

· 论 著 ·

# 趋化因子受体 CCR10 在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

郭金云, 王玉伟

葫芦岛市中心医院呼吸内二科, 辽宁 葫芦岛 125001

**摘要:** **目的** 探讨趋化因子受体家族中的 C-C 基元受体 10 (CCR10) 在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达水平及与临床病理指标之间的关系。**方法** 运用免疫组化染色法和逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 NSCLC 组织及相应癌旁正常肺组织中 CCR10 的蛋白表达及 CCR10 的 mRNA 表达, 分析 CCR10 蛋白表达及 mRNA 表达与患者性别、年龄、病理组织类型、TNM 分期、淋巴结转移等临床病理指标之间的关系。**结果** 免疫组化结果显示, CCR10 蛋白阳性反应表现为肿瘤细胞的胞质或胞膜呈棕黄色或棕褐色。CCR10 蛋白阳性表达率在 NSCLC 组织中明显高于癌旁正常肺组织 (66.67% vs 8.33%,  $P=0.000$ ); 在腺癌中高于鳞癌 (77.14% vs 52.00%,  $P=0.042$ ); 在有淋巴结转移者中高于无淋巴结转移者 (83.78% vs 43.48%,  $P=0.001$ ); 在临床 III + IV 期中高于临床 I + II 期 (79.41% vs 50.00%,  $P=0.017$ )。NSCLC 组织中 CCR10 蛋白的阳性表达与患者性别、年龄、组织分化程度无关 ( $P$  均  $>0.05$ )。CCR10 mRNA 相对表达量在 NSCLC 组织中高于癌旁正常肺组织 ( $1.1289 \pm 0.1363$  vs  $0.2159 \pm 0.1247$ ,  $P=0.000$ )。NSCLC 组织中 CCR10 mRNA 相对表达量在不同组织类型、淋巴结状态、临床分期中比较, 差异有统计学意义 ( $P$  均  $<0.05$ )。**结论** NSCLC 组织中, CCR10 无论是在 mRNA 水平抑或蛋白质水平均为高表达, 在癌组织中的表达水平高于正常肺组织, CCR10 的表达水平与 NSCLC 的病理组织学类型、临床分期、淋巴结状态密切相关。

**关键词:** 非小细胞肺癌; 趋化因子受体家族; C-C 基元受体 10; 免疫组织化学; 临床病理

**中图分类号:** R 734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)07-0875-04

## Expression of chemokine receptor CCR10 in NSCLC and its clinical significance

GUO Jin-yun, WANG Yu-wei

*Department of Respiratory Medicine, Huludao Central Hospital, Huludao, Liaoning 125001, China*

**Abstract:** **Objective** To study the expression level of chemokine C-C-Motif receptor 10 (CCR10) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its association with clinicopathologic feature of NSCLC. **Methods** Immunohistochemical staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to respectively detect the expressions of CCR10 protein and CCR10 mRNA in NSCLC and the corresponding paracancerous normal lung tissues. The associations of CCR10 protein and mRNA expressions with sex, age, pathological type of tissue, TNM staging and lymph node metastasis were analyzed. **Results** Immunohistochemical staining showed that CCR10 positive reaction was manifested by coloring of brownish yellow or brown granules located in the cytoplasm or cytomembrane of tumor cells. CCR10 protein positive expression rates were significantly higher in NSCLC tissues (66.67% vs 8.33%,  $P=0.000$ ), adenocarcinoma tissues (77.14% vs 52.00%,  $P=0.042$ ), patients with lymph node metastasis (83.78% vs 43.48%,  $P=0.001$ ) and patients with clinical stages of III + IV (79.41% vs 50.00%,  $P=0.017$ ) than those in paracancerous normal lung tissues, squamous cell carcinoma tissues, patients without lymph node metastasis and patients with clinical stages of I + II, respectively. CCR10 protein positive expression in NSCLC tissues was not associated with sex, age and degree of tissue differentiation (all  $P>0.05$ ). The relative expression level of CCR10 mRNA in NSCLC tissues was significantly higher than that in paracancerous normal lung tissues ( $1.1289 \pm 0.1363$  vs  $0.2159 \pm 0.1247$ ,  $P=0.000$ ). There were significant differences in the relative expression levels of CCR10 mRNA in NSCLC tissues for different tissue type, lymph node status and clinical staging (all  $P<0.05$ ). **Conclusions** CCR10 is highly expressed in NSCLC tissues both at mRNA level and protein level compared with normal lung tissues. The expression level of CCR10 is associated with histopathological type, clinical staging and lymph node status.

