论著

文章编号:1000-5404(2007)08-0728-03

siRNA 沉默人乳腺癌细胞株 CXCR4 基因的实验研究

厉红元,任国胜,谭金详 (重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨 shRNA- CXCR4 对人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s 细胞 CXCR4 基因表达及蛋白表达的影响。**方法** 通过 shRNA-CXCR4 沉默 CXCR4 基因后,RT-PCR、Western blotting 检测 3 株人乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s 的 CXCR4 mRNA 及其蛋白的表达。**结果** shRNA-CXCR4 作用于人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s 后能明显抑制其 CXCR4 基因的 mRNA 及蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** shRNA-CXCR4 能特异性抑制乳腺癌细胞的 CXCR4 mRNA 及其蛋白的表达。

关键词:乳腺癌;shRNA;CXCR4 基因

中图法分类号:R394-33;R73-354;R737.9 **文献标识码**:A

Silencing breast cancer cell CXCR4 gene *in vitro*

LI Hong-yuan, REN Guo-sheng, TAN Jin-xiang (Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study whether shRNA-CXCR4 could inhibit the CXCR4 gene expression in MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-435s breast cancer cells. Methods After the knockdown of CXCR4 by shRNA, the CXCR4 mRNA expression by RT-PCR and the CXCR4 protein expression by Western blotting in breast cancer cells were examined. Results The CXCR4 mRNA expression and its protein expression were decreased significantly in MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-435s breast cancer cells by shRNA-CXCR4($P<0.05$). Conclusion Silencing CXCR4 could inhibit the breast cancer cell CXCR4 mRNA and its protein expression.

Key words: breast cancer; shRNA; CXCR4 gene

CXCR4 是趋化细胞因子 SDF-1/CXCL12(基质细胞衍生因子-1)的受体。它参与了各种生理病理过程,刺激、诱导白细胞向炎症部位积聚[1]。近来的研究表明,CXCR4 在多种恶性肿瘤细胞如:乳腺癌,前列腺癌,肾癌,恶性黑色素瘤等有表达,而在其转移的器官有较丰富的 SDF-1[2-4]。本实验拟利用构建 shRNA CXCR4 质粒,首先从体外实验途径研究沉默 CXCR4 基因,探讨 3 株人乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s)CXCR4 基因在分子,蛋白水平表达是否下降,为进一步研究沉默 CXCR4 基因对人乳腺癌细胞生长、转移的影响奠定基础。

基金项目:重庆市卫生局科研项目(07-2-029)

Supported by Sci & Tech Project of Chongqing Bureau of Health (07-2-029)

作者简介:厉红元(1965-),男,辽宁省营口市人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事乳腺癌、甲状腺疾病方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:13594232091,E-mail: hongy_li@hotmail.com

通讯作者:任国胜,电话:(023)89012511

收稿日期:2007-03-09;修回日期:2007-03-28

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-435s 由上海复旦大学肿瘤医院沈镇宙教授惠赠,MCF-7 购于中科院上海生物细胞所;shRNA 质粒载体 pGenSil-1(简称 pG)购于武汉晶赛公司;Lipofectamine 购于 Invitrogen,质粒提取试剂盒购于 AXYGEN,连接试剂盒总 RNA 提取试剂、cDNA 合成及 PCR 扩增试剂,β-actin 购于 TaKaRa;兔抗人多克隆抗体 CXCR4 购于 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔多克隆抗体购于北京中杉金桥。

1.2 细胞培养

MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435s 3 株人乳腺癌细胞用含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 卡那霉素的 RPMI1640 培养液,于 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中培养,常规换液传代。

1.3 质粒载体的构建

1.3.1 shRNA 的 DNA 序列设计和合成 根据 GenBank CXCR4 基因已知序列(基因编号:AY728138)按 shRNA 序列设计原则,结合网上在线设计软件,选择 2 对 21 个碱基的 siRNA,RT-PCR 结果显示其中 1 对具有更好的干扰作用。CXCR4 沉默的 RNA 的 2 条互补链:正义链:5′-GATCCGTCCTGGCCTTCA

TCAGTCTTTCAAGACGAGACTGATGAAGGCCAGGATTTTTTG TCGACA-3′；反义链：3′-GCAGGACCGGAAGTAGTCAGAAAGT TCTGCTCTGACTACTTCCGGTCCTAAAAAACAGCTGTTCGA-5′；转录的 siRNA- CXCR4 为AGACUGAUGAAGGCCAGGAUU。

