文章编号:1000-5404(2009)11-1049-04

论著

下调 CXCR4 表达对胶质瘤干细胞侵袭能力和 VEGF 分泌量的影响

赵林涛,卞修武,姜建勇,王 斌,平轶芳,余时沧 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察下调胶质瘤干细胞 CXCR4 表达后对其侵袭能力和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)分泌量的影响。**方法** 采用间接免疫荧光标记观测 U87 细胞及其颅内移植瘤标本中胶质瘤干细胞标记物 CD133 和 CXCR4 共表达情况;分别从稳定转染 CXCR4 小干扰 RNA 质粒的 U87 细胞和稳定转染阴性对照质粒的 U87 细胞中培养出胶质瘤干细胞球,并对其进行鉴定,观察两者 CXCR4 的表达情况;通过 Transwell 小室比较两者的侵袭能力;采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测两者细胞培养上清内 VEGF 的含量。**结果** U87 细胞及其移植瘤中均可检测到 CXCR4 与 CD133 共表达,下调胶质瘤干细胞 CXCR4 表达后,胶质瘤干细胞的体外侵袭能力明显下降[干扰组:(17.0±5.8),对照组:(71.5±8.7),$P<0.05$],VEGF 分泌明显减少[干扰组:24 h (690±24) pg/ml,48 h (1 504±53) pg/ml;对照组:24 h (850±25) pg/ml,48 h (2 001±150) pg/ml,$P<0.05$]。**结论** 胶质瘤干细胞表达 CXCR4,下调其表达可抑制胶质瘤干细胞的侵袭和促血管生成能力,提示 CXCR4 可能成为针对胶质瘤干细胞进行治疗的靶点。

关键词: 胶质瘤干细胞;CXCR4;侵袭;血管内皮生长因子;血管生成
中图法分类号: R394-33; R73-34; R730.264 **文献标识码:** A

Down-regulation of CXCR4 expression inhibits invasion and VEGF production of glioma stem cells

ZHAO Lin-tao, BIAN Xiu-wu, JIANG Jian-yong, WANG Bin, PING Yi-fang, YU Shi-cang (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of CXCR4 downregulation on the invasion capacity and VEGF secretion of glioma stem cells (GSCs). **Methods** Coexpression of CXCR4 and CD133 in U87 cells and their xenografts grown in nude mice brain was detected by indirect immunofluorescence, under a laser scanning microscope. Tumorspheres were isolated from control U87 cells and CXCR4-siRNA U87 cells, respectively. We investigated the expression of CD133, nestin and CXCR4 in tumorspheres by laser scanning microscopy. Effects of CXCR4 downregulation on invasion and VEGF production of GSCs were detected by transwell assay and ELISA respectively. **Results** CXCR4 and CD133 were coexpressed in U87 cells and their xenografts. Down-regulation of CXCR4 expression inhibits the invasion capacity [siRNA:(17.0±5.8), control:(71.5±8.7), $P<0.05$] and VEGF secretion of GSCs[siRNA: 24 h (690±24) pg/ml,48 h (1 504±53) pg/ml, control: 24 h (850±25) pg/ml,48 h (2 001±150) pg/ml, $P<0.05$]. **Conclusion** GSCs express CXCR4, and downregulation of CXCR4 expression attenuates the invasion and pro-angiogenic capacity of GSCs, which suggests that CXCR4 expressed on GSCs may be a potential target of glioma therapy.

Key words: glioma stem cells;CXCR4;invasion;vascular endothelial growth factor;angiogenesis

目前研究认为,肿瘤干细胞可以自我更新、多向分化产生新的瘤体,而非肿瘤干细胞则缺乏这些能力。肿瘤干细胞还具有较非肿瘤干细胞更强的抗化疗、放疗能力。因此,肿瘤干细胞被认为是恶性肿瘤复发的根源[1-6]。我们前期研究表明,胶质瘤细胞表达的趋化因子受体 CXCR4 具有显著的促侵袭和促血管生成能力[7,8],然而 CXCR4 在胶质瘤干细胞中的作用尚需进一步研究。因此,本研究采用小干扰 RNA 下调 CXCR4 表达,并探讨此受体下调后对胶质瘤干细胞侵袭能力和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)分泌量的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

