论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2140-03

靶向 CXCR4 的 siRNA 对人食管鳞癌 EC9706 细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用

臧文巧, 轩小燕, 杜 英, 李倩如, 李 敏, 杨 璇 (郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室,郑州 450052)

摘 要: 目的 探讨 CXCR4 siRNA 对人食管鳞癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**方法** 建立人食管鳞癌细胞株 EC9706 裸鼠移植瘤动物模型,瘤旁注射化学合成 CXCR4 siRNA,同时以瘤旁注射阴性对照 siRNA 和 PBS 为对照。监测肿瘤生长变化,测量瘤质量。HE 染色观察肿瘤病理学变化,RT-PCR、免疫组化方法检测 CXCR4 mRNA 和蛋白变化。**结果** 裸鼠体内实验结果显示,与对照组比较,CXCR4 siRNA 组肿瘤生长受到明显抑制,瘤质量下降;HE 染色显示对照组肿瘤体积大、异形明显;RT-PCR、免疫组化结果表明 CXCR4 siRNA 处理组 CXCR4 mRNA 和蛋白表达下调。**结论** CXCR4 siRNA 能抑制人食管鳞癌 EC9706 细胞株裸鼠皮下移植瘤的形成,且能在体内有效下调 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达。

关键词: 食管鳞癌;CXCR4;裸鼠;RNAi

中图法分类号: R73-354; R73-362; R735.1 **文献标识码**: A

CXCR4 siRNA inhibits growth of human esophageal squamous carcinoma EC-9706 cell xenograft in nude mice

ZANG Wen-qiao, XUAN Xiao-yan, DU Ying, LI Qian-ru, LI Min, YANG Xuan (Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Basic Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) siRNA on the growth of transplanted tumors of esophageal squamous carcinoma in nude mice. Methods Nude mice model bearing esophageal squamous carcinoma was reproduced by implanting human esophageal squamous carcinoma cell line EC-9706. CXCR4 siRNA was injected to the area nearby the tumors. The tumors injected with control siRNA or PBS served as control. Tumor growth and tumor weight were measured. Histopathological changes of the tumors were observed with HE staining, and the mRNA and protein expressions of CXCR4 were detected by RT-PCR and immunohistochemical staining respectively. Results Tumor growth was obviously suppressed and tumor volume was significantly smaller in the group treated by with CXCR4 siRNA than in control groups. While the histopathological features in the control group showed that the tumor volumes were bigger and large amount of atypic tumor cells was seen. RT-PCR and immunohistochemical staining indicted that CXCR4 mRNA and protein expressions were reduced in in the group treated by with CXCR4 siRNA. Conclusion CXCR4 siRNA inhibits the tumorigenesis of EC9706 cell xenograft in nude mice and down-regulates the CXCR4 mRNA and protein expressions *in vivo*.

Key words: esophageal squamous carcinoma; CXC chemokine receptor 4; nude mice; RNA interference

食管鳞癌是我国常见的恶性肿瘤之一,深入了解食管鳞癌发生、发展及侵袭转移的机制以寻求新的治疗措施是目前提高食管鳞癌患者预后的关键。我们近期的研究表明,CXCR4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)在食管鳞癌中高表达,且其表达水平与食管鳞癌的预后密切相关。因此,我们化学合成了靶向 CXCR4 的 siRNA,在脂质体介导下转入人食管鳞癌细胞(EC9706)中,此 siRNA 可明显下调 EC9706 细胞中 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达,抑制 EC9706 细胞的体外生长[1]。为进一步研究靶向 CXCR4 的 siRNA 在体内对食管鳞癌生长的影响,本研究首先用 EC9706 细胞在裸鼠体内构建食管鳞癌移植瘤动物模型,采用瘤旁注射给药的方式,观察 CXCR4 siRNA 对食管鳞癌体内生长的影响,探讨其可能机制,以期为食管鳞癌的临床治疗提供新的途径和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人食管鳞癌 EC9706 细胞株由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠。

作者简介:臧文巧,女,河南省郑州市人,硕士,讲师,主要从事肿瘤免疫和自身免疫病方面的研究。E-mail:zangwenqiao@sina.com

通信作者:杜 英,电话:(0371)65113950,E-mail:duying@zzu.edu.cn

收稿日期:2009-03-03;**修回日期**:2009-05-17

EC9706 细胞在含有 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基中生长，并置于 37 ℃、5% CO_2 的条件下培养，实验细胞均处于对数生长期。

