

趋化因子受体 CXCR4 小干扰 RNA 对人大肠癌细胞株迁移的抑制作用

许超¹, 孙延平^{1*}, 徐昕昀¹, 徐燕², 王全兴³, 王强¹

(1. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003; 2. 第二军医大学护理系, 上海 200433; 3. 第二军医大学基础部免疫学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨趋化因子受体 CXCR4 小干扰 RNA(siRNA)对人大肠癌细胞株迁移的抑制作用。**方法:**采用 RT-PCR、Western 印迹和体外迁移实验检测趋化因子受体 CXCR4 在大肠癌细胞株 SW480、SW620、LoVo 细胞的表达及迁移能力。将与 CXCR4 mRNA 互补的 siRNA 及非抑制性双链 RNA(Non-silencing dsRNA), 在脂质体介导下以 150 nmol/L 终浓度转染大肠癌细胞 SW480, 以 RT-PCR 和 Western 印迹法检测 CXCR4 表达的变化, Transwell 迁移实验检测大肠癌细胞 SW480 迁移的变化。**结果:**大肠癌细胞 SW480 高表达 CXCR4, 大肠癌细胞 LoVo 低表达 CXCR4, SW620 的 CXCR4 表达水平介于二者之间。与 LoVo 细胞相比, SW480 和 SW620 迁移细胞明显增多($P < 0.01$)。与对照组、脂质体组和 Non-silencing dsRNA 组相比, siRNA 组 SW480 细胞内 CXCR4 mRNA 和蛋白均明显降低, 细胞迁移被明显抑制($P < 0.01$)。**结论:**CXCR4 siRNA 可通过下调 CXCR4 的表达抑制人大肠癌细胞 SW480 的迁移。

[关键词] 受体, CXCR4; RNA, 小分子干扰; 肠肿瘤; 肿瘤转移

[中图分类号] R 735.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)05-0470-04

Inhibitory effect of small interfering RNA on migration of human colorectal cancer cell line

XU Chao¹, SUN Yan-ping^{1*}, XU Xin-yun¹, XU Yan², WANG Quan-xing³, WANG Qiang¹ (1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Nursing, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Institute of Immunology & National Key Laboratory of Medical Immunology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the inhibitory effect of small interfering RNA (siRNA) on migration of human colorectal cancer cell line. **Methods:** CXCR4 expression in colorectal cancer cell line SW480, SW620 and LoVo was determined by RT-PCR and Western blotting. Migratory responses of CXCR4 to stromal cell-derived factor 1(SDF-1) were detected by cellular migration assays. The siRNA complementary to CXCR4 mRNA and its control, Non-silencing double-stranded RNA (Non-silencing dsRNA), were embedded in cationic liposome Lipofectin and transfected into SW480 cells at the final concentration of 150 nmol/L; semi-quantitative RT-PCR and Western blotting were performed to evaluate the CXCR4 mRNA and protein expression levels, respectively. The migration of transfected SW480 cells were measured quantitatively by Transwell migration assays. **Results:** CXCR4 expression was strong in SW480 cells, intermediate in SW620 cells, and weak in LoVo cells. *In vitro* cellular migration assays showed that the cell migration of SW480 and SW620 cells was more obvious than that of LoVo cells ($P < 0.01$). The expression of CXCR4 mRNA and protein and the migration of siRNA-treated SW480 cells were significantly decreased compared with those of control group, liposome group and Non-silencing dsRNA group ($P < 0.01$). **Conclusion:** CXCR4 siRNA can significantly inhibit the migration of human colorectal cancer cell line SW480 to SDF-1 by downregulating CXCR4 expression.

[KEY WORDS] receptors, CXCR4; RNA, small interfering; intestinal neoplasms; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 470-473]

趋化因子受体 CXCR4 是人体组织表达最为广泛的细胞因子受体之一, 近年来研究发现 CXCR4 和其配体基质细胞衍生因子 1(SDF-1)相互作用, 不但参与了体内许多重要的病理、生理反应, 而且在多种肿瘤的转移中起着重要的作用^[1], 高表达 CXCR4 的肿瘤细胞, 在 SDF-1 趋化作用下, 迁移至作为配体产生源的某些器官(肝、肺、淋巴结等), 从而形成器官特异性的转移^[2]。我们已有的工作显示, 大肠癌组织 CXCR4 表达水平较高, 并与大肠癌患者临

