



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.027
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.027
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(5):749-752.

· 简要论著 ·

乳腺癌中 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 表达及临床意义

赵海宁, 马德寿, 才旦多杰, 刘震, 陈鹏, 刘燕

(青海大学附属医院 乳腺甲状腺外科, 青海 西宁 810001)

摘要

目的: 研究乳腺癌组织中细胞表面黏附分子拼接变异体 -6 (CD44v6) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) mRNA 的表达, 探讨其表达相关性及其与临床病理之间的关系。

方法: 应用 qRT-PCR 检测 60 例乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中 CD44v6 和 CXCR4 mRNA 的表达, 分析两者表达、相关性及其与临床病理学特征的关系。

结果: 乳腺癌组织 CD44v6 和 CXCR4 mRNA 表达水平高于癌旁正常乳腺组织 ($P < 0.05$); CD44v6 和 CXCR4 的 mRNA 阳性表达率分别为 56.67% (34/60) 和 61.67% (37/60), 均明显高于癌旁正常乳腺组织 ($P < 0.01$), 且两者表达具有正相关性 ($r = 0.399$, $P < 0.05$); CD44v6 与 CXCR4 mRNA 表达与乳腺癌的临床 TNM 分期及淋巴结转移有关 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 与患者的年龄、肿瘤大小及病理类型无关 ($P > 0.05$)。

结论: CD44v6 和 CXCR4 与乳腺癌发展和转移密切相关, 可作为乳腺癌的重要分子标志物和治疗靶点, 联合检测两者的 mRNA 表达对乳腺癌的临床诊断及预后判断具有一定的指导意义。

关键词

乳腺肿瘤 / 病理学; CD44v6; CXCR4

中图分类号: R737.9

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 随着经济发展和生活水平的提高, 乳腺癌的发病率正逐年上升, 据统计全球每年新发病例约 130 余万, 死亡病例则高达 40 余万, 已成为严重威胁女性的健康问题^[1]。虽然目前众多学者对于乳腺癌有大量研究, 但乳腺癌早期诊断、治疗及对乳腺癌的特异性表达预测方面仍存在许多不足之处, 因此寻找可以合理预测及治疗乳腺癌生物学靶点具有重要的临床意义。本研究采用 qRT-PCR 检测 60 例乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中细胞表面黏附分子拼接变异体 -6 (CD44v6) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) 的表达, 旨在分析两者表达相关性及其与临床病理学特征的关系, 为乳腺癌的诊断治疗探寻合理生物学靶点。

1 材料与方法

1.1 收集标本及临床资料

2012 年 12 月—2014 年 12 月间青海大学附属医院行乳腺癌根治术的女性乳腺癌患者 60 例的癌组织及癌旁正常组织新鲜标本, 所有患者术前均未行放化疗、内分泌治疗及其他针对肿瘤的特殊治疗, 且患者的临床资料完整, 术后标本 HE 切片后经 2 名高年资病理医师双盲法确诊为乳腺癌及癌旁正常组织。患者均为女性, 年龄 23~61 岁, 平均年龄 41.6 岁, 其中 ≤ 35 岁者 17 例, > 35 岁者 43 例; 肿块直径 > 2 cm 者 41 例, 其中在 2~5 cm 之间者有 29 例, > 5 cm 者有 12 例, ≤ 2 cm 者 19 例; 浸润性导管癌 48 例, 导管内癌 12 例; 按 WHO (2012) 乳腺癌标准对乳腺癌进行分期: I 期 5 例, II 期 26 例, III 期 29 例; 伴有腋窝淋巴结转移者 39 例、无腋窝淋巴结转移者 21 例。

1.2 试剂和仪器

TRIzol Reagent、SYBR Premix Ex Taq™ II 及 cDNA 逆转录试剂盒购于 Takara 公司, 无水乙醇、三氯甲烷及异丙醇购于川东化工公

