

· 论 著 ·

趋化因子 10 在慢性非萎缩性胃炎、胃癌癌前病变及胃癌中的表达及意义*

何 甜¹,唐 慧²,郭 强^{1△},杨 慧³

(云南省第一人民医院:1. 消化内科;2. 基础医学研究所/云南省重点实验室;3. 病理科,昆明 650032)

摘 要:目的 检测趋化因子 10(CXCL10)在慢性非萎缩性胃炎(CNAG)、癌前病变(PL)和胃癌(GC)中的表达情况,探讨 CXCL10 蛋白与 GC 临床特征及胃黏膜癌变机制的关系。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测 CXCL10 蛋白在 20 例 CNAG、60 例 PL 及 60 例 GC 患者胃黏膜中的表达。并应用计算机辅助图像分析仪对表达结果进行图像分析,然后进行统计学分析。结果 CXCL10 蛋白在 CNAG、PL 和 GC 中的表达阳性率分别为 10.00%、26.67%、71.67%;CXCL10 蛋白阳性表达率在 GC 组显著高于 CNAG 及 PL 组(均为 $P<0.01$);CXCL10 蛋白在 PL、CNAG 两种病理组织中阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$);在 PL 组中,CXCL10 的阳性表达率在肠化及不典型增生组中差异无统计学意义($P>0.05$),在不同程度增生的不典型增生组中差异亦无统计学意义($P>0.05$)。在 GC 组中,中低分化 GC 组 CXCL10 蛋白阳性表达率显著高于高分化组。结论 随着 GC 演进,CXCL10 蛋白阳性表达率逐渐升高,可见 CXCL10 蛋白在 GC 演进过程中异常扩增提示其可能对 GC 的形成起一定的调控作用。

关键词:趋化因子 CXCL10;慢性萎缩性胃炎;癌前病变;胃肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.002 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)04-0388-03

Expression of CXC chemokine 10 in chronic non-atrophy gastritis, carcinoma of stomach precancerous lesions and gastric cancer and their clinical significance*

He Tian¹, Tang Hui², Guo Qiang^{1△}, Yang Hui³

(1. Department of Gastroenterology; 2. Institute of Basic Medicine; 3. Department of Pathology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of CXC chemokine 10(CXCL10) in chronic non-atrophy gastritis(CNAG), precancerous lesions(PL)and gastric cancer(GC), primitively understanding of CXCL10 expression levels in three gastric types, exploring their clinical significances. **Methods** The expressions of CXCL10 in 20 cases of CNAG, 60 cases of PL, 60 cases of GC tissues were examined with immunohistochemistry method, the expression level of CXCL10 was analyzed by computer-assisted image analysis system, and then analyzed statistically. **Results** CXCL10 expression were positive in parts of CNAG, PL and GC the positive rates were 10.00%, 26.67%, 71.67% respectively). Expression levels of CXCL10 in the GC tissue specimens were significantly higher than in CNAG and PL($P<0.01$). Expression levels of CXCL10 in the PL and CNAG tissue specimens have no significant difference($P>0.05$). Expression levels of CXCL10 in CAG with IM, CAG with Dys had no significant difference($P>0.05$), and in CAG with Severe Dys and Light-Moderate Dys had no significant difference($P>0.05$). The expression levels of CXCL10 were relevant to the differentiation degree of GC($P>0.05$). **Conclusion** The expression levels of CXCL10 were gradually rose from CNAG, PL to GC, and had significant correlation with each other in CNAG, PL and GC, indicating that CXCL10 have a key role in the produce and development of GC.

