文章编号:1000-5404(2013)22-2443-05

论著

# CXCR4通过EMT促进食管癌侵袭转移过程

王 峰,曹 蕾,庞丽娜,周 然,王留兴 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 探讨趋化因子受体CXCR4(CXC chemokine receptor 4,CXCR4)在食管癌上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)发生中的作用及其参与食管癌侵袭转移的可能机制。**方法** 化学合成靶向CXCR4的siRNA,脂质体作用下转染食管癌EC9706细胞,同时以转染阴性对照siRNA、单纯转染脂质体和空白细胞作为对照。RT-PCR和Western blot检测CXCR4 siRNA对CXCR4 mRNA和蛋白表达的抑制作用;侵袭小室、划痕实验和MTT检测CXCR4 siRNA对EC9706细胞侵袭转移和增殖能力的影响;RT-PCR和Western blot检测CXCR4 siRNA对E-cadherin和vimentin mRNA和蛋白表达的影响。**结果** 靶向CXCR4 siRNA可以有效抑制食管癌EC9706细胞中CXCR4 mRNA和蛋白的表达,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),且有时间依赖性($P<0.05$);转染CXCR4 siRNA的EC9706细胞侵袭转移和增殖能力较对照组显著下降($P<0.05$);转染CXCR4 siRNA的EC9706细胞随着CXCR4表达下降,E-cadherin表达随之升高,而vimentin表达则相应下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** CXCR4可通过促进食管癌EMT的发生,参与其侵袭转移过程。

[关键词] 食管癌;趋化因子受体CXCR4;上皮间质转化;侵袭转移
[中图法分类号] R341;R730.23;R735.1 [文献标志码] A

# CXCR4 participates in invasion and metastasis of esophageal carcinoma through epithelial-mesenchymal transition

Wang Feng, Cao Lei, Pang Lina, Zhou Ran, Wang Liuxing (Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of CXCR4 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) in esophageal carcinoma and the mechanism of CXCR4 participating in the invasion and metastasis of esophageal carcinoma. **Methods** siRNA targeting CXCR4 was chemically synthesized and was transfected into esophageal carcinoma EC9706 cells. EC9706 cells transfected with negative siRNA or Lipofectamine 2000 and vacant cells were used as controls. CXCR4 mRNA and protein levels were evaluated by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting after 24, 48 and 72 h. Invasion and metastasis ability and proliferation ability were detected by Boyden chamber assay, wound-healing assay and MTT assay. The mRNA and protein levels of E-cadherin and vimentin in EC9706 cells transfected with CXCR4 siRNA were tested by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting. **Results** siRNA targeting CXCR4 could suppress the expression of CXCR4 in EC9706 cells efficiently, as compared to that in control groups ($P<0.01$), in a time-dependent manner ($P<0.05$). The invasion and metastasis ability and proliferation ability of EC9706 cells transfected with CXCR4 siRNA were decreased greatly as compared to those in control groups ($P<0.05$). With the decrease of CXCR4 expression, the expression of E-cadherin was increased while the expression of vimentin was decreased ($P<0.05$). **Conclusion** CXCR4 participates in the invasion and metastasis of esophageal carcinoma through EMT.

[**Key words**] esophageal carcinoma; CXCR4; epithelial-mesenchymal transition; invasion and metastasis

Supported by Project of Basic and Frontier Technology Research of Henan Province(132300410127) and the Key Project of Science and Technology Research From Education Department of Henan Province(13A320638). Corresponding author: Wang Liuxing, E-mail:wlx2246@163.com

肿瘤的侵袭转移是肿瘤患者死亡的主要原因,因此,有关肿瘤侵袭转移机制的探讨是目前研究的热点问题之一[1]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是肿瘤细胞侵袭转移的主要因素之

[基金项目] 河南省基础与前沿技术研究计划(132300410127);河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A320638)
[通信作者] 王留兴,E-mail:wlx2246@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1456.004.html(2013-09-14)

