文章编号:1000-5404(2010)01-0063-04

论著

CXCR7/CXCL12对人乳腺癌细胞侵袭和黏附能力的影响

郑 科,厉红元,苏新良,王小毅,谭金祥,孔令全,任国胜 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科)

[摘要] **目的** 探讨趋化因子受体CXCR7及其配体CXCL12对人乳腺癌细胞MDA-MB-435s移动性、侵袭能力以及黏附能力的影响。**方法** 运用RNA干扰技术,沉默人乳腺癌细胞MDA-MB-435s CXCR7基因的表达,分别用RT-PCR、Western blot检测CXCR7 mRNA及蛋白表达水平;划痕实验检测细胞移动性的变化;Transwell小室侵袭实验检测细胞侵袭能力的变化;黏附实验检测肿瘤细胞与细胞外基质的黏附能力。**结果** 有效沉默CXCR7的表达后,与空白对照组比较,CXCR7 mRNA及蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$),CXCL12诱导的人乳腺癌细胞移动速度减慢,侵袭能力和黏附能力明显减弱($P<0.05$)。**结论** CXCR7表达的改变能够调节人乳腺癌细胞移动性、侵袭和黏附能力。CXCL12/CXCR7生物轴在乳腺癌的侵袭转移过程中可能具有重要作用。

[关键词] 人乳腺癌细胞;细胞移动性;细胞侵袭;细胞黏附;CXCR7
[中图法分类号] R737.9; R394.3; R73-37 **[文献标志码]** A

Silencing CXCR7 decreases invasion and adhesion of human breast cancer cells

Zheng Ke, Li Hongyuan, Su Xinliang, Wang Xiaoyi, Tan Jinxiang, Kong Lingquan, Ren Guosheng (Department of Endocrinology and Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of chemokine receptor CXCR7 and its ligand CXCL12 on the migration, invasion and adhesion of breast cancer cell line MDA-MB-435s. **Methods** The expression of the CXCR7 on MDA-MB-435s cells was inhibited by RNA interference. Expression levels of CXCR7 mRNA and CXCR7 protein were assayed by RT-PCR and Western blot respectively. Effect of altered expression of CXCR7 on cell migration was measured by cell scratch assay, cell invasion by Transwell chamber and cell adhesion by adhesion assay respectively. **Results** The expression levels of CXCR7 mRNA and CXCR7 protein, and the migration, invasion and adhesion of the cancer cells were all decreased significantly after the silencing of CXCR7 compared with the control cells. **Conclusion** The migration, invasion and adhesion of human breast cancer cells are regulated by CXCR7. CXCL12/CXCR7 axis may play an important role in the invasion and metastasis of breast cancer.

[Key words] human breast cancer cells; cell migration; cell invasion; cell adhesion; chemokine receptor 7

Corresponding author: Ren Guosheng, Tel: 86-23-89012511, E-mail: rgs726@163.com

乳腺癌患者的预后与肿瘤的转移密切相关,远处转移已成为制约患者长期生存的主要障碍,是乳腺癌治疗面临的最棘手问题[1]。近年研究发现,趋化因子受体与其配体特异性结合,在肿瘤的器官特异性转移中发挥重要作用,并提出了肿瘤细胞通过趋化因子受体与其配体结合而实现器官特异性转移的理论模型[2]。以前的大量研究认为,趋化因子12(chemokine 12, CXCL12)只能与其唯一的受体CXCR4结合,然而最近发现,趋化因子受体7(chemokine receptor 7, CXCR7)也能够与CXCL12结合作为其新的受体,从而形成CXCR7/CXCL12生物轴;CXCR7表达于许多肿瘤细胞系,而大多数正常细胞表面不表达,已有部分研究提示,CXCR7与乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、胰腺癌、Kaposi's肉瘤的发生、发展具有一定的联系[3-9]。Miao等[4]发现CXCR7高表达于乳腺癌组织,且体内实验表明CXCR7在乳腺癌细胞实验性肺转移过程中具有重要作用。据这些研究结论,我们初步推测CXCR7在肿瘤发生、发展中可能具有一定的作用,所以我们希望探寻CXCR7在乳腺癌中的作用。本研究运用RNA干扰技术沉默CXCR7的表达,探讨CXCR7表达的改变对人乳腺癌细胞移动性、侵袭能力以及黏附能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞MDA-MB-435s,由重庆医科大学核医学教研

