文章编号:1000-5404(2012)04-0279-05

论著

沉默 CXCR4 基因表达抑制胰腺癌增殖和侵袭的体外研究

王 铮,李徐奇,徐 军,仵 正,张 东,沙焕臣,马清涌 (710061 西安,西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 利用 RNAi 技术构建 CXCR4 shRNA 表达载体,观察 CXCR4 基因干扰后胰腺癌细胞增殖及侵袭能力的变化。**方法** 在不同分化程度胰腺癌细胞株中筛选出 CXCR4 高表达胰腺癌细胞株,RNAi 技术构建 CXCR4 shRNA 表达载体,转染胰腺癌 CXCR4 高表达细胞 Miapaca-2 并应用 G418 筛选出稳定表达株,Real-time PCR、Western blot 实验观察 RNAi 对 CXCR4 基因的抑制效率;MTT 实验检测 CXCR4 基因干扰后胰腺癌细胞增殖,应用 Transwell 侵袭小室观察CXCR4 干扰对胰腺癌细胞侵袭转移力的影响。**结果** 胰腺癌细胞株 Miapaca-2 CXCR4 表达异常增高,特异性 CXCR4 基因沉默能够在基因和蛋白水平稳定、高效、特异地抑制 CXCR4 的表达,抑制效率达 70% 以上。特异性 CXCR4 shRNA 能够抑制细胞生长,细胞达到对数生长期的时间延长($P<0.05$)。Transwell 实验证明 CXCR4 基因干扰后细胞侵袭能力减低($P<0.05$),即使 SDF-1 的刺激也不能够使细胞侵袭能力增加。**结论** 成功构建了针对胰腺癌细胞 CXCR4 的 siRNA 载体;CXCR4基因沉默能抑制胰腺癌细胞增殖、侵袭和成瘤能力。

[关键词] 受体, CXCR4; 胰腺肿瘤; 细胞增殖;肿瘤侵润;肿瘤转移;细胞系, 肿瘤
[中图法分类号] R394-33;R73-362;R735.9 [文献标志码] A

Silencing CXCR4 by RNA interference suppresses proliferation and invasion in pancreatic cancer cells

Wang Zheng, Li Xuqi, Xu Jun, Wu Zheng, Zhang Dong, Sha Huanchen, Ma Qingyong (Department of Hepatobilary Surgery, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710061, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of CXCR4 knockdown by RNA interference on the proliferation and invasion in pancreatic cancer cells. **Methods** Pancreatic cancer cell lines PC-2, PC-3, Miapaca-2, BXPC-3, and PANC-1 were used to screen the cells with high expression of CXCR4 by real-time PCR. RNAi technique was applied to construct the CXCR4 shRNA expression vector. Then the vector was transfected into the cells with highly expressed CXCR4 with the aid of Lipofectamine 2000, and the cells with stable expression were screened with G418. Real-time PCR and Western blotting were used to observe the inhibitory effect of RNAi on CXCR4 expression. MTT assay was applied to assess the influence of specific CXCR4 shRNA on cell growth. Transwell chamber test was used to observe the cancer cell invasive ability. **Results** Miapaca-2 cells showed significantly high expression of CXCR4. Transfection of specific CXCR4 shRNA into Miapaca-2 cells resulted in a stable, specific and highly-efficient declined expression of CXCR4 (70%) at mRNA and protein levels, and an inhibition in cell proliferation and growth arrest in exponential phase cells ($P<0.05$). Transwell chamber test indicated that the transfection of specific CXCR4 shRNA also led to the decrease of invasive ability of Miapaca-2 cells ($P<0.05$), even under the stimulation of SDF-1. **Conclusion** CXCR4 shRNA vector is successfully constructed. CXCR4 knockdown inhibits the proliferation, cell tumorigenesis and invasive ability in pancreatic cancer cells.

