

趋化因子受体 CCR7 在人胃癌组织中的表达 及其与胃癌转移的关系

涂力蒋 蔡张 驰王 卉

摘要 目的 观察趋化因子受体 CCR7 在胃癌中的表达情况,探讨 CCR7 表达水平与临床病理特征的关系。方法 采用 Real-time PCR、Western blot 及免疫组化技术检测 CCR7 在 60 例胃癌组织及相应的癌旁组织中的表达分布情况,并分析其表达差异与胃癌临床病理特征的相关性。结果 在 60 例胃癌组织中,CCR7 在胃癌组织中 mRNA 表达水平均显著高于癌旁组织 ($P < 0.05$)。免疫组化检测结果显示 CCR7 在胃癌组织中的蛋白表达定位于细胞质,且 CCR7 蛋白在癌旁组织与胃癌组织中的阳性表达率分别为 25% (15/60) 和 73% (44/60)。经 χ^2 检验,两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 24.000, P < 0.001$)。Western blot 结果显示 CCR7 蛋白在胃癌组织中的表达水平显著高于癌旁组织。胃癌组织中 CCR7 表达水平在胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期差异有统计学意义 ($P < 0.05$),在患者性别、年龄及肿瘤大小差异无统计学意义。结论 CCR7 在胃癌组织中高表达,其表达水平与胃癌侵袭转移密切相关,有望成为胃癌治疗新靶点。

关键词 趋化因子受体; CCR7; 胃癌; 侵袭转移; 临床意义
中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1472-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.012

胃癌是目前严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一。大多数胃癌患者就诊时癌细胞已发生转移,从而延误最佳治疗时机。癌细胞主要通过直接浸润、血运转移、淋巴转移及腹腔种植转移等多种方式向邻近器官组织转移,严重影响临床疗效,且目前术后复发和转移仍是患者预后不良甚至死亡的关键因素^[1-2]。因此,如能阻断胃癌发生转移的途径,则可极大提高胃癌患者的生存率。近年来,趋化因子及其受体在肿瘤发生发展、侵袭转移中的作用受到广

泛关注^[3-4]。研究^[5-6]表明:趋化因子受体 7 (chemokine receptor 7, CCR7) 是 7 次跨膜受体 G 蛋白偶联受体,在肿瘤细胞的增殖、迁移、播散及肿瘤血管形成中发挥关键作用。该研究旨在观察 CCR7 在 60 例胃癌组织中的表达情况,探讨其表达水平与胃癌淋巴转移、远处转移等临床病理特征的相关性,以期寻找胃癌新的治疗靶点提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2015 年 1 月~12 月华中科技大学附属武汉市中心医院 60 例人胃癌组织及配对癌旁组织标本,所有标本经病理证实,且术前未行化疗或放疗。其中男 37 例,女 23 例;年龄 28~78 (58.96 ± 11.87) 岁。根据《美国肿瘤联合委员会 (AJCC) 癌症分期手册(第七版)》、相关胃癌大体分型、组织学分型及临床病理分期标准进行严格的病理诊断并判断肿瘤转移。癌旁组织标本取自至少距肿瘤边缘 5 cm 处,新鲜标本离体后立即置入液氮中保存。所有标本的获取征得患者本人及家属同意,并通过本院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂 兔抗人 CCR7 单克隆抗体、鼠抗人 β -actin 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗均购自英国 Abcam 公司; TRIzol 试剂盒、逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 总蛋白抽提试剂盒、RNA 提取试剂盒购自北京 Tiangen 公司; 免疫组化试剂盒和二氨基联苯胺 (DAB) 显色液购自武汉博士德生物公司; CCR7 引物序列为: F: 5'-AGGCTATTGTCCCTAAACC-3', R: 5'-GGAGGA-CAGTGAAGAAAACG-3'; β -actin 引物序列为: F: 5'-TGAGACCTTCAACACCCAG-3', R: 5'-GCCATCTCT-TGCTCGAAGTC-3' 均由上海英骏生物工程技术服务有限公司设计并合成。