收稿日期: 2014-02-21; 修订日期: 2015-04-21。

作者简介: 赵海宁, 青海大学附属医院副主任医师, 主要从事乳腺甲状腺肿瘤外科方面的研究。

通信作者: 赵海宁, Email: zhn0413@163.com

司, 超速冷冻离心机为德国 HEMNLE 公司生产, 多功能酶标仪及荧光定量 PCR 仪为美国 BIO-RAD 公司生产。引物序列由上海生工合成, 序列分别为: CD44v6 (上游引物 5'-TCTACAACCTGGACAGACAAC-3'; 下游引物 5'-CTTGCTGTAGTTTCGCAAT-3'), CXCR4 (上游引物 5'-AGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGAT-3'; 下游引物 5'-AGGATGGGGATGATTGTGGTCTTGA-3')。β-actin 为内参, 引物序列为 (上游引物: 5'-AAGAGAGGCArCCTCACCCT-3' 下游引物 5'-GGAAGGAAGGCTGGAAG-3')。

1.3 方法

1.3.1 组织总 RNA 的提取 用液氮冷冻组织标本, 低温下用研钵研碎, 约 50 mg 标本组织加入 1 mL Trizol 匀浆后移入 1.5 mL EP 管中, 室温静置 5 min, 每毫升 Trizol 加入 0.2 mL 氯仿, 震荡后室温静置 5 min, 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min。取上层液体, 每毫升加入 0.5 mL 异丙醇震荡混匀, 冰上静置 10 min 后 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min 后弃上清, 管底见 RNA 沉淀后加入 75% 乙醇震荡混匀, 12 500 r/min, 4 °C 离心 5 min, 弃上清, 待 RNA 略干燥后加入适量 DEPC 水溶解。RNA 纯度用紫外分光光度计测定, 测定 OD260nm/OD280nm 比值在 1.8~2.0 之间的样品为符合要求。

1.3.2 cDNA 的合成 按照 Takara 试剂盒操作步骤将测定符合要求 RNA 逆转录成 cDNA, 总反应体积为 20 μL, 其中包括总 RNA 1 μg, 逆转录条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, cDNA 产物 -20 °C 保存备用。

1.3.3 PCR 反应 按照 TAKARA 公司 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒操作进行, 总反应体积为 20 μL, 包括 SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μL、上游引物 0.8 μL、下游引物 0.8 μL、cDNA 2 μL、dH₂O 6.4 μL。扩增参数为: 95 °C, 30 s 预变性 1 次; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。所有实验均重复 3 次, 以 β-actin 为内参对照, 用 $2^{-(\Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{control}})}$ 方法确定目的基因表达相对水平。癌组织 CD44v6/β-actin、CXCR4/β-actin 比值高于癌旁正常组织为阳性; 癌组织 CD44v6/β-actin、CXCR4/β-actin 比值等于或低于癌旁正常组织为阴性。

1.4 统计学处理

所有数据使用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 计量资料结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组以上数据比较用单因素方差分析 (ANOVA), 两组数据间比较

用配对样本 *t* 检验, 率的比较用 χ^2 检验, 相关性分析用 Spearman 秩相关分析法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 在乳腺癌组织中表达水平

采用 qRT-PCR 检测 60 例乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织中 CD44v6 和 CXCR4 的 mRNA 相对表达水平, 结果显示: 乳腺癌组织 CD44v6 和 CXCR4 mRNA 表达水平比癌旁正常乳腺组织分别高约 3.5 倍、4 倍, 差异有统计学意义 (P < 0.05) (图 1)。

