

[ 文章编号 ] 1007-385X(2005)01-0046-06

## CXCR4 表达水平对肺癌细胞转移潜能的影响

苏丽萍, 张进平, 郑秀娟, 储以薇, 熊思东 (复旦大学上海医学院免疫系, 教育部分子医学重点实验室, 上海基因免疫和疫苗研究中心, 上海 200032)

[ 摘要 ] **目的:** 探讨趋化因子受体 CXCR4 表达水平对人肺癌细胞转移潜能的影响。**方法:** 采用 RT-PCR, FACS 检测趋化因子受体 CXCR4 在肺癌细胞株 95C, 95D 细胞的表达。构建 CXCR4 正义和反义真核表达质粒, 用脂质体法转染至 95C 和 95D 细胞内, 通过 G418 筛选出稳定转染株。通过趋化和趋化侵袭实验测定转染前后细胞对基质衍生因子(SDF-1 $\alpha$ )的迁移能力, 通过明胶酶谱法检测 MMP-2 活性, 通过 FACS 检测细胞对血管内皮细胞的黏附能力。**结果:** CXCR4 正义和反义真核表达质粒 pcDNA3-X4 和 pcDNA3-ASX4 能明显上调或下调肺癌细胞表面 CXCR4 的表达, 上调 95C 细胞表面 CXCR4 的表达可以增强其对 SDF-1 $\alpha$  的趋化反应性、MMP-2 活性及其对血管内皮细胞的黏附能力。相反, 下调 95D 细胞表面 CXCR4 的表达抑制了其对其对 SDF-1 $\alpha$  的趋化反应性、MMP-2 活性及其对血管内皮细胞的黏附能力。**结论:** 上调或下调肺癌细胞表面 CXCR4 表达可以显著增强或抑制其转移潜能, 提示 CXCR4 表达水平与肺癌细胞转移潜能有关。

[ 关键词 ] CXCR4; 肺癌细胞; 转移潜能

[ 中图分类号 ] R734.2 [ 文献标识码 ] A

## The Effect of the Expression Level of CXCR4 on the Metastatic Potential of Human Lung Cancer Cells

SU Li-ping, ZHANG Jin-ping, ZHENG Xiu-juan, CHU Yi-wei, XIONG Si-dong (Department of Immunology of Shanghai Medical College of Fudan University, Key Laboratory of Molecular Medicine of Ministry of Education, Center for Gene Immunization and Vaccine Research, Shanghai, 200032, China)

[ Abstract ] **Objective:** To study the effect of the expression levels of Chemokine receptor CXCR4 on the metastatic potential of human lung cancer. **Methods:** CXCR4 expression was determined by Real-time PCR and FACS. The plasmid DNA containing CXCR4 coding gene or CXCR4 antisense nucleotides fragment was constructed and transfected into 95C or 95D cells with Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 reagent respectively, and then the stable transfectants were screened by G418. Migratory responses to SDF-1 $\alpha$  were detected by chemotaxis and chemoinvasion assay, MMP-2 activity was determined with zymography, and the ability of adhesion to ECV-304 cells was analyzed by FACS. **Results:** The surface expression of CXCR4 on lung cancer cells was significantly up or down regulated. Following up-regulation of CXCR4 expression on 95C cells, the migratory response to SDF-1 $\alpha$ , MMP-2 activity, and the ability of adhesion to ECV-304 cells were consequently enhanced. Conversely, when CXCR4 expression was down regulated on 95D cells, the migratory response to SDF-1 $\alpha$ , MMP-2 activity, and the ability of adhesion to ECV-304 cells were significantly impaired. **Conclusion:** Up or down regulation of CXCR4 expression enhanced or inhibited the metastatic potential of human lung cancer cells, which implied that CXCR4 expression was closely associated with the metastatic potential of human lung cancer cells.