阳性对照 GAPDH：正义链：5′-GATCCGTATGACAACAGCC TCAAGTTCAAGACGCTTGAGGCTGTTGTCATACTTTTTTGAAT TCA-3′；反义链：3′-GCATACTGTTGTCGGAGTTCAAGTTCTGCG AACTCCGACAACAGTATGAAAAAACTTAAGTTCGA-5′；转录的 siRNA-GAPDH 为CUUGAGGCUGUUGUCAUACUU。

阴性对照 HK：正义链：5′-GATCCGACTTCATAAGGCGCA TGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTTGTCGAC A-3′；反义链：3′-GCTGAAGTATTCCGCGTACGAAGTTCTGCCG TACGCGGAATACTTCAGAAAAAACAGCTGTTCGA-5′；转录的 siRNA-HK 为GCAUGCGCCUUAUGAAGUCUU。

1.3.2　质粒构建　　用 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切空质粒 pGenSil-1（含 U6 启动子、GFP 及 neo 抗性基因），将退火形成的双链定向克隆至该真核载体上，经筛选，酶切鉴定后，再进行测序确定。

1.4　质粒转染及稳定筛选

阳离子脂质体介导的质粒转染按 Lipofectamine 转染试剂说明进行转染。在 G418 培养基中培养筛选单克隆抗性细胞。

1.5　RT-PCR 测定细胞株 CXCR4 基因的表达

细胞总 RNA 抽提及 cDNA 合成按试剂盒说明书进行。

PCR 反应体系的反应体积为 50 μl：cDNA10 μl，引物浓度 50 nmol/L，*Taq* 酶 1 U。CXCR4 基因 PCR 引物：正义链 5′-GGT-GGTCTATGTTGGCGTCT-3′，反义链 5′-CTCAGTGGAAACAGAT-GAAT-3′，扩增产物片段为 568 bp。反应条件：94 ℃ 5 min，94 ℃变性 1 min，63 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1min，共进行 35 个循环，最后 72 ℃延伸 7 min。以 GAPDH 作阳性对照，其 PCR 引物：正义链 5′-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3′；反义链 5′-AT-GAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3′，扩增产物片段为 350 bp。反应条件：94 ℃ 5 min，94 ℃变性 45 s，55 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 45 s，共进行 35 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。

1.6　Western blotting 检测蛋白的表达

收集稳定表达细胞用细胞裂解液提取细胞总蛋白，考马斯亮蓝法测蛋白浓度。取 40 μg 蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜。5% 脱脂奶室温封闭 1 h，分别加 1∶500 比例稀释的一抗，4 ℃孵育过夜，PBST 洗涤 3 次，再加入 1∶5 000 比例稀释的二抗，37 ℃孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次，加 DAB 显色，数码拍照，并在 Bio-Rad 凝胶仪上成像并进行密度分析。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.1 统计软件行单因素方差分析及两两比较 q 检验。

2　结果

2.1　pG 转染细胞条件筛选及效率

载体 pG 自带荧光，选取转染细胞密度在 6 孔板从 1×10^5 ~5×10^5/孔细胞，质粒浓度为 0.4 μg/μl，分别用 5、10、15 μl，发现 0.4 μg/μl，10 μl，细胞密度为 2×10^5/孔时能有较佳的转染效率。实验重复 3 次，荧光共聚焦显微镜观察到发绿色荧光的细胞数可达到 90% 以上（图 1）。

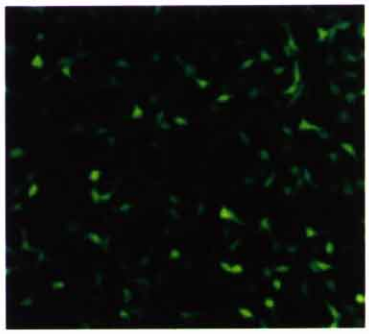


图 1　pG 转染 MDA-MB-231 细胞 24 h 后荧光共聚焦显微镜观察　（×100）

2.2　RT-PCR 测定 shRNA-CXCR4 对人乳腺癌细胞 CXCR4 基因 mRNA 表达的影响

通过 RNA 干扰细胞 48 h 后，分别用 RT-PCR 分析（表 1），我们发现：实验组（pG-CXCR4）与空白对照组（等体积的 1640 培养液），阴性对照组（pG-HK）及阳性对照组（pG-GAPDH）比较：实验组 CXCR4 mRNA 表达水平显著受抑（$P < 0.05$），但未抑制 GAPDH mRNA 的表达，其 GAPDH mRNA 水平与空白对照组及阴性对照组无显著性差异（$P > 0.05$）。实验组 CXCR4 mRNA/GAPDH mRNA 与空白对照组及阴性对照组有显著差异（$P < 0.05$）。实验组 CXCR4 mRNA/GAPDH mRNA 与阳性对照组比较有显著性差异（$P < 0.05$）。