U87 细胞系引自美国菌种保藏中心(ATCC),用含 10% 胎牛血清的 DMEM 常规培养。采用本研究所已建立的方法获取胶质瘤干细胞球[9]。

作者简介:赵林涛,男,山东省潍坊市人,硕士研究生,主要从事胶质瘤干细胞方面的研究。E-mail: zhaolt72@126.com

收稿日期:2009-01-08;修回日期:2009-03-23

1.2 获取稳定转染了 CXCR4 小干扰 RNA 表达质粒的 U87 细胞

根据小干扰 RNA 的设计原则,选择 AAGACTGACCAATATTGTACA 作为针对 CXCR4 cDNA 的干扰靶点,并用 Blast 软件比对以排除和其他基因同源。将干扰片段插入载体 pSilencer™ 3.1-H1 hygro(Ambion 公司,美国)中,使用 FuGENE 转染试剂(Roche 公司,瑞士)将质粒转入 U87 细胞,实验步骤参见说明书。转染后 36 h,在培养基中加入潮霉素(50 ng/ml,博大泰克,中国)进行筛选以获得稳定转染的 U87 细胞;将 Ambion 公司提供的 pSilencer™ 3.1-H1 hygro Negative Control 阴性对照质粒以同样步骤转入 U87 细胞中,将获取的稳定转染的 U87 细胞作为阴性对照。干扰效果通过间接免疫荧光染色、Western blot 进行鉴定。

1.3 间接免疫荧光染色

用正常山羊血清于 37 ℃封闭 1 h,弃去血清,加入兔抗人 CXCR4 抗体(1∶100,美国 Abcam 公司),小鼠抗人 CD133 单克隆抗体(1∶100 ,美国 Abcam 公司)和小鼠抗人 Nestin 单克隆抗体(1∶100,美国 Chemicon 公司)4 ℃孵育过夜,加入荧光标记的二抗于室温孵育 1 h,用 Hochest33258 标记细胞核,50% 甘油封片后,激光共聚焦显微镜观察。

1.4 Western blot 检测

收集细胞,加入细胞裂解液,提取细胞总蛋白,用 BCA 法检测蛋白质浓度,制备 10% SDS-PAGE 凝胶,每孔上样 20 μg。电泳后,转印到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 2 h,加入兔抗人 CXCR4(1∶1 000,美国 Abcam 公司),使用兔抗人 GAPDH(1∶2 000,美国 Abcam 公司)作为内参照,4 ℃孵育过夜。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶10 000,中杉金桥)室温孵育 1.5 h,使用 ECL 化学发光检测。

1.5 体外侵袭实验

使用 Transwell 小室(孔径 8.0 μm,美国 Millipore 公司)检测胶质瘤干细胞的侵袭能力,以 10 μl Matrigel(1∶2稀释,Sigma 公司)37 ℃包被微孔膜过夜。各组胶质瘤干细胞球在去除生长因子及 B27 的 DMEM/F12 中孵育 4 h 后,吹散为单细胞悬液并计数。上室加入 0.2 ml 细胞悬液(约 5×10^5 细胞),下室加入含 20% 胎牛血清的 DMEM,37 ℃孵育 20 h。4% 多聚甲醛室温固定 20 min,湿棉签小心拭去微孔膜上表面未侵袭的细胞,Giemsa 染色后,光学显微镜下随机选取 10 个高倍镜视野,计数侵袭至微孔膜下表面的细胞量。

1.6 培养上清内 VEGF 含量的检测

分别将 2 组胶质瘤干细胞吹散成单细胞悬液后,以 1×10^5/ml 接种于 24 孔板中,每孔加入 0.5 ml 含 0.5% 血清的 DMEM。24 h 后收集细胞培养上清,并使用 VEGF ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)检测培养上清内 VEGF 含量,具体操作参考说明书。