[ Key words ] CXCR4; human lung cancer cell; metastatic potential

肺癌是近年来发生率呈逐渐上升趋势的一种恶性肿瘤,多数病人初次就诊时已经发生转移,因此肿瘤转移成为影响肺癌患者5年存活期的重要因素。我们已有的工作显示,肺癌组织中表达较高水平的趋化因子

[ 基金项目 ] 国家教育部科学技术重点项目(03063)、国家杰出青年科学基金(39925031)

[ 作者简介 ] 苏丽萍(1974-),女,山东鄄城人,在读博士生,主要从事趋化因子的基础和临床研究

受体 CXCR4, 并与肺癌患者有无临床转移有关。但这种相关性是意味着 CXCR4 的表达在某种程度上决定了肺癌细胞的转移能力还是肺癌转移过程中伴随着 CXCR4 表达的升高, 我们尚不清楚。为了进一步明确趋化因子受体 CXCR4 的表达与肺癌转移的关系, 我们观察了不同转移潜能肺癌细胞中 CXCR4 的表达情况, 并进一步通过调控肺癌细胞中 CXCR4 的表达水平, 分析其对肿瘤细胞恶性生物学行为的影响, 从而为转移性肺癌的发病机理和治疗提供理论基础和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、质粒和主要试剂

人肺癌高、低转移潜能细胞株 95D、95C 由本校分子遗传室提供; 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 为本室保存。Lipofectamine™2000、pcDNA3 质粒(Invitrogen); 限制性内切酶(EcoR V、BamH I)、逆转录酶(MBI); TaqDNA 多聚酶(Biostar); SYBR Green I(Roche); Matrigel(Sigma); SDF-1 $\alpha$ (Cytolab); CXCR4 抗体(MAB173, R&D); calcein AM(molecular probes)。

### 1.2 细胞体外侵袭实验

将 800  $\mu$ l NIH3T3 条件培养上清加入 24 孔板, 然后放置预先铺有 Matrigel 的 chamber(Neuroprobe), 于每孔中加入 500  $\mu$ l 处于对数生长期的肺癌细胞( $1 \times 10^5$ /ml), 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 12 h 后, 取出, 用棉签轻轻拭去膜内层细胞, 甲醇固定。HE 染色, 在光学显微镜下计数至少 5 个视野( $\times 100$ )下的细胞数, 以每个视野下的细胞均数表示。

### 1.3 明胶酶谱实验

将  $5 \times 10^4$ /孔细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 细胞用 PBS 轻轻洗涤 3 遍后, 加入新鲜的含有或不含有 SDF-1 $\alpha$ (100 ng/ml) 无血清培养基, 继续培养 24 h 后, 收集细胞上清, 离心去除细胞碎片, 根据细胞计数调整各组细胞培养上清液中的蛋白浓度。参照文献方法<sup>[3]</sup>检测细胞明胶酶活性。以条带面积与条带强度的乘积代表其明胶酶活性。

1.4 RT-PCR 采用异硫氰酸胍-酸性一步法提取细胞总 RNA, 进行 cDNA 第一链的合成: 1  $\mu$ g 总 RNA 中加 1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>15</sub>, 70 $^{\circ}$ C 5 min, 于冰上加入 5  $\times$  缓冲液 5  $\mu$ l, dNTP5  $\mu$ l, RNasin0.5  $\mu$ l, 逆转录酶 200 U, 加水至总体积 25  $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C 延伸 60 min 后 70 $^{\circ}$ C 10 min。然后以 cDNA 为模板进行 PCR, 扩增条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。根据 GeneBank 中 CXCR4 的基因序列设计引物, 上游: 5'-CGGAATTCAGCAGG-TAGCAAAGTGACG-3', 下游: 5'-GCTCTAGAGGTCCT-

GCCTA GACACACATC-3', 或 5'-GACGCCAACAT-AGACCACCT-3', 产物大小分别为 1353bp 和 561 bp。同时以人 GAPDH 为对照, 上游: 5'-CTGCACCAC-CAACTGCTTAG-3', 下游: 5'-CCACTGACACGTTGG CAGTG-3', 产物大小为 275 bp。此外经逆转录的 cDNA 用 lightcycler 以 SYBR Green I 为荧光指示进行实时定量 PCR 扩增 CXCR4 基因片段, 以 GAPDH 为对照。

