



**鲁凤民**, 北京大学基础医学院病原生物学系及北京大学感染病研究中心教授、学系主任, 博士生导师。长期从事病毒性肝炎、肿瘤等相关研究。主持或参加了国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项、国家高技术研究发展计划(863 计划)、国家重点基础研究发展计划(973 计划)及国家自然科学基金面上项目。担任国务院学位委员会基础医学学组委员、中国医药质量协会转化医学分会主任委员、中国研究型医院分子诊断专业委员会副主任委员、中华医学会医学病毒学分会委员、北京市医学病毒学分会副主任委员、中国微生物学会病毒学工作委员会常委、北京市微生物学会常委等, 并担任《中华肝脏病杂志》《中华预防医学杂志》等期刊常务编委或编委。主要学术成就是实验证实了乙型肝炎病毒 RNA 病毒样颗粒的存在, 提出了以血清乙型肝炎病毒 RNA 的持续消失作为慢性乙肝核苷(酸)类似物抗病毒治疗安全停药和准功能性治愈的概念。在 *New England Journal of Medicine*、*Journal of Hepatology*、*Cancer Research* 等 SCI 杂志发表论文 120 篇, 他引超过 3 200 次。曾作为参加人两次获得国家科学技术进步奖二等奖。



**陈香梅**, 北京大学基础医学院病原生物学系及北京大学感染病研究中心副教授, 博士生导师, 主要研究方向为病毒和宿主因素在乙肝疾病进展和肝癌发生中的作用及机制。主要研究工作包括: 乙型肝炎病毒整合的致癌新机制、乙型肝炎相关肝癌发生发展的分子机制、影响慢性乙型肝炎疾病进展的宿主遗传易感性等。近五年主持和参加的课题有国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项、国家自然科学基金面上项目、北京市自然科学基金面上项目、北京市科委首都市民培育项目等。现任中华医学会肝病学会青年委员、中华医学会病毒学分会临床病毒学组委员、北京市医学会肝病学会委员、中国医药质量管理协会转化医学分会副主任委员, 《中华肝脏病杂志》《微生物学免疫学进展》等杂志编委。作为第一作者或通信作者在 *Journal of Hepatology*、*Oncogene*、*Liver International* 等杂志发表 SCI 论文 20 余篇, 曾获得国家科学技术进步奖二等奖 1 次

(第 8 完成人)。

## 肝细胞癌中趋化因子 *CXCL10* 及其受体 *CXCR3* 的表达及临床意义分析

张 婧, 陈 洁, 关贵文, 张 婷, 鲁凤民<sup>△</sup>, 陈香梅<sup>△</sup>  
 (北京大学基础医学院病原生物学系暨北京大学感染病研究中心, 北京 100191)

**[摘 要]** **目的:** 探索趋化因子 *CXCL10* 及其受体 *CXCR3* 基因在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及其临床意义。**方法:** 通过挖掘癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)中 HCC 数据库和国际肝癌研究所(Liver Cancer Institute, LCI)中乙肝相关肝癌数据库, 分析 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因在 HCC 及癌旁组织中的表达以及与患者术后总生存率的关系; 采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)方法检测 45 例乙肝相关 HCC 患者临床样本中 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因的表达情况, 并分析 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因表达的相关性。

基金项目: 北京市自然科学基金(7182079) Supported by Beijing Natural Science Foundation(7182079)

<sup>△</sup> Corresponding author's e-mail, lu.fengmin@hsc.pku.edu.cn, xm\_chen6176@bjmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-5-10 14:10:37 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20190509.1005.004.html

**结果:**TCGA 数据库中 *CXCL10* 基因在 HCC 组织中的表达显著高于癌旁组织(非配对样本:  $3.379 \pm 2.081$  vs.  $2.213 \pm 2.274$ ,  $P < 0.001$ ; 配对样本:  $3.159 \pm 2.267$  vs.  $2.213 \pm 2.274$ ,  $P = 0.018$ ), LCI 数据库中 *CXCL10* 基因在 HCC 组织中的表达显著高于癌旁组织( $7.625 \pm 1.683$  vs.  $7.287 \pm 1.328$ ,  $P = 0.009$ ), TCGA 和 LCI 数据库中 *CXCL10* 基因高表达 HCC 患者术后总体生存率高于 *CXCL10* 基因低表达患者( $P = 0.107$ ,  $P = 0.002$ )。TCGA 数据库中 *CXCR3* 基因在 HCC 组织的表达显著高于癌旁组织(非配对样本:  $-0.906 \pm 1.697$  vs.  $-1.978 \pm 1.629$ ,  $P < 0.001$ ; 配对样本:  $-1.329 \pm 1.732$  vs.  $-1.978 \pm 1.629$ ,  $P = 0.037$ ), 而 LCI 数据库中 *CXCR3* 基因在乙肝相关 HCC 组织的表达显著低于癌旁组织( $3.989 \pm 0.339$  vs.  $4.074 \pm 0.309$ ,  $P = 0.003$ ), 但两个数据库中 HCC 组织 *CXCR3* 基因高表达患者的术后总体生存率均显著高于 *CXCR3* 基因低表达患者( $P = 0.004$ ,  $P = 0.014$ )。TCGA 数据库中 *CXCL10* 基因与 *CXCR3* 基因在 HCC 和癌旁组织里的表达水平均呈正相关( $r = 0.584$ ,  $P < 0.001$ ;  $r = 0.776$ ,  $P < 0.001$ )。临床样本检测结果显示, *CXCL10* 基因在乙肝相关 HCC 和配对癌旁组织里的表达水平分别为  $0.479(0.223, 1.094)$  和  $0.484(0.241, 0.846)$ , 均显著高于正常肝组织的  $0.131(0.106, 0.159)$  ( $P = 0.010$ ,  $P < 0.001$ ), *CXCR3* 基因在 HCC 和配对癌旁组织里的表达水平分别为  $0.011(0.006, 0.019)$  和  $0.016(0.011, 0.021)$ , 也显著高于正常肝组织的  $0.002(0.001, 0.004)$  ( $P = 0.004$ ,  $P < 0.001$ ), 但 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因在 HCC 组织中的表达水平与配对癌旁组织相比差异均无统计学意义( $P = 1.000$ ,  $P = 0.374$ )。**结论:***CXCL10* 在不同病因 HCC 组织中均呈高表达, *CXCR3* 在乙肝相关 HCC 组织中呈低表达, HCC 组织中 *CXCL10* 和 *CXCR3* 的高表达均利于 HCC 患者的术后生存。