1.7 实验动物和接种方法

选用的近交系无胸腺裸小鼠由第三军医大学实验动物中心提供,鼠龄 3~4 周,雌性,体质量 15~20 g。1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉动物,层流超净台内以微量进样器吸取 5 μl 含 1×10^6 瘤细胞的细胞悬液,在内眦连线与头矢状中线交汇处垂直进针,深度距颅骨表面约 4 mm,注射前略微回退 0.5~1 mm,将瘤细胞悬液缓慢、匀速注入裸鼠颅内,接种后动物全部饲养于 SPF 级环境中。

1.8 RT-PCR 检测

取 0.5 μg 总 RNA 进行 RT-PCR,具体操作参考说明书(TaKaRa 公司,日本)。CXCR4 的引物序列为:上游:5′-AATCTTCCTGCCCACCATCT-3′ 和下游:5′-GACGCCAACATAGACCACCT-3′,产物大小为 367 bp。GAPDH 的引物序列为:上游:5′-TTCATTGACCTCAACTACAT-3′和下游:5′-GAGGCGCCATCCACAGTCTT-3′,产物大小为 466 bp。PCR 反应参数为:95 ℃变性 5 min 后进入循环,95 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,扩增 35 个循环,72 ℃继续延长10 min。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖电泳分离,溴化乙啶染色,凝胶成像系统扫描观察。以 GAPDH 作为内参照。

1.9 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验分析,所有实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 U87 细胞及其移植瘤中 CXCR4 和 CD133 共表达检测

用免疫荧光标记 U87 细胞及其瘤颅内移植瘤标本,激光共聚焦扫描显微镜观察 CXCR4 和 CD133 的表达情况。结果显示 U87 细胞及其移植瘤中均可以检测到 $CD133^+$ 和 $CXCR4^+$ 的胶质瘤细胞(图 1)。

2.2 CXCR4 干扰效果鉴定

获取稳定转染的细胞后,我们分别从 RNA 和蛋白质水平对干扰效果进行检测。RT-PCR 结果显示,干扰组细胞的 CXCR4 mRNA 水平较对照组明显下调[干扰组:(0.50±0.07),对照组:(1.55±0.09),$P<0.05$];Western blot 结果显示,干扰后 CXCR4 蛋白水平也明显下调[干扰组:(0.65±0.09),对照组:(1.86±0.15),$P<0.05$]。见图 2。

