

乳腺癌组织 CCR7 的表达及其与上皮间质转化的关系^{*}

徐 蕴¹ 张肇林² 窦珊珊¹ 崔利德¹

(¹ 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; ² 蓬莱市人民医院, 山东 蓬莱 265600)

摘 要 **目的** 研究趋化因子受体-7(chemokine receptor 7, CCR7)在乳腺癌组织中的表达及临床意义,并探讨 CCR7 与上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)的关系。**方法** 采用免疫组织化学检测 CCR7、EMT 相关标志物转录因子 Slug 和 N-cadherin 的表达,分析 CCR7 与患者病理特征的关系。**结果** 1) CCR7 在淋巴结转移组的表达明显高于无淋巴结转移组($\chi^2=5.061, P<0.05$); 2) CCR7 在人乳腺癌组织的表达随患者病理分期的增加(I→IV)而增加; 3) CCR7、Slug 和 N-cadherin 在人乳腺癌组织中均呈高表达,阳性率分别为 60.71% (34/56)、66.07% (37/56)、76.78% (43/56); 4) CCR7 与 Slug、N-cadherin 在乳腺癌组织的表达均呈正相关($P<0.05$)。**结论** CCR7 在人乳腺癌组织中的表达与 EMT 的指标密切相关,可能是判断癌转移的特异性指标。

关键词 CCR7; 乳腺癌; Slug; N-cadherin; 淋巴转移

中图分类号 R737.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9760(2015)12-394-04

Expression of CCR7 and its correlation with epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma

XU Yun, ZHANG Zhaolin, DOU Shanshan, CUI Lide

(School of Basic Sciences, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To investigate the association between the expression of CCR7 and clinical parameters in human breast carcinoma and analyze the relationship between CCR7 and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** CCR7, Slug and N-cadherin were examined by immunohistochemistry in 56 cases of breast carcinoma tissues. The correlation between clinical parameters and CCR7 expression were retrospectively analyzed. **Results** 1) The expressions of CCR7 in lymph node metastasis group were significantly higher than those in the group that without lymph node metastasis ($\chi^2=5.061, P<0.05$). 2) The expression of CCR7 in human breast cancer increased with the increase of the pathological stage of the patients. 3) High expressions of CCR7, Slug and N-cadherin were found in human breast carcinoma and the positive rate was 60.71%, 66.07% and 76.78% respectively. 4) The CCR7 expression was significantly associated to Slug and N-cadherin ($P<0.001$). **Conclusion** CCR7 was closely related to EMT indicators (Slug and N-cadherin) in human breast carcinoma. CCR7 may play a role in the genesis of EMT in human breast carcinoma and be expected to become the biomarker of cancer metastasis.

Keywords: CCR7; Breast carcinoma; Slug; N-cadherin; Lymph node metastasis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,而乳腺癌细胞转移是患者死亡最主要的原因^[1]。乳腺癌细胞侵袭转移等病理过程涉及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。目前,EMT 发生的分子机制还不完全清楚。最近有研究报道,CC 族趋化因子受体-7(chemokine receptor 7,

CCR7)的配体 CCL21 可调节 EMT 细胞向淋巴内皮细胞趋化迁移^[3]。然而,CCR7 与某些肿瘤细胞发生 EMT 的关系及机制尚不清楚。本文采用免疫组织化学检测 CCR7 的表达,分析其表达与 EMT 的关系,探讨 CCR7 的临床意义。报道如下。

^{*} [基金项目] 2013 年济宁医学院科研计划项目(编号:JY2013 KJ 014)

1 资料与方法

1.1 资料

收集蓬莱市人民医院乳腺癌手术切除标本 56 例。其中 >50 岁者 29 例, ≤ 50 岁者 27 例; 淋巴结转移者 40 例, 非转移者 16 例; 临床病理分期 I ~ II 者 31 例, III ~ IV 者 25 例。患者术前均未接受任何放疗及化疗, 术后均经病理组织学检查确诊为乳腺癌。标本组织经 4% 甲醛浸泡固定并经石蜡包埋, 连续 5 μ m 切片。

