

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.009

CXCL12、CXCR4、MVD 在多发性骨髓瘤骨髓微龕中表达及意义*

周俊¹, 叶丽¹, 林凡莉¹, 汪姝玥¹, 李晓明², 黄纯兰^{2△}

(1. 西南医科大学临床医学院, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属医院血液内科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨趋化因子配体 12(CXCL12)、趋化因子受体 4(CXCR4)、微血管密度(MVD)在多发性骨髓瘤(MM)骨髓微龕中的表达、分布、意义及其相互关系。**方法** 收集 MM 患者 63 例作为试验组, 选择健康人 42 例作为对照组。采用免疫组织化学方法检测两组骨髓活检片中 CXCL12、CXCR4、MVD 表达及分布。**结果** 试验组骨髓活检组织中 CXCL12、CXCR4、MVD 表达明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 三者在骨髓中表达与性别、年龄、免疫球蛋白分型、轻链分类表达差异无统计学意义($P > 0.05$); CXCL12 表达与 CXCR4、MVD 表达均呈正相关($P < 0.05$)。**结论** MM 中 CXCL12、CXCR4、MVD 表达可能与疾病发生相关; CXCL12/CXCR4 生物轴促进 MM 骨髓微龕血管新生。

[关键词] 多发性骨髓瘤; CXCL12; CXCR4; 微血管密度**[中图分类号]** R559**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1733-04

Expression and significance of CXCL12, CXCR4, MVD in MM bone marrow micro niche*

ZHOU Jun¹, YE Li¹, LIN Fanli¹, WANG Shuyue¹, LI Xiaoming², HUANG Chunlan^{2△}

(1. School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Hematopathology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study expression, distribution, significance and relationship of CXCL12, CXCR4, microvessel density (MVD) in multiple myeloma (MM) bone marrow micro niche. **Methods** 63 cases of patients with MM were chosen as the experimental group, 42 cases of healthy persons were chosen as the control group. The expression and distribution of CXCL12, CXCR4, MVD were detected by immunohistochemical method. **Results** Compared with the control group, the expressions of CXCL12, CXCR4, MVD in the experimental group were higher, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), their expressions in bone marrow were not significantly different from gender, age, immunoglobulin type and light chain classification ($P > 0.05$); the expression of CXCR4, MVD were positively related with CXCL12 ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of CXCL12, CXCR4, MVD may be related to the occurrence of MM; CXCL12/CXCR4 biological axis could promote the angiogenesis of MM bone marrow micro niche.

[Key words] multiple myeloma; CXCL12; CXCR4; microvessel density

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)居血液系统恶性肿瘤第 2 位, 目前仍是临床无法治愈的疾病。MM 以骨髓微龕中瘤型浆细胞克隆、增殖, 血液、尿液中单克隆蛋白增多为主要特点, 终末器官损害主要表现为贫血、肾功能不全、骨痛、高钙血症等^[1-3]。趋化因子配体 12(CXCL12)及趋化因子受体 4(CXCR4)形成 CXCL12/CXCR4 生物轴在多种肿瘤中发现, 能够促进肿瘤细胞的生长, 抑制肿瘤细胞的凋亡, 促进肿瘤血管生成, 影响某些肿瘤的靶向转移, 增强肿瘤细胞的黏附和迁移能力, 影响肿瘤细胞的分泌行为等^[4-7], 其在 MM 中的作用机制有待进一步研

究, 本研究通过测定 MM 患者骨髓活检组织中 CXCL12、CXCR4、微血管密度(microvessel density, MVD)的表达、分布, 以研究其在 MM 中表达并对临床意义进行讨论, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1 月至 2016 年 7 月西南医科大学附属医院血液科收治的 MM 患者 63 例作为试验组, 其中男 34 例, 女 29 例, 平均年龄(59.73 ± 8.85)岁, MM 分期 I 期 7 例, II 期 14 例, III 期 42 例, 免疫球蛋白分型轻链型 11 例, IgG 型 33 例, IgA 型 19 例, 血清轻链分型 λ 型 26 例, κ 型 37 例。所有患者

