

文章编号:1005-6947(2008)08-0785-04

· 基础研究 ·

RANTES 及其受体在胃癌中的表达及其意义探讨

曹志新, 徐向上, 王静, 李小兰, 陶德定, 龚建平

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胃肠外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨 RANTES 及其受体 (CCR5) 在胃癌和转移淋巴结组织中的表达及其与胃癌转移的关系。方法 采用流式细胞仪 CCR5/DNA 和 RANTES/DNA 双参数法检测 CCR5 在胃癌以及 RANTES 在有癌组织转移的淋巴结中的表达情况。结果 胃癌组织中 CCR5 的表达率 $[(21.53 \pm 3.10)\%]$ 明显高于癌旁组织 $[(10.10 \pm 1.30)\%]$ ($P < 0.05$)。有肿瘤转移的淋巴结组织中 RANTES 的表达 $[(63.50 \pm 5.25)\%]$ 明显高于正常淋巴结组织 $[(44.40 \pm 4.76)\%]$ ($P < 0.05$)。结论 趋化因子 RANTES 及其受体可能参与了胃癌转移的调控。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 785-788]

关键词: 胃肿瘤; RANTES; 肿瘤转移

中图分类号: R 735.2 文献标识码: A

Expression and significance of RANTES and its receptor in gastric cancer metastasis

CAO Zhixin, XU Xiangshang, WANG Jing, LI Xiaolan, TAO Deding, GONG Jianping

(Department of Gastrointestinal Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To study the relation of RANTES and its receptor (CCR5) expression in gastric cancer and in lymph nodes with cancer metastasis. **Methods** The expression of CCR5 in gastric cancer and the expression of RANTES in lymph nodes were detected by the CCR5/DNA bivariate and RANTES/DNA bivariate by flow cytometry. **Results** The expression of CCR5 in gastric cancer and normal gastric tissue was $(21.53 \pm 3.10)\%$ and $(10.10 \pm 1.30)\%$ respectively ($P < 0.05$); the positive rate of RANTES in lymph nodes with or without cancer metastasis was $(63.50 \pm 5.25)\%$ and $(44.40 \pm 4.76)\%$ respectively ($P < 0.05$). **Conclusions** RANTES and its receptor might take part in modulation of gastric cancer metastasis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8): 785-788]

Key words: Stomach Neoplasms; RANTES; Neoplasm Metastasis

CLC number: R 735.2

Document code: A

基金项目:湖北省自然科学基金(2006ABA098)。

收稿日期:2008-06-15; 修订日期:2008-07-10。

作者简介:曹志新,男,华中科技大学同济医学院附属同济医院副教授,主要从事胃肠肿瘤方面的研究。

通讯作者:曹志新 E-mail:zxcao@tjh.tjmu.edu.cn

胃癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤,发病率高,且容易发生转移,探讨胃癌的转移机制对于预防和治疗肿瘤的转移有重要意义。调节活化正常T细胞的表达与分泌因子(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, RANTES)属于趋化因子CC家族成员,近年发现趋化因子在肿瘤中参与了病理性淋巴结的形成以及肿瘤细胞的移动、归巢和转移的调控过程^[1],本研究通过流式细胞仪CCR5/DNA和RANTES/DNA双参数法检测CCR5(RANTES的受体)在胃癌以及RANTES在有癌组织转移的淋巴结中的表达情况,以探讨RANTES与胃癌转移可能存在的关系。

1 材料与方法

1.1 标本分组及一般资料

(1)胃癌组织组:30例。取自华中科技大学同济医学院附属同济医院胃肠外科手术切除组织。30例胃癌患者中男19例,女11例;年龄为21~68(48.5 ± 11.8)岁。腺癌27例,管状腺癌1例,黏液腺癌2例;有淋巴结转移20例,无淋巴结转移10例;临床分期I期2例,II期8例,III期11例,IV期9例。(2)旁组织组:30例。取自距癌组织3~5cm的胃组织,经病理证实均无癌组织。(3)有肿瘤转移的淋巴结组:20例。(4)无肿瘤转移的淋巴结组:10例。淋巴结均取自上述病例,均切取一半实验,另一半送检病理证实是否有肿瘤转移。全部手术患者术前均未进行化疗、放疗以及其他抗肿瘤治疗,取材均在手术中进行。