[**Key words**] receptors, CXCR4; pancreatic neoplasms; cell proliferation; neoplasm invasiveness; neoplasm metastasis; cell line, tumor

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81172195, 30700817) and the International Cooperation Project of Fundamental Science Funding of Xi'an Jiaotong University (2011-05). Corresponding author: Ma Qingyong, Tel:86-29-85323899, E-mail:qyma56@mail.xjtu.edu.cn

胰腺癌恶性度高,早期容易发生侵袭转移,死亡率居世界癌症死亡第 4 位。胰腺癌根治性手术切除率低,5 年生存率不足5%[1]。随着分子生物学手段的不断进展,生物治疗越来越得到了人们的重视,针对血管

[基金项目] 国家自然科学基金(81172195,30700817);西安交通大学基本科研业务费国内外合作项目(2011-05)
[通信作者] 马清涌,电话:(029)85323899, E-mail:qyma56@mail.xjtu.edu.cn

生成、表皮生长因子等多个途径的药物已经进入了不同的临床阶段[2]。在针对肿瘤的侵袭转移研究中,趋化因子的作用是目前的研究热点,由于趋化因子能够诱导具有相关受体的肿瘤细胞游走到特异的器官,调控趋化因子被认为是调节肿瘤转移的一个重要途径[3]。胰腺癌常发生肝转移、肺转移,而在肝脏、肺脏等组织中基质源性细胞因子1(stromal derived factor-1, SDF-1,又名CXCL12)呈现高表达。CXCR4是SDF-1已知的唯一的趋化因子受体[4]。课题组前期研究[5]发现CXCR4在胰腺癌组织中异常表达,并且与胰腺癌预后明确相关。因此,以CXCR4作为胰腺癌基因治疗靶点具有一定的临床应用前景。RNAi提供了一种特异性基因功能失活的方法,可以作为一种简单有效的替代基因敲除的工具,它在功能基因组学研究、基因治疗等领域越来越得到更多的重视[6]。本课题拟通过RNAi技术沉默CXCR4基因的表达,观察其对胰腺癌侵袭转移的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

不同分化程度的胰腺癌细胞(PC-2, PC-3, Miapaca-2, BX-PC-3, PANC-1)由西安交通大学医学院第一附属医院中心实验室保存。限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ及胶回收试剂盒(TaKaRa公司),转染试剂Lipofectamine 2000(Invitrogen公司),质粒抽提试剂盒(天跟生化科技有限公司),寡核苷酸及测序(上海生工合成),Real-time PCR反应体系(MBI公司),G418及DMEM(Gibco公司),兔抗人CXCR4(Neomarker公司)及HRP-羊抗兔抗体(中杉公司)。碘化丙啶(PI)及Hoechest染料(碧云天公司)。载体pRNAT-U6.1/Neo由西安交通大学医学院第一附属医院中心实验室李旭教授馈赠。

1.2 Real-time PCR检测CXCR4 mRNA表达

按Trizol试剂盒说明使用氯仿和异丙醇抽提总RNA。使用逆转录试剂盒,采用Oligo DT和逆转录酶合成cDNA链。PCR引物采用Primer Premier 5.0引物设计软件设计,由上海生工公司合成。Real-time PCR在ABI7300机器上进行反应实验操作,采用两步法,进行引物扩增。CXCR4上游:5′-CTGTGAG-CAGAGGGTCCAG-3′,下游:5′-ATGAATGTCCACCTCGCTT-3′;GAPDH上游:5′-AGCCACATCGCTCAGACAC-3′,下游:5′-GC-CCAATACGACCAAATCC-3′。反应条件设置:预变性94 ℃,5 min;94 ℃,15 s;60 ℃,60 s;40个循环;溶解曲线条件:95 ℃,15 s;60 ℃,30 s;95 ℃,15 s。Real-time PCR反应完成后,进行一个循环的溶解曲线反应反映扩增的特异程度。待测基因的表达水平通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法进行计算[7]。

