

## 趋化因子受体 D6、DARC 在人乳腺癌组织中的表达研究\*

景周宏,曹勇,熊忠讯,江歌丽,刘晓渝,曾晓华<sup>△</sup>

(重庆市肿瘤研究所乳腺外科 400030)

**[摘要]** **目的** 研究乳腺癌组织中趋化因子受体 D6 与 Duffy 抗原趋化因子受体(DARC)表达水平,探讨与乳腺癌临床分期及相关病理指标之间的关系。**方法** 收集乳腺癌患者癌组织标本 120 例,均为病理确诊,应用免疫组织化学 SP 法检测在各标本中 D6 和 DARC 表达水平,统计分析 D6、DARC 蛋白表达与乳腺癌临床分期、淋巴结转移、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体-2(HER-2)表达的相关性。**结果** D6、DARC 在乳腺癌及癌旁正常乳腺中均有表达,癌旁正常乳腺组织中阳性表达率分别为 71.7%、68.3%,在乳腺癌的阳性表达率分别为 68.3%、65.0%。D6、DARC 的表达情况与乳腺癌临床分期及是否发生腋淋巴结转移密切相关( $P<0.01$ )。D6、DARC 的表达与患者 ER、PR 及 HER-2 的表达等病理指标无关( $P>0.05$ )。**结论** D6、DARC 在乳腺癌发展中呈现负性调节作用,其在乳腺癌中表达的高低与 HER-2、ER 及 PR 等临床病理指标无明显相关性。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;免疫组织化学;淋巴转移;受体,趋化因子;Duffy 抗原趋化因子受体;D6;表达

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)14-1915-03

## Study of D6 and DARC expression in breast cancer\*

Jing Zhouhong, Cao Yong, Xiong Zhongxun, Jiang Geli, Liu Xiaoyu, Zeng Xiaohua<sup>△</sup>

(Department of Breast Surgery, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe and study the expression of chemokine D6 and DARC in breast cancer, and to analyse their association with cTNM stage and pathological features of breast cancer. **Methods** Expressions of chemokine D6 and DARC in 120 breast cancer patients were determined by IHC(immunohistochemistry) technique(SP). The corresponding normal breast tissues in paraneoplastic were also detected. The level of D6 and DARC in 120 breast cancer were analysed whether it was associated with cTNM stage, axillary lymph node status, ER status, PR status and HER-2 status. **Results** D6 and DARC were expressed in both breast cancer and normal breast tissues in paraneoplastic. The positive expression rate of D6 and DARC in normal paraneoplastic breast tissues were 71.7% and 68.3%. The positive expression rate of D6 and DARC in breast cancer were 68.3% and 65.0%. The expression of DARC and D6 was closely related to the clinical stage of breast cancer and whether the axillary lymph node metastasis occurred ( $P<0.01$ ). The expression of D6 and DARC were not associated with ER, PR and HER-2 status ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The level of D6 and DARC expression might play negative regulatory role in breast cancer staging. The level of expression is not significantly correlated with pathological features of breast cancer.

**[Key words]** breast neoplasms; immunohistochemistry; lymphatic metastasis; receptors, chemokine; DARC; D6; expression

乳腺癌是严重危害妇女健康的恶性肿瘤之一,每年约有 50 万患者死于该病<sup>[1]</sup>。趋化因子是目前研究较热的一类与肿瘤发病及进展密切相关的小分子蛋白,其主要通过趋化并激活白细胞相关途径来完成干扰肿瘤发生、发展的目的<sup>[2-6]</sup>。近年来,非典型性趋化因子结合物(ACBs)如 Duffy 抗原趋化因子受体(DARC)、D6 等的发现表明体内存在趋化因子的转录后调节机制<sup>[7-8]</sup>。这些不下传信号的趋化因子结合蛋白即 ACBs 也被称为诱饵受体或清道夫,在复杂的趋化因子体内调控平衡中起到极为关键作用,参与多种关于趋化因子反应过程。近期文献及相关研究报道,在乳腺癌患者的预后性研究中,D6 及 DARC 与乳腺癌密切相关,其干预肿瘤发病及进展主要通过表达抑制肿瘤成瘤和转移来完成<sup>[9-13]</sup>。