1.3 免疫组织化学染色及结果判定 免疫组织化学染色按试剂盒实验步骤操作,常规石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,微波抗原修复,兔抗人 CCR7 单克隆抗体 (1:200 稀释) 4℃ 过夜孵育, DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,中性树胶封片

2017-04-06 接收

基金项目: 湖北省卫计委资助项目 (编号: WJ2015MB144); 武汉市卫计委临床医学科研项目 (编号: WX15A12)

作者单位: 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院检验科, 武汉 430014

作者简介: 涂力男 技师, 硕士研究生;

王卉女 副主任技师, 硕士研究生, 责任作者, E-mail: tuli100@163.com

固定。用 PBS 替代一抗作阴性对照,相同条件下每个样本重复 3 次。结果判定标准: CCR7 表达免疫组化结果根据阳性细胞率进行评定和分析。未见阳性细胞或阳性细胞率 $< 5\%$ 判定为阴性(-),阳性细胞率 $5\% \sim 25\%$ 判定为弱阳性(+), $25\% \sim 50\%$ 判定为中度阳性(++), $> 50\%$ 判定为强阳性(+++)。

1.4 Real-time PCR 法检测 CCR7 mRNA 表达

采用 TRIzol 试剂盒提取 60 例胃癌组织及配对癌旁组织的总 mRNA,以紫外分光光度仪检测其吸光度(A)值(A_{260nm}/A_{280nm} 值 1.8 ~ 2.0 为理想值),计算其浓度以便指导逆转录模板的需要量。接着用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA,保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。所有操作步骤按照说明书进行。Real-time PCR 总反应体系为 $20\text{ }\mu\text{l}$: $2\times\text{SYBR Green mix}$ 缓冲液 $10\text{ }\mu\text{l}$, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 $0.6\text{ }\mu\text{l}$, cDNA $2\text{ }\mu\text{l}$, DEPC 水 $6.8\text{ }\mu\text{l}$ 。反应参数为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ; 共 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min 。每个样本均做 3 个复孔,并重复 3 次。各组中 CCR7 的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.5 Western blot 法检测 CCR7 蛋白表达 分别称取 0.1 g 胃癌组织和癌旁组织,加 $800\text{ }\mu\text{l}$ 全蛋白提取液(放射免疫沉淀裂解液 RIPA),含 10% 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟提取蛋白。采用 Bradford 法进行蛋白定量。各组 $150\text{ }\mu\text{g}$ 上样于 5.0% 浓缩胶, 15% 分离胶,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后转移蛋白于 PVDF 膜,加 5% 脱脂奶粉稀释的一抗 CCR7 及 $\beta\text{-actin}$ ($1:500$ 稀释)封闭 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,加 HRP 标记二抗 ($1:5000$ 稀释), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件温育 2 h ,化学发光法显影检测。Western blot 条带的灰度值经灰度扫描仪分析后获得。CCR7 相对表达水平通过与内参比较确定。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异比较采用独立样本 t 检验,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 免疫组织化学染色结果显示:在 60 例胃癌组织及癌旁组织中 CCR7 主要表达于细胞质,呈棕黄色,见图 1。在癌旁组织中,细胞质着色多为淡黄色,CCR7 为阴性,弱阳性或中度阳性,然而,在胃癌组织中,细胞质染色较深,以棕黄色和棕黑色为主,CCR7 弱阳性、中度阳性或

强阳性。中度阳性及强阳性均判定为阳性表达。组织学评分后的统计结果显示,CCR7 蛋白在癌旁组织与胃癌组织中的阳性表达率分别为 25% ($15/60$) 和 73% ($44/60$)。经 χ^2 检验,两者差异有统计学意义($\chi^2 = 24.000$, $P < 0.001$)。

