论著

文章编号:1000-5404(2009)07-0598-03

CXCR4/SDF-1对鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响

邱际华,刘求真,陈 丽,焦 锋,姚开泰 (南方医科大学肿瘤研究所,教育部和广东省共建人类重大疾病转录组学和蛋白质组学重点实验室,广东省分子肿瘤病理学重点实验室,广州 510515)

摘 要:目的 观察鼻咽癌不同恶性程度的细胞中趋化因子受体CXCR4的表达,检测CXCR4/SDF-1反应轴对鼻咽癌细胞的增殖作用,SDF-1对CXCR4阳性肿瘤细胞的趋化作用,探讨CXCR4/SDF-1生物学轴对人鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响。**方法** 以鼻咽癌成瘤高转移细胞株5-8F及成瘤不转移细胞株6-10B为研究对象,采用Western blot免疫印迹法检测鼻咽癌细胞株CXCR4蛋白的表达情况,SDF-1及CXCR4阻断剂AMD3100作用于两种细胞后,MTT法检测细胞的增殖能力,体外迁徙实验检测CXCR4/SDF-1反应轴对鼻咽癌细胞的趋化作用。**结果** 5-8F细胞株CXCR4蛋白的表达明显高于6-10B细胞株;SDF-1能明显增强5-8F细胞增殖与迁移能力,CXCR4阻断剂AMD3100作用后,5-8F细胞增殖与迁移能力明显降低;SDF-1对6-10B细胞的迁移及增殖能力无明显影响。**结论** CXCR4/SDF-1生物学轴与鼻咽癌细胞株的增殖与迁移有一定的关系,AMD3100可明显抑制鼻咽癌细胞的增殖与迁移能力。

关键词: 鼻咽癌;增殖;迁移;CXCR4;SDF-1

中图法分类号: R329.28;R73-37;R739.63 **文献标识码:** A

Effect of CXCR4/SDF-1 on proliferation and migration of human nasopharyngeal carcinoma cell lines

QIU Ji-hua, LIU Qiu-zhen, CHEN Li, JIAO Feng, YAO Kai-tai (Institute of Cancer Research, Key Laboratory for Transcriptomics and Proteomics of Human Fatal Diseases of Ministry of Education and Guangdong Province, Key Laboratory for Molecular Tumor Pathology of Guangdong Province, Institute of Tumor, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To detect the expression of chemokine receptors 4 (CXCR4) in human nasopharyngeal carcinoma cell lines (NPC cells) and explore the role of CXCR4/stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) axis in the proliferation and migration of tumor cell. Methods The expression of CXCR4 protein in NPC cell lines 5-8F (with high tumogenicity and metastasis) and 6-10B (having tumogenicity but no metastasis) was measured by Western blot analysis. After the addition of SDF-1 and CXCR4 blocker, AMD3100, the changes of cell growth were observed by MTT. The changes of cell migration were measured by Transwell. Results Western blotting showed that 5-8F cells expressed higher CXCR4 levels than 6-10B cells. The growth rate and the number of migration cells in 5-8F cells was increased after SDF-1 treatment, and significantly decreased after the addition of AMD3100. However, 6-10B cells had no response to SDF-1. Conclusion CXCR4/SDF-1 axis may play an important role in NPC cells proliferation and migration, and CXCR4 blocker can efficiently suppress this effect..

Key words: nasopharyngeal carcinoma; proliferation; migration; chemokine receptors 4; stromal cell-derived factor

鼻咽癌是我国南方及东南亚地区常见的一种恶性肿瘤,尤以珠江三角洲一带多见。由于鼻咽部淋巴组织丰富,早期即可发生颈部淋巴结的转移,骨、肺和肝等器官的转移,也比其他头颈部肿瘤常见[1],因此,鼻咽癌患者5年生存率仅为50%左右[2],而侵袭和转移是导致患者死亡最主要的原因。新近研究表明,一些趋化因子及其受体与肿瘤的侵袭和转移密切相关。基

基金项目:广东省科技计划项目(2007B031515006)
Supported by the Project of Sci & Tech Plan of Guangdong Province (2007B031515006)

