

CXCL2 在结直肠癌中的表达及临床意义

宋宏伟¹, 汪桂华¹, 王旭东^{1△}, 朱惠君² (南通大学附属医院: 1. 检验医学中心; 2. 病理科, 江苏南通 226001)

【摘要】 目的 检测 CXCL2 蛋白在结直肠癌中的表达情况, 探讨其临床研究意义。**方法** 利用 Oncomine 芯片数据库分析 6 个独立的研究中结直肠癌 CXCL2 mRNA 的表达数据。采用组织芯片 (TMA) 免疫组化染色检测结直肠癌 CXCL2 蛋白的表达情况, 并用统计学分析其与临床病理特征和预后的相关性。**结果** CXCL2 在结直肠癌较其癌旁组织中高表达; 31.31% 的结直肠癌细胞质 CXCL2 高表达, 与肿瘤部位 ($P=0.022$)、原发肿瘤的浸润程度 ($P=0.005$) 及淋巴结转移 ($P=0.017$) 显著相关; Kaplan-Meier 和 Cox 回归分析表明, CXCL2 高表达 ($P<0.001$) 是结直肠癌预后不良的一项独立预测因素。**结论** CXCL2 高表达可能与结直肠癌的侵袭和转移有关, 可作为结直肠癌的预后指标和治疗的潜在靶点。

【关键词】 CXCL2; 结直肠癌; 组织芯片; 免疫组化; 预后

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1045-04

Expression and clinical significance of CXCL2 in colorectal cancer SONG Hong-wei¹, WANG Gui-hua¹, WANG Xu-dong^{1△}, ZHU Hui-jun² (1. Center of Clinical Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

【Abstract】 Objective To detect the expression condition of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) in colorectal cancer (CRC) and to study its significance in clinical research. **Methods** The data of colorectal cancer CXCL2 mRNA expression in 6 independent research centers were analysed by using the Oncomine microarray database. The tissue microarray (TMA) immunohistochemistry staining was employed to characterize the expression of the CXCL2 protein in CRC. The correlation of CXCL2 expression with clinicopathological features and prognosis was analyzed by statistics. **Results** CXCL2 was highly expressed in CRC tissues compared with corresponding peritumoral tissues. 31.31% of CXCL2 cytoplasm in CRC was highly expressed, which was significantly correlated with the tumor location ($P=0.022$), infiltration extent of primary tumor ($P=0.005$) and lymph node metastasis ($P=0.017$). The Kaplan-Meier and Cox regression analysis revealed that high CXCL2 expression was an independent predictive factor of poor prognosis in CRC. **Conclusion** High CXCL2 expression may be associated with invasion and metastasis of CRC, which can be used as a prognostic index and potential target for the treatment of CRC.

【Key words】 CXCL2; colorectal cancer; tissue microarray; immunohistochemistry; prognosis

结直肠癌在女性最常见癌症中排第二位, 在男性最常见癌症中排第三位^[1]。结直肠癌致癌作用是一个复杂的过程, 与累积基因组变化相关联^[2-3]。因此, 有必要探寻潜在肿瘤进展过程中的分子标记物, 并确定新的治疗目标以改进治疗方法, 并延长结直肠癌患者的生存期。

趋化因子是一群小的促炎细胞因子, 它们在炎症组织中吸引、激活并调节白细胞。最近的研究显示它们在肿瘤发生、发展中起作用^[3]。趋化因子基于 N 端保守半胱氨酸残基的数量和排列方式可分为 CXC、CC、C 和 CX3C 四个亚族。CXCL2 是 CXC 亚族的一个成员, 也称为 GRO-2 或 GRO- β 。CXCL2 在结肠腺瘤中表现失调^[4]。然而, CXCL2 过表达在结直肠癌患者临床结果中的影响仍不清楚。本研究采用 cDNA 芯片数据库和组织芯片 (TMA 技术) 对结直肠癌及其癌旁组织中的 CXCL2 表达水平进行分析, 对其表达水平与结直肠癌临床病理特征之间的潜在相关性进行探讨, 研究 CXCL2 表达与患者预后之间的关系。

