基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1344-04

趋化因子受体 CXCR7/RDC1 在乳腺癌细胞株中的表达及意义

王元元,任国胜

(重庆医科大学附属第一医院普通外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨趋化因子受体(Chemokine receptor CXCR7)在不同乳腺癌细胞株中的相对表达强度及意义。方法:采用 RT-PCR、Western Blot 等方法,检测 6 株乳腺癌细胞株中趋化因子受体 CXCR7 在 mRNA 水平及蛋白水平上的表达情况。结果:CXCR7 在 6 株乳腺癌细胞中的表达水平存在显著差异,其 mRNA 在 6 种人乳腺癌细胞株中均可检出,雌激素受体(Estrogen recepter,ER)(+)细胞株在蛋白水平上的表达明显高于 ER(-)细胞株($P<0.01$)。结论:CXCR7/RDC1 与乳腺癌的发生、发展及预后有一定的相关性。

【关键词】趋化因子受体;CXCR7/RDC1;乳腺癌

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-26

Expression and significance of chemokine's receptor CXCR7/RDC1 in human breast carcinoma cells

WANG Yuan-yuan, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and significance of CXCR7/RDC1 in human breast carcinoma cells. *Methods*: The mRNA and protein expressions of CXCR7 in human breast cancer cells (MCF-7, ZR-75-30, MDA-MB-435S, MDA-MB-453, MDA-MB-231, and HBL-100) were detected with the application of RT-PCR and Western-Blot, respectively. *Results*: The expression levels of CXCR7 varied significantly among six cell lines. CXCR7 mRNA can be detected in all of the six breast cancer cell lines, and CXCR7 protein expression was statistically prominent in ER positive cell lines and couldn't be detected in MDA-MB-231 breast cancer cell. *Conclusion*: CXCR7/RDC1 may play a key role in occurrence, development and prognosis of breast cancer.

作者介绍:王元元(1983-),女,硕士,
研究方向:乳腺癌的浸润、转移机制。

通讯作者:任国胜,男,教授,E-mail:rgs726@163.com。

【Key words】Chemokine's receptor; CXCR7/RDC1; Breast cancer

[5] Hafizi S, Dahlback B. Signalling and functional diversity within the AXL subfamily of receptor tyrosine kinases[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2006,17(4):295-304.

[6] Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, et al .A promiscuous liaison between IL-15 receptor and AXL receptor tyrosine kinase in cell death control [J].EMBO,2005,24(24):4260-4270.

[7] Munoz X, Sumoy L, Ramirez-Lorca R,et al. Human vitamin K-dependent GAS6:gene structure,allelic variation,and association with stroke [J]. Hum Mutat,2004,23(5):506-512.

[8] Sasaki T,Knyazev P G,Clout N J,et al.Structural basis for Gas6-AXL signaling [J]. EMBO J,2006,25(1):80-87.

[9] Lay J D, Hong C C, Huang J S, et al. Sulfasalazine suppresses drug resistance and invasiveness of lung adenocarcinoma cells expressing AXL [J].Cancer Res, 2007,67(8):3878-3887.

[10] Shieh Y S, Lai C Y, Kao Y R, et al. Expression of AXL in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression [J].Neoplasia, 2005, 7(12):1058-1064.

[11] Wu Y M, Robinson D R, Kung H J. Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2004,64(20):7311-7320.

[12] Sun W, Fujimoto J, Tamaya T.Coexpression of Gas6/AXL in human ovarian cancers [J]. Oncology,2004,66(6):450-457.

[13] Chung B I, Malkowicz S B, Nguyen T B, et al. Expression of the proto-oncogene AXL in renal cell carcinoma [J]. DNA Cell Biol, 2003,22 (8):533-540.

[14] hankar S L,O'Guin K,Kim M, et al.Gas6/AXL signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Aktl survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-inducedap optosis[J]. Neurosci,2006,26(21):5638-5648.

[15] Vajkoczy P,Knyazev P,Kunkel A.Dominant-negative inhibition of the AXL receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival[J]. Proc Natl Acard Sci USA, 2006,103 (15):5799-5804.