**Key words:** Non-small cell lung cancer; Chemokine receptor; C-C-Motif receptor 10; Immunohistochemistry;

## Clinical pathology

在全球范围内肺癌的发病率和死亡率均处于恶性肿瘤第 1 位,每年大约有 160 万人死于肺癌<sup>[1]</sup>,其中 85% 为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。尽管近些年在肺癌的诊断和治疗方面取得了很大进步,但由于肺癌高侵袭性和高转移性的生物学特性以及 70% 左右的 NSCLC 患者在诊断时就已经处在局部晚期或发生转移,失去手术根治的机会且对放、化疗不敏感,进而导致 NSCLC 患者的整体预后不容乐观,其总的 5 年生存率尚不足 20%<sup>[2]</sup>。近年来研究证实,肺癌细胞可表达多种趋化因子和趋化因子受体,趋化因子和趋化因子受体构成的复杂网络在肺癌的发生、发展过程当中发挥着重要作用,其共同参与肿瘤细胞的黏附、增殖、抗凋亡及血管生成等病理生理过程<sup>[3-4]</sup>。趋化因子受体家族中的 C-C 基元受体 10(CCR10),又称孤儿受体 GPR2,系 CC 族趋化因子受体成员之一,属于 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体。有关 CCR10 与 NSCLC 之间的关系迄今国内外文献尚未见报道。本研究旨在探讨 CCR10 在 NSCLC 中的表达水平及其与临床病理指标之间的关系,以期作为 NSCLC 的发病机制、预后判断以及后续 NSCLC 的临床靶向治疗提供参考。

## 1 对象与方法

**1.1 对象** 标本来源:收集我院心胸外科 2014 年 3 月 1 日至 2017 年 6 月 30 日期间行肺癌根治手术患者 NSCLC 标本 60 例,所有病例临床资料完整。其中男性 39 例,女性 21 例;年龄 32 ~ 78 岁,平均年龄为 55.6 岁;病理组织分型:鳞癌 25 例,腺癌 35 例;根据 2009 年国际抗癌联盟(UICC) NSCLC 临床分期的标准:I + II 期 26 例,III + IV 期 34 例。另收集上述 NSCLC 患者距肿瘤组织 > 5 cm 的相应癌旁正常肺组织 60 例作为对照,经病理学确认为正常肺组织,排除合并有炎症、结核等病史。本研究通过我院伦理委员会批准并与患者签署书面知情同意书。

**1.2 主要试剂** 兔抗人 CCR10 抗体,英国 Abcam 公司;PV-9000 试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司;30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,成都科龙化工试剂厂;总 RNA 提取试剂盒(离心柱型),天根生化科技(北京)有限公司;2 × Taq Plus PCR Master Mix,天根生化科技(北京)有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.3 免疫组织化学** 免疫组化步骤严格按照试剂盒说明步骤进行。按照独立、双盲的原则,由两位高年资的病理科医师进行显微镜下切片染色阅片。采用

半定量二次计分法进行计分。

**1.4 引物设计与合成** CCR10 引物设计与 Gene-Bank 发布的序列比对确认,CCR10 引物交由 Invitrogen 公司合成。实验所用引物序列如下。(1)CCR10 的引物序列:上游引物,5'-GAG GCC ACA GAG CAG GTT TC-3';下游引物,5'-CCT GGA CAT CGG CCT TGT A-3';扩增片段为 363 bp。(2)GAPDH 的引物序列:上游引物,5'-GAC AGT CAG CCG CAT CTT CT-3';下游引物,5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC TC-3';扩增片段为 391 bp。