[关键词] 趋化因子; 趋化因子受体; 肝细胞癌

[中图分类号] R393 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2019)03-0402-07

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2019.03.005

## Expression and clinical significance of chemokine *CXCL10* and its receptor *CXCR3* in hepatocellular carcinoma

ZHANG Jing, CHEN Jie, GUAN Gui-wen, ZHANG Ting, LU Feng-min<sup>△</sup>, CHEN Xiang-mei<sup>△</sup>

(Department of Microbiology & Infectious Disease Center, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100191, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the expression and clinical significance of chemokine *CXCL10* and *CXCR3* in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** The expression and prognostic of *CXCL10* and *CXCR3* in HCC tumor tissues and non-tumor tissues were analyzed in two different publicly available databases the Cancer Genome Atlas (TCGA) and Liver Cancer Institute (LCI). In addition, quantitative real-time PCR (qPCR) was used to detect the mRNA expression of *CXCL10* and *CXCR3* in 45 HCC clinical samples with HBV infection background. Pearson correlation and Spearman rank correlation were used to determine the correlation between the expression level of *CXCL10* and *CXCR3* in tumor and non-tumor tissues. **Results:** In TCGA database, the expression of *CXCL10* in HCC tumor tissues was significantly higher than that in non-tumor tissues (nonpaired samples:  $3.379 \pm 2.081$  vs.  $2.213 \pm 2.274$ ,  $P < 0.001$ ; paired samples:  $3.159 \pm 2.267$  vs.  $2.213 \pm 2.274$ ,  $P = 0.018$ ). Similarly in LCI database ( $7.625 \pm 1.683$  vs.  $7.287 \pm 1.328$ ,  $P = 0.009$ ). And higher *CXCL10* expression was significantly associated with a better prognosis in the patients with HCC both in TCGA and LCI database ( $P = 0.107$ ,  $P = 0.002$ ). In TCGA database, the expression of *CXCR3* in HCC tumor tissues was significantly higher than that in non-tumor tissues (nonpaired samples:  $-0.906 \pm 1.697$  vs.  $-1.978 \pm 1.629$ ,  $P < 0.001$ ; paired samples:  $-1.329 \pm 1.732$  vs.  $-1.978 \pm 1.629$ ,  $P = 0.037$ ), while lower in LCI database ( $3.989 \pm 0.339$  vs.  $4.074 \pm 0.309$ ,  $P = 0.003$ ). In both databases, higher *CXCR3* expression was significantly associated with a better prognosis in the HCC patients ( $P = 0.004$ ,  $P = 0.014$ ). Furthermore, in TCGA database, the expression level of *CXCL10* and *CXCR3* was positively correlated both in HCC tumor tissues and matched non-tumor tissues ( $r = 0.584$ ,  $P < 0.001$ ;  $r = 0.776$ ,  $P < 0.001$ ). The qPCR assay showed that the expression of *CXCL10* in HBV-related HCC tumor tissues was significantly higher than those in normal liver tissues [ $0.479(0.223, 1.094)$  vs.  $0.131(0.106, 0.159)$ ,  $P = 0.010$ ], and the expression in HBV-related non-tumor tissues was also significantly higher than those in normal liver tissues [ $0.484(0.241, 0.846)$  vs.  $0.131(0.106, 0.159)$ ,  $P < 0.001$ ]. The same was true as *CXCR3* [ $0.011(0.006, 0.019)$  vs.  $0.002(0.001, 0.004)$ ,  $P = 0.004$ ;  $0.016(0.011, 0.021)$  vs.  $0.002(0.001, 0.004)$ ,  $P < 0.001$ ]. However there was no significant difference of *CXCL10* and *CXCR3* between tumor tissues and matched non-tumor tissues ( $P = 1.000$ ,  $P = 0.374$ ). **Conclusion:** Expression of *CXCL10* was up-regulated in HCC tissues, expression of *CXCR3* was down-regulated in HBV-related HCC tissues, and the higher expression of both genes was correlated with better overall survival in HCC patients.

