

· 论著 ·

趋化因子受体 7 在食管癌中的表达及临床意义

安超伦¹, 褚红军¹, 仲崇俊²

1. 南通市第三人民医院胸外科, 江苏南通 226001;
2. 南通大学附属南通第一人民医院胸外科, 江苏南通 226001

摘要: 目的 探讨趋化因子受体(CXCR)7在食管癌中的表达水平及其临床意义。方法 对2013年1月至2015年12月在南通第三人民医院及南通第一人民医院收治确诊的56例胸段食管鳞癌患者的临床资料进行回顾性分析。随机选取其手术所获6对癌组织以及癌旁组织,应用Real-time PCR、Western blot检测CXCR7 mRNA以及蛋白表达情况,应用免疫组化方法检测56例癌组织中CXCR7阳性情况,并应用 χ^2 检验以及Spearman相关分析分析CXCR7阳性与否和患者临床特征的关系。随访截止于2017年12月31日,应用Kaplan-Meier生存分析分析CXCR7阳性与否和患者生存期的关系。结果 食管癌组织中CXCR7 mRNA表达水平约为癌旁组织的(1.62 ± 0.08)倍($t = 11.370, P < 0.01$);CXCR7蛋白表达水平约为癌旁组织的(1.50 ± 0.09)倍($t = 8.043, P < 0.01$)。56例患者中42例(75.00%)患者CXCR7阳性;CXCR7阳性率与肿瘤浸润深度、淋巴结转移以及pTNM分期有相关性($P < 0.01$)。至随访截止时,CXCR7阳性患者中位生存期为38个月(95% CI: 14.83 ~ 57.17),明显低于CXCR7阴性患者的58个月(95% CI: 53.13 ~ 61.72, $P < 0.05$)。结论 CXCR7在食管癌中高表达,与肿瘤浸润深度、淋巴结转移以及pTNM分期密切相关,并影响患者预后,可能是食管癌诊治的潜在靶点。

关键词: 趋化因子受体 7; 食管癌; 侵袭; 转移; 生存期

中图分类号: R 735.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2019)11-1484-04

Expression and clinical significance of chemokine receptor 7 in esophageal cancer

AN Chao-lun^{*}, CHU Hong-jun, ZHONG Chong-jun

* Department of Thoracic Surgery, Nantong Third People's Hospital affiliated to Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of chemokine receptor (CXCR) 7 in esophageal cancer. Methods The clinical data of 56 patients with thoracic esophageal squamous cell carcinoma diagnosed in Nantong Third People's Hospital and Nantong First People's Hospital from January 2013 to December 2015 were retrospectively analyzed. Six pairs of cancer tissues and adjacent tissues were randomly selected. The expression of CXCR7 mRNA and protein were detected by Real-time PCR and Western blot. The positive rate of CXCR7 of cancer tissues in 56 cases was detected by immunohistochemistry. The relationship between CXCR7 positive status and clinical features were analyzed by Chi-square test and Spearman correlation analysis. Follow-up was completed on December 31, 2017, and Kaplan-Meier survival analysis was used to analyze the relationship between CXCR7 positive status and patients' survival. Results The expression of CXCR7 mRNA in esophageal cancer tissues was (1.62 ± 0.08) times than that of adjacent tissues ($t = 11.370, P < 0.01$). The expression of CXCR7 protein was (1.50 ± 0.09) times than that of adjacent tissues ($t = 8.043, P < 0.01$). CXCR7 was positive in 42 of 56 patients (75.00%). The positive rate of CXCR7 was correlated with tumor invasion depth, lymph node metastasis and pTNM stage (all $P < 0.01$). By the end of follow-up, the median survival time of CXCR7 positive patients was 38 months (95% CI: 14.83 ~ 57.17), which was significantly lower than that of CXCR7-negative patients (58 months, 95% CI: 53.13 ~ 61.72, $P < 0.05$). Conclusions CXCR7 is highly expressed in esophageal cancer, which is closely related to tumor invasion depth, lymph node metastasis and pTNM staging, and affects the prognosis of patients. It may be a potential target for the diagnosis and treatment of esophageal cancer.