**1.5 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)** 具体步骤严格按照试剂盒说明步骤进行,PCR 反应结束后,取 5 μl 产物用于下一步琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 结果判定:取出胶板,通过 Syngene GeneGenius 凝胶成像系统成像,应用 GeneTools 系统软件分析电泳结果。将每一组织标本测得的 CCR10 mRNA 条带的灰度值与相应内参 GAPDH 条带的灰度值之比,视之为 CCR10 mRNA 的相对表达量。

**1.6 统计学方法** 应用 SPSS 16.0 软件处理数据。采用 Pearson  $\chi^2$  检验比较 NSCLC 与相应癌旁正常肺组织中 CCR10 的表达差异,及 NSCLC 组织中 CCR10 蛋白阳性表达率在不同性别、年龄、病理组织类型、TNM 分期、淋巴结状态之间的差异。采用独立样本 *t* 检验,比较 NSCLC 组织中 CCR10 mRNA 相对表达量在不同性别、年龄、病理类型、组织分化程度、临床分期及淋巴结状态间的差异。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CCR10 mRNA 在 NSCLC 组与癌旁正常肺组织中的表达** 凝胶成像系统照相结果显示,在 363 bp 处亮度不同的条带为目标基因 CCR10,在 391 bp 处的明亮条带为相应的内参 GAPDH。CCR10 基因的条带在 NSCLC 组织中的亮度高于相应的正常肺组织,见图 1。经凝胶电泳图像分析软件 GeneTools 分析,CCR10 mRNA 在肺癌组织中的相对表达量为  $1.1289 \pm 0.1363$ ,高于癌旁正常肺组织中的表达量  $0.2159 \pm 0.1247$ ,两者差异有统计学意义(*t* = 48.794, *P* = 0.000)。

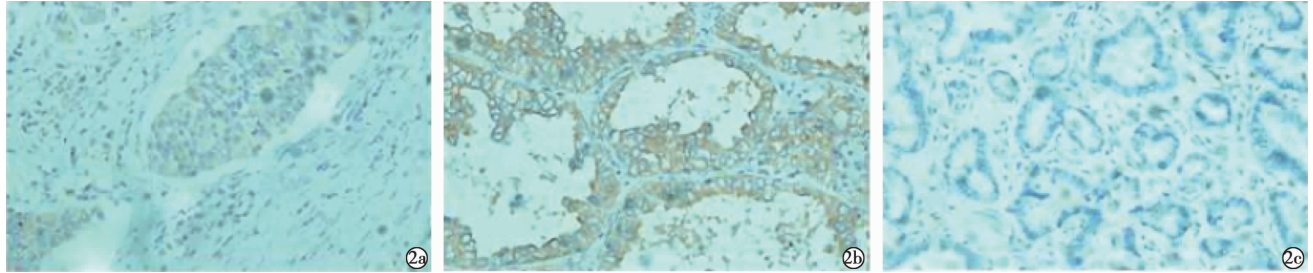
**2.2 CCR10 蛋白在 NSCLS 组织及癌旁正常肺组织的表达** 免疫组化结果显示,CCR10 蛋白阳性反应主要定位于细胞质和细胞膜上,表现为弥漫性细胞质内及细胞膜棕褐色颗粒状着色;癌旁正常肺组织仅少

量肺泡上皮细胞着色,染色深度及阳性细胞比率相比肺癌组织明显减少(图 2)。CCR10 蛋白阳性表达率在 NSCLC 组织中为 66.67% (40/60),癌旁正常肺组织中为 8.33% (5/60),两者差异有统计学意义( $\chi^2 = 43.556, P = 0.000$ )。