2.3 胶质瘤干细胞球的筛选和鉴定

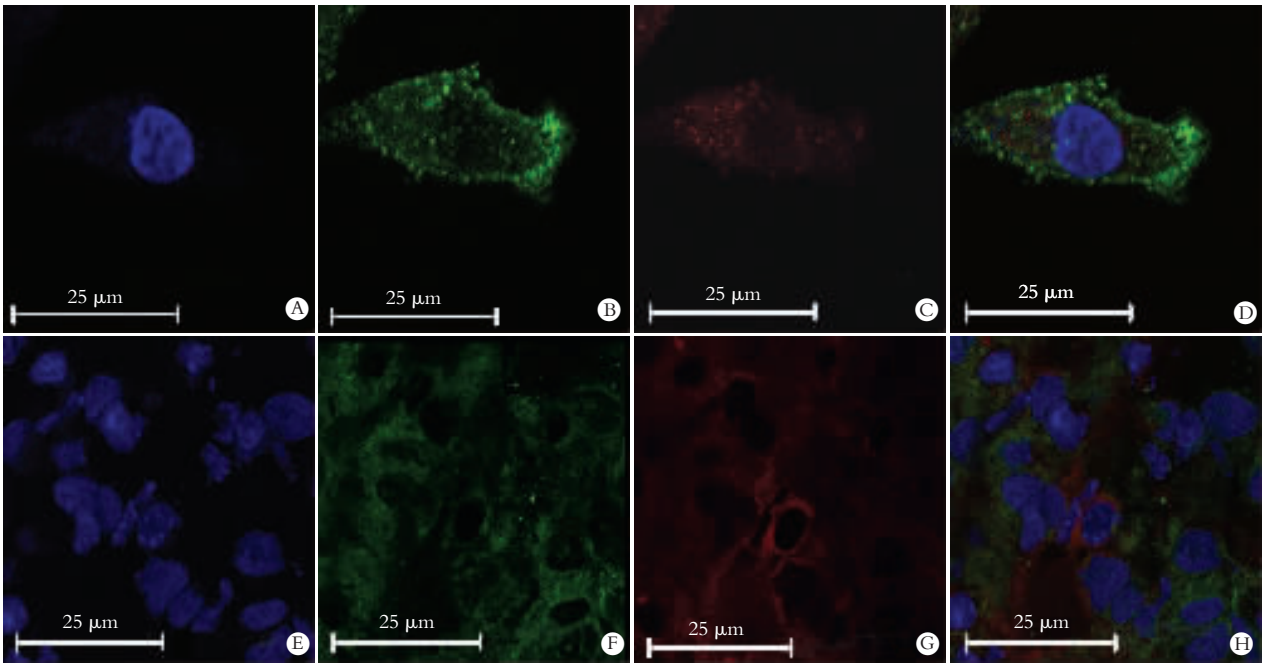
用逐渐添加神经干细胞条件培养基的方法,分别从干扰组与对照组 U87 细胞中成功地培养出胶质瘤干细胞球。2 组胶质瘤干细胞球均表达胶质瘤干细胞的标记物 CD133 和 Nestin,并且从干扰组 U87 细胞中获得的胶质瘤干细胞球,其 CXCR4 的表达较对照组明显降低(图 3)。

2.4 下调 CXCR4 表达抑制胶质瘤干细胞的侵袭能力

如图 4 所示,下调胶质瘤干细胞 CXCR4 表达后,其侵袭能力也显著下降。体外侵袭实验结果显示,干扰组转移至微孔膜下表面的细胞数明显少于对照组[干扰组:(17.0±5.8),对照组:(71.5±8.7),$P<0.05$]。

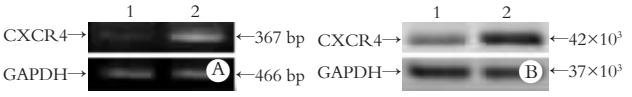
2.5 下调 CXCR4 表达抑制胶质瘤干细胞分泌 VEGF

分别在 24、48 h 时用 ELISA 检测各组胶质瘤干细胞培养上清中 VEGF 的含量。下调胶质瘤干细胞 CXCR4 表达后,其 VEGF 的分泌量也随之降低。在 24 h 时干扰组和对照组 VEGF 的分泌量分别为(690±24)pg/ml 和(850±25)pg/ml,2 组差异有统计学意义($P<0.05$),在 48 h 时干扰组和对照组 VEGF 的分泌量分别为(1 504±53)pg/ml 和(2 001±150)pg/ml,2 组差异有统计学意义($P<0.05$)。



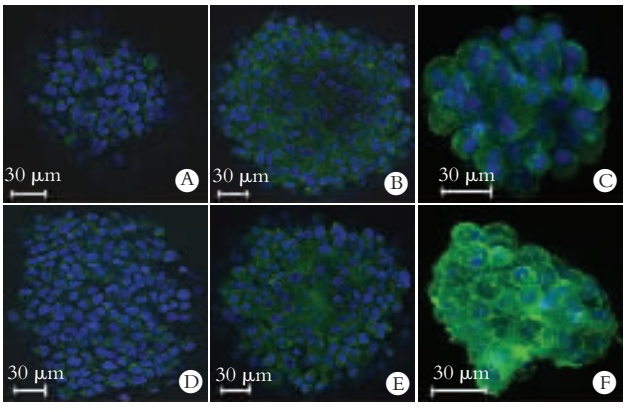
A－D:U87 细胞;E－H:颅内移植瘤冰冻切片;A、E:细胞核;B、F:CXCR4;C、G:CD133;D、H:双标