1.2 主要试剂

小鼠抗人 CCR7 单抗购自美国 Santa Cruz 公司; 小鼠抗人 Slug 单抗及 N-cadherin 单抗; 山羊抗小鼠二抗试剂盒、DAB 显色液均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 组织切片常规脱蜡、水化; 组织抗原采用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲剂热修复(100 $^{\circ}$ C、15 min), 自然冷却至室温; PBS 洗涤后, 用 3% 的过氧化氢浸泡 10 min, 以灭活内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 5 min/次, 共 3 次, 加入山羊血清封闭 20 min, 然后滴加小鼠抗人 CCR7(1 : 300)/Slug/N-cadherin(1 : 200)一抗, 放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜; PBS 冲洗 5 min/次, 共 3 次, 滴加山羊抗小鼠二抗孵育 20 min, PBS 浸洗, DAB 显色, 苏木精复染, 在光学显微镜下观察染色情况。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 免疫组化阳性评价 以细胞膜或胞质出现棕黄色颗粒为阳性, 以阳性细胞百分率和着色强度的评分作为标准, 采用半定量积分法判断染色结果。着色强度与背景色相比记分如下: 无着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。阳性癌细胞百分率记分: 在低倍镜下随机选取 5 个视野, 高倍镜下计数, 每个视野记录 100 个细胞, 计算阳性细胞百分率, 取平均数, 其中无阳性细胞即 0% 为 0 分; 0% ~ 25% 为 1 分; 25% ~ 50% 为 2

分; $>50\%$ 为 3 分。以着色强度与阳性细胞百分率评分的乘积作为最终分值, 范围从 0 至 9; <4 分记为阴性或低表达, ≥ 4 分记为阳性或高表达。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。

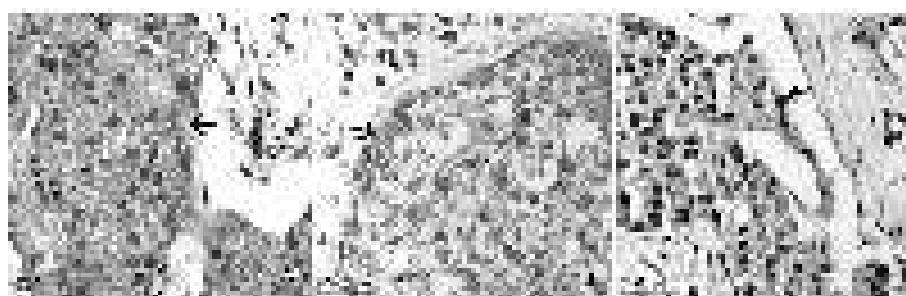
2 结果

2.1 乳腺癌组织中 CCR7 与 EMT 相关标志物的表达

56 例人乳腺癌组织中 CCR7、Slug 及 N-cadherin 蛋白均呈高表达, 表达率分别为 60.71% (34/56)、66.07% (37/56)、76.78% (43/56)。CCR7 与 N-cadherin 主要表达于癌细胞质内和细胞膜, Slug 蛋白主要表达于细胞核(图 1)。此外, 在细胞基质及癌旁组织中也检测到 CCR7、Slug 及 N-cadherin。

2.2 CCR7 表达与临床病理特征之间的关系

CCR7、Slug 及 N-cadherin 的表达与患者的年龄无关 ($P > 0.05$); CCR7、Slug 及 N-cadherin 在淋巴结转移组中的阳性表达率为 70.00% (28/40)、75.00% (30/40)、85.00% (34/40), 而无淋巴结转移组的阳性表达率为 37.50% (6/16)、43.75% (7/16)、56.25% (9/16), 有淋巴结转移的患者 CCR7、Slug 及 N-cadherin 的表达明显高于无淋巴结转移患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CCR7、Slug 及 N-cadherin 在临床病理分期 I ~ II 中的阳性表达率为 51.61% (16/31)、54.84% (17/31)、64.52% (20/31), 而在 III ~ IV 分期中的阳性表达率为 80.00% (20/25)、84.00% (21/25)、92.00% (23/25), 临床病理分期 III ~ IV 期的患者 CCR7、Slug 及 N-cadherin 的表达明显高于 I ~ II 期患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。



A: CCR7; B: N-cadherin; C: Slug

图 1 CCR7/N-cadherin/Slug 在乳腺癌组织中阳性表达(免疫组化染色 $\times 400$)

表1 CCR7、EMT 相关标志物的表达与乳腺癌患者临床特征的关系

临床病理参数	n	CCR7		χ^2	P	N-Cadherin		χ^2	P	Slug		χ^2	P
		阴性	阳性			阴性	阳性			阴性	阳性		
年龄(岁)													
≤ 50	27	12	15	0.582	0.446	8	19	1.204	0.237	9	18	1.204	0.273
> 50	29	10	19			5	24			10	19		
淋巴结转移													
有	40	12	28	5.061	0.024	6	34	5.299	0.021	10	30	4.979	0.026
无	16	10	6			7	9			9	7		
病理分期													
I ~ II	31	15	16	4.857	0.028	11	20	5.865	0.015	14	17	5.396	0.020
III ~ IV	25	5	20			2	23			4	21		