1.1.2　实验动物　　4 ~ 6 周龄 BALB/c-nude 雌性裸鼠，平均体质量 18 ~ 22 g，购自中国科学院上海实验动物中心。在恒温（26 ~ 28 ℃）、恒湿（相对湿度 40% ~ 60%）的半屏障系统环境下饲养，笼罩、垫料、饮水及饲料均经灭菌处理。全部饲养过程达到 SPF（special pathogen free）条件。

1.1.3　主要试剂　　脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司，1640 培养基购自 Gibco 公司，CXCR4 兔抗人多克隆抗体、β-actin 兔抗人多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司，cDNA 第一链合成试剂盒及 PCR 扩增试剂盒均购自上海生工公司。靶向 CXCR4 的 siRNA：5′-UAAAAUCUUCCUGCCCACCdTdT-3′，由广州锐博生物科技公司化学合成。同时合成阴性对照 siRNA（碱基序列随机排列，与人类基因的外显子无同源性）。

1.2　方法

1.2.1　裸鼠食管鳞癌移植瘤模型的建立　　取对数生长期的食管鳞癌 EC9706 细胞，显微镜下计数活细胞，PBS 调整浓度到 1×10^7/ ml，接种于裸鼠右前肢腋背部皮下，每只裸鼠接种细胞数为 0.2 ml。接种 1 周左右，可见接种部位皮下长出米粒大小的硬结，为移植瘤模型建成。

1.2.2　实验分组及处理方法　　待肿瘤长到 100 ~ 200 mm^3 时，挑选其中瘤体相近的 15 只裸鼠进行随机分组实验，每组 5 只。CXCR4 siRNA 组：瘤旁注射终浓度为 50 nmol/L 的 CXCR4 siRNA；阴性对照 siRNA 组：瘤旁注射终浓度为 50 nmol/L 的阴性对照 siRNA；对照组：瘤旁注射同等剂量的 PBS。上述各组动物，隔日给药 1 次，共治疗 14 次。均在同等条件下饲养至实验结束。

1.2.3　观察瘤体及瘤质量　　裸鼠自由摄取食料及水，常规饲养，待皮下肿瘤成瘤后，每隔 3 天用游标卡尺测量瘤体大小，待肿瘤长到 100 ~ 200 mm^3，按上述分组分别处理裸鼠，并每日观察裸鼠进食情况、精神状况、活动情况及体质量变化，实验结束时采用颈椎脱臼法统一处死裸鼠，将裸鼠移植瘤瘤体剥离后，电子天平精确称取瘤质量。计算肿瘤抑制率，肿瘤抑制率（%）=（对照组瘤质量 - 实验组瘤质量）/对照组瘤质量 × 100%。

1.2.4　半定量 RT-PCR 检测 CXCR4 mRNA 的表达　　分别提取 3 组肿瘤组织总 RNA，电泳鉴定其完整性。cDNA 第一链合成试剂盒逆转录总 RNA，PCR 扩增 CXCR4 基因。CXCR4 引物为：上游 5′-ACCGAGGAAATGGGCTCAGGG-3′，下游 5′-ATAGTCAGCAGGAGGGCAGGGA-3′，产物片断长度为 470 bp；内参 β-actin 的上游引物为 5′-GGGAAATCGTGCGTGACA -3′，下游引物为 5′-TCAGGAGGAGCAATGATC -3′，产物长度为 385 bp，均由赛百盛公司合成。

1.2.5　HE 染色和免疫组化检测　　分别取 3 组瘤组织，多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片。HE 染色，镜下观察肿瘤的病理变化。免疫组化 S-P 法染色，观察 CXCR4 蛋白的表达。阳性显色为棕黄色颗粒。每张片子随机计数 5 个高倍视野（400 ×），每个视野观察 200 个细胞，记录其中阳性细胞的数值，计算每张片子 200 个细胞中的阳性细胞平均数作为结果进行统计分析。无着色为阴性。

1.3　统计学处理

应用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理，计量资料、统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两样本均数比较采用 t 检验，多个样本均数比较应用单因素方差分析。