一[2],EMT发生以上皮表型(E-cadherin)缺失和间质表型(vimentin等)获得为主要特征[3]。食管癌是河南省最常见的消化道恶性肿瘤。近年研究表明,趋化因子CXCR4/CXCL12生物轴在肿瘤的演变过程中发挥着重要作用[4-5]。但CXCR4是否通过EMT参与食管癌侵袭转移的机制探讨甚少。因此本研究通过抑制食管癌细胞株EC9706中CXCR4的表达,观察CXCR4对EC9706细胞侵袭转移及增殖能力的影响,并观察其对E-cadherin、vimentin表达的影响,初步探讨其在食管癌EMT发生及侵袭转移中的作用和分子机制,旨在为食管癌的诊断、治疗提供新的思路和有效途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

食管癌细胞系EC9706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。EC9706细胞在5% $CO_2$条件下,用含10%胎牛血清的1640培养基培养,实验所用细胞均处于对数生长期。

### 1.2 主要试剂

1640培养液及Trizol试剂均购自Gibco公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,cDNA第1链合成试剂盒及PCR试剂盒均购自上海生工公司,脂质体Lipofectamine$^{2000}$购自Invitrogen公司,兔抗人多克隆抗体均购自CST公司,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司,Boyden小室购自BD公司,CXCR4siRNA及阴性对照siRNA由广州锐博生物公司合成(CXCR4 siRNA序列,正义链:5′-UUUCAAAGUCACAUCUUGGCU-3′,反义链:5′-CCAAGAUGUGACUUUGAAACC-3′;阴性对照siRNA序列,正义链:5′-AUUGACAUCGCACUUCAUGAU-3′,反义链:5′-CAUGAAGUGCGAUGUCAAUGU-3′),其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.3 细胞分组及转染

将EC9706细胞按$5\times10^5$/孔接种于6孔板中培养,培养密度至50%~60%,参照Lipofectamine$^{2000}$说明书,将CXCR4 siRNA及阴性对照siRNA转染入食管癌EC9706细胞,转染终浓度均为100 nmol/L。无血清培养基培养6 h后转为全陪液继续培养至24、48、72 h收集细胞进行后续实验。实验细胞分为4组:CXCR4 siRNA转染组(加入CXCR4 siRNA和脂质体)、阴性对照组(加入阴性对照siRNA和脂质体)、脂质体组(仅加入脂质体)和空白对照组(不加任何试剂)。

### 1.4 EC9706细胞形态学观察

在细胞培养状态下,于倒置显微镜下观察EC9706细胞转染CXCR4 siRNA 24、48、72 h后细胞形态学改变,同时以阴性对照组、脂质体组及空白对照组EC9706细胞形态作为对照。

### 1.5 RT-PCR检测各处理组细胞CXCR4和E-cadherin、vimentin mRNA的表达

CXCR4 siRNA转染EC9706细胞后24、48、72 h,提取各组细胞总RNA,电泳鉴定其完整性。cDNA第1链合成试剂盒逆转录总RNA,PCR扩增CXCR4和E-cadherin、vimentin。CXCR4上游引物:5′-TGGGGAGGAGAGTTGTAGGA-3′,下游引物:5′-GAGTCATAGTCCCCTGAGCC-3′,产物片段长度232 bp;E-cadherin上游引物:5′-AACAGGATGGCTGAAGGTGA-3′,下游引物:5′-CCTTCCATGACAGACCCCTT-3′,产物片段长度192 bp;vimentin上游引物:5′-CGTCTTGACCTTGAACGCAA-3′,下游引物:5′-CTCCGGTACTCAGTGGACTC-3′,产物片段长度314 bp;内参上游引物:5′-CCCAAGTCCAACCGTGAAAA-3′,下游引物:5′-TCTCAAGAGCCGAGGATTGG-3′,产物长度379 bp。在凝胶成像仪上成像及测定分析。实验重复4次。