1.2 方法

1.2.1 单细胞悬液分离 手术台上切取新鲜胃癌及癌旁组织1.0cm×1.0cm大小(黏膜至浆膜全层),立即进行单细胞分离。组织块置于冷磷酸盐缓冲液(PBS)中,剪除附着组织,PBS冲洗去血液。组织放入10mL小烧杯中,眼科剪剪碎,滤网过滤,组织碎末置于覆有200目尼龙网的30mL烧杯上,边搓边用PBS滴冲;细胞悬液经滤网过滤入试管中,1200r/min离心5min,PBS洗涤2次,调整细胞数为 2×10^6 /mL。

1.2.2 CCR5/DNA双参数法分析 CCR5在胃癌组织中的表达 细胞收获后,用80%冷乙醇固定,于-20℃冰箱过夜。固定细胞用PBS洗涤2次,2.5g/L Triton X-100在冰上处理,以PBS

洗涤2次,加入用10g/L BSA稀释的兔抗人CCR5多克隆抗体(Cell Signaling公司,在100μL体积中,每 5×10^5 细胞与0.25μg抗体反应),在4℃孵育过夜。次日细胞用PBS洗涤,加入标有FITC羊抗兔IgG抗体(Sigma公司)(用10g/L BSA以1:40的比例稀释),在室温下孵育30min。再次洗涤细胞后,用10mg/L碘化丙啶PI(Sigma公司)和1.0g/L Rnase A(Sigma公司),室温染色20min。抗体特异性同质对照采用同质特异性抗体,兔抗人IgG多克隆抗体(Sigma公司)。

1.2.3 RANTES/DNA双参数法分析 RANTES在淋巴结组织中的表达 方法同上,一抗为兔抗人RANTES多克隆抗体(Cell Signaling公司),FITC羊抗兔IgG抗体为Sigma公司产品。

1.2.4 流式细胞术分析 经上述处理的细胞荧光标记成功后,应用FACSsort流式细胞仪(Becton Dickson,美国)检测。经488nm激光激发,被标记细胞发射的红色(PI)和绿色(FITC)荧光同时、分别被FACSsort流式细胞仪的标准透镜接收。应用Cellquest软件(Becton Dickson,美国),对上述所测细胞的双参数荧光强度、任一细胞群体的平均荧光强度进行分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件对CCR5在胃癌和正常胃组织以及RANTES在有癌转移淋巴结和无癌转移淋巴结的表达阳性率分别进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 胃癌及癌旁组织中CCR5的表达

胃癌组织中CCR5的平均表达率为(21.53 ± 3.10)%,癌旁组织中的表达率为(10.10 ± 1.30)%。胃癌组织中CCR5的表达率高于癌旁组织,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图1)。

2.2 淋巴结组织中RANTES的表达

有肿瘤转移的淋巴结中RANTES的表达率为(63.50 ± 5.25)%,无转移淋巴结中RANTES的表达率为(44.40 ± 4.76)%。有肿瘤转移的淋巴结组织中RANTES的表达较无转移淋巴结组织高,两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图2)。

