文章编号:1000-5404(2009)20-2005-04

论著

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

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

摘 要:目的 通过构建CXCR7短发夹状RNA(short hairpin RNA,shRNA)序列的真核表达载体,探讨趋化因子受体CXCR7对人乳腺癌细胞MDA-MB-435s增殖、凋亡、周期的影响。**方法** 针对CXCR7构建编码shRNA序列的重组表达载体;分别用RT-PCR和Western blot检测CXCR7 mRNA及蛋白表达水平;MTT法检测细胞增殖;TUNEL法检测细胞凋亡;流式细胞术检测细胞周期。**结果** 构建针对CXCR7短发夹状RNA序列的表达载体,经酶切及测序证实与设计完全一致;将2个CXCR7shRNA载体(CXCR7-shRNA1;CXCR7-shRNA2)转染MDA-MB-435s细胞后,CXCR7 mRNA及蛋白平均降低;抑制CXCR7的表达后,CXCR7-shRNA组细胞增殖率明显下降($P<0.05$),细胞凋亡增多($P<0.05$),细胞周期无明显改变。**结论** 重组表达载体CXCR7-shRNA1、CXCR7-shRNA2能有效抑制靶基因CXCR7的表达,进而可抑制人乳腺癌MDA-MB-435s细胞的增殖,促进细胞凋亡,而对细胞周期无明显影响。

关键词: 人乳腺癌细胞;细胞周期;凋亡;CXCR7;shRNA
中图法分类号: R394-33;R730.23;R737.9 **文献标识码:** A

Effect of chemokine receptor 7 (CXCR7) on proliferation, apoptosis and cycle of human breast cancer cell line MDA-MB-435s

ZHENG Ke, LI Hong-yuan, SU Xin-liang, WANG Xiao-yi, TAN Jin-xiang, KONG Ling-quan, REN Guo-sheng (Department of Endocrinology and Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct an expressing vector encoding short hairpin RNA (shRNA) targeting chemokine receptor 7 (CXCR7) and explore its effect on the proliferation, apoptosis, and cycle of the human breast cancer cell line MDA-MB-435s. Methods Expressing vector of CXCR7 shRNA was constructed and transfected into MDA-MB-435s cells. Expression levels of CXCR7 mRNA and CXCR7 protein were assayed by RT-PCR and Western blot analysis respectively. Cell proliferation was measured by MTT method, cell apoptosis by TUNEL assay, and cell cycle by flow cytometry. Results Recombinant expressing vector CXCR7 shRNAs was successfully constructed. Enzyme digesting and sequencing showed that the insertion sequence was correct. After transfection of 2 CXCR7 shRNA vectors (CXCR7-shRNA1 and CXCR7-shRNA2), the expression levels of CXCR7 protein and CXCR7mRNA in the MDA-MB-435s cells were significantly decreased compared with those of control shRNA and untreated cells ($P<0.05$). The proliferation of cancer cells was decreased significantly ($P<0.05$) while the apoptosis was increased significantly after CXCR7-shRNA1 and CXCR7-shRNA2 transfection ($P<0.05$). However, the cell cycle had no significant difference compared with those of control shRNA and untreated cells. Conclusion Recombinant expressing vector CXCR7 shRNAs effectively inhibits the expression of CXCR7, and suppresses the proliferation of MDA-MB-435s cells to promote cell apoptosis, but has no obvious influence on the cell cycle after the inhibition of the CXCR7.

Key words: human breast cancer cells; cell cycle; apoptosis; chemokine receptor 7; shRNA

趋化因子受体是一类介导趋化因子行使功能的G蛋白偶联跨膜受体,通过与其配体结合而发挥作用,广泛参与细胞的生长、发育、分化、凋亡等多种生理功能。趋化因子受体与其配体构成的生物学轴激活的特殊信

作者简介:郑 科,男,重庆市人,博士研究生,主要从事乳腺癌侵袭转移机制方面的研究。E-mail: zhk888666@yahoo.com.cn
通信作者:任国胜,电话:(023)89012511,E-mail: rgs726@163.com
收稿日期:2009-02-15;修回日期:2009-03-27

