

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.013

## CD40 和 CXCR4 在人宫颈癌组织中的表达及其与肌层浸润的相关性

徐健<sup>1</sup>, 瞿秋霞<sup>2</sup>, 黄沁<sup>2,3</sup>, 朱一蓓<sup>1</sup>, 张学光<sup>1,2</sup> (1. 苏州大学 生物技术研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 苏州大学 附属第一医院 临床免疫研究所, 江苏 苏州, 215006; 3. 苏州大学 附属第一医院 妇产科, 江苏 苏州 215006)

**[摘要]** **目的:**检测 CXC 趋化因子受体 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) 和 CD40 在人宫颈癌组织中的表达, 并探讨两者表达水平和宫颈癌肌层浸润程度的相关性。**方法:**53 例宫颈癌患者收集自苏州大学附属第一医院妇产科(2009 年至 2011 年), 年龄 29~53 岁, 中位年龄 41 岁。免疫组织化学法检测 53 例宫颈癌组织中 CXCR4 和 CD40 的表达, 分析两者表达水平和宫颈癌肌层浸润程度的相关性。**结果:**CD40 和 CXCR4 在宫颈癌组织中有着不同程度的表达, 两者间的表达水平呈正相关 ( $P=0.035$ ); 22 例 CXCR4 强阳性的组织中有 11 例呈 CD40 强阳性。与 CXCR4 或 CD40 单独表达水平相比, CXCR4 和 CD40 共表达与宫颈癌肌层浸润深度更具相关性, 在 CXCR4 与 CD40 均高表达的宫颈癌组织中发生深层肌层浸润的比例高于单独高表达的宫颈癌组织 (90% vs 72%,  $P<0.05$ ), 明显高于两者均不表达的宫颈癌组织 (90% vs 20%,  $P<0.01$ )。**结论:** CXCR4 和 CD40 在宫颈癌组织中的表达与宫颈癌肌层浸润程度密切相关。

**[关键词]** 宫颈癌; CD40; CXCR4; 肌层浸润

**[中图分类号]** R737.33; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)03-0294-04

## Expressions of CXCR4 and CD40 in human cervical carcinoma and their correlation with myometrial invasion

XU Jian<sup>1</sup>, QU Qiu-xia<sup>2</sup>, HUANG Qin<sup>2,3</sup>, ZHU Yi-bei<sup>1</sup>, ZHANG Xue-guang<sup>1,2</sup> (1. Biotechnology Research Institute, Soochow University, 215007, Jiangsu, China; 2. Clinical Immunology Institute, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 3. Department of Obstetrics & Gynecology, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To assess the expressions of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) and CD40 in human cervical carcinoma tissues and evaluate the correlation between their combined expression and the depth of the myometrial invasion. **Methods:** Fifty-three patients with cervical carcinoma aged of 29-53 years (median 41) from the First Affiliated Hospital of Soochow University were included in this study (2009-2011). The expressions of CXCR4 and CD40 in 53 cases of cervical carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry. Then the association between the expressions of these two proteins and the depth of myometrial invasion was analyzed. **Results:** CXCR4 and CD40 were found to be expressed in cervical carcinoma tissues at different levels, and there was a positive correlation between CD40 and CXCR4 expressions ( $P=0.035$ ). Of 22 cases which highly expressed CXCR4, 11 were found with a high expression of CD40. Furthermore, combined analysis of CXCR4 and CD40 expressions made results more relevant to the myometrial invasion. The depth of myometrial invasion was significantly higher in patients (90%) with a high expression of both CXCR4 and CD40 than in those (72%) with a high expression of one of the molecules, or those (20%) without high expressions of these two molecules ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The expressions of CXCR4 and CD40 in cervical carcinoma tissues are correlated with the depth of the myometrial invasion.

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81101556);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目资助(No. CXZZ11\_0110);苏州市科技发展计划项目(No. SYSD2011084)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81101556), and the Research Innovation Project for University Graduate Student in Jiangsu Province (No. CXZZ11\_0110); Suzhou Science and Technology Development Project (No. SYSD2011084)

**[作者简介]** 徐健(1986-),男,河南省洛阳市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫学相关的基础研究。E-mail: eplug1986@126.com

**[通信作者]** 张学光(ZHANG Xue-guang, corresponding author), E-mail: xueguangzh@yahoo.com.cn

[ **Key words** ] cervical carcinoma; CD40; CXCR4; myometrial invasion

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19( 3 ): 294-297 ]