Key words: Chemokine receptor 7; Esophageal cancer; Invasion; Metastasis; Survival time

Fund program: Nantong Science and Technology Plan Program (YYZ15040)

食管癌在我国是一种常见的消化道恶性肿瘤,预计 2050 年我国新发食管癌病例将达 60 万,而死亡病例将达 48 万^[1]。目前,以外科手术为主辅助放、化疗,为治疗食管癌的标准模式。但其生物学行为具有高侵袭性和高转移倾向,使得现今食管癌患者的生存率并没有得到很大改善^[2]。因此,研究食管癌侵袭和转移的机制,以提高其疗效已成为一项迫切的任务。近年来有关趋化因子(CXC)及其受体在肿瘤侵袭和转移中的作用受到关注,研究认为其可能成为肿瘤诊治的又一个新的靶点。趋化因子受体(CXCR)与其他传统的受体不同,能够以非配体依赖的组成性激活方式,调节靶基因的转录,参与众多的细胞生物学过程,如增殖、分化、凋亡、癌变等过程^[3]。本研究分析 CXCR7 在食管癌中的表达及其与患者临床特征的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2013 年 1 月至 2015 年 12 月在南通第三人民医院及南通第一人民医院收治确诊的 56 例胸段食管鳞癌患者的临床资料进行回顾性分析。56 例中男 36 例,女 20 例;年龄 52~76(60.19 ± 7.88)岁,其中≤59 岁 23 例,>59 岁 33 例;肿瘤直径<3 cm 25 例,≥3 cm 31 例;肿瘤位于食管上段 1 例,中段 29 例,下段 26 例;pTNM 分期 I 期 8 例,II 期 27 例,III 期 20 例,IV 期 1 例;浸润深度情况,7 例 T₁,17 例 T₂,30 例 T₃,2 例 T₄;高分化 12 例,中分化 37 例,低分化 7 例;无淋巴结转移 28 例,<3 枚淋巴结转移 18 例,≥3 枚淋巴结转移 10 例。所有患者均接受手术治疗,术后常规放化疗。收集术中的部分癌组织以及相应癌旁组织液氮冻存备用,余下标本福尔马林固定,常规脱水,行 10 μm 石蜡切片。

1.2 主要试剂 Trizol 试剂盒、qPCR Master Mix12 (Fermenas 公司,美国);RIPA 裂解液(碧云天生物技术有限公司);免抗 CXCR7 多克隆抗体、小鼠抗 β-actin 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);结合有 HRP 的羊抗兔 IgG、结合有 HRP 的羊抗小鼠 IgG(Millipore 公司,美国);ECL 显色液(Bio-Rad 公司,美国)。

1.3 Real-time PCR 依据 Genbank 提供的 mRNA 序列,使用 Primer 5.0 软件按照实时定量技术对引物的要求设计引物,CXCR7 的引物序列:上游,5'-ATC TCT TCG ACT ACT CA-3';下游,5'-GTA GAG CAG GAC GCT TTT GTT-3';GAPDH 的引物序列:上游,5'-GTC AAG GCT GAG AAC GGG AA-3';下游,5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC TC-3'。引物由上海 Invitrogen 公司合成。

随机取出 6 对液氮冻存的癌组织及癌旁组织标本,用 Trizol 法(试剂盒购自 Fermenas 公司)提取组织总 RNA 并逆转录成 cDNA,以其为模版对 CXCR7、GAPDH 进行 Real-time PCR 检测。配置反应体系:SYBR Green I qPCR Master Mix 12 μl(Fermentas 公司),P1(上游引物,10 μmol/L)1 μl,P2(下游引物,10 μmol/L)1 μl,标准品模板 1 μl,dd H₂O 10 μl。设置反应条件:预变性 95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,48 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,50 个循环。通过 2^{-ΔΔCT} 法计算 mRNA 相对表达量。

1.4 Western blot 随机取出 6 对液氮冻存的癌组织及癌旁组织标本,加入 RIPA 裂解液制成匀浆,将蛋白定量后稀释成 3 g/L,行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,然后经过半干转印系统转膜,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,再用 5% 脱脂奶粉稀释的免抗 CXCR7 多克隆抗体(1:200)、小鼠抗 β-actin 单克隆抗体(1:800)室温孵育 3 h,PBS 洗涤后,用 5% 脱脂奶粉稀释的结合有 HRP 的羊抗兔 IgG(1:2 000)和羊抗小鼠 IgG(1:2 000)室温孵育 2 h,PBS 洗涤后行 ECL 显色。