[通信作者] 任国胜,电话:(023)89012511, E-mail: rgs726@163.com

室李少林教授惠赠,胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),G418(Gibco),RPMI1640培养基(重庆医科大学基研所提供),基因重组人CXCL12(英国Peprotech),兔抗人CXCR7多克隆抗体(英国Abcam),总RNA提取试剂盒(上海华舜生物技术有限公司),RT-PCR试剂盒(大连宝生物公司),Lipofectamine 2000(Invitrogen),兔抗人β-actin抗体、羊抗兔二抗(北京中杉金桥),CXCR7引物(上海生工),BSA、ECL显色剂(碧云天公司),Transwell小室、Matrigel、纤维粘连蛋白(fibronectin,FN)(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建 载体pGPU6/GFP/Neo带绿色荧光蛋白,本室前期研究已成功构建出CXCR7短发夹状RNA(short hairpin RNA,shRNA)序列的真核表达载体,并已经酶切鉴定和测序证实,命名为CXCR7 shRNA。CXCR7 shRNA靶序列:5′-GCATCTCTTCGACTACTCAGA-3′,正义链:5′-CACCGCATCTCTTCGACTACTCAGATTCAAGAGATCTGAGTAGTCGAAGAGATGCTTTTTTG-3′,反义链:5′-GATCCAAAAAAGCATCTCTTCGACTACTCAGATCTCTTGAATCTGAGTAGTCGAAGAGATGC-3′。

1.2.2 转染及稳定表达细胞株的筛选 人乳腺癌细胞MDA-MB-435s放入10%胎牛血清的RPMI1640培养基,在37 ℃,5% CO_2培养箱中培养,细胞培养至对数生长期待用。本室前期研究已筛选出稳定表达细胞株。待细胞增至90% ~95%时,按照Lipofectamine2000脂质体转染试剂盒说明书进行转染操作。转染24 h后在倒置荧光显微镜下观察荧光,2 d后更换为G418筛选培养液(700 μg/ml)筛选,对照细胞全部死亡时降低G418浓度至300 μg/ml维持筛选,3周后可见细胞克隆,获得稳定表达的细胞,荧光显微镜下观察转染效率。本研究共分3组:空白对照组、无关shRNA组、CXCR7 shRNA组(n=3)。

1.2.3 RT-PCR检测CXCR7 mRNA表达 收获各组细胞,提取细胞总RNA,PCR扩增目的片段CXCR7和内参GAPDH;根据GenBank中CXCR7基因序列设计引物,CXCR7上游:5′-TGGGTGGTCAGTCTCGT-3′;下游:5′-CCGGCAGTAGGTCTCAT-3′,产物大小为294 bp。以人GAPDH为内参,上游:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′;下游:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,产物大小为450 bp。反应条件:94 ℃变性5 min,变性94 ℃ 30 s,退火56 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 30 s,循环30次,终末延伸72 ℃ 10 min,其他步骤按说明书进行。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下观察并拍照。

1.2.4 Western blot检测CXCR7蛋白水平表达 收获各组细胞,提取细胞总蛋白,采用BSA法进行蛋白定量后,将蛋白样品和5×SDS上样缓冲液4∶1的比例混匀,置于沸水浴中加热5 min。蛋白样品每孔上样量均为50 μg总蛋白。制备10% SDS-PAGE凝胶进行电泳分离。分离的蛋白条带转移至PVDF膜上,转膜时间为60 min。室温封闭1 h后,分别加入CXCR7 mAb(1∶1 000)、β-actin(1∶1 000),4 ℃过夜;以TBST洗膜10 min×3次;加入羊抗兔二抗(1∶5 000),室温孵育1 h后,以TBST洗10 min×3次。最后用化学发光法(ECL)曝光显影,冲洗胶片。β-actin作为内参照。