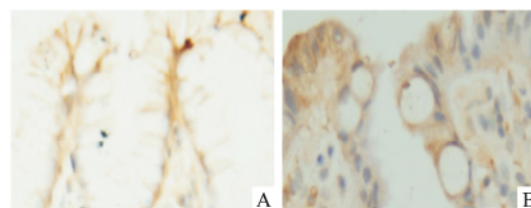


图 1 胃癌组织及癌旁组织中 CCR7 蛋白的表达 免疫组织化学染色 $\times 200$
A: 癌旁组织; B: 胃癌组织

2.2 CCR7 在胃癌中的表达 在 60 例胃癌组织中,CCR7 mRNA 在胃癌组织中的表达显著高于癌旁组织(1.53 ± 0.23 vs 0.42 ± 0.08 , $t = 35.746$, $P < 0.001$)。CCR7 蛋白在胃癌组织中的表达同样高于癌旁组织($P < 0.05$),见图 2。

2.3 CCR7 蛋白表达水平与胃癌临床病理特征之间的关系 CCR7 蛋白在胃癌组织中的表达量以胃癌组织 CCR7 条带的灰度值与对应的 $\beta\text{-actin}$ 的灰度值之比来表示。通过统计分析得: CCR7 蛋白表达量在胃癌浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期差异有统计学意义($P < 0.05$),然而在性别、年龄、肿瘤大小差异无统计学意义。见表 1。

3 讨论

胃癌是常见恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率分别居全球恶性肿瘤的第 4 位和第 2 位,5 年相对生存率不足 20% 。侵袭转移是导致胃癌病死率居高不下的主要原因,但机制不明^[7]。因此探讨胃癌发生发展、侵袭转移的病理生理机制对于胃癌的防治具有重要的现实意义。越来越多的研究^[5-6]显示 CCR7 与肿瘤的侵袭转移密切相关。然而,对于 CCR7 在胃癌生长、侵袭和转移中的作用研究较少。

在肿瘤组织及其相应邻近正常组织的差异性表达是分析基因与肿瘤关系的基础,异常表达的基因可能在肿瘤的形成扮演重要角色,可认为是潜在的新一类控制细胞增殖和凋亡的癌基因和抑癌基因^[8]。本研究选取 60 例胃癌患者的肿瘤组织及相应配对的癌旁组织,采用 Real-time PCR 法检测 CCR7 mRNA 的表达,检测结果表明 CCR7 基因在胃