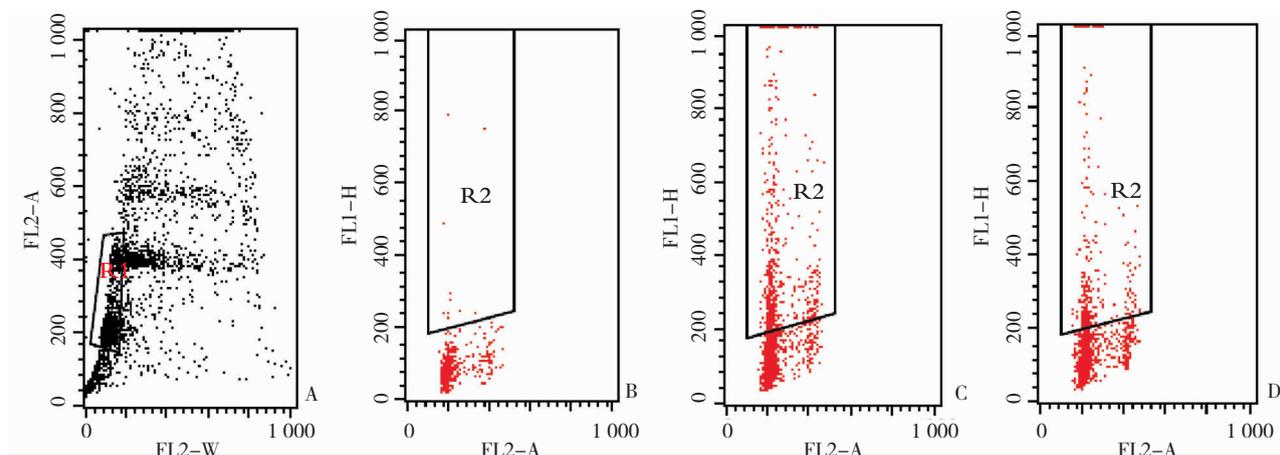


图1 CCR5在胃癌中表达的流式细胞仪双参数定量分析 A为细胞核染色的散点图,R1区域代表进行双参数分析的细胞,B,C,D为双参数分析散点图。横轴为细胞核染色质含量,纵轴为表达的标记荧光强度。R2区域代表表达阳性的细胞。B为对照,C,D分别为胃癌组织和正常胃组织,C,D图中两样本表达阳性率分别为23.36%和11.08%。

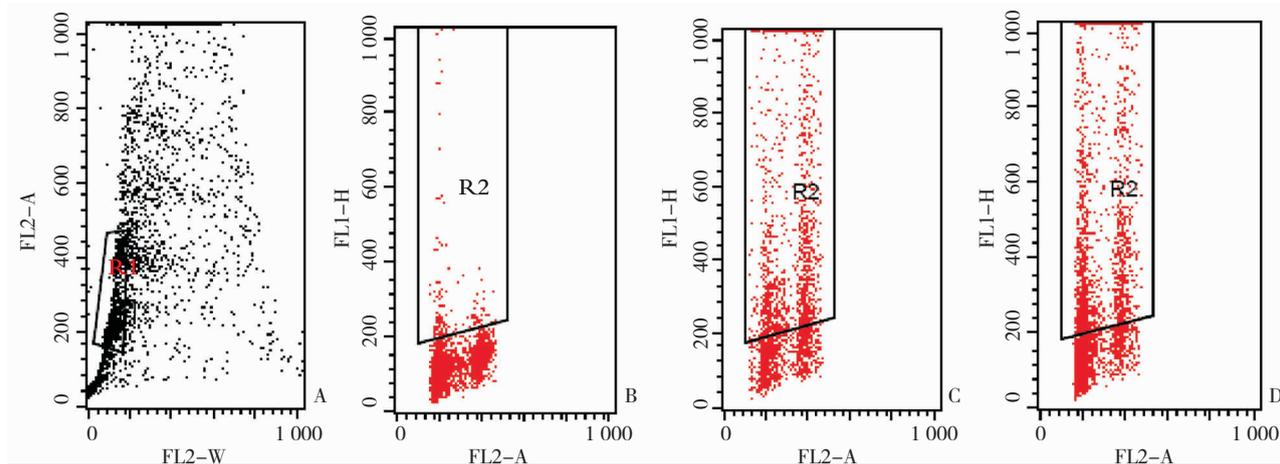


图2 RANTES在淋巴结中表达的流式细胞仪双参数定量分析 A为细胞核染色的散点图,R1区域代表进行双参数分析的细胞,B,C,D为双参数分析散点图。横轴为细胞核染色质含量,纵轴为RANTES表达的标记荧光强度。R2区域代表RANTES表达阳性的细胞。B为对照,C,D分别为正常淋巴结组织和有癌组织转移的淋巴结组织,C,D图中两样本RANTES表达阳性率分别为46.23%和60.36%。

3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康,虽然肿瘤的治疗取得了可喜的进展,但是肿瘤容易转移的特性是肿瘤治疗方面的一大障碍,胃癌属于发病率较高的肿瘤,死亡率位居恶性肿瘤第二位,而转移的防治是胃癌治疗的难题^[2]。