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81450030); 四川省 2015 年度留学回国人员科技活动择优资助入选重点资助项目; 四川省教育厅重大培育资助项目(14CZ0017)。 作者简介: 周俊(1990-), 在读硕士, 主要从事多发性骨髓瘤发病机制、骨髓微环境改变研究。 △ 通信作者, E-mail: huangcll880@163.com。

均符合中国 MM 诊治指南(2015 年修订)中 MM 诊断标准^[8]。选择同期健康人 42 例作为对照组,其中男 20 例,女 22 例,平均年龄(60.20±13.37)岁。

1.2 方法

1.2.1 检测方式 用免疫组织化学 SP 法,检测试验组、对照组骨髓活检组织标本中 CXCL12、CXCR4 及 MVD 的表达。收集骨髓活检组织蜡块 4 μm 厚连续切片,依次行脱蜡水化、抗原修复、一抗、二抗孵育、二氨基联苯胺(DAB)显色、苏木精复染、分化-封片、镜检、拍照。用已知阳性切片做阳性对照,以磷酸缓冲盐溶液(PBS)代替一抗做阴性对照。并收集两组性别、年龄、临床分期、免疫球蛋白、轻链分型临床资料,将上述资料进行统计学相关分析。

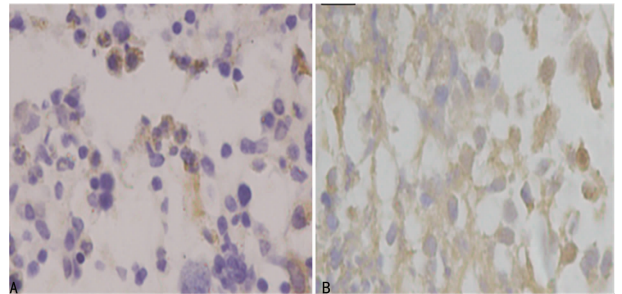
1.2.2 结果判定 骨髓组织细胞的细胞质和细胞膜内出现棕黄色着色颗粒为 CXCL12 和 CXCR4 阳性细胞,结果评价用 SP 法染色强度(阳性)和阳性细胞百分比确定。随机观察 10 个高倍视野(×400),每个视野计数 100 个细胞,根据其中阳性细胞所占百分比和染色强度分别进行评分,最后综合评定结果。(1)阳性细胞所占百分比评分:≤10%为 0 分,10%~25%为 1 分,>25%~50%为 2 分,>50%为 3 分。(2)染色强度评分:无染色为 0 分,淡黄色为 1 分,淡黄色至黄色为 2 分,黄色至棕黄色为 3 分。(3)结果判断:染色强度和阳性细胞分值之和为最终分值。总积分 0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~5 分为中强阳性(++),6 分及以上为强阳性(+++)。细胞质出现棕黄色着色颗粒为 MVD 阳性细胞,首先形态学观察:在低倍光学显微镜下(×100)判断骨髓病理切片的取材、染色是否成功,骨髓增生程度,微血管分布情况;高倍镜下(×400)观察内皮细胞、微血管形态,并进行微血管计数。骨髓 MVD 计数:对每张切片进行 MVD 计数。首先在低倍镜下(×100)进行逐个视野的观察,至少选出 3 个血管最丰富且不相连的热点区域,然后在高倍镜下(×400)计数微血管,共计 3 次,取其平均值表示 MVD。任何呈棕黄色的能够计数的血管,不以是否有管腔或管腔中是否有红细

胞作为判断标准,骨小梁内或与骨小梁相连的血管被排除在外。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个样本的比较采用 *t* 检验,多个样本的比较采用方差分析,计数资料用频数或百分率表示,比较采用 Wilcoxon 检验分析,相关性分析采用 Spearman 法分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

