

## 趋化因子受体 CXCR4 在颅咽管瘤中的表达及其与预后的关系

刘健刚<sup>1)</sup>, 陈乾<sup>1)</sup>, 周良学<sup>2)</sup>, 徐建国<sup>2)</sup>, 游潮<sup>2)</sup>

(1) 深圳市儿童医院神经外科, 广东深圳 518026; 2) 四川大学华西医院神经外科,  
四川成都 610041)

**[摘要]** **目的** 检测颅咽管瘤组织中趋化因子受体 CXCR4 的表达, 并观察其与肿瘤复发的关系. **方法** 40 例釉质上皮型 (ACP) 和 40 例鳞状乳头型 (SCP) 颅咽管瘤病例, 根据各组术后复发情况再分为复发组和非复发组, 采用免疫组化 (SPT 法) 测定趋化因子受体 CXCR4 在各组中的表达情况. **结果** 40 例釉质上皮型组 14 例患者复发, 40 例鳞状乳头型组 6 例患者复发. 釉质上皮型组与鳞状乳头型组间复发率和趋化因子受体 CXCR4 表达差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 各组中复发组与非复发组间趋化因子受体 CXCR4 表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). **结论** 颅咽管瘤的病理亚型和趋化因子受体 CXCR4 的表达与肿瘤预后及复发有关, 可能预测肿瘤复发危险性.

**[关键词]** 颅咽管瘤; CXCR4; 预后; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 06-0088-04

## Expression of CXCR4 in Craniopharyngiomas and Its Correlation with Prognosis

LIU Jian-gang<sup>1)</sup>, CHEN Qian<sup>1)</sup>, ZHOU Liang-xue<sup>2)</sup>, XU Jian-guo<sup>2)</sup>, YOU Chao<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Neurosurgery, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen Guangdong 518026; 2) Dept. of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of CXCR4 in craniopharyngiomas and observe the relation between the expression and the recrudescence of craniopharyngiomas. **Methods** 40 adamantine craniopharyngioma (ACP) patients and 40 squamous craniopharyngioma (SCP) patients were enrolled in this study, and each group was then divided into recurrence group and recurrence-free group. The expression of CXCR4 was evaluated in each group by immunohistochemical method (avidin-biotin-peroxidase). **Results** 14 of 40 ACP patients and 6 of 40 SCP patients had recurred during follow-up. CXCR4 expression and recurrence rate showed significant difference between ACP group and SCP group ( $P < 0.05$ ). CXCR4 expression between recurrence group and recurrence-free group was significantly different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The subtype and CXCR4 expression in craniopharyngiomas are related to the prognosis of tumor and thus may be useful in predicting the risk of tumor relapse.

**[Key words]** Craniopharyngioma; CXCR4; Prognosis; Immunohistochemistry

趋化因子 SDF-1 和其配体 CXCR4 是趋化因子大家族中重要的一员, SDF-1/CXCR4 生物轴参与机体许多重要生理和病理过程, 公认与多数肿瘤的增殖、粘附、侵袭和复发有密切关系<sup>[1-9]</sup>. SDF-1/CXCR4 在中枢神经系统中表达意义重大,

其异常表达可引起中枢神经系统肿瘤等疾病的发生. 目前 CXCR4 已被认为是星形胶质细胞瘤、转移瘤、髓母细胞瘤, 甚至侵袭性垂体瘤等疾病侵袭行为的分子标记<sup>[4,5-10]</sup>.

颅咽管瘤 (craniopharyngioma, CP) 是一种最

**[基金项目]** 深圳市科技计划基金资助项目 (201003153)

**[作者简介]** 刘健刚 (1977~), 男, 吉林辽源市人, 医学博士, 主治医师, 主要从事神经外科临床工作.

常见的生长缓慢的先天性良性颅内肿瘤, 好发于鞍区, 一般认为起源于颅颊囊的残余部分. WHO 将肿瘤分为釉质上皮型 (adamantine cranio pharyngioma, ACP) 和鳞状乳头型 (squamous cranio pharyngioma, SCP), 组织学上定义为良性, 但两种亚型临床表现差异极大, 前者较后者具有更强的侵袭性和复发的生物学特点<sup>[11-13]</sup>. 本实验通过免疫组织化学方法检测颅咽管瘤组织中 CXCR4 的表达, 分别比较釉质上皮型组与鳞状乳头型组及复发组与非复发组肿瘤细胞 CXCR4 表达的差异, 并探讨其与肿瘤预后的关系.