### 1.6 Western blot检测各处理组细胞CXCR4和E-cadherin、vimentin蛋白的表达

CXCR4 siRNA转染EC9706细胞后24、48、72 h,提取各组细胞总蛋白。BCA检测试剂盒测定各组细胞的蛋白浓度。分别取总蛋白50 μg上样,经10%分离胶及5%浓缩胶SDS-PAGE凝胶电泳后湿转法转PVDF膜。加入特异性一抗(兔抗人CXCR4多克隆抗体,稀释度为1∶1 000;兔抗人E-cadherin多克隆抗体,稀释度为1∶800;兔抗人vimentin多克隆抗体,稀释度为1∶800;内参抗体;稀释度1∶1 000)4 ℃过夜。与二抗(羊抗兔单克隆抗体,稀释度1∶1 000)室温孵育2 h后,ECL化学发光剂于暗室中曝光和显影。测定蛋白条带的光密度值,以表示蛋白的相对表达水平。实验重复4次。

### 1.7 MTT检测细胞增殖变化

收集各组细胞接种于96孔培养板中,约5 000个细胞/孔,每组设5个平行孔。于37 ℃分别培养24、48、72 h,加入5 mg/L的MTT溶液20 μL,继续培养4 h;吸去上清后每孔加入200 μL DMSO,在96孔酶标仪上读取波长570 nm处光密度值[$D$(570)]。每组实验4次。

生长抑制率=[1-实验组平均$D$(570)值/对照组平均$D$(570)值]×100%。

### 1.8 Boyden小室检测体外侵袭能力

侵袭小室上、下室之间用孔径8 μm的聚碳酸酯膜分开,上室内滴入400 μL单细胞悬液($5\times10^5$个细胞/mL),下室加15%胎牛血清趋化,于37 ℃分别培养24、48、72 h。取出小室,擦去上室未穿膜细胞,穿膜细胞苏木精染色5 min,二甲醛透明后,置于载玻片上,封片观察,400倍倒置显微镜下随机计数5个视野穿膜细胞数。以穿膜细胞数表示细胞的侵袭力。实验重复4次。

### 1.9 划痕实验检测体外运动能力

将50 μL人纤维连接蛋白加入96孔板,静止5 h,吸出上清。在制备好的96孔培养板中接种各组细胞($5\times10^3$/mL)培养。当细胞形成单层细胞时,在培养板底部用10 μL Tip头做“一”字形划痕,倒置显微镜下观察测量。并于EC9706细胞转染后24、48、72 h这3个时间点200倍倒置显微镜下观察测量细胞向致伤区的迁移距离,计算出EC-1细胞在划痕后的相对迁移距离。相对迁移的距离为:1-(即时划痕的宽度/原始划痕的宽度)。实验重复4次。

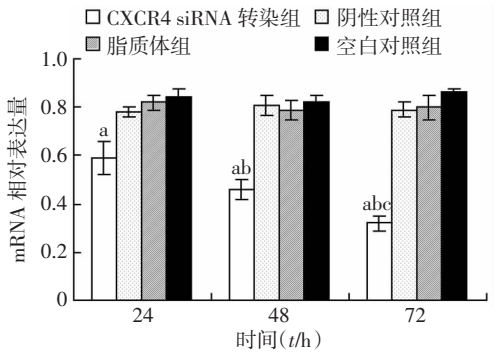
### 1.10 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行处理,两组及以上比较采用单因素方差分析,组间比较采用SNK方法。检验水准取$\alpha=0.05$。

## 2 结果

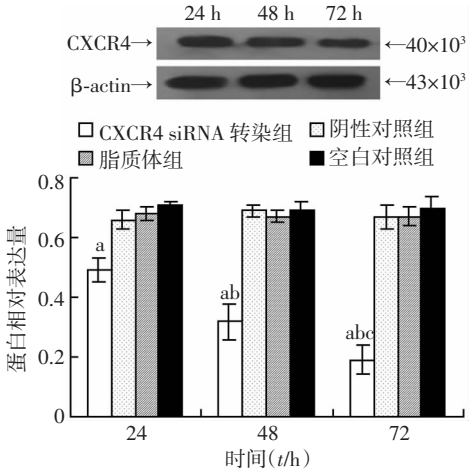
### 2.1 转染 CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞 CXCR4 mRNA 和蛋白表达的影响