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤,宫颈癌组织的肌层浸润深度和淋巴结转移与患者的生存率密切相关<sup>[1]</sup>。肿瘤细胞的浸润是一个复杂的、多阶段的过程,包括细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解、相关部位的肿瘤克隆生长和血管生成,还需要肿瘤细胞黏附特性、侵袭能力的改变以促进肿瘤细胞的迁徙<sup>[2,4]</sup>。CD40 分子属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族成员,表达于肿瘤细胞以及树突状细胞、巨噬细胞、内皮细胞等在内的多种免疫及非免疫细胞表面。最近的研究<sup>[5-8]</sup>表明,CD40 分子可以促进血管生成,参与肿瘤侵袭、转移,因此 CD40 分子被视为一个促进肿瘤细胞浸润的生长因子。CXC 趋化因子受体 4(C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)分子为趋化因子家族重要成员,表达在多种类型的肿瘤表面。CXCR4 分子与其配体基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ (stromal cell-derived factor-1 alpha, SDF-1 $\alpha$ )之间的相互作用会增强细胞的迁移能力,提高胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和 NF- $\kappa$ B 依赖途径活化的整合蛋白的表达,在肿瘤的转移和血管生成的过程中都起着重要作用。鉴此,本研究以宫颈癌为研究对象,采用免疫组织化学方法检测 CD40 分子和 CXCR4 分子在宫颈癌组织中的表达,并评估两者在浅层和深层肌层浸润的宫颈癌组织中表达水平的差异,探讨联合分析 CXCR4 和 CD40 分子对宫颈癌肌层浸润程度的预测价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料

抗人 CXCR4 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,抗人 CD40 抗体由本实验室制备(克隆号 5C11)。多聚赖氨酸玻片、HRP 标记鼠/兔通用型二抗、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂、柠檬酸抗原修复液、苏木精细胞快速染色液、封片用中性树胶购自福州迈新公司,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液购自中国国药化学试剂公司。

### 1.2 组织标本

53 例宫颈癌患者来自苏州大学附属第一医院妇产科(2009 年至 2011 年),年龄 29 ~ 53 岁,中位年龄 41 岁。所有患者均为初治患者,术前均未接受任何治疗,癌组织类型均为鳞癌,低分化 16 例、中分化 18 例、高分化 19 例,局部淋巴结转移 10 例,癌组

织浸润局限于浅肌层以内 26 例,有深肌层浸润者 27 例。

### 1.3 免疫组织化学染色方法检测 CD40 与 CXCR4 分子在宫颈癌组织中的表达

所有手术切除标本由 10% 甲醛液固定,石蜡包埋,5  $\mu$ m 连续切片。CD40 和 CXCR4 分子的免疫染色使用生物素-链霉亲和素复合物法,切片脱蜡后消除内源性过氧化物酶活性,使用羊血清封闭交叉反应部位,一抗稀释液 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,二抗使用 HRP 标记鼠/兔通用型二抗,DAB 标记显色,苏木精复染。阴性对照分别使用鼠 IgG 及兔 IgG。

### 1.4 免疫组织化学染色结果评估

每个标本随机选择 5 个高倍视野的肿瘤区域,对染色强度和阳性染色肿瘤细胞比例进行评估。按照切片中阳性染色的肿瘤细胞所占百分比分为 5 个半定量等级:0 分(< 5% 阳性细胞),1 分(6% ~ 25% 阳性细胞),2 分(26% ~ 50% 阳性细胞),3 分(51% ~ 75% 阳性细胞)和 4 分(> 75% 阳性细胞)。胞质和胞膜染色强度半定量分为 0 到 3 级:0 分(阴性),1 分(弱阳性),2 分(中等阳性),3 分(强阳性)。再将分级后的肿瘤细胞阳性染色率与染色强度评分相乘形成最终的评级标准:0(阴性),+(1 ~ 2),++(3 ~ 4)和+++ (5 ~ 7)。统计学分析时,不表达或低表达的切片染色结果评级为 0 或 +,高表达的切片染色结果评级为 ++ 或 +++。

### 1.5 统计学处理

使用 SPSS 统计软件,CD40 分子和 CXCR4 分子的表达与某些临床病理参数的相关性分析使用 Chi-square 检验或 Spearman rank 检验。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CD40 和 CXCR4 在宫颈癌组织中的表达

免疫组织化学分析结果(图 1)显示,CD40 分子主要表达在肿瘤细胞的胞质及胞膜。在 36 例宫颈癌组织中 CD40 分子不表达或低表达,而在另外 17 例宫颈癌组织中 CD40 分子呈现高表达。CXCR4 分子主要表达于胞质及胞核内。31 例宫颈癌组织中 CXCR4 分子不表达或低表达,22 例宫颈癌组织高表达 CXCR4 分子。统计学分析显示,在 22 例 CXCR4 分子强阳性的组织中有 11 例呈 CD40 强阳性,CD40 分子与 CXCR4 分子的表达存在相关性( $P = 0.035$ )。