**KEY WORDS** Chemokine; Chemokine receptor; Hepatocellular carcinoma

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其术后 5 年肿瘤复发转移率高达 40% ~ 70%<sup>[1]</sup>。HCC 的致病因素主要包括慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染、慢性丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染、食物黄曲霉毒素暴露、嗜酒以及非酒精性脂肪肝等<sup>[2]</sup>。我国的 HCC 发生多与慢性 HBV 感染有关, 且大约 70% ~ 90% 的乙肝相关 HCC 都有肝硬化背景<sup>[3]</sup>, 因此, 阐明 HCC 特别是乙肝相关 HCC 的致病机制将对我国 HCC 防治具有重要意义。

趋化因子及其受体在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 趋化因子 *CXCL10* 是由干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 诱导产生的一类趋化因子, *CXCR3* 是 *CXCL10* 基因的唯一受体。近年的研究显示, *CXCL10*/*CXCR3* 信号通路与炎症和肿瘤发生密切相关<sup>[4]</sup>。本研究通过对癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 和来自国际肝癌研究所 (Liver Cancer Institute, LCI) 数据库的 HCC 表达数据库挖掘, 以及采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 方法检测 45 例乙肝相关 HCC 组织中 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因剪接异构体 *B* (*CXCR3B*) 的表达, 分析 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因的异常表达与 HCC 患者预后的相关性, 探索 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因在 HCC 发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床标本

45 例原发性 HCC 患者的癌组织和配对癌旁组织样本取自郑州大学附属肿瘤医院接受肝癌手术切除的患者, HCC 诊断标准参照中国 2011 年《原发性肝细胞癌诊疗规范》<sup>[5]</sup>。所有 HCC 患者均为男性, 均有慢性 HBV 感染及肝硬化背景, 并经病理学确诊。8 例正常肝组织来源于肝血管瘤患者。本研究已获得北京大学生物医学伦理委员会审批

(IRB00001052-12088), 所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 TCGA 和 LCI 数据库分析

TCGA 肝细胞癌基因表达数据下载自美国 Broad 研究所基因数据分析中心 (<http://gdac.broadinstitute.org/>), 采用 FPKM (fragments per kilobase million) 法对 TCGA 转录组测序数据进行标准化, 并去除了部分重复检测的病例, 最终纳入 370 例不同病因的 HCC 组织及 50 例癌旁组织的数据。

LCI 肝细胞癌基因表达数据下载自高通量功能基因组数据 GSE14520 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 最终纳入 204 例有随访信息的 HCC 患者, 所有患者均有 HBV 感染背景。

1.3 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司, 实时荧光定量 PCR 试剂购自美国 Super Array Biosciences 公司, 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司 (Light Cycler 480 II)。

1.4 组织 RNA 提取

将约 100 mg 的 HCC、癌旁或正常肝组织分别置于装有液氮的研钵中, 充分研磨至细粉状, 移至无 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中。加入 1 mL Trizol 试剂, 按照说明书提取肝组织的总 RNA。用 Nano-Drop2000 测定 RNA 浓度, 分装冻存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.5 逆转录和 qPCR 实验

按照逆转录试剂盒说明书, 在 20  $\mu$ L 的反应体系内, 以 5  $\mu$ g 总 RNA 为模板, 用随机引物合成 cDNA 链。取 1  $\mu$ L 逆转录产物用于 qPCR 实验, PCR 扩增条件: 95 °C 10 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。PCR 反应运行结束后, 采用 Roche 软件分析每孔反应的 Ct 值, 以管家基因 *C-TBPI* 的表达为内参照, 计算 *CXCL10* 基因和 *CXCR3B* 基因的相对表达量, qPCR 引物见表 1。

表 1 临床标本 qPCR 引物  
Table 1 qPCR primer sequences for clinical samples

Gene	Primer sequence	Size/bp
<i>CXCL10</i>	F: 5'-GTACGCTGTACCTGCATCAGCATTAG-3'	189
	R: 5'-CTGGATTTCAGACATCTCTTCTCACCC-3'	
<i>CXCR3B</i>	F: 5'-ATCACGCAGAAGAATGCGAG-3'	265
	R: 5'-TCGGCGTCATTTAGCACTTG-3'	
<i>C-TBPI</i>	F: 5'-TTCACCGTCAAGCAGATGAGAC-3'	156
	R: 5'-CTGGCTAAAGCTGAAGGGTTCC-3'	

F, forward primer; R, reverse primer.

