

• 临床检验研究论著 •

腹腔微环境与卵巢上皮性癌腹腔转移关系的研究*

汤凯雯

(广州医科大学附属肿瘤医院, 广东广州 510095)

摘要:目的 探讨腹腔微环境与卵巢上皮性癌腹腔转移关系的研究。方法 采用 RT-PCR 法及免疫组化法检测卵巢上皮性癌组织相应趋化因子受体及其配体的表达情况, 腹膜组织相应配体的表达情况, 以揭示趋化因子介导上皮性卵巢癌腹腔内转移机制。结果 趋化因子受体 CXCR4 在卵巢上皮性癌组织中表达明显高于其他趋化因子受体表达 ($P < 0.01$); 趋化因子受体 CXCR4 的配体 SDF-1 在上皮性卵巢癌组织和腹膜中均高表达。结论 趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 在卵巢癌组织中高表达, 通过自分泌作用, 可能刺激卵巢癌细胞的过度生长; SDF-1 在腹膜组织高表达, 通过旁分泌作用, 可能介导表达 CXCR4 的卵巢癌细胞向腹腔内转移。

关键词: 腹腔; 卵巢上皮性癌; 转移

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)14-1880-03

Relationship between abdominal microenvironment with abdominal cavity metastasis of epithelial ovarian cancer*

Tang Kaiwen

(Affiliated Tumor Hospital, Guangzhou medical University, Guangzhou, Guangdong 520095, China)

Abstract: Objective To discuss the relationship between the abdominal microenvironment with abdominal cavity metastasis of epithelial ovarian cancer. **Methods** In order to reveal the mechanism of chemokines mediating epithelial ovarian cancer abdominal cavity metastasis, the expressions of chemokine receptor and its ligand in the epithelial ovarian carcinoma tissue and the peritoneal tissue were detected by RT-PCR and immunohistochemical. **Results** The expression of chemokine receptor CXCR4 in the epithelial ovarian carcinoma tissue was significantly higher than that of other chemokine receptors ($P < 0.01$). The CXCR4 ligand SDF-1 was high-expressed in the epithelial ovarian carcinoma tissue and the peritoneal tissue. **Conclusion** The CXCR4 and SDF-1 are high-expressed in the ovarian cancer tissue and may stimulate the excessive growth of ovarian cancer cells by the autocrine function; SDF-1 in the peritoneal tissue is high-expressed and may mediate the ovarian cancer cells expressing CXCR4 transferred to the abdominal cavity.

Key words: enterocoelia; epithelial ovarian cancer; metastasis

卵巢癌是现今妇科最常见的恶性肿瘤之一, 由于卵巢位于患者的盆腔深入位置, 即使出现病变也难以发现, 故大部分卵巢癌患者确诊时已为晚期, 且易转移和复发^[1]。卵巢上皮性癌占卵巢癌的 80%~90%, 且卵巢上皮性癌易转移至腹腔腹膜上, 复发转移病死率高, 如何有效诊治卵巢上皮性癌成为当今医学界研究的热点、难点^[2]。近年来, 经研究发现大部分的癌细胞均可产生趋化因子, 局部趋化因子表达水平对癌组织中淋巴细胞浸润具有重要作用, 且其受体和配体参与了癌细胞的复发和转移^[3-4]。因此, 本研究通过分析趋化因子受体及其配体在卵巢上皮性癌组织及腹膜组织的表达情况, 以揭示趋化因子介导上皮性卵巢癌腹腔内转移机制, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2012 年 3 月至 2013 年 3 月经病理检查确诊为原发性卵巢上皮性癌组织 30 例, 年龄 45~67 岁, 平均 (54.32±11.72) 岁, 病理类型: 浆液性癌 21 例, 子宫内膜样癌 6 例, 透明细胞癌 2 例, 黏液性囊腺癌 1 例。参照 1986 年国际妇产科联盟 (FIGO) 标准进行病理分期: I 期 6 例, II 期 7 例, III 期 13 例, IV 期 4 例。