号传导途径,对癌细胞在转移好发部位种植、存活和增殖起关键的作用[1]。CXCR7 是新近发现的与肿瘤发生有关的新趋化因子受体,它能与其配体 CXCL12 结合发挥生物学作用,从而打破了 CXCL12 只能与 CXCR4 这个唯一的受体结合的传统观点[2]。本研究初步探寻新趋化因子受体 CXCR7 在人乳腺癌细胞中的功能,通过构建 CXCR7 shRNA 序列的表达载体,运用 RNA 干扰技术沉默 CXCR7 的表达,探讨 CXCR7 对人乳腺癌细胞增殖、凋亡、细胞周期的影响。

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(重庆医科大学基础研究所提供),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、胶回收试剂盒、*Bam*HⅠ、*Pst*Ⅰ酶(大连宝生物),Lipofectamine 2000(Invitrogen),羊抗兔二抗(北京中杉金桥),CXCR7 引物(上海生工),TUNEL 试剂盒为(Roche),真核表达载体 pGPU6/GFP/Neo 质粒(上海吉玛),ECL 显色剂(碧云天公司),兔抗人 β-actin 抗体(北京中杉金桥)。

1.2 方法

1.2.1 载体序列设计 构建针对 CXCR7 的 shRNA 真核表达载体,根据 GenBank 数据库提供的 CXCR7 基因(NM_020311),设计 2 组 shRNA(分别命名为 CXCR7-shRNA1、CXCR7-shRNA2)。CXCR7-shRNA1 靶序列:5′-GCATCTCTTCGACTACTCAGA-3′,正义链:5′-CACCGCATCTCTTCGACTACTCAGATTCAAGAGATCTGAGTAGTCGAAGAGATGCTTTTTTG-3′,反义链:5′-GATCCAAAAAAGCATCTCTTCGACTACTCAGATCTCTTGAATCTGAGTAGTCGAAGAGATGC-3′;CXCR7-shRNA2 靶序列:5′-GCTATGACACGCACTGCTACA-3′,正义链:5′-CACCGCTATGACACGCACTGCTACATTCAAGAGATGTAGCAGTGCGTGTCATAGCTTTTTTG-3′,反义链:5′-GATCCAAAAAAGCTATGACACGCACTGCTACATCTCTTGAATGTAGCAGTGCGTGTCATAGC-3′。pGPU6/GFP/Neo-shRNA 载体的构建按照如下体系进行:10 × T4 Ligation Buffer 4 μl, pGPU6/GFP /Neo(*Bbs*Ⅰ + *Bam*HⅠ)1 μl, shRNA 模板 1 μl,T_4 DNA 连接酶 0.5 μl,ddH_2O 11.5 μl,22 ℃ 1 h。每个连接反应挑取 6 个菌落,接种到含 50 μg/ml Kanamycin 的 LB 培养集中。使用碱裂解法抽提质粒,所得质粒用 *Bam*HⅠ, *Pst*Ⅰ分别酶切鉴定。

1.2.2 细胞培养、转染及稳定表达细胞株的筛选 人 MDA-MB-435s 乳腺癌细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基。按照 Lipofectamine® 2000 试剂盒说明书进行转染操作。转染 2 d 后更换为 G418 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,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 4 组:空白对照组、无关 shRNA 组、CXCR7-shRNA1 组和 CXCR7-shRNA2 组。

1.2.3 RT-PCR 检测 CXCR7 mRNA 表达 收获各组细胞,抽提细胞总 RNA;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;同时以人 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 蛋白表达 收集各组细胞,提取细胞总蛋白,BSA 法进行蛋白定量,蛋白样品每孔上样量均为 50 μg 总蛋白。电泳分离的蛋白条带转移至 PVDF 膜上,转膜时间为 55 min。室温封闭 1 h 后,加入 CXCR7 mAb(1∶1 000)、β-actin(1∶1 000),4 ℃过夜;以 TBST 洗膜 10 min × 3;加入山羊抗兔二抗(1∶5 000),室温孵育 1 h 后,以 TBST 洗 10 min × 3。用化学发光法(ECL)曝光显影,冲洗胶片,用紫外分光光度计扫描条带灰度值,计算蛋白表达水平, β-actin 作为内参照。