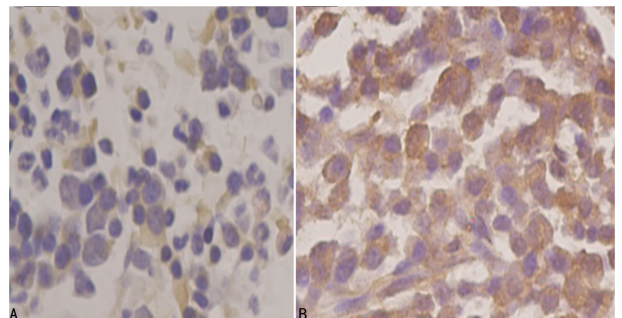
2 结果

2.1 CXCL12、CXCR4 和 MVD 染色情况 CXCL12、CXCR4 蛋白表达阳性染色位于骨髓细胞细胞质,染色颗粒呈浅黄色或棕黄色;MVD 蛋白表达阳性染色位于细胞膜,见图 1~3。



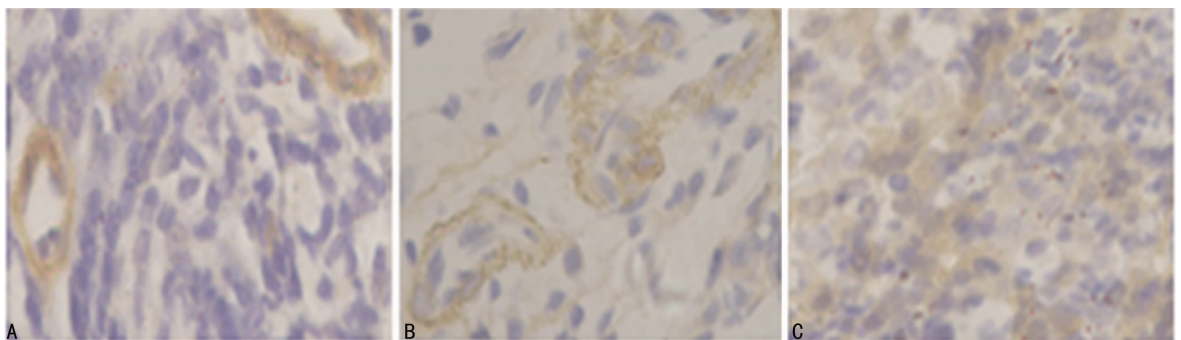
A: 对照组骨髓中细胞染色呈黄色,细胞散在表达,呈弱阳性;B: 试验组骨髓中细胞弥漫表达,呈棕黄色,呈强阳性

图 1 两组骨髓中 CXCL12 染色(×400)



A: 对照组骨髓中细胞染色呈黄色,细胞散在表达,呈弱阳性;B: 试验组骨髓中细胞弥漫表达,呈棕黄色,呈强阳性

图 2 两组骨髓中 CXCR4 染色(×400)



A: 对照组骨髓显示微血管形态规则,结构良好;B: 试验组骨髓显示微血管明显增多,微血管形态不规则,大小不一;C: 试验组骨髓可见单个内皮细胞,内皮细胞团簇,甚至成线状排列未见明显管腔

图 3 两组骨髓中 MVD 染色(×400)

表 1 MM 骨髓中 CXCL12 表达与 CXCR4、MVD 表达的相关性

项目	CXCL12				r	P
	-	+	++	+++		
CXCR4(n)					0.478	0.000
-	0	0	0	0		
+	3	4	2	0		
++	1	9	23	16		
+++	0	1	16	2		
MVD($\bar{x}\pm s$)	14.09±9.93	17.33±7.06	24.21±4.76	26.09±10.36	0.472	0.000

2.2 CXCL12、CXCR4 和 MVD 蛋白表达情况 试验组骨髓 CXCL12、CXCR4 和 MVD 表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。MM 患者骨髓 CXCL12、CXCR4 和 MVD 的表达与患者性别、年龄、免疫球蛋白、轻链分型表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 相关性分析结果 MM 的骨髓 CXCL12 表达与 CXCR4、MVD 表达均呈正相关,见表 1。

3 讨论

MM 是骨髓中浆细胞呈恶性克隆的增殖性疾病,可累及骨髓、血液、肾脏等多个靶器官,骨髓微环境也受浆细胞影响发生相应变化。诸多学者就分子、因子等多方面对 MM 微环境改变、血管生成机制等进行研究^[9-14]。