图 1　间接免疫荧光标记检测胶质瘤干细胞标记物在 U87 细胞及其颅内移植瘤中共表达情况



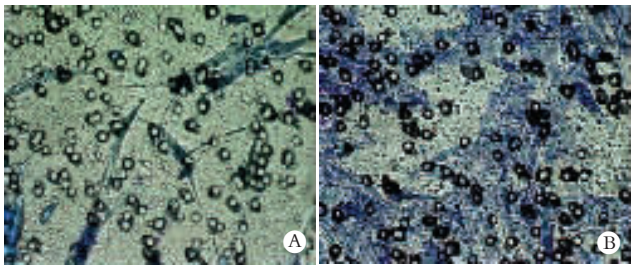
A:RT-PCR;B:Western blot　1:干扰组;2:对照组

图 2　RT-PCR 和 Western blot 检测干扰组和对照组 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达



A－C:干扰组;D－F:对照组;A、D:CD133;B、E:Nestin;C、F:CXCR4

图 3　干扰和对照组胶质瘤干细胞球的鉴定和 CXCR4 蛋白表达水平的检测



A:干扰组;B:对照组

图 4　下调 CXCR4 表达后对胶质瘤干细胞体外侵袭能力的影响
(Giemsa ×400)

3　讨论

长期以来,肿瘤细胞的起源与增生一直是众多学者关注的焦点问题之一,中枢神经肿瘤细胞也不例外。先前多数研究是将肿瘤细胞作为一个整体,研究其生物学特性。随着干细胞研究领域的飞速发展和实验技术的进步,“肿瘤干细胞学说”再次受到人们的关注。目前肿瘤干细胞理论已陆续在白血病、乳腺癌、脑肿瘤、结肠癌、肝癌和前列腺癌中得到证实,并被越来越多的学者所接受。目前研究认为,只有肿瘤干细胞可以自我更新、多向分化、产生新的瘤体,而非肿瘤干细胞则缺乏这些能力。此外,肿瘤干细胞还具有较非肿瘤干细胞更强的抗化疗、放疗能力。常规的治疗有时虽然可以显著的缩小肿瘤的体积,但却不能有效地消除肿瘤干细胞,导致肿瘤迅速复发[10]。因此,肿瘤干细胞被认为是恶性肿瘤复发的根源。为了取得更好的化疗效果,现在许多学者都认为应该寻找那些对肿瘤干细胞有显著作用的治疗靶点。

趋化因子受体 CXCR4 属于 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体家族,可被其特异性配体 SDF-1 激活。CXCR4 在多种肿瘤中都具有很强的促侵袭和促血管生成能力[11－15]。在胶质瘤中,CXCR4 的表达与肿瘤的级别呈正相关,其活化后可促进胶质瘤细胞侵袭,并且活化后还可以通过上调胶质瘤细胞 VEGF 的分泌量来促进肿瘤的血管生成[7,16]。近期研究表明,从原代胶质瘤标本中获取的胶质瘤干细胞表达 CXCR4[3,17]。此外,

我们观察到 U87 细胞中的胶质瘤干细胞也表达 CXCR4。这提示 CXCR4 可能在胶质瘤干细胞的恶性生物学特性中发挥重要作用。

我们的研究表明下调胶质瘤干细胞 CXCR4 表达后可抑制其侵袭,这提示下调胶质瘤干细胞 CXCR4 的表达可能有重要的治疗学意义。首先,由于胶质瘤细胞的侵袭能力很强,外科手术切除肿瘤后,周边残留的部分胶质瘤干细胞可能是肿瘤复发的主要原因,下调胶质瘤干细胞 CXCR4 的表达就可以很好的辅助外科手术,使术后残留较少的胶质瘤干细胞,延迟肿瘤复发。其次,下调 CXCR4 表达可能会增强肿瘤的化疗效果。由于胶质瘤血管的异质性和多样性使化疗药物不能在肿瘤内均一分布,导致在不同的区域化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效果不同。这使得部分胶质瘤干细胞可能会主动侵袭到周围易于其生存的环境得以存活。下调 CXCR4 的表达就可以抑制胶质瘤干细胞的侵袭,从而使其运动受限,增强化疗效果。

