

文章编号 1006-8147(2014)04-0264-03

论著

CXCR4 和 CathepsinD 在恶性纤维组织细胞瘤中的表达及意义

班新超^{1,2,3}, 孙保存^{1,3}, 谷彦军^{1,3}, 魏秀平^{1,3}, 娄丹^{1,3}, 李庆选², 郑燕君¹

(1.天津医科大学病理学教研室,天津 300070;2.天津市天津医院病理科,天津 300211;3.天津医科大学肿瘤医院病理科,天津 300060)

摘要 目的:探讨 CXCR4 和组织蛋白酶 D(Cathepsin D)的表达与恶性纤维组织细胞瘤(MFH)转移及预后的关系。方法:选取存档的 55 例 MFH 组织标本,根据临床资料分为有转移组和无转移组,利用免疫组织化学染色检测两组原发灶中 CXCR4 和 CathepsinD 蛋白的表达情况,比较其过表达患者与低表达患者的中位生存期;利用 Real-time PCR 检测 20 例 MFH 有转移组和无转移组原发灶中 CXCR4 和 CathepsinD 的 mRNA 表达水平。结果: CXCR4 和 CathepsinD 表达水平在转移组均显著高于无转移组($P<0.05$);CXCR4 过表达者的中位生存期均显著低于其低表达者($P<0.05$);CathepsinD 过表达者的中位生存期低于其低表达者,但差异无显著性($P>0.05$)。结论:过表达 CXCR4 和 CathepsinD 与 MFH 的远处转移有关,CXCR4 可作为 MFH 预后不良的参考指标。

关键词 恶性纤维组织细胞瘤;转移;CXCR4;CathepsinD

中图分类号 R73

文献标志码 A

Expression of CXCR4 and CathepsinD in malignant fibrous histiocytoma and their biological significance

BAN Xin-chao^{1,2,3}, SUN Bao-cun^{1,3}, GU Yan-jun^{1,3}, WEI Xiu-ping^{1,3}, LOU Dan^{1,3}, LI Qing-xuan², ZHENG Yan-jun¹

(1.Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Pathology, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China; 3. Department of Pathology, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of CXCR4 and CathepsinD in malignant fibrous histiocytoma (MFH) and to explore their relationship with metastasis and prognosis. **Methods:** Fifty-five MFH cases were divided into two groups (with or without metastasis). The expression levels of CXCR4 and CathepsinD were detected using immunohistochemical staining method to compare the median survival time of patients with overexpression and underexpression of the two proteins; mRNA expression of CXCR4 and CathepsinD were detected using Real-time PCR in 20 MFH cases with and without metastasis. **Results:** The protein and mRNA expression levels of CXCR4 and CathepsinD in group with metastasis were significantly higher than those without metastasis ($P<0.05$); the median survival time of patients with overexpression of CXCR4 was significantly less than those with low-expression ($P<0.05$); the median survival time of patients who overexpressed CathepsinD was less than those who underexpressed. However, no statistical significance was found ($P>0.05$). **Conclusion:** The overexpression of CXCR4 and CathepsinD in MFH is related to distant metastasis and CXCR4 could be associated with poor prognosis of MFH.

Key words malignant fibrous histiocytoma; metastasis; CXCR4; CathepsinD

随着分子遗传学和分子生物学的发展,恶性纤维组织细胞瘤(malignant fibrous histiocytoma, MFH)作为一种独立恶性肿瘤的地位受到质疑^[1-4],WHO(2002年)将MFH和未分化多形性肉瘤视为同义词^[5]。MFH易复发和远处转移,是影响患者生存质量和生存率的主要原因。研究表明,CXCR4在肿瘤器官特异性转移中发挥重要作用^[6],而组织蛋白酶D(CathepsinD)与某些肿瘤的浸润、转移及预后有关^[7],但其在肉瘤中的研究尚罕见。本研究检测CXCR4

和CathepsinD在MFH中的表达,并探讨两者的表达与MFH转移及预后的关系。

1 材料和方法

1.1 标本来源 选取天津医科大学附属肿瘤医院1989年1月—2007年1月间经手术切除、石蜡包埋的MFH组织标本55例和20例组织库冻存的MFH新鲜组织。所有病例均按照WHO软组织与骨肿瘤病理学和遗传学(2002年)分类标准,经病理科高年资医师复读HE染色切片,并结合Vimentin、panCK、EMA、Desmin、SMA、Bcl-2、CD99、S-100、HMB45、CD34、CD117、CD68等免疫组化染色结果进一步明确诊断。