CXCR4 siRNA 转染组 EC9706 细胞 CXCR4 mRNA 的表达水平明显低于阴性对照组、脂质体组和空白对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）；且随着转染时间延长，CXCR4 mRNA 的表达水平逐渐下降，具有明显的时间依赖性，差异有统计学意义（$P<0.05$）。与 RT-PCR 结果一致，Western blot 结果显示，CXCR4 siRNA 转染组 EC9706 细胞 CXCR4 蛋白的表达水平同样明显低于阴性对照组、脂质体组和空白对照组，差异具有统计学意义（$P<0.01$）；且具有明显的时间依赖性，随着转染时间延长，CXCR4 蛋白的表达不断下降，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见图 1、2。说明实验所用 CXCR4 siRNA 能在体外有效抑制 CXCR4 基因的表达。




a：$P<0.01$，与同时间其他 3 组比较；b：$P<0.05$，与 CXCR4 siRNA 转染 24 h 比较；c：$P<0.05$，与 CXCR4 siRNA 转染 24、48 h 比较

**图 1 CXCR4 siRNA 转染后不同时间点 EC9706 细胞中 CXCR4 mRNA 的表达**

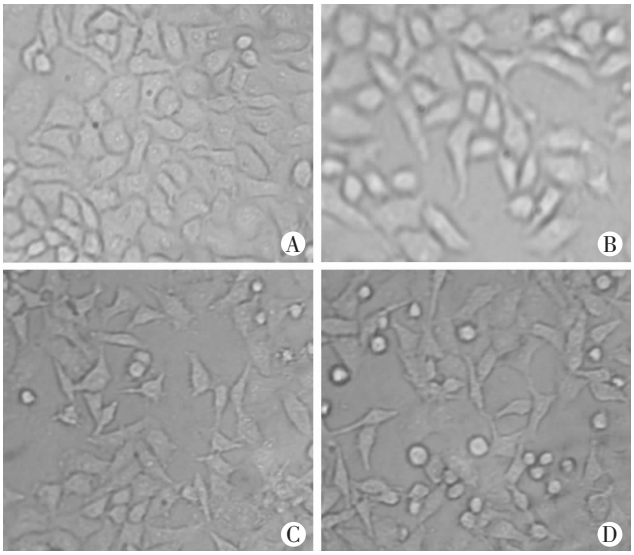



A：Western blot 检测；B：半定量分析 a：$P<0.01$，与同时间其他 3 组比较；b：$P<0.05$，与 CXCR4 siRNA 转染 24 h 比较；c：$P<0.05$，CXCR4 siRNA 转染 24、48 h 比较

**图 2 CXCR4 siRNA 转染后不同时间 EC9706 细胞中 CXCR4 蛋白的表达**

### 2.2 转染 CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞生长和形态的影响

倒置显微镜下观察发现，与空白对照组相比，转染 CXCR4 siRNA 的 EC9706 细胞排列整齐，细胞去梭形化明显，转染 CXCR4 siRNA 48 h 较转染 24 h 细胞去梭形化更明显，但与 72 h 相比细胞梭形化无显著差异。而空白对照组细胞呈多边梭形，排列松散。见图 3。