1 资料与方法

1.1 cDNA 基因芯片资料 通过 Oncomine 癌症芯片数据库

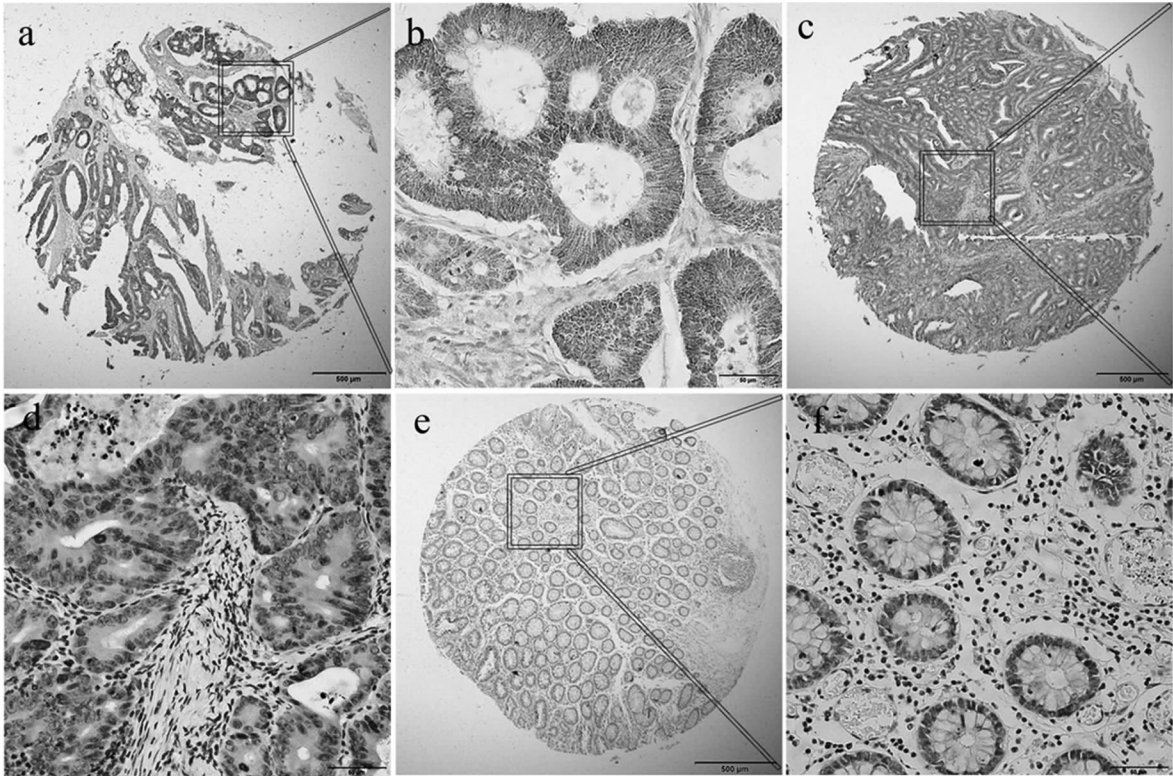
(<http://www.oncomine.org>) 从 6 个独立的研究中 (文献 [5-9] 及 <https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) 提取 CXCL2 mRNA 的表达数据, 比较其在结直肠癌及正常组织中的表达水平。

1.2 一般资料 198 份结直肠癌标本来源于南通大学附属医院 2002~2008 年结直肠癌手术患者, 福尔马林固定, 石蜡包埋肿瘤组织及其癌旁组织。患者临床资料包括性别、年龄、分化程度、肿瘤部位、原发肿瘤的浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移、癌胚抗原 (CEA) 水平和随访资料 (包括 5 年生存率) 等。生存期从手术日期开始计算, 直至死亡日期或最后一次随访时间。肿瘤分期按照 TNM 系统确定, 肿瘤分化程度由世界卫生组织的标准确定。

1.3 方法 每例患者的 2.0 mm 组织采用组织芯片系统 (Quick-Ray, UT06, UNITMA, Korea) 进行 TMA 分析。TMA 切片经 100% 的二甲苯溶液脱蜡和乙醇梯度溶液再水化。在 pH6.0 枸橼酸盐缓冲液中煮沸 5 min 修复抗原, 在 5% 山羊血清 PBS 中孵育 15 min 阻断非特异性结合。TMA 切片先与抗 CXCL2 抗体 (1:400, 500-P104, PeproTech, Rocky Hill, USA) 孵育, 然后与辣根过氧化物酶结合的山羊抗兔二抗孵育 (sc-

