基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0537-05

SDF-1/CXCR4 与 VEGF-C 在喉癌中的表达及与淋巴结转移的关系

张园园,胡国华,李忠万,左汶奇,付 然,蒋建国
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨趋化因子受体(CXC chemokine receptor4,CXCR4)、血管内皮生长因子-C(Vascular endothelial growth factor C,VEGF-C)、基质细胞衍生因子-1(Stromalcell derived factor-1,SDF-1)在喉鳞状细胞癌及颈淋巴结组织中的表达及其在淋巴结转移过程中的作用和可能机制。方法:应用 RT-PCR 技术及免疫组织化学 SP 法检测 10 例癌旁正常组织、45 例喉癌原发灶中 CXCR4、VEGF-C 和 45 例颈淋巴结组织中 SDF-1 表达的情况。结果:不论在 mRNA 还是蛋白水平,喉癌原发灶均表达较高水平的 CXCR4 与 VEGF-C(78%、67%与 78%、71%),与癌旁正常组织相比,差异有统计学意义;SDF-1 在颈部淋巴结组织中呈高表达,在有癌细胞浸润组的表达率(100%)显著高于无癌细胞浸润组(30%)。喉癌原发灶中 CXCR4 和 VEGF-C 表达呈正相关 ($P<0.05$);CXCR4 和 VEGF-C 的表达与喉癌患者的 TNM 分期,分化高低及有无淋巴结转移有显著相关性($P<0.05$);SDF-1 的表达则仅与患者有无淋巴结转移显著相关($P<0.05$);喉癌原发灶中 CXCR4 与淋巴结组织中 SDF-1 的表达经 pearson 相关分析结果显示,两者的表达水平呈显著负相关($r=-0.330\ 9$,$P=0.016\ 7$)。结论:SDF-1/CXCR4/VEGF-C 在喉癌组织及转移淋巴结中高表达,并与喉癌淋巴转移显著相关,三者在喉癌的器官特异性转移中可能起协同作用,共同促进喉癌的淋巴转移。

【关键词】喉鳞状细胞癌;基质细胞衍生因子-1;CXC 族趋化因子受体 4;血管内皮生长因子 C
【中国图书分类法分类号】R739.65 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

Expression of SDF-1-CXCR4-VEGF-C and the relationship with lymph node metastasis in laryngeal carcinoma

ZHANG Yuan-yuan, et al
(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship of CXCR4, VEGF-C and SDF-1 in human laryngeal carcinoma and discuss the significance of the three indexs in lymph node metastasis. *Methods*: The expression of CXCR4, VEGF-C and SDF-1 was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immuno-histochemical SP in 10 cases of adjacent normal tissue, 45 cases of laryngeal carcinoma tissue and cervical lymph node tissue. *Results*: Not in the mRNA but the level of proteins, The positive rate of the expression of CXCR4 and VEGF-C were 78%, 67% and 78%, 71% in primary tumor cells, were altogether higher than that in adjacent normal tissue ($P<0.05$); The expreession of SDF-1 in metastasis lymph node tissue (100%) was higher than that in nonmetastasis lymph node tissue (30%). There was significant correlation between CXCR4 and VEGF-C expression in the laryngeal carcinoma ($P<0.05$); The expression of CXCR4 and VEGF-C in laryngeal carcinoma was significantly related to clinical TNM stage, tumor cell differentiation and lymph nodes metastasis; The expression of SDF-1 in lymph node showed significant relationship only with the state of lymph nodes metastasis ($P<0.05$); The correlation between the expression of CXCR4 in laryngeal carcinoma and SDF-1 in lymph node had significantly negtive correlation ($r=-0.330\ 9$, $P=0.016\ 7$). *Conclusion*: The overexpression of SDF-1-CXCR4-VEGF-C in laryngeal carcinoma and metastasis lymph nodes had significantly related to lymph nodes metastasis. The co-expression of CXCR4, VEGF-C, SDF-1 may play cooperation role in lymphatic metastasis of laryngeal carcinoma.