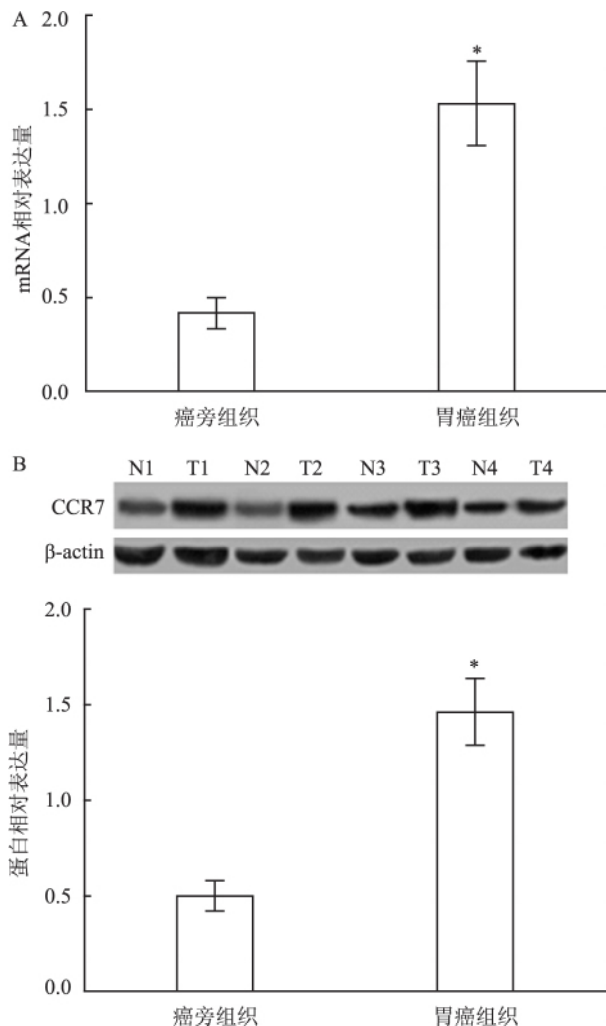


图2 胃癌组织及癌旁组织中 CCR7 的 mRNA 和蛋白表达

A: CCR7 mRNA; B: CCR7 蛋白; N: 癌旁组织; T: 胃癌组织; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

癌组织中的表达显著高于相应癌旁组织, Western blot 进一步证实 CCR7 蛋白在胃癌组织中的表达同样显著高于癌旁组织。免疫组化检测结果显示 CCR7 在胃癌组织中的蛋白表达定位于细胞质, 在癌旁组织中, 细胞质着色多为淡黄色, CCR7 为阴性、弱阳性或中度阳性, 然而, 在胃癌组织中, 细胞质染色较深, 以棕黄色和棕黑色为主, CCR7 弱阳性、中度阳性或强阳性。经统计分析得 CCR7 在胃癌组织中的阳性表达率显著高于癌旁组织。本研究结果有力证实: CCR7 在胃癌发生发展过程中具有癌基因特性, 促进胃癌的发生发展。与国内外的研究^[9-10]结果相一致。

肿瘤的侵袭和转移是一个复杂、连续和多阶段的过程, 且具有特异性、非随机性和器官选择性。首先肿瘤细胞离开原发灶并侵入周围组织, 接着侵袭

表1 CCR7 蛋白表达量与胃癌临床病理特征之间的关系($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	表达量	t 值	P 值
性别				
男	33	1.48 ± 0.19	0.885	0.380
女	27	1.44 ± 0.16		
年龄(岁)				
<60	25	1.48 ± 0.20	0.563	0.575
≥60	35	1.45 ± 0.16		
肿瘤大小(cm)				
<5	36	1.45 ± 0.16	-0.916	0.364
≥5	24	1.49 ± 0.15		
浸润深度				
未及浆膜	18	1.25 ± 0.08	-9.429	<0.001
侵及浆膜	42	1.55 ± 0.12		
淋巴结转移				
阴性	20	1.27 ± 0.08	-9.932	<0.001
阳性	40	1.56 ± 0.12		
远处转移				
阴性	48	1.40 ± 0.14	-7.189	<0.001
阳性	12	1.70 ± 0.07		
TNM 分期				
I ~ II 期	22	1.28 ± 0.08	-10.402	<0.001
III ~ IV 期	38	1.57 ± 0.12		

血管和淋巴管进入循环系统, 然后逃避免疫杀伤在循环系统内存活, 并经循环系统到达远处器官, 通过侵袭血管和淋巴管脱离循环系统进入局部组织形成微转移灶, 最终进一步增殖形成转移瘤^[11]。本研究通过对 CCR7 蛋白表达与胃癌临床病理特征之间关系的分析, 得出 CCR7 在胃癌组织中过度表达与胃癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移、远处转移及 TNM 分期显著相关。本研究结果提示 CCR7 促进胃癌侵袭转移。与 Mashino et al^[9] 和 Yan et al^[12] 的报道基本一致。研究^[13]显示趋化因子受体拮抗剂可抑制肿瘤的生长和侵袭转移。因此本研究推测抑制 CCR7 的表达或其活性将成为治疗胃癌发生和转移的新靶点。

综上所述, 本研究结果证实: CCR7 在胃癌中存在过度表达, CCR7 与其配体结合参与胃癌侵袭转移过程, 阻断 CCR7 的表达有可能通过抑制胃癌侵袭转移而成为治疗胃癌的一个新靶点。随着对 CCR7 研究的不断深入, CCR7 在胃癌侵袭转移的评估、判断、治疗及预后方面将有着更为广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Hashimoto T, Arai K, Yamashita Y, et al. Characteristics of intramural metastasis in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2013, 16(4): 537-42.
- [2] Li W, Ye F, Wang D, et al. Protein predictive signatures for