### 1.5 CXCR4 正义和反义真核表达重组质粒的构建和鉴定

通过 RT-PCR 获得 CXCR4 全长基因, 经低熔点琼脂糖法回收后, 用限制性内切酶 EcoR I, Xba I 分别消化 CXCR4 全长片段和 pcDNA3, 回收后按片段和载体摩尔数之比为 1:3 混合后加入 T<sub>4</sub>DNA 连接酶于室温连接, 转化。并进一步经 PCR、酶切和 DNA 序列分析鉴定。同样通过 RT-PCR 获得 CXCR4 的目的片段, 回收后接入 pUCmT 载体中, 用 T7 引物(5'-TTAATAC-GACTCACTATAG-3')和 CXCR4 下游引物进行 PCR 鉴定, 筛选出与 pUCmT 载体正向连接的重组体 T-CXCR4, 然后用限制性内切酶 EcoR V, BamH I 消化 T-CXCR4 和 pcDNA3, 分别回收酶切后的含有 CXCR4 的片段和 pcDNA3, 室温连接, 转化和鉴定。

### 1.6 细胞转染、稳定筛选和鉴定

将 95C 和 95D 细胞( $2.5 \times 10^5$ /孔)接种至 6 孔板中, 待细胞密度达到 70% ~ 80% 时, 采用 Lipofectamine™2000 真核转染说明书进行转染。于转染后 48 h, 加入含 600  $\mu$ g/ml G418 的新鲜培养液, 每隔 3 ~ 4 d 换液, 筛选 G418 抗性克隆。

用抗 CXCR4 抗体标记细胞, 4 $^{\circ}$ C 标记 30 min, PBS 洗 3 遍, 加入 FITC-羊抗鼠 IgG, 4 $^{\circ}$ C 标记 30 min, PBS 洗 3 遍, 流式细胞仪分析。设置同型对照。

### 1.7 趋化和趋化侵袭实验

参照文献报道<sup>[4]</sup>的方法, 用 48 孔趋化小室, 将 27  $\mu$ l 含 SDF-1 $\alpha$  的趋化上清(RPMI1640 + 0.5% BSA + 100 ng/ml SDF-1 $\alpha$ ) 加入下室, 将 8  $\mu$ m 孔径的预先用 Fibronectin(5.0  $\mu$ g/ml) 或 Matrigel 处理过的 polycarbonate 膜(Neuroprobe) 覆盖在小室上, 将 50  $\mu$ l 单个细胞悬液( $2 \times 10^4$ ) 加入上室中, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育 12 h 或 24 h。抑制实验时, 细胞分别与抗人 CXCR4 抗体(50  $\mu$ g/ml) 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后按上述方法作趋化或趋化侵袭试验。设置阴性对照即下池中只加入 RPMI-1640(含 0.5% BSA)。每组 3 复孔。趋化膜用甲醇固定后进行 HE 染色, 在光学显微镜下计数 5 个视野( $\times 100$ )下的细胞数。

### 1.8 黏附实验

将 ECV-304 细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后,

吸去原有液体,加入 100  $\mu$ l 含 SDF-1 $\alpha$ (100 ng/ml)新鲜培养液,于室温下作用 20 min,洗涤备用。收集 95C,95C-pC,95C-X4,95D,95D-pC 和 95D-ASX4 细胞,按  $4 \times 10^5$ /ml 悬浮于 1 ml RPMI-1640 培养液中。分别加入 5  $\mu$ l(10 mg/ml)calcein AM,于 37 $^{\circ}$ C 标记 30 min。然后用 37 $^{\circ}$ C 预温的 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次后,分别加入每孔中(100  $\mu$ l/孔),每组设置 3 复孔,于 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 20 min 后,轻轻洗去未黏附细胞。分别收集每孔内的黏附细胞和 ECV-304,悬浮于 1 ml PBS 中,用流式细胞仪检测。