【Key words】Laryngeal carcinoma; Stromalcell derived factor-1; CXC chemokine receptor 4; Vascular endothelial growth factor C

作者介绍:张园园(1981-),女,硕士,
研究方向:喉癌淋巴转移的机制研究。
通讯作者:胡国华,男,教授,E-mail:hghcq@sina.com。
基金项目:重庆市卫生局科研基金(07-2-070);重庆市卫生局重点项目(2008-1-16)。

趋化因子受体家族成员 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor4, CXCR4)是趋化因子 CXCL12 即基质细胞衍生因子-1 (Stromalcell derived factor-1, SDF-1)的唯一受体,两者特异性结合可诱

导靶细胞趋化性迁移,与肿瘤器官特异性转移有关,是近年研究热点[1]。有学者提出,血管内皮生长因子C(Vascular endothelial growth factor C,VEGF-C)既可促进淋巴内皮细胞的增生,又可促进淋巴内皮细胞产生趋化因子如 CXCR4,诱导肿瘤细胞向特定的器官转移[2,3]。

本研究应用 RT-PCR 技术和免疫组化方法研究人喉鳞状细胞癌组织 CXCR4、VEGF-C mRNA 及蛋白的表达及其常见转移部位淋巴结组织中 SDF-1mRNA 及蛋白的表达,并分析其与肿瘤颈淋巴结转移的关系,初步探索 CXCR4/SDF-1 在 VEGF-C 介导的肿瘤淋巴转移机制中的作用,为今后进一步筛选肿瘤转移相关标记物,设计预测肿瘤转移潜能的基因芯片或探索干预喉癌淋巴转移的有效措施提供新的理论基础和治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

收集重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科 2006 年 9 月～2008 年 9 月手术切除的喉癌患者的癌组织 45 例,全部病例均经组织病理学检查证实为喉鳞状细胞癌。所有病例均按 AJCC(2002)喉癌分期方案进行分期。其中 $T_1N_0M_0$ 2 例,$T_2N_0M_0$ 4 例,$T_1N_1M_0$ 8 例,$T_2N_1M_0$ 9 例,$T_3N_0M_0$ 3 例,$T_3N_1M_0$ 9 例,$T_4N_0M_0$ 4 例,$T_4N_1M_0$ 6 例,其中所有 T_1、T_2 声门上型 CN_0 期均行预防性颈淋巴结清扫术,所有 T_3、T_4 声门型 CN_0 均行选择性颈淋巴结清扫术,其中Ⅰ期 2 例,Ⅱ期 4 例,Ⅲ期 29 例,Ⅳ期 10 例。声门上型 25 例,声门型 20 例。高分化鳞癌 21 例,中分化鳞癌 9 例,低分化鳞癌 15 例。男 40 例,女 5 例,年龄 36～77 岁(中位年龄 57 岁)。所有患者术前未经任何抗癌治疗。另取 10 例相应正常黏膜组织(取自距喉癌组织边缘 >1 cm,病理活组织检查证实为正常者)为对照。并取相应颈部淋巴结组织 45 例,其中病理证实有癌转移 36 例,无癌转移 9 例。每例标本均于标本离体后 1 h 内采集,分别分为 2 份,一份置入经处理后的速冻管,放入液氮内保存,并快速保存于 -70℃冰箱;另一份组织用 4% 的甲醛固定,常规石蜡包埋备用。

1.2 主要试剂

DEPC、olig-dT、Trizol RNA 提取试剂购自 Promega 公司,RNA 酶抑制剂购自 G 公司,M-MLV 逆转录酶购自 MBI 公司,RT-PCR 试剂盒(大陆 TaKala),DNA 聚合酶购自 Biostar 公司,DNA marker 购自北京鼎国公司,CXCR4 cDNA、VEGF-C cDNA、GAPDH 序列引物由 TaKala 公司合成。兔抗人 SDF-1 多克隆抗体(Ebioscience,catalog number:14-7992)工作浓度为 1:100,兔抗人 VEGF-C 多克隆抗体(Zymed,USA)工作浓度为 1:25,兔抗人 CXCR4 多克隆抗体工作浓度为 1:500(Ebioscience catalog number:14-6009)。SP 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。