(责任编辑:冉明会)

迄今，研究表明趋化因子及其受体网络在肿瘤细胞的发生与转移中起着至关重要的作用。国内外文献证实，肿瘤组织中复杂的趋化因子体系直接影响着淋巴细胞的浸润、肿瘤细胞的生长、凋亡、转移及新生血管的形成等[1,2]。在上述趋化因子受体中，新近发现的 CXCR7（RDC1 及 CCX-CKR2）可与 SDF-1(CXCL12)、I-TAC（CXCL11)等结合发挥生物学作用，从而打破了传统意义上的“CXCL12—CXCR4”生物学轴在肿瘤播散和器官特异性转移中的中枢地位，亦使得被 SDF-1 和 I-TAC 调控的体内平衡及炎症事件变得日趋复杂。鉴于此，本研究拟通过观察不同乳腺癌细胞株中趋化因子受体 CXCR7 的表达情况，初步探讨其意义，并为进一步的研究提供理论支持及实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 及 HBL-100 购自中国科学院上海生物研究所细胞库，人乳腺癌细胞株 ZR-75-30 及 MDA-MB-435 S、MDA-MB-453 由本实验室保存。

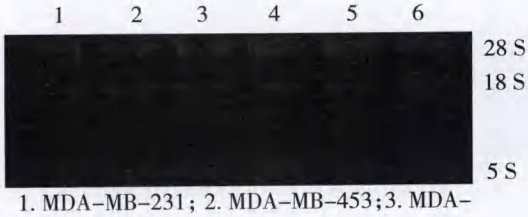
1.1.2 主要试剂 细胞培养基 RPMI1 640（美国 Gibco 公司)，胎牛血清（杭州四季青公司)，小量组织 / 细胞总 RNA 抽提试剂盒（上海华舜生物有限公司)，TaKaRa RNA PCR Kit Ver.3.0 试剂盒（大连宝生物公司)，兔抗人 CXCR7 抗体（abcam 公司)，HPR 标记的羊抗兔二抗（武汉博士德），鼠抗人 β-actin（中杉金桥)，辣根酶标记山羊抗鼠二抗（中杉金桥)，BeyoECL Plus 发光试剂盒、细胞裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Brodford 蛋白浓度测定试剂盒（碧云天)，硝酸纤维素膜（Minipore)，PCR 引物（上海生工)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞置于含 10%胎牛血清和青霉素、链霉素各 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液中，在 37℃、5% CO_2、饱和湿度的恒温箱中培养。传代时用 0.25%的胰蛋白酶消化，按 1∶3 的比例传代。对数生长期细胞用于实验。

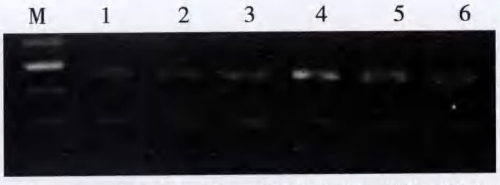
1.2.2 CXCR7 mRNA 表达水平的检测 参考 mRNA 抽提试剂盒说明，提取各组细胞株中的总 RNA，紫外分光光度仪对所得 RNA 进行定量分析，并通过琼脂糖凝胶电泳确定其完整性。根据测得的浓度值，将提取得到的各细胞株总 RNA 的浓度均调整为 500 ng/μl 后进行逆转录反应，上样体积为 10 μl。PCR 反应体系如下：5 × PCR Buffer 10 μl，基因上下游引物各 0.5 μl，TaKaRa Ex Taq HS 0.25 μl，RT 反应产物 10 μl，灭菌蒸馏水 28.75 μl。CXCR7 的 PCR 反应条件如下：94℃ 预变性 5 min，94℃变性 1 min，54℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 30 s，循环 35 次，72℃延伸 10 min。GAPDH 的 PCR 反应条件如下：94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 1 min，58℃ 退火 1 min，72℃延伸 30 s，循环 35 次，72℃延伸 10 min 。GAPDH 引物序列为：上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'，下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'，扩增片断大小为 450 bp；CXCR7 引物序列为：上游 5'-TGGGTGGTCAGTCTCGT-3'，下游 5'-CCGGCAGTAGGTCTCAT-3'，扩增片断大小为 252 bp。PCR 产物用 1.5 %琼脂糖凝胶电泳鉴定，在紫外光凝胶成像分析系统下拍照并进行条带灰度分析以测定光密度值，以 CXCR7/GAPDH 值代表 CXCR7 的相对含量。