1.3 Western blot检测CXCR4蛋白表达

胰腺癌细胞生长达70%后,经PBS漂洗,然后将预冷至4 ℃的RIPA裂解缓冲液(用时加入Cocktail proteinase inhibitor 10 μl以及适量PMSF)加入其中,细胞刮子收集细胞,冰浴30 min,12 000 r/min离心15 min后,上清液保存于-80 ℃。采用Bradford法测定蛋白质浓度,每孔上样40 μg,10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,通过电转移法将蛋白质从SDS-PAGE凝胶转移至硝酸纤维素膜。后者在含5%脱脂奶粉的TBST中37 ℃封闭2 h,加入以封闭液稀释的一抗(CXCR4,1∶200;GAPDH,1∶400),封闭杂交袋,4 ℃过夜。TBST充分漂洗(15 min×3次),分别加入以牛奶封闭的HRP标记二抗(anti-rabbit:1∶1 500,anti-mouse 1∶2 000),室温下孵育2 h;TBST充分漂洗(20 min,3次),化学荧光法(ECL)显色,观察结果。凝胶成像系统扫描记录,蛋白表达以光密度表示,以目的蛋白/GAPDH表示蛋白的相对表达,全自动凝胶成像系统对结果进行分析并拍照。

1.4 设计和构建CXCR4 shRNA表达载体

从GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)获得人CXCR4 mRNA的基因序列,共有2个序列,其中NM_003467是目前人CXCR4 mRNA研究最多的序列。依据文献[8]关于siRNA的设计原则,利用互联网上软件程序设计针对CXCR4 mRNA(NM_003467)基因CDS区的siRNA的序列,利用BLAST比较设计的序列和人类基因组数据库,排除和其他基因明显同源的靶序列,设计3条序列,其中包括2条CXCR4 mRNA的Oligo序列(1#,2#)和1条作为负对照的无关序列(N#)。1#正义链:5′-gatccgTGAGAAGCATGACGGACAAttcaagagaTTGTCCGTCATGCT-TCTCAtttttggaaa-3′,反义链:5′-agcttttccaaaaaaTGAGAAGCAT-GACGGACAAtctcttgaaTTGTCCGTCATGCTTCTCAcg-3′;2#正义链:5′-gatccAGCGAGGTGGACATTCATCttcaagagaGATGAATGTCCAC-CTCGCTttttttggaaa-3′,反义链:5′-agcttttccaaaaaaAGCGAGTGGA-CATTCATCtctcttgaaGATGAATGTCCACCTCGCTcg-3′;负对照N#正义链:5′-gatccTTCTCCGAACGTGTCACGTttcaagagaACGTGAC-ACGTTCGGAGAAttttttggaaa-3′,反义链:5′-agcttttccaaaaaaTTCT-CCGAACGTGTCACGTtctcttgaaACGTGACACGTTCGGAGAAcg-3′。序列中大写为通过软件设计的互补2条19nt序列,小写为酶切位点及茎环结构,其中ggatcc为*Bam*HⅠ酶切位点,aagctt为*Hind*Ⅲ酶切位点,shRNA的茎环结构为ttcaagaga。N#质粒经BLAST进行比对,与人类基因组序列无同源序列。将上述寡核苷酸序列退火形成双链DNA,插入酶切后的空质粒,将退火后得到的转录模版双链DNA与线形化pRNAT-U6.1/Neo载体以T_4 DNA ligase连接,从而构建siRNA表达载体。对酶切正确的质粒进行测序,如插入片段完全一致表明重组成功,分别命名为pRNAT-M1(转染1#质粒)、pRNAT-M2(转染2#质粒)、pRNAT-MN(转染N#质粒)。

1.5 质粒转染及CXCR4 shRNA稳定表达细胞的建立

参照Lipofectamine 2000转染试剂盒说明书进行转染。转染前24 h,取对数生长期的胰腺癌细胞进行消化,细胞计数板计数,用含10% FBS,无抗生素的DMEM培养基调整细胞数为4×10^5/ml,以0.5 ml/孔于24孔培养板培养过夜,Miapaca-2细胞培养达到70%左右融合后进行转染;瞬时转染48 h后消化细胞,按1∶10接种于6孔板,用含10% FBS、无抗生素的DMEM培养基培养,并加G418 400 μg/ml进行稳定转染筛选,每3~5日换液;2~3周后,6孔培养板出现多个G418抗性的克隆,由于质粒带有GFP的表达,在镜下可看到带绿色荧光的阳性克隆。显微镜下,用小枪头吸取少量胰酶,进行消化挑取带绿色荧光的单个克隆;挑取的克隆移入24孔培养板,G418培养基200 μg/ml进行继续维持培养,经过8周可以获得稳定转染的克隆。必要时通过有限稀释法再次筛选单克隆阳性细