### 1.9 统计学方法

数据以均数  $\pm$  标准差表示,分析用 *t* 检验。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CXCR4 在不同转移潜能肺癌细胞的表达

首先我们确认了人肺癌细胞株的不同转移潜能。采用铺有人工基底膜 Matrigel 的 Transwell-chamber 和明胶酶谱法检测了细胞的体外侵袭能力和 MMP 活性,结果显示 95D 细胞的体外侵袭能力平均是 95C 细胞的 2.36 倍( $P < 0.05$ ),95D 分泌的 MMP-2 活性显著高于

95C( $P < 0.05$ ),而 MMP-9 在两者之间无显著差异,进一步证实了肺癌高、低转移细胞株的不同转移潜能。接着我们检测了不同转移潜能肺癌细胞株中 CXCR4 表达,结果显示,CXCR4 在 95D 细胞中的表达高于 95C 细胞,CXCR4 属于细胞表面的 7 次跨膜的 G 蛋白耦联受体,我们继而通过 FACS 检测其表达,结果同样证实了 CXCR4 在 95D 细胞(50.37%)的表达高于 95C 细胞(25.83%)。

### 2.2 CXCR4 正义和反义真核表达载体的构建、鉴定和转染

为了进一步研究 CXCR4 与肺癌转移的关系,我们构建了 CXCR4 正义和反义真核表达载体 pcDNA3-X4 和 pcDNA3-ASX4,重组体经 PCR、酶切鉴定,显示目的片段插入 pcDNA3 质粒中,而且插入方向正确,进一步经 DNA 测序分析证实其序列与理论序列一致。

采用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 将 pcDNA3, pcDNA3-X4 和 pcDNA3-ASX4 质粒分别转染 95C 和 95D 细胞,经 3~4 周 G418 选择培养,获得了稳定转染细胞株 95C-X4 和 95D-ASX4,及其相应的空质粒对照细胞 95C-pC 和 95D-pC。通过流式细胞仪检测了转染前后细胞表面 CXCR4 表达,结果显示(图 1),与 95C,95C-pC 细胞相

图 1 转染前后细胞表面 CXCR4 的表达

Fig. 1 The expression of CXCR4 on the non-transfectant and stable transfectant with CXCR4 full length or antisense plasmid

比,95C-X4 细胞表面 CXCR4 表达水平显著升高(峰向右偏移),表明 CXCR4 真核全长质粒在 95C 细胞内有效地转录和翻译。相反,与 95D,95D-pC 细胞相比,95D-ASX4 细胞表面 CXCR4 表达水平显著降低(峰向

左偏移),表明 CXCR4 反义真核表达载体有效抑制了 95D 细胞 CXCR4 的表达。

2.3 调控 CXCR4 表达影响肺癌细胞对 SDF-1 $\alpha$  的迁移能力

为了进一步明确 CXCR4 表达对肺癌恶性生物学行为的影响,我们首先检测了调控 CXCR4 表达后肺癌细胞对其特异配体 SDF-1 $\alpha$  的趋化和趋化侵袭反应。结果显示(图 2,3),SDF-1 $\alpha$  可以诱导细胞发生不同程度的趋化和趋化侵袭。与 95C 和 95C-pC 细胞,上调 CXCR4 后,SDF-1 $\alpha$  对 95C-X4 细胞的趋化或趋化侵袭作用显著增强( $P < 0.05$ )。SDF-1 $\alpha$  能有效诱导 95D 和 95D-pC 细胞发生趋化或趋化侵袭,而对 95D-ASX4 细胞的作用显著低于 95D 和 95D-pC 细胞( $P < 0.05$ )。抗 CXCR4 中和抗体均可以明显抑制这种由 SDF-1 $\alpha$  诱导的趋化或趋化侵袭作用。提示 SDF-1 $\alpha$  诱导的趋化或趋化侵袭作用是由 CXCR4 特异性介导的。

