

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.03.006

· 基础研究 ·

RNA 干扰 CXCR4 和 CXCR7 对子宫内膜癌 HEC-1-A 细胞生物学行为的影响

龙萍, 刘萍萍, 孙凤仪, 马莹莹, 王箴言, 黄煜(青岛大学附属医院 妇科, 山东 青岛 266010)

[摘要] **目的:** 探讨 siRNA(small interference RNA)干扰趋化因子受体 CXCR4 和 CXCR7 对子宫内膜癌 HEC-1-A 细胞生物学行为的影响。**方法:** 以 Lipofectamine™2000 脂质体为载体将 siRNA 转染至人子宫内膜癌 HEC-1-A 细胞株, 以半定量 RT-PCR 和 Western blotting 验证 siRNA 对 CXCR4 和 CXCR7 的干扰效果, 以 CCK-8 法、流式细胞术和 Transwell 法分别检测 CXCR4 和 CXCR7 基因沉默对 HEC-1-A 细胞周期、增殖和侵袭能力的影响;**结果:** HEC-1-A 细胞高表达 CXCR4 和 CXCR7, 合成的 CXCR4-siRNA、CXCR7-siRNA、CXCR4/CXCR7-siRNA 均可分别干扰 HEC-1-A 细胞内 CXCR4、CXCR7、CXCR4/CXCR7 基因或蛋白的表达; CXCR4 和 CXCR7 基因的单独沉默或联合沉默均可导致 HEC-1-A 细胞增殖和侵袭能力的显著下降($P < 0.05$), 同时引发 HEC-1-A 细胞周期出现 S 期阻滞。**结论:** 趋化因子受体 CXCR4 和 CXCR7 在 HEC-1-A 细胞的增殖和侵袭行为中发挥重要作用, CXCR4 和 CXCR7 途径的抑制有望成为子宫内膜癌治疗的新靶点。

[关键词] 子宫内膜癌; CXCR4; CXCR7; 趋化因子; siRNA

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)03-0315-07

Effects of CXCR4 and CXCR7 downregulation by RNA interference on the biological behaviors of endometrial carcinoma HEC-1-A cells

Long Ping, Liu Pingping, Sun Fengyi, Ma Yingying, Wang Zhenyan, Huang Yu(Department of Gynecology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266010, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 downregulation by siRNA on the biological characteristics of endometrial carcinoma cell HEC-1-A. **Methods:** siRNAs targeting CXCR4 and CXCR7 were transfected into HEC-1-A by using Lipofectamine™2000. The downregulation of CXCR4 and CXCR7 was assessed by RT-PCR and immunoblotting. The effects of altered CXCR4 and CXCR7 expression on cell proliferation, invasion and apoptosis were measured by CCK-8, Transwell and FCM respectively. **Results:** Both CXCR4 and CXCR7 were highly expressed in HEC-1-A cell lines. After transfected with specific siRNA, the expression of CXCR4 and CXCR7 gene and protein were downregulated markedly. The proliferation and invasion ability of HEC-1-A cells were significantly decreased compared to those transfected with control siRNA, and the cells were arrested in S phase. **Conclusion:** Knocking down CXCR4 and CXCR7 inhibits the proliferation and invasion ability of human endometrial cancer cell line HEC-1-A, suggesting that they are potential targets for endometrial cancer therapy.

[Keywords] endometrial carcinoma(EC); CXCR4; CXCR7; chemokine; siRNA

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(3): 315-321]

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC), 为女性生殖道常见三大恶性肿瘤之一, 占女性生殖道恶性肿瘤的 20% ~ 30%, 以子宫内膜腺体的腺癌最常见。其发病率高有种族、地区等差异, 以北美、北欧地区发病率最高, 亚洲日本、印度等地区发病率较低^[1]。近 20 年来 EC 的发病率在世界范围有上升趋势^[2-3], 但其具体发病机制仍不十分清楚, 一旦发生浸润、转移和复发, 则预后极差。EC 的发生、发展是一个复杂的多步骤连续演化过程, 机体内多种分

[基金项目] 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(No. BS2009SW002), 山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2013HM012)。Project supported by the Scientific Research Foundation of Shandong Province for Outstanding Young Scientist Award(No. BS2009SW002), and the Natural Science Foundation of Shandong Province(No. ZR2013HM012)