2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)。CX-CL2 染色情况由 2 名病理工作人员在双盲实验条件下独立评估。染色阳性率记录为 0%~100%, 染色强度分级如下: 0=无染色; 1=轻度; 2=中度; 3=高度。最终染色评分由强度分级和阳性细胞百分率相乘而来。CXCL2 表达的 cutoff 值由 X-tile 软件程序 (Rimm Lab, Yale University, New Haven, CT, USA; <http://www.tissuearray.org/rimmlab>) 计算而来^[10]。染色的程度采用二分级量化, 最终 CXCL2 染色评分定义如下: 0~150, 低表达; 150~300, 高表达。

1.4 统计学处理 实验数据均采用 SPSS20.0 统计软件处理, CXCL2 mRNA 表达水平的比较采用 *u* 检验或 *t* 检验, CX-CL2 表达与临床病理特征的关系采用 Pearson 相关分析, 采用 Kaplan-Meier 法和 Cox 比例风险回归模型计算生存率, 采用对数秩和检验进行差异分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。



注: a、b 为ⅢB期, CXCL2 蛋白高表达; c、d 为ⅡA期, CXCL2 蛋白低表达; e、f 为癌旁组织, CXCL2 蛋白不表达。

图1 典型结直肠癌及其癌旁组织 CXCL2 免疫组化染色模型(a、c、e: ×40; b、d、f: ×400)

2.3 CXCL2 表达与临床病理特征的相关性 本研究对 198 例结直肠癌患者细胞质 CXCL2 蛋白表达水平进行研究, 发现 CXCL2 蛋白低表达者 136 例, 占 68.69%; 高表达者 62 例, 占 31.31%。进一步与患者临床病理特征的相关性作进一步研究, 结果显示原发性结直肠癌细胞质 CXCL2 高表达与肿瘤部位(*P*=0.022)、原发肿瘤的浸润程度(*P*=0.005)及淋巴结转移(*P*=0.017)显著相关。而 CXCL2 表达水平与其他临床病理特征包括性别、年龄、分化程度、TNM 分期及 CEA 水平之间并无显著性相关, 见表 1。

2.4 结直肠癌 CXCL2 高表达的预后价值 68 例结直肠癌患者术后随访期间死亡。本研究观察了 CXCL2 高表达、分化程度、TNM 分期、原发肿瘤的浸润程度、淋巴结转移和 CEA 水平等各因素与结直肠癌患者生存期的相关性, 并用 Kaplan-Meier 分析各因素的预后价值(表 2)。Kaplan-Meier 分析显示

2 结 果

2.1 结直肠癌 CXCL2 mRNA 过表达 利用 Oncomine 芯片数据库, 本研究从 6 个独立的研究中发现结直肠癌组织 CX-CL2 mRNA 的表达水平平均高于正常组织, 并且根据肿瘤和正常组织 CXCL2 mRNA 的平均表达值的比较, 肿瘤和正常组织间均存在显著性差异(*P*<0.0001)。

2.2 免疫组化染色分析结直肠癌及其癌旁组织 CXCL2 蛋白表达 为了进一步研究 CXCL2 蛋白在癌组织及其癌旁组织中的表达, 本研究用免疫组化染色分析 198 例原发性结直肠癌和 86 例癌旁组织。图 1 显示, 在各个水平上检测阳性染色, 主要存在于结直肠癌细胞的胞质中。癌组织 CXCL2 染色评分较其癌旁组织高, 31.31%(62/198)的结直肠癌组织检测出细胞质 CXCL2 蛋白高表达。因此, 结合 CXCL2 mRNA 分析数据, 本研究确认结直肠癌组织 CXCL2 蛋白的过表达。