1.2.5 MTT 检测细胞的增殖情况 将各组细胞制成单细胞悬液,按 10^4/孔分别接种于 96 孔培养板,每孔加入 100 μl,各组细胞均加入 CXCL12(200 ng/ml)诱导;分别于 24、48、72 h 和 96 h 加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl,继续孵育 4 h 后,吸弃孔内培养液,加入 DMSO 150μl,置摇床上低速振荡 10 min,在酶联免疫检测仪测量各孔 490 nm 处的光密度值[D(490)]。每组设 5 个复孔,取各组值的均数表示细胞的增殖情况。

1.2.6 流式细胞术检测细胞周期 回收各组细胞,制成单细胞悬液;75% 冰乙醇固定,4 ℃过夜,重悬细胞,加入 500 μl PBS 含 50 μg/ml 溴化乙锭(PI),100 μg/ml RNase A,4 ℃避光染色 30 min,过滤后在流式细胞仪上进行检测。

1.2.7 TUNEL 法检测细胞凋亡 将各组细胞制成细胞爬片,TUNEL 法检测细胞凋亡,具体操作参照 Roche 公司试剂盒说明书进行。TUNEL 检测细胞核染色呈蓝色的为正常细胞,呈棕黄色或棕褐色为阳性细胞即为凋亡细胞。在每例爬片上,高倍镜(×200)下选 5 个视野对细胞进行计数,每一视野连续记数 100 个癌细胞,再计算出每 100 个细胞中凋亡的细胞数,即凋亡指数(AI)。取均值。

凋亡指数(%)=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%

1.3 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

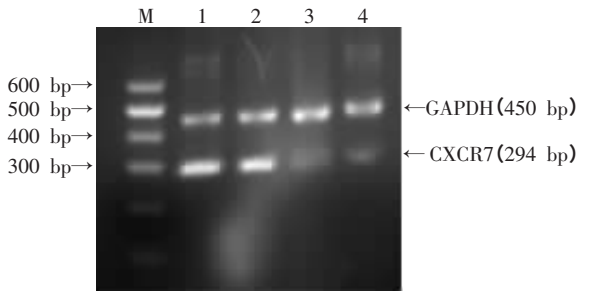
2.1 重组载体的酶切鉴定、测序

使用碱裂解法抽提质粒,所得质粒用 *Bam*HⅠ, *Pst*Ⅰ分别

酶切鉴定。阳性重组载体应该可以被 *Bam*H Ⅰ 切开，而不能被 *Pst* Ⅰ 切开。酶切结果表明，质粒均为阳性重组载体，每一种载体选择 2 个克隆进行测序鉴定。

2.2　RT-PCR 测定 CXCR7 mRNA 水平

RT-PCR 结果显示，各样本均可见亮度均一的 GAPDH 条带，在空白对照组可见明显的 CXCR7 目的条带。与空白对照组相比，CXCR7-shRNA1 组及 CXCR7-shRNA2 组 CXCR7 基因表达抑制率分别为（71 ± 3）% 和（68 ± 5）%，差异具有统计学意义（$P < 0.05$），表明两组 shRNA 真核表达载体均能有效抑制 CXCR7 mRNA 表达。而无关 shRNA 组无明显变化，差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图 1。



M：DNA 标准；1：空白对照组；2：无关 shRNA 组；3：CXCR7-shRNA1 组；4：CXCR7-shRNA2 组

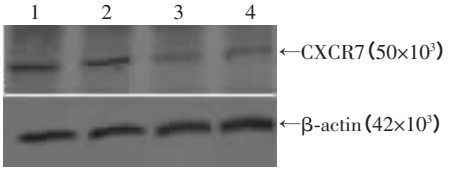
图 1　RNA 干扰后 MDA-MB-435s 细胞 CXCR7 mRNA 的表达

2.3　Western blot 测定 CXCR7 蛋白水平的表达

CXCR7-shRNA1 组、CXCR7-shRNA2 组与空白对照组及无关 shRNA 组相比，细胞内 CXCR7 蛋白表达明显下降，其抑制率分别为（67 ± 5）%、（65 ± 2）%（$P < 0.05$），表明 CXCR7-shRNA 真核表达载体构建成功，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（$P > 0.05$）。见图 2。