1.2.5 划痕实验检测细胞移动性 将5×10^5/ml稳定转染后的细胞接种在6孔板,待其生长至临近90%融合时,用200 μl无菌枪头在细胞板上沿直线划痕,然后用PBS将细胞轻柔洗涤2遍,加入含10%胎牛血清RPMI1640培养基,同时各组细胞均加入CXCL12(100 ng/ml)诱导。划痕后的第0、24小时用荧光倒置显微镜观察细胞移动情况以及划痕宽度的变化。

1.2.6 细胞体外趋化侵袭实验(Transwell小室实验) 将Matrigel用含0.1%胎牛血清的培养基稀释成100 μg/ml,加入滤膜上表面(5 μg/滤膜),室温下通风橱中干燥过夜。用前Matrigel以40 μl无血清培养基重建20 min后备用。收获各组对数生长期的细胞,用无血清培养基RPMI1640悬浮,将200 μl细胞悬液(1×10^5个细胞)加入上室,下室内加入600 μl RPMI 1640含CXCL12(浓度为100 ng/ml)的细胞培养液,37 ℃、5% CO_2条件下孵育24 h后取出Transwell小室(上下室之间为直径8 μm PET微孔滤膜),以棉签小心刮除滤膜上室面的细胞;以甲醇固定迁移并黏附到下室面的细胞,常规HE染色,封片后显微镜下(×200)直接观察穿过膜的细胞数。每张膜取3个视野,计数每个视野内穿过微孔的细胞数,重复3次,取均值。

1.2.7 肿瘤细胞与细胞外基质黏附实验 96孔板分别用0.01 mg/ml的BSA、FN和Matrigel胶包被(BSA作为空白对照组),4 ℃过夜。PBS洗涤2次,加入含0.02% BSA的RPMI1640,37 ℃封闭1 h。用含CXCL12(100 ng/ml)的RPMI1640制备细胞悬液(2×10^5/ml),将200 μl细胞悬液加入各孔,37 ℃,5% CO_2孵育2 h,使细胞黏附于细胞外基质。吸出培养基,PBS轻柔洗涤3次,除去未黏附细胞,依次加入100 μl RPMI1640、25 μl MTT(5 mg/ml),37 ℃,5% CO_2孵育4 h。弃上清,加入150 μl DMSO在酶联免疫仪读数。在波长570 nm处读数,空白对照组调零,测各孔吸光度值[D(570)]。

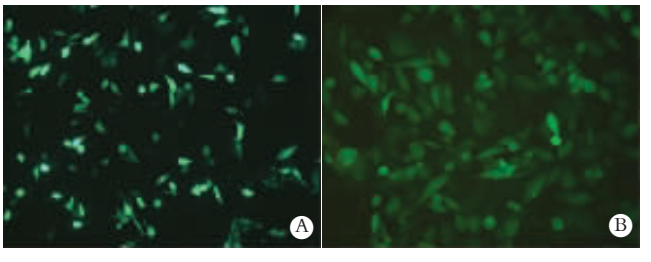
1.3 统计学分析

肿瘤细胞黏附能力[D(570)]以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 稳定转染细胞株筛选

转染24 h后,倒置荧光显微镜下观察,转染成功的细胞可见绿色荧光。更换G418选择培养液后第4天,细胞开始出现死亡,第3周开始出现细胞克隆;第4周能见到最大的细胞克隆;稳定筛选后,倒置荧光显微镜下可见大量绿色荧光,转染效率为80% ~90%;稳定表达的细胞株用于后续实验。见图1。



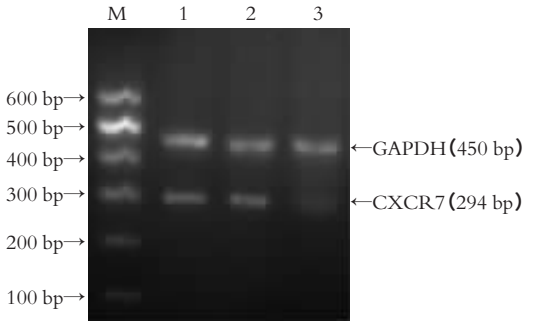
A:转染24 h后;B:稳定筛选后

图1 转染24 h后及稳定筛选后MDA-MB-435s细胞荧光观察(荧光显微镜 ×200)