[作者简介] 龙萍(1988 -), 女, 山东省滕州市人, 硕士生, 主要从事妇科肿瘤基础和临床研究。E-mail: longpingfuke@163.com

[通信作者] 黄煜(Huang Yu, corresponding author), E-mail: huangyuqd@126.com

子都参与其中,包括黏附分子、细胞因子及趋化因子等,并影响其预后。研究表明,肿瘤细胞的生物学行为受趋化因子及其受体的严密调控,尤其是趋化因子 CXCL12 及其相应受体 CXCR4 在多种肿瘤发生、发展中的作用受到广泛关注。本实验前期研究^[4]表明,CXCL12/CXCR4 在子宫内膜细胞的增殖和侵袭等生物学行为中发挥调控作用。而作为 CXCL12 的第 2 受体,CXCR7 是否同样参与 EC 细胞的生物学行为值得探讨。本实验使用 RAN 干扰技术,分别或联合沉默 EC 细胞系 HEC-1-A 的 CXCR4 和 CXCR7 基因,进行细胞增殖、侵袭和凋亡等实验分析,探索 CXCR4 和 CXCR7 在 EC 细胞生物学行为中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人 ECHC-1-A 细胞株购自青岛大学附属医院中心实验室。RT-PCR 相关试剂购自日本 TaKaRa 试剂公司,荧光标记的 siRNA (FAM-siRNA) 片段由上海吉玛制药技术有限公司合成,TRIzol 和 Lipofectamine™2000 细胞转染试剂均购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 CXCR7 (RDC-1) 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,鼠抗人 CXCR4 单克隆抗体、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体均购自美国 ABGENT 公司,CCK-8 试剂盒购自日本同仁株式会社化学研究所,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,Hoechst-PI 染色试剂盒 (FCM) 购自德国 Millipore 公司。

1.2 细胞培养及转染

HEC-1-A 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 的温箱中培养。转染前 1 d,用无血清 McCoy's 5A 培养基调整细胞密度为 3×10^5 /ml,以每孔 2 ml 接种于 6 孔板,使能在 24 h 内细胞数汇合达到 70% ~ 85%,于次日按照 Lipofectamine™2000 说明书进行转染。实验分 6 组: CXCR4-siRNA 组 (sense 5-CUG UCC UGC UAU UGC AUU ATT-3, anti-sense 5-UAA UGC AAU AGC AGG ACA GTT-3)、CXCR7-siRNA 组 (sense 5-GGA AGA UCA UCU UCU CCU ATT-3, anti-sense 5-UAG GAG AAG AUG AUC UUC CGG-3)、CXCR4/CXCR7-siRNA 组、阴性对照组 (sense 5-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3, anti-sense 5-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3)、空载对照组 (只加入脂质体) 和正常细胞组。于转染后的不同时间点用胰酶消化收集细胞备用。

1.3 RT-PCR 检测 siRNA 转染后 EC HEC-1-A 细胞

CXCR4 和 CXCR7 mRNA 的表达

转染 48 h 后,用 TRIzol 试剂盒提取各实验组细胞的总 RNA,然后按照试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。目的基因 CXCR4 的上游引物为: 5-GAA CTT CCT ATG CAA GGC AGT CC-3,下游引物为: 5-CCA TGA TGT GCT GAA ACT GGA AC-3,扩增片段长度为 302 bp;目的基因 CXCR7 的上游引物为: 5-AAG AAG ATG GTA CGC CGT GTC GTC TGC ATC CTG-3,下游引物为: 5-CTG CTG TGC TTC TCC TGG TCA CTG GAC GCC GAG-3,扩增片段长度为 281 bp。内参基因 GAPDH 的上游引物为: 5-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3,下游引物为: 5-TCA TGG GTG TGA ACC ATG AGA A-3,扩增片段长度为 146 bp。扩增产物点入 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 μg/ml) 加样孔中,110 V 稳压条件下电泳约 30 min 后在 VILBER LOURMAT 凝胶成像仪照相系统中分析电泳条带灰度值,以各样本 CXCR4/GAPDH 和 CXCR7/GAPDH 的比值表示 mRNA 的相对含量。