1.2.3 CXCR7 蛋白水平的表达 以细胞裂解液提取细胞总蛋白，Bradford 法测定蛋白浓度。以 50 μg 蛋白上样，用 10%的 SDS-PAGE 胶垂直电泳分离。电泳结束后，将蛋白转至 PVDF 膜，用含 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后，加 1∶1 000 稀释的一抗 4℃过夜，TBST 漂洗 3 次，每次 5 min，加入 1∶800 羊抗兔 IgG/HRP 室温孵育 1 h，再用 TBST 洗 3 次，ECL 化学发光剂于暗室中曝光和显影。所用内参均为 β-actin（鼠抗人，稀释度为 1∶1 000)。条带灰度分析使用 Quantity One Mannual 软件系统。



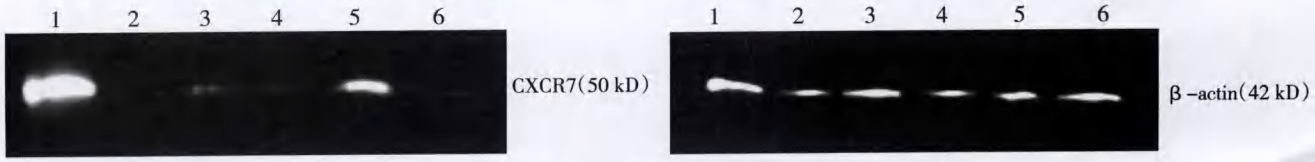
1. MDA-MB-231; 2. MDA-MB-453;3. MDA-MB-435S;4. MCF-7; 5. HBL-100;6. ZR-75-30

图 1 不同细胞抽提的 RNA 变性凝胶电泳



M. maker;1. MDA-MB-231;2. MDA-MB-453;3. MDA-MB-435S;4. MCF-7;5. HBL-100; 6. ZR-75-30

图 2 不同乳腺癌细胞系中 CXCR7mRNA 的表达(RT-PCR)



1. MCF-7;2. MDA-MB-231;3. MDA-MB-435S; 4. MDA-MB-453;5. ZR-75-30;6.HBL-100

图 3 不同乳腺癌细胞系中 CXCR7 蛋白的表达(Western blot)

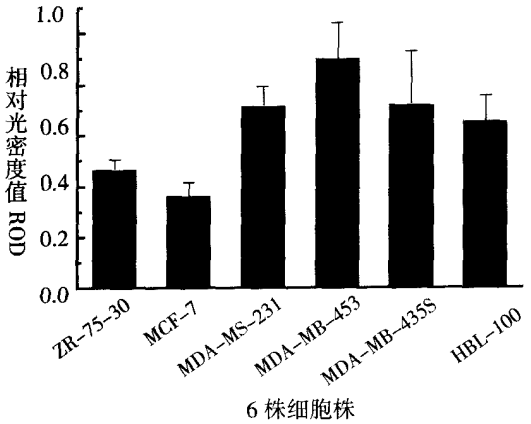


图 4 RT-PCR 检测乳腺癌细胞株中 CXCR7 mRNA 的表达

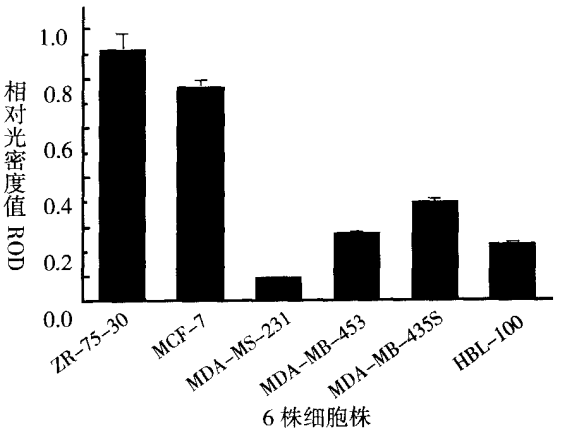


图 5 Western blot 检测乳腺癌细胞株中 CXCR7 蛋白的表达

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件，独立样本的 t 检验进行统计学分析，实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示，以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 RNA 质量的检测

各 RNA 样品的光密度 D_{260}/D_{280} 比值均在 1.8～2.0 之间，提示样品 RNA 纯度较高，满足 PCR 的实验要求。经琼脂糖凝胶电泳鉴定，28 S 及 18 S 条带呈高亮显示，其中 28 S 条带的亮度约为 18 S 条带的 2 倍以上，表明其 mRNA 质量较好(图 1)。