本研究通过免疫组织化学 SP 法分别检测 D6、DARC 在乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中的表达情况,着重分析在乳腺癌组织中表达高低与患者临床分期、淋巴结转移、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、人表皮生长因子受体-2(HER-2)等临床病理指标的相关性,初步探讨 D6、DARC 表达与乳腺癌发展的相关性,旨在提供新的关于乳腺癌进展及预后的参考资料。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院 2012 年 8 月至 2013 年 8 月乳腺外科病理确诊为乳腺癌患者癌组织标本 120 例,所有病例均为女性,临床资料完整,中位年龄 54 岁(34~78 岁)。所有入选病例均为 I~III 期可手术切除的患者,术前均未接受过放、化疗。按 AJCC 和 UICC(第 7 版,2009 年)TNM 分期, I 期 31 例, II 期 65 例, III 期 24 例;淋巴结转移阳性 54 例,淋巴结转移阴性 66 例;ER 阳性 79 例,阴性 41 例;PR 阳性 70 例,阴性 50 例;Her-2 阳性 22 例,阴性 98 例。所有病例中,93 例浸润型导管癌,6 例乳腺单纯癌,7 例乳腺黏液腺癌,7 例乳腺髓样癌,7 例其他类型乳腺癌,选取手术切除标本中正常乳腺组织(癌旁大于 3 cm)作为对照。

## 1.2 方法

**1.2.1 主要试剂** 小鼠抗人 D6 单克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司;小鼠抗人 DARC 单克隆抗体购自美国 R&D 公司;ER、PR、HER-2 抗体及 SP 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2.2 免疫组织化学方法** 采用 SP 法对 120 例女性乳腺癌

石蜡标本分别进行 D6、DARC 蛋白表达检测,将乳腺癌组织切片置于 pH 8.0 乙二胺四乙酸(EDTA)液高压修复,试验按照 SP 检测试剂盒说明书进行,抗稀释度 1:50,二氨基联苯胺(DAB)溶液显色、复染、脱水、透明、封片。阳性对照选取已知的阳性病例,而阴性对照中选取磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。

**1.2.3 结果判定** 所有切片观察视野均含低倍和高倍镜,采取双盲阅片方式,由两位高年资病理医师完成。结果判定如下:D6、DARC 阳性细胞表达定位于细胞质,偶见细胞膜阳性表达,以肿瘤细胞的细胞质和(或)细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞。按切片中肿瘤细胞阳性细胞率和着色强度分别记分。(1)按阳性细胞百分率记分: $<5\%$ ,0分; $5\% \sim <25\%$ ,1分; $25\% \sim <50\%$ ,2分; $50\% \sim <75\%$ ,3分; $\geq 75\%$ ,4分。(2)按着色强度记分为:无着色,0分;淡黄色,1分;黄色,2分;棕黄色,3分。最后以上述两者乘积计分:0分为阴性;大于1分为阳性( $\geq 6$ 分表示高表达, $< 6$ 分表示低表达)<sup>[14]</sup>。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计数资料用率表示,采用 Pearson 检验比较乳腺癌与癌旁正常乳腺组织中各指标表达差异、乳腺癌中各指标表达情况、临床分期、淋巴结转移状况、ER、PR、HER-2 等临床病理参数的差异。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 D6、DARC 在乳腺癌及癌旁正常乳腺组织中的表达** 在 120 例乳腺癌癌旁正常乳腺导管上皮细胞中,D6、DARC 阳性分别为 86、82 例,阳性表达率为 71.7%、68.3%;120 例乳腺癌中,D6、DARC 阳性分别为 82 例、78 例,阳性表达率为 68.3%、65.0%。D6、DARC 在乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织均有表达,两者差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.300, P = 0.584$ ),见图 1。

