

· 肿瘤学研究 ·

## 肝癌组织 CCR1 表达与患者预后的关系

武正山,刘一纬,吴晓峰\*

南京医科大学第一附属医院肝胆中心,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究CC趋化因子受体1(C-C motif chemokine receptor 1, CCR1)蛋白在人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及与临床病理因素和预后的相关性。方法:构建288例HCC组织芯片,应用免疫组化(三步法)检测288例HCC组织中CCR1蛋白的表达情况,对随访资料作单因素和多因素相关生存分析。结果:CCR1在HCC组织中的表达显著高于癌旁组织,CCR1阳性组的无瘤生存期和总体生存期显著低于阴性组。多因素分析显示CCR1阳性是HCC术后无瘤生存期和总体生存期的独立危险因素。结论:检测HCC中CCR1的表达水平有助于术后复发的预测。

[关键词] 肝细胞癌;CCR1;组织芯片;免疫组织化学;预后

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)12-1737-05

doi:10.7655/NYDXBNS20191206

## The relationship of CCR1 expression in hepatocellular carcinoma tissue and the prognosis of patients

Wu Zhengshan, Liu Yiwei, Wu Xiaofeng\*

Hepatobiliary Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression of C-C motif chemokine receptor 1 (CCR1) protein in human hepatocellular carcinoma (HCC) and its correlation with clinicopathological factors and prognosis. **Methods:** Immunohistochemistry (three-step method) was used to detect the expression of CCR1 protein in tissue microarray constructed by 288 cases of HCC. Univariate and multivariate Cox regression models were performed on follow-up data. **Results:** The expression of CCR1 in HCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. The tumor-free survival and overall survival of CCR1 positive expression group were significantly lower than those of CCR1 negative expression group. Multivariate Cox regression models showed that positive expression of CCR1 was an independent risk factor for tumor-free survival and overall survival after surgery. **Conclusion:** Detection of CCR1 expression in HCC is helpful for the prediction of postoperative recurrence.

[Key words] hepatocellular carcinoma; CCR1; tissue microarray; immunohistochemistry; prognosis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(12): 1737-1740, 1746]

随着对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)高危人群监测的推广和诊疗策略的改进,部分肝癌患者因为早期发现、早期诊断及综合治疗而获得长期生存,但是肝癌的转移复发使整体治疗效果仍难以令人满意。趋化因子及其受体的相互作用参与肿瘤的侵袭转移是肿瘤研究热点<sup>[1]</sup>。越来越多的研

究证实CC趋化因子受体1(C-C motif chemokine receptor 1, CCR1)促进HCC的侵袭和转移,但是临床上通过高通量的组织芯片探讨CCR1与HCC预后的关系尚待深入研究。本研究使用免疫组织化学技术检测CCR1在288例HCC组织芯片中的表达强度,分析其与HCC根治术后复发转移、无瘤生存期和总体生存期的相关性,从而探索CCR1预测HCC肝切术后复发和判断预后的价值,以便对于高危人群进行干预治疗,以进一步提高HCC的临床诊疗水平。

[基金项目] 国家自然科学基金(81472306)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wuxf@njmu.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

组织芯片(TMA)由288例HCC组织和对应的相邻非癌组织组成,标本来自本院1997年1月—2000年12月行肝切除术的HCC患者,符合以下条件:肝切除术未行其他抗肿瘤治疗;组织病理学证实为HCC。患者的临床信息包括性别、年龄、肿瘤大小、甲胎蛋白、TNM分期等信息。288例中,男243例,女45例;在TNM分期中,1期174例,2期48例,3期66例;Edmondson分级,I~II级204例,III~IV级84例。患者均有术后随访的完整记录。根据手术日期至死亡日期或最后一次随访计算生存时间。此外,从术后随访记录中获取死亡日期。由公司构建组织芯片,应用组织穿刺针(直径1.0 mm)穿刺出石蜡标本组织芯,整齐排列在蜡块上制成组织阵列块,切片制成组织芯片。

### 1.2 方法

免疫组化染色采用SP法,第一抗体:鼠抗人CCR1抗体(R&D公司,美国)。第二抗体:生物素标

记的抗鼠抗体(Chemicon公司,美国),实验步骤严格按照试剂盒说明进行,DAB显色,苏木精复染。所有芯片染色均在相同条件下进行,常规设立空白对照、癌旁对照和阳性对照。所有组织芯片均在相同条件下进行染色。用已知染色阳性的组织进行阳性对照;应用相应浓度的血清代替抗体孵育组织切片作为空白对照。CCR1在HCC细胞浆或细胞膜呈棕黄色染色为阳性染色。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS12.0软件分析,定量资料用*t*检验,定性资料用卡方检验,生存分析用Kaplan-Meier曲线估计生存率,用Log-rank检验进行组间比较,危险因素的分析采用单因素和多因素Cox回归分析。*P* ≤ 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织芯片中CCR1表达情况