1.4 Western blotting 检测 siRNA 转染后 EC HEC-1-A 细胞 CXCR4、CXCR7 蛋白的表达

提取转染后 48 h 各个实验组的蛋白,使用 BCA 法进行蛋白定量。取 50 μg 总蛋白上样于 12 % 的 SDS-PAGE,将蛋白转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔抗人 CXCR7 (1:100)、鼠抗人 CXCR4 (1:500) 和兔抗人 GAPDH (1:10 000) 于 4 °C 孵育过夜。次日使用 TBST 洗脱后,孵育二抗 2 h,再用 TBST 洗涤后,使用 ECL 化学发光法检测目的蛋白条带。用 Quantity One 4.6 软件分析图像,以 GAPDH 为内参,以 CXCR4/GAPDH 和 CXCR7/GAPDH 条带的灰度值之比代表其蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.5 CCK-8 法检测 CXCR4 和 CXCR7 基因下调对 EC HEC-1-A 细胞增殖的影响

取对数生长期 HEC-1-A 细胞用胰酶消化,使用无血清培养液制成单细胞悬液,调整细胞密度为 5×10^4 /ml,以每孔 100 μl 接种到 96 孔培养板中,换完全培养液后放入 5% CO₂、37 °C 培养箱内培养 24 h;后按前述的分组和方法进行转染,每组分别在转染后 24、48、72 和 96 h 检测各组细胞的活性,每组设有 3 个复孔。每孔加入 CCK-8 试剂 10 μl,培养箱内继续反应 4 h,在酶标仪波长 450 nm 处检测光密度 (D) 值,并根据 (D) 值绘制细胞生长曲线。

1.6 Transwell 检测 CXCR4 和 CXCR7 基因下调对 EC HEC-1-A 细胞侵袭的影响

实验前将 Matrigel 基质胶和 FN(纤维黏连蛋白)置于 4 ℃ 冰箱内放置过夜,以让其充分融化,Matrigel 基质胶与无血清 McCoy's 5A 培养基按 1:8 的比例进行稀释,稀释后的 Matrigel 基质胶均匀地包被 Transwell 小室底部,每个小室内约 75 μ l,同时将 FN 均匀涂抹于小室的下室面,于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 3 h。收集转染 24 h 后的各实验组细胞,制成 5×10^4 /ml 的单细胞悬液。取各组单细胞悬液 200 μ l 加入到 Transwell 上室,下室内加入 600 μ l 含 100 ng/ml 的重组人 CXCL12(SDF-1)细胞培养液。将培养板放入 5% CO₂、37 ℃ 培养箱内培养 24 h。以 95% 乙醇浸泡固定 Transwell 上室穿膜细胞 20 min, PBS 液洗涤 2 遍,用 0. 1% 结晶紫染色 5 ~ 8 min 后自来水轻轻冲洗上室面,用化妆棉棒轻轻擦去上室面的残留细胞,将小室置于干净载玻片上于倒置显微镜下观察。侵袭能力的观察:在倒置显微镜下随机选取 5 个视野进行细胞拍照、计数。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测 siRNA 转染后 CXCR4 和 CXCR7 基因下调对 HEC-1-A 细胞周期和凋亡的影响

根据 Hoechst-PI 细胞凋亡染色试剂盒说明书操作。转染 48 h 后收集各实验组细胞,制成单细胞悬液并计数,每个实验组细胞数目约 $(1 \sim 5) \times 10^6$ 个/ml, $800 \times g$ 离心 5 min, 弃去培养液;使用 3 ml PBS 洗涤细胞 1 次,离心弃去 PBS,加入预冷的 70% 的乙醇固定,4 ℃ 过夜。离心弃去乙醇固定液,然后用 3 ml PBS 液重悬细胞, $1\,000 \times g$ 离心 5 min, 弃 PBS 液(正常细胞组、阴性对照组和空载对照组的实验步骤与实验组的实验方法相同),使用 200 μ l Guava Cell Cycle Reagent 染液重悬细胞,室温避光 30 min, 流式细胞术检测细胞周期。使用转染 48 h 细胞, PBS 洗涤 1 次,加入 100 μ l PBS 和 75 μ l Guava Nex-in Reagent(含有 Annexin V-PE 和 7-AAD 的缓冲液)染液染色,室温避光 30 min, 正常细胞组、阴性对照组和空载对照组的实验步骤与实验组的实验方法相同,流式细胞术检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 转染对各实验组 HEC-1-AEC 细胞