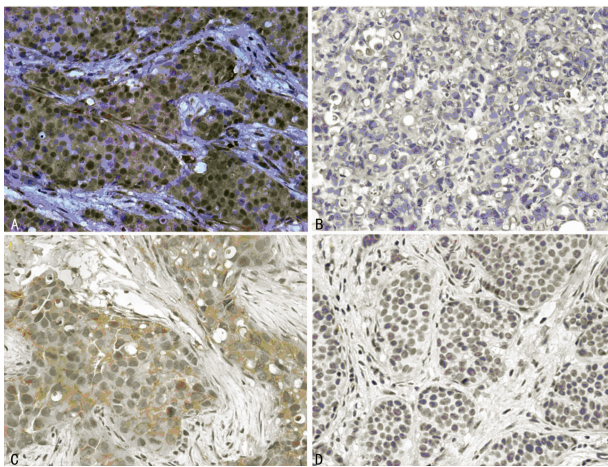


图 1 D6、DARC 阳性及阴性表达( $\times 200$ )  
A: D6 阳性表达; B: D6 阴性表达; C: DARC 阳性表达; D: DARC 阴性表达。

图 1 D6、DARC 阳性及阴性表达( $\times 200$ )

**2.2 D6、DARC 与乳腺癌临床分期及淋巴结转移的关系** 本研究中,I 期乳腺癌患者为 31 例,其中 D6 及 DARC 阳性表达率分别为 80.65%、74.19%; II 期乳腺癌患者为 65 例,其中 D6 及 DARC 阳性表达率分别为 53.85%、60.00%; III 期乳腺癌患者为 24 例,其中 D6 及 DARC 阳性表达率分别为 16.67%、20.83%。54 例发生腋窝淋巴结转移,其中 D6、DARC 阳性表达率分别为 25.96%、22.22%; 66 例无腋窝淋巴结转移,其中 D6、DARC 阳性表达率分别为 78.79%、83.33%,D6、DARC 的表达情况与乳腺癌临床分期及是否发生腋窝淋巴结转移密切相关( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 D6、DARC 与乳腺癌临床病理参数的关系( $n$ )

项目	D6				DARC			
	+	-	$\chi^2$	$P$	+	-	$\chi^2$	$P$
分期			22.262	$< 0.01$			16.618	$< 0.01$
I	25	6			23	8		
II	35	30			39	26		
III	4	20			5	19		
淋巴转移			33.533	$< 0.01$			44.979	$< 0.01$
是	14	40			12	42		
否	52	14			55	11		
ER			0.022	0.881			0.032	0.857
+	55	24			59	20		
-	28	13			30	11		
PR			0.048	0.826			0.560	0.454
+	42	28			48	22		
-	29	21			31	19		
HER-2			0.028	0.867			0.089	0.765
+	13	9			12	10		
-	56	42			50	48		

**2.3 D6、DARC 与乳腺癌病理参数的关系** ER 阳性及阴性患者 D6 阳性表达率分别为 69.62%、68.29%,DARC 阳性表达率分别为 74.68%、73.17%; PR 阳性及阴性患者 D6 阳性表达率分别为 60.00%、58.00%,DARC 阳性表达率分别为 68.57%、62.00%; HER-2 阳性及阴性患者 D6 阳性表达率分别为 59.09%、57.14%,DARC 阳性表达率分别为 54.55%、51.02%。由此可见乳腺癌组织中 D6、DARC 表达水平与 ER、PR 及 HER-2 表达状态差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

## 3 讨论

近年来,得益于手术、化疗、放疗、靶向治疗、生物免疫治疗等多种手段的综合运用,乳腺癌病死率已大大降低,肿瘤患者的无瘤生成率也得到极大改善。但乳腺癌发病及进展系多基因、多阶段共同作用的结果,其强侵袭能力、较早淋巴转移、易复发等特点一直以来都是治疗的难点,严重制约肿瘤的治疗效果,也导致 90% 乳腺癌患者死于转移<sup>[15]</sup>。