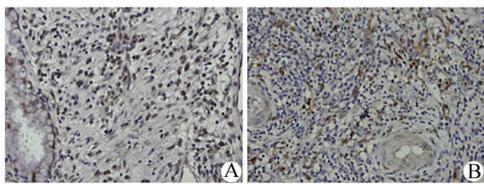


图1 CD40和CXCR4在宫颈癌组织中的表达(×200)  
 Fig. 1 Expression of CD40 and CXCR4 in cervical carcinoma tissues(×200)  
 A: CD40; B: CXCR4

2.2 CD40和CXCR4的表达与肌层浸润程度的相关性

对26例发生浅层肌层浸润和27例深层肌层浸润的宫颈癌组织进行分析,结果(表1)显示,肌层浸润程度和CXCR4分子的表达水平存在相关性( $P = 0.012$ ),但与CD40分子的表达水平无明显相关

性( $P = 0.052$ )。

2.3 CD40与CXCR4共表达与肌层浸润程度的相关性

进一步分析CXCR4分子与CD40分子共表达与宫颈癌肌层浸润程度之间的关系。结果(表2)显示,在CXCR4分子与CD40分子均高表达的宫颈癌组织中,发生深层肌层浸润的比例高于只有单一分子的高表达(90% vs 72%,  $P < 0.05$ ),明显高于两分子均不表达的患者(90% vs 20%,  $P < 0.05$ )。

再根据CXCR4与CD40分子同时表达的情况,将53例样本进一步分为两个亚组: I组,两者表达其一; II组,两者同时表达。结果显示,43例CXCR4分子与CD40分子非共表达的I组中只有18例为深层浸润,而10例CXCR4分子与CD40分子共表达的II组中有9例为深层肌层浸润。相较于I组样本,II组样本与深层肌层浸润之间有显著的相关性( $P = 0.0113$ )。

表1 CD40和CXCR4表达与宫颈癌肌层浸润程度的相关性

Tab. 1 Correlation of expressions of CD40 and CXCR4 with myometrial invasion status of cervical carcinoma

Invasion depth	N	High expression of CD40			High expression of CXCR4		
		n	%	P	n	%	P
Superficial	26	3	11.5	0.052	4	15.4	0.012
Deep	27	14	51.9		18	66.7	

表2 CXCR4和CD40共表达和宫颈癌肌层浸润程度的相关性

Tab. 3 Correlation of combined expressions of CXCR4 and CD40 with myometrial invasion status of cervical carcinoma

CXCR4/CD40	Invasion depth (n)		P
	Superficial	Deep	
Both 0/+	20	5	<0.01
Either ++/+++	5	13	
Both ++/+++	1	9	

3 讨论

宫颈癌是常见妇科恶性肿瘤,发病率及病死率居高不下,严重威胁着妇女健康。在我国,子宫颈癌发病率有进一步增高趋势,发病年龄趋于年轻化<sup>[9]</sup>。目前认为,肿瘤侵袭、转移是肿瘤治疗失败的主要原因,肿瘤转移和炎症细胞浸润有着相似的形成过程,均涉及到细胞黏附和跨内皮迁移等<sup>[10]</sup>。趋化因子在炎症细胞活化、迁移和准确定位中的重

要作用提示,趋化因子及其受体可能通过与炎症细胞浸润相似的机制参与了肿瘤的侵袭和转移<sup>[11-12]</sup>。因此,探讨肿瘤侵袭、转移的细胞和分子机制将为制定新的肿瘤靶向干预策略奠定良好的基础,也是目前肿瘤免疫学研究的热点之一。

本研究所关注的两个分子分别是CD40和CXCR4,均被发现在肿瘤的转移、侵袭过程发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。已有研究<sup>[15]</sup>显示,Hodgkin's的标志细胞R-S细胞和骨髓瘤细胞上发生的CD40配基化能上调黏附分子CD54、LFA-1和ICAM-2表达。肿瘤细胞最常见的是高表达CXCR4,其配体SDF-1 $\alpha$ 多表达于肺、肝脏、骨髓和淋巴结,导致这些部位成为肿瘤转移的常见器官。SDF-1 $\alpha$ -CXCR4的表达还受到其他一些因素的影响。例如Burger等<sup>[16]</sup>发现,缺氧能够诱导非小细胞肺癌细胞中CXCR4表达水平显著升高。Bachelder等<sup>[17]</sup>指出,乳腺血管内皮生长因子通过调节CXCR4的表达促进乳腺癌细胞浸润,使乳腺癌细胞发生转移。Orimo等<sup>[18-19]</sup>报道,浸润性乳腺癌组织的成纤维细胞可通过促进SDF-1 $\alpha$ 的