研究发现,很多趋化因子可能参与了生理性、病理性淋巴管的形成和调节,并参与了肿瘤细胞的移动、归巢和转移的控制^[1]。研究显示,淋巴

管的内皮细胞通过分泌趋化因子趋化肿瘤细胞,进而促进肿瘤细胞的淋巴转移^[3]。在肿瘤细胞定向转移的过程中,趋化因子通过与肿瘤细胞表面的受体作用,能诱导肿瘤细胞的细胞骨架重排,促使肿瘤细胞和淋巴管内皮细胞的紧密黏附结合,最终实现定向迁移^[3]。研究表明,人类乳腺癌细胞高表达CXCR4和CCR7,而正常乳腺上皮细胞不表达,它们的配体在局部淋巴结、骨髓、肺和肝中表达水平极高,所以上述部位是乳腺癌转移的好发部位^[4]。研究表明,胃癌组织中趋化因

子 IL-8 的高表达可能与胃癌中血管的形成具有一定的关系,进而影响胃癌的生长与转移^[5]。RANTES 属 CC 家族成员,主要受体为 CCR5,具有强烈调节多种免疫细胞功能,介导淋巴细胞迁徙和归巢^[6]。研究发现,乳腺癌、淋巴瘤中高表达 RANTES 及其受体,且肿瘤组织中浸润了大量的单核细胞,高表达 RANTES 及其受体的肿瘤易发生转移^[7];前列腺癌细胞亦高表达 RANTES,且与其侵袭性有关,用抗 CCR5 抗体可阻断其侵袭性^[8],Nouh 等^[9]认为 RANTES 可作为乳腺癌预后的标志。本研究通过流式细胞仪双参数定量法检测了 RANTES 在淋巴结组织中的表达以及其受体 CCR5 在胃癌组织中的表达,结果显示胃癌组织中 CCR5 的表达阳性率明显高于癌旁组织,而在有胃癌转移的淋巴结组织中 RANTES 的表达也较无癌转移的淋巴结组织高,据此推测,高表达 RANTES 的淋巴结组织对于表达 RANTES 受体 CCR5 的胃癌细胞具有定向趋化作用,RANTES-CCR5 所组成的系统可能参与了胃癌的定向转移。笔者通过体外趋化试验研究发现,转移淋巴结组织蛋白提取物对肿瘤细胞有趋化作用,而加入 RANTES 抗体后可抑制淋巴结对肿瘤细胞的定向迁移,提示该肿瘤细胞趋化作用可能与 RANTES 及其受体有关^[10]。同时还发现 RANTES 高表达肿瘤组织中 Th1 类细胞因子(IL-2, γ -IFN)向 Th2 细胞类细胞因子(IL-10)漂移,呈现 Th2 类细胞因子强势表达状态,肿瘤局部呈免疫抑制状态,有利于肿瘤细胞免疫逃逸。由此可见,RANTES 及其受体 CCR5 一方面通过改变肿瘤局部免疫状态,诱导肿瘤细胞免疫逃逸,另一方面通过趋化作用直接诱导肿瘤细胞定向移动,进而促进肿瘤细胞的淋巴转移。

总之,RANTES 及其受体 CCR5 与胃癌的转移具有相关性,可能参与了胃癌转移过程,但其确切机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. [J] N Engl JMed, 2001, 345(11): 833 - 835.
- [2] 王竟,王金万. 胃癌治疗进展[J]. 癌症进展杂志, 2004, 2(2): 88 - 93.
- [3] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. [J]. Nature, 1998, 392(6676): 565 - 568.
- [4] Muller A, Homey B, Soto H, *et al*. Involvement of chemokine receptor in breast cancer metastasis. [J] Nature 2001, 410(6824): 50 - 56.
- [5] 贾忠,沈伟敏,封光华,等. 趋化因子 IL-8 与胃癌组织血管再生的相关性实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(1): 39 - 43.
- [6] Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. [J]. N Engl JMed, 2001, 345(11): 833 - 835.
- [7] Mori N, Krensky Ann, Ohshima K, *et al*. Elevated expression of CCL5/RANTES in adult T cell leukemia cell: possible transactivation of the CCL5 gene by human T cell leukemia virus type I tax [J]. Int J Cancer, 2004, 111(4): 548 - 551.
- [8] Vaday GG, Peehl DM, Kadam PH, *et al*. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer [J]. Prostate, 2006, 66(2): 124 - 134.
- [9] Nouh MA, Eissa SA, Zaki SA, *et al*. Important of serum IL18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2005, 17(1): 51 - 55.
- [10] 徐向上,罗学来,曹志新,等. RANTES-受体轴在消化道肿瘤及淋巴结中的表达与肿瘤转移关系的探讨[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(6): 761 - 763.