作者简介:邱际华,女,江西省赣州市人,硕士研究生,主要从事肿瘤干细胞方面的研究。E-mail:qiujihua1015@163.com

通信作者:姚开泰,男,E-mail:ktyao@fimmu.com

收稿日期:2008-12-26;修回日期:2009-02-20

质细胞衍生因子 1(stromal cell -derived factor-1, SDF-1/CXCL12)和其特异性受体 CXCR4(CXC chemokine receptor 4)在肿瘤转移中的作用日益引起重视,在肿瘤中发挥多种作用[3]。目前,在肺癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、白血病等众多肿瘤细胞中均发现 CXCR4 的高表达,并且 CXCR4 的表达与肿瘤的恶性行为密切相关[4]。

已有研究表明, CXCR4 /SDF-1 生物学轴不仅对乳腺癌细胞的转移起着关键作用[5],与乳腺癌细胞的生长也有着密切的联系[6,7]。本研究中,我们以高成瘤、高转移能力的 5-8F 细胞和无转移能力的 6-10B 细胞为研究对象,采用 CXCR4 阻断剂 AMD3100 进行体外实验性干预 ,观察 CXCR4/SDF-1 生物学轴对 5-8F 及 6-10B 细胞的生长能力及细胞迁移能力,以阐明 CXCR4 /SDF-1 生物学轴对鼻咽癌细胞增殖和迁移能力的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞　　鼻咽癌细胞株 5-8F、6-10B 均为本实验室保存,5-8F 和 6-10B 为鼻咽癌细胞株 SUNE-1 亚株,由中山医科大学肿瘤研究所建立。5-8F 细胞具有高成瘤、高转移潜能,6-10B 具有成瘤、不转移能力。细胞培养在 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中,用含 10 % 新生牛血清的 RPMI1640 培养基培养。

1.1.2　主要试剂　　兔抗人 CXCR4 抗体购自 Chemicon 公司,鼠抗人 beta-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶标记的二抗(抗鼠、抗兔)均为武汉博士德公司产品。Western blot 发光液为 Pierce 公司产品。CXCR4 阻断剂 AMD3100、二甲基四氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司, SDF-1 购自 R&D 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.1.3　主要仪器　　二氧化碳培养箱购自美国 Harris 公司,垂直凝胶电泳系统、680 酶标仪购自美国 Bio Rad 公司。

1.2　方法

1.2.1　Western blot 检测 CXCR4 蛋白的表达　　取对数生长期的 5-8F 与 6-10B 细胞,加入 RIPA 裂解液,冰上静置 10 min 后,以 4 ℃,10 000 r /min 离心 5 min 后取上清,采用 BCA 法定量后,蛋白样品加入等体积的 2 ×SDS 凝胶上样缓冲液混匀,置于沸水浴中加热 10 min。蛋白样品 (每孔上样量均为 20 μg 总蛋白)以 30% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离 ,分离的蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上。4 ℃以含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜后 ,加入用封闭液稀释的 CXCR4 mAb (1∶500)室温孵育 1 h,以 TBST 洗膜 3 ×10 min,以 TBST 稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1∶6 000),室温孵育 1 h 后 ,以 TBST 洗 10 min 2 次。最后用增强的化学发光反应混合液(enhanced chemiluminescence, ECL;美国 Pierce 公司)显色,感光胶片曝光。X 线片经显影、定影后扫描记录。

1.2.2　噻唑蓝(MTT)比色实验检测细胞增殖能力　　以每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,设置 3 组:第 1 组即对照组,不加任何药物刺激的细胞;第 2 组为实验组,细胞加 100 ng/ml SDF-1;第 3 组为抑制组,细胞用 AMD3100(0.1 g/L)中和作用 30 min 后加入 100 ng/ml SDF-1。每组 5 孔。同时设空白对照(仅加培养基),每孔体积 200 μl,分别培养 1、2、3、4、5 d,每孔加入 5 mg/ml 的四氮唑蓝盐(MTT)20 μl,37 ℃继续培养 4 h 后终止培养,小心吸弃孔内培养基,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,室温孵育 10 min,微振荡器振荡 10 min,使结晶物充分溶解,以空白对照孔调零,酶标仪上 490 nm 测定各孔吸光度值[D(490)值],以相对应吸光度比值表示细胞增殖能力大,各组取 5 孔平均值,绘制增殖曲线。