CXCR4 和 CXCR7 mRNA 表达的影响

荧光显微镜观察(图 1)显示, siRNA 瞬时转染入 HEC-1-A 细胞 6 h 后,转染效率达 80% ~ 90%; 各实验组转染 48 h 后均达到理想干扰效果。CXCR4-siRNA 组在 siRNA 转染后 HEC-1-AEC 细胞 CXCR4 mRNA 的相对表达量较转染前显著下降[(0.51 ± 0.07) vs (1.17 ± 0.09) , $P = 0.022$],而 CXCR7-siRNA 组转染前后其表达则无显著差别; CXCR4/CXCR7-siRNA 组 siRNA 转染后 CXCR4 mRNA 相对表达量较转染前显著下降[(0.49 ± 0.09) vs (1.19 ± 0.06) , $P = 0.017$],而 CXCR4-siRNA 组转染前后其表达量则无显著差别($P = 0.14$); CXCR7-siRNA 组 siRNA 转染后 CXCR7 mRNA 的相对表达量较转染前显著下降[(0.51 ± 0.06) vs (1.39 ± 0.08) , $P = 0.018$],而 CXCR4/CXCR7-siRNA 组转染前后其表达量则无显著差异。

siRNA 转染前后对空白、空载和阴性对照组中 CXCR4 mRNA 和 CXCR7 mRNA 的相对表达量均无显著影响。结果表明,本实验设计的 CXCR4-siRNA 和 CXCR7-siRNA 均能理想干扰 HEC-1-A 细胞内 CXCR4 和 CXCR7 基因的转录(图 2)。

2.2 siRNA 转染对各实验组 HEC-1-A 细胞 CXCR4 和 CXCR7 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果(图 2 c-d)显示, siRNA 转染后 CXCR4-siRNA 组 CXCR4 蛋白的表达量较转染前显著下降[(0.82 ± 0.04) vs (1.17 ± 0.01) , $P = 0.039$],而 CXCR7-siRNA 组 siRNA 转染前后 CXCR4 的蛋白表达量无显著差异; CXCR4/CXCR7-siRNA 组 CXCR4 蛋白表达量较转染前显著下降[(0.80 ± 0.02) vs (1.15 ± 0.08) , $P = 0.026$],而 CXCR4-siRNA 组 CXCR7 蛋白的表达量在转染前后则无显著差异; CXCR7-siRNA 组 CXCR7 蛋白表达量较转染前显著下降[(0.86 ± 0.02) vs (1.17 ± 0.03) , $P = 0.015$]; CXCR4/CXCR7-siRNA 组 CXCR7 蛋白表达量较转染前也显著下降[(0.80 ± 0.02) vs (1.15 ± 0.08) , $P = 0.026$]。

在 3 组对照组中, siRNA 转染前后其 CXCR4 和 CXCR7 蛋白的表达量均无明显差异。实验结果表明, siRNA 转染后 CXCR4 与 CXCR4/CXCR7 组相比,其 CXCR4 的表达量相似, CXCR7 组与 CXCR4/CXCR7 组相比,其 CXCR7 的表达量也无明显差别。说明本实验中 siRNA 转染 HEC-1-A 细胞致 CXCR4 与 CXCR7 同时被干扰时并不存在交叉影响。以上结果表明,本研究设计的 CXCR4-siRNA 和 CXCR7-siRNA 均能理想干扰 HEC-1-A 细胞内 CXCR4 和