CXCL2 高表达的结直肠癌患者比 CXCL2 低表达组的生存期显著缩短(*P*<0.001)。其生存曲线也显示 CXCL2 高表达组的总生存率显著减小(*P*<0.001), 见图 2。通过调整患者的性别、年龄、肿瘤部位、分化程度、肿瘤分期和淋巴结转移, 作进一步多变量 Cox 回归分析, CXCL2 高表达(*P*<0.001)、TNM 分期(*P*=0.002)和 CEA 水平(*P*=0.027)对结直肠癌预后不良的判断仍然是独立的预测因素, 见表 3。研究结果表明 CXCL2 高表达可作为结直肠癌的预后标志物。

表1 细胞质 CXCL2 表达与结直肠癌患者临床病理特征的相关性

临床病理因素	<i>n</i>	低表达	高表达	χ^2	<i>P</i>
		[<i>n</i> (%)]	[<i>n</i> (%)]		
性别	男性	126	86(68.25)	0.03	0.862
	女性	72	50(69.44)		

续表 1 细胞质 CXCL2 表达与结直肠癌患者临床病理特征的相关性						
临床病理因素		<i>n</i>	低表达 [<i>n</i> (%)]	高表达 [<i>n</i> (%)]	χ^2	<i>P</i>
年龄	<60 岁	65	45(69.23)	20(30.77)	0.013	0.908
	≥60 岁	133	91(68.42)	42(31.58)		
肿瘤部位	结肠	145	93(64.14)	52(35.86)	5.212	0.022
	直肠	53	43(81.13)	10(18.87)		
分化程度	中、高分化	166	113(68.07)	53(31.93)	0.18	0.671
	低分化	32	23(71.88)	9(28.13)		
TNM 分期	1	46	38(82.60)	8(17.39)	5.462	0.065
	2	78	51(65.38)	27(34.62)		
	3+4	74	47(63.51)	27(36.49)		
T	Tis+1+2	51	43(84.31)	8(15.69)	7.799	0.005
	3+4	147	93(63.27)	54(36.73)		
N	0	124	89(71.77)	35(28.23)	8.176	0.017
	1	57	40(70.18)	17(29.82)		
	2+3	17	7(41.18)	10(58.82)		
CEA	阴性	119	81(68.07)	38(31.93)	1.713	0.191
	阳性	24	13(54.17)	11(45.83)		
	未知	55	42(76.36)	13(23.64)		

表 2 Kaplan-Meier 单变量分析术后结直肠癌患者的生存期(月)				
项目		生存期 ($\bar{x}\pm s$)	生存期 95%CI	<i>P</i>
CXCL2 表达	低	56.24±1.29	53.71~58.77	<0.001
	高	33.02±2.99	27.16~38.88	
性别	女性	51.68±2.35	47.07~56.29	0.153
	男性	47.67±1.92	43.91~51.42	
年龄	<60 岁	48.97±2.64	43.80~54.14	0.929
	≥60 岁	49.21±1.84	45.61~52.81	
肿瘤部位	直肠	50.11±1.74	46.70~53.52	0.169
	结肠	46.59±2.89	40.92~52.27	
分化程度	中、高分化	50.53±1.57	47.45~53.61	0.044
	低分化	41.70±4.18	33.51~49.89	
TNM 分期	1	59.73±1.55	56.69~62.76	<0.001
	2	49.46±2.30	44.95~53.97	
	3+4	42.08±2.75	36.68~47.48	
T	Tis+1+2	59.36±1.52	56.39~62.33	<0.001
	3+4	45.52±1.86	41.88~49.17	
N	0	53.34±1.62	50.18~56.51	<0.001
	1	45.46±3.14	39.29~51.62	
	2+3	30.85±4.91	21.22~40.47	
CEA	阴性	51.59±1.73	48.20~54.98	0.001
	阳性	38.13±5.12	28.10~48.15	

表 3 Cox 多变量回归分析术后结直肠癌患者的总生存率							
项目	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>	95.0%CI
CXCL2	1.778	0.306	33.702	1	0.000	5.920	3.248~10.791
TNM	0.653	0.222	8.613	1	0.003	1.921	1.242~2.970
CEA	0.758	0.325	5.461	1	0.019	2.135	1.130~4.032