2.3 CCR7 与 Slug、N-cadherin 表达的相关性

对 56 例人乳腺癌组织中 CCR7、Slug 及 N-cadherin 的表达结果分析显示: CCR7 的表达与 Slug($r=0.393$, $P=0.001$)、N-cadherin($r=0.39$, $P=0.002$) 均呈正相关,见表 2。

表2 人乳腺癌组织中 CCR7 与 N-Cadherin/Slug 之间的表达关系

	CCR7		<i>r</i>	<i>P</i>
	阳 性	阴 性		
N-Cadherin				
阳 性	31	12	0.390	0.002
阴 性	3	10		
Slug				
阳 性	28	9	0.393	0.001
阴 性	6	13		

3 讨论

淋巴结转移是乳腺癌最重要的生物学特性之一,也是影响其预后的关键因素。目前肿瘤细胞向淋巴结或其他器官侵袭转移的分子机制依然未完全被阐明。

CCR7 属于 G 蛋白偶联的跨膜蛋白,主要表达于 T 淋巴细胞和成熟树突细胞表面,其配体是 CCL21 或 CCL19^[4-5]。CCR7 及其配体在介导机体内淋巴细胞的迁移过程中具有重要作用^[6]。近来研究显示:CCR7 广泛表达于多种肿瘤细胞并且与淋巴结转移密切相关,如乳腺癌、食管癌以及头颈癌^[7];CCL21/CCR7 在肿瘤细胞侵袭与转移过程中发挥十分重要的作用。

EMT 是指上皮细胞失去其细胞极性、细胞间黏附力下降、具有较强的运动性等间质细胞表型的

生物学过程,在胚胎发育、慢性炎症、多种纤维化疾病和肿瘤转移中发挥重要作用^[8],其主要特征包括黏附分子如 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达降低同时获得转录因子 Snail、Slug 以及 N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的表达^[9]。EMT 标记物广泛表达于多种肿瘤并且与肿瘤的侵袭扩散有关。已发现许多因子能激活肿瘤细胞相应受体信号程序发生 EMT,使其获得侵袭转移能力,如胰岛素样生长因子(IGF)、转化生长因子(TGF- β)。本文采用免疫组化检测了 CCR7 及 EMT 标记物 Slug、N-cadherin 在人乳腺癌组织中的表达。结果显示,癌细胞 CCR7、Slug 及 N-cadherin 的表达与淋巴结转移及临床病理分期密切相关,有淋巴结转移者及乳腺癌 III ~ IV 期患者的 CCR7、Slug 及 N-cadherin 的表达明显升高,说明 CCR7 可能促进乳腺癌细胞的浸润转移过程。而后我们进一步分析了 CCR7 与 EMT 标记物(Slug、N-cadherin)之间的相关性,发现 CCR7 的表达与 Slug、N-cadherin 的表达均呈正相关,提示 CCR7 与乳腺癌 EMT 的发生关系密切,其机制有待进一步实验研究证实。信号通路研究表明,CCR7 可通过激活 MAPK、AKT 信号途径参与基因的转录调控^[10]。而在 EMT 的发生中,MAPK、AKT 可以激活 Smad、Slug 及 Twist^[11]等转录因子,共同调节 EMT 标志物的表达。因此,我们认为 CCR7 可能通过激活 MAPK 或 AKT 途径而激活 Snail、Slug 及 Twist 等转录因子,进而诱导乳腺癌细胞表达 N-cadherin 等 EMT 标志物,发生转移;可能是判断癌转移的特异性指标。

(下转第 402 页)

力来自种植体与骨的机械铆合,反作用力直接分散于骨内,避免牙齿受到反作用力而产生位移,具有较好的稳定性,且负载较大、可有效支抗牙的抗力^[9]。微螺钉支抗对牙弓宽度无任何限制,不会引起宽度不协调等问题,可以运用在复杂的各类错合畸形。本文结果显示:观察组患者上中切牙倾角和凸距明显比对照组减小更显著,前牙内收更多,且磨牙前移少,拔牙间隙得到充分利用,应用微螺钉种植体支抗使上前牙唇倾明显得到改善,对于安氏 II 类第一分类错合畸形治疗效果更佳,总有效率比对照组高,患者更满意。