## 1.6 统计学分析

使用 SPSS 22.0 及 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。正态计量资料采用均数  $\pm$  标准差进行描述,其中配对资料用配对 *t* 检验,非配对资料用非配对 *t* 检验,相关性分析用 Pearson 相关;非正态资料采用中位数和上下四分位数 [ $M(P_{25}, P_{75})$ ] 描述,其中配对资料用 Wilcoxon 配对检验,非配对资料比较用 Mann-Whitney *U* 检验,相关性分析用 Spearman 秩相关。使用 Kaplan-Meier 法进行生存分析,Log-rank 检验用于比较组间生存差异。 $r \geq 0.3$  即认为具有相关性,多重比较时采用 Bonferroni 法对 *P* 值进行校正, $P < 0.05$  即认为差异具有统计学意义。

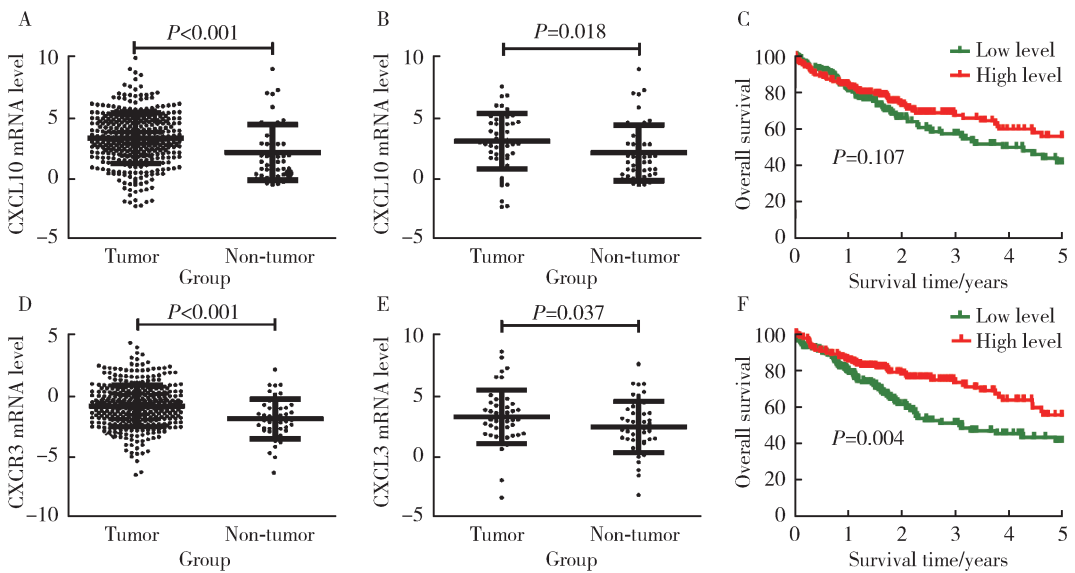
## 2 结果

### 2.1 TCGA 数据库中 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因在 HCC 样本中的表达及预后

为探索 *CXCL10* 及其受体 *CXCR3* 基因在 HCC 组织中的表达情况,我们首先分析 TCGA 数据库中 370 例 HCC 组织和 50 例癌旁组织中的基因表达,结果显示 HCC 组织中的 *CXCL10* 基因表达水平显

著高于癌旁组织 ( $P < 0.001$ , 图 1A)。在 TCGA 数据库中,有 50 例 HCC 患者同时有 HCC 和配对癌旁组织的表达数据,分析 *CXCL10* 基因在配对 HCC 及癌旁组织中的表达,结果显示 50 例 HCC 组织中 *CXCL10* 基因的表达水平显著高于配对癌旁组织 ( $P = 0.018$ , 图 1B)。进一步采用 Kaplan-Meier 法分析了 *CXCL10* 基因表达水平与 HCC 患者预后的相关性,结果显示与 *CXCL10* 基因低表达 ( $n = 185$ ) 的 HCC 患者相比, *CXCL10* 基因高表达 ( $n = 185$ ) 的 HCC 患者 5 年总体生存率升高,但差异无统计学意义 ( $P = 0.107$ , 图 1C)。

我们采用同样的方法也分析了 TCGA 数据库 HCC 组织中 *CXCR3* 基因的表达,结果表明 370 例 HCC 组织中 *CXCR3* 基因表达水平显著高于 50 例癌旁组织 ( $P < 0.001$ , 图 1D),且 *CXCR3* 基因在 50 例配对 HCC 组织中的表达亦显著高于癌旁组织 ( $P = 0.037$ , 图 1E)。Kaplan-Meier 分析结果表明 *CXCR3* 基因高表达 ( $n = 185$ ) 的 HCC 患者 5 年总体生存率显著高于 *CXCR3* 基因低表达 ( $n = 185$ ) 的 HCC 患者 ( $P = 0.004$ , 图 1F)。



A, the expression of *CXCL10* in nonpaired HCC tumor tissues ( $n = 370$ ) and non-tumor tissues ( $n = 50$ ); B, the expression of *CXCL10* in paired HCC tumor tissues and non-tumor tissues ( $n = 50$ ); C, the prognostic of *CXCL10* in HCC patients; D, the expression of *CXCR3* in nonpaired HCC tumor tissues ( $n = 370$ ) and non-tumor tissues ( $n = 50$ ); E, the expression of *CXCR3* in paired HCC tumor tissues and non-tumor tissues ( $n = 50$ ); F, the prognostic of *CXCR3* in HCC patients. Results were showed as  $\bar{x} \pm s$ .