2.2 乳腺癌细胞中 CXCR7 mRNA 的表达

对各细胞株中 CXCR7 在 mRNA 水平的表达进行 RT-PCR 扩增，并对各细胞中 CXCR7 mRNA 的相对光密度值进行分析处理，结果如下：MCF-7：0.359 ±0.055，ZR -75 -30：0.466 ±0.041，MDA -MB -435S：0.72±0.209，MDA-MB-453：0.898±0.141，MDA-MB-231：0.715±0.08，HBL-100：0.653±0.102。由上述数据可知，ER(+)细胞株中 MCF-7 及 ZR-75-30 的表达量较低，ER(-)细胞株中 MDA-MB-435S、MDA-MB-453、MDA-MB-231 及 HBL-100 的 mRNA 水平明显高于 ER(+)细胞株($P<0.01$)(图 2 及图 4)。

2.3 乳腺癌细胞中 CXCR7 蛋白的表达

Western blot 的分析结果显示，ER (+) 细胞株 MCF-7 及 ZR-75-30 的蛋白表达明显高于 ER (-) 细胞株 MDA-MB-435S、MDA-MB-453、HBL-100($P<0.01$)，而 MDA-MB-231 无明显表达。其相对光密度值分别为：0.769 6±0.026，0.92±0.063，0.297 8±0.011，0.175 3±0.003，0.130 9±0.006(图 3 及图 5)。

3 讨 论

研究表明，SDF-1(CXCLI2)能调控许多重要的生物过程，如心脏与神经的发育、干细胞运动、血管形成、凋亡及肿瘤发生。传统观点认为，SDF-1 是通过 CXCR4 这个唯一的受体来调控上述不同的过程。但 Burns JM 等[3]在研究 CXCR4 基因敲除小鼠的第 13 d 胚胎时却意外地发现其胎肝细胞仍然能结合 SDF-1，经系统研究鉴定后得出 SDF-1 的新结合位点为其基因早已克隆出的一直被当作孤儿受体的 RDC1 分子，并将其重新命名为 CXCR7。

CXCR7 最初被命名为 CCX-CKR2。CXCR7 是 1 个被 RDC1 编码的 7 次跨膜受体[4,5]RDC1 基因，属孤儿受体家族成员。CXCR7 除能与 SDF-1 高亲和力结合外，还能结合另一个趋化因子 I-TAC(CXCLI1)，而以前的研究表明 I-TAC(CXCL11)、Mig(CXCL9)和 IPIO(CXCL10) 3 个趋化因子只能结合 CXCR3。CXCR7 表达于许多肿瘤细胞系、活化的内皮细胞以及胎肝细胞，别的细胞却很少表达。进一步研究发现，CXCR7 主要表达于转化细胞表面，而大多数正常细胞表面不表达。Northern 分析还发现，尽管这些细胞表面不表达 CXCR7 分子，其细胞内却表达 CXCR7 mRNA。

孤儿受体(Orphan receptor)是近年来随着生理、生化科学研究的进展，利用核受体的保守结构域为诱饵通过低严谨杂交技术筛选出的一种新的受体类别[6]。与配体依赖性激活的传统受体不同，这类受体可以以非配体依赖的组成性激活方式调节效应基因转录，参与了细胞增殖、分化发育、凋亡、癌变、胞内信号传导、核内信号途径对话(Crosstalking)等过程[6]。有研究[7]发现，异于其它的趋化因子受体，

配体活化 CXCR7 后并不引起细胞钙流的变化,也不引起细胞迁移。RDC1/CXCR7 可能逃脱了像 CXCRs 早期的非孤儿化和确定,因其缺乏 CXCRs 某种典型的和容易获得的能力:与配体结合后介导的趋化性和钙离子移动能力。此表明 CXCR7 信号通路与其他 CXCRs 典型的 GPCR 机制不同。

虽然 CXCR7 中的很多分子作用机制还不是很清楚,但它的生物学功能已得到初步研究,Burns 等[3]Miao 等[8] 通过实验证实:CXCR7 促进肿瘤生长、血管生成及细胞间的粘附。Wang 等[9]研究 CXCR7 在前列腺癌中的作用时发现,这些作用可能与激活 AKT 信号通路有关,CXCR7 的水平受 CXCR4 的调节,CXCR7 也调节前血管形成因子 IL-8 或 VEGF (可能参与肿瘤血管形成的调节)的表达。