CXCR7 蛋白的转录,同时转染 CXCR4-siRNA 和 CXCR7-siRNA 也能达到同时干扰 CXCR4 和 CXCR7 的效果。

2.3 CXCR4 和 CXCR7 表达下调可显著抑制 HEC-1-A 细胞的增殖能力

CCK-8 法检测结果(图 3)显示,在转染 24 h 后,各实验组和各对照组组间的细胞数量相似($P > 0.05$),但在转染后 48 h, CXCR4-siRNA、CXCR7-siRNA、CXCR4/CXCR7-siRNA 3 组实验组中 HEC-1-A 细胞数量均未出现明显上升,而 3 组对照组的细胞数量则均明显增多,各实验组与对照组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在转染后的 72 和 96 h,实验组的细胞数目表现为逐步上升的趋势,但仍均较同时段的 3 个对照组显著降低。表明 CXCR4 或 CXCR7 的基因沉默自转染后 48 h 起,导致了细胞增殖能力的明显减弱,在转染后 96 h 仍可显著抑制 HEC-1-A 细胞增殖。但 CXCR4 和 CXCR7 干扰组的细胞增殖抑制效应则相似($P > 0.05$),甚至 CXCR4/

CXCR7 联合干扰产生的增殖抑制与两者之一单独干扰产生的抑制效应相似,提示 CXCR4 和 CXCR7 在肿瘤细胞内信号转导途径中可能存在干扰或重叠。

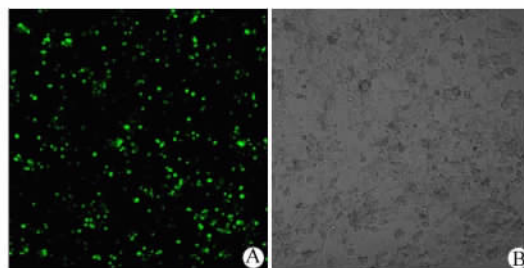


图 1 脂质体介导荧光标记 siRNA 转染 HEC-1-A 细胞的效率($\times 100$)

Fig.1 Transfection efficiency of HEC-1-A cells after transfected with siRNA($\times 100$)

A: Bright field image; B: Fluorescent image

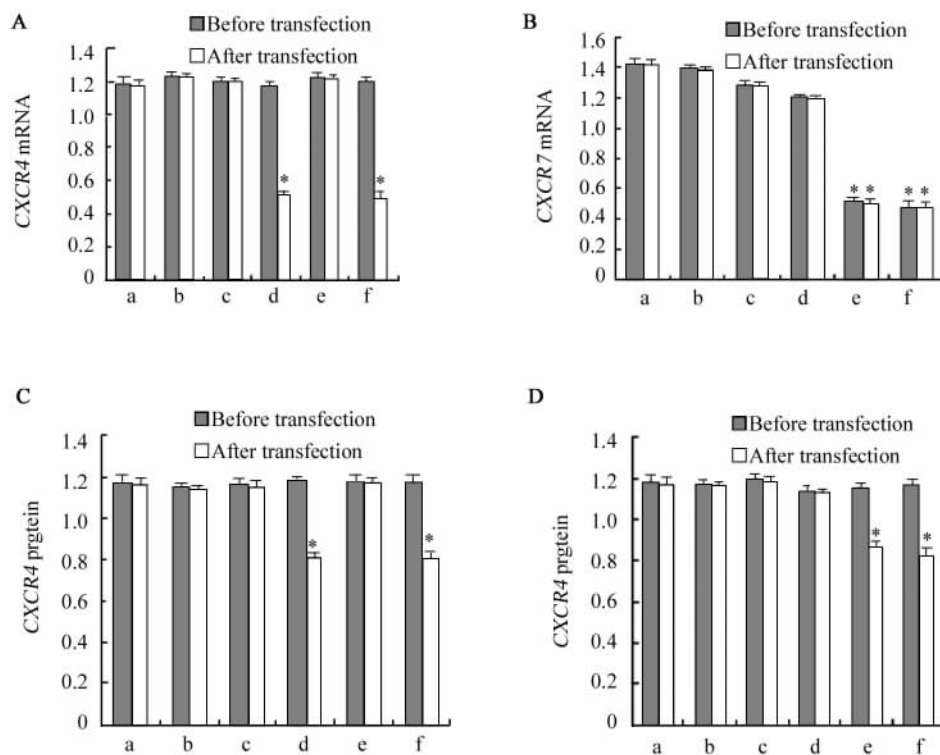


图 2 HEC-1-A 细胞 CXCR4/CXCR7 中 mRNA 和蛋白在 siRNA 干扰前后的表达量

Fig. 2 Expression of CXCR4/CXCR7 mRNA and protein in each group before and after transfected with siRNA