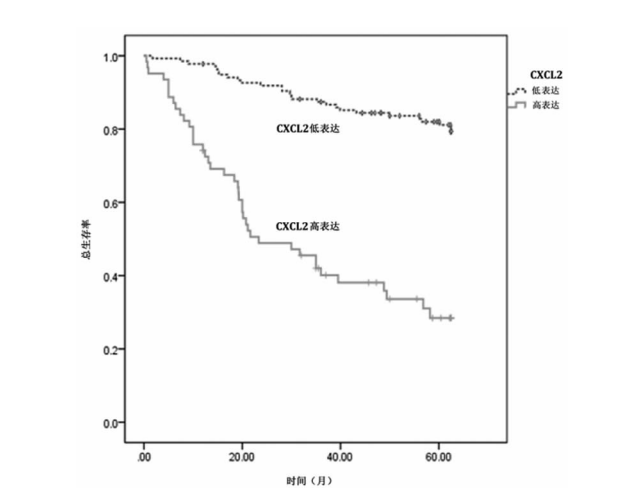


图 2 结直肠癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨 论

最近,CXCL2 作为一种潜在致癌因子已用于如食管鳞状细胞癌^[11]、黑色素瘤^[12]等几种人类癌症的检测。CXCL2 在结直肠癌中的作用所知甚少。到目前为止,在笔者检索范围内只有 2 个研究探讨了 CXCL2 在结肠肿瘤中的潜在作用:使用 qRT-PCR^[13],结肠癌相比正常结肠组织 CXCL2 mRNA 的表达显著增加;在之前的相关研究中^[4],CXCL2 mRNA 的表达在癌变前的腺瘤中也是增加的,它表明 CXCL2 失调可能是结肠肿瘤发生的早期阶段。本研究从 6 个独立的研究数据中使用 cDNA 芯片数据作进一步统计分析,结果显示与正常组织相比,CXCL2 mRNA 在恶性结直肠组织中过表达。

本研究检测了结直肠癌及其癌旁组织 CXCL2 蛋白的表达情况,探讨了其表达水平与结直肠癌临床病理特征之间的潜在相关性,研究 CXCL2 表达与患者预后之间的关系。一些有趣的观察结果本研究将在下面进行讨论。

首先,本研究采用免疫组化染色技术显示 CXCL2 蛋白在 198 份结直肠癌组织(包括疾病的各个阶段)较 86 份癌旁组织中表达高。这种过表达与肿瘤上皮细胞有关,而与炎性细胞或非上皮间质无关。有趣的是,当根据部位分为结肠和直肠两类时,CXCL2 高表达在结肠中明显比在直肠中频繁(*P*=0.022)。最近,直肠癌和结肠癌被认为是截然不同的两种癌症,因为它们具有不同的临床表现、预后,可能在遗传和流行病学上也有不同^[14-15]。因此,CXCL2 表达可能通过一种特殊的方式影响结直肠组织的致癌作用。本研究的结果进一步表明结肠癌和直肠癌存在不同的病因。此外,CXCL2 表达与原发肿瘤的浸润程度和淋巴结转移显著相关,CXCL2 高表达与更高的肿瘤分期有关,更易发生淋巴结转移。这些结果表明,结直肠癌细胞质 CXCL2 过表达可能促进癌症细胞侵袭和转移。以前的研究也显示,增加 CXCL2 表达参与进展和侵袭如食管鳞状细胞癌^[11]、黑色素瘤^[12]等几种类型的癌。本研究的数据清楚地表明,细胞质 CXCL2 高表达与极差的生存率有关。多因素方差分析显示,CXCL2 表达可作为结直肠癌患者的 1 项独立预

后因素。除了 CXCL2 高表达外, TNM 分期和高 CEA 水平被认为是结直肠癌不良预后的独立因素。因此, CXCL2 表达可能是人类结直肠癌转归性质的一个重要预后因素。CXCL2 对于确定结直肠癌患者治疗目标具有潜在价值。