趋化因子是一类相对分子质量为  $(8 \sim 12) \times 10^3$  的小分子分泌型蛋白,由 70~100 个氨基酸组成,主要为吸引白细胞定向移行至感染部位,在炎症反应中发挥重要作用。根据半胱氨酸残基数量和位置可将趋化因子分为 CXC、CC、C、CX3C 4 个亚类<sup>[6]</sup>。多种趋化因子及其活性受体均可由乳腺癌细胞产生,并在乳腺癌发病及进展中起到广泛的作用;CXCL1、CXCL8、CCL18 等趋化因子具有促乳腺癌作用,而 CCL19、CCL21 等则可能有抗乳腺癌作用<sup>[4,6]</sup>。

D6 亦称 CCBP2 (chemokine binding protein 2)、CMKBR9 (chemokine binding receptor 9)、CCR9 (CC chemokine receptor 9) 或 CCR10,具有 7 次跨膜结构,其天冬酰胺替代天冬氨酸,即第 2 次跨膜改变对 D6 的诱饵功能可能起到重要作用<sup>[16-17]</sup>。皮肤淋巴管、小肠、胎盘、肺的内皮细胞均有 D6 的高表达,其中以淋巴管内皮细胞为最高,研究表明 D6 不能传递信号,其主要作用为中和、呈递及转运趋化因子。D6 与多种肿瘤发生、发展都有重要关系,在小鼠大肠炎与结肠癌的相关研究表明,D6 表达使小鼠患大肠炎相关性癌症易感性明显增加<sup>[17]</sup>。另有研究显示 MCF-7、MDA-MB-231 等多种人乳腺癌细胞系均可表达 D6,其中在裸鼠人乳腺癌移植瘤生长及肺转移受抑制的标本中,D6 均处于过表达状态<sup>[13]</sup>。

Duffy 血型物质(Duffy blood group,DBG),即 Duffy 抗原

(Duffy antigen) 为 DARC, 是一类可同时结合 CC 族和 CXC 族趋化因子的糖蛋白<sup>[18]</sup>。由于 DRY(Asp-Arg-Tyr) 碱基序列的缺失, 导致细胞胞内信号转导无法完成, 因此也被称为趋化因子诱饵受体。DARC 在肺毛细血管后静脉、神经、肌肉、骨髓、胰、肾脏的内皮细胞上都有表达, 但 DARC 只表达于静脉系统<sup>[19]</sup>。研究证实 DARC 在肺癌、黑色素瘤及前列腺癌发病中具有负性调节作用<sup>[20-23]</sup>。国内学者也证实 DARC 与乳腺癌的发生及转移有关<sup>[24]</sup>。DARC 一方面通过清除 CCL2、CXCL8 等成血管性趋化因子抗肿瘤, 同时也包含基因水平的肿瘤相关调控<sup>[23]</sup>。

乳腺癌转移所致相关脏器损害、衰竭是患者死亡的主要原因, 究其原因主要在于靶器官所表达趋化因子, 而乳腺癌组织表达趋化因子受体, 两者结合导致了肿瘤转移的发生, 由此可见, 肿瘤转移与靶器官表达趋化因子高低密切相关。本试验对 120 例乳腺癌组织中 D6、DARC 的表达情况进行研究发现, 乳腺癌细胞上 D6、DARC 的表达与乳腺癌的临床分期及淋巴结转移存在明显负性相关性, 而在关于病理相关标志物 ER、PR、HER-2 研究中, D6、DARC 表达与病理学标志物表达无明显相关性。

随着研究的不断深入, D6、DARC 等 ACB 所表现出的广泛结合力及强大的趋化因子清除力, 已不断运用到肿瘤相关研究中。乳腺癌的发生、发展亦被证实与更多的趋化因子有关, 趋化因子的多靶点高效调控即将成为可能, 给乳腺癌的治疗带来新的思路, 为乳腺癌等肿瘤的治疗提供具有革命性意义的新的治疗途径。