1.5 免疫组化 取石蜡切片,每张切片滴加含有 10% 山羊血清的封闭液 100 μl,室温孵育 2 h,PBS 漂洗 3 遍,滴加 1:250 稀释的免抗 CXCR7 多克隆抗体 100 μl,37 ℃ 湿盒孵育 4 h,PBS 漂洗 3 遍,滴加 1:1 000 稀释的结合 HRP 的羊抗兔二抗 100 μl,室温湿盒孵育 2 h。PBS 漂洗 3 遍,DAB 显色约 5 min,PBS 漂洗 3 遍,每张切片滴加哈氏苏木素 100 μl,室温孵育 1 min,乙醇脱水干燥,然后中性树脂封片。

采用半定量积分法对阳性细胞染色强度及阳性细胞率分别进行分级计分:阳性细胞染色强度分别计为无着色(0 分)、浅棕色(1 分)、棕黄色(2)以及深棕色(3 分);阳性细胞率分别计为<5%(0 分)、5%~25%(1 分)、>25%~50%(2 分)、>50%~75%(3 分)、>75%(4 分)。每张切片得分为上述两种得分相乘,<4 分视为低表达,定义为阴性,≥4 分视为高表达,定义为阳性^[4]。

1.6 随访 采用电话以及门诊随访,所有随访截止到 2017 年 12 月 31 日。总生存期定义为手术之日起,至患者死亡或最后一次随访的时间。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验;计数资料以例数表示,采用 χ^2 检验;用 Spearman 相关分析进行等级资料两变量的相关性分析;应用 Kaplan-Meier 生存函数分析 CXCR7 阳性率与患者 5 年总生存率的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CXCR7 mRNA 表达情况 Real-time PCR 结果显示, 食管癌组织中 CXCR7 mRNA 表达水平约为癌旁组织的 (1.62 ± 0.08) 倍 ($t = 11.370, P < 0.01$)。见图 1。

2.2 CXCR7 蛋白表达情况 Western blot 结果显示, 食管癌组织中 CXCR7 蛋白表达水平约为癌旁组织的 (1.50 ± 0.09) 倍 ($t = 8.043, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 CXCR7 免疫组化情况 CXCR7 蛋白主要表达于细胞膜及细胞浆, 癌旁组织主要呈淡黄色(图 3a), pTNM I ~ II 期癌组织主要呈棕黄色(图 3b), pTNM III ~ IV 期癌组织主要呈深棕色(图 3c)。56 例患者中 42 例 CXCR7 阳性, 阳性率为 75.00%。所有癌旁组织阳性率为 0。

2.4 CXCR7 阳性率与食管癌患者临床特征的关系

CXCR7 阳性率与肿瘤浸润深度 ($r = 0.532, P = 0.001$)、淋巴结转移 ($r = 0.353, P = 0.008$) 以及 pTNM 分期 ($r = 0.491, P = 0.000$) 有相关性; 与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置以及分化程度无相关性 ($P > 0.05$)。见表 1。

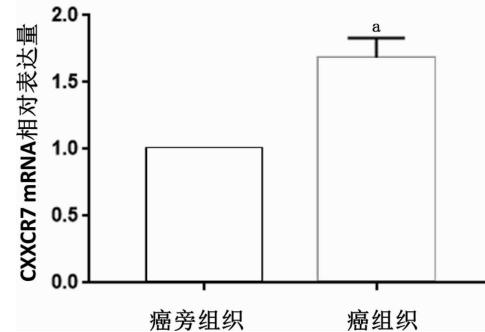
2.5 CXCR 与 5 年总生存率的关系 56 例患者无失访, 随访率 100%。至随访截止时, 死亡 29 例, 存活 27 例, Kaplan-Meier 生存函数分析结果示, CXCR7 阳性患者中位生存期为 38 个月 (95% CI: 14.83 ~ 57.17), CXCR7 阴性患者中位生存期为 58 个月 (95% CI: 53.13 ~ 61.72), CXCR7 阳性患者生存期明显低于 CXCR7 阴性患者 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

食管癌是全球八大常见恶性肿瘤, 也是全球癌症死亡率的第六大原因^[1]。然而, 在中国, 食管癌被列为癌症死亡的第四大常见原因, 并且其约占所有恶性肿瘤死亡率的十分之一^[2]。超过 90% 的食管癌患者诊断时已经为晚期^[3~5]。一项随机对照试验表明, 对于食管癌患者的内镜筛查和监测是不切实际的, 因