1.2 试剂 鼠抗人 CXCR4 抗体, 兔抗人 SDF-1 抗体, 均购自美国 R&D 公司, 免疫组化试剂盒由北京中杉生物公司提供。M-Mnlv, reaction buffer, 4dNTPmix 和 Ribomndase inhibitor 则由上海生工生物工程公司提供。

1.3 检测方法 RT-PCR 法: 研磨癌组织, 加入 1 mL Trizol, 采用 1 mL 的注射器抽吸裂解液至裂解液不黏稠, 静置 5 min 后

离心加入异丙醇沉淀 RNA。提取 RNA 置于 PCR 管, 处理后置于 PCR 仪, 70 ℃ 下反应 5 min。随后置于冰上冷却 5 min, 依次加入 4 μL 5× 反应缓冲液, 2 μL 10 mmol/L 4 dNTPmix 及 1 μL Ribomndase inhibitor。再次置于 PCR 仪, 37 ℃ 下反应 5 min。加入 1 μL 200 μmol/L, 40 ℃ 下反应 60 min, 70 ℃ 下反应 10 min 终止反应。免疫组化 SP 法: 癌组织冷冻切片, 厚度为 4 μm, 石蜡包埋。HE 染色后, 加入鼠抗人 CXCR4 抗体和兔抗人 SDF-1 抗体, DAB 显色后, 苏木精染色对比。

1.4 趋化因子序列 CXCR1: 正义链 5'-CAG ATC CAC AGA TGT GGG AT-3', 反义链 5'-TCC AGC CAT TCA CCT TGG AG-3'; CXCR2: 正义链 5'-CTT TTC TAC TAG ATG CCG C-3', 反义链 5'-GAA GAG AGC CAA CAA AGG-3'; CXCR3: 正义链 5'-ACC TAG CTG TAG CAG ACA CG-3', 反义链 5'-CAT AGC AGT AGG CCA TGA CC-3'; CXCR4: 正义链 5'-GAA CTT CCT ATG CAA GGC AGT CC-3', 反义链 5'-CCA TGA TGT GCT GAA ACT GGA AC-3'; CXCR5: 正义链 5'-AAC TAC CCG CTA ACG CTG GAA ATG GAC-3', 反义链 5'-CAC GGC AAA GGG CAA GAT GAA GAC C-3'。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行数据分析, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 多组数据比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 法测定卵巢上皮性癌组织中 CXCR 表达情况 趋化因子受体 CXCR4 在卵巢上皮性癌组织中表达明显高于

* 基金项目: 广州医学院青年基金项目 (2011A05)。 作者简介: 汤凯雯, 女, 主治医师, 主要从事妇产科肿瘤研究。

其他趋化因子受体表达 ($P < 0.01$), 见图 1、表 1。

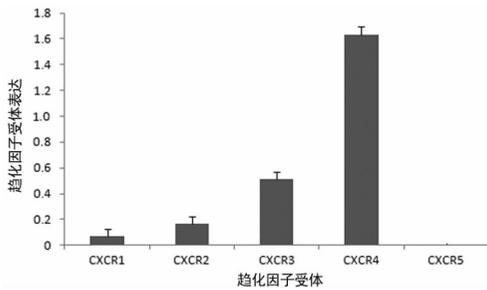


图 1 卵巢上皮性癌组织中 CXCR 表达情况

表 1 卵巢上皮性癌组织中 CXCR 表达情况比较

趋化因子受体	样本数	表达情况
CXCR1	30	0.070 ± 0.054
CXCR2	30	0.164 ± 0.112
CXCR3	30	0.510 ± 0.384
CXCR4	30	1.633 ± 0.621*
CXCR5	30	0.000 ± 0.000

*: $P < 0.01$, 与其他趋化因子受体比较。

2.2 免疫组化法检测卵巢上皮性癌组织中趋化因子受体 CXCR4 蛋白表达 趋化因子受体 CXCR4 在卵巢上皮性癌组织中呈阳性表达见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

