 然后肿瘤树突状细胞可依次通过产



M: Marker; I: I 级星形细胞瘤组织; II: II 级星形细胞瘤组织; III: III 级星形细胞瘤组织; IV: IV 级星形细胞瘤组织。

图 1 CXCL12 mRNA 电泳图

表 2 CXCL12 蛋白和 CXCR4 蛋白在各组中的表达情况

组别	n	CXCL12		CXCR4	
		-	+	-	+
非瘤组	12	7	5	8	4
肿瘤组	48	11 [△]	37 [△]	14 [△]	34 [△]
I~II 级星形细胞瘤组织	25	9	16	11	14
III~IV 级星形细胞瘤组织	23	2 [☆]	21 [☆]	3 [☆]	20 [☆]

[△]: $P<0.05$, 与非瘤组比较; [☆]: $P<0.05$, 与 I~II 级星形细胞瘤组织比较。

2.2 CXCL12 蛋白和 CXCR4 蛋白的表达 见表 2。CXCL12

生 IL-8 和 TNF- α 诱导血管的生成^[4]。同时血管内皮细胞的移行在很大程度上依赖于 CXCL12, 血管内皮细胞可沿着 CXCL12 迁移并以依赖 CXCL12 的方式诱导肿瘤血管的生成。CXCL12 还可通过诱导肿瘤细胞产生纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)抑制纤溶酶原激活物(PA)来发挥其促进肿瘤增殖和血管发生的作用^[5]。研究还显示,在 CXCL12 抗体存在的情况下非小细胞肺癌(NSCLC)的转移在很大程度上被抑制了^[6],并且在细胞表面阻断 CXCR4 的表达能极大降低肿瘤细胞向肝脏和肺脏的转移,在肿瘤经常转移的器官如淋巴结、肺脏、肝脏和骨髓等中发现表达有较高水平的 CXCL12^[7]。肿瘤的散播可以被看为涉及细胞外基质降解的过程,金属蛋白酶(MMPs)能使周围正常组织的细胞外基质降解并能介导肿瘤的侵袭和转移。许多研究证实,在多种肿瘤细胞中 CXCL12 能诱导 MMPs 的合成和肿瘤细胞的粘附来促进肿瘤细胞的转移^[8]。CXCL12 和 CXCR4 在一些肿瘤细胞中的高表达也许暗示着 CXCL12/CXCR4 信号通路在引导肿瘤细胞向特定器官的转移中方面发挥着关键性的作用。

目前通过阻断 CXCL12 和 CXCR4 的相互作用和抑制下游细胞内酶的活性, CXCL12/CXCR4 信号通路已成为相关疾病治疗的一个重要靶点。CXCR4 拮抗剂——AMD3100 的安全性、耐受性和有效性在临床实验中已经得到证实^[9]。临床试验显示非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤患者在应用 AMD3100 和 G-CSF 后与单独应用 G-CSF 相比,更多的患者收集到了最佳数量的干细胞用于自体移植^[10]。CXCL12 拮抗剂类似物 CTCE-9908 在小鼠的乳腺癌模型中能降低肿瘤的转移和原发肿瘤的生长,并能小鼠的前列腺癌模型中减小肿瘤的体积^[11]。

本研究认为在星形细胞瘤中存在 CXCL12 和 CXCR4 的高表达,其表达水平与病理级别密切联系,并且二者的表达呈现明显的正相关。检测 CXCL12 和 CXCR4 的表达水平可能对临床治疗和判断星形细胞瘤病理级别、分化程度及预后具有一定的指导意义。

参考文献:

[1] 王忠诚,王忠诚神经外科学[M].武汉:湖北科学技术出版社,2005:541.
[2] Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, et al. Stromal cell-derived factor 1 stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt[J]. Cancer Res, 2003, 63(8):

1969-1974.

[3] Kryczek I, Lange A, Mottram P, et al. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers [J]. Cancer Res, 2005, 65(2):465-472.
[4] Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, et al. Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64(16):5535-5538.
[5] Oh JW, Olman M, Benvenise EN. CXCL12-Mediated induction plasminogen activator inhibitor-1 expression in human CXCR4 positive astrogloma cells[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(4):573-577.
[6] Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, et al. The stromal derived factor-1/ CXCL12- CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(12):1676-1686.
[7] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. Nature, 2001, 410(6824):50-56.
[8] Klier CM, Nelson EL, Cohen CD, et al. Chemokine-induced secretion of gelatinase B in primary human monocytes[J]. Biol Chem, 2001, 382(9):1405-1410.
[9] DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, et al. Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for patients with non-Hodgkins lymphoma [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(28):4767-4773.
[10] DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem transplantation in patients with multiple myeloma[J]. Blood, 2009, 113(23):5720-5726.
[11] Porvasnik S, Sakamoto N, Kusmartsev S, et al. Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth [J]. Prostate, 2009, 69(13):1460-1469.

(收稿日期:2011-12-01 修回日期:2012-01-06)

(上接第 1911 页)

性重型颅脑损伤患者治疗机理及临床疗效研究[J]. 中华神经外科杂志, 2001, 17(5):51-55.
[11] 邹国英,蒋洪敏. 颅脑损伤患者外周血髓过氧化物酶的变化及临床意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(29):2915-2917.
[12] Curfman GD. Hypothermia to protect the brain[J]. N Engl J Med, 2002, 346(8):546-556.

[13] 王琴,黄慧玲,刘锐,等. 亚低温对急性颅脑损伤大鼠线粒体呼吸链酶活性的影响[J]. 天津医药, 2008, 36(7):524-526.
[14] 班桂玲. 亚低温疗法治疗急性期脑出血 108 例疗效观察 [J]. 山东医药, 2009, 49(18):78-79.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-03-22)