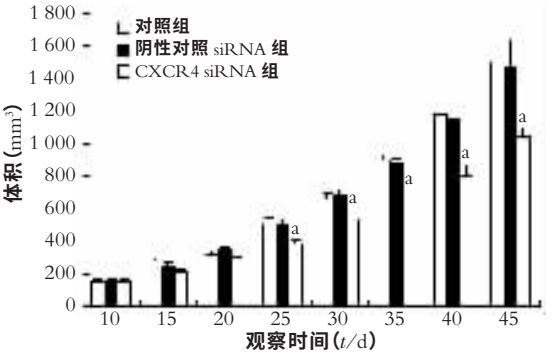
2　结果

2.1　裸鼠食管鳞癌异种移植瘤模型的建立

接种后约 1 周左右，所有裸鼠均有肿瘤长出，表现为接种部位出现小的皮下结节。瘤体起初为椭圆形，以后渐不规则，表面凸凹不平。

2.2　裸鼠皮下移植瘤生长检测

3 组裸鼠在处理前肿瘤体积相对均衡，无显著性差异（$P > 0.05$）。经不同方法处理后，全部裸鼠均存活，与阴性对照 siRNA 组和对照组比较，CXCR4 siRNA 组裸鼠肿瘤体积增长速度明显减慢（图 1），治疗结束时，CXCR4 siRNA 组肿瘤的体积［（1 041.67 ± 52.84）mm^3］与阴性对照 siRNA 组［（1 469.11 ± 172.81）mm^3］、对照组［（1 503.75 ± 137.34）mm^3］相比，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），而阴性对照 siRNA 组和对照组瘤体体积没有显著性差异（$P > 0.05$）。



a：$P < 0.01$，与其他 2 组比较

图 1　3 组裸鼠移植瘤生长情况

2.3　裸鼠移植瘤的抑瘤率

结果发现 CXCR4 siRNA 组瘤质量明显低于阴性对照 siRNA 组和对照组瘤体，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。阴性对照 siRNA 组和对照组间比较，瘤质量没有明显差异（$P > 0.05$）。与对照组比较，CXCR4 siRNA 的抑瘤率达到 31.1%，而阴性对照 siRNA 瘤旁注射抑瘤率仅为 2.8%（表 1）。

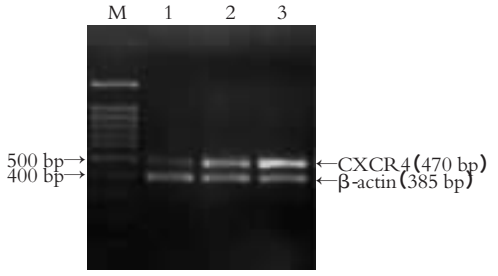
表 1　各组间肿瘤标本的平均质量及肿瘤的抑制率（$n = 5$）

组别	瘤质量（g）	抑瘤率（%）
CXCR4 siRNA 组	0.573 ± 0.031[a]	31.1%
阴性对照 siRNA 组	0.809 ± 0.021	2.8%
对照组	0.832 ± 0.036	–

a：$P < 0.05$，与其他 2 组比较

2.4　半定量 RT-PCR 检测结果

CXCR4 mRNA 在 CXCR4 siRNA 组中的表达明显低于阴性对照 siRNA 组和对照组（图 2）。



M:标准;1:CXCR4 siRNA 组;2:阴性对照 siRNA 组;3:对照组

图2 3组裸鼠瘤组织中 CXCR4 mRNA 的表达

2.5 HE 染色结果

HE 染色后肿瘤组织病理变化观察可见,CXCR4 siRNA 组肿瘤组织内可见细胞凋亡,点、片状坏死灶;肿瘤细胞形状不规则,可见病理性分裂相,少见瘤巨细胞。而阴性对照 siRNA 组和对照组肿瘤片状排列;肿瘤细胞大小不一,核染色质多,核大不规则,可见病理性核分裂相,瘤巨细胞常见,异型性明显。

2.6 免疫组化结果

与阴性对照 siRNA 组[阳性细胞数为(134±8)]和对照组(143±5)比较,CXCR4 siRNA 组瘤体内 CXCR4 蛋白表达(78±6)显著下调($P<0.05$)。

3 讨论

趋化因子受体(chemokine receptor)是一类表达于不同类型细胞上的能和趋化因子结合的含7个跨膜区的G蛋白偶联受体。趋化因子和趋化因子受体结合后可参与多种生理和病理过程[2]。其中趋化因子受体 CXCR4 及其配体 SDF-1 相互作用形成的反应轴尤其引人注目。自 1996 年 Feng 等首次克隆出 CXCR4 以来,已经在 23 中不同类型肿瘤中发现 CXCR4 基因的异常表达,是目前肿瘤细胞表达最为普遍的趋化因子受体,并且和患者的预后相关[3]。Kang 等[4]通过检测 120 例乳腺癌组织中 CXCR4 的表达发现,CXCR4 表达阳性与患者淋巴结、远处转移相关;Li 等[5]则发现高表达 CXCR4 的乳腺癌患者预后较差。一项关于结直肠癌的研究表明,CXCR4 高表达与肿瘤的复发、肝脏转移相关,并且相应患者生存率也较低[6]。另外,在卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌等其他肿瘤的研究中也得到了相似的结果。虽然目前 SDF-1/CXCR4 轴在肿瘤发生、发展及浸润转移中的确切机制尚不明了,但现有资料表明,SDF-1/CXCR4 轴相互作用构成的反应轴可作为肿瘤治疗过程中的新靶点,因此封闭 CXCR4 基因在肿瘤细胞中的表达将有可能成为肿瘤基因治疗研究的新热点,从而为肿瘤治疗开辟新的途径。