胶质瘤的血管极为丰富,通常其血管越丰富预后越差。CXCR4 活化后可以通过上调胶质瘤细胞 VEGF 的分泌量来促进肿瘤的血管生成。以往的研究认为胶质瘤细胞对肿瘤血管生成的贡献相同。近期研究表明胶质瘤干细胞在胶质瘤血管生成中占主要地位,并且其主要通过上调 VEGF 的分泌量来实现[18]。我们的实验结果表明下调胶质瘤干细胞 CXCR4 表达后可以抑制其 VEGF 的分泌。这说明下调 CXCR4 表达可以抑制胶质瘤干细胞的促血管生成能力,从而降低肿瘤的血管密度,抑制肿瘤生长。此外,目前研究认为微血管是胶质瘤干细胞 niche 结构的重要组成部分,胶质瘤干细胞与其周围的微血管存在交互作用。下调胶质瘤干细胞 CXCR4 的表达可能会影响到其 niche 结构,然后再反作用于胶质瘤干细胞对其自我更新、增殖产生影响,进而影响肿瘤的生长。

总之,我们的实验证明下调胶质瘤干细胞 CXCR4 的表达可以显著抑制其侵袭能力,并降低其 VEGF 的分泌,进一步提示 CXCR4 可能是针对胶质瘤干细胞进行治疗的靶点。

参考文献:

[1] Salmaggi A, Boiardi A, Gelati M, *et al*. Glioblastoma-derived tumorospheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype[J]. Glia, 2006,54(8): 850 – 860.

[2] Yuan X, Curtin J, Xiong Y, *et al*. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme[J]. Oncogene, 2004, 23(58): 9392 – 9400.

[3] Liu G, Yuan X, Zeng Z, *et al*. Analysis of gene expression and chemoresistance of $CD133^+$ cancer stem cells in glioblastoma[J]. Mol Cancer,2006, 5:67.

[4] Folkins C, Man S, Xu P, *et al*. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors[J]. Cancer Res,2007,67(8): 3560 – 3564.

[5] Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland E C. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors[J]. Cancer Cell, 2006, 10(6): 454 – 456.

[6] Galli R, Binda E, Orfanelli U, *et al*. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma[J]. Cancer Res,2004,64(19):7011 – 7021.

[7] Yang S X, Chen J H, Jiang X F, *et al*. Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335(2): 523 – 528.

[8] Ehtesham M, Winston J A, Kabos P, *et al*. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness[J]. Oncogene, 2006, 25(19): 2801 – 2806.

[9] Yu S C, Ping Y F, Yi L, *et al*. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87[J]. Cancer Lett, 2008,265(1): 124 – 134.

[10] 梁 兵,肖中鹏,李 艺,等.新型靶向纳米材料介导基因治疗胶质瘤的体外研究[J].重庆医科大学学报,2008,33(1):14 – 19,22.

[11] Spano J P, Andre F, Morat L, *et al*. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome[J]. Ann Oncol, 2004, 15(4): 613 – 617.

[12] Brand S, Dambacher J, Beigel F, *et al*. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation[J]. Exp Cell Res, 2005, 310(1): 117 – 130.

[13] Mori T, Doi R, Koizumi M, *et al*. CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(1): 29 – 37.

[14] 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.

[15] Burger J A, Kipps T J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment[J]. Blood,2006,107(5): 1761 – 1767.

[16] 倪 峰,李红伟,杨 波.人脑胶质瘤组织中 PTEN 与 VEGF 的表达[J].郑州大学学报:医学版,2006,41(5):945 – 946.

[17] Bajetto A, Barbieri F, Dorcaratto A, *et al*. Expression of CXC chemokine receptors 1 – 5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration[J]. Neurochem Int, 2006, 49(5): 423 – 432.

[18] Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, *et al*. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor[J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 7843 – 7848.

(编辑 王 红)