1.3 检测方法

1.3.1 用 RT-PCR 法检测 CXCR4、VEGF-C 及 SDF-1 mRNA 的表达 将组织标本从液氮中取出后,迅速放入研钵中,在液氮中研磨为粉末状,采用改良异硫氰酸胍法(Trizol 试剂)一步法提取细胞总 RNA,按试剂说明 CAG 书进行,所提取总 RNA 用分光光度计定量。分别取 2 μg 总 RNA,采用 TaKala 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA,然后以 cDNA 作为模板 PCR 扩增 CXCR4、VEGF-C、SDF-1,同时扩增内参照 GAPDH。扩增引物序列为:CXCR4 引物正义链:5'-CTA TGC AAG GCA GTC CAT GT-3',反义链:5'-CAA TAC GCA GGA TAA GG-3',扩增产物大小为 303 bp;VEGF-C 引物正义链:5'-CTT CTT CTC TGT GGC GTG TTC T-3',反义链:5'-GTC TCT TCT GTC CTT GAG TTG AGG-3',扩增产物大小为 265 bp;SDF-1 引物正义链:5'-AGA GCC AAC GTC AAG CAT CTC-3',反义链:5'-GCT TTC TCC AGG TAC TCC TGA AT-3',扩增产物大小为 237 bp;GAPDH 引物正义链:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',反义链:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CT GTA-3' 扩增产物大小为 450 bp。PCR 总反应体积为 50 μl,PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min,然后进入 94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s,共循环 30 次,最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后取 10 μl PCR 产物,用 2% 琼脂糖凝胶(含 0.2 mg/L EB)电泳后以凝胶成像系统成像及进行扫描定量分析,以所测得吸光度与内参照吸光度的比值代表半定量值。

1.3.2 用免疫组化 SP 法检测 CXCR4 及 VEGF-C 蛋白及 SDF-1 蛋白的表达 所有经常规石蜡包埋的标本,制备 5 μm 厚连续切片,应用 SP 法进行免疫组织化学染色。二甲苯及梯度酒精脱蜡水化,抗原修复,加 30 ml/L 过氧化氢溶液室温 20 min;100 ml/L 山羊血清室温封闭 10 min;加一抗 4℃冰箱中过夜;加二抗室温 30 min;加 SP 复合物 30 min;二氨基联苯胺(DAB 液)显色,苏木素复染脱水、透明、封片,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

除 VEGF-C 只在胞质表达,SDF-1、CXCR4 的阳性细胞均为细胞质或胞膜出现淡黄至棕黄色的着色颗粒,阳性表达判断参照 Mattem 等[4]的计数方法,按染色强度及阳性细胞率来计算评分。染色强度:阴性为 0 分,弱阳性为 1 分,阳性为 2 分,强阳性为 3 分;阳性细胞率:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞率 <25% 为 1 分,阳性细胞率 25%～50% 为 2 分,阳性细胞率 >50% 为 3 分;染色强度及阳性细胞率评分之和即为最后得分,得 3～6 分者评为免疫组化染色阳性,<3 分者为染色阴性。所有切片由两位高级病理医师对免疫组化的染色结果进行评定,如评分相差一个等级以上需共同协商确定。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,统计分析采用卡方检验及 pearson 相关分析,$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CXCR4 在喉癌组织的表达情况

2.1.1 mRNA 表达情况 由表 1 可见，与正常组织相比，喉癌组织中表达较高水平的 CXCR4（$P<0.05$）（图 1），其中在临床资料显示有淋巴结转移的喉癌组织中的表达高于未发生转移的喉癌组织（$P<0.05$），Ⅲ、Ⅳ期患者表达高于Ⅰ、Ⅱ期，中低分化患者表达高于高分化患者（$P<0.5$），这提示了 CXCR4 mRNA 的表达水平与喉癌细胞淋巴结转移的与否及临床分期、分化程度有关。