Key words: chemokine CXCL10; stomach neoplasms; chronic non-atrophic gastritis; precancerous lesions

胃癌(GC)是消化道常见的恶性肿瘤之一,虽然近年来世界范围内 GC 总体发病率呈下降趋势,但其发病率和病死率在各类恶性肿瘤中均居首位,严重威胁着人民的身体健康。目前,寻找特异性的治疗靶点,成为 GC 治疗研究中心的一个热点。而随着肿瘤与分子学关系研究的不断深入,其中趋化因子 10(CXCL10)与其受体 CXCR3 构成的生物学轴成为目前研究热点。近年来的研究发现,众多肿瘤细胞均可过度表达 CXCL10,其可能对肿瘤的生物学行为起到重要的调控作用,包括诱导细胞凋亡,促进细胞增殖炎症效应等^[1-2],但关于 CXCL10 与 GC 的研究鲜见报道。而众所周知,GC 癌变的发展演变过程是从慢性非萎缩性胃炎(chronic non-atrophy gastritis, CNAG)→慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)→肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)→不典型增生(dysplasi-

a, Dys)→GC,其中 CAG→IM→Dys 作为 GC 发生、发展的重要阶段,被统称为癌前病变(precancerous lesions, PL)^[3]。本研究采用 SP 免疫组织化学法检测 CXCL10 蛋白在 GC PL 组织中的表达变化,以期进一步揭示 GC 癌变的发生、发展机制,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2006 年 6 月至 2009 年 12 月 140 例样本,其中 CNAG 20 例、PL 60 例(CAG 伴 IM 20 例、CAG 伴轻-中度 Dys 20 例、CAG 伴重度 Dys 20 例);GC 60 例(高分化 GC 20 例、中低分化 40 例)。20 例 CNAG,男 9 例、女 11 例,平均(51.1±14.9)岁;60 例 PL,男 46 例、女 14 例,平均(55.9±22.1)岁;60 例 GC,男 42 例、女 18 例,平均(60.6±26.4)岁。所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。本研

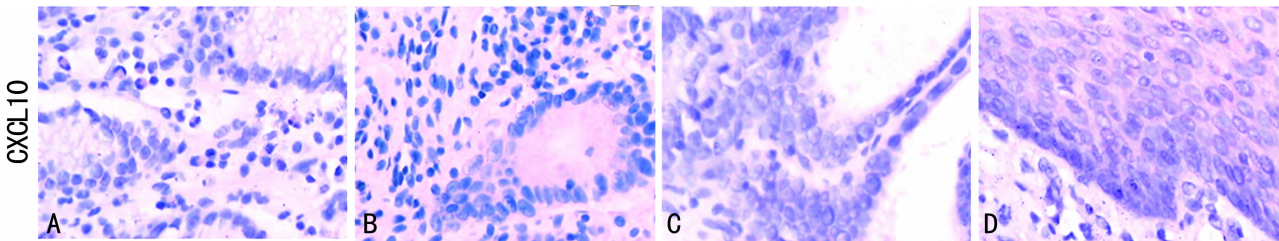
* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260323);云南省社会发展科技计划-社会事业发展专项资金资助项目(2009CA009)。作者简介:何甜(1986—),硕士,主要从事胃癌的早期诊断及治疗工作。△ 通讯作者, Tel: (0871)63648772; E-mail: gqkj003@sina.com。

究获得了本院伦理委员会的批准及患者的知情同意。全部研究样本均经病理组织学证实,GC 分类参照日本胃癌学会标准^[4]。判断标准:CNAG,发现水肿,线状充血,红斑,并经胃黏膜活检证实黏膜表层上皮细胞变性或坏死脱落形成糜烂,固膜有淋巴细胞及浆细胞浸润;CAG,内镜检查发现有明显的柱状上皮化生和皱襞肥厚,并经胃黏膜活检证实有杯状细胞存在和腺体细胞增生肥大;GC,手术切除样本中,取无坏死的癌组织,经常规病理切片证实为 GC。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 SP 法检测 CXCL10 蛋白的表达 CXCL10 抗体购自 Abcam 公司,柠檬酸盐抗原修复缓冲液(pH 6.0,MVS-0100)、超敏 SP 试剂盒(KIT-9710)、DAB 试剂盒(DAB-0031)、苏木素体细胞快速染色液(CTS-1099)、磷酸盐缓冲液(PBS-0061)和中性树胶(DAB-0033)均购自福州迈新生物技术公司。