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象和分组

本实验为回顾性队列研究, 收集四川大学华西医院神经外科 2000 年 1 月至 2007 年 12 月手术患者标本, 经纳入、排除标准进行筛选入组. 纳入标准: (1) 第 1 次接受手术, 术前未经放疗、化疗; (2) 手术方案由全科室讨论, 由有经验的神外科医生进行手术操作, 术后由 2 位以上病理科医生共同判定肿瘤为颅咽管瘤, 并区分亚型; (3) 肿瘤最大径 > 2 cm, 术中由 2 位以上医生共同认为达到全切、术后即复查 MRI 未见肿瘤残余; (4) 患者术后服从随访, 资料齐全. 排除标准: (1) 随访期内接受放化疗者; (2) 术后死因不明者或死于其他明确病因者; (3) 术后失随访者. 收集符合标准病例, 采用随机抽样的方法筛选出釉质上皮型 ACP 和鳞状乳头型 SCP 患者各 40 例, 其中男性 45 例, 女性 35 例, 同时, 将 10 例外伤后内减压脑组织作对照. 所有标本经 10% 福尔马林液固定, 常规石蜡包埋, 4 μm 厚连续切片, 贴于涂有多聚赖氨酸防脱胶的载玻片, 烤片后备用. 除 1 张切片经 HE 染色以复核诊断外, 其余留作免疫组化用.

### 1.2 主要试剂及设备

鼠抗人多克隆抗体 CXCR4 (1:100, Santa Cruz), 免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中三杉金桥生物技术有限公司. TE2000-U 正置生物显微镜 (Olympus, 日本); Image-Pro Plus 6 专业图像分析软件 (Media Cybernetics, 美国).

### 1.3 免疫组化染色

石蜡切片 APES 液浸泡后, 置于恒温 60 °C 烤箱 3 h 防止脱片, 二甲苯脱蜡. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下与切片孵育 10 min 以灭活内源性酶, 切片浸入 0.01 mol/L 的枸橼酸盐缓冲液微波加热修复抗原. 3%

Triton X-100 处理后, 正常山羊血清封闭. 分别加入 CXCR4 一抗, 4 °C 过夜后加入 1:200 稀释的生物素标记的二抗, 后加入链亲和素过氧化物酶标记的三抗 (1:200 稀释). DAB 显色, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片. 取已知鳞状上皮肿瘤作阳性对照, PBS 代替一抗行阴性对照.

### 1.4 免疫组化评估

肿瘤细胞浆 (部分细胞出现膜表达) 出现棕黄色免疫沉淀物为 CXCR4 阳性表达. 参考相关文献<sup>[14]</sup>进行肿瘤细胞阳性分析. 先在高倍镜随机选择 10 个高倍视野, 每个视野记数 100 个肿瘤细胞, 避开肿瘤边缘和坏死区, 根据阳性瘤细胞数目所占百分比得出 CXCR4 标记指数 (Labeling index, LI):

$$\text{CXCR4 LI} = \frac{\text{阳性瘤细胞数}}{1000 \text{ 个瘤细胞}} \times 100\%$$

分为以下 4 级计分: I: 0 分, < 10%; II: 1 分, 10 ~ 25%; III: 2 分, 25 ~ 50%; IV: 3 分, > 50%. 染色强度按瘤细胞深浅 (与间质细胞比较) 记分: 0 分, 不着色; 1 分, 弱; 2 分, 中等; 3 分, 强. 将 2 个分值相加即得出该例标本的免疫组化阳性分度: 0 ~ 1 分为阴性, 记为 (-); ≥ 2 分为阳性, 2 分为弱阳性 (+), 3 ~ 4 分为中等阳性(++), ≥ 5 分以上为强阳性(+++). 本实验中 ≤ 2 分均记为弱阳性 (-); > 2 分均记为阳性 (+).

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 统计软件包进行统计, 两样本率的比较采用四格表资料的  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 肿瘤复发率

80 例颅咽管瘤患者平均随访 9.05 a. 40 例 ACP 中有 14 例患者复发, 复发率为 35.0% (14/40); 40 例 SCP 中有 6 例患者复发, 复发率为 15.0% (6/40). 颅咽管瘤 2 个亚型复发率之间的比较有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.27$ ,  $P < 0.05$ ), ACP 较 SCP 更易于复发.