床转移有关^[3]。本实验采用与 CXCR4 mRNA 互补的小干扰 RNA(siRNA), 探讨其对人大肠癌细胞株 SW480 体外迁移的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 人大肠癌细胞株 SW480、

[作者简介] 许超, 博士, 主治医师. E-mail: changxusir@yahoo.com.cn
* Corresponding author. E-mail: sunyanping2003@yahoo.com

SW620、LoVo 均获赠于第二军医大学基础部免疫学教研室。RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, CXCR4 多克隆抗体(一抗)、PE-CXCR4 单克隆抗体购自 eBioscience 公司, Transwell 迁移小室购自美国 Corning Costar 公司, SDF-1 和 β -actin 单克隆抗体(一抗)购自 R&D 公司。Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。小干扰 RNA 序列由上海吉凯化学技术有限公司合成、纯化, 根据人 CXCR4 基因序列(GenBank 序列号: NM-001008540)合成, CXCR4 siRNA 序列为: sense 5'-UAA AAU CUU CCU GCC CAC Cdt dt-3', antisense 5'-GGU GGG CAG GAA GAU UUU Adt dt-3'。阴性对照为非抑制性双链 RNA(Non-silencing dsRNA): sense 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG Udt dt-3', antisense 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA Adt dt-3'。在 GenBank 中行 BLASTn 证实 CXCR4 siRNA 仅与 CXCR4 基因相应位点匹配, Non-silencing dsRNA 与任何已知哺乳动物基因无匹配。

1.2 RT-PCR 法检测 CXCR4 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 以紫外分光光度计检验纯度并定量, 在 1% 甲醛变性凝胶上电泳验证 RNA 完整性。RT-PCR 采用两步法试剂盒, 按厂家推荐步骤进行。实验中以持家基因 GAPDH 为内参照, 对样品模板用量标准化。CXCR4 和 GAPDH 分管扩增。引物序列参照文献^[4]: CXCR4 (206 bp) 上游引物 5'-TTC TAC CCC AAT GAC TTG TG-3', 下游引物 5'-ATG TAG TAA GGC AGC CAA CA-3'; GAPDH (525 bp) 上游 5'-ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG-3', 下游 5'-CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC-3'。RT-PCR 条件: 42℃ 逆转录 15 min, 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35(CXCR4, GAPDH) 个循环, 72℃ 充分延伸 5 min。基因扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 以上海天能 GIS 图像分析系统成像并分析。以 CXCR4 条带波长 254 nm 的光密度值(D)代表 CXCR4 mRNA 表达量。

1.3 Western 印迹法检测 CXCR4 蛋白表达 将细胞培养液吸净后, 冰 PBS 漂洗 3 次, 立即加入 50 μ l 裂解缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.14), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 5 μ g/ml 抑肽酶(aprotinin), 10 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽], 收集细胞, 4℃ 静置 30 min, 12 000 r/min ($r=8.5$ cm) 离心 20 min, 取上清, BCA 法测定总蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素膜, 5%

脱脂奶粉封闭非特异性抗原, 加入 1:1 000 稀释的小鼠抗人 CXCR4 多克隆抗体, 室温孵育 1 h, 用含 0.1% Tween 20 的 TBS 洗膜, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗, 室温作用 1 h, 洗膜后加入增强化学发光底物 ECL Plus 试剂, 以上海天能 GIS 图像分析系统成像并分析。以 CXCR4 条带的 D_{254} 代表 CXCR4 蛋白表达量。

1.4 siRNA 及 Non-silencing dsRNA 的转染 采用阳离子脂质体 Lipofectamine2000 转染。实验分对照组(转染时不加脂质体, 不加双链 RNA)、脂质体组(转染时仅加脂质体)、siRNA 组(以脂质体转染 siRNA) 和 Non-silencing dsRNA 组(以脂质体转染 Non-silencing dsRNA), siRNA 组和 Non-silencing dsRNA 组终浓度均为 150 nmol/L。取对数生长期的 SW480 细胞接种于 6 孔培养板, 培养至约 70% 覆盖率。siRNA 和 Non-silencing dsRNA 溶于 DMEM, 另取 5 μ l Lipofectamine2000 试剂与 245 μ l DMEM 混合, 室温下温育 5 min。将 siRNA 和 Non-silencing dsRNA 分别与 Lipofectamine2000 在 5 min 内混合, 室温下温育 20 min, 将混合液加入培养细胞, 轻柔前后推摇培养板以混匀液体, 37℃、5% CO₂ 孵箱孵育。12 h 后去除转染液, 换以含 10% 小牛血清的 DMEM 继续培养。培养过程中设复孔常规以锥虫蓝染色法检测细胞死亡率, 各组细胞死亡率均 $\leq 5\%$ 。将转染后继续培养 48 h 的 SW480 细胞分别进行 RT-PCR 和 Western 印迹及 Transwell 迁移实验检测。以脂质体组、siRNA 组和 Non-silencing dsRNA 组 CXCR4 条带的 D_{254} 值与对照组 CXCR4 条带 D_{254} 值的比值表示 CXCR4 mRNA 相对表达量。