2.1.2 蛋白表达情况 免疫组化结果显示：在正常组织中，CXCR4 表达较低仅 20%（2/10）。在 45 例喉癌原发灶标本中 CXCR4 呈淡黄色至棕黄色分布于癌细胞的胞膜和胞质（图 4），阳性表达率 67%（35/45），明显高于正常组织 20%（2/10）差异有统计意义（$P<0.05$）。

2.2 SDF-1 在颈淋巴结的表达情况

2.2.1 mRNA 表达情况 45 例淋巴结组织，有 36 例扩增出 GAPDH 基因序列片段及选定的 SDF-1 mRNA 片段（图 2），由表 1 可见其表达与喉癌患者的性别、年龄、组织和分化程度无关（$P>0.05$），而与患者有无颈部淋巴结转移显著相关（$P<0.05$）。

2.2.2 蛋白表达情况 45 例淋巴结标本有 31 例 SDF-1 蛋白表达阳性，与 mRNA 表达相似（$P<0.05$）（图 6、7）。

2.3 喉癌组织中 CXCR4 与颈淋巴结中 SDF-1 表达水平相关性分析

分别对喉癌组织中 CXCR4 与颈淋巴结中 SDF-1 的 mRNA 及蛋白表达水平进行 pearson 相关分析结果显示两者的表达水平呈显著负相关（$r=-0.330\,9$，$P=0.016\,7$）。

2.4 喉癌组织中 CXCR4 与淋巴结组织中 SDF-1 的表达与临床病理特征的关系

由表 1 可看出，喉癌原发灶中 CXCR4 表达水平与患者的年龄、性别、组织学类型、分化程度等无相关性（$P>0.05$），而与 TNM 分期及淋巴结转移有相关性（$P<0.05$）。淋巴结组织中的 SDF-1 表达水平与患者的年龄、性别、组织学类型、TNM 分期、分化程度等无相关性（$P>0.05$），而只与淋巴结转移有相关性（$P<0.05$）。

2.5 VEGF-C 在喉癌组织的表达情况

2.5.1 mRNA 表达情况 由表 1 可见，与正常组织相比，喉癌组织 VEGF-C mRNA 的表达显著高于正常组织（$P<0.05$），其中在临床资料显示有淋巴结转移的喉癌组织中的表达高于未发生转移的喉癌组织（$P<0.05$）。RT-PCR 电泳结果见图 3。

2.5.2 蛋白表达情况 在正常组织中 VEGF-C 仅在少量上皮细胞中表达，阳性率为 30%（3/10）（图 5）。在 45 例喉癌原发灶标本中 VEGF-C 阳性表达 71%（32/45），与正常组织 30%（3/10）相比差异有显著性（$P<0.05$）。

2.6 喉癌组织中 CXCR4 与 VEGF-C 表达水平的相关性

分析喉癌组织中 CXCR4 与 VEGF-C mRNA 及蛋白表达水平的相关性经 pearson 等级相关分析表明：两者之间存在显著相关性（$r=0.886\,4$、$0.901\,4$，$P<0.000\,1$）（表 2）。