标本采用 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,免疫组织化学采用 SP 法。切片厚度 4 μm,置于载玻片上;常规脱蜡,不同浓度的乙醇中脱水至水洗;30 mL/L 过氧化氢甲醇溶液室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶活性;山羊血清室温下孵育 20 min;柠檬酸盐抗原修复缓冲液(pH 6.0)微波修复;PBS 洗后滴加一抗(工作浓度为 1:500)50 μL,湿盒内 4℃ 孵育过夜,PBS 冲洗;滴加 SP 试剂盒中生物素标记的二抗,置 37℃ 30 min,PBS 冲洗;滴加链霉亲和素辣根过氧化物酶 50 μL,置 37℃ 30 min,PBS 冲洗;DAB 室温下显色;PBS 终止显色;清水冲洗 10 min 后苏木素复染、脱水、透明、封片、照相。用 PBS 代替一抗作阴性对照。



A: CAG; B: CAG 伴 IM; C: CAG 伴 Dys; D: GC。

图 1 CXCL10 蛋白在 CNAG、PL 和 GC 中的表达情况(苏木素复染×400)

2.2 CXCL10 蛋白在不同病理类型中的表达阳性率的比较 χ^2 检验发现,CXCL10 蛋白阳性表达率在 GC 组中异常升高,极显著高于 CNAG 及 PL 组,差异有统计学意义($P<0.01$);而 CXCL10 蛋白在 PL、CNAG 两种病理组织中阳性表达率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

2.3 CXCL10 蛋白表达与 PL、GC 患者各临床病理特征的关系 将 PL 分为 CAG 伴 IM 及 CAG 伴 Dys, CXCL10 蛋白在两种病理组织中阳性表达率分别为 15.0%、32.5%,差异无统计学意义($P>0.05$);同时将 Dys 分为轻中度、重度不典型增生,CXCL10 蛋白在两种病理组织中差异无统计学意义($P>0.05$)。分别将 GC 中 CXCL10 蛋白阳性和阴性病例的各临床病理参数,包括性别、年龄、肿瘤分化程度进行统计分析, CXCL10 蛋白在 GC 组中的表达与年龄无关,差异无统计学意义($P>0.05$);而在男性 GC 组中,CXCL10 蛋白阳性表达率显著高于女性,差异有统计学意义($P<0.05$);中低分化 GC 中 CXCL10 蛋白阳性表达率显著高于高分化 GC,差异有统计学意义($P<0.05$)。

1.2.2 图像采集和结果判读 切片用 Olympus BX 50 光学显微镜观察、摄像。用 HMIAS-2000 高清晰度全自动彩色图像分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)采集图像并对各 CXCL10 蛋白表达的阳性染色面积及染色强度进行分析。每张切片随机选择 10 个视野取平均值。结果判读采用双盲法,并由两位病理医师独立读片评定 CXCL10 蛋白染色结果,评估参考文献^[5]及预实验结果采用综合评分法,根据染色强度及着色面积进行判断。染色强度:0 分,无显色;1 分,浅黄色;2 分,棕黄色;3 分,棕褐色。在 400 倍光镜下随机观察 5 个不同的视野,按显色细胞比例评分,0 分: $<5\%$;1 分: $5\% \sim 25\%$;2 分: $26\% \sim 50\%$;3 分: $51\% \sim 75\%$;4 分: $>75\%$ 。根据以上两项指标得分的和作为判断表达结果,若积分小于或等于 1 为阴性,2~4 为弱阳性,5~7 为强阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计数资料采用率表示,采用 χ^2 检验或精确概率检验;计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验及方差分析。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 CXCL10 蛋白在 CNAG、PL 和 GC 中的表达结果 CXCL10 蛋白在这些胃黏膜组织中均有表达,表达部位集中在细胞膜及细胞质中。在 CNAG、PL 和 GC 中 CXCL10 蛋白的表达阳性率分别为:10% (2/20)、26.67% (16/60)、71.67% (43/60);且 CXCL10 蛋白在 CNAG、PL 和 GC 中表达多为淡黄色颗粒(图 1),随着 CNAG-PL-GC 演进过程中,CXCL10 蛋白阳性表达率逐渐升高,表达面积逐渐增大。