分泌加快肿瘤的生长及血管生成。虽然目前有关 CD40 和 CXCR4 分子直接的研究尚不多,但推测,旁分泌机制以及 CD40-CD40L 信号介导的炎症反应可能是造成癌组织 CXCR4 分子高表达的原因。

本文旨在人宫颈癌组织中分析 CD40 和 CXCR4 分子的表达情况,并探讨两者之间相关性及其和宫颈癌肌层浸润程度的关系。结果显示,宫颈癌组织中 CD40 分子和 CXCR4 分子的表达存在相关性;CXCR4/CD40 分子共表达比 CXCR4/CD40 分子单独表达与肌层浸润有更强的相关性。这些结果再次揭示了 CD40 分子和 CXCR4 分子在癌组织中的表达存在相关性,可能协同增强了宫颈癌细胞的侵袭能力,参与了肌层浸润。

最近的研究<sup>[20-21]</sup>还表明,CD40 和 CXCR4 分子的激发可增强血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的分泌,从而加速肿瘤血管生成和转移。肿瘤细胞被富含 SDF-1 $\alpha$ (在血管内皮细胞表达)器官的血管壁捕获,通过与肿瘤细胞上 CXCR4 的结合导致肿瘤细胞转移至正常组织,从而发生细胞增殖,诱导血管增生,形成转移性肿瘤<sup>[22]</sup>。因此,本研究结果提示,CXCR4/CD40 分子的共表达水平不仅能显示肿瘤浸润性生长的能力,也可能预示血管生成及炎症反应程度。总之,CXCR4/CD40 分子的共表达与宫颈癌肌层浸润有显著的相关性,深入探讨 CXCR4/CD40 分子相互作用而引起的肿瘤血管生成和侵袭将有助于进一步认识宫颈癌转移的机制。

## [参考文献]

- [1] Huang Q, Qu QX, Xie F, et al. CD40 is overexpressed by HPV16/18-E6 positive cervical carcinoma and correlated with clinical parameters and vascular density [J]. *Cancer Epidemiol*, 2011, 35(4): 388-392.
- [2] Kim Y, Stolarska MA, Othmer HG. The role of the microenvironment in tumor growth and invasion [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2011, 106(2): 353-379.
- [3] Mareel M, Constantino S. Ecosystems of invasion and metastasis in mammary morphogenesis and cancer [J]. *Int J Dev Biol*, 2011, 55(7/9): 671-684.
- [4] Calvo F, Sahai E. Cell communication networks in cancer invasion [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(5): 621-629.
- [5] Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, et al. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22(1): 307-328.
- [6] Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(4): 1083-1088.

- [7] Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10(1): 1-13.
- [8] Bergmann S, Pandolfi PP. Giving blood: A new role for CD40 in tumorigenesis [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(11): 2409-2412.
- [9] 周海滨,彭绩,池洪珊,等. 1999~2008年深圳市宫颈癌发病趋势分析 [J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(7): 430-433.
- [10] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: Plasticity and reciprocity [J]. *Cell*, 2011, 147(5): 992-1009.
- [11] Sciumè G, Santoni A, Bernardini G. Chemokines and glioma: Invasion and more [J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 224(1/2): 8-12.
- [12] Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(1): 77-82.
- [13] Chiodoni C, Iezzi M, Guiducci C, et al. Triggering CD40 on endothelial cells contributes to tumor growth [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(11): 2441-2450.
- [14] Sun X, Wei L, Chen Q, et al. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression [J]. *Mol Cancer*, 2010, 26(9): 17.
- [15] Gruss HJ, Scheffrahn I, Hubinger G, et al. The CD30 ligand and CD40 ligand regulate CD54 surface expression and release of its soluble form by cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells [J]. *Leukemia*, 1996, 10(5): 829-835.
- [16] Burger JA, Stewart DJ, Wald O. Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung cancer [J]. *Expert Rev Anti-cancer Ther*, 2011, 11(4): 621-630.
- [17] Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4 [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24): 7203-7206.
- [18] Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: A novel tumor-promoting cell type [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(15): 1597-1601.
- [19] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion [J]. *Cell*, 2005, 121(3): 335-348.
- [20] Xie F, Shi Q, Wang Q, et al. CD40 is a regulator for vascular endothelial growth factor in the tumor microenvironment of glioma [J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 222(1/2): 62-69.
- [21] Ping YF, Yao XH, Jiang JY, et al. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 promote glioma stem cell-mediated VEGF production and tumour angiogenesis via PI3K/AKT signalling [J]. *J Pathol*, 2011, 224(3): 344-354.
- [22] Wang L, Wang L, Yang B, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(8): 1049-1054.

[收稿日期] 2012-02-11

[修回日期] 2012-04-11

[本文编辑] 韩丹