### 2.2 CXCR4 在原发 ACP 和 SCP 中的表达模式及分布特征

免疫组化阳性表达为细胞膜和细胞浆着色, 以细胞膜着色为主. ACP 肿瘤组织中可见巢状瘤细胞团侵入周围胶质组织甚至正常神经节细胞间生长, 这类瘤细胞团中 CXCR4 染色较深 (见图 1), 而在 SCP 肿瘤则很少发现这种指状或条带状瘤细胞团向周围突入性生长 (见图 2). CXCR4 在 ACP

总体表达率 75.0%，强阳性为 32.5%，中等阳性为 42.5%；SCP 总体阳性表达率为 45.0%，强阳性占 17.5%，中等阳性为 27.5%，见表 1。CXCR4 在

ACP 中表达强于在 SCP 组 ( $P < 0.05$ )；颅咽管瘤 2 个亚型的复发组 CXCR4 表达强于非复发组 ( $P < 0.05$ )，见表 2。

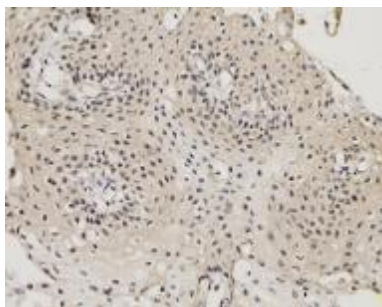


图 1 ACP 组织中可见部分巢状肿瘤细胞团呈指状侵入周围脑胶质层生长 (SPT × 100)

Fig. 1 Nested tumor cell aggregates were found and invaded into the surrounding stratum gelatinosum in SCP group (SPT × 100)

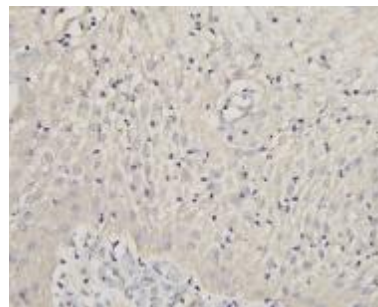


图 2 SCP 很少见到巢状肿瘤细胞团的侵袭生长现象 (SPT × 100)

Fig. 2 Almost no nested tumor cell aggregates were found in SCP group (SPT × 100)

表 1 CXCR4 在颅咽管瘤组织中的表达情况 (n)

Tab. 1 The expression of CXCR4 in craniopharyngiomas (n)

分 组	n	阴性 (-)	弱阳性 (+)	中等阳性 (++)	强阳性 (+++)
ACP 组	40	5	5	17	13
SCP 组	40	9	13	11	7

表 2 颅咽管瘤各亚型及复发组、非复发组间 CXCR4 的表达情况 (n)

Tab. 2 The expression of CXCR4 in craniopharyngioma patients with different subtypes in recurrence group and recurrence-free group (n)

组 别	n	阳性 (n)	阳性率 (%)
ACP	40	30	75.0*
复发 ACP	14	13	92.8 <sup>△</sup>
非复发 ACP	26	17	65.4
SCP	40	23	45.0
复发 SCP	6	4	83.3 <sup>△</sup>
非复发 SCP	34	22	38.2

与 SCP 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与非复发组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

### 3 讨论

本实验中,笔者采用免疫组化方法检测并分析 CXCR4 在 80 例 CP 中的表达模式及分布特点,结果发现 CXCR4 在各组肿瘤中阳性表达率较正常组织增加,且在 ACP 组明显高于 SCP 组;CXCR4 高表达与肿瘤的高复发率有关联;实验的结果证实了 CXCR4 在颅咽管瘤中高表达,并在肿瘤的侵

袭和复发中发挥重要作用。

大量研究证实 SDF-1/CXCR4 生物轴参与机体许多重要生理和病理过程,在中枢神经系统正常发育和病理改变中同样意义重大,SDF-1 在早期对轴索定向生长和神经元前体细胞迁移及细胞性能的保持必不可少,之后,通过调节细胞迁移和辅助神经元归巢等促进中枢神经系统发育成熟,并维持其稳定。CXCR4 在中枢神经系统中表达丰富,特别是在室管膜下神经细胞、垂体腺、海马、脉络丛等部位为甚。CXCR4 的异常表达可引起中枢神经系统的病理状态。目前发现,星形胶质细胞瘤、转移瘤、髓母细胞瘤,甚至是垂体瘤等过度表达 CXCR4,可能与肿瘤的发生和转移密切相关<sup>[4,9,10,14,15]</sup>。

本实验发现 CXCR4 在正常脑组织中几乎不表达,偶有个别细胞出现弱表达;在颅咽管瘤 2 个亚型中均有表达,在 ACP 的星网状细胞和临近腔面的细胞层和旋涡状结构中的细胞表达更明显,而在基底层细胞表达不明显。在原发肿瘤中均显示 CXCR4 中度阳性者常见,强阳性表达者次之,弱阳性率及阴性率低,ACP 组表达普遍强于 SCP 组。上述结果提示 CXCR4 生物轴在颅咽管瘤的发生发展中具有重要作用,可能是通过相关信号传导

通路促进肿瘤细胞的生长与增殖.