图 2 SDF-1 $\alpha$  对肺癌细胞的趋化作用

Fig.2 Chemotaxis of lung cancer cells to SDF-1 $\alpha$

图 3 SDF-1 $\alpha$  对肺癌细胞的趋化侵袭作用

Fig.3 Chemoinvasion of lung cancer cells to SDF-1 $\alpha$

#### 2.4 调控 CXCR4 表达影响肺癌细胞 MMP-2 活性

已有的结果显示,MMP-2 在高、低转移肺癌细胞株之间存在差异,表明 MMP-2 与肺癌细胞的侵袭转移能力相关。因此我们检测 CXCR4 的表达对肺癌细胞 MMP-2 活性的影响。结果显示,未经 SDF-1 $\alpha$  活化的 95C,95C-pC 和 95C-X4 细胞均分泌一定活性的 MMP-

2,三者之间无差异,经 SDF-1 $\alpha$  刺激 24 h 后发现 95C,95C-pC 和 95C-X4 细胞分泌的 MMP-2 活性均有一定程度地增高,而 95C-X4 细胞 MMP-2 活性高于 95C,95C-pC 细胞( $P < 0.05$ );相反地,未经 SDF-1 $\alpha$  活化的 95D,95D-pC 和 95D-ASX4 细胞分泌较高活性的 MMP-2。在经 SDF-1 $\alpha$  刺激 24 h 后发现 95D,95D-pC 和 95D-ASX4 细胞的 MMP-2 活性均有一定程度地增高,但 95D,95D-pC 分泌的 MMP-2 活性显著高于 95D-ASX4 细胞( $P < 0.05$ )。这提示 CXCR4/SDF-1 的相互作用调控了肺癌细胞的 MMP-2 活性。

#### 2.5 调控 CXCR4 表达影响肿瘤细胞对内皮细胞的黏附

黏附至血管内皮细胞是肿瘤细胞发生远处转移的一个关键步骤。我们检测了调控 CXCR4 表达对肺癌细胞与血管内皮细胞黏附能力的影响。结果显示,95C,95C-pC 和 95C-X4 细胞与血管内皮细胞的相对黏附率分别为  $11.2 \pm 1.38\%$ ,  $10.57 \pm 0.89\%$  和  $16.75 \pm 1.25\%$ 。血管内皮细胞经外源 SDF-1 $\alpha$  处理后,细胞与其黏附率升高至  $27.32 \pm 1.07\%$ ,  $28.32 \pm 0.92\%$  和  $43.21 \pm 1.89\%$ ,95C-X4 细胞的黏附率显著高于 95C,95C-pC 细胞( $P < 0.05$ ) (图 4)。同样,95D,95D-pC 和 95D-ASX4 细胞与血管内皮细胞的相对黏附率分别为  $22.35 \pm 1.31\%$ ,  $22.22 \pm 1.52\%$  和  $17.77 \pm 0.90\%$ 。ECV-304 细胞经 SDF-1 $\alpha$  处理后,细胞与其黏附性升高至  $50.92 \pm 2.63\%$ ,  $50.27 \pm 0.98\%$  和  $22.41 \pm 1.21\%$ ;95D-ASX4 细胞的黏附率显著低于 95D,95D-pC 细胞( $P < 0.05$ ) (图 4)。肺癌细胞与 CXCR4 中和抗体预先孵育后,与 SDF-1 $\alpha$  刺激后的血管内皮细胞的黏附率明显降低,提示肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附在一定程度上依赖于 CXCR4/SDF-1 的相互作用。

图 4 调控 CXCR4 表达对肺癌细胞黏附能力的影响

Fig.4 The effect of CXCR4 regulation on the adhesive ability of lung cancer cells