2.3 CCR10 蛋白表达与患者临床病理特征的关系

分析 CCR10 蛋白表达情况与 NSCLC 患者临床病理特征之间的关系,发现 CCR10 蛋白在肺腺癌组织中的阳性表达率比鳞癌组织高(77.14% vs 52.00%,  $\chi^2 = 4.149, P = 0.042$ );依据 TNM 分期,Ⅲ + Ⅳ期肺癌患者 CCR10 的阳性表达率比 I + Ⅱ期者高(79.41% vs 50.00%,  $\chi^2 = 5.735, P = 0.017$ );有淋巴结转移的肺癌组织中 CCR10 阳性表达率比无淋巴结转移者高(83.78% vs 43.48%,  $\chi^2 = 10.648, P = 0.001$ )。以患者性别、年龄、肿瘤分化程度为基准比较,两组间 CCR10 的表达水平差异无统计学意义( $P$  均 > 0.05)。见表 1。

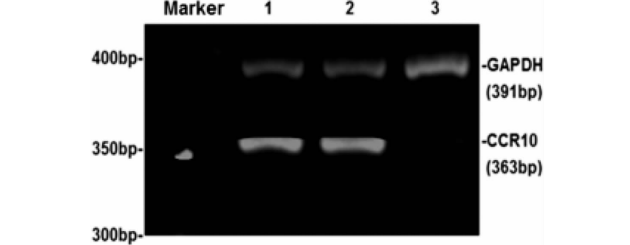
2.4 CCR10 mRNA 表达与临床病理特征的关系



注:2a:肺鳞癌;2b:肺腺癌;2c:癌旁正常肺组织。  
图 2 CCR10 蛋白在肺鳞癌、腺癌和正常肺组织中的表达(IHC, × 200)

| 表 1 NSCLS 组织中 CCR10 蛋白表达<br>与 NSCLC 临床病理学特征的关系 |    |             |    |        |            |       |
|------------------------------------------------|----|-------------|----|--------|------------|-------|
| 类型                                             | 例数 | CCR10 表达(例) |    | 阳性率(%) | $\chi^2$ 值 | P 值   |
|                                                |    | 阳性          | 阴性 |        |            |       |
| 性别                                             |    |             |    |        |            |       |
| 男                                              | 39 | 20          | 19 | 51.28  | 0.007      | 0.935 |
| 女                                              | 21 | 11          | 10 | 52.38  |            |       |
| 年龄(岁)                                          |    |             |    |        |            |       |
| ≤60                                            | 17 | 15          | 11 | 53.13  | 0.097      | 0.755 |
| >60                                            | 16 | 12          | 9  | 57.14  |            |       |
| 病理类型                                           |    |             |    |        |            |       |
| 鳞癌                                             | 25 | 13          | 12 | 52.00  | 4.149      | 0.042 |
| 腺癌                                             | 35 | 27          | 8  | 77.14  |            |       |
| 分化程度                                           |    |             |    |        |            |       |
| 高中分化                                           | 28 | 19          | 9  | 67.86  | 0.033      | 0.855 |
| 低未分化                                           | 32 | 21          | 11 | 65.63  |            |       |
| TNM 分期                                         |    |             |    |        |            |       |
| I + Ⅱ                                          | 26 | 13          | 13 | 50.00  | 5.735      | 0.017 |
| Ⅲ + Ⅳ                                          | 34 | 27          | 7  | 79.41  |            |       |
| 淋巴结转移                                          |    |             |    |        |            |       |
| 有                                              | 37 | 31          | 6  | 83.78  | 10.648     | 0.001 |
| 无                                              | 23 | 10          | 13 | 43.48  |            |       |

NSCLC 组织中 CCR10 mRNA 相对表达量在不同的病理组织类型、临床分期、淋巴结转移状态中,差异均有统计学意义:CCR10 mRNA 的相对表达量 NSCLC 腺癌组高于鳞癌组( $t = 2.304, P = 0.038$ ),伴淋巴结转移者高于不伴淋巴结转移者( $t = 2.593, P = 0.027$ ),临床Ⅲ + Ⅳ期高于临床 I + Ⅱ期患者( $t = 2.350, P = 0.013$ );但在不同性别、年龄、肿瘤组织分化程度的 NSCLC 组织中差异无统计学意义( $P$  均 > 0.05)。见表 2。