288例人HCC组织芯片免疫组化染色结果显示有200例(69.4%)呈阴性,88例(30.6%)呈阳性(图1);CCR1阴性和CCR1阳性患者的临床病理指标差

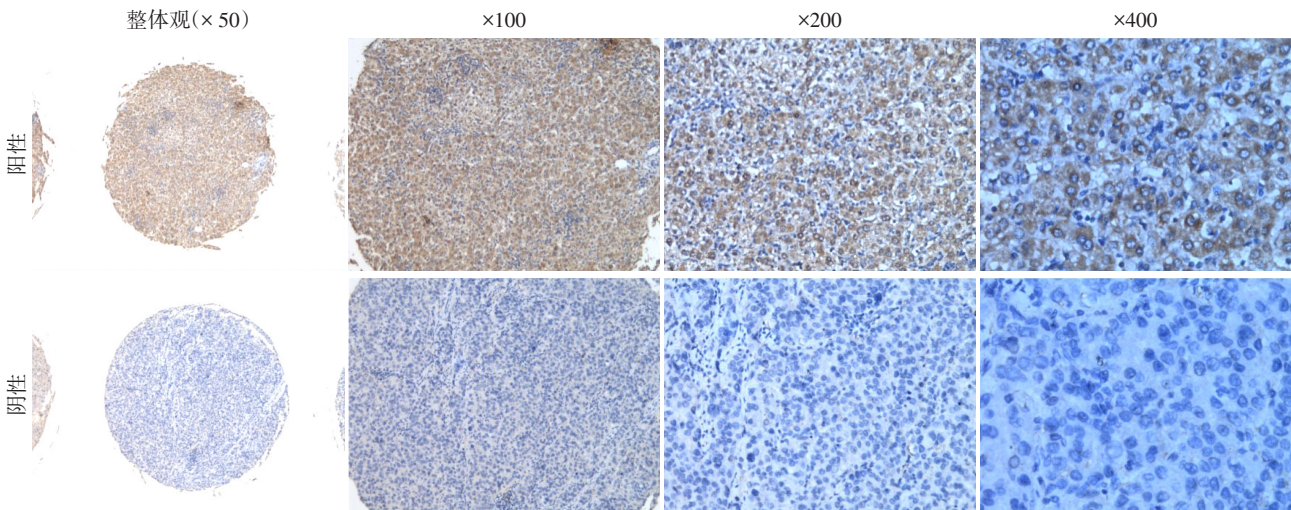


图1 肝癌组织芯片 CCR1 免疫组化染色

Figure 1 Immunohistochemical staining of CCR1 in HCC tissue microarray

异均无统计学意义(表1)

### 2.2 CCR1 表达与 HCC 术后复发和预后的关系

CCR1 阳性表达组的无瘤生存期和总生存期均显著低于阴性表达组,CCR1 阳性和肝癌患者的复发和长期生存明显相关(图2)。

### 2.3 Cox 单因素回归分析肝癌预后影响因素

发现影响肝癌切除术后无瘤生存期的高危因素包括TNM、肿瘤直径和CCR1 阳性表达;影响肝癌

切除术后总体生存率的高危因素包括HCV、TNM、肿瘤直径和CCR1 阳性表达(表2)。采用Cox 回归模型,多因素分析显示CCR1 染色阳性(HR =1.715, 95%CI: 1.230~2.390, *P*=0.001)是影响肝癌术后无瘤生存期的高危因素(表3),TNM 分期(HR =1.479, 95% CI: 1.183~1.849, *P*=0.001)和CCR1 染色阳性(HR =2.688, 95% CI: 1.150~2.109, *P*=0.009)是影响肝癌术后总体生存期的独立危险因素(表4)。

**表1 肝癌患者临床病理指标与肝癌组织CCR1表达的关系**  
**Table 1 Relationship between clinicopathological parameters and CCR1 expression in HCC**