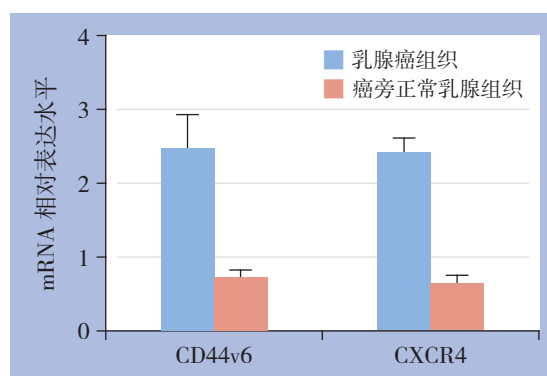


图 1 乳腺癌组织 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 表达水平

2.2 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 在乳腺癌组织中表达的相关性

以 β-actin 为内参对照, qRT-PCR 结果显示 60 例乳腺癌组织 CD44v6 和 CXCR4 的 mRNA 阳性表达率分别为 56.67% (34/60) 和 61.67% (37/60), 均明显高于癌旁正常乳腺组织 (P < 0.01) (表 1) (图 2)。对 CD44v6 和 CXCR4 的 mRNA 阳性表达率作 Spearman 秩相关分析, 结果提示 CD44v6 与 CXCR4 表达正相关 ($r=0.399$, P < 0.05) (表 2)。

2.3 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 在乳腺癌组织中表达与临床病理的关系

为了进一步研究 CD44v6 与 CXCR4 在乳腺癌发生发展中的作用, 对 60 例患者 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 表达与临床病理学特征的关系进行分析, 结果表明 CD44v6 与 CXCR4 mRNA 表达与乳腺癌的临床 TNM 分期及淋巴结转移有关, 分期越晚, CD44v6 与 CXCR4 mRNA 阳性表达率越高

($P < 0.01$) ; 伴淋巴结转移的乳腺癌组织CD44v6与CXCR4 mRNA阳性表达率明显高于无淋巴结转移

者($P < 0.05$)。两者mRNA阳性表达与患者的年龄、肿瘤大小及病理类型无关($P > 0.05$) (表3)。

表1 CD44v6和CXCR4在乳腺癌组织及正常乳腺组织中的表达

组织类型	CD44v6 表达		χ^2	P	r	CXCR4 表达		χ^2	P	r
	阳性数	阳性率 (%)				阳性数	阳性率 (%)			
癌组织	34	56.67	26.49	0.000	0.399	37	61.67%	27.88	0.000	0.399
正常组织	12	20.00				8	13.33%			

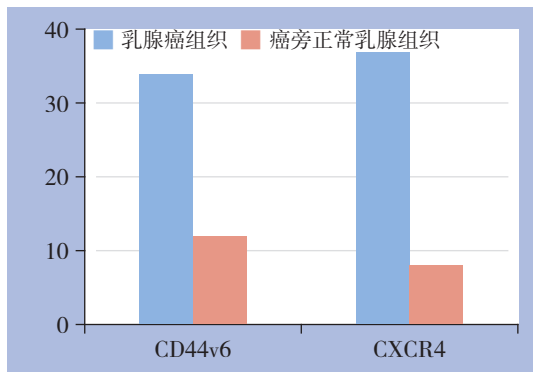


图2 CD44-v6和CXCR4在乳腺癌组织及正常乳腺组织中的表达

表2 乳腺癌组织CD44v6与CXCR4 mRNA表达的相关性分析

CXCR4 表达	CD44v6 表达		相关系数	P
	阳性 (n=34)	阴性 (n=26)		
阳性 (n=37)	25	12	0.279	0.037
阴性 (n=23)	9	14		

表3 乳腺癌组织CD44v6与CXCR4 mRNA表达与临床病理的关系 [n (%)]