图 1 TCGA 数据库 HCC 与癌旁组织中 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因的表达及预后分析

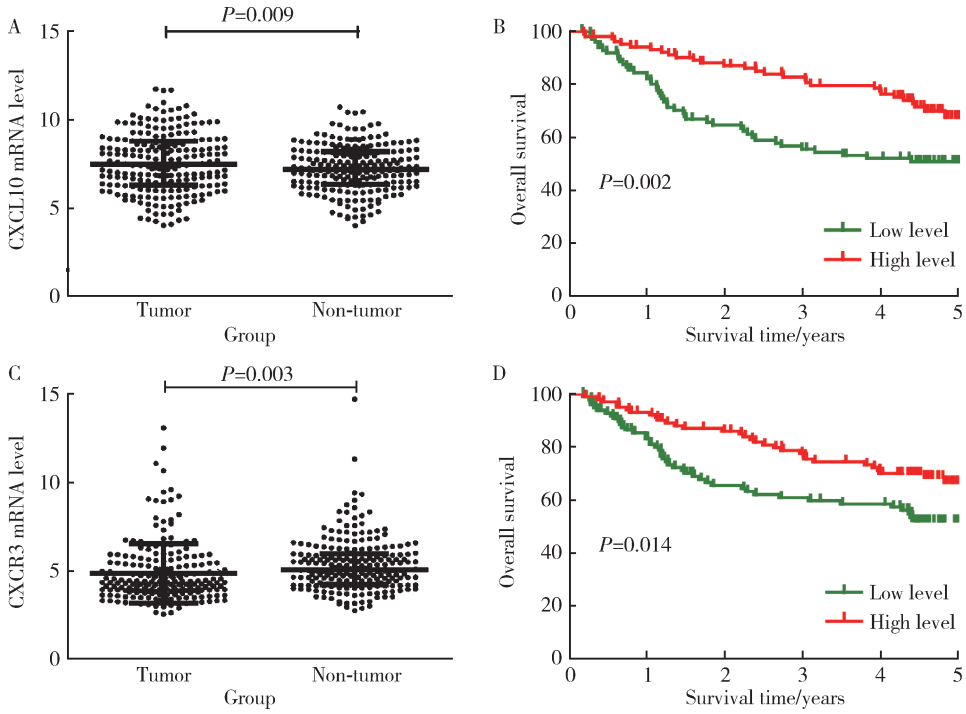
Figure 1 Expression and prognostic of *CXCL10* and *CXCR3* in HCC tumor tissues and non-tumor tissues in TCGA database

### 2.2 LCI 数据库中 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因在 HCC 样本中的表达及预后

我们进一步分析了 LCI 数据库中 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因在乙肝相关 HCC 样本中的表达情况,结果表明 HCC 组织中 *CXCL10* 基因表达水平显著高于癌旁组织 ( $P = 0.009$ , 图 2A)。Kaplan-Meier

分析结果显示, *CXCL10* 基因高表达 ( $n = 102$ ) HCC 患者的 5 年总体生存率显著高于 *CXCL10* 基因低表达 ( $n = 102$ ) HCC 患者 ( $P = 0.002$ , 图 2B),但 *CXCR3* 基因在 HCC 组织中的表达显著低于癌旁组织 ( $P = 0.003$ , 图 2C)。Kaplan-Meier 分析结果所示, *CXCR3* 基因高表达 ( $n = 102$ ) HCC 患者的 5 年总生存率高

于 *CXCR3* 基因低表达 ( $n = 102$ ) HCC 患者 ( $P = 0.014$ , 图 2D)。



A, the expression of *CXCL10* in HCC tumor tissues and non-tumor tissues ( $n = 204$ ); B, the prognostic of *CXCL10* in HCC patients ( $n = 204$ ); C, the expression of *CXCR3* in HCC tumor tissues and non-tumor tissues ( $n = 204$ ); D, the prognostic of *CXCR3* in HCC patients ( $n = 204$ ). Results were showed as  $\bar{x} \pm s$ .