1.2.3　体外迁移实验　　利用 Transwell 体外迁移体系,滤膜为微孔聚碳酸酯膜 (直径为 13 mm,孔径为 8 μm) , 生长状态良好的培养细胞,胰酶消化后制成单细胞悬液,无血清培养基洗涤细胞 2 次后,细胞计数,调整细胞数为(1 ~2) ×10^6 ml^{-1}。加 100 μl 细胞悬液于内室,然后加 500 μl RPMI1640 培养液(含 0.5% BSA)于下室,设置 3 组:第 1 组即对照组,下室不加任何药物刺激;第 2 组为实验组,下室加 100 ng/ml SDF-1 ;第 3 组为抑制组,细胞用 AMD3100(0.1 g/L)中和作用 30 min ,下室加入 100 ng/ml SDF-1。37 ℃培养 20 h。取出小室,用棉签轻轻擦掉未穿过膜的细胞,PBS 洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次,然后苏木精复染 15 min,用蒸馏水轻轻地冲洗数次,空气中风干。显微镜下随机选取 5 个高倍视野计数穿过膜的细胞数。

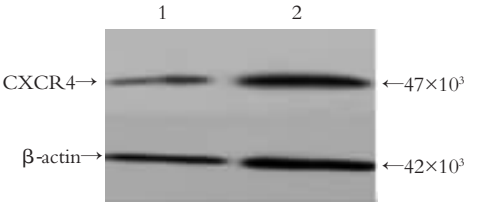
1.3　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,细胞的增殖能力与迁移能力采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　Western blot 检测 CXCR4 蛋白的表达水平

有转移潜能的 5-8F 细胞 CXCR4 蛋白的表达高于无转移能力的 6-10B 细胞。见图 1。

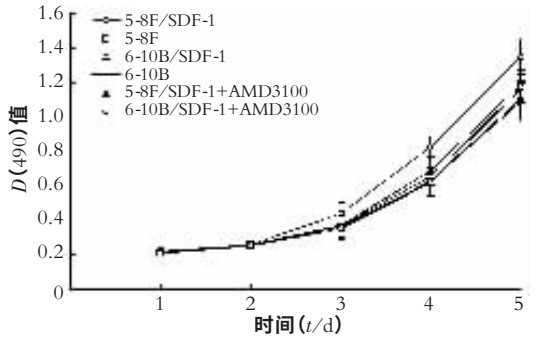


1: 6-10B 细胞; 2: 5-8F 细胞

图 1　Western blot 检测鼻咽癌细胞 5-8F 与 6-10B 中 CXCR4 蛋白的表达

2.2　CXCR4/SDF-1 对细胞增殖能力的影响

MTT 法检测示, SDF-1 作用 5-8F 细胞 1、2 d, 细胞增殖无明显变化;3 d 以后, 细胞的增殖反应明显增强,SDF- 1 刺激后实验组细胞数显著高于对照组($P < 0.01$)。预先孵育 CXCR4 拮抗剂 AMD3100(抑制组)可以对抗 SDF-l 的增殖作用, 使细胞数明显低于实验组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。6-10B 细胞实验组、对照组、抑制组 3 组之间细胞的增殖能力无显著差异($P > 0.05$)。见图 2。

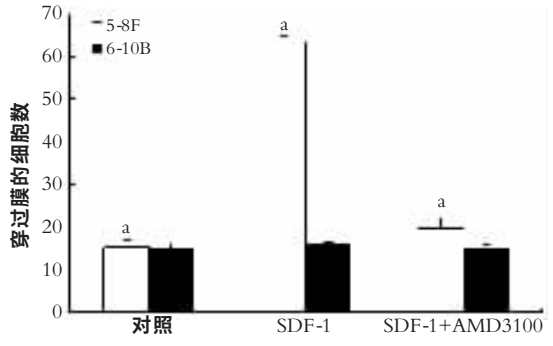


$P<0.05$,3 d 后 5-8F 实验组、对照组、抑制组组间比较

图 2 CXCR4/SDF-1 作用不同时间对鼻咽癌细胞增殖的影响

2.3 CXCR4/SDF-1 对细胞迁移能力的影响

体外迁徙实验显示，SDF-1 可诱导鼻咽癌 5-8F 细胞的迁移，实验组的跨膜鼻咽癌细胞数显著高于对照组，其趋化活性与对照组相比有显著性差异（$P<0.05$）。预先孵育 CXCR4 拮抗剂 AMD3100（抑制组）可以对抗 SDF-1 的趋化作用，使穿膜细胞数明显低于 SDF-1 刺激组，具有显著性差异（$P<0.01$）。SDF-1 及 AMD3100 对低表达 CXCR4 的 6-10B 细胞作用不明显，实验组、对照组、抑制组 3 组之间无显著差异（$P>0.05$）。见图 3。