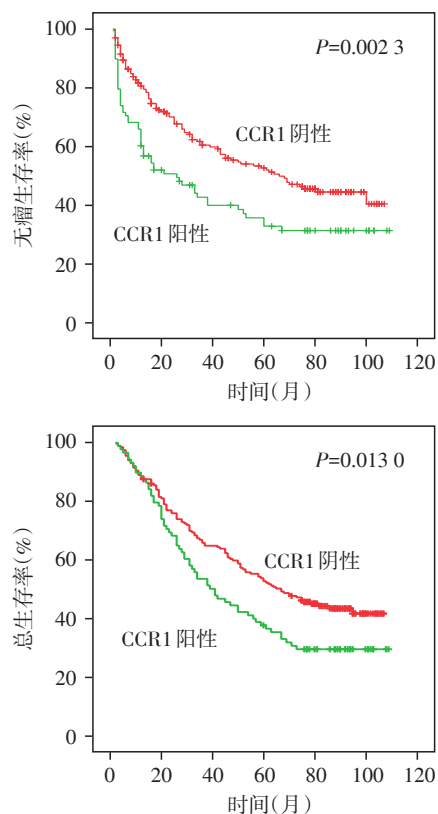
临床病理特征	CCR1 染色		P 值
	阴性 (n=200)	阳性 (n=88)	
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	51.5 ± 10.8	52.2 ± 11.3	0.590
性别[n(%)]			
男	169(84.5)	74(84.1)	0.529
女	31(15.5)	14(15.9)	
HBsAg[n(%)]			
阴性	30(15.0)	15(17.0)	0.390
阳性	170(85.0)	73(83.0)	
肝硬化[n(%)]			
无	32(16.0)	14(15.9)	0.568
有	168(84.0)	74(84.1)	
甲胎蛋白[n(%)]			
≤40 ng/mL	131(66.2)	62(71.3)	0.240
>40 ng/mL	67(33.8)	25(28.7)	
肿瘤大小[n(%)]			
≤5 cm	103(51.5)	36(40.9)	0.063
>5 cm	97(48.5)	52(59.1)	
肿瘤数目[n(%)]			
单个	149(74.5)	73(83.0)	0.076
多个	51(25.5)	12(17.0)	
肿瘤包膜[n(%)]			
完整	107(53.5)	55(62.5)	0.098
不完整	93(46.5)	33(37.5)	
Edmondson 分级[n(%)]			
I~II	136(68.0)	68(77.3)	0.072
III~IV	64(32.0)	20(22.7)	
pTNM 分期[n(%)]			
I	119(59.5)	55(62.5)	0.804
II	33(16.5)	15(17.0)	
III	48(24.0)	18(20.5)	

### 2.4 受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)

ROC 曲线可通过计算 ROC 曲线下面积 AUC 来判断预测预后的效率,结果示 CCR1 阳性均对无瘤生存和总体生存有预测作用(图3)。

### 3 讨论

趋化因子受体是 G 蛋白偶联的受体,包含 7 个跨膜结构域,在某些细胞表面上与称为趋化因子的细胞因子相互作用。研究表明 CCR1 表达于嗜中性粒细胞、单核细胞、T 和 B 淋巴细胞等免疫细胞表



**图2 HCC 患者中 CCR1 阳性组和阴性组间无瘤生存率和总生存率的比较**

**Figure 2 Comparison of tumor-free survival and overall survival between CCR1 - positive and negative groups in HCC patients**

**表2 Cox 单因素回归分析肝癌预后影响因素**

**Table 2 Univariate Cox regression analysis of factors affecting the prognosis of HCC**

因素	总体生存率 P 值	无瘤生存期 P 值
肝硬化	0.547	0.696
HBsAg	0.532	0.792
HCV	0.033	0.050
肿瘤直径	0.008	0.042
肿瘤分化	0.090	0.298
肿瘤包膜	0.075	0.555
肿瘤数目	0.051	0.076
TNM	<0.001	0.010
AFP	0.328	0.331
CCR1 阳性	0.006	0.003

面,并与其配体结合介导动脉粥样硬化和炎症反应<sup>[2]</sup>。CCR1 在不同癌症,包括多发性骨髓瘤、前列腺癌、结肠直肠癌中呈高表达。在多发性骨髓瘤的研究中表明,HIF-2 $\alpha$ 增加了 CCR1 表达,而 CCR1 表达上调通过介导 CCR1/CXCR4 信号通路影响患者的不良预后<sup>[3]</sup>。在前列腺癌中,CCR1 与 CCL5 的相互

表3 多因素分析患者各因素与术后无瘤生存期的关系

Table 3 Multivariate Cox regression analysis of factors affecting tumor-free survival in HCC patients