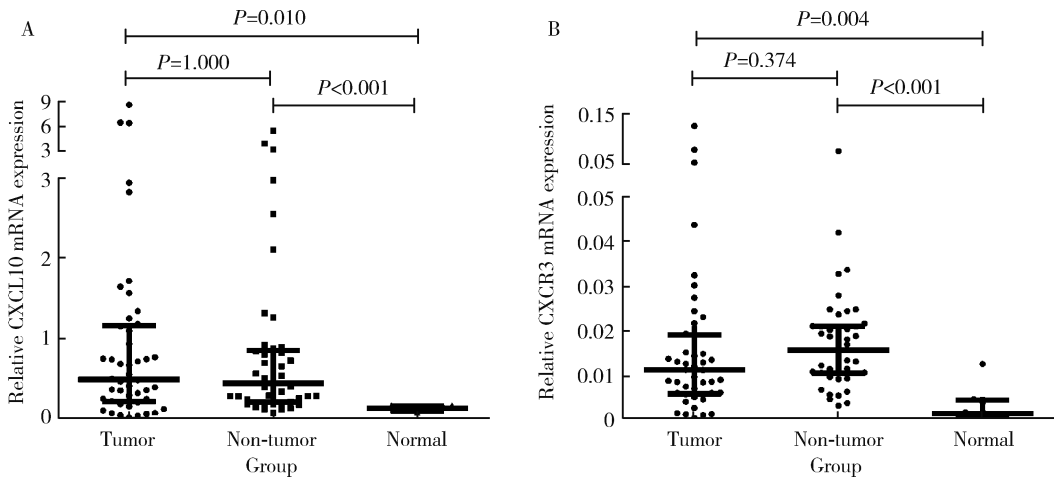
图 2 LCI 数据库 HCC 与癌旁组织中 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因的表达及预后分析

Figure 2 The expression and prognostic of *CXCL10* and *CXCR3* in HCC tumor tissues and non-tumor tissues in LCI database

### 2.3 qPCR 方法检测 HCC 样本中 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因的表达

为了验证 TCGA 和 LCI 数据库的结果,我们采用 qPCR 方法检测了 45 例乙肝相关 HCC 中 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因的表达水平,并以 8 例正常肝组织作为对照,结果显示 *CXCL10* 基因在乙肝相关 HCC 和配对癌旁组织里的表达均显著高于正常肝组织

( $P = 0.010, P < 0.001$ ),但 *CXCL10* 基因表达水平在 HCC 和配对癌旁组织中的差异无统计学意义 ( $P = 1.000$ , 图 3A)。同样, *CXCR3* 基因在 HCC 和配对癌旁组织里的表达水平也显著高于正常肝组织 ( $P = 0.004, P < 0.001$ ),但其在 HCC 组织中的表达水平与配对癌旁组织相比差异无统计学意义 ( $P = 0.374$ , 图 3B)。



A, mRNA expression of *CXCL10* in HCC ( $n = 45$ ), non-tumor ( $n = 45$ ) and normal ( $n = 8$ ) tissues; B, mRNA expression of *CXCR3* in HCC ( $n = 45$ ), non-tumor ( $n = 45$ ) and normal ( $n = 8$ ) tissues. Results were showed as  $M (P_{25}, P_{75})$ .

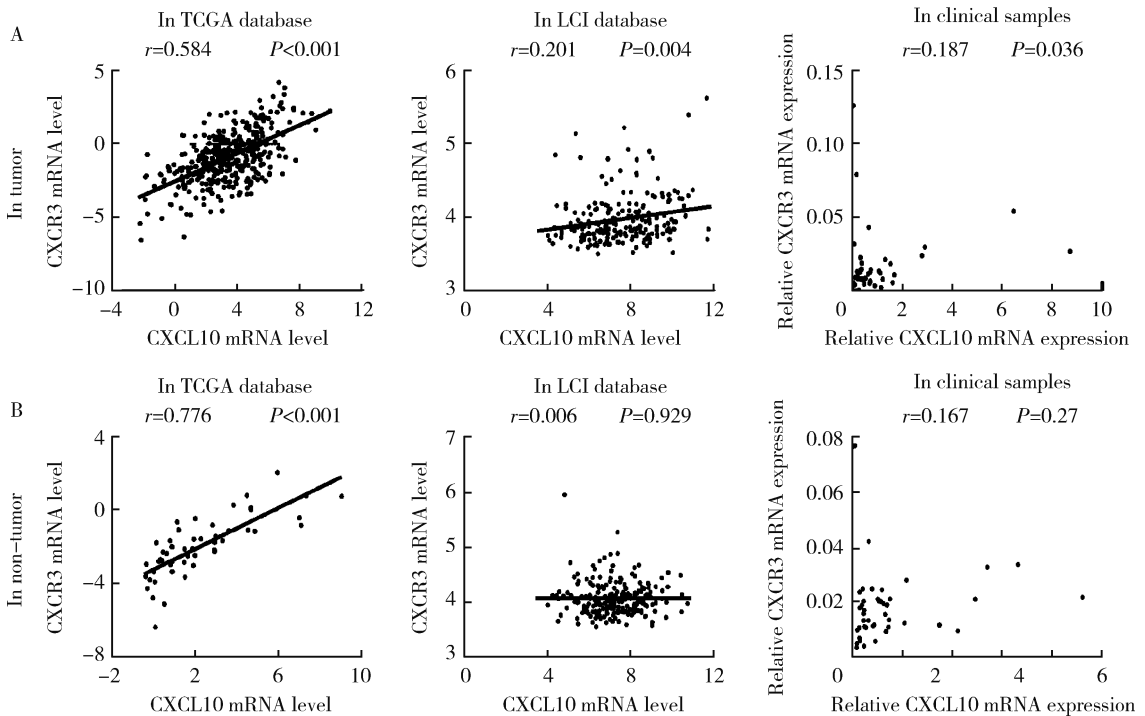
图 3 qPCR 方法检测 45 例乙肝相关 HCC 样本中 *CXCL10* 和 *CXCR3* 基因的表达