1.5 Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力 以 10% 小牛血清 DMEM 继续培养细胞 24 h。以无血清 DMEM 制成密度为 5×10^5 /ml 的单细胞悬液, 取 200 μ l 移入上室内; 下室内加入 600 μ l 含 SDF-1 (浓度为 100 ng/ml) 的细胞培养液, 另在下室以未加入 SDF-1 作为对照组。置 37℃、5% CO₂ 孵箱内孵育 24 h, 取出上室, 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 H-E 染色。每个小室在高倍镜 ($\times 200$) 下随机取 6 个视野计数迁移细胞数, 取其平均值作为结果。每组设 2 复孔, 重复 3 次。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本间均数比较行 t 检验, 由 SPSS 10.0 软件包完成。

2 结果

2.1 CXCR4 mRNA 表达情况 大肠癌细胞株

SW480、SW620、LoVo 中 CXCR4 mRNA 均呈阳性表达(图 1)。大肠癌细胞 SW480 高表达 CXCR4 (3.84 ± 0.08), LoVo 低表达 CXCR4 (1.24 ± 0.05), SW620 的 CXCR4 表达水平 (2.33 ± 0.06) 介于二者之间,三者间两两比较的 t 值分别为 6.30、4.19 和 5.76, P 值均 < 0.01 。

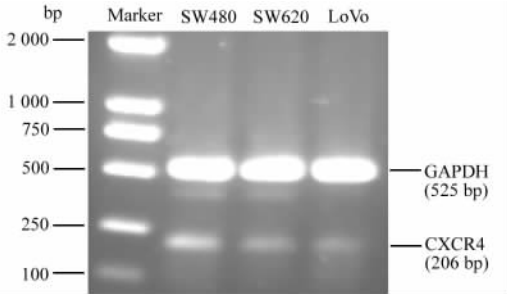


图 1 大肠癌细胞中 CXCR4 mRNA 的表达
Fig 1 Expression of CXCR4 mRNA in human colorectal cancer cell lines

2.2 CXCR4 蛋白表达情况 大肠癌细胞株 SW480、SW620、LoVo 中 CXCR4 均呈阳性表达(图 2)。大肠癌细胞 SW480 高表达 CXCR4 (9.74 ± 0.31), LoVo 低表达 CXCR4 (2.83 ± 0.08), SW620 的表达水平 (6.44 ± 0.17) 介于二者之间,三者间两两比较的 t 值分别为 5.37、4.75 和 7.26, P 值均 < 0.01 ,与 RT-PCR 结果一致。

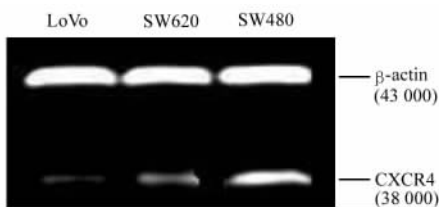


图 2 大肠癌细胞中 CXCR4 蛋白的表达
Fig 2 Expression of CXCR4 protein in human colorectal cancer cell lines

2.3 Transwell 迁移实验检测情况 CXCR4 高表达的大肠癌细胞 SW480 和 SW620 在 SDF-1 趋化作用下发生体外迁移细胞明显增多(t 值分别为 25.30、10.29, $P < 0.01$), CXCR4 低表达大肠癌细胞 LoVo 体外迁移无明显变化(t 值为 2.56, $P > 0.05$, 表 1)。