研究资料提示,雌激素是乳腺癌重要的有丝分裂刺激剂,这种促分裂作用是通过乳腺组织中的雌激素受体(Estrogen receptor,ER)介导。ER 是目前评价乳腺癌患者预后的主要指标之一。本实验研究发现:CXCR7 表达于乳腺癌细胞,且 6 株细胞的表达量存在明显差异。用 RT-PCR 实验了解到 6 株人乳腺癌细胞系中均可检出 CXCR7 mRNA,ER(+)细胞株 MCF-7,ZR-75-30 表达量相对于 ER(-)细胞株 MDA-MB-231,MDA-MB-435S,MDA-MB-453,HBL-100 较低,但在蛋白水平表达量明显高于 ER(-)细胞株($P<0.01$),MDA-MB-231 在 mRNA 水平表达量较高但蛋白水平无明显表达。作为孤儿受体或是诱饵受体[11,12]的 CXCR7 在侵袭性较弱,ER 阳性的细胞株上比侵袭性较强,ER 阴性的细胞株上表达的量较多,提示 CXCR7 分子可能与瘤细胞的侵袭性呈负相关;本实验研究还发现:CXCR7 基因转录和翻译水平上可能存在差异,基因表达的调控是个非常复杂的过程,翻译水平的调节主要调控 mRNA 的稳定性和 mRNA 翻译起始的调控。推测出现这种差异的原因可能是由于 ER(-)细胞株在基因表达调控上 mRNA 的稳定性遭到了破坏,或者 ER(+)细胞株的 CXCR7 存在交叉抗原性,使得被翻译出来的蛋白表达量明显高于 ER(-)细胞株。有待进一步研究证实。

Miao 等[8]注意到,CXCR7 的表达水平与一些分泌的蛋白质水平相关,特别是基质金属蛋白酶 3 (MMP3),它们又是通过何种途径来调节 CXCR7 的表达水平,亦值得深入研究。

CXCR7/RDC1 与配体 CXCL11、CXCL12 结合参与肿瘤的浸润与转移。它是如何激活其特有的信号通路?与 CXCR4 是如何协同来发挥作用?此类研究甚少。Benedetta Mazzinghi 等[10]报道 CXCR7 和 CXCR4 在急性肾功衰时人肾幼粒细胞治疗性的归巢中起着必要但不同的作用。CXCL11 有效地与 CXCR7 结合,但 CXCL11 不能通过 CXCR7 引导钙流信号或者 ERK1/2 或 AKT 磷酸化[11]。由于找到另一个和配体 CXCL1,CXCL11 高亲和力的受体,我们可以对关于趋化因子的早期发现给予重新解释。CXCR7 可能在一系列关于炎症和癌症关系上提供新的分子链。可能是肿瘤发生发展过程中的一个重要调节分子,有望成为肿瘤分子治疗中的新靶点。

参 考 文 献

[1] MURPHY PM.Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis [J]. N Engl J Med,2001,345(11):833-835.

[2] Zlotnik A.Chemokines and cancer[J]. J Cancer,2006,119(9):2026-2029.

[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]. Exp Med,2006,203(9):2201-2213.

[4] Libert F, Parmentier M, Lefort A,et al.Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1[J]. Nucleic Acids Res,1990,18(7):1917.

[5] Heesen M,Berman M A,Charest A,et al. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1[J].Immunogenetics,1998,47(5):364-370.

[6] Sanchez R,Nguyen D,Rocha W,et al.Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors[J].Bioessays,2002,24(3):244-254.

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

[8] Zhen H M, Kathryn E L,Bretton CS,et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature[J].PNAS,2007,104(40): 15735-15740.

[9] Wang J H,Yusuke Shiozawa,Wang J C,et al. The Role of CXCR7/RDC1 as a Chemokine Receptor for CXCL12/SDF-1 in Prostate Cancer[J]. Biol. Chem,2008,283(7): 4283-4294.

[10] Benedetta Mazzinghil, Elisa Ronconil, Elena Lazzeril,et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells[J]. Exp. Med,2008,205(2):479-490.

[11] Paul Proost, Anneleen Mortier,Tamara Loos,et al. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration[J]. Blood,2007,110(1): 37-44.

(责任编辑:关蕴良)