A: The expression of CXCR4 mRNA in each group; B: The expression of CXCR7 mRNA in each group;

C: The expression of CXCR4 protein in each group; D: The expression of CXCR7 protein in each group

a: Blank-control; b: Negative-control; c: Vector-control; d: CXCR4-siRNA; e: CXCR7-siRNA; f: CXCR4/CXCR7-siRNA

* $P < 0.05$ vs control group

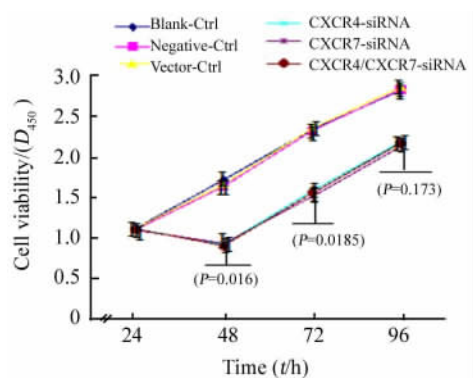


图3 转染 CXCR4/CXCR7-siRNA 对 HEC-1-A 细胞增殖的影响

Fig.3 Proliferation efficiency of each group after transfected with siRNA

* $P < 0.05$ vs control group

2.4 CXCR4 和 CXCR7 基因表达下调对 HEC-1-A

细胞侵袭能力的影响

Transwell 法检测结果(图4)显示,转染 48 h 后 CXCR4-siRNA、CXCR7-siRNA 和 CXCR4/CXCR7-siRNA 组的穿膜细胞数分别为(54.35 ± 6.87)、(55.98 ± 5.37)和(51.85 ± 5.56),三者之间无显著差异($P > 0.05$)。3 个对照组的穿膜细胞数空白组为(104 ± 8.11)个,阴性对照组为(94.60 ± 6.48)个,空载脂质体组为(93.43 ± 6.57)个,三者之间差别也无显著差异($P > 0.05$)。各实验组分别与各对照组相比,其穿膜细胞数则显著减少($P < 0.01$)。结果表明,CXCR4 和/或 CXCR7 被干扰之后细胞侵袭能力均明显下降,提示二者在 EC 细胞的侵袭行为中可能发挥重要作用。同时,研究中发现,CXCR4/CXCR7 联合干扰产生的侵袭抑制与二者之一单独干扰产生的抑制效应相似,提示 CXCR4 和 CXCR7 在肿瘤细胞内信号转导途径中可能存在干扰或重叠。

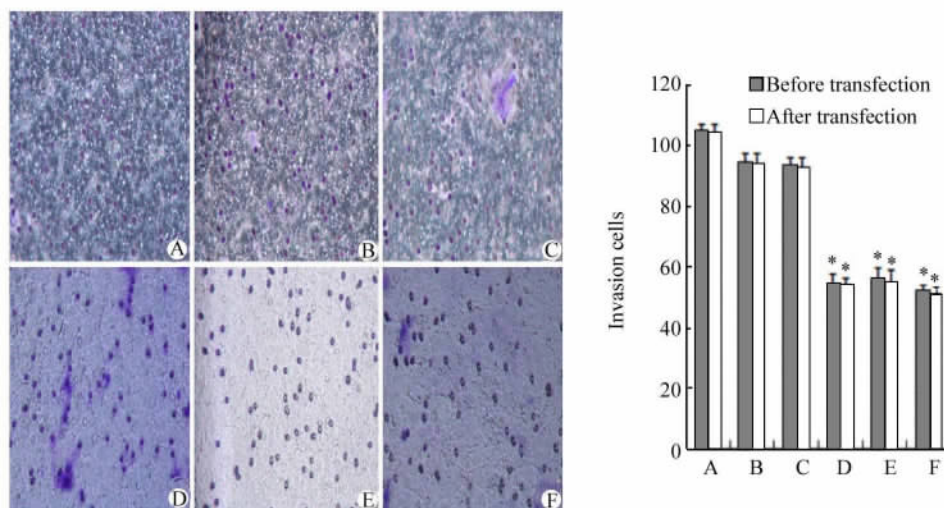


图4 CXCR4/CXCR7 表达下调对细胞侵袭能力的影响(×20)