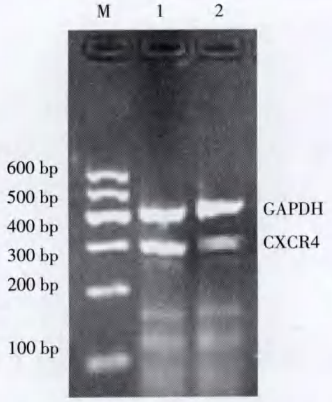


图 1 CXCR4 mRNA 的表达

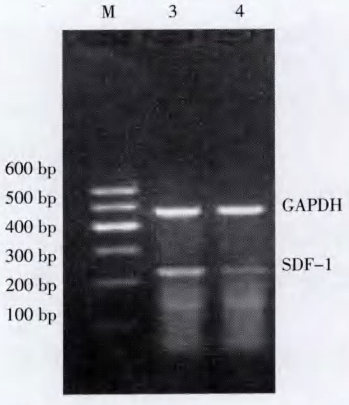


图 2 SDF-1 mRNA 的表达

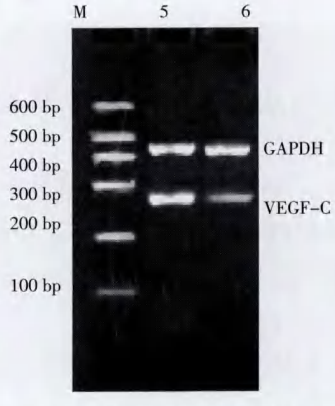


图 3 VEGF-C mRNA 的表达

M. 标志物；1. 喉癌组织；2. 正常组织；3. 喉癌组织；4. 正常组织；5. 癌细胞转移阳性的淋巴结组织；6. 癌细胞转移阴性的淋巴结组织

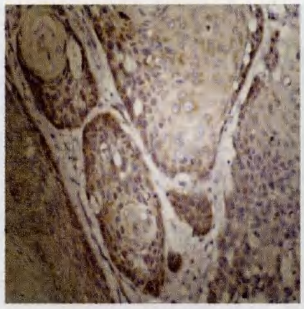


图 4 CXCR4 在喉癌组织中的阳性表达(SP×200)

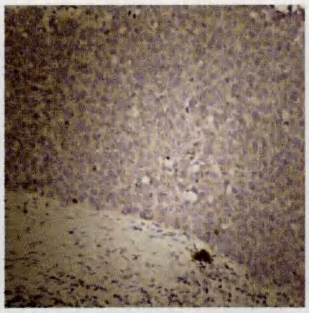


图 5 VEGF-C 在喉癌组织中的阳性表达(SP×200)



图 6 SDF-1 在癌转移阳性的淋巴结组织中的阳性性表达(SP×200)

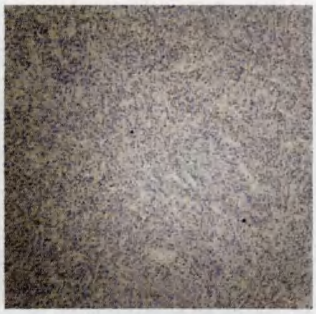


图 7 SDF-1 在癌转移阴性的淋巴结组织中的弱阳表达(SP×200)

表 1 喉癌组织中 CXCR4、VEGF-C 的表达及淋巴结组织中 SDF-1 的表达，及其与临床病理特征的关系

临床病理参数	病例	CXCR4 阳性率		VEGF-C 阳性率		SDF-1 阳性率	
		mRNA(%)	蛋白(%)	mRNA(%)	蛋白(%)	mRNA(%)	蛋白(%)
总例数	45						
年龄							
<60	20	15(75%)	14(70%)	16(80%)	15(75%)	16(80%)	14(70%)
>60	25	18(60%)	16(64%)	19(76%)	17(68%)	20(80%)	17(68%)
组织类型							
正常组织	10	3(30%)	2(20%)	4(40%)	3(30%)		
癌组织	45	33(73..3%)*	30(66.7%)*	35(77.8%)*	32(71.1%)*		
TNM 分期							
Ⅰ+Ⅱ	6	3(50%)	2(44%)	3(50%)	3(50%)	5(83%)	4(67%)
Ⅲ+Ⅳ	39	37(95%)**	7(95%)	39(100%)**	38(97%)*	34(87%)**	33(79%)**
分化程度							
高+中分化	30	16(53%)	16(53%)	18(60%)	17(57%)	21(70%)	20(67%)
低分化	15	15(100%)***	15(100%)***	15(100%)**	13(87%)***	11(73%)	10(67%)
淋巴结转移							
有	36	22(95.7%)****	22(95.7%)****	22(95.7%)****	23(100%)****	23(100%)****	23(100%)****
无	9	11(50%)	8(36.4%)	13(59.1%)	9(40.9%)	13(59.1%)	18(81.8%)
病变部位							
声门上型喉癌	25	18(72%)	17(68%)	18(72%)	17(68%)	20(80%)	17(68%)
声门型喉癌	20	12(75%)	11(65%)	13(85%)	11(65%)	12(75%)	11(65%)