2.2 RNA干扰后RT-PCR检测MDA-MB-435s细胞CXCR7 mRNA的表达

RT-PCR结果显示,与空白对照组相比,CXCR7 shRNA组

CXCR7 mRNA 表达下调,密度扫描半定量分析表明 CXCR7 表达抑制率为 72.1%,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明 CXCR7 shRNA 能有效抑制 CXCR7 mRNA 表达。空白对照组、无关 shRNA 组之间 CXCR7 mRNA 表达无明显差异($P>0.05$)。各组之间 GAPDH 表达无明显差异($P>0.05$)。见图 2。



M:DNA 标准; 1:空白对照组;2:无关 shRNA 组;3:CXCR7 shRNA 组

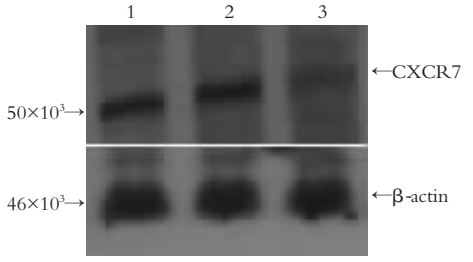
图 2　RNA 干扰后 MDA-MB-435s 细胞 CXCR7 mRNA 的表达

2.3　RNA 干扰后 Western blot 检测 MDA-MB-435s 细胞 CXCR7 蛋白的表达

Western blot 结果示:CXCR7 shRNA 组与空白对照组及无关 shRNA 组比较,细胞内 CXCR7 蛋白表达下调,其抑制率为 69.6%($P<0.05$),表明 CXCR7 shRNA 真核表达载体能有效沉默 CXCR7 蛋白的表达。与空白对照组比较,无关 shRNA 组蛋白表达无明显改变,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。各组间内参 β-actin 表达无明显差异($P>0.05$)。见图 3。

2.4　RNA 干扰后 CXCL12 诱导下细胞移动性的变化

有效沉默 CXCR7 的表达后,经 CXCL12 的诱导,划痕实验检测乳腺癌细胞的移动能力是否发生变化。在划痕后的第 0、24 小时倒置显微镜下可见,空白对照组和无关 shRNA 组细胞移动速度较快,经过 24 h 培养划痕逐渐愈合。然而,CXCR7 shRNA 组细胞移动速度明显减慢,经过24 h培养划痕仍未愈合。结果表明抑制 CXCR7 的表达,能够减弱 CXCL12 诱导的乳腺癌细胞的移动能力。见图 4。