2.3 免疫组化法检测腹膜组织中配体 SDF-1 表达 SDF-1 在腹膜间皮细胞浆中呈阳性表达,但在腹膜间质细胞中却不表达,见图 3。

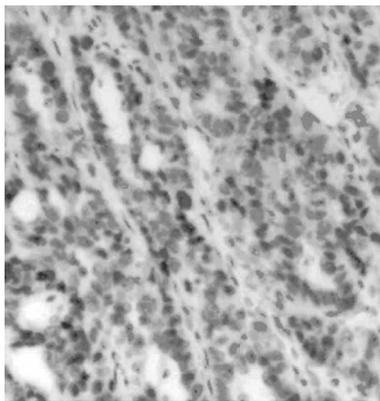


图 3 SDF-1 在腹膜间皮细胞浆中呈阳性表达

2.4 免疫组化法检测卵巢癌组织中 SDF-1 的表达情况 见图 4。

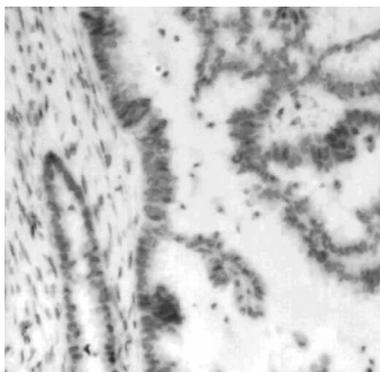


图 4 SDF-1 在卵巢癌组织中呈阳性表达

3 讨论

近年来,研究指出肿瘤细胞中的趋化因子、细胞因子以及炎性细胞在肿瘤的发生、发展中起重要作用,并可抑制机体自身的抗肿瘤免疫应答^[5]。趋化因子是一种小分子分泌蛋白质,其主要功能控制白细胞转移,尤其是在免疫应答及炎症反应时^[6]。传统的观点认为,趋化因子是通过特异性受体介导血液循环中白细胞迁移到机体各个部位参与抗炎反应,而现今研究进一步指出,趋化因子及其受体在许多疾病和中枢神经中参与其生理性和病理性的过程^[7-8]。目前,趋化因子及其受体主要参与以下生理性和病理性的过程^[9]:(1)介导肿瘤生长和转移过程;(2)参与淋巴细胞迁移过程;(3)与大部分的炎症疾病密切相关;(4)具有促进或抑制血管形成的作用;(5)与造血细胞形成有关;(6)与 HIV 及其他病毒性感染有关。

本研究发现在卵巢上皮性癌组织中 CXCR4 表达明显高于其他趋化因子受体,且卵巢癌组织本身也有明显的 SDF-1 表达,而在腹膜组织中 CXCR4 的配体 SDF-1 也明显表达。卵巢上皮性癌是转移性比较高的卵巢癌之一,因此可大胆推测趋化因子 CXCR4 及其配体 SDF-1 与卵巢上皮性癌转移有关。据 Zhukovsky 等^[10]研究发现,即 CXCR4 阴性细胞不能被 HIV 病毒感染,且 SDF-1 能特异性阻断 HIV 通过 CXCR4 感染 T 细胞。此外,经沈晓燕等^[11]研究证实,CXCR4 在卵巢癌细胞中有表达,且在卵巢患者的腹腔积液中找到其相应配体 SDF-1 的表达。Kim 等^[12]的研究进一步指出,炎症细胞因子是 NF-KB(nuclear factor kappa B)的潜在诱导剂,而 NF-KB 则是 CXCR4 的潜在诱导剂,转移的癌细胞组织可能是通过小淋巴结产生大量的细胞因子,从而激活 NF-KB,达到上调 CXCR4 表达的目的,故在转移病灶中 CXCR4 的阳性表达率明显高于原发性病灶。CXCR4 的配体 SDF-1 在腹膜间皮细胞浆中大量表达,对淋巴细胞归巢有重要作用,因此表达 CXCR4 的卵巢癌细胞可能是在高浓度的 SDF-1 趋化下而发生淋巴转移的^[13]。本研究属初步探究,仅说明了卵巢上皮细胞癌组织中趋化因子受体及其配体的表达情况,并没有从根本上解决卵巢癌转移的问题,仍需要在进一步完善上述研究的基础上,建立卵巢癌动物模型或侵袭模型,以了解趋化因子受体或配体的表达情况,并采用 RNAi 干扰技术,对趋化因子受体或配体的表达进行干预,最终达到抑制癌细胞转移的结果。