注：与正常组织比较 *P<0.05；与Ⅰ+Ⅱ比较 **P<0.05；与高+中分化比较 ***P<0.05；与阴性比较 ****P<0.05

2.7 喉癌组织中 VEGF-C 的表达与临床病理特征的关系

由表 1 可看出，喉癌原发灶中 VEGF-C 的表达水平与患者的年龄、性别、组织学类型、分化程度等无相关性(P>0.05)，而与 TNM 分期及淋巴结转移有相关性(P<0.05)。

2.8 CXCR4、VEGF-C、SDF-1mRNA 与蛋白表达的相关性分析

分别对喉癌中的 CXCR4、VEGF-C 以及淋巴结中的 SDF-1 的蛋白与 mRNA 的表达应用 pearson 相关分析发现，其蛋白与 mRNA 表达之间均呈显著相关关系(r=0.852 8、0.838 6、0.744 0，P<0.000 1、P<0.000 1、P<0.000 1)，即随着 CXCR4、VEGF-C 及 SDF-1 的 mRNA 表达增加，其蛋白表达也相应增加。

3 讨 论

3.1 SDF-1/CXCR4 的表达与喉癌淋巴结转移的关系

淋巴途径转移在实体肿瘤转移中占有的重要地位日益受到重视，而淋巴转移是喉癌转移的主要途径，是否存在淋巴转移对于喉癌的治疗及预后有重要的指导意义。肿瘤细胞的转移是一个有序、复

表 2 喉癌组织中 CXCR4 与 VEGF-C 表达之间的关系

	CXCR4mRNA		r/P	CXCR4 蛋白		r/P
	+	-		+	-	
VEGF-CmRNA+	33	2	r=0.886 4	30	5	r=0.755 9
-	0	10	P<0.000 1	0	10	P<0.000 1
VEGF-C 蛋白+	32	1	r=0.946 1	30	2	r=0.901 4
-	0	12	P<0.000 1	0	13	P<0.000 1

杂非随机的过程，并有器官选择性，不同组织器官起源的肿瘤有其特定的转移方式和靶器官亲嗜性，这种亲嗜性是靶器官特异性表达的多种趋化因子与肿瘤细胞所表达的相应受体相互作用的结果。研究人员推测，这种介导肿瘤细胞转移的趋化因子与其受体的相互作用可能与调节淋巴细胞归巢和白细胞游出的过程类似。

目前，SDF-1/CXCR4 生物学轴在肿瘤转移中的作用已分别在乳腺癌、非小细胞肺癌和前列腺癌等 23 种不同类型肿瘤的研究中得到初步证实，并与患者的预后密切相关[5]。有研究显示，正常乳腺上皮细胞中 CXCR4 的表达很低或缺乏，而乳腺癌从不典型性导管增生到侵袭性乳癌的发展过程中 CXCR4 的表达水平不断的增加[6]。Yoon 等[7]通过头颈部原位移植鳞状细胞癌小鼠模型发现，有癌转移的 686 个淋巴结中 CXCR4 mRNA 明显高于无癌转移的 686 个淋巴结，认为 CXCR4 可作为高转移潜能的细胞亚群的潜在生物标志物。Muller 等[8]在乳腺癌的研究中发现，淋巴结中的淋巴内皮细胞以及基质细胞能够分泌趋化因子间质细胞分化因子 SDF-1，它能与肿瘤细胞上的 CXCR4 受体相结合，促使肿瘤细胞向淋巴管移动，发生淋巴结的定向转移。以上研究表明肿瘤细胞特异性的转移，与其表达的趋化因子受体以及靶器官所表达的趋化因子密切相关。