CXCL12 又称基质细胞衍生因子-1(SDF-1),属于 CXC 族趋化因子成员,对骨髓基质细胞、T 淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞等均有趋化作用,而这些细胞也都表达 CXCR4。CXCR4 是 CXCL12 的特异受体,是由 352 个氨基酸组成的 G 蛋白偶联受体。CXCL12/CXCR4 生物轴在调节肿瘤的发生、发展、侵袭、转移、血管生成中具有重要作用^[15-19]。MM 细胞可表达 CXCR4, CXCL12 与 CXCR4 相互作用,趋化 MM 细胞的迁移和定居在骨髓微环境^[20-21]。本研究试验组 CXCL12、CXCR4 的表达较对照组明显增加,与以上观点相符合, CXCL12、CXCR4 与 MM 的发生相关,因此推测 CXCL12/CXCR4 生物轴在 MM 发病机制中具有重要作用。此外,该生物轴与骨髓微环境中血管新生具有密切关系。CXCL12/CXCR4 生物轴可通过促进血管内皮生长因子(VEGF)分泌促进血管生成^[22-25]。既往多项研究表明血管新生与恶性血液病发生、演变、预后密切相关^[26-27]。MM 骨髓活检中 MVD 明显高于对照组,表明血管新生与 MM 的发生有明显关系。肿瘤的发生、发展有赖于新生血管的形成,而 CXCL12/CXCR4 与血管新生过程密切相关^[28]。在肿瘤缺氧环境下,由缺氧因子诱导,VEGF 大量表达, CXCL12 表达也明显升高。ECONOMIDOU 等^[29]研究发现 CXCL12/CXCR4 在恶性胸腔积液中高度表达,并发现 CXCL12 与 VEGF

呈正相关,因此认为 CXCL12 上调 VEGF 的表达,促进血管新生。本研究表明,MM 组骨髓 CXCL12/CXCR4 的表达与 MVD 的表达呈正相关,故推测 MM 骨髓微环境中 CXCL12/CXCR4 生物轴可促进血管新生,因此可认为抑制 CXCL12/CXCR4 在微血管形成的作用会成为抗肿瘤治疗的新途径。

综上所述,骨髓微环境中血管新生机制可能成为治疗 MM 的新靶点,通过抑制 CXCL12/CXCR4 生物轴抗血管新生可为 MM 的发病机制及寻找有效的诊断和治疗提供新的途径。

参考文献

- [1] MATEOS M V, OCIO E M, PAIVA B, et al. Treatment for patients with newly diagnosed multiple myeloma in 2015[J]. Blood Rev, 2015, 29(6):387-403.
- [2] KYLE R A, RAJKUMAR S V. Multiple myeloma[J]. N Engl J Med, 2004, 351(18):1860-1873.
- [3] MOREAU P, SAN M J, LUDWIG H, et al. Multiple myeloma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2013, 24(suppl 5):vi133-137.
- [4] RUBIE C, KOLLMAR O, FRICK V O, et al. Differential CXC receptor expression in colorectal carcinomas[J]. Scand J Immunol, 2008, 68(6):635-644.
- [5] RUBIE C, FRICK V O, WAGNER M, et al. Chemokine expression in hepatocellular carcinoma versus colorectal liver metastases[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(41):6627-6633.
- [6] MIYANISHI N, SUZUKI Y, SIMIZU S, et al. Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 403(1):154-159.
- [7] DO C A, PATRICO I, CURZ M T, et al. CXCL12/CXCR4 promotes motility and proliferation of glioma cells[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(1):56-65.
- [8] 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会血液学分会, 中国协会医师 MM 专业委员会. 中国 MM 诊治指南(2015 修订)[J]. 中华内科杂志, 2015, 54(12):1066-1070.
- [9] PAPANAS A, ASIMAKOPOULOS F. Mechanisms of resistance in multiple myeloma[M]. Handbook of Experi-