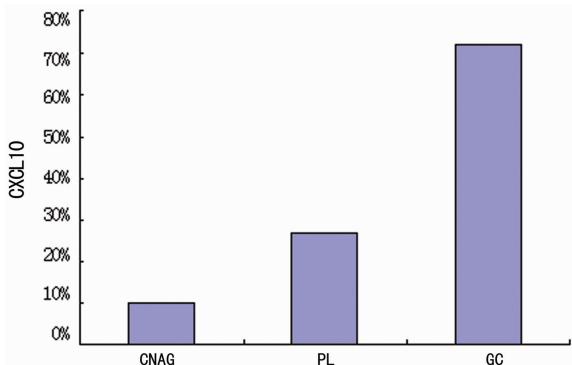


图 2 CXCL10 在 CNAG、PL、GC 病理组织中的阳性表达

3 讨 论

趋化因子是一组结构同源,功能相似,且能趋化细胞定向移动的小分子分泌型蛋白。在趋化因子的分子中都有 4 个保守的半胱氨酸(C),根据靠近分子氨基端(N 端)的前两个 C 间是否插入其他氨基酸,将他们分为 CXC、C-C、C 及 CX3C 四类

亚族^[6],而 CXCL10 又称为干扰素 Y 诱导蛋白 10,属于 CXC 类趋化因子,是 1985 年 Luster 等^[7]首先发现并报道的能使细胞发生趋化运动的小分子细胞因子,其受体为 CXCR3,含有 2 个亚群,即 CXCR3A 及 CXCR3B。CXCR3B 含有 416 个氨基酸,较 CXCR3A 在 NH₂-端的包外区长 52 个氨基酸残基,此种结构的差异导致了 CXCR3 两种亚群功能的显著不同^[8]。当 CXCL10 与其受体 CXCR3 结合,经 GTP 耦联蛋白在机体炎症、肿瘤、自身免疫等疾病中发挥重要的生理和病理效应。尤其在肿瘤形成的生物行为中发挥双向作用:(1)通过抗肿瘤免疫性,抗肿瘤血管生成、诱导细胞凋亡从而起到抗肿瘤的作用;(2)通过促炎效应、促进肿瘤细胞增殖在肿瘤生成、发展的生物行为过程中发挥重要作用^[9-10]。近年来,随着 CXCL10 蛋白研究的不断深入,CXCL10 蛋白抗肿瘤机制日渐明朗,但亦有不少研究发现,高表达的 CXCL10 蛋白与大多恶性肿瘤的发生、发展、侵袭及转移相关,国内外已有大量文献报道^[1-2,11],而在 GC 及其癌前病变中尚无 CXCL10 蛋白表达及临床病理参数相关性的报道。

本研究采用免疫组织化学 SP 法和图像分析定量,检测了作为 PL 的 CAG、IM、Dys 这三类组织类型中 CXCL10 蛋白的表达情况,并同时检测了其在 CNAG 中的表达情况。以期从肿瘤细胞自身的 CXCL10 蛋白表达水平方面解释由 PL 发展为 GC 的可能机制。本研究结果显示,CXCL10 蛋白在 CNAG、PL、GC 三类病理组织中均有表达(阳性表达率分别为 10.00%、26.67%、71.67%),而在 GC 病理组织中的阳性表达率尤其升高,显著高于 PL 及 CNAG 组;在 PL、CNAG 两种病理组织中 CXCL10 蛋白阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$)。同时研究显示,CXCL10 蛋白阳性表达率在 CNAG-PL-GC 过程中逐渐升高,尤其在 GC 阶段,提示蛋白 CXCL10 有可能在胃黏膜的发育中起一定的作用,结果进一步佐证了 PL 发展成 GC 是一个逐渐演变的过程。并且 CXCL10 蛋白与肿瘤发生、发展机制在乳腺癌的研究中得以证实:在癌组织中,CXCL10 与 CXCR3A 受体结合后,能在组织微环境中起作用,同时还能通过自主分泌的方式作用于肿瘤细胞本身,促进肿瘤细胞的生长,另一方面,当 CXCL10 蛋白与血管内皮细胞 CXCR3B 受体结合则抑制肿瘤细胞的生长。因此,当患者组织细胞 CXCR3A 受体占优势,起保护作用的 CXCR3B 受体处于劣势时,CXCL10 蛋白与前者的优势结合介导了肿瘤的发生、发展^[9]。