### 3 讨论

已有的研究表明,趋化因子受体 CXCR4 与其配体相互作用构成 CXCR4/SDF-1 反应轴,参与了机体的多种生理和病理过程如造血系统和淋巴系统的发育和成熟、血管生成、造血干细胞的归巢等<sup>[5-7]</sup>。近年来发现该反应轴也参与了肿瘤的进展和抑制。本研究中我们发现 CXCR4 在不同转移潜能肺癌细胞株的表达不同,其表达水平与肺癌细胞株高转移潜能有关,并证实了我们已有的结果即 CXCR4 在临床肺癌组织中的高表达。为了进一步明确 CXCR4 与肺癌细胞转移的关系,我们通过调控 CXCR4 在肺癌高、低转移潜能细胞中的表达,观察它对肺癌细胞转移潜能的影响。首先通过过表达技术和反义技术两种手段成功地构建了 CXCR4 全长真核表达质粒 pcDNA-X4 和靶向 CXCR4 5' 端未翻译区和翻译起始区的反义 RNA 表达质粒 pcDNA-ASX4,用脂质体法转染 95D 和 95C 细胞,建立稳定转染细胞株。FACS 分析结果显示,与未转染细胞和空质粒转染组细胞相比,稳定转染细胞表面 CXCR4 的表达发生了显著上调或下调,为随后研究 CXCR4 在肺癌转移中的作用建立了一个平台。

运动性是评价肿瘤细胞体外转移潜能的指标之一。通过对转染前后细胞的趋化迁移能力分析表明,上调或下调肺癌细胞表面 CXCR4 的表达均显著影响了其运动性,这种转移潜能是由 CXCR4 介导的,因为给予同样的 SDF-1 和制备的裸鼠组织匀浆,细胞对其趋化反应性降低,表明 CXCR4 与其配体 SDF-1 的相互作用与该肿瘤细胞的体外迁移运动有关。研究表明 CXCR4 介导的 T 细胞趋化迁移是由其配体 SDF-1 与之结合后,通过 G 蛋白触发细胞内信号传导级联,上调 PI3K 活性,诱导下游相关效应分子如 RAFTK、paxillin 和 Crk 的酪氨酸磷酸化和聚集,导致细胞骨架重排,从而介导 CXCR4/SDF-1 相互作用触发的趋化迁移效应<sup>[8]</sup>。本研究中通过下调 CXCR4 的表达或 CXCR4 中和抗体在一定程度上阻断这条通路,这可能是 CXCR4 下调后影响肿瘤细胞转移潜能的可能原因,其详细机制有待于进一步研究。另外 95D-ASX4 细胞对其诱导的体外移行能力未能恢复至对照组水平,分析其原因可能是反义技术效果有限,或者除 CXCR4/SDF-1 之外有其它的分子参与其转移。

肿瘤细胞转移过程中的一个必需步骤是穿越基底膜和侵入周围基质。这一过程有许多的蛋白溶酶参与,基质金属蛋白酶 (Matrix Metalloproteinase, MMP) 是其中重要的一种。正常情况下, MMPs 受到机体精细的平衡调节,在恶性肿瘤中,这种调节受到破坏,引起

组织破坏和肿瘤浸润。MMPs 与肿瘤侵袭与转移的关系首先表现在肿瘤细胞能上调 MMPs 活性<sup>[9-10]</sup>。高转移潜能的 95D 细胞具有较高的 MMP-2 活性,本研究发现 CXCR4/SDF-1 的相互作用影响了肺癌细胞 MMP-2 活性,这种调控至少部分是依赖 CXCR4/SDF-1 的相互作用,因为下调或上调 CXCR4 的表达对细胞 MMP-2 活性有较大影响。

肿瘤细胞到达远处后,最早期最重要的一个步骤是肿瘤细胞黏附至血管内皮细胞,近年来越来越多的证据也表明转移能力与黏附力之间成正相关<sup>[11]</sup>。因此我们以肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附特性为指标,检测发现 CXCR4 表达水平影响了肺癌细胞的黏附能力,表明了 CXCR4/SDF-1 的作用与其黏附特性有关, CXCR4 上调或下调后影响了肺癌细胞黏附血管内皮细胞的能力,从而影响了其侵袭转移能力。有研究表明 CXCR4/SDF-1 通过调控造血干细胞、淋巴细胞表面的某些黏附分子如 VLA-4、VLA-5、LFA-1 等的表达,而介导了它们的归巢和再循环过程<sup>[12-13]</sup>。已经证明介导肿瘤细胞与内皮细胞相互作用的也是黏附分子,本研究中 CXCR4 调控前后细胞的黏附能力是不同的,可能是 SDF-1 与 CXCR4 相互作用调控了这些肿瘤细胞表面某些黏附分子的表达或活性,而 CXCR4 上调或下调后,影响了这些黏附分子的表达量或者活性,使细胞与内皮细胞的黏附能力发生改变下降,从而可能影响了肺癌细胞的侵袭转移能力。对于 SDF-1/CXCR4 的相互作用调控了肺癌细胞表面何种黏附分子的变化及其确切的分子机制仍需进一步深入研究。