种植钉支抗的植入手术简单,术后可即刻加载,对于患者创伤小、痛苦少、稳定、舒适,支抗效果保证,且无须患者依从治疗,且利于在各个方向上控制牙齿的移动,获得理想的矫治效果^[10],大大地弥补了传统支抗的不足。微螺钉在植入后有一定的失败率,会出现松动甚至脱落的情况,与植入的角度、植入的位置、植入后使用的力值过大、炎症、患者年龄、患者全身情况等有关,这些因素值得我们进一步研究。本文中松动的两例患者在重新植入加力后稳定性均较好,未影响治疗效果。

综上所述,微螺钉支抗种植体用于治疗口腔正畸中安氏 II 类第一分类错合畸形临床效果显著,可以更有效的改善面型,患者满意度更高,值得临

床口腔正畸医师推广应用。

参考文献:

- [1] 蔡嘉喜.微螺钉支抗种植体用于口腔正畸临床效果观察[J].中国现代医药杂志,2013,15(1):84-85.
- [2] 包雪梅,陈岩.正畸微种植体初始稳定性的研究进展[J].中华口腔正畸学杂志,2012,19(2):118-120.
- [3] 李嵘,沈国荣,王国荣,等.微螺钉种植体支抗的口腔正畸效果分析[J].中国临床医学,2014,21(2):221-222.
- [4] 张妍,侯艳妮.微螺钉种植体支抗在口腔正畸中的临床应用分析[J].求医问药(学术版),2012,10(6):604.
- [5] 石聪聪.鼻-唇-颊软组织侧貌影响因素的研究进展[J].医学研究生学报,2014,27(3):313-316.
- [6] 陈启锋,黄荣城,赖昌拥.活动翼矫治技术治疗双颌前突前后软硬组织改变的分析[J].口腔医学研究,2012,28(9):950-953.
- [7] 黄一平,李巍然.影响双颌前突青少年患者唇部内收因素的研究[J].中华口腔正畸杂志,2014,21(4):190-194.
- [8] 张超,任素峰,王宏伟,等.微螺钉种植体支抗压低伸长磨牙并种植义齿修复的临床研究[J].河北医药,2012,34(11):1670-1671.
- [9] 杨一帆,杨磊,丁寅.种植体支抗矫正双颌前突畸形疗效回顾性研究[J].中国实用口腔科杂志,2014,7(8):475-478.
- [10] 崔淑霞,丁睿,王淑敏,等.比较 2 种部位种植钉支抗推上颌磨牙向远中移动的效果[J].实用口腔医学杂志,2014,30(6):849-852.

(收稿日期 2015-10-14)

(上接第 396 页)

参考文献:

- [1] Grabau D, Dihge L, Ferno M, et al. Completion axillary dissection can safely be omitted in screen detected breast cancer patients with micrometastases. A decade's experience from a single institution[J]. Eur J Surg Oncol, 2013, 39(6): 601-607.
- [2] Mukaida N, Baba T. Chemokines in tumor development and progression[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(2): 95-102.
- [3] Pang M F, Georgoudaki A M, Lambut L, et al. TGF- β induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis[J]. Oncogene, 2015, doi:10.1038/onc.
- [4] 熊化保,司传平,张惠.固有淋巴细胞研究进展[J].济宁医学院学报,2015,38(2):77-81.
- [5] 石俊强.淋巴管生成与疾病[J].济宁医学院学报,2015,38(5):349-355.
- [6] Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, de la Rosa G, et al. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that in-

hibits apoptosis of mature dendritic cells[J]. Blood, 2004, 104:619-625.

- [7] Oliveira-Neto H H, de Souza P P, da Silva M R, et al. The expression of chemokines CCL19, CCL21 and their receptor CCR7 in oral squamous cell carcinoma and its relevance to cervical lymph node metastasis[J]. Tumour Biol, 2013, 34: 65-70.
- [8] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5):871-890.
- [9] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2):97-100.
- [10] Kuwabara T, Tanaka Y, Ishikawa F, et al. CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3 kinase and NF- κ B pathway in dendritic cells[J]. J Leukoc Biol, 2012, 92:309-318.
- [11] Hough C, Radu M, Dore J J. TGF- β induced ERK phosphorylation of smad linker region regulates Smad signaling[J]. PLoS One, 2012, 7:e42513.

(收稿日期 2015-09-08)