注:M:DNA Marker I;1,2:肺癌组织;3:癌旁正常肺组织。  
图 1 CCR10 mRNA 在 NSCLC 及癌旁正常肺组织中表达的 RT-PCR 结果

| 表 2 NSCLC 组织中 CCR10 mRNA 相对表达量<br>与临床病理特征的关系 ( $\bar{x} \pm s$ ) |    |                 |       |       |
|------------------------------------------------------------------|----|-----------------|-------|-------|
| 类型                                                               | 例数 | CCR10 mRNA      | t 值   | P 值   |
| 性别                                                               |    |                 |       |       |
| 男                                                                | 39 | 1.8714 ± 0.3014 | 0.902 | 0.381 |
| 女                                                                | 21 | 1.7903 ± 0.2962 |       |       |
| 年龄(岁)                                                            |    |                 |       |       |
| ≤60                                                              | 32 | 1.5847 ± 0.1352 | 0.068 | 0.849 |
| >60                                                              | 28 | 1.5793 ± 0.1361 |       |       |
| 病理类型                                                             |    |                 |       |       |
| 鳞癌                                                               | 25 | 1.6156 ± 0.2263 | 2.304 | 0.038 |
| 腺癌                                                               | 35 | 1.7258 ± 0.1637 |       |       |
| 分化程度                                                             |    |                 |       |       |
| 高中分化                                                             | 28 | 1.5148 ± 0.1267 | 1.647 | 0.179 |
| 低未分化                                                             | 32 | 1.5402 ± 0.2603 |       |       |
| TNM 分期                                                           |    |                 |       |       |
| I + Ⅱ                                                            | 26 | 1.9603 ± 0.1227 | 2.350 | 0.013 |
| Ⅲ + Ⅳ                                                            | 34 | 2.1874 ± 0.1421 |       |       |
| 淋巴结转移                                                            |    |                 |       |       |
| 有                                                                | 37 | 1.7238 ± 0.1126 | 2.593 | 0.027 |
| 无                                                                | 23 | 1.6382 ± 0.1058 |       |       |

### 3 讨论

人类 CCR10 在成年人睾丸和小肠中表达量最高,于胎儿肺、肾中呈中等量表达,于成年人脾、胸腺、淋巴结等器官组织中表达量最低<sup>[5]</sup>。在细胞水平上,人类 CCR10 由唾液腺、小肠、大肠、阑尾及扁桃腺中的 IgA 抗体分泌细胞选择性表达。CCR10 的特异性配体为 CCL27 和 CCL28<sup>[6]</sup>。研究发现,CCR10 与银屑病、过敏性接触性皮炎等炎症反应性疾病有关<sup>[7]</sup>。近年来愈来愈多的文献报道 CCR10 与肿瘤关系密切,其在恶性神经胶质瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、黑色素瘤、成人 T 细胞淋巴瘤以及皮肤鳞状细胞癌等肿瘤中均有表达<sup>[8-12]</sup>。然而有关 CCR10 与 NSCLC 之间的关系迄今国内外文献尚未见报道。本研究对 NSCLC 肿瘤组织及癌旁正常组织 CCR10 表达的定性分析发现,NSCLC 及其相应的癌旁正常肺组织中均有 CCR10 表达。CCR10 阳性细胞表达主要定位于细胞膜与细胞质。在 NSCLC 组织中,CCR10 阳性表达率高于相应的癌旁正常肺组织(66.67% vs 8.33%),提示 CCR10 的表达可能与 NSCLC 的发生、发展有关,CCR10 可能成为肺癌治疗的一个靶点和诊断、预后判定的指标。在肺腺癌组织 CCR10 表达率明显高于肺鳞癌组织(77.14% vs 52.00%),提示 CCR10 的表达水平与组织学类型可能有关;临床Ⅲ+Ⅳ期组 CCR10 的阳性表达率高于Ⅰ+Ⅱ期组(79.41% vs 50.00%),表明 NSCLC 患者临床分期越晚,CCR10 阳性表达率越高;CCR10 在 NSCLC 淋巴结转移组的阳性表达率高于无淋巴结转移组(83.78% vs 43.48%),提示 CCR10 有望成为预测患者淋巴结转移的有效生物学指标。研究中还发现,CCR10 的表达与患者性别、年龄及肿瘤分化程度无相关性。