a：$P<0.05$，5-8F 组间比较

图 3 SDF-1 对 5-8F 与 6-10B 细胞迁移能力的影响

3 讨论

鼻咽癌是一种起源于上皮组织的恶性肿瘤。徐永等[8,9]报道 CXCR4 在鼻咽癌细胞高表达，其表达水平与鼻咽癌细胞的分化程度和增殖能力有关 。Wang 等[10]研究发现 CXCR4 的表达同肿瘤的临床分期和淋巴结转移显著相关，提示 CXCR4 可影响鼻咽癌的转移行为。本研究以鼻咽癌恶性程度不同的细胞株 5-8F 和 6-10B 为研究对象，探讨 CXCR4 /SDF-1 生物学轴对鼻咽癌细胞增殖与迁移能力的影响。通过 Western blot 免疫印迹法检测，恶性程度高的 5-8F 细胞株 CXCR4蛋白的表达高于恶性程度相对低的 6-10B 细胞。MTT 法细胞增殖研究显示，SDF-1 作用 1、2 d，细胞增殖无明显变化；3 d 以后，5-8F 细胞的增殖反应明显增强，预先用 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 作用于细胞，可不同程度地拮抗 CXCR4 与 SDF-1 的结合，抑制 SDF-1 对鼻咽癌细胞的增殖作用；体外迁移实验研究结果显示，CXCR4 表达相对较高的 5-8F 细胞，在 SDF-1 的诱导下，跨膜细胞数显著高于对照组，预先孵育 CXCR4 拮抗剂 AMD3100，SDF-1 诱导迁移的细胞数明显减少。

本研究表明，具有成瘤、高转移潜能的 5-8F 细胞，其 CXCR4 表达水平高于同一亲本来源的仅成瘤、不转移的 6-10B 细胞。细胞增殖实验与体外迁移实验也证实，SDF-1 刺激后，高表达 CXCR4 的 5-8F 细胞增殖与迁移能力明显增强，而 6-10B 细胞增殖与迁移能力均无明显变化。这一结果提示 ，CXCR4 可能与鼻咽癌细胞的恶性行为密切相关，高表达 CXCR4 的肿瘤细胞，在 SDF-1 的作用下，可引起 CXCR4 二聚体的形成，通过激活 G 蛋白偶联的 PI-PLC 和 PI3K，而 PI-PLC 和 PI3K 又通过激活蛋白激酶 C 途径，随后再激活其下游与黏附相关的酪氨酸激酶和细胞外信号调节激酶等信号分子，促进细胞的增殖与迁移[11]。通过抑制趋化因子与趋化因子受体相互作用，可抑制鼻咽癌细胞的增殖与迁移能力。CXCR4 可能是预防和治疗鼻咽癌新的潜在靶标。

参考文献：

[1] Vokes E E, Liebowitz D N, Weichselbaum R R. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 1997, 350(9084):1087 – 1091.

[2] Hu L F, Chen F, Zheng X, *et al*. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1[J]. Oncogene, 1993, 8(6):1575 – 1583.

[3] Balkwill F. Chemokine biology in cancer[J]. Semin Immunol, 2003, 15(1): 49 – 55.

[4] De-Clercq E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100 [J]. Mini Rev Med Chem, 2005, 5(9):805 – 824.

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

[6] Schmid B C, RudasM, Rezniczek G A, *et al*. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia [J]. Breast Can Res Treat, 2004, 84(3): 247 – 250.

[7] Smith M C, Luker K E, Garbow J R, *et al*. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer[J]. Cancer Res, 2004,64 (23) : 8604 – 8612.

[8] 徐 永,张素珍,黄培春, 等. 趋化因子受体 CXCR4 在鼻咽癌细胞中的表达[J]. 癌症, 2004,23(2):136 – 140.

[9] 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与淋巴结转移之间的关系[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4) : 357 – 359.

[10] Wang N, Wu Q L, Fang Y, *et al*. Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome[J]. J Transl Med, 2005, 3:26.

[11] Petit I, Goichberg P, Spiegel A, *et al*. Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34 + progenitor cells[J]. J Clin Invest, 2005, 115 (1) : 168 – 176.

（编辑 王 红）