Fig.4 Invasion efficiency of each group after transfected with siRNA(×20)

A: Blank-control; B: Negative-control; C: Vector-control; D: CXCR4-siRNA; E: CXCR7-siRNA; F: CXCR4/CXCR7-siRNA

* $P < 0.05$ vs control group

2.5 CXCR4 和 CXCR7 基因表达下调可引发 HEC-1-A 细胞周期出现 S 期阻滞

流式细胞术检测结果(图5)显示,将转染 48 h 后各实验组和对照组组间的细胞凋亡率没有显著差异($P > 0.05$),表明 CXCR4 和 CXCR7 不参与 HEC-1-A 细胞的凋亡机制(图5A)。但 CXCR4-siRNA、CXCR7-siRNA 和 CXCR4/CXCR7-siRNA 3 组细胞分别与对照组细胞相比均出现明显的 S 期阻滞($P < 0.05$)(图5B),再次证明了 CXCR4、CXCR7 与细胞

的增殖活性密切相关。

3 讨论

趋化因子是一类能趋化细胞定向移动的小分子分泌蛋白,可以与七次穿膜 G 蛋白偶联,主要调节细胞的迁移与黏附。越来越多的证据表明,趋化因子及受体参与调节肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移等重要作用。趋化因子的受体更利于肿瘤在关键步骤的转移和扩散,包括肿瘤细胞黏附到内皮细胞、血管外浸润、

转移的趋向性、增殖能力,并且激活下游的信号转导通路如: ERK/MAPK, PI-3K/Akt/mTOR, or Jak/STAT 等^[5]。本实验前期研究^[4]证实, CXCR4 和 CXCL12 高表达于 EC 细胞和组织,且 CXCR4 的表达水平与 EC 的细胞分化程度有关。另有研究^[7]已经证明, CXCR7 高表达于子宫内膜癌组织和细胞,且雌激素能上调子宫内膜癌细胞株 Ishikawa(ER α 阳性)中 CXCR7 的表达水平,提示趋化因子受体在子宫内

膜癌细胞中与雌激素相互作用及其参与的作用机制的复杂性。本研究应用小分子 RNA 特异性靶向沉默子宫内膜癌细胞 HEC-1-A 中 CXCR4 和 CXCR7 基因的表达,抑制 HEC-1-A 细胞中 CXCR4 和 CXCR7 的表达后,细胞的增殖和侵袭能力明显下降且细胞周期出现 S 期阻滞率升高,表明趋化因子受体 CXCR4 和 CXCR7 均可能通过促进细胞的增殖和侵袭参与促进子宫内膜癌的生长和迁移。