在肿瘤临床特点方面, ACP 比 SCP 具有更高的侵袭性和复发率. 结合肿瘤临床特点分析, 笔者发现 CXCR4 的高表达与下列临床特征关系密切: (1) 其在 CP 的指状突起或漩涡状细胞中表达强度; (2) 钙化; (3) 复发; (4) 年龄、这些特点主要为 ACP 的临床特点, 而发现其与肿瘤大小、性别关系不密切. 上述特点提示 SDF-1/CXCR4 生物轴在 ACP 中扮演的角色较 SCP 中更重要, 主要涉及肿瘤的侵袭性和复发率相关的临床特点, 提示 CXCR4 的高表达容易导致肿瘤复发, 也从一个方面解释 ACP 较 SCP 更容易复发的原因, 其可能机制是该轴通过相关信号通路促进了肿瘤细胞的生长、粘附和侵袭. 通过相关性分析发现 CXCR4 的阳性表达与肿瘤的复发存在正相关关系, 特别是复发患者中 CXCR4 的阳性表达率高达 80% 以上, 也从反向证实 CXCR4 的高表达可能促进肿瘤的发展及侵袭.

趋化因子在血管生成过程中发挥着重要而复杂的作用. 有研究报道, 在缺乏 CXCR4 的基因敲除小鼠中出现血管发育缺乏现象. 此外, 越来越多的研究证实 CXCR4 作为内皮细胞表达的一种重要的趋化因子, 可通过促进血管生成而在肿瘤生长方面发挥间接作用. Yasargil 等认为颅咽管瘤是位于蛛网膜下腔池的肿瘤, 他们观察到巢状瘤细胞团(整合素  $\alpha v \beta 3$  染色较强)可突入正常脑组织生长. 这是由于肿瘤组织沿蛛网膜固有间隙生长, 还是肿瘤组织突破蛛网膜、软脑膜侵入脑组织及血管壁, 笔者在颅咽管瘤组织的瘤血管内皮细胞上同样观察到 CXCR4 高表达; 在肿瘤周围组织和瘤血管周围的吞噬细胞(中性粒细胞和单核细胞)上也可见 CXCR4 的表达, 这提示颅咽管瘤内和瘤周高浓度的 CXCR4 可以促进肿瘤细胞和血管内皮细胞的生长增殖, 从而形成肿瘤新生供血管. 微血管形成与局部复发和侵袭性生长密切相关, 这可能成为预测颅咽管瘤高复发率的一个重要机理.

#### [参考文献]

- [1] BOLDAJIPOUR B, MAHABALESHWAR H, KARDASH E, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration[J]. *Cell*, 2008, 132:463 - 473.
- [2] PETIT I, JIN D, RAFII S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis

[J]. *Trends Immunol*, 2007, (28):299 - 307.

- [3] LI M, RANSOHOFF R M. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, (84):116 - 131.
- [4] STRUCKMANN K, MERTZ K, STEU S, et al. pVHL coordinately regulates CXCR4/CXCL12 and MMP2/MMP9 expression in human clear-cell renal cell carcinoma[J]. *J Pathol*, 2008, 214:464 - 471.
- [5] BORRELL V, MARIN O. Meninges control tangential migration of hemiderived Cajal Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9:1 284 - 1 293.
- [6] CALLEWAERE C, BANISADR G, DESARMENIEN M G, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4[J]. *PNAS*, 2006, 103:8 221 - 8 226.
- [7] ROT A, VON ANDRIAN U H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2004, 22:891 - 928.
- [8] MANTOVANI A, ROMERO P, PALUCKA A K, et al. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment [J]. *Lancet*, 2008, 371(9 614):771 - 783.
- [9] SPOO A C, LUBBERT M, WIERDA W G, et al. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109:786 - 791.
- [10] DRIESSEN W H, FUJII N, TAMAMURA H, et al. Development of peptidetargeted lipoplexes to CXCR4-expressing rat glioma cells and rat proliferating endothelial cells [J]. *Mol Ther*, 2008, 16:516 - 524.
- [11] KARAVITAKI N, CUDLIP S, ADAMS C B, et al. Craniopharyngiomas [J]. *Endocr Rev*, 2006, 27(4):371 - 397.
- [12] GARRE M L, CAMA A. Craniopharyngioma: modern concepts in pathogenesis and treatment [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2007, 19(4):471 - 479.
- [13] ULLRICH N J, SCOTT R M, POMEROY S L. Craniopharyngioma therapy: long-term effects on hypothalamic function [J]. *Neurologist*, 2005, 11(1):55 - 60.
- [14] WU B, CHIEN E, MOL C D, et al. Structures of the CXCR4 Chemokine GPCR with Small-Molecule and Cyclic Peptide Antagonists [J]. *Science*, 2010, 330:1 066 - 1 071.
- [15] GRUNEWALD M, AVRAHAM I, DOR Y, et al. VEGF induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells [J]. *Cell*, 2006, 124:175 - 189.

(2012 - 02 - 03 收稿)