临床病理	n	CD44v6 表达	χ^2	P	CXCR4 表达	χ^2	P
年龄 (岁)							
≤ 35	17	9 (52.94)	0.134	0.714	11 (64.71)	0.093	0.761
> 35	43	25 (58.14)			26 (60.47)		
肿瘤直径 (cm)							
≤ 2	19	10 (52.63)	0.184	0.668	12 (63.16)	0.026	0.872
2~5	36	20 (55.56)			21 (58.3)		
> 5	5	3 (60.0)			2 (40.0)		
病理类型							
浸润型导管癌	48	28 (58.33)	0.026	0.872	31 (64.58)	0.357	0.550
导管内癌	12	6 (50.0)			6 (50.0)		
TNM分期							
I期	5	1 (20.0)	21.738	0.000	2 (40.0)	11.063	0.004
II期	26	8 (30.77)			11 (42.31)		
III期	29	25 (86.21)			24 (82.76)		
淋巴结转移							
有	39	26 (66.67)	4.538	0.033	28 (71.79)	4.835	0.028
无	21	8 (38.10)			9 (42.86)		

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 占女性全部恶性肿瘤发病率的23%, 全世界每年有超过400 000人死于乳腺癌^[1]。近年来, 我国乳腺癌的发病率逐年快速增长, 黄哲宙等^[2]发现中国女性乳腺癌已经成为中国女性常见的癌症之一, 其发病率位居所有女性癌症的第1位, 病死率位居第6位。由于乳腺癌早期临床症状不典型, 许多患者以发现乳房无痛性肿块者为首诊原因, 有相关临床资料^[3]表明在临床确诊时大约10%患者已发生转移。因此寻找可以合理预测乳腺癌发生发展浸润转移等生物学行为的标记物, 对于乳腺癌的早期诊断和合理治疗具有很重要的临床意义。CD44 (细胞表面黏附分子拼接变异体-6) 是一种细胞表面的跨膜糖蛋白, 介导细胞间或细胞与基质间黏附和结合的一类分子, 在恶性肿瘤组织中主要表达于肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞的黏附和运动^[4-5]。CD44基因外显子按表达方式不同分为两种: 组成型外显子, 共10个, 转录片段存在与所有CD44转录子中, 称之为标准型CD44(CD44s); V区变性拼接外显子, 也有10个, 含该外显子的CD44转录子统称为CD44拼接变异体(CD44v)^[6]。CD44v6作为CD44v中的一种, 在肺癌^[7]、胰腺癌^[8]、胃癌^[9]、结肠癌^[10]、卵巢癌^[11]、乳腺癌^[12]等多种肿瘤中高表达, 与肿瘤生发、侵袭和转移密切相关^[13]。趋化因子受体4 (CXCR4) 是一个编码352个氨基酸且高度保守的G蛋白偶联七次跨膜受体, 是趋化因子基质细胞衍生因子-1 (CXCL12) 的专属受体。国内外研究发现, CXCL12/CXCR4与多种实体瘤的生长、侵袭和转移相关, 在胃癌^[14]、结肠癌^[15]、胰腺癌^[15]、前列腺癌^[17]、乳腺癌^[18]等多种肿瘤高表达, 与多种恶性实体瘤的演进密切相关。

据文献^[19-20]报道在胰腺癌及肝癌细胞中CD44v6与CXCR4有相关协同作用, 与肿瘤发生、

侵袭和转移密切相关^[19-20]。国内有关CD44v6与CXCR4在乳腺癌组织联合检测尚无相关性研究。本研究通过PCR实验方法检测CXCR4和CD44v6在乳腺癌组织中的表达,发现乳腺癌组织CD44v6和CXCR4 mRNA表达水平明显高于癌旁正常乳腺组织,且两者表达具有相关性,提示两者在肿瘤发生发展中可能有相互协同作用。对CD44v6与CXCR4 mRNA表达与临床病理学特征的关系进行分析,结果表明亦CD44v6与CXCR4 mRNA表达与乳腺癌的临床 TNM 分期及淋巴结转移有关,分期越晚,CD44v6与CXCR4 mRNA阳性表达率越高,伴淋巴结转移的乳腺癌组织CD44v6与CXCR4 mRNA阳性表达率明显高于无淋巴结转移者,进一步证实了两者在乳腺癌发生、发展、侵袭和转移中具有重要作用。