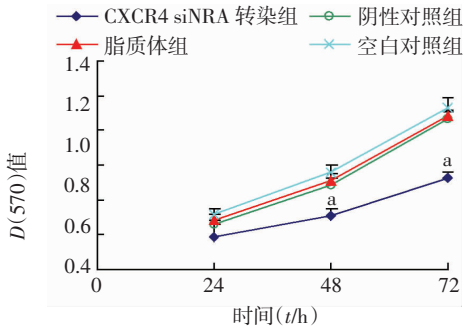



A：CXCR4 siRNA 转染组；B：阴性对照组；C：脂质体组；D：空白对照组

**图 3 倒置显微镜观察各组 EC9706 细胞处理 48 h 的形态变化（×200）**

### 2.3 转染 CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞增殖能力的影响

MTT 结果显示：EC9706 细胞转染 CXCR4 siRNA 48 h 后细胞的增殖抑制率与转染 CXCR4 siRNA 24 h 组、阴性对照组、脂质体组和空白对照组相比明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）；且随着转染时间延长，CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞增殖的抑制不断增强，转染 CXCR4 siRNA 72 h 细胞生长抑制率高于转染 CXCR4 siRNA 48 h，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 4）。说明抑制 CXCR4 基因的表达能有效抑制 EC9706 细胞体外增殖能力。