表 1　pG-CXCR4 作用于人乳腺癌细胞 CXCR4 基因的 mRNA 的表达

组别	GAPDH	CXCR4	CXCR4/ GAPDH
MDA-MB-231			
空白对照组	399.69 ± 9.79	159.89 ± 12.48[a]	0.40 ± 0.02[a]
阳性对照组	46.73 ± 11.32	170.56 ± 18.21[a]	3.79 ± 0.97[a]
实验组	406.92 ± 44.04	61.05 ± 10.06	0.15 ± 0.04
阴性对照组	408.73 ± 40.61	182.58 ± 5.27[a]	0.45 ± 0.05[a]
MDA-MB-435S			
空白对照组	269.31 ± 26.46	184.70 ± 6.17[a]	0.69 ± 0.07[a]
阳性对照组	61.67 ± 12.75	192.19 ± 23.13[a]	3.23 ± 0.86[a]
实验组	274.38 ± 34.20	53.31 ± 7.75	0.20 ± 0.05
阴性对照组	259.87 ± 4.20	201.12 ± 14.67[a]	0.78 ± 0.07[a]
MCF-7			
空白对照组	566.02 ± 44.59	185.62 ± 25.43[a]	0.33 ± 0.02[a]
阳性对照组	47.71 ± 14.68	150.20 ± 6.73[a]	3.31 ± 0.82[a]
实验组	576.33 ± 18.39	51.69 ± 13.77	0.09 ± 0.02
阴性对照组	558.99 ± 66.50	172.80 ± 7.19[a]	0.31 ± 0.05[a]

a：$P < 0.05$，与实验组比较

阳性对照组与空白对照组及阴性对照组比较：GAPDHmRNA 表达水平显著受抑（$P < 0.05$），RT-PCR 几乎不能检测出 GAPDH-mRNA 的表达，但 CXCR4mRNA 的表达无明显影响，其 CXCR4mRNA 水平无明显差异（$P > 0.05$）。空白对照组及阴性对照组比较：两组间 CXCR4mRNA/GAPDHmRNA 无显著差异（$P > 0.05$）。两组间的 CXCR4 mRNA 表达水平及 GAPDH mRNA 表达水平亦无显著差异（$P > 0.05$）。

2.3 Western blotting 测定 shRNA-CXCR4 对人乳腺癌细胞 CXCR4 蛋白表达的影响

通过 RNA 干扰细胞 48 h 后，分别用 Western blottng 分析，结果显示：实验组与空白对照组、阴性对照组及阳性对照组比较：实验组 CXCR4/β-actin 蛋白表达水平显著受抑（$P<0.05$）。阳性对照组与空白对照组及阴性对照组比较：CXCR4/β-actin 蛋白表达无显著差异（$P>0.05$）。空白对照组及阴性对照组比较：两组间的 CXCR4/β-actin 蛋白表达水平无显著差异（$P>0.05$）。见表 2。

表 2 pG-CXCR4 作用于人乳腺癌细胞 CXCR4 蛋白的表达

组别	β-actin	CXCR4	CXCR4/β-actin
MDA-MB-231			
空白对照组	1 125.47 ± 24.37	932.80 ± 35.16[a]	0.83 ± 0.04[a]
阳性对照组	1 145.78 ± 45.67	954.04 ± 58.78[a]	0.83 ± 0.04[a]
实验组	1 149.60 ± 49.00	175.50 ± 12.49	0.15 ± 0.02
阴性对照组	1 106.50 ± 43.59	971.15 ± 21.78[a]	0.88 ± 0.02[a]
MDA-MB-435S			
空白对照组	1 142.82 ± 51.57	1 002.95 ± 69.45[a]	0.88 ± 0.02[a]
阳性对照组	1 081.45 ± 23.84	939.88 ± 25.42[a]	0.87 ± 0.04[a]
实验组	1 125.02 ± 34.82	195.22 ± 30.99	0.17 ± 0.02
阴性对照组	1 121.67 ± 56.11	1 015.80 ± 47.52[a]	0.91 ± 0.03[a]
MCF-7			
空白对照组	1 115.34 ± 27.59	1 015.95 ± 64.06[a]	0.91 ± 0.06[a]
阳性对照组	1 094.28 ± 67.64	1 032.08 ± 18.31[a]	0.94 ± 0.06[a]
实验组	1 103.33 ± 46.09	194.99 ± 39.64	0.18 ± 0.03
阴性对照组	1 173.51 ± 26.64	1 024.99 ± 51.67[a]	0.87 ± 0.06[a]