Figure 3 mRNA expression of *CXCL10* and *CXCR3* of 45 HCC clinical samples with HBV infection background detected by qPCR

## 2.4 *CXCL10* 与 *CXCR3* 基因表达水平在 HCC 和癌旁组织中的相关性

我们进一步分析了来自 TCGA、LCI 数据库以及我们检测的临床样本中 *CXCL10* 基因与 *CXCR3* 基因表达水平的相关性,结果如图 4 所示,在 HCC

组织中,来自 TCGA 数据库的 *CXCL10* 基因与 *CXCR3* 基因的表达水平间呈显著正相关,但在 LCI 数据库以及我们的临床样本中未见明显相关性(图 4A),这一现象同样存在于癌旁组织中(图 4B)。



A, correlation between the expression level of *CXCL10* and *CXCR3* in tumor tissues in TCGA database, LCI database and clinical samples; B, correlation between the expression level of *CXCL10* and *CXCR3* in non-tumor tissues in TCGA database, LCI database and clinical samples.

图 4 *CXCL10* 与 *CXCR3* 基因表达水平在 HCC 和癌旁组织中的相关性分析

Figure 4 Correlation between the expression level of *CXCL10* and *CXCR3* in tumor and non-tumor tissues

## 3 讨论

作为肿瘤细胞赖以生存的场所,肿瘤微环境可直接影响肿瘤细胞的生长、转移及预后<sup>[6]</sup>,因此研究肿瘤微环境的特点及功能可为肿瘤的早期诊断和治疗提供新依据。趋化因子及其受体之间的相互作用是肿瘤微环境的关键环节,在促进肿瘤细胞增殖、招募免疫细胞及重塑细胞外基质等方面发挥重要作用。已有研究表明,*CXCL10* 基因可通过招募表达 *CXCR3* 基因的 T 细胞、B 细胞、单核/巨噬细胞和自然杀伤细胞等,参与多种炎症性疾病和肿瘤的发生与发展<sup>[7]</sup>。*CXCL10*/*CXCR3* 在胃癌、乳腺癌、肺癌和多发性骨肉瘤组织中呈高表达,且与上述肿瘤的恶性表型密切相关<sup>[7]</sup>,但 *CXCL10*/*CXCR3* 在 HCC 中的表达及作用鲜见报道。

*CXCL10* 基因主要由成纤维细胞、内皮细胞、肝实质细胞、角化细胞等多种细胞表达。在细胞处于稳态条件下,*CXCL10* 基因呈低表达,但在炎症细胞

因子刺激下 *CXCL10* 基因表达上调。*CXCL10* 基因的表达主要由  $\text{IFN-}\gamma$  诱导,其主要作用是趋化 T 淋巴细胞、单核细胞、自然杀伤细胞到达炎症部位,发挥抗炎免疫作用。*CXCL10* 基因也是一种血管抑制因子,可招募抗肿瘤 T 淋巴细胞,发挥潜在的抗肿瘤效应,但肿瘤细胞的自分泌 *CXCL10* 信号也能促进肿瘤细胞的增殖、血管生成和转移<sup>[7]</sup>。Ren 等<sup>[8]</sup>的研究发现,HCC 组织中 *CXCL10* 基因表达上调,且 *CXCL10* 基因高表达与 HCC 患者的总体生存率呈负相关,但也有研究表明<sup>[9-10]</sup>,HCC 组织中 *CXCL10* 基因的表达水平与 Th1、 $\text{CD8}^+$  T 细胞和自然杀伤样 T 细胞的浸润呈正相关,提示在某些 HCC 患者中 *CXCL10* 基因可能是通过增强抗肿瘤免疫抑制肿瘤的转移和复发,从而利于 HCC 患者的预后。为了进一步验证组织中 *CXCL10* 基因的表达水平与患者预后的关系,我们分析了 TCGA 和 LCI 数据库中 *CXCL10* 基因的表达情况及其与预后的关系。与 Ren 等<sup>[8]</sup>的发现一致,本研究结果显示 *CXCL10* 基

因在 HCC 组织中的表达显著高于癌旁组织,但不同的是, *CXCL10* 基因高表达 HCC 患者的总体生存率显著高于 *CXCL10* 基因低表达 HCC 患者,提示 *CXCL10* 基因高表达利于 HCC 患者的预后。此外,我们也在 45 例乙肝相关 HCC 样本中验证了 *CXCL10* 基因在 HCC 组织的高表达,但 HCC 和癌旁组织中 *CXCL10* 基因水平差异无统计学意义,可能与我们所检测癌旁组织均有肝硬化背景有关。