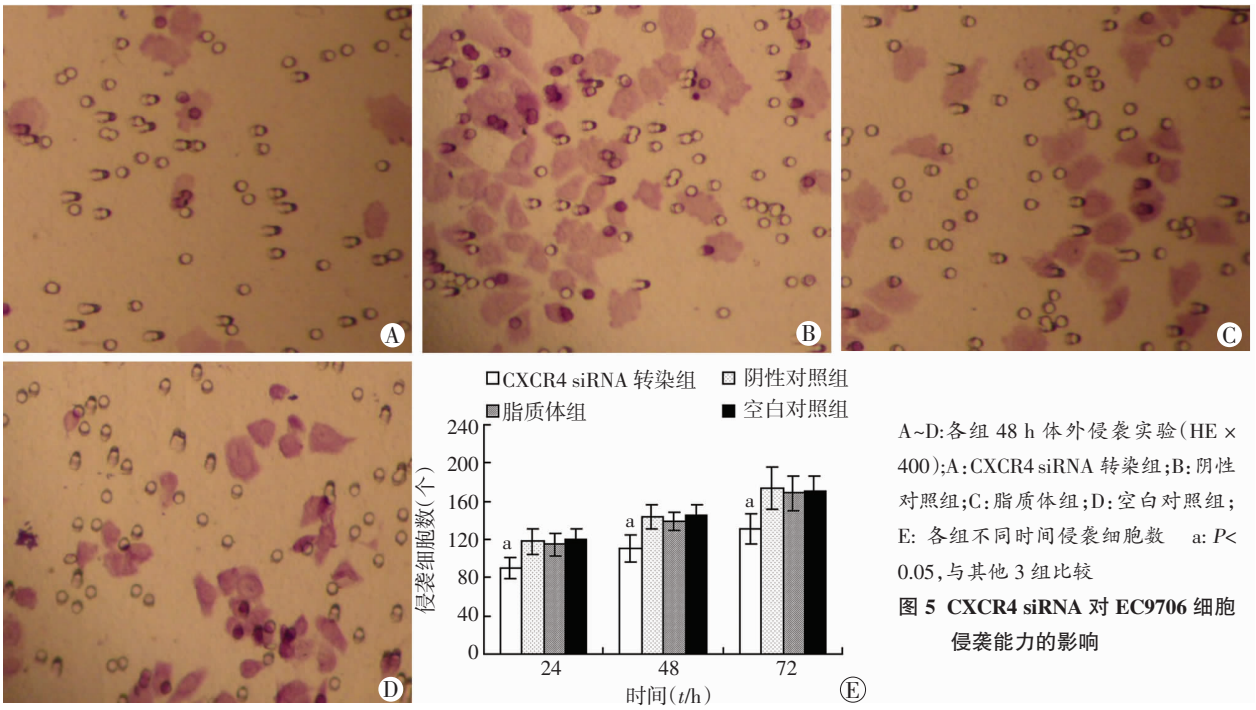



a：$P<0.05$，与其他 3 组比较

**图 4 CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞增殖能力的影响**

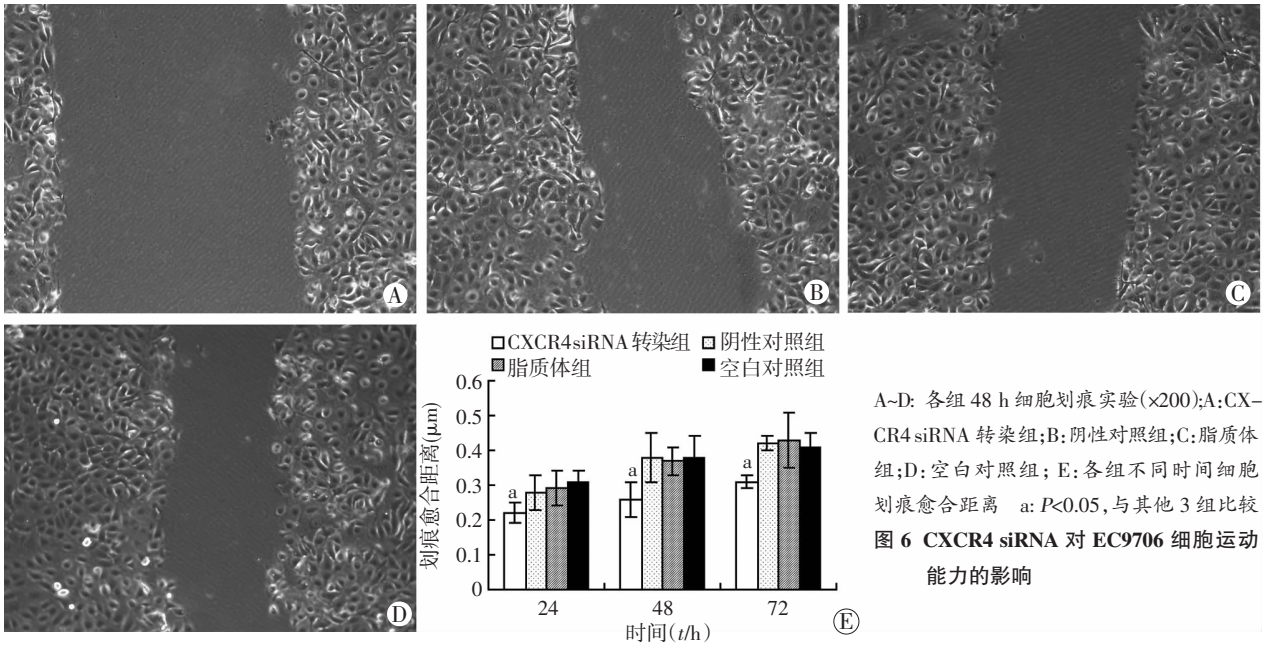
### 2.4 转染 CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞侵袭、转移能力的影响

EC9706 细胞转染 CXCR4 siRNA 24 h 后，与阴性对照组、脂质体组和空白对照组相比，穿膜细胞数明显下降（$P<0.05$，图 5）。划痕实验结果显示，EC9706 细胞转染 CXCR4 siRNA 48、72 h，与阴性对照组、脂质体组和空白对照组相比，干扰组的迁移能力明显降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$，图 6）。说明抑制 CXCR4 基因表达能有效抑制 EC9706 细胞体外侵袭转移能力。




A~D:各组48 h体外侵袭实验(HE×400);A:CXCR4 siRNA转染组;B:阴性对照组;C:脂质体组;D:空白对照组;E:各组不同时间侵袭细胞数 a:$P<0.05$,与其他3组比较

**图5 CXCR4 siRNA对EC9706细胞侵袭能力的影响**

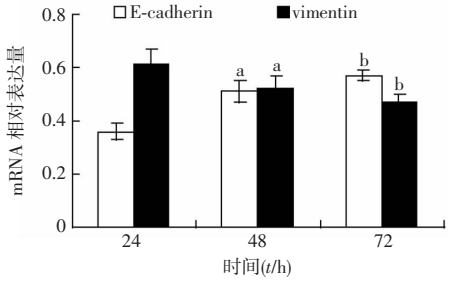



A~D:各组48 h细胞划痕实验(×200);A:CXCR4 siRNA转染组;B:阴性对照组;C:脂质体组;D:空白对照组;E:各组不同时间细胞划痕愈合距离 a:$P<0.05$,与其他3组比较