综上所述,CD44v6和CXCR4与乳腺癌发生、发展、侵袭和转移密切相关,可作为乳腺癌的重要分子标志物和治疗靶点,联合检测两者的表达对乳腺癌的诊断及预后判断具有一定的指导意义。笔者推测两者在细胞分子学水平可能存在相互协同作用,下一步将在细胞及分子水平进一步研究两者的相互作用及其对乳腺癌生物学行为的影响,为乳腺癌的诊断及治疗寻找新的思路与理论基础。

参考文献

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics,2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74-108.
- 黄哲宙,陈万青,吴春晓,等.中国女性乳腺癌的发病和死亡现状——全国32个肿瘤登记点2003—2007年资料分析报告[J].肿瘤,2012,32(6):435-439.
- Tao Z, Shi A, Lu C, et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, [Epub ahead of print]
- Nandy SB, Gangwani L, Nahleh Z, et al. Recurrence and metastasis of breast cancer is influenced by ovarian hormone's effect on breast cancer stem cells [J]. Future Oncol, 2015, 11(6): 983-995.
- Basakran NS. CD44 as a potential diagnostic tumor marker[J]. Saudi Med J, 2015, 36(3):273-279.
- Wang W, Dong LP, Zhang N, et al. Role of cancer stem cell marker CD44 in gastric cancer: a meta-analysis[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12):5059-5066.
- Yu P, Zhou L, Ke W, et al. Clinical significance of pAKT and CD44v6 overexpression with breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(8):1283-1292.
- Jiang H, Zhao W, Shao W. Prognostic value of CD44 and CD44v6 expression in patients with non-small cell lung cancer: meta-analysis[J]. Tumour Biol, 2014, 35(8):7383-7389.
- Wang H, Rana S, Giese N, et al. Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells [J]. Int J Cancer, 2013, 133(2):416-426.
- Xie JW, Chen PC, Zheng CH, et al. Evaluation of the prognostic value and functional roles of CD44v6 in gastric cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, [Epub ahead of print]
- Zhao LH, Lin QL, Wei J, et al. CD44v6 expression in patients with stage II or stage III sporadic colorectal cancer is superior to CD44 expression for predicting progression[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1):692-701.
- Wang J, Xiao L, Luo CH, et al. CD44v6 promotes beta-catenin and TGF-beta expression, inducing aggression in ovarian cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5):3505-3510.
- Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion [J]. Exp Mol Pathol, 2009, 86(2):95-100.
- Wu XJ, Li XD, Zhang H, et al. Clinical significance of CD44s, CD44v3 and CD44v6 in breast cancer [J]. J Int Med Res, 2015, 43(2):173-179.
- Masuda T, Nakashima Y, Ando K, et al. Nuclear expression of chemokine receptor CXCR4 indicates poorer prognosis in gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2014, 34(11):6397-6403.
- Liu X, Zhu L, Lu X, et al. IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(3):486-492.
- Xu Q, Wang Z, Chen X, et al. Stromal-derived factor-1alpha/CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway promotes perineural invasion in pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2014, 6(7):4717-4732.
- Sakao K, Vyas AR, Chinni SR, et al. CXCR4 Is a Novel Target of Cancer Chemopreventative Isothiocyanates in Prostate Cancer Cells[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2015, 8(5):365-374.
- Zhan Y, Zhang H, Li J, et al. A novel biphenyl urea derivate inhibits the invasion of breast cancer through the modulation of CXCR4[J]. J Cell Mol Med, 2015, [Epub ahead of print]
- Zhang R, Pan X, Huang Z, et al. Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e23831.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 赵海宁, 马德寿, 才旦多杰, 等. 乳腺癌中CD44v6与CXCR4 mRNA表达及临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(5):749-752. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.027

Cite this article as: ZHAO HN, MA DS, CAI DDJ, et al. The mRNA expressions of CD44v6 and CXCR4 in breast cancer and their clinical significance[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(5):749-752. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.05.027