胞,在 96 孔板进行扩大培养。

1.6 MTT 法检测特异性 CXCR4 shRNA 对 Miapaca-2 细胞生长的抑制作用

细胞 1×10^4/孔接种于 5 块 96 孔细胞培养板中,每组设 4 个复孔,同时设空白对照组只加培养液,每孔体积 200 μl;将培养板移入 37 ℃,饱和湿度条件下的孵箱中培养;分别在 24、48、72、96 h 和 120 h 后,每孔加入 MTT 溶液 5 mg/ml 20 μl,继续孵育 4 h,终止培养。弃上清后加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,用酶联免疫检测分析仪测定 D(490)值;以只加培养液,不加细胞的空白对照孔调零,于自动酶标读数仪上测定各孔光密度值,计算各组细胞的平均值;记录结果,以培养时间为横坐标,光密度值为纵坐标,绘制细胞增殖曲线。

1.7 Transwell 小室检测 CXCR4 干扰后胰腺癌细胞 Miapaca-2 细胞侵袭能力

Boyden 小室分为上、下两室,中间为孔径为 8 μm 的聚碳酯膜,膜的上室可以铺基质凝胶(Matrigel)。将各实验组的细胞消化,以无血清的 DMEM 培养液调整细胞数至 2.5×10^5/ml 备用;以 200 μl 无血清的 DMEM 培养液水化 Transwell 小室,尽量吸尽小室内残留的培养液;吸取 400 μl 细胞悬液加入到 Transwell 小室的上室;Transwell 小室的下室加入 10% FBS 的 DMEM 培养基或含 100 ng/ml SDF-1α 和 10% FBS 的 DMEM 培养基作趋化液;将细胞置于 37 ℃,CO_2 孵箱培养 20 h;取出小室,以棉签小心擦除滤膜上室面的细胞,以 4% 多聚甲醛固定黏附在下室面的细胞;Giemsa(1∶9稀释,现用现配)染色;显微镜下观察处于微孔滤膜外侧面上的细胞,镜下计数滤膜下表面的迁移细胞数,随机计数 5 个视野的细胞数目,以穿出细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。每个标本重复 3 次,实验重复 2 次。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析并应用 LSD 法行两两比较。

2 结果

2.1 CXCR4 在胰腺癌细胞株中的表达

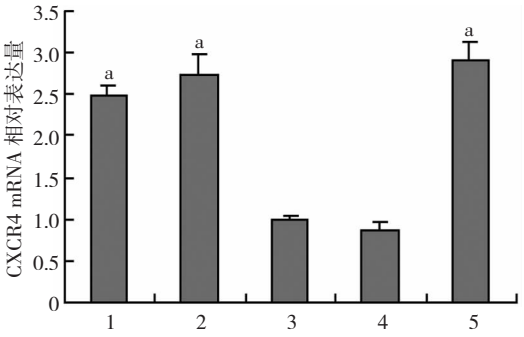
应用 5 种具有不同侵袭转移能力的胰腺癌细胞进行 CXCR4 mRNA 以及蛋白表达的检测。Western blot 以及 Real-time PCR 结果显示,CXCR4 mRNA 在胰腺癌细胞中有不同程度的表达,其中 Miapaca-2 和 PANC-1 细胞 CXCR4 mRNA 水平表达较高(图 1)。在蛋白水平的检测方面,Miapaca-2 细胞 CXCR4 蛋白明显高表达(图 2)。因此,在后续试验中,应用 CXCR4 高表达的 Miapaca-2 细胞作为靶细胞进行研究。

2.2 特异性 CXCR4 shRNA 表达载体的鉴定

经过 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ的酶切后的质粒只剩下线形结构,酶切后质粒大小以及插入片段大小得到了确认。对酶切正确的质粒进行测序,插入片段完全一致,表明重组成功,分别命名为 pRNAT-M1(转染 1# 质粒)、pRNAT-M2(转染 2# 质粒)、pRNAT-MN(转染 N# 质粒)。