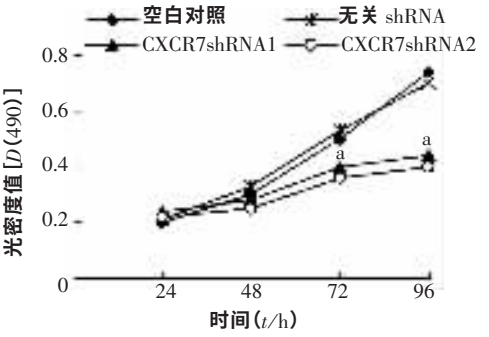
2.4　RNA 干扰后 CXCL12 诱导对 MDA-MB-435s 细胞增殖的影响

MTT 结果显示，在 CXCL12 诱导下，沉默 CXCR7 的表达以后，CXCR7-shRNA1 组及 CXCR7-shRNA2 组 MDA-MB-435s 细胞增殖明显低于空白对照组，细胞生长明显受到抑制，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；无关 shRNA 组与空白对照组差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见图 3。



1：空白对照组；2：无关 shRNA 组；3：CXCR7-shRNA1 组；4：CXCR7-shRNA2 组

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



a：$P < 0.05$，与对照组相比较

图 3　RNA 沉默 CXCR7 基因后各组细胞的生长曲线

2.5　RNA 干扰对 MDA-MB-435s 细胞周期的影响

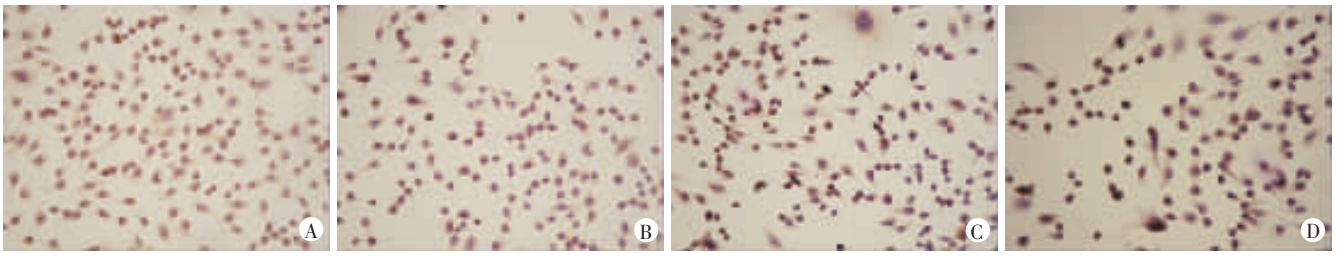
流式细胞术检测结果示：CXCR7-shRNA1 组及 CXCR7-shRNA2 组 G_1、S、G_2 期细胞比例与空白对照组比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$），说明 CXCR7 表达的变化对 MDA-MB-435s 细胞周期无明显影响。无关 shRNA 组与空白对照组之间无显著差异（$P > 0.05$）。见表 1。

表 1　RNA 干扰后各组细胞周期分布（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白对照组	53.30 ± 2.80	42.15 ± 3.40	1.95 ± 2.51
无关 shRNA 组	54.25 ± 1.50	40.20 ± 5.25	2.00 ± 1.55
CXCR7-shRNA1 组	56.65 ± 5.50	38.55 ± 6.56	1.80 ± 1.22
CXCR7-shRNA2 组	55.95 ± 6.66	38.65 ± 4.55	1.81 ± 1.25

2.6　RNA 干扰对 MDA-MB-435s 细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测结果示：空白对照组与无关 shRNA 转染组凋亡细胞均较少［（2.05 ± 1.03）、（2.10 ± 1.23）%］，2 组比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）；而 CXCR7-shRNA1 组、CXCR7-shRNA2 组［（37.11 ± 3.96）、（38.95 ± 3.87）%］细胞凋亡明显增多，与空白对照组相比，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）。见图 4。