本实验结果显示，喉癌原发灶高表达 CXCR4，喉癌常见的转移部位淋巴结高表达 SDF-1，两者密切相关，相互作用促进喉癌淋巴结转移。这与对乳腺癌[8]、结直肠癌[9]的研究发现原发灶高度表达 CXCR4，而其最常见的转移部位如淋巴结、肺、肝脏组织则高表达其配体 SDF-1 这一结果相似。为了进一步探讨 SDF-1/CXCR4 在喉癌组织中高表达的临床意义，本研究分析了 SDF-1/CXCR4 表达与某些临床病理指标的关系，结果显示，CXCR4 的表达与病理类型、分化程度、年龄之间无关，而与 TNM 分期、有无淋巴结转移有关，而 SDF-1 的表达仅与有无淋巴结转移有关。这与孙国华等[10]在下咽癌中的研究结果相似，说明 SDF-1/CXCR4 高表达可能是判断喉癌是否发生淋巴转移的一个重要指标。

3.2 SDF-1/CXCR4 与 VEGF-C 的功能及两者之间的关系

有学者通过动物实验研究发现，VEGF-C 的生物效应一方面可通过其受体 VEGFR-3 的信号转导至淋巴内皮细胞，刺激内皮细胞增殖，新生淋巴管形成；另一方面促使淋巴内皮细胞通过旁分泌或自分泌产生趋化因子和促有丝分裂因子，驱使肿瘤细胞"归巢"至靶器官淋巴结，并增殖分裂，引发淋巴转移[2]。JIANG 等[11]报道，在趋化因子 SDF-1 的作用下，卵巢癌细胞 VEGF-C 的表达上调，并能增强癌细胞侵袭、迁移和转移的能力，这些作用可被抗 CXCR4 单克隆抗体所抑制。体外实验表明 SDF-1/CXCR4 与 VEGF-C 可通过 PI3/Akt 和 MEK/ERK 途径相互调节，SDF-1/CXCR4 可促进 VEGF-C 的表达上调，反过来，VEGF-C 又能促进 SDF-1/CXCR4 的表达增加，从而形成一个正反馈环，加速肿瘤的转移[12,13]。以上研究表明，在 SDF-1/CXCR4 和 VEGF-C/VEGFR3 信号轴之间可能存在着共同的信号通路相互调节，并协同介导肿瘤的淋巴转移。

本文统计分析显示，在基因及蛋白水平均证实人喉癌中 CXCR4 与 VEGF-C 的阳性表达呈显著正相关，而且在淋巴结转移组两者的阳性表达率明显高于无淋巴结转移组。CXCR4 与 VEGF-C 两者间的相关性提示两者间的潜在联系，说明两者可能在喉癌淋巴结转移中起协同作用。对于目前流行的关于肿瘤特异性器官转移的两种学说即："归巢"以及"土壤和种子"学说，本研究可以将此两种学说统一起来认为：由于喉癌细胞"种子"可以分泌 CXCR4 和 VEGF-C，而其特异性转移的淋巴结中具有吸引种子向"土壤"中"归巢"的趋化因子 SDF-1。这样，表达 CXCR4 的喉癌细胞便经由淋巴管被吸引至局部淋巴结，与淋巴内皮细胞和基质细胞分泌的 SDF-1 相结合，并促进淋巴内皮细胞和癌细胞分泌 VEGF-C，而 VEGF-C 又正反馈作用于 CXCR4，形成一个