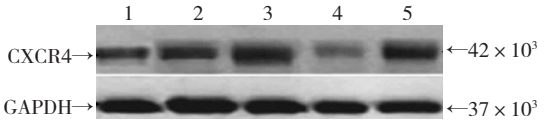
2.3 特异性 CXCR4 shRNA 表达载体转染 Miapaca-2 细胞

构建的质粒带有 GFP 基因,因此可以在荧光显微镜下观察绿色的表达。G418 筛选浓度为 400 μg/ml。从转染后 24 h 开始应用荧光显微镜观察,24 h Miapaca-2 的转染效率为 20% ~ 30%;转染细胞经过 G418 筛选,单克隆扩大培养后,表达 GFP 的细胞逐渐增加,不表达的细胞逐渐减少。经过 2 次有限稀释法对细胞进行单克隆的筛选并扩大培养后,镜下可见稳定转染的细胞 90% 以上表达绿色荧光蛋白(图 3)。



1:PC-2; 2:PANC-1; 3: PC-3; 4:BXPC-3; 5: Miapaca-2; a: $P<0.05$,与 PC-3 细胞比较

图 1 Real-time PCR 分析 CXCR4 mRNA 在 5 种胰腺癌细胞中的表达



1:PC-2; 2:PC-3;3:Miapaca-2;4:BXPC-3;5:PANC-1

图 2 Western blot 分析 CXCR4 蛋白在 5 种胰腺癌细胞中的表达

2.4 特异性 CXCR4 shRNA 对 Miapaca-2 细胞 CXCR4 mRNA 表达的抑制作用

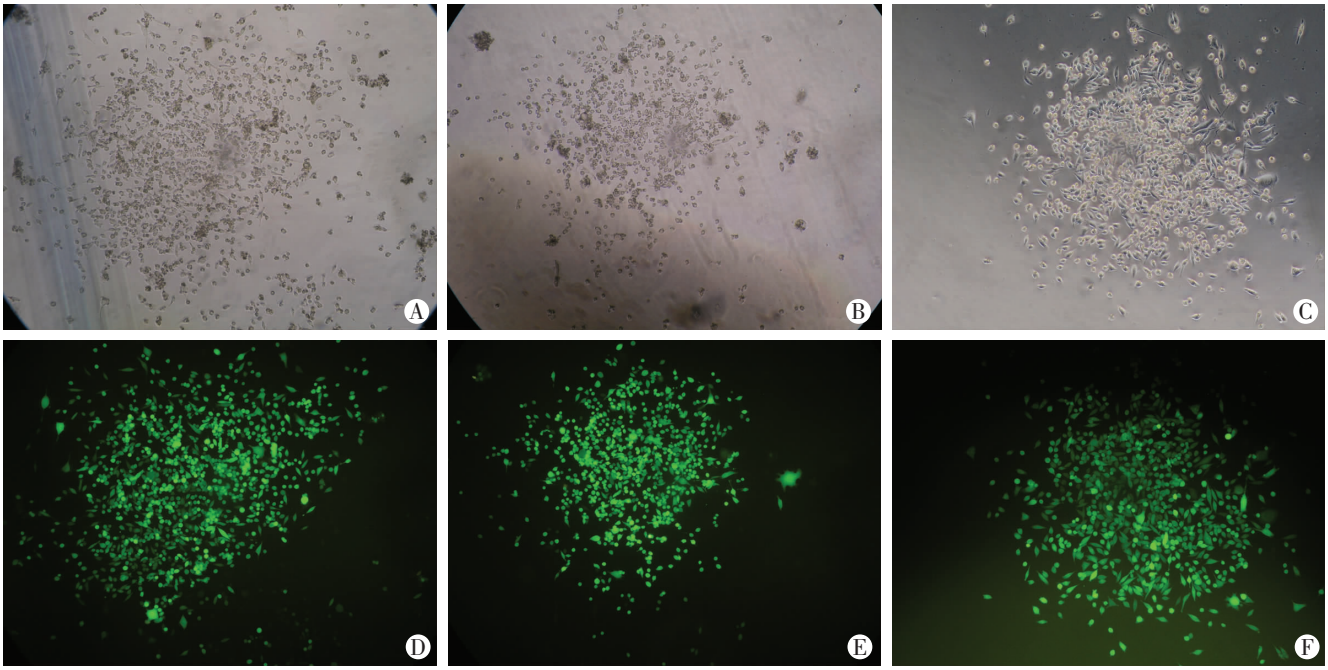
转染空质粒组的 pRNAT-MN CXCR4 mRNA 水平下降不明显,相对表达量为(0.93 ± 0.07)($P>0.05$),而 pRNAT-M1、pRNAT-M2 的 CXCR4 mRNA 水平都明显下降,pRNAT-M1、pRNAT-M2 的 CXCR4 mRNA 相对表达量为(0.21 ± 0.03)、(0.38 ± 0.04)。与 pRNAT-MN 相比,pRNAT-M1 的 CXCR4 mRNA 抑制效果较 pRNAT-M2 强(抑制率:79% *vs* 62%,$P<0.05$),因此用 pRNAT-M1 进行后续的实验。