**图6 CXCR4 siRNA对EC9706细胞运动能力的影响**

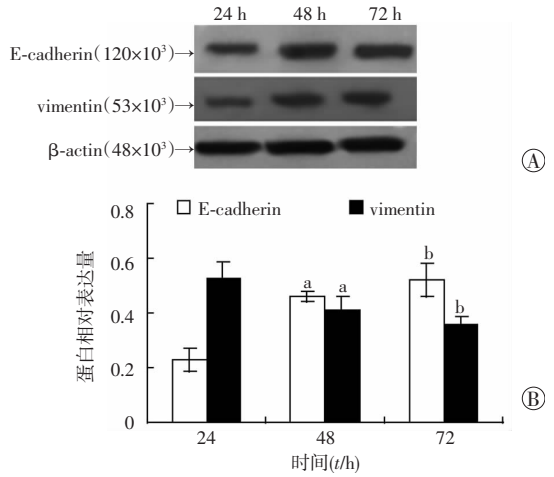
### 2.5 转染CXCR4 siRNA对EC9706细胞E-cadherin、vimentin mRNA和蛋白表达的影响

RT-PCR和Western blot结果表明,随着CXCR4表达下降,EC9706细胞E-cadherin mRNA和蛋白的表达明显增加,转染后72 h细胞中E-cadherin mRNA和蛋白的含量最高,具有时间依赖性(图7)。而随着CXCR4表达下降,EC9706细胞中vimentin mRNA和蛋白的表达随之下降,且同样具有时间依赖性,转染后72 h细胞中vimentin mRNA和蛋白的下降最明显($P<0.05$,图8)。说明CXCR4能够通过调控EC9706细胞上皮表型(E-cadherin)和间质表型(vimentin)的表达参与EMT。




a:$P<0.05$,与CXCR4 siRNA转染24 h比较;b:$P<0.05$,与CXCR4 siRNA转染48 h比较

**图7 CXCR4 siRNA对EC9706细胞E-cadherin和vimentin mRNA表达的影响**




A: Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 CXCR4 siRNA 转染24 h比较;b:$P<0.05$,与 CXCR4 siRNA 转染 48 h 比较

**图 8　CXCR4 siRNA 对 EC9706 细胞 E-cadherin 和 vimentin 蛋白表达的影响**

## 3　讨论

食管癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,尤其是河南省林州市食管癌发病率和病死率均居全国首位。癌细胞早期的侵袭转移是大部分食管鳞癌患者死亡的主要原因之一,因此探讨食管鳞癌的侵袭转移机制对于食管鳞癌的治疗及预后至关重要[5]。

趋化因子是一大类具有趋化作用的细胞因子。自 Muller 等[6]首次报道趋化因子受体和肿瘤转移有关系以来,越来越多的趋化因子受体被发现与肿瘤发生、发展及侵袭转移的过程密切相关,而 CXCR4 是其中最受关注的一个。CXCR4 是趋化因子 CXCL12 的受体,研究表明 CXCR4/CXCL12 构成的生物轴在多种肿瘤的发生及侵袭转移中发挥着重要作用[7]。为了探讨 CXCR4 在食管癌侵袭转移潜能的关系,我们选择食管癌 EC9706 细胞作为实验细胞,利用脂质体化学合成的 CXCR4 siRNA 转染入 EC9706 细胞。转染后 RT-PCR 和 Western blot 结果均显示,转染 CXCR4 siRNA 的 EC9706 细胞 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达均较阴性对照组、脂质体组和空白对照组显著下降,且 CXCR4 siRNA 对 CXCR4 mRNA 和蛋白表达的抑制作用具有明显的时间依赖性,随着时间延长,抑制作用更加明显。Boyden 体外侵袭实验结果表明随着 EC9706 细胞 CXCR4 表达下降,穿膜细胞数显著减少,表明 CXCR4 表达下降使得 EC9706 细胞的侵袭力降低。推测 CXCR4 可能同样在食管癌的侵袭转移中发挥重要作用。MTT 实验结果则显示随着 CXCR4 表达下降,细胞生长明显受抑,提示 CXCR4 同样在 EC9706 细胞增殖过程中起作用。