事实上, CXCL2 在结直肠癌病理生理中的致癌作用和进展中所起的作用尚不清楚。CXCL2(一种经典的中性粒细胞化学诱导物)不仅是由中性粒细胞产生的第一个趋化因子,而且发挥招募中性粒细胞、释放颗粒酶和表达黏附分子的作用,从而增加炎症效应^[4]。慢性炎症可能会增加患癌症的风险^[16-17]。CXCL2 在炎症中过表达并趋化中性粒细胞与其受体 CXCR2 结合。CXCL2 在与结肠炎相关结肠癌的发生和发展中起着关键作用, CXCL2/CXCR2 轴可能对减少溃疡性结肠炎相关结肠癌的风险是有用的^[4,13]。有足够的证据表明,趋化因子除了在炎症反应和进展中发挥作用外,它在癌症中也发挥重要作用^[18-19]。CXCL2 通过结合受体 CXCR2,增加口腔鳞状细胞癌基质金属蛋白酶(MMPs)产物,可能参与癌症进展^[19]。Wang 等^[20]也发现 CXCL2/CXCR2 通过激活 ERK1/2 途径形成一个自分泌环路,明显有助于原发性食管鳞状细胞癌扩散。本研究结果表明, CXCL2 在结直肠癌细胞而非炎症细胞的细胞质中过表达。然而, CXCL2 蛋白表达与临床病理特征之间的关系只是局限于采用肿瘤组织芯片对临床资料的观察, CXCL2 在结直肠癌致癌作用中有关自分泌或旁分泌机制和所涉及的信号通路仍有待阐明。需要进一步的体外和体内研究来探讨 CXCL2 在结直肠癌中的生物功能。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Rao CV, Yamada HY. Genomic instability and colon carcinogenesis: from the perspective of genes [J]. Front Oncol, 2013, 3: 130.
- [3] Khan S, Cameron S, Blaschke M, et al. Differential gene expression of chemokines in KRAS and BRAF mutated colorectal cell lines: role of cytokines [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(11): 2979-2994.
- [4] McLean MH, Murray GI, Stewart KN, et al. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15366.
- [5] Graudens E, Boulanger V, Mollard C, et al. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses [J]. Genome Biol, 2006, 7(3): R19.
- [6] Kaiser S, Park YK, Franklin JL, et al. Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumor models and human colon cancer [J]. Genome Biol, 2007, 8(7): R131.
- [7] Sabates-Bellver J, Van der Flier LG, de Palo M, et al. Transcriptome profile of human colorectal adenomas [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(12): 1263-1275.
- [8] Gaedcke J, Grade M, Jung K, et al. Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2010, 49(11):

1024-1034.

- [9] Skrzypczak M, Goryca K, Rubel T, et al. Modeling oncogenic signaling in colon tumors by multidirectional analyses of microarray data directed for maximization of analytical reliability [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13091.
- [10] Sun R, Wang X, Zhu H, et al. Prognostic value of LAMP3 and TP53 overexpression in benign and malignant gastrointestinal tissues [J]. Oncotarget, 2014, 5(23): 12398-12409.
- [11] Dong QM, Zhang JQ, Li Q, et al. Clinical significance of serum expression of GRObeta in esophageal squamous cell carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(21): 2658-2662.
- [12] Owen JD, Strieter R, Burdick M, et al. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins [J]. Int J Cancer, 1997, 73(1): 94-103.
- [13] Doll D, Keller L, Maak M, et al. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival [J]. Int J Colorectal Dis, 2010, 25(5): 573-581.
- [14] Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, et al. PLA2 (group II A phospholipase A2) as a prognostic determinant in stage II colorectal carcinoma [J]. Ann Oncol, 2009, 20(7): 1230-1235.
- [15] Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer [J]. Cancer J, 2010, 16(3): 196-201.
- [16] Inoue Y, Iwata T, Okugawa Y, et al. Prognostic significance of a systemic inflammatory response in patients undergoing multimodality therapy for advanced colorectal cancer [J]. Oncology, 2013, 84(2): 100-107.
- [17] Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, et al. Inflammation-based prognostic system predicts survival after surgery for stage IV colorectal cancer [J]. Am J Surg, 2013, 205(1): 22-28.
- [18] Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment [J]. J Clin Invest, 2013, 123(11): 4836-4848.
- [19] Shang K, Bai YP, Wang C, et al. Crucial involvement of tumor-associated neutrophils in the regulation of chronic colitis-associated carcinogenesis in mice [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51848.
- [20] Wang B, Khachigian LM, Esau L, et al. A key role for early growth response-1 and nuclear factor-kappaB in mediating and maintaining GRO/CXCR2 proliferative signaling in esophageal cancer [J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(5): 755-764.