综上所述, CXCR4 的差异表达在一定程度上与肺癌细胞的转移潜能有关,调控肺癌细胞表面 CXCR4 的表达,显著影响了肺癌细胞的体外转移能力,因此 CXCR4 的靶向阻断可能在转移性肺癌的治疗中有潜在的应用价值。

### [参考文献]

- [1] Dunussi-Joannopoulos K, Zuberek K, Runyon K, *et al.* Efficacious immunomodulatory activity of the chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1): Local secretion of SDF-1 at the tumor site serves as T-cell chemoattractant and mediates T-cell dependent antitumor responses [J]. *Blood*, 2002, 100: 1551.
- [2] Muller A, Homey B, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410: 50.
- [3] Inoue K, Slaton JW, Eve BY, *et al.* Interleukin 8 expression regulated tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer [J]. *Clin Can Res*, 2000, 6: 2104.
- [4] Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, *et al.* Chemokine induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines [J]. *Int J Cancer*, 1997, 71: 257.
- [5] Aiuti A, Taviani M, Cipponi A, *et al.* Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human

- lympho-hematopoietic progenitors [ J ]. Eur J Immunol, 1999, 29: 1823.
- [ 6 ] Salcedo R, Wasserman K, Young HA, *et al.* Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells; *in vivo* neovascularization induced by stromal-derived factor-1 $\alpha$  [ J ]. Am J Pathol, 1999, 154:1125.
- [ 7 ] Murdoch C. CXCR4: Chemokine receptor extraordinaire [ J ]. Immunol Rev, 2000, 177: 175.
- [ 8 ] Ramesh K, Stephanie A, Joshua M, *et al.* The  $\alpha$ -chemokine, stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ , binds to the transmembrane g-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways [ J ]. J Biol Chem, 1998, 273( 36 ): 23169.
- [ 9 ] 王杰军, 高勇, 许青. 肿瘤转移机制及诊疗进展 [ M ]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002, 53-59.
- [ 10 ] Freije JM, Balbin M, Pendas, *et al.* Matrix metalloproteinases and tumor progression [ J ]. Adv Exp Med Biol, 2003, 532: 91.
- [ 11 ] Wang N, Yu SH, Liener IE, *et al.* Characterization of high and low metastatic clones derived from a methylnanthrene induced murine fibrosarcoma [ J ]. Cancer Res, 1982, 42: 1046.
- [ 12 ] 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<sup>+</sup> cells: Role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice [ J ]. Blood, 2000, 95( 11 ): 3289.
- [ 13 ] Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions [ J ]. Science, 1998, 279: 381.
- [ 收稿日期 ] 2004-09-27 [ 修回日期 ] 2004-12-10  
[ 本文编辑 ] 王莹, 韩丹

## · 研究简报 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2005 )01-0051-01

# 正反义人端粒酶 RNA 组分( hTR )逆转录病毒真核表达载体的构建

王丛笑, 刘吉勇, 赵跃然, 焦玉莲, 马春燕, 杨崇美 ( 山东省立医院, 济南 250021 )