- mental Pharmacology, Springer, Berlin, Heidelberg, 2017: 1-38.
- [10] CIAVARELLA S, LAURENZANA A, DE S S, et al. u- PAR expression in cancer associated fibroblast; new acquisitions in multiple myeloma progression [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 215.
- [11] ZHAO P, CHEN Y, YUE Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells regulate stemness of multiple myeloma cell lines via BTK signaling pathway [J]. Leuk Res, 2017 (57): 20-26.
- [12] RIBATTI D, VACCA A. Role of endothelial cells and fibroblasts in multiple myeloma angiogenic switch [J]. Cancer Treat Res, 2016(169): 51-61.
- [13] KAWANO Y, MOSCHETTA M, MANIER S, et al. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma [J]. Immunol Rev, 2015, 263(1): 160-172.
- [14] RIBATTI D, NICO B, VACCA A. Multiple myeloma as a model for the role of bone marrow niches in the control of angiogenesis [J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2015(314): 259-282.
- [15] OOI L L, DUNSTAN C R. CXCL12/CXCR4 axis in tissue targeting and bone destruction in cancer and multiple myeloma [J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(7): 1147-1149.
- [16] DE N F, SCHIANO C, INFANTE T, et al. CXCR4 inhibitors; tumor vasculature and therapeutic challenges [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2012, 7(3): 251-264.
- [17] DIAMOND P, LABRINIDIS A, MARTIN S K, et al. Targeted disruption of the CXCL12/CXCR4 axis inhibits osteolysis in a murine model of myeloma-associated bone loss [J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(7): 1150-1161.
- [18] BROMAGE D I, TAFEMER S, PILLAI M, et al. A novel recombinant antibody specific to full-length stromal derived factor-1 for potential application in biomarker studies [J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0174447.
- [19] LIANG Z, BROOKS J, WILLARD M, et al. CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through AKT signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(3): 716-722.
- [20] SANZ-RODRIGUEZ F, HIDALGO A, TEIXIDO J. Chemokine stromal cell-derived factor-1 alphamodulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1 fibronectin and VCAM-1 [J]. Blood, 2001, 97: 346-351.
- [21] HIDESHIMA T, CHAUHAN D, HAYASHI T, et al. The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1 alpha in multiple myeloma [J]. MolCancer Ther, 2002, 1(7): 539-544.
- [22] KIJOWSKI J, BAJ-KRZYWORZEKA M, MAJKA M, et al. The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lympho-hematopoietic cells [J]. Stem Cells 2001, 19(5): 453-466.
- [23] DARASH-YAHANA M, PIKARSKY E, ABRAMOV-ITH R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis [J]. FASEB J, 2004, 18(11): 1240-1242.
- [24] DEKKER L V, SEGAL A W. Perspectives; signal transduction. Signals to move cells [J]. Science, 2000, 287(5455): 982-985.
- [25] MARINACCIO C, NICO B, MAIORANO E, et al. Insights in Hodgkin lymphoma angiogenesis [J]. Leuk Res, 2014, 38(8): 857-861.
- [26] GONCALVES K A, 胡国富. 血管生成素在造血系统恶性肿瘤中的作用及机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(12): 1267-1275.
- [27] HAN Y, WANG X, WANG B. The progress of angiogenic factors in the development of leukemias [J]. Intractable Rare Dis Res, 2016, 5(1): 6-16.
- [28] TANG J M, WANG J N, ZHANG L, et al. VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart [J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(3): 402-411.
- [29] ECONOMIDOU F, ANTONIOU K M, SOUFLA G, et al. Role of VEGF-stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 axis in pleural effusion of lung cancer [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2010, 30(3): 154-160.

(收稿日期: 2017-10-15 修回日期: 2017-12-23)

(上接第 1732 页)

- Nutrition screening tools; does one size fit all? A systematic review of screening tools for the hospital setting [J]. Clin Nutr, 2014, 33(1): 39-58.
- [5] 中华医学会. 临床诊疗指南-肠外肠内营养学分册(2008版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [6] KONDRUP J, ALLISON S P, ELIA M, et al. ESPEN guidelines for nutrition screening 2002 [J]. Clin Nutr, 2003, 22(4): 415-421.
- [7] MUEUER C, COMPHER C, EHEN D M, et al. A. S. P. E. N. clinical guidelines: nutrition screening, assessment, and intervention in adults [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2011, 35(1): 16-24.
- [8] 中华医学会肠外肠内营养学分会. 成人围手术期营养支持指南 [J]. 中华外科杂志, 2016, 9(54): 641-657.
- [9] 中华医学会肠外肠内营养学分会. 肿瘤患者营养支持指南 [J]. 中华外科杂志, 2017, 11(55): 801-829.
- [10] SCOTT G, DU K, BRAUNSCHWEIG C A, et al. Economic burden of disease-associated malnutrition at the state level [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0161833.

(收稿日期: 2017-10-18 修回日期: 2017-12-26)