综上所述,趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 在卵巢癌组织中高表达,通过自分泌作用,可能刺激卵巢癌细胞的过度生长;SDF-1 在腹膜组织高表达,通过旁分泌作用,可能介导表达 CXCR4 的卵巢癌细胞向腹腔内转移。

参考文献

- [1] Rustin GJ. The cost of surveillance following treatment of ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2013, 131(3):501-502.
- [2] Rouhana-Toubi A, Wasser SP, Agbarya A, et al. Inhibitory Effect of ethyl acetate extract of the shaggy incap medicinal mushroom, coprinus comatus (higher basidiomycetes) fruit bodies on cell growth of human ovarian cancer[J]. Int J Med Mushrooms, 2013, 15(5):457-470.
- [3] 燕霞, 燕锋, 孙红, 等. 上皮性卵巢癌中 CXCR4、VEGF 的表达及其相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(11):1220-1223.
- [4] 谢婷婷, 魏莉, 宋辉, 等. 趋化因子受体 CXCR4 及 CCR5 真核表达载体的构建及其在卵巢癌细胞中的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(12):1200-1202.
- [5] Salazar N, Castellán M, Shirodkar SS, et al. Chem- (下转第 1884 页)

2.4 耐药基因类型检测 151 株耐亚胺培南铜绿假单胞菌中,检出携带 VIM 基因 94 株,携带 IMP 基因 32 株,携带 SPM 基因 3 株,携带 SIM 基因 2 株;未检出 GIM、NDM-1 耐药基因。有 22 株同时携带两种或两种以上耐药基因,见表 4,基因电泳图见图 1。

3 讨 论

近年来,随着亚胺培南在临床治疗中的广泛应用,越来越多的铜绿假单胞菌对亚胺培南产生了耐药性,碳青霉烯类耐药铜绿假单胞菌同时对其他抗菌药物也呈现出很高的耐药性^[5]。本研究检测到耐亚胺培南铜绿假单胞菌仅对多黏菌素 B 耐药率为 0,对其余抗菌药物均表现出大于 50% 的高耐药率,且多重耐药率达 31.8%,远远高于普通铜绿假单胞菌报道的 9.1%^[6],耐药形势相当严峻。

本组 151 株耐亚胺培南的铜绿假单胞菌对美罗培南的敏感率为 61.6%,提示亚胺培南与美罗培南耐药机制不尽相同。美罗培南是不经过特殊通道扩散的,细菌外膜的低通透性合并主动外排系统起作用是其对铜绿假单胞菌形成低水平耐药性的主要机制。国外有研究表明,对美罗培南耐药的铜绿假单胞菌 94.7% 对亚胺培南耐药,而对亚胺培南耐药的菌株只有 47% 对美罗培南耐药,且美罗培南体外活性是亚胺培南的 2 倍,对部分耐亚胺培南菌株有效,故临床上用美罗培南治疗亚胺培南耐药的菌株,但仍需密切监测药敏结果^[7]。

产碳青霉烯酶是铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药的重要原因。碳青霉烯酶是能够明显水解碳青霉烯类抗菌药物的一类 β-内酰胺酶,最主要的有 6 种基因型:IMP、VIM、GIM、SPM、SMI 和 NDM-1,铜绿假单胞菌中以 IMP 和 VIM 基因型多。本研究检测到 IMP 阳性 32 株,阳性率 21.2%,VIM 阳性 94 株,阳性率 62.3%,还检出 5 株携带 SPM 基因及 3 株携带 SIM 基因,耐药基因 GIM 和 NDM-1 暂未检出,与文献^[8]报道的以 IMP、VIM 基因为主相同。但本地区 VIM 基因型检出率最高,与国内报道的以 IMP 基因检出率最高有差异^[6],可能本地区用药习惯有关,需进一步研究。