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81172046)

作者简介 班新超(1983-),女,硕士,研究方向:肿瘤血管生成;通信作者:孙保存,E-mail:sunbaocun@aliyun.com。

1.2 试剂与方法

1.2.1 免疫组化染色 兔来源单克隆抗体 CXCR4 购自武汉博士德生物科技公司(BA0761);兔来源多克隆抗体 CathepsinD 购自武汉博士德生物科技公司(BA0206);PV-6001 二步法免疫组化检测试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司;DAB Kit 购自武汉博士德生物工程公司。一抗按 1:75 进行稀释,每次染色选择相应阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。各变量相对表达量用染色强度和阳性细胞百分比积分的乘积来评价。染色强度:阴性为细胞无着色(0 分);弱阳性为浅黄(1 分);中度阳性为棕黄(2 分);强阳性为棕褐(3 分)。阳性细胞百分比:计数 5 个含有阳性细胞的高倍视野($\times 400$)分别计数 100 个肿瘤细胞,计算阳性细胞数百分比,取其平均值,0%~5%阳性细胞计为 0 分,6%~25%阳性细胞计为 1 分,26%~50%阳性细胞计为 2 分,>50%阳性细胞计为 3 分。染色强度和阳性细胞百分比积分乘积最大值为 9,积分乘积 ≤ 1 为“-”,2~3 为“+”,4~5 为“++”, ≥ 6 为“+++”,以 \geq “++”为过表达,以 \leq “+”为低表达。

1.2.2 Real-time PCR TIANScript RT Kit、2 \times Tag PCR MasterMix、RealMasterMix(SYBR Green)均购自天根生化科技有限公司。采用 TRIzol 提取组织总 RNA,逆转录过程按照试剂说明书进行,引物由 TaKaRa 公司设计,每份样本做 3 个重复。Real-time PCR 的反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,最佳退火温度下 30 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,40 个循环。CXCR4 和 CathepsinD 的最佳退火温度分别为 62 $^{\circ}\text{C}$ 和 64 $^{\circ}\text{C}$ 。用相对定量 PCR 法对标本中目的基因和 β -actin 基因(内参照)的表达进行相对定量分析,样本目的基因相对表达量计算方法:相对表达量=2 $^{-\Delta\text{CT}}$ ($\Delta\text{CT}=\text{CT}_{\text{sample}}-\text{CT}_{\beta\text{-actin}}$),结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 软件进行数据处

理,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 来表示,计数资料用率(%)或中位数表示;Kaplan-Meier 法分析生存时间(Log-Rank 检验);率的比较采用 χ^2 检验,定量资料间的比较采用秩和检验(Mann-Whitney Test);均以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCR4 的表达情况 CXCR4 主要表达于肿瘤细胞膜和胞浆,部分细胞也可表达在胞核(图 1A、1B)。在有转移组肿瘤原发灶中 CXCR4 过表达率为 73.7%,显著高于无转移组($P<0.05$)(表 1)。CXCR4 mRNA 相对表达量在有转移组显著高于无转移组($P<0.05$)(表 2)。

2.2 CathepsinD 的表达情况 CathepsinD 主要表达于肿瘤细胞的胞浆,尤其是部分瘤巨细胞,也可表达在部分间质纤维组织(图 1C、1D)。在有转移组肿瘤原发灶中 CathepsinD 过表达率为 63.2%,显著高于无转移组($P<0.05$)(表 1)。CathepsinD mRNA 相对表达量在有转移组显著高于无转移组($P<0.05$)(表 2)。