2.5 特异性 CXCR4 shRNA 对 Miapaca-2 细胞 CXCR4 蛋白表达的抑制作用

pRNAT-M1、pRNAT-M2 的 CXCR4 蛋白相对表达量为(0.29 ± 0.02)、(0.57 ± 0.03);而 pRNAT-MN 的 CXCR4 蛋白相对表达量为(0.81 ± 0.06),与正常 Miapaca-2 细胞 CXCR4 蛋白(0.81 ± 0.04)比较差异无显著性($P>0.05$)。与转染空质粒细胞比较,CXCR4 沉默稳定转染的细胞 CXCR4 表达受到了显著的抑制($P<0.05$),并且 1# 质粒能够得到最佳的沉默效率,与 Real-time PCR 结果一致。见图 4。

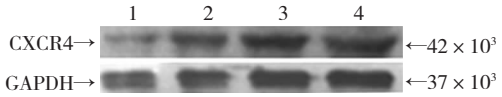
2.6 特异性 CXCR4 shRNA 对 Miapaca-2 细胞细胞增殖的影响

pRNAT-M1 组细胞的增殖速度比正常细胞和负对照组细胞显著减慢。从第 4 天开始 pRNAT-M1 与 pRNAT-MN 之间差异具有显著性($P<0.05$),并随之时间的延长差异增加,而 pRNAT-MN 与正常细胞之间没有明显的差异(图 5)。提示 CXCR4基因被干扰后,Miapaca-2 细胞增殖能力降低。



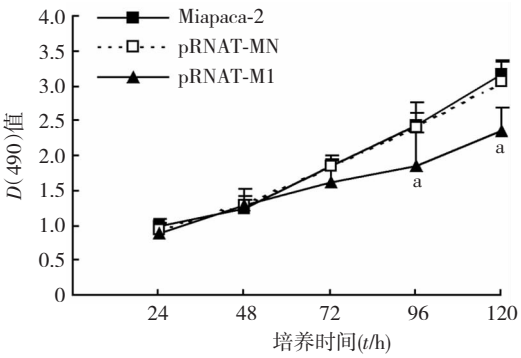
A～C:普通光镜;D～F:荧光显微镜;A、D:1#质粒;B、E: 2#质粒;C、F: 3#质粒

图3 荧光显微镜下观察1#、2#、N#质粒G418筛选后细胞(×40)