- lymph node metastasis of gastric cancer[J]. *Int J Cancer* ,2013 , 132(8) : 1851 – 9.
- [3] Chow M T , Luster A D. Chemokines in cancer[J]. *Cancer Immunol Res* ,2014 2(12) : 1125 – 31.
- [4] Roy I , Evans D B , Dwinell M B. Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician[J]. *Surgery* ,2014 , 155(6) : 961 – 73.
- [5] Ishida K , Iwahashi M , Nakamori M , et al. High CCR7 mRNA expression of cancer cells is associated with lymph node involvement in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol* ,2009 , 34(4) : 915 – 22.
- [6] Arigami T , Natsugoe S , Uenosono Y , et al. CCR7 and CXCR4 expression predicts lymph node status including micrometastasis in gastric cancer[J]. *Int J Oncol* ,2009 , 35(1) : 19 – 24.
- [7] Jemal A , Bray F , Center M M , et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin* ,2011 , 61(2) : 69 – 90.
- [8] Si M L , Zhu S , Wu H , et al. MiR-21-mediated tumor growth [J]. *Oncogene* ,2007 , 26(19) : 2799 – 803.
- [9] Mashino K , Sadanaga N , Yamaguchi H , et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma[J]. *Cancer Res* ,2002 , 62(10) : 2937 – 41.
- [10] 王 欢,袁武锋,蒋 雷,等. 趋化因子受体 CCR7 在胃癌转移中的作用研究[J]. *中国现代医生* 2015 , 53(15) : 14 – 6 , 20.
- [11] Fidler I J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited[J]. *Nat Rev Cancer* ,2003 , 3(6) : 453 – 8.
- [12] Yan C , Zhu Z G , Yu Y Y , et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis [J]. *World J Gastroenterol* ,2004 , 10(6) : 783 – 90.
- [13] Luo Y , Cai J , Xue H , et al. Functional SDF1 α /CXCR4 signaling in the developing spinal cord[J]. *J Neurochem* ,2005 , 93 (2) : 452 – 62.

Expression of chemokine receptor CCR7 in human gastric carcinoma tissues and its association with metastasis

Tu Li , Jiang Yi , Zhang Chi , et al

(*Dept of Clinical Laboratory ,The General Hospital of Wuhan , Wuhan 430014*)

Abstract Objective To investigate the expression of chemokine receptor CCR7 in gastric cancer and explore the correlation between expression and its clinicopathologic parameters of gastric cancer. **Methods** Real-time PCR , Western blot and immunohistochemistry were employed to detect CCR7 expression in 60 cases of gastric cancer tissues and its adjacent normal tissues. Furthermore , the correlation between the CCR7 expression levels and clinicopathological characteristics of gastric cancer was analyzed. **Results** CCR7 mRNA levels was significantly increased in tumor tissues than in adjacent normal tissues in the 60 cases of gastric cancer($P < 0.05$) . Immunohistochemistry showed that CCR7 protein was located in cytoplasmic. In addition , the positive expression rate of CCR7 in tumor-adjacent tissues and gastric cancer tissues was 25% (15/60) vs 73% (44/60) , the difference was statistically significant($P < 0.05$) . While Western blot results showed that CCR7 protein expression levels was significantly higher in gastric cancer tissues than in the adjacent normal tissues. And the CCR7 protein expression was tightly correlated with depth of infiltration , lymph nodes metastasis , distant metastasis and TNM stage($P < 0.05$) , but not with gender , age and tumor size. **Conclusion** CCR7 is highly expressed in gastric cancer , and its expression level is closely related to invasion and metastasis of gastric cancer , which is expected to be a new target for gastric cancer treatment.

Key words chemokine receptor; CCR7; gastric cancer; invasion and metastasis; clinical significance