表 1 CXCR4 和 CathepsinD 在 MFH 中的蛋白表达情况

Tab 1 The protein expression levels of CXCR4 and CathepsinD in MFH

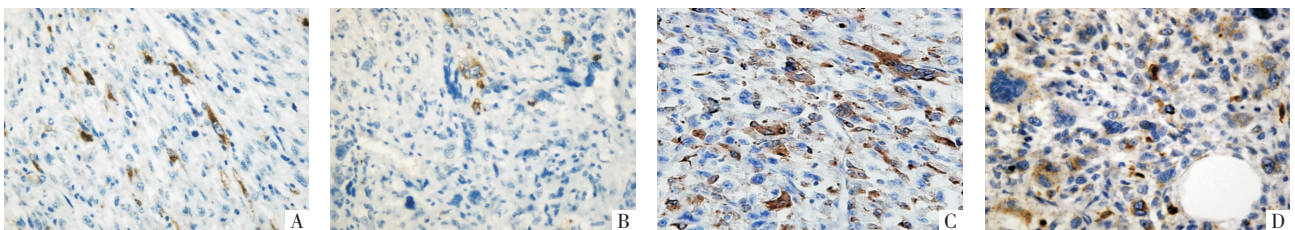
组别	CXCR4		过表达率/ %	P	CathepsinD		过表达率/ %	P
	$\leq +$	$\geq ++$			$\leq +$	$\geq ++$		
有转移	5	14	73.7	<0.05	7	12	63.2	<0.05
无转移	28	8	22.2		26	10	27.8	

表 2 MFH 中 CXCR4 和 CathepsinD 的 mRNA 表达水平

Tab 2 The mRNA expression levels of CXCR4 and CathepsinD in MFH

组别	ΔCt^*		2- ΔCt		χ^2	P
	有转移	无转移	有转移	无转移		
CXCR4	1.52 \pm 0.52	3.47 \pm 1.47	0.28	0.17	-2.10	<0.05
CathepsinD	1.57 \pm 0.74	4.01 \pm 1.04	0.35	0.06	-3.27	<0.05

* ΔCt 服从正态分布,用 $\bar{x}\pm s$ 表示;2- ΔCt 不服从正态分布,用中位数表示, ΔCt 值越大说明 mRNA 表达水平越低



A:有转移组 CXCR4 表达于肿瘤细胞的胞膜和胞浆,部分表达于胞核;B:无转移组偶见 CXCR4 阳性的肿瘤细胞;C:有转移组 CathepsinD 表达于肿瘤细胞胞浆,尤其是某些瘤巨细胞;D:无转移组 CathepsinD 表达水平明显较有转移组弱

图 1 MFH 中 CXCR4 和 CathepsinD 的表达(免疫组化染色, $\times 400$)

Fig 1 The expression of CXCR4 and CathepsinD in MFH(IHC staining, $\times 400$)

2.3 CXCR4 和 CathepsinD 与 MFH 患者生存期的关系 随访时间截止到 2009 年 1 月,55 例 MFH 患者中 52 例获随访,随访率 94.5%,平均生存期为 43 个月,中位生存期为 31 个月。CXCR4 过表达患者的中位生存期为 28 个月,显著低于其低表达者 ($P < 0.05$),CathepsinD 过表达患者的中位生存期低于其低表达者,但差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 3 CXCR4 和 CathepsinD 的表达与 MFH 患者预后的关系

Tab 3 Correlation of CXCR4 and CathepsinD with prognosis in MFH patients

指标	CXCR4		CathepsinD	
	$\geq ++$	$\leq +$	$\geq ++$	$\leq +$
中位生存期/月	28	74	29	60
χ^2	8.66		1.27	
P	< 0.05		> 0.05	

3 讨论

MFH 是一种高侵袭性软组织肉瘤,由于术后易出现局部复发和远处转移,MFH 患者的远期生存率较低。能预测这类低分化肉瘤的转移潜能,从而有效地判断预后对这类肿瘤患者具有重要意义。

近年来研究发现,趋化因子及其受体尤其是 SDF-1 和 CXCR4 在肿瘤定向运动、侵袭、远处器官特异性转移过程中发挥重要作用,肿瘤组织高表达特异的趋化因子受体,同时靶器官高表达其相应的趋化因子配体,肿瘤细胞借助趋化因子与其受体的特异性结合,实现向靶器官的特异性转移^[8-9]。研究证实 CXCR4 在乳腺癌中的高表达与其远处转移,尤其是骨转移密切相关^[10],而在胰腺癌中 CXCR4 是一个与远处转移相关的独立预后标志,可作为评估胰腺癌预后有吸引力的靶点^[11]。由于 MFH 晚期较易发生远处转移,尤其是肺转移,故推测其肿瘤细胞可能存在 CXCR4 的异常表达。本研究采用免疫组化和 Real-time PCR 检测 MFH 原发灶中 CXCR4 的表达,结果表明,CXCR4 在 MFH 原发灶的过表达与 MFH 的远处转移和预后有关,在有远处转移组和生存期较短的病例中 CXCR4 表达明显上调,与上述研究结果一致。