本研究首次报道出耐亚胺培南铜绿假单胞菌可携带两种及以上碳青霉烯酶耐药基因,其耐药性极强,此次检测出一株同时携带三种耐药基因的铜绿假单胞菌,药物敏感试验证实,此菌株除多黏菌素 B 以外,对其余 9 种抗菌药物均耐药,需引起临床重视。

此外,本研究检测到 36 株耐药基因阴性的耐亚胺培南铜绿假单胞菌,占 23.8%,此类菌株的耐药机制可能与外膜通透性障碍,主动外排泵,改变抗菌药物作用的靶位,生物膜形成等有关,需进一步研究考证。

综上所述,本地区耐亚胺培南铜绿假单胞菌耐药性强,且多重耐药现象严重,耐药机制主要是产生了碳青霉烯酶耐药基因。亚胺培南等碳青霉烯类抗菌药物耐药现象的不断加和流行,使临床面临几乎无药可选的境地,严重地威胁到人类健康,加强细菌耐药监测及耐药机制研究,对及时控制医院感染及临床合理使用抗菌药物具有重要意义。

参考文献

- [1] Wantanabe M, Joybe M, Inoue M, et al. Transferable imipenem resistance in *P. aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 35(3): 147-151.
- [2] Kouda S, Ohara M, Onodera M, et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima [J]. *Antimicrob Chemother*, 2009, 64(1): 46-51.
- [3] Chu YW, Afzal SM, Houang ET, et al. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. In Korean hospitals [J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(7): 868.
- [4] Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.
- [5] Huang YS, Long Y, Fang L. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteria metal detection of β-lactamase and related genes [J]. *Chin J Clin Physic*, 2010, 4(9): 120-123.
- [6] 于勇, 常东, 蒋伟, 等. 烧伤病区抗生素使用与铜绿假单胞菌耐药水平变化的关系 [J]. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(24): 92-95.
- [7] Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; risk factors and clinical impact [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(1): 43-48.
- [8] Liu Y, Zhang B, Cao Q, et al. Two clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* carrying plasmid-borne blaIMP-4, blaSHV-12, and armA isolated at a Pediatric Center in Shanghai, China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(4): 1642-1644.

(收稿日期: 2013-12-28)

(上接第 1881 页)

okines and chemokine receptors as promoters of prostate cancer growth and progression [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2013, 23(1): 77-91.

- [6] 郭清, 吴小华, 吕英璞, 等. CXCL12-CXCR4 趋化因子轴与卵巢上皮性癌关系的实验研究 [J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(21): 1677-1680.
- [7] 陈聪, 刘志峰, 任炳成, 等. 胶质母细胞瘤微环境中 CXCL12/CXCR4 趋化因子受体 4 的表达分布及其在肿瘤侵袭迁移中的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(6): 1271-1274.
- [8] Amedei A, Prisco D, D'Elia MM. The use of cytokines and chemokines in the cancer immunotherapy [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2013, 8(2): 126-142.
- [9] 彭婷, 刘莉, 李剑. 趋化因子 2 对血液肿瘤生物学行为的影响 [J]. *广东医学*, 2013, 34(13): 2106-2108.
- [10] Zhukovsky MA, Lee PH, Ott A, et al. Putative cholesterol-binding

sites in human immunodeficiency virus (HIV) coreceptors CXCR4 and CCR5 [J]. *Proteins*, 2013, 81(4): 555-567.

- [11] 沈晓燕, 王绍海, 汪宏波, 等. CXCR4 及其配体 SDF-1α 在卵巢癌 SKOV3 细胞黏附和侵袭中的作用 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(9): 852-856.
- [12] Kim JH, Gupta SC, Park B, et al. Turmeric (*Curcuma longa*) inhibits inflammatory nuclear factor (NF)-κB and NF-κB-regulated gene products and induces death receptors leading to suppressed proliferation, induced chemosensitization, and suppressed osteoclastogenesis [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2012, 56(3): 454-465.
- [13] Hunger C, demis V, Engele J. Expression and function of the SDF-1 chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 during mouse limb muscle development and regeneration [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(17): 2178-2190.

(收稿日期: 2014-01-08)