1: 空白对照组; 2: 无关 shRNA 组; 3: CXCR7 shRNA 组

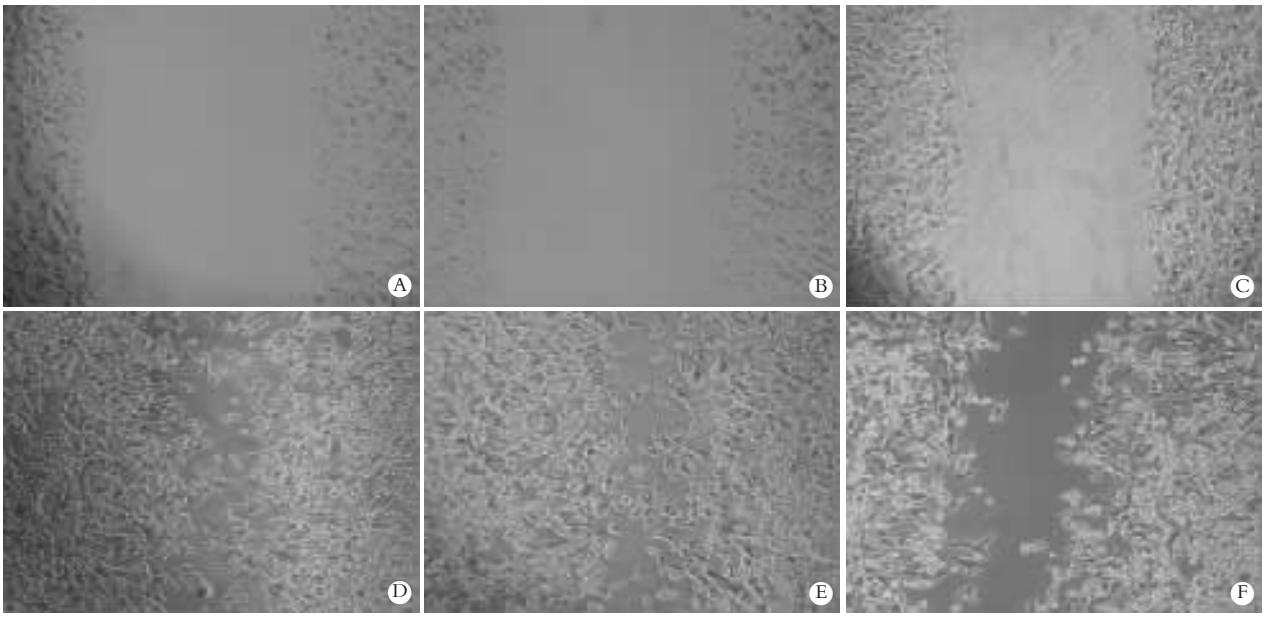
图 3　RNA 干扰后各组 MDA-MB-435s 细胞蛋白的表达

2.5　RNA 干扰后 CXCL12 诱导下细胞侵袭能力的变化

Transwell 小室侵袭实验检测细胞的侵袭能力,有效沉默 CXCR7 的表达后,各组细胞均加入 CXCL12 进行诱导,结果显示:空白对照组、无关 shRNA 组和 CXCR7shRNA 组穿膜细胞数分别为(39.00 ± 2.00)、(38.22 ± 2.63)和(7.44 ± 1.58)。与空白对照组比较,CXCR7 shRNA 组穿过 Matrigel 的 MDA-MB-435s 细胞数明显减少,细胞的侵袭能力明显减弱($P<0.05$);无关 shRNA 组和空白对照组穿膜细胞数较多,2 组之间比较无明显差异($P>0.05$)。结果提示,沉默 CXCR7 的表达能够抑制 MDA-MB-435s 细胞的侵袭能力。

2.6　RNA 干扰后 XCL12 诱导下细胞黏附能力的变化

有效沉默 CXCR7 的表达后,在 CXCL12 诱导下,检测肿瘤细胞与细胞外基质的黏附能力,黏附实验结果示:在 BSA 包被的孔内,各组黏附细胞较少,组间无明显差异($P>0.05$);在 FN 和 Matrigel 包被的孔内,与空白对照组相比,CXCR7 shRNA 组细胞对 FN 和 Matrigel 的黏附能力明显降低($P<0.05$);而空白对照组与无关 shRNA 组之间黏附能力无明显差异($P>0.05$)。见表 1。结果提示,抑制 CXCR7 的表达能够使细胞与细胞外基质(FN 和 Matrigel)的黏附能力减弱。



A:空白对照组 0 h; B:无关 shRNA 组 0 h; C: CXCR7 shRNA 组 0 h; D: 空白对照组 24 h; E:无关 shRNA 组 24 h; F: CXCR7 shRNA 组 24 h

图 4　第 0、24 小时各组细胞的移动性　(倒置显微镜 ×200)

表1 RNA干扰后CXCL12诱导下细胞黏附能力的变化[$D(570)$, $n=3$, $\bar{x}\pm s$]

组别	BSA	FN	Matrigel
空白对照组	0.13±0.02	0.41±0.02	0.43±0.02
无关shRNA组	0.12±0.03	0.39±0.01	0.42±0.03
CXCR7 shRNA组	0.11±0.02	0.18±0.01[a]	0.24±0.02[a]

a:$P<0.05$,与空白对照组比较

3 讨论

越来越多的研究表明,趋化因子及其受体在肿瘤的发生、发展,尤其是肿瘤转移过程中具有重要作用[10]。CXCR7是近年来发现的新趋化因子受体,研究表明,CXCR7与部分肿瘤的侵袭转移具有一定的联系,如乳腺癌、肺癌、前列腺癌[3-6]。