CathepsinD 是 1979 年首先由 Westley 及 Rochefort 等发现的一种糖蛋白,该酶通过其蛋白水解作用使细胞外基质和基底膜降解,在肿瘤微环境的重塑中发挥了重要作用,肿瘤细胞通过自分泌 CathepsinD,使微环境中水解酶表达增多,导致微环境基质降解,便于肿瘤细胞的侵袭和播散^[12]。在实体肿瘤缺氧区域的酸性环境下,CathepsinD 有助于引发蛋白水解级联从而促进癌细胞的入侵和转移^[13]。CathepsinD

的表达在晚期结肠癌主体肿瘤组织中明显上调,并且与后续的远处转移和较短的生存期显著相关^[14]。MFH 是一种浸润性生长的实体肿瘤,缺氧是其重要的生物学特征,推测其生长进展过程中可能有 CathepsinD 的参与。本研究通过免疫组化和 Real-time PCR 检测 MFH 原发灶中 CathepsinD 的表达,结果表明,MFH 原发灶中存在 CathepsinD 的异常表达,过表达 CathepsinD 的肿瘤细胞更易发生远处转移,过表达 CathepsinD 的患者生存期较短,但与低表达患者相比差异无显著性。

综上所述,本研究证实 CXCR4 和 CathepsinD 在 MFH 中的过表达与 MFH 的远处转移有关,CXCR4 的过表达与 MFH 的预后不良有关,这对预测 MFH 的转移潜能及评估预后提供了参考,但其是通过何种机制参与 MFH 转移过程还需深入的实验研究。

参考文献:

- [1] Erlandson R A, Antonescu C R. The rise and fall of malignant fibrous histiocytoma[J]. Ultrastruct Pathol, 2005, 28(5/6): 283
- [2] Randall R L, Albritton K H, Ferney B J, et al. Malignant fibrous histiocytoma of soft tissue: an abandoned diagnosis[J]. Am J Orthop, 2004, 33(12): 602
- [3] Daugaard S. Current soft-tissue sarcoma classifications[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(4): 543
- [4] Lagacé R, Aurias A. Does malignant fibrous histiocytoma exist[J]. Ann Pathol, 2002, 22(1): 29
- [5] Christopher D M, Fletcher K, Krishnan U, et al. World Health Organization Classification of Tumours: pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone[A]. Lyons, France: IARC Press: 2002
- [6] Chen G, Wang Z, Liu X Y, et al. High-level CXCR4 expression correlates with brain-specific metastasis of non-small cell lung cancer[J]. World J Surg, 2011, 35(1): 56
- [7] Dian D, Heublein S, Wiest I, et al. Significance of the tumor protease Cathepsin D for the biology of breast cancer[J]. Histol Histopathol, 2013, [Epub ahead of print]
- [8] Shen X, Artinyan A, Jackson D, et al. Chemokine receptor CXCR4 enhances proliferation in pancreatic cancer cells through AKT and ERK dependent pathways[J]. Pancreas, 2010, 39(1): 81
- [9] Wang Z, Ma Q, Liu Q, et al. Blockade of SDF-1/CXCR4 signalling inhibits pancreatic Cancer progression in vitro via inactivation of canonical Wnt pathway[J]. Br J Cancer, 2008, 99(10): 1695
- [10] Hung C S, Su H Y, Liang H H, et al. High-level expression of CXCR4 in breast cancer is associated with early distant and bone metastases[J]. Tumour Biol, 2014, 35(2): 1581
- [11] Bachet J B, Maréchal R, Demetter P, et al. Contribution of CXCR4 and SMAD4 in predicting disease progression pattern and benefit from adjuvant chemotherapy in resected pancreatic adenocarcinoma[J]. Ann Oncol, 2012, 23(9): 2327
- [12] Benesa P. Vaclav vetvickab and martin fusekc. CathepsinD—many functions of one aspartic protease[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2008, 68(1): 12
- [13] Maynadier M, Farnoud R, Lamy P J, et al. Cathepsin D stimulates the activities of secreted plasminogen activators in the breast cancer acidic environment[J]. Int J Oncol, 2013, 43(5): 1683
- [14] Kirana C, Shi H, Laing E, et al. Cathepsin D expression in colorectal cancer: from proteomic discovery through validation using western blotting, immunohistochemistry, and tissue microarrays[J]. Int J Proteomics, 2012, 2012: 245819

(2014-02-21 收稿)