2.4 siRNA 对 CXCR4 表达的抑制作用 半定量 RT-PCR 扩增产物电泳和 Western 印迹结果(图 3)显示,对照组、脂质体组及 Non-silencing dsRNA 组 SW480 细胞 CXCR4 mRNA 表达无明显差异(表 2, t 值分别为 1.63、2.03、1.31, $P > 0.05$), CXCR4 蛋

白表达无明显差异(t 值分别为 1.42、1.78、2.13, $P > 0.05$); 与对照组、脂质体组、Non-silencing dsRNA 组相比较, siRNA 组 SW480 细胞 CXCR4 mRNA 显著降低(t 值分别为 6.24、7.38、6.72, $P < 0.01$), CXCR4 蛋白显著降低(t 值分别为 12.04、11.31、13.53, $P < 0.01$)。

表 1 大肠癌细胞在 SDF-1 趋化作用下发生的细胞迁移数变化
Tab 1 Migration of CXCR4 in human colorectal cancer cell lines

($n=6, \bar{x} \pm s$)			
Group	SW480	SW620	LoVo
Control (without SDF-1)	65 ± 5	47 ± 5	35 ± 4
Experiment (added with 100 ng/ml SDF-1)	163 ± 9 **	89 ± 6 **	38 ± 3

** $P < 0.01$ vs control group

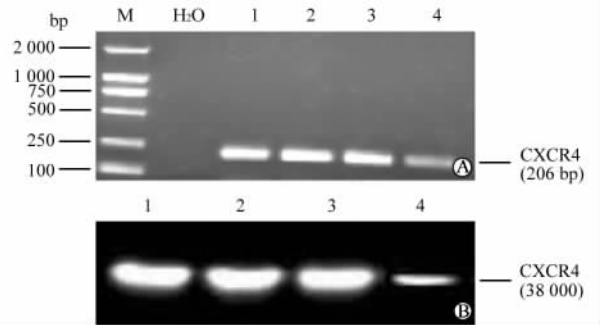


图 3 各组 SW480 细胞 CXCR4 mRNA 和蛋白的表达
Fig 3 Expression of CXCR4 mRNA and protein of SW480 in different groups

A: RT-PCR; B: Western blot; 1: Control; 2: Liposome; 3: Non-silencing dsRNA; 4: siRNA

表 2 siRNA 对 SW480 细胞 CXCR4 表达及迁移的抑制

Tab 2 Inhibitory effect of siRNA on CXCR4 expression and migration of SW480 cells

($n=6, \bar{x} \pm s$)			
Group	Expression of CXCR4 mRNA	Expression of CXCR4 protein	Migrated cells
Control	8.74 ± 0.52 * * 14.84 ± 1.37 * * 168 ± 12 * *		
Liposome	9.13 ± 0.81 * * 15.14 ± 1.21 * * 172 ± 11 * *		
Non-silencing dsRNA	8.53 ± 0.77 * * 14.49 ± 1.15 * * 165 ± 10 * *		
siRNA	2.24 ± 0.18	3.24 ± 0.21	97 ± 8

** $P < 0.01$ vs siRNA group

2.5 siRNA 对细胞迁移的抑制作用 Transwell 迁移实验中, 对照组、脂质体组及 Non-silencing dsRNA 组之间 SW480 迁移细胞数无明显差异(t 值

分别为 2.13、1.98、2.47, $P > 0.05$)。与对照组、脂质体组、Non-silencing dsRNA 组相比较, siRNA 组 SW480 迁移细胞数明显减少, 差别具有显著意义 (t 值分别为 11.20、12.38、10.12, $P < 0.01$, 表 2)。