临床病理因素	风险比	95%CI	P值
肿瘤直径	1.168	0.814~1.675	0.339
TNM	1.216	0.946~1.562	0.127
CCR1染色阳性	1.715	1.230~2.390	0.001

表4 多因素分析患者各因素与术后总体生存时间的关系

Table 4 Multivariate Cox regression analysis of factors affecting overall survival in HCC patients

临床病理因素	风险比	95%CI	P值
HCV	1.314	0.701~2.463	0.395
肿瘤直径	1.364	0.957~1.943	0.086
TNM	1.479	1.183~1.849	0.001
CCR1染色阳性	2.688	1.150~2.109	0.009

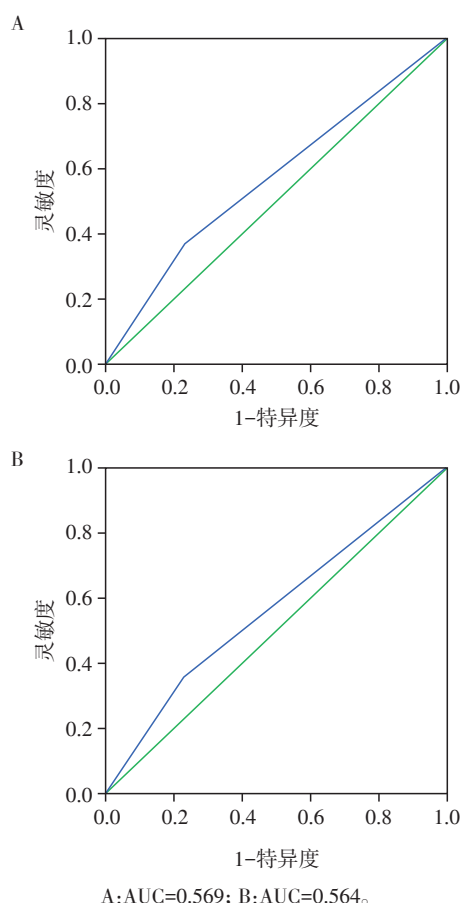


图3 ROC分析CCR1对无瘤生存(A)和总生存(B)的预测曲线

Figure 3 ROC analysis of CCR1 prediction curve for tumor-free survival(A) and overall survival(B)

作用是由CCR1表达增加引起的,其通过增加MMP2和MMP9的分泌以及激活ERK和Rac信号传导来促进PC3PR细胞的侵袭<sup>[4]</sup>。而在结直肠癌中,CXCL1

和CXCL8通过CXCR2将中性粒细胞募集到结直肠癌中,干预CXCL1/8-CXCR2轴可能是一种针对SMAD4阴性结直肠癌的新型治疗方法<sup>[5]</sup>。另外,CCL15-CCR1轴可能是预防结直肠癌肺转移的治疗靶标<sup>[6-7]</sup>。课题组前期研究证实CCR1不仅可以通过与配体结合增强肝癌细胞的运动能力,并且可以促进分泌MMP2降解细胞外基质,从而促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[8]</sup>。近年来研究提示硫酸皮肤素差向异构酶(DSE)可以调节肝癌CCL5/CCR1信号,参与DSE诱导的肝癌细胞恶性生物学行为<sup>[9]</sup>。

肝癌患者术后复发率高,严重影响其术后长期生存<sup>[10]</sup>。因此,预测患者肿瘤侵袭及转移的风险对于预测预后及指导临床治疗方针具有重要意义。已有研究初步探索CCR1趋化因子受体在人肝癌组织中表达及其临床意义,发现肝癌表达CCR1和门静脉浸润密切相关<sup>[11]</sup>。为了进一步研究CCR1表达是否和肝癌预后相关,本研究使用含288例HCC标本的组织芯片,高通量分析CCR1表达的强度和HCC预后的关系。在288例HCC组织芯片中,有200例CCR1呈阴性,88例CCR1呈阳性。统计学结果表明CCR1的表达强度和肝癌的分期和分化程度没有相关性。但是,研究发现CCR1的表达强度和肝癌患者术后无瘤生存和总生存期明显相关,CCR1阳性患者肝癌容易复发、预后较差、总体生存时间短。进一步研究发现CCR1是独立于分期和分化程度之外的危险因素。CCR1和复发及预后的明显相关性表明CCR1在HCC的侵袭中发挥重要作用,参与HCC的侵袭和转移。监测HCC肝切除术后CCR1的表达可以作为评价肿瘤复发及预后的指标。最近研究发现CCL15-CCR1轴形成了一个复杂的促进炎症微环境,阻断CCL15-CCR1轴可能是一种有效的治疗肝癌的方法<sup>[12]</sup>,提示CCR1是HCC治疗的潜在靶点,为未来HCC的靶向治疗提供更多选择。