我们前期研究发现人乳腺癌细胞株MDA-MB-435s表达CXCR7,这与Burns等[3]的研究结果并不一致。我们分析出现此差异可能是因为,我们所用的细胞是经过筛选的高转移细胞株,比筛选前转移能力更强,筛选后细胞的某些生物学特性有所改变,如侵袭能力增强[11]。本室前期研究已成功构建出重组质粒CXCR7shRNA,并经RT-PCR、Western blot检测能够有效抑制CXCR7 mRNA和蛋白的表达。

研究发现,在CXCL12的诱导下,CXCR7表达的改变对斑马鱼原始生殖细胞、肾多能祖细胞的移动性具有一定的影响[12,13]。大量研究已证实肿瘤细胞的移动能力在肿瘤的侵袭转移过程中具有重要作用,所以我们首先研究CXCR7能否影响人乳腺癌细胞的移动性。在有效沉默CXCR7的表达后,借助细胞划痕实验,发现在CXCL12的诱导下,人乳腺癌细胞移动能力减弱,经过24 h划痕仍未愈合,结果提示,抑制CXCR7的表达能够减弱CXCL12诱导的MDA-MB-435s细胞的移动性。

已有研究发现CXCR7能够促进乳腺肿瘤,肺肿瘤的生长以及转移,免疫组织化学发现在人乳腺癌及肺癌中CXCR7高表达,肿瘤血管内皮细胞也高表达CXCR7[4]。在研究前列腺癌时,运用组织微阵列方法分析人体肿瘤标本发现,CXCR7与肿瘤的分级及侵袭状态有关,同时CXCR7能够增强肿瘤细胞的侵袭能力[5]。Meijer等[8]发现CXCR7能够影响肿瘤细胞的趋化性,而对裸鼠皮下移植瘤转移无明显影响。这些研究结果存在一定分歧,所以我们希望研究CXCR7是否能够影响人乳腺癌细胞的侵袭能力,本研究以Transwell小室为模型,在有效抑制CXCR7的表达后,发现经CXCL12诱导穿过Matrigel的MDA-MB-435s细胞数明显减少,肿瘤细胞侵袭能力明显减弱。此外,肿瘤细胞与细胞外基质黏附,是肿瘤侵袭转移的重要步骤。有研究表明,CXCR7能够影响肿瘤细胞的黏附能力[3,5]。本研究运用细胞与细胞外基质黏附实验,发现沉默CXCR7的表达后,乳腺癌细胞与细胞外基质的黏附能力减弱。

总之,本研究发现CXCR7表达的下调,能够使人乳腺癌细胞MDA-MB-435s的移动性、侵袭能力和黏附能力减弱。然而,细胞内复杂的趋化因子网络远未阐明,CXCR7与其配体结合后,最终会激活细胞内哪些信号分子?目前仍知之甚少。因此,我们希望随着对趋化因子及其受体研究的不断深入,逐步阐明细胞内复杂的趋化因子网络,为深入研究乳腺癌侵袭转移机制提供新的思路和线索。

参考文献:

[1] 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.

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

[3] Burns J M, Summers B C, Wang Y, *et al*. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development[J]. J Exp Med, 2006, 203(9): 2201-2213.

[4] Miao Z, Luker K E, Summers B C, *et al*. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(40): 15735-15740.

[5] Wang J, Shiozawa Y, Wang J, *et al*. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer[J]. J Biol Chem, 2008, 283(7): 4283-4294.

[6] 郑科,厉红元,苏新良,等. 趋化因子受体CXCR7对人乳腺癌细胞生长凋亡及细胞周期的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(20):2005-2008.

[7] Raggo C, Ruhl R, McAllister S, *et al*. Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5084-5095.

[8] Meijer J, Ogink J, Roos E. Effect of the chemokine receptor CXCR7 on proliferation of carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Br J Cancer, 2008,99(9):1493-1501.

[9] Marechal R, Demetter P, Nagy N, *et al*. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2009, 100(9):1444-1451.

[10] Epstein R J. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(11): 901-909.

[11] 张涛,汤为学,蔡辉,等. 不同转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立与生物学特性的分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(18): 1726-1729.

[12] Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, *et al*. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration[J]. Cell, 2008, 132(3): 463-473.

[13] Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, *et al*. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells[J]. J Exp Med, 2008, 205(2): 479-490.

(**收稿**:2009-04-25;**修回**:2009-07-15)

(编辑 栾 嘉)