A：空白对照组；B：无关 shRNA 组；C：CXCR7-shRNA1 组；D：CXCR7-shRNA2 组

图 4　RNA 干扰对各组人乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞凋亡的影响情况（TUNEL ×200）

3 讨论

趋化因子 CXCL12 及其受体(CXCR7;CXCR4)构成的信号通路与乳腺癌细胞的生长和器官特异性转移密切相关。肿瘤细胞可以表达 CXCL12,刺激肿瘤间质细胞产生 TNF-α,促进肿瘤细胞生长[3]。乳腺癌中基质细胞大部分是由成纤维细胞构成。Orimo 等[4]研究表明,从人乳腺癌中分离的肿瘤相关性成纤维细胞较从同一患者正常乳腺部位分离的成纤维细胞能显著地促进乳腺肿瘤细胞的生长,原因是其分泌 CXCL12 与受体结合而刺激肿瘤细胞生长。历来认为,CXCL12 只能与 CXCR4 这个唯一的受体结合来调控生物学功能。但最近研究发现 CXCR7-新的趋化因子受体,它能够与 CXCLI2 结合发挥生物学作用,从而打破了 CXCL12 只能与 CXCR4 受体结合这一传统观点,为趋化因子及其受体的研究开辟了新的空间[2,5]。CXCR7 能够促进乳腺肿瘤、肺肿瘤的生长以及转移;免疫组织化学证实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[6]。在研究前列腺癌时发现,CXCR7 能够促进肿瘤细胞的生长、抑制细胞凋亡、促进血管生成[7];CXCR7 与 Kaposi's 肉瘤的发生、发展也具有一定的联系[8]。Meijer 等[9]发现 CXCR7 能够影响细胞的增殖、凋亡和趋化性。据以上研究结果我们初步推测,CXCR7 在肿瘤发生中可能具有一定作用。为了探寻 CXCR7 在人乳腺癌细胞中的功能,我们首先构建了针对 CXCR7 短发夹状 RNA 序列的真核表达载体;将 2 个 CXCR7shRNA 载体转染 MDA-MB-435s 细胞,稳定筛选后,经 RT-PCR、Western blot 分析,稳定表达的细胞中 CXCR7 mRNA 及蛋白水平均降低,CXCR7 的表达被有效抑制。趋化因子及其受体可以调节多种肿瘤细胞的增殖,包括卵巢癌、小细胞肺癌、前列腺癌等[10]。Barbero 等[11]发现 CXCL12 与其受体结合可以活化 ERK1/2 和 AKT 信号通路诱导胶质瘤细胞的增殖。Hall 等[12]报道雌激素可诱导乳腺癌细胞 CXCL12 的分泌,从而促进雌激素受体 α 阳性的乳腺癌细胞增殖。本研究表明,有效沉默 CXCR7 的表达后,在 CXCL12 的诱导下,运用 MTT 方法检测人乳腺癌细胞的生长,发现细胞的增殖能力减弱;运用 TUNEL 法检测细胞凋亡,凋亡细胞增多;运用流式细胞术检测细胞周期,抑制 CXCR7 的表达对细胞周期无明显影响。

目前,关于乳腺癌中 CXCR7 的生物学功能报道较少,CXCR7 与其配体 CXCL12 结合后,通过何种信号途径影响癌细胞的生物学特性?其具体机制仍知之甚少。因此,我们希望通过研究 CXCL12 ~ CXCR7 生物学轴,尝试着阐明肿瘤细胞内趋化因子网络,为肿瘤诊断和治疗提供一种新的选择。

参考文献:

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

[2] 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.

[3] Wiley H E, Gonzalez E B, Maki W, *et al*. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(21): 1638 – 1643.

[4] Orimo A, Gupta P B, Sgroi D C, *et al*. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. Cell, 2005, 121(3): 335 – 348.

[5] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, *et al*. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35760 – 35766.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Kryczek I, Wei S, Keller E, *et al*. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(3): C987 – C995.

[11] Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, *et al*. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt[J]. Cancer Res, 2003, 63(8): 1969 – 1974.

[12] Hall J M, Korach K S. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(5): 792 – 803.

(编辑 龙 亮)