1: pRNAT-M1; 2: pRNAT-M2; 3: pRNAT-MN; 4: Miapca-2

图4 Western blot检测特异性CXCR4 shRNA对Miapaca-2细胞CXCR4蛋白表达的抑制作用

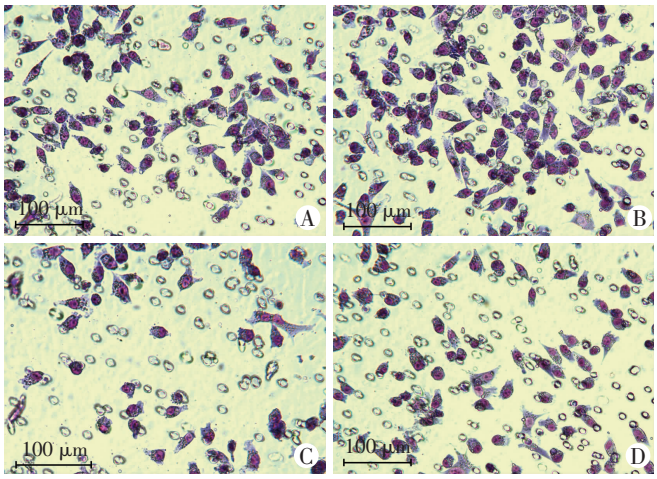


a: $P<0.05$,与pRNAT-MN比较

图5 MTT法检测各组细胞体外增殖能力

2.7 特异性CXCR4 shRNA对Miapaca-2细胞侵袭力的影响

在正常10% FBS的DMEM培养基趋化下,pRNAT-M1、pRNAT-MN细胞穿过小室的细胞数分别为(38.02±8.32)、(47.35±4.64),差异有统计学意义($P<0.05$)。利用CXCR4目前发现的唯一的配体SDF-1进行趋化,可以看到pRNAT-M1、pRNAT-MN的细胞穿膜数分别为(41.27±7.21)、(86.28±6.17),pRNAT-MN细胞穿透能力明显增强($P<0.05$),而pRNAT-M1细胞并没有明显改变(图6)。



A:pRNAT-MN在10% FBS的培养基;B:pRNAT-MN在含100 ng/ml SDF-1的10% FBS培养基;C:pRNAT-M1在10% FBS的培养基;D:pRNAT-M1在含100 ng/ml SDF-1的10% FBS培养基

图6 Transwell分析CXCR干扰后各组细胞侵袭能力(Giemsa)

3 讨论

近年研究发现,多数肿瘤细胞都表达趋化因子及趋化因子受体,在肿瘤的发生、发展过程中趋化因子受体及其配体表现出重要的作用[8]。因此,以趋化因子及其受体分子为控制靶点,通过激活或拮抗趋化因子受体的信号传导来控制趋化因子系统的功能,可望用于治疗相关疾病,具有潜在的临床应用前景[9]。研究发现CXCR4是组织表达最为广泛的细胞因子受体之一,在多种恶性肿瘤细胞的生长、转移都有很重要的作用。SDF-1与CXCR4结合后可使细胞肌动蛋白丝聚

合,可形成假伪足,定向迁移、侵袭,形成“趋向性学说”。许多恶性肿瘤如前列腺癌、肾癌、喉癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、结肠癌、乳腺癌等中异常表达CXCR4[10-14]。研究发现 CXCR4 在胰腺癌细胞膜和细胞质中有阳性表达,表达阳性率为 71.2%。当体外给予 SDF-1 刺激后,胰腺癌细胞株 MMPs 活性大大增强,胰腺癌的侵袭转移能力增强[15]。在动物的胰腺癌模型中发现,CXCR4 的表达是小鼠胰腺癌肝转移和肺转移的一个标志物,当给予 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 后,体内、体外实验证实胰腺癌转移能力得到了抑制,肝转移和肺转移数量明显减少[16-17]。可见,以 CXCR4 作为胰腺癌治疗的靶点具有临床应用前景。

在体外实验中应用 5 种不同分化程度的胰腺癌细胞进行 CXCR4 表达的检测,发现未分化的 Miapaca-2 CXCR4 mRNA 表达及蛋白表达明显升高,由于 5 种胰腺癌细胞分化程度不一,Miapaca-2 细胞为未分化胰腺癌细胞,考虑恶性度较高胰腺癌细胞表达 CXCR4 更高。本实验成功构建重组质粒 pRNAT-U6.1/ Neo-CXCR4 shRNA,经阳离子脂质体 lipofectamine 2000 转染 Miapaca-2 细胞,瞬时转染率较低(20% ~30%)。为了克服瞬时转染存在的转染效率低、表达不长久且不稳定等特点,在瞬时转染后 48 h 开始进行 G418 筛选,在这种筛选压力下,由于抗性基因的作用,表达重组质粒的细胞将会被保留,未转染该质粒的细胞将会被杀死,最终筛选出稳定表达重组质粒的 Miapaca-2 细胞。经过反复的有限稀释单克隆化,在荧光显微镜和 G418 筛选的压力下,获得了能够稳定转染的细胞。