[参考文献]

[1] 吴 飏,刘东方,张 纯,等. 缺氧微环境中胰腺星状细胞通过CCL7/CCR5轴促进胰腺癌侵袭[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2017,37(5):521-525  
 [2] Fox JM, Kausar F, Day A, et al. CXCL4/platelet factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration[J]. Sci Rep,2018,8(1):9466  
 [3] Vandyke K, Zeissig MN, Hewett DR, et al. HIF-2alpha promotes dissemination of plasma cells in multiple myeloma by regulating CXCL12/CXCR4 and CCR1 [J]. Cancer

(下转第1746页)

- [2] Man SM, Zhu Q, Zhu L, et al. Critical role for the DNA sensor AIM2 in stem cell proliferation and cancer [J]. *Cell*, 2015, 162(1):45-58
- [3] Wilson JE, Petrucelli AS, Chen L, et al. Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt[J]. *Nat Medicine*, 2015, 21(8):906-913
- [4] Dihlmann S, Tao S, Echterdiek F, et al. Lack of absent in melanoma 2 (AIM2) expression in tumor cells is closely associated with poor survival in colorectal cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(10):2387-2396
- [5] Hu B, Jin C, Li HB, et al. The DNA-sensing AIM2 inflammasome controls radiation-induced cell death and tissue injury[J]. *Science*, 2016, 354(6313):765-768
- [6] Zhang Q, Hu Q, Chu Y, et al. The influence of radiotherapy on AIM2 inflammasome in radiation pneumonitis [J]. *Inflammation*, 2016, 39(5):1827-1834
- [7] Chen LC, Wang LJ, Tsang NM, et al. Tumour inflammasome-derived IL-1beta recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(12):1276-1293
- [8] Ijichi K, Adachi M, Ogawa T, et al. Cell-cycle distribution and Thymidilate Synthase (TS) expression correlate with 5-FU resistance in head and neck carcinoma cells[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(6):2907-2911
- [9] Stoecklein VM, Osuka A, Ishikawa S, et al. Radiation exposure induces inflammasome pathway activation in immune cells[J]. *J Immunol*, 2015, 194(3):1178-1189
- [10] 彭雪婷,朱琨,闫融,等. 直肠癌腹腔镜手术长期疗效并不优于开腹手术:近10年经典随机对照试验的荟萃分析[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6):932-940
- [收稿日期] 2019-06-23

(上接第1740页)

- Res, 2017, 77(20):5452-5463
- [4] Kato T, Fujita Y, Nakane K, et al. CCR1/CCL5 interaction promotes invasion of taxane-resistant PC3 prostate cancer cells by increasing secretion of MMPs 2/9 and by activating ERK and Rac signaling[J]. *Cytokine*, 2013, 64(1):251-257
- [5] Ogawa R, Yamamoto T, Hirai H, et al. Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via the CXCL1/8-CXCR2 axis[J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(9):2887-1899
- [6] Yamamoto T, Kawada K, Itatani Y, et al. Loss of SMAD4 promotes lung metastasis of colorectal cancer by accumulation of CCR1 + tumor-associated neutrophils through CCL15-CCR1 axis[J]. *Clin Cancer Research*, 2017, 23(3):833-844
- [7] Inamoto S, Itatani Y, Yamamoto T, et al. Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by accumulation of myeloid-derived suppressor cells through the CCL15-CCR1 chemokine axis [J]. *Clin Rancer Res*, 2016, 22(2):492-501
- [8] Wu X, Fan J, Wang X, et al. Downregulation of CCR1 inhibits human hepatocellular carcinoma cell invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(4):866-871
- [9] Liao WC, Yen HR, Liao CK, et al. DSE regulates the malignant characters of hepatocellular carcinoma cells by modulating CCL5/CCR1 axis [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(2):347-362
- [10] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma reply [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(1):e2
- [11] 王晓颖,樊嘉,周俭,等. CCR1趋化因子受体在人肝癌组织中表达及其临床意义[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2006, 12(2):101-104
- [12] Liu LZ, Zhang Z, Zheng BH, et al. CCL15 recruits suppressive monocytes to facilitate immune escape and disease progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2019, 69(1):143-159
- [收稿日期] 2019-06-03