3 讨论

趋化因子受体 CXCR4 是一类以 SDF-1 为结合配体的趋化因子受体, SDF-1 与 CXCR4 具有高度的亲和力, 两者特异性结合后形成的 SDF-1/CXCR4 轴是其生物学功能实现的分子基础。随着研究的深入, 人们发现 CXCR4 是肿瘤组织表达最为广泛的细胞因子受体之一, CXCR4 和其配体 SDF-1 相互作用不但参与了体内许多重要的病理、生理反应, 而且在多种肿瘤组织中有较强表达, 其表达水平与肿瘤的发生和转移呈正相关^[5], SDF-1 与 CXCR4 相互作用可以上调表达基质金属蛋白酶 (MMP) 2 和 MMP-9, 减少金属蛋白酶组织抑制因子 (TIMP) 的分泌^[6], 从而使细胞外基质 (ECM) 发生降解, 促进肿瘤的侵袭和转移。SDF-1 可短暂且快速上调整合素 VLA-4、VLA-5 和 LFA-1 表达, 使循环中的细胞易与内皮细胞发生黏附, 进而转移至靶器官^[7-8], 因此 CXCR4 成为抗肿瘤研究的新靶点。在本研究中我们从 mRNA、蛋白水平检测了 3 种大肠癌细胞 CXCR4 的表达, 发现 SW480 CXCR4 表达水平最高, 并且在 SDF-1 趋化作用下发生体外迁移细胞明显增多, CXCR4 低表达大肠癌细胞 LoVo 体外迁移无明显变化, 这种效应除了与 SDF-1 的趋化作用有关外, 已有研究还发现 SDF-1 与 CXCR4 结合可激活 PI3K 途径使细胞骨架蛋白发生重排, 细胞内的丝状肌动蛋白 (F-肌动蛋白) 增加, 使细胞形成明显的伪足, 增强了肿瘤细胞的运动性^[9]。

RNA 干扰现象是一种进化上保守的抵御转基因或外来病毒侵犯的防御机制, 是指内源性或外源性与靶基因的转录产物 mRNA 存在同源互补序列的双链 RNA, 在细胞内 Dicer 酶 (Dicer 酶是双链 RNA 特异内切核酸酶家族的一个成员) 的作用下, ATP 提供能量, 形成 21~23 bp 大小的 siRNA, 在细胞识别并切割与 siRNA 互补的靶 mRNA 序列, 从而致使特异性的基因有效封闭的过程, 是一种序列特异性的转录后基因沉默^[10]。近来的研究发现 RNA 干扰是一种抑制基因表达的有效武器, 在技术上优于反义寡核苷酸和核酶, 已广泛用于抑制基因表达。RNA 干扰应用面临的主要问题之一是选择功能性靶序列, siRNA 并不能作用于所有目标 RNA

序列; 某些序列可能藏于二级结构或目的 RNA 的折叠区域; 某些序列可能与蛋白质形成紧密结构从而使 siRNA 无法识别^[11]。因此最合适靶序列的选择需要反复试验, 从而增加了研究难度。有些 RNA 可能因此无法应用 RNA 干扰技术。为此我们对靶基因采用严格的 BLASTn 进行比对, 选择特异性结合效率最高的靶序列。本研究通过半定量 RT-PCR、Western 印迹和 Transwell 迁移实验说明, siRNA 能够显著下调 CXCR4 的表达, 从而降低 SDF-1 对大肠癌细胞 SW480 的趋化迁移作用, 不仅测定了 CXCR4 siRNA 的活性, 而且进一步验证了 CXCR4 表达与细胞迁移的关系。提示 siRNA 可能为人类大肠癌基因治疗提供一条新的途径。

[参考文献]

- [1] Burger J A, Kipps T J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment [J]. *Blood*, 2006, 107: 1761-1767.
- [2] Balkwill F. Cancer and the chemokine network. [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 540-550.
- [3] 许超, 王强, 孙延平, 等. CXCR4 在结肠直肠癌组织中的表达及临床意义 [J]. *外科理论与实践*, 2006, 11: 413-416.
- [4] Schimanski C C, Schwald S, Simiontonaki N, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer [J]. *Clin Can Res*, 2005, 11: 1743-1750.
- [5] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14: 171-179.
- [6] Chu H, Zhou H, Liu Y, et al. Functional expression of CXCR4 chemokine receptor-4 mediates the secretion of matrix metalloproteinases from mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis ability [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 197-205.
- [7] Gazitt Y, Akay C. Mobilization of myeloma cells involves SDF-1/CXCR4 signaling and downregulation of VLA-4 [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 65-73.
- [8] Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34⁺ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice [J]. *Blood*, 2000, 95: 3289-3296.
- [9] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410: 50-56.
- [10] Dallas A, Vlassov A V. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential [J]. *Med Sci Monit*, 2006, 12: 67-74.
- [11] Silhavy D, Molnar A, Lucoli A, et al. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25- nucleotide double-stranded RNAs [J]. *EMBO J*, 2002, 21: 3070-3080.

[收稿日期] 2007-02-07

[修回日期] 2007-04-10

[本文编辑] 邓晓群