Chen 等<sup>[12]</sup>采用 RT-PCR 检测结果显示,恶性神经胶质瘤中 CCR10 mRNA 的表达水平较正常脑组织高。本研究应用 RT-PCR 在基因转录水平上对 NSCLC 组织及其相应的癌旁正常肺组织的 CCR10 mRNA 表达水平进行检测,结果也显示 NSCLC 组织中 CCR10 mRNA 表达高于癌旁正常组织。本研究进一步探讨 NSCLC 组织中 CCR10 mRNA 的表达水平与临床病理特征之间的关系,结果表明 CCR10 mRNA 相对表达量在 NSCLC 腺癌中高于鳞癌;有淋

巴结转移的癌组织中高于不伴有淋巴结转移者;临床Ⅲ+Ⅳ期患者癌组织中高于临床Ⅰ+Ⅱ期患者。而 CCR10 mRNA 的表达水平与患者性别、年龄、组织分化程度无相关性。未进行相关性的多因素分析是本研究的欠缺之处。

综上所述,CCR10 在 NSCLC 组织中高表达,CCR10 可能与 NSCLC 的发生、发展有关。

### 参考文献

- [1] 熊小玲,刘杰,朱丽萍,等. 2010-2014 年江西省肿瘤登记地区肺癌发病率及时间趋势分析[J]. 中华疾病控制杂志,2017,21(10):1002-1004,1013.
- [2] 刘志坤,苏景伟,张魏丽,等. 107 例 NSCLC 患者放疗后≥2 级放射性肺炎预测模型的建立和分析[J]. 实用肿瘤杂志,2017,32(3):239-243.
- [3] 刘仁鹏,陈郭玲,周爽,等. 趋化因子受体 CCR7 下调对 95D 肺癌细胞侵袭力的影响[J]. 同济大学学报(医学版),2015,36(4):7-12.
- [4] 管彩虹,赵凯,楼雅芳,等. 趋化因子 CCL22 对肺癌细胞迁移和侵袭的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2015,25(1):12-13,25,107.
- [5] 钱希颖,金立德,曹霞. CCL27 CCL28 及 CCR10 在癫痫小鼠急性期表达增高[J]. 重庆医学,2015,44(24):3331-3333.
- [6] 高雯,朱滔,朱笕青. 趋化因子 CCL28 在炎症与肿瘤中作用的研究进展[J]. 生命的化学,2016,36(3):359-362.
- [7] Riis JL, Johansen C, Vestergaard C, et al. Kinetics and differential expression of the skin-related chemokines CCL27 and CCL17 in psoriasis, atopic dermatitis and allergic contact dermatitis[J]. Exp Dermatol, 2011, 20(10):789-794.
- [8] 王卓敏,李迎春,张壮. LNMTca8113 舌癌细胞中 CCR10 下游分子鉴定[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(12):2644-2647.
- [9] 乔新安,朱彦彩,都军霞,等. CCL25 和 CCL28 及其相应受体 CCR9 和 CCR10[J]. 医学分子生物学杂志,2007,4(5):458-460.
- [10] Kühnelt-Leddihn L, Müller H, Eisendle K, et al. Overexpression of the chemokine receptors CXCR4, CCR7, CCR9, and CCR10 in human primary cutaneous melanoma; a potential prognostic value for CCR7 and CCR10[J]. Arch Dermatol Res, 2012, 304(3):185-193.
- [11] Kai H, Kadono T, Kakinuma T, et al. CCR10 and CCL27 are overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Pathol Res Pract, 2011, 207(1):43-48.
- [12] Chen L, Liu X, Zhang HY, et al. Upregulation of chemokine receptor CCR10 is essential for glioma proliferation, invasion and patient survival[J]. Oncotarget, 2014, 5(16):6576-6583.

收稿日期:2018-01-16 修回日期:2018-02-16 编辑:石嘉莹