a：$P<0.05$，与实验组比较

3 讨论

Muller 研究发现趋化因子受体 CXCR4 和 CCR7 在人乳腺癌细胞呈高表达。两者的配体分别为 SDF-1 和 CCL21，在乳腺癌转移首先到达的器官如肺、骨、肝、淋巴结中高表达[5]。Fernandis 研究提示 SDF-1 诱导局灶性激酶（FAK）和 PAFTK/Pyk2 酪氨酸磷酸化，诱导磷酸酰肌醇-3 激酶（PI3K）活性，PI3K、PAFTK/Pyk2 抑制剂可阻断 SDF-1 介导的趋化浸润和转移，表明 CXCR4/ SDF-1 轴参了乳腺癌的浸润，转移的信号传导[6]。还有研究表明 VEGF、NF-kappaB 可以上调 CXCR4 的表达[7]。

RNA 干扰（RNA interference，RNAi）是内源性或外源性双链 RNA（double stranded RNA，dsRNA）诱发的 mRNA 水平上的基因沉默机制，小片段干扰性 RNA（small interfering RNA，siRNA）通过序列特异性的降解作用，能有效封闭靶 mRNA 和降低蛋白水平[8]。已有研究表明，在乳腺癌细胞中，利用 siRNA 技术，沉默 CXCR4 基因，使其蛋白产物减少或不表达，从而达到使癌细胞的侵袭、黏附能力下降，血管形成减少，转移受抑制[9]。本研究根据 CXCR4 基因序列设计合成了针对 CXCR4 mRNA 的特异性 shRNA 干扰片段，构建了带绿色荧光蛋白的 CXCR4 shRNA 质粒载体（pGeneSil-1）。经酶切电泳和 DNA 测序证明插入编号 shRNA 的序列大小、位点和方向均正确。最新研究表明，在人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的实验中，沉默 CXCR4 使小鼠肿瘤的生长亦受抑制[8]。我们利用大肠杆菌扩增 shRNA-CXCR4 质粒，DNA 分光光度计检测其浓度为 0.4 μg/μl，分别以 5、10、15 μl 的 shRNA-CXCR4 质粒转染入 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435S 细胞内，选取转染细胞密度在 6 孔板从 1×10^5 ~ 5×10^5/孔细胞。发现在细胞密度为 2×10^5/孔，10 μl（4 μg）时能有较佳的转染效率。荧光共聚焦显微镜观察，其转染率均达到 90% 以上，为进一步研究提供了理论依据。

本实验采用 RT-PCR 测定 RNA 干扰人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-435S、MCF-7 后 CXCR4 基因的 mRNA 的表达变化，发现 CXCR4-shRNA 干扰 3 株人乳腺癌细胞 CXCR4 后其 mRNA 表达水平显著受抑，RT-PCR 几乎不能检测出 CXCR4 mRNA 的表达，但未抑制 GAPDH mRNA 的表达，其 GAPDH mRNA 水平与空白对照及阴性对照组无明显差异，说明 pGenSil-CXCR4-shRNA 的干扰作用具有高效性及高特异性；同样，采用 Western blot 测定目的基因在干扰后，CXCR4 的蛋白表达在 3 株乳腺癌细胞中显著受抑制。我们的研究结果与 Lapteva 等[8]的结果一致。本研究为进一步从细胞及整体水平阐明 RNA 干扰 CXCR4 基因在人乳腺癌生长，转移中的作用提供了一定的理论依据。

参考文献：

[1] Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines[J]. Nat Immunol, 2001, 2(2): 123 - 128.

[2] Dewan M Z, Ahmed S, Iwasaki Y, *et al*. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2006, 60(6): 273 - 276.

[3] 黄绍崧，杨 辉，卞修武，等. 趋化因子受 CXCR4 的表达与垂体腺瘤侵袭性关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(20)：2063 - 2066.

[4] 彭亦良，梁后杰，高晋华，等. CXCR4 和 VEGF-C 在结肠癌组织中的表达及淋巴结转移之间的关系[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：357 - 359.

[5] Murakami T, Maki W, Cardones A R, *et al*. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells[J]. Cancer Res, 2002, 62(24): 7328 - 7334.

[6] Muller A, Homey B, Soto H, *et al*. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001, 410(6824): 50 - 56.

[7] Fernandis A Z, Prasad A, Band H, *et al*. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(1): 157 - 167.

[8] Lapteva N, Yang A G, Sanders D E, *et al*. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth *in vivo*[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(1): 84 - 89.

[9] Liang Z, Yoon Y, Votaw J, *et al*. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2005, 65(3): 967 - 971.

（编辑 张大春）