EMT 是一种基本的生理现象,然而 EMT 在多种上皮细胞来源的恶性肿瘤的侵袭转移中的作用近年来也越来越受到国内外专家的重视[2]。EMT 过程中细胞在由上皮形态向间质形态转变的同时,伴随一些标志物的改变,如上皮细胞表型标志物,如 E-cadherin 等表达缺失;间质细胞表型标志物,如 vimentin 等表达上调[8]。其中 E-cadherin 的表达降低是评价 EMT 的主要标志。张姗姗[9]发现 CXCR4 表达阳性的结直肠癌细胞通过发生 EMT,获得了更强的迁移和运动能力。另有研究指出,细胞高表达 CXCR4 后,对 SDF-1 的处理敏感,可诱导发生 EMT,从而获得更强大的迁移和侵袭能力[10]。但在食管癌中 CXCR4 是否通过参与 EMT 从而增强细胞的侵袭转移能力还未见报道。因此本研究通过 RT-PCR 和 Western blot 检测转染 CXCR4 siRNA 的 EC9706 细胞中 E-cadherin 和 vimentin 的表达,结果显示,随着 CXCR4 表达下降,E-cadherin 表达显著升高,而 vimentin 的表达随之下降,都具有时间依赖性。表明 CXCR4 有可能通过诱导细胞 EMT 作为促进 EC9706 细胞侵袭转移的机制。

综上所述,对 CXCR4 在食管癌侵袭转移中的作用和可能机制的探讨,有可能对食管癌侵袭转移的发生及机制有更深入的了解,并为食管癌转移的治疗提供新的靶点和方向。

## 参考文献:

[1] Oda I, Yamada M, Yoshinaga S, *et al*. Lymph-node metastasis in surgical resection of intramucosal esophageal adenocarcinoma[J]. Dig Endosc, 2013, 25(Suppl 2): 177-180.

[2] 廉猛, 房居高. 上皮细胞间叶化的触发机制及肿瘤的侵袭转移[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2010, 34(4): 212-216.

[3] 周颐, 姜藻. E-钙黏蛋白在结肠癌侵袭转移机制中的研究进展[J]. 实用肿瘤杂志, 2008, 23(6): 582-585.

[4] Gros S J, Graeff H, Drenckhan A, *et al*. CXCR4/SDF-1α-mediated chemotaxis in an *in vivo* model of metastatic esophageal carcinoma[J]. *In Vivo*, 2012, 26(4): 711-718.

[5] 汤少鹏, 臧文巧, 王涛, 等. 沉默 S100A4 基因对食管癌 EC-9706 细胞中 MMP-9 基因表达及浸润转移的影响[J]. 广东医学, 2013, 36(4): 831-834.

[6] Muller A, Sonkoly E, Eulert C, *et al*. Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy[J]. Int J Cancer, 2006, 118(9): 2147-2157.

[7] 王涛, 轩小燕, 臧文巧, 等. 沉默 CXCR4 基因对食管鳞癌 EC9706 细胞中 VEGF 基因表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(21): 54-58.

[8] 刘剑, 王峰, 何炜, 等. 钠氢交换蛋白 1 基因在体外对食管癌 KYSE-70 细胞增殖和侵袭作用的影响[J]. 肿瘤, 2013, 33(2): 126-131.

[9] 张姗姗. CD133$^+$CXCR4$^+$肿瘤细胞在结肠癌肝转移中的作用及机制研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2011.

[10] Albert S, Hourseau M, Halimi C, *et al*. Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue[J]. Oral Oncol, 2012, 48(12): 1263-1271.

(**收稿**:2013-05-28;**修回**:2013-07-11)

(编辑　汪勤俭)