#### 参考文献

- [1] Li J, Zhang BN, Fan JH, et al. A nation-wide multicenter 10-year (1999-2008) retrospective clinical epidemiological study of female breast cancer in China[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(364): 1-11.
- [2] Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, et al. Activated local immunity by CC chemokine ligand 19-transduced embryonic endothelial progenitor cells suppresses metastasis of murine ovarian cancer[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 164-173.
- [3] 林刻智, 林峰, 郑双, 等. 趋化因子 CXCL14 在结直肠癌组织中的表达及其临床相关性研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(2): 355-358, 373.
- [4] Balkwill FR. The chemokine system and cancer[J]. *J Pathol*, 2012, 226(2): 148-157.
- [5] Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited[J]. *Immunity*, 2012, 36(5): 705-716.
- [6] Zlotnik A, Burkhardt AM, Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(9): 597-606.
- [7] Cancellieri C, Vacchini A, Locati M, et al. Atypical chemokine receptors: from silence to sound[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(1): 231-236.
- [8] Graham GJ, Locati M, Mantovani A, et al. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors[J]. *Immunol Lett*, 2012, 145(1/2): 30-38.
- [9] Liu XF, Li LF, Ou ZL, et al. Correlation between Duffy blood group phenotype and breast cancer incidence[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(374): 1-6.
- [10] Nibbs RJ, Graham GJ. Immune regulation by atypical chemokine receptors[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(11): 815-829.
- [11] Vetrano S, Borroni EM, Sarukhan A, et al. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated Colon Cancer through the chemokine decoy receptor D6[J]. *Gut*, 2010, 59(2): 197-206.
- [12] Chew AL, Tan WY, Khoo BY. Potential combinatorial effects of recombinant atypical chemokine receptors in breast cancer cell invasion; a research perspective[J]. *Biomed Rep*, 2013, 1(2): 185-192.
- [13] Wu FY, Ou ZL, Feng LY, et al. Chemokine decoy receptor d6 plays a negative role in human breast cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(8): 1276-1288.
- [14] 龚迪和, 丁克峰. 趋化因子 CCL28 在乳腺癌中的表达及意义[J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24(4): 304-309.
- [15] Marx V. Tracking metastasis and tricking cancer[J]. *Nature*, 2013, 494(7435): 133-136.
- [16] Graham GJ, Locati M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6[J]. *J Pathol*, 2013, 229(2): 168-175.
- [17] Lee KM, Nibbs RJ, Graham GJ. D6: the 'crowd controller' at the immune gateway[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(1): 7-12.
- [18] Meny GM. The Duffy blood group system: a review[J]. *Immunohematology*, 2010, 26(2): 51-56.
- [19] Huang W, Qin W, Lv L, et al. Duffy antigen/receptor for chemokines correlates with inflammatory reaction in rats with venous hypertension: implication for the pathogenesis of primary chronic venous disease[J]. *Vasa*, 2014, 43(1): 47-54.
- [20] Shen H, Schuster R, Stringer KF, et al. The duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth[J]. *FASEB J*, 2006, 20(1): 59-64.
- [21] Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression[J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 933-938.
- [22] Khanna P, Chung CY, Neves RI, et al. CD82/KAI expression prevents IL-8-mediated endothelial gap formation in late-stage melanomas[J]. *Oncogene*, 2014, 33(22): 2898-2908.
- [23] Horton LW, Yu Y, Zaja-Milatovic S, et al. Opposing roles of murine duffy antigen receptor for chemokine and murine CXC chemokine receptor-2 receptors in murine melanoma tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20): 9791-9799.
- [24] Yu KD, Wang X, Yang C, et al. Host genotype and tumor phenotype of chemokine decoy receptors integrally affect breast cancer relapse[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 26519-26527.