RNAi 技术自 1998 年首次报道以来,因其高度特异性、高效性等特点引起研究者们越来越多的关注,已用于多种基因功能的研究、肿瘤的试验性治疗的多项领域[7]。目前已有研究者利用 RNAi 技术封闭肿瘤细胞中 CXCR4 基因的表达从而有效抑制肿瘤细胞的增殖和转移。研究发现,当乳腺癌细胞系 MDA-MB231 中的 CXCR4 被 siRNA 特异性抑制后,细胞扩增速度明显降低[8]。李康华等[9]报道,小干扰 RNA 能下调骨肉瘤细胞株 MG-63 中的 CXCR4 mRNA 的表达和降低其体外侵袭潜能,并表明小干扰 RNA 能快速、有效地抑制目的基因 CXCR4 的表达和组织骨肉瘤的转移。我们前期研究证实,利用 RNAi 技术将化学合成的 CXCR4 siRNA 体外转染食管鳞癌 EC9706 细胞后,能有效抑制 EC9706 细胞中 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达,抑制癌细胞的增殖和侵袭转移[1]。但机体内部环境远较体外环境复杂得多,如动物对药物的吸收性、敏感性、耐药性,荷瘤动物体内局部和全身循环免疫状态,给药方式、给药剂量、给药频率和药物剂型,这些因素相互影响导致肿瘤细胞发生机制、生物学行为在体外与体内表现不尽相同。

为进一步验证 CXCR4 siRNA 在体内的作用,我们成功构建了食管癌异种移植瘤动物模型。结果发现,CXCR4 siRNA 处理组肿瘤的生长明显受到抑制,其成瘤率也下降显著。进一步实验表明,CXCR4 siRNA 处理组 CXCR4 mRNA 的表达明显低于对照组,并且 CXCR4 siRNA 处理组肿瘤组织内可见大量凋亡细胞,且瘤组织间可见点、片状坏死灶。表明 CXCR4 siRNA 转染的食管鳞癌 EC9706 细胞不仅在体外可以干扰 CXCR4 基因的表达,影响 EC9706 细胞的增殖,接种到裸鼠体内同样可以降低 CXCR4 表达,同时明显抑制肿瘤的生长。

以上实验结果表明,CXCR4 在食管鳞癌的生长和增殖中具有重要作用,为 CXCR4 siRNA 治疗食管鳞癌提供了更多证据,为进一步从体内途径深入研究 CXCR4在食管鳞癌发生、发展及浸润转移中的作用提供了理论基础。

参考文献:

[1] 王 涛,轩小燕. siRNA 沉默 CXCR4 基因对食管鳞癌 EC9706 细胞体外侵袭能力的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(18): 1057-1060.

[2] 厉红元, 任国胜, 谭金详. siRNA 沉默人乳腺癌细胞株 CXCR4 基因的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 728-730.

[3] 蒋玉萍, 吴小华. 趋化因子 CXCL12 及其受体与肿瘤转移的关系[J]. 癌症, 2007, 26(2): 220-224.

[4] Kang H, Watkins G, Douglas-Jones A, *et al*. The elevated level of CXCR4 is correlated with nodal metastasis of human breast cancer[J]. Breast, 2005, 14(5): 360-367.

[5] Li Y M, Pan Y, Wei Y, *et al*. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis[J]. Cancer Cell, 2004, 6(5): 459-469.

[6] Kim J, Takeuchi H, Lam S T, *et al*. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(12): 2744-2753.

[7] 黄渝侃, 张明昌, 王 勇, 等. p27Kip1 基因 shRNA 表达质粒的构建鉴定及功能研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(22): 2148-2151.

[8] Leung R K, Whittaker P A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics[J]. Pharmacol Ther, 2005, 107(2): 222-239.

[9] 李康华, 肖文峰, 龙海涛, 等. 小干扰 RNA 对骨肉瘤细胞株 CXCR4 基因表达和侵袭力的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(7): 1088-1091.

(编辑 邓强庭)