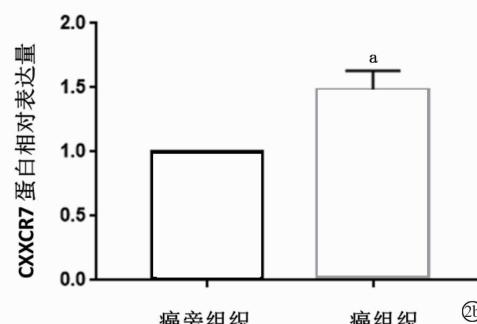
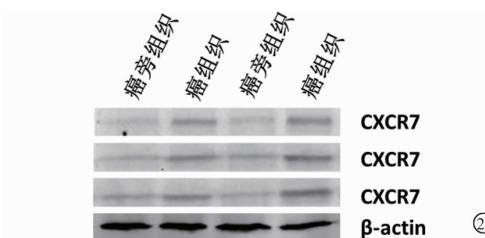
为费用昂贵且患者的益处相对较低。尽管在诊断和治疗方面取得了相当大的进展, 但食管癌的总体预后仍然很差^[6~9], 5 年生存率约为 15% ~ 25%^[2]。因此, 对食管癌的分子机制进行深入的理解将有助于寻找新的诊治策略。

有研究已经充分证明 CXC 及 CXCR 在肿瘤发展中起重要作用^[10~13]。CXC 是低分子量细胞因子, 可以细分为 CXC 和 CC 趋化因子。其可以通过化学吸引选择性地调节白细胞外渗到炎症区域^[12]。除了在



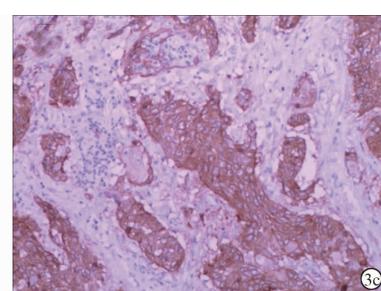
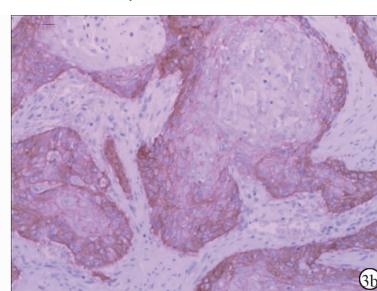
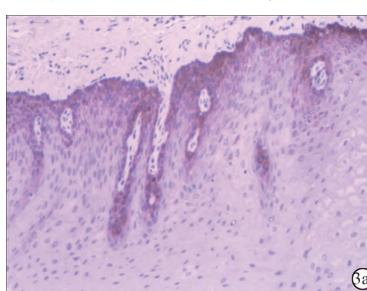
注:与癌旁组织比较, $^aP < 0.01$ 。

图 1 Real-Time PCR 检测 CXCR7 mRNA 表达



注:2a:食管癌组织及癌旁组织 CXCR7 蛋白条带;2b:CXCR7 蛋白相对表达量;与癌旁组织比较, $^aP < 0.01$ 。

图 2 Western blot 检测 CXCR7 蛋白表达



注:3a:癌旁组织;3b:pTNM I ~ II 期癌组织;3c:pTNM III ~ IV 期癌组织。

图 3 不同组织 CXCR7 病理图(免疫组化, $\times 200$)

表 1 CXCR7 阳性率与食管癌临床特征的相关性

临床因素	例数	CXCR7(例)		χ^2 值	Spearman 相关分析	
		阳性	阴性		r 值	P 值
年龄						
≤59岁	23	18	5			
>59岁	33	24	9	0.221	0.063	0.638
性别						
女	20	16	4			
男	36	26	10	0.415	0.086	0.520
肿瘤大小						
<3 cm	25	20	5			
≥3 cm	31	22	9	0.602	0.104	0.438
肿瘤位置						
上	1	1	0			
中	29	23	6	1.082	0.136	0.582
下	26	18	8			
PTNM 分期						
I 期	8	1	7			
II 期	27	22	5			
III 期	20	18	2	20.005	0.491	0.000
IV 期	1	1	0			
浸润深度						
T ₁	7	2	5			
T ₂	17	10	7			
T ₃	30	28	2	16.465	0.532	0.001
T ₄	2	2	0			
分化程度						
高分化	12	9	3			
中分化	37	28	9	0.057	0.018	0.972
低分化	7	5	2			
淋巴结转移						
无	28	16	12			
<3 个	18	17	1	9.592	0.353	0.008
≥3 个	10	9	1			