已有研究表明, *CXCR3* 基因在乳腺癌、骨髓瘤、结肠癌等多种肿瘤中异常表达,且与肿瘤的转移和预后相关<sup>[9]</sup>。Ding 等<sup>[11]</sup>和任颖等<sup>[12]</sup>的研究表明, HCC 组织中 *CXCR3* 基因表达水平高于癌旁组织, HCC 组织中 *CXCR3* 蛋白的阳性率也高于癌旁组织,且 *CXCR3* 蛋白阳性患者术后总体生存率低于阴性患者。本研究来自 TCGA 数据库 370 例 HCC 患者的转录组测序数据显示, *CXCR3* 基因在 HCC 组织中的表达水平显著高于癌旁组织,且 *CXCR3* 基因高表达利于 HCC 患者的预后,但来自 LCI 数据库乙肝相关肝癌的分析结果与 TCGA 相反, *CXCR3* 基因在 HCC 组织中的表达水平低于配对癌旁组织,而 *CXCR3* 基因高表达的 HCC 患者同样预后更好。我们检测了 *CXCR3* 基因在 45 例乙肝相关 HCC 中的表达, *CXCR3* 基因在 HCC 组织和癌旁组织中的表达差异不具有统计学意义,但趋势与 LCI 数据库一致。本研究检测的 45 例 HCC 样本和 LCI 数据库里纳入的 204 例 HCC 均有 HBV 感染背景, TCGA 数据库中仅有 102 例 HCC 患者有 HBV 感染,而 Ding 等<sup>[11]</sup>和任颖等<sup>[12]</sup>的研究没有分析 HCC 患者的慢性乙肝背景,提示不同研究中 *CXCR3* 基因表达不一致的原因可能与 HCC 患者的病因不同有关。与此结果一致的是, *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因表达水平呈正相关的现象仅存在于 TCGA 数据库,但在 LCI 数据库和我们检测的样本中这种相关性消失。由于 HCC 中浸润的淋巴细胞也可以表达 *CXCR3* 基因,淋巴细胞浸润程度会影响 *CXCR3* 基因 mRNA 水平的检测。此外, *CXCR3* 基因有 3 个剪接异构体,分别为 *CXCR3A*、*CXCR3B* 和 *CXCR3alt*。研究表明,不同 *CXCR3* 基因亚型的功能及分布不同。 *CXCR3A* 激活可诱发细胞的趋化和增殖,而 *CXCR3B* 激活则抑制细胞的迁移和增殖,促进凋亡<sup>[13]</sup>。本研究定量检测的是 *CXCR3B* 亚型,其在乙肝相关肝癌中的低表达可能与肿瘤的发生有关,但 TCGA、LCI 数据库以及另外两项研究中均未注明所检测的 *CXCR3* 基

因亚型,因此,不同研究中的 *CXCR3* 基因表达结果不一致也可能与所检测的亚型不同有关。

综上所述,本研究结果证实 *CXCL10* 基因在不同病因的 HCC 组织中均呈高表达,而 *CXCR3* 基因在乙肝相关 HCC 组织中呈低表达,且 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因的高表达利于 HCC 患者的术后生存,提示 *CXCL10* 基因和 *CXCR3* 基因在 HCC 的发生、发展过程中发挥重要的作用。

(志谢:郑州大学附属肿瘤医院肝胆胰外科张玲教授提供肝组织样本)

#### 参考文献

- [1] Joliat GR, Allemann P, Labgaa I, et al. Treatment and outcomes of recurrent hepatocellular carcinomas [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2017, 402(5): 737-744.
- [2] El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-2576.
- [3] Hong TP, Gow P, Fink M, et al. Novel population-based study finding higher than reported hepatocellular carcinoma incidence suggests an updated approach is needed [J]. *Hepatology*, 2016, 63(4): 1205-1212.
- [4] Elia G, Fallahi P. Hepatocellular carcinoma and *CXCR3* chemokines: a narrative review [J]. *Clin Ter*, 2017, 168(1): e37-e41.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011年版) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(11): 1141-1159.
- [6] Kamil F, Rowe JH. How does the tumor microenvironment play a role in hepatobiliary tumors? [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2018, 9(1): 180-195.
- [7] Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, et al. *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11/CXCR3* axis for immune activation: a target for novel cancer therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 63: 40-47.
- [8] Ren T, Zhu L, Cheng M. *CXCL10* accelerates EMT and metastasis by MMP-2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 2824-2837.
- [9] Hirano S, Iwashita Y, Sasaki A, et al. Increased mRNA expression of chemokines in hepatocellular carcinoma with tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(5): 690-696.
- [10] Chew V, Chen J, Lee D, et al. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2012, 61(3): 427-438.
- [11] Ding Q, Xia Y, Ding S, et al. An alternatively spliced variant of *CXCR3* mediates the metastasis of CD133<sup>+</sup> liver cancer cells induced by *CXCL9* [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 14405-14414.
- [12] 任颖, 阙云珍, 孔令非. 靶向沉默 *CXCR3* 对肝癌细胞恶性增殖的作用研究 [J]. *中华肝胆病杂志*, 2018, 26(7): 508-512.
- [13] Billotet C, Quemener C, Bikfalvi A. *CXCR3*, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836(2): 287-295.

(2019-03-25 收稿)

(本文编辑:刘淑萍)