利用 Real-time PCR 方法和 Western blot 检测特异性 CXCR4 shRNA 对 CXCR4 mRNA 和蛋白的抑制效果,发现 CXCR4 shRNA 均表现出显著的抑制能力,以 1# 质粒最为突出,抑制效率约 70%,与负对照组和正常细胞 CXCR4 的表达具有明显的差异性;根据抑制强度采用 1# 质粒作为主要的研究对象,进一步研究特异性 CXCR4 shRNA 对 Miapaca-2 细胞的影响。结果显示,CXCR4 shRNA 组与负对照组和正常细胞相比,增殖能力显著下降,曲线平缓,进入对数生长期较慢,而无义序列组与正常细胞组相比无明显的差异性,增殖是肿瘤生长的一个特性,CXCR4 的基因沉默能够在体外有效地阻滞肿瘤的生长。Transwell 小室实验发现,在正常的培养基趋化下,CXCR4 干扰的细胞和对照细胞有着明显的差异,CXCR4 干扰的细胞穿透Matrigel的能力显著下调。当给以 SDF-1 这种 CXCR4 唯一的配体趋化后,对照组细胞穿透力得到了明显的提高,而 CXCR4 基因干扰组没有明显的变化,提示 CXCR4 基因沉默能够在一定程度上抑制胰腺癌的侵袭。

综上所述,在 CXCR4 沉默的胰腺癌细胞株中,胰腺癌的侵袭转移能力得到了有效的抑制。CXCR4 有望成为胰腺癌治疗中的新靶位,靶向胰腺癌 CXCR4 基因治疗显示出潜在的疗效和良好的应用前景。

参考文献:

[1] 赵玉沛. 胰腺癌诊断与治疗的现状与未来[J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(5): 321-323.
[2] Vincent A, Herman J, Schulick R, *et al*. Pancreatic cancer[J]. Lancet, 2011, 378(9791): 607-620.
[3] Mantovani A, Savino B, Locati M, *et al*. The chemokine system in cancer biology and therapy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2010, 21(1): 27-39.
[4] Billadeau D D, Chatterjee S, Bramati P, *et al*. Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells [J]. Int J Gastrointest Cancer, 2006, 37(4): 110-119.
[5] 王铮, 马清涌, 李军辉, 等 CXCR4 和 β-catenin 在胰腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 17(10): 1071-1076.
[6] Paddison P J, Caudy A A, Bernstein E, *et al*. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(8): 948-958.
[7] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
[8] Duda D G, Kozin S V, Kirkpatrick N D, *et al*. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? [J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8): 2074-2080.
[9] Patrussi L, Baldari C T. The CXCL12/CXCR4 axis as a therapeutic target in cancer and HIV-1 infection [J]. Curr Med Chem, 2011, 18(4): 497-512.
[10] 黄绍崧, 杨辉, 卞修武, 等. 趋化因子受体 CXCR4 的表达与垂体腺瘤侵袭性关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2063-2066.
[11] Muller A, Homey B, Soto H, *et al*. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. Nature, 2001, 410 (6824): 50-56.
[12] Torregrossa L, Giannini R, Borrelli N, *et al*. CXCR4 expression correlates with the degree of tumor infiltration and BRAF status in papillary thyroid carcinomas [J]. Mod Pathol, 2011. [Epub ahead of print]
[13] 张园园, 胡国华, 袁琨, 等. SDF-1/CXCR4 对喉癌细胞归巢的作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1316-1320.
[14] Sacanna E, Ibrahim T, Gaudio M, *et al*. The role of CXCR4 in the prediction of bone metastases from breast cancer: a pilot study[J]. Oncology, 2011, 80(3/4): 225-231.
[15] Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, *et al*. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(9): 3530-3535.
[16] Saur D, Seidler B, Schneider G, *et al*. CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer [J]. Gastroenterology, 2005, 129 (4): 1237-1250.
[17] 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.

(**收稿**:2011-10-10;**修回**:2011-11-06)
(编辑 龙 亮)