本研究还将 CXCL10 蛋白表达与临床病理参数统计分析,结果显示,在 GC 组中男性 CXCL10 蛋白阳性表达率显著高于女性,差异有统计学意义($P<0.05$),而与 GC 发病年龄无关。该结果再次证实我国男性发病率高于女性,而随着生活及饮食习惯等影响,GC 发病年龄越年轻化,各年龄阶段均可见 GC 的发生,该结果提示临床应该加强普查。同时中低分化 GC 组中 CXCL10 蛋白阳性表达率显著高于高分化组,该结果提示 CXCL10 的表达可能与 GC 的分化类型相关,通过检测不同分化类型 CXCL10 的表达在 GC 预后预测、个体化治疗中可能具有一定的意义。此外,本研究还将 PL 按 CAG 是否伴肠化及是否伴异型增生分为两个大组比较,发现 CXCL10 蛋白阳性表达水平在两组病理组织中差异无统计学意义($P>0.05$),CXCL10 蛋白的表达与 CAG 是否伴异型增生及肠化无关。同时将萎缩性胃炎伴不典型增生分为轻中度不典型增生

及重度不典型增生,发现 CXCL10 蛋白的表达在轻中度、重度不典型增生的阳性表达率无明显差异,说明 CXCL10 蛋白的表达与增生程度无关。

综上所述,CXCL10 蛋白与 GC 的发生、发展密切相关,且 CXCL10 蛋白表达与 GC 的分化程度具有显著相关性,CXCL10 蛋白极有可能成为 GC 诊断预后标志物之一,同时利用分子生物学技术,阻断 CXCL10/CXCR3 反应轴,可能成为 GC 治疗的一个新靶点。

参考文献:

- [1] 段波峰,郑维,唐梅徕,等. CXCR3/CXCL10 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国医师杂志,2011,13(10):1305-1304.
- [2] Furuya M, Suyama T, Usui H, et al. Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ov-arian carcinomas and endometriosis[J]. Hum Pathol, 2007, 38(11):1676-1687.
- [3] 杜中红,魏晓萍,惠起源. 胃癌前病变癌变机制及筛查研究进展[J]. 现代肿瘤医学杂志,2010,4(18):814-816.
- [4] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Gastric Cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3) [J]. Gastric Cancer, 2011, 14(3):113-123.
- [5] Kodama J, Hasengaowa, Seki N, et al. Expression of the CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in human endometrial cancer[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2007, 28(5):370-375 PMID:17966215.
- [6] 郑红. 趋化因子及其受体的功能[J]. 免疫学杂志,2004,20(1):1-9.
- [7] Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins[J]. Nature, 1985, 315(6021):672-676.
- [8] Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as unfunctional receptor for platelet factor 4 [J]. J Exp Med, 2003, 197(11):1537-1549.
- [9] Nagpal ML, Chen Y, Lin T. Effects of overexpression of CXCL10 (cytokine responsive gene-2) on MA-10 mouse leydig tumor cell steroidogenesis and proliferation[J]. J Endocrinol JT, 2004, 183(3):585-594.
- [10] Bodnar RJ, Yates CC, Wells A. IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tubeformation via inhibition of calpain [J]. Cric Res, 2006, 98(5):617-625.
- [11] Glodberg-Bittman L, Neumark E, sagi-Assif O, et al. The expression of the chemokine receptors CXCR3 and its ligand, CXCL10 in human breast adenocarcinoma cell lines [J]. Immunol Lett, 2004, 92(1/2):171-178.