炎症反应中的作用外,大量证据表明,CXC 在肿瘤中也发挥重要作用,CXC 及 CXCR 均通过调节血管生成,激活肿瘤特异性免疫应答,刺激细胞增殖以及参与肿瘤转移来调节肿瘤发展^[13]。CXCR7 是 CXCL12 的第二种受体[基质细胞衍生因子(SDF-1)],在哺乳动物中高度保守,是膜相关受体蛋白。尽管 CXCR7 分子作用机制仍不明了,但其在一些肿瘤中的生物学功能已得到初步证实,如 CXCR7 与 CXCL12 结合,可参与多种肿瘤的浸润与转移,如肺癌、胃癌以及前列腺等^[3,10,13~15]。

本研究探讨 CXCR7 在食管癌中的表达及其与食管癌临床特征的关系,结果显示,食管鳞癌组织中 CXCR7 基因处于高表达状态,其高表达与食管癌的恶性程度密切相关,Spearman 相关分析示,CXCR7 阳性率与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 pTNM 分期有相关性;Kaplan-Meier 生存函数分析结果示,CXCR7 阳性患者中位生存期明显低于 CXCR7 阴性患者。本研究样本量较少,且未能阐明 CXCR7 在食管癌的具体机制,有待后续进一步深入研究。

综上所述,CXCR7 在食管癌中呈高表达,与肿瘤浸润深度、淋巴结转移以及 pTNM 分期密切相关,并影响患者预后,可能是食管癌诊治的潜在靶点。

参考文献

- Ghaffar M, Li J, Zhang L, et al. Water carcinogenicity and prevalence of HPV infection in esophageal cancer patients in Huaihe River Basin, China[J]. Gastroenterol Res Pract, 2018, 2018(4):1~8.
- Xu D, Li G, Li H, et al. Comparison of IMRT versus 3D-CRT in the treatment of esophagus cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine, 2017, 96(31):e7685.
- Katsura M, Shoji F, Okamoto T, et al. Correlation between CXCR4/CXCR7/CXCL12 chemokine axis expression and prognosis in lymph-node-positive lung cancer patients[J]. Cancer Sci, 2018, 109(1):154~165.
- 魏瑜,张莉. PD-L1 表达与食管癌预后相关性的 Meta 分析[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(1):48~51.
- Hyid-Jensen F, Federsen L, Drewes AM, et al. Incidence of adenocarcinoma among patients with barrett's esophagus [J]. N Engl J Med, 2011, 365(15):1375~1383.
- Francis S, Lloyd S, Orton A, et al. Toxicity and outcomes in patients with and without esophageal stents in locally advanced esophagus cancer[J]. Int J Radiat Oncol, 2016, 96(2S):E175.
- Yagyu T, Saito H, Kono Y, et al. Thoracic esophagus cancer revealing a tracheal diverticulum[J]. Yonago Acta Med, 2017, 60(3):200.
- Yano T, Hatogai K, Morimoto H, et al. Photodynamic therapy for esophageal cancer[J]. An Transl Med, 2014, 2(3):29.
- Paireder M, Asari R, Kristo I, et al. Impact of sarcopenia on outcome in patients with esophageal resection following neoadjuvant chemotherapy for esophageal cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2017, 43(2):478~484.
- Shi A, Shi H, Dong L, et al. CXCR7 as a chemokine receptor for SDF-1 promotes gastric cancer progression via MAPK pathways[J]. Scand J Gastroenterol, 2017, 52(6/7):745~753.
- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, et al. The Role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer[J]. J Biol Chem, 2008, 283(7):4283~4294.
- Khurram SA, Bingle L, McCabe BM, et al. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 regulate oral cancer cell behaviour[J]. J Oral Pathol Med, 2014, 43(9):667~674.
- Wu K, Cui L, Yang Y, et al. Silencing of CXCR2 and CXCR7 protects against esophageal cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(8):3398~3408.
- Huang YL, Liu XL, Xu N, et al. Expression and function of CXCR2, CXCR7 of acute leukemic cells in rat[J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7(5):417~420.
- Xin Q, Zhang N, Yu HB, et al. CXCR7/CXCL12 axis is involved in lymph node and liver metastasis of gastric carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(17):3053~3065.

收稿日期:2019-02-14 修回日期:2019-03-20 编辑:王国品