端粒的功能是完成染色体末端的复制,防止染色体免遭融合、重组和降解,其长度的维持是细胞永生及恶性转化的重要分子基础,而调控端粒长度的关键分子则是端粒酶。端粒酶的重新表达在细胞永生及癌变过程中起着重要的作用。端粒酶 RNA( hTR )作为端粒酶的组成部分决定着端粒的重复序列并参与端粒酶的活化。本研究将反义端粒酶 RNA 基因插入到逆转录病毒质粒载体 PLXSN 中,构建真核表达重组质粒 PLXSN-hTR,以期重组质粒表达反义端粒酶 RNA,从复制、转录、及翻译三个水平发挥作用,调控肿瘤细胞的端粒长度和端粒酶的活性,抑制或逆转肿瘤细胞的恶性表型,为研究和探索基因治疗肿瘤奠定基础。

提取人血基因组 DNA 并以其为模板,设计引物,PCR 扩增目的基因端粒酶 RNA( hTR ),得到 490 bp 的目的基因片段后,酚、氯仿抽提法纯化目的基因, T4 连接酶连接 PMD18-T 和目的基因 hTR 得到重组基因 PMD-hTR,转化感受态细胞,增菌,挑选阳性重组克隆,碱裂解法小量提取质粒,限制性内切酶 Hinc II 酶切鉴定、测序。再分别将逆转录病毒真核表达载体 PLXSN、PMD-hTR 转化感受态细胞,增菌,挑选阳性克隆,碱裂解法中量提取质粒,内切酶 Ecor I、Hap I、BamH I、Hap I 双酶切 PLXSN; Ecor I、Hinc II、BamH I、Hinc II 双酶切 PMD-hTR,双酶切产物纯化, T4 连接酶连接,得到正反义重组表达质粒 PLXSN-hTR,分别 PCR 及酶切鉴定。

结果显示,PCR 目的基因 hTR, 1% 琼脂糖电泳,有一约 500 bp 的特异带。重组质粒 PMD-hTR, 1% 琼脂糖电泳,见一约 3 100 bp 特异带,说明目的基因 hTR 已插入 pMD18-T 载体中。经美国 ABI 全自动序列仪测出了 bp 的 DNA 序列结果通过 DNASIS 软件与 GENE BANK 中的序列进行同源性序

列分析,发现此次克隆的 hTR 基因全长为 490 bp,除 5' 端第 218 位核苷酸不一致外( A 应为 T ),余结果与文献报道的肾癌 293 细胞系 hTR cDNA 序列( MEDLINE 95381057 )完全一致,核苷酸的同源性达 99%。其中模板区的 11 个核苷酸( 5'-CUAACCCUAAC-3' )无差错。PLXSN 双酶切电泳结果,于 5 900 bp 处出现单一的条带; PMD-hTR 双酶切结果于 2 600 bp 及 500 bp 左右处见单一条带,说明目的基因已从 PMD18-T 载体上切下。以扩增 hTR 基因的引物及以 PLXSN 质粒的引物 PCR 鉴定反义 PLXSN-hTR,于 500 bp 处均见单一的条带,以扩增 hTR 基因的引物及 PLXSN 质粒的引物 PCR 鉴定正义 PLXSN-hTR,则于 500 bp 及 630 bp 处分别有单一的条带。反义 PLXSN-hTR 的双酶切鉴定分别于 5 900 bp, 500 bp 处见条带,正义 PLXSN-hTR 的单酶切鉴定分别于 2 593 bp, 3 771 bp 处见条带,对照空 PLXSN 质粒于 2 103 bp, 3 771 bp 处见条带。上述结果与理论设计一致,说明目的基因正、反插入逆转录病毒真核表达载体 PLXSN 中。

本研究成功克隆了人血端粒酶 RNA,并将其正、反插入逆转录病毒真核表达载体 PLXSN 中,成功构建正、反真核表达质粒 PLXSN-hTR,为进一步探索肿瘤基因治疗方法奠定基础。

[ 关键词 ] 人端粒酶 RNA 组分; 克隆; 真核表达载体; 反义基因

[ 中图分类号 ] Q555<sup>+</sup>.7 [ 文献标识码 ] D

[ 收稿日期 ] 2004-07-10 [ 修回日期 ] 2004-10-26  
[ 本文编辑 ] 韩丹, 王莹