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)05-0542-05

siRNA 沉默 FAK 基因表达对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学特性的影响

马 杰,王继见,李 洋
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 RNAi 干扰粘着斑激酶(Focal adhesion kinase,FAK)的表达及对人类乳腺癌细胞生物学特性的影响。方法:构建表达 FAK 基因 siRNA 的重组质粒 FAK-siRNA,在脂质体的介导下转染人人乳腺癌 MCF-7 细胞,荧光倒置显微镜下观察转染效率,应用 RT-PCR 和 Western blot 检测 FAK mRNA 和蛋白表达,流式细胞术分析细胞周期分布,体外实验测定肿瘤细胞穿透 matrigel 的能力。结果:成功转染 FAK-siRNA 后乳腺癌 MCF-7 细胞 FAK 基因的表达与阴性对照组、空白质粒转染组相比 FAK mRNA 和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),细胞增殖指数及侵袭力明显降低($P<0.01$)。结论:FAK-siRNA 能有效抑制人乳腺癌细胞 FAK 基因 mRNA 和蛋白的表达,降低细胞增殖能力及侵袭力。

作者介绍:马 杰(1981-),男,硕士,
研究方向:乳腺肿瘤。
通讯作者:王继见,男,教授,E-mail:Wangjj1963@163.com。

更利于喉癌种子增殖和向淋巴转移的"土壤"。从而其迁移性、侵袭性以及增殖能力增强,喉癌细胞向淋巴管定向迁移的渗透能力进一步增强,这样癌细胞更容易通过淋巴管转移至局部淋巴结并定居下来,形成转移灶,提示 CXCR4/VEGF-C 可能作为监测喉癌患者淋巴转移的参考指标。总之,CXCR4、VEGF-C 在喉癌组织中以及 SDF-1 在转移淋巴结组织中的高表达,且与喉癌的淋巴结转移密切相关,说明喉癌细胞中的 CXCR4/SDF-1 与 VEGF-C 在促进喉癌的淋巴结转移方面存在一个或多个共同通路,但其具体的分子机制还不清楚,有待于进一步实验研究。由于肿瘤淋巴结转移是影响喉癌患者预后的独立因素,故 CXCR4-SDF-1-VEGF-C 高表达可能是判断喉癌是否发生转移的一个指标,并预示患者的预后,阻断这一生物学轴可能成为喉癌治疗的一个新途径。

参 考 文 献

[1] Kucia M,Jankowski K,Reca R,et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion[J]. J Mol Histol, 2004, 35(3): 233-245.

[2] He Y,Karpanen T,Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis[J]. Biochimica et Biophysica Ata(BBA)-Reviews on Cancer, 2004, 1654(1): 3-12.

[3] Karpanen T,Makinen T. Regulation of lymphangiogenesis-from cell fate determination to vessel remodeling [J]. Exp Cell Res, 2006, 312(5): 575-583.

[4] Leung D W,Cachianes G,Kuang W J,et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J]. Science, 1989, 246 (4935): 1306-1309.

[5] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14(3): 171-179.

[6] Salvucci O,Bouchard A,Baccarelli A,et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissuemicroarray study[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 97(3): 275-283.

[7] Yoon Y,Liang Z X,Zhang Y,et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models[J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7518-7524.

[8] Muller A,Homey B,Soto H,et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001, 410(6824): 50-56.

[9] Kim J. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome[J]. Annal Surg, 2006, 244(1): 113-120.

[10] 孙国华,朱永学,黄彩平. 趋化因子受体 CXCR4 在下咽鳞癌组织中的表达及其意义[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(6): 420-423.

[11] Jing Y P,Wu X H,Xing H Y,et al. Role of CXCL12 in metastasis of human ovarian cancer[J]. Chin Med J(Engl), 2007, 120(14): 1251-1255.

[12] Ottaiano A. Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stageII-III colorectal cancer atients[J]. linCancer, 2006, 12(9): 2795.

[13] Zagzag D,Esencay M,Mendez O,et al. Hypoxia-and vascular endothelial growth factor-Induced stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 expression in glioblastomas[J]. Am J Pathol, 2008, 173(2): 545-560.

(责任编辑:冉明会)