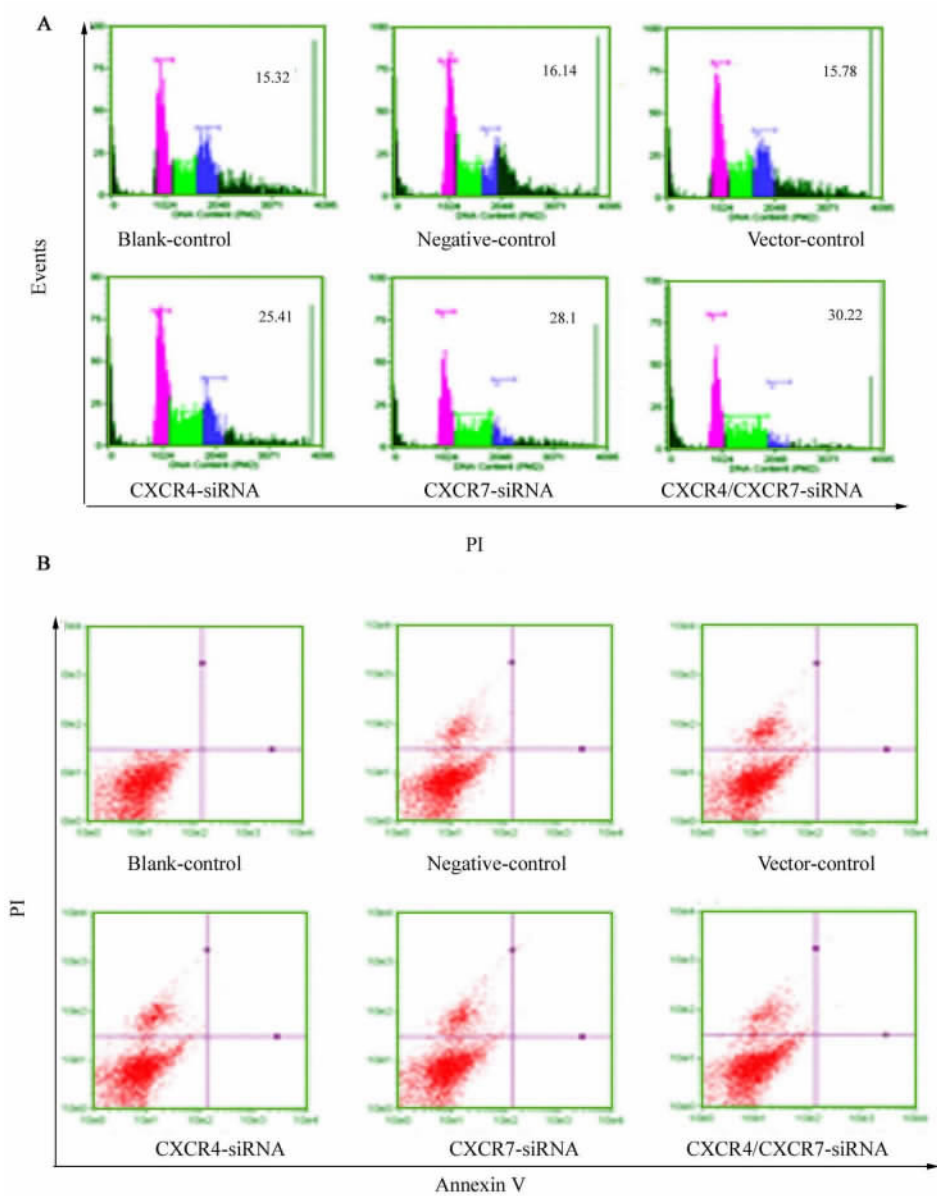


图 5 转染 siRNA 对细胞凋亡(A)和细胞周期(B)的影响

Fig. 5 Cells apoptosis (A) and cells cycling (B) of each group after transfected with siRNA

现有的很多研究^[8-12]已经证明, CXCR7 能够提高肿瘤细胞的存活和抑制细胞的凋亡,增加肿瘤细胞的黏附性,同时促进其侵袭和转移能力。应用 CXCR7 的拮抗剂也可以抑制细胞的增殖、侵袭和迁

移能力,并能够同时抑制 CXCR4 和 CXCR7 的表达。而 CXCR4 的特异性抑制剂 AMD3100 是 CXCR7 的激活剂, CXCR7 的抑制剂可以削弱 CXCR4 的结合能力。更有文章^[11,13-16]表明,两者在乳腺癌和中间

神经元转移的过程中具有相反的功能。本研究也证实虽然单独沉默 CXCR4 或 CXCR7 基因,细胞的增殖和侵袭能力均出现下降,但联合沉默 CXCR4 或 CXCR7 基因,却检测不到增殖和侵袭能力下降的叠加效应。以上结果充分表明,CXCR4 和 CXCR7 在参与 EC 细胞生物学行为调控中的复杂性,二者的细胞膜或细胞内调控通路中可能出现交集,并可能表现为相互制约的关系。本研究后续实验将深入探讨子 EC 细胞中 CXCR4、CXCR7 激活后的下游通路之间的可能关系。

受体 CXCR4 和 CXCR7 共用配体 CXCL12。研究^[17]证实,CXCR4 与 CXCL12 结合后引起细胞骨架重构,使靶细胞与内皮细胞牢固黏附,定向迁移到趋化因子浓度较高的组织和部位。CXCR7 和 CXCR4 与 CXCL12 竞争性结合,且 CXCR7 与 SDF-1 的亲合力是 CXCR4 的 10 倍。CXCR4 是通过引起细胞内钙流的变化激活下游的信号通路,但是 CXCR7 结合 SDF-1 后,并不引起细胞钙流的变化,也不引起细胞迁移,而是将其运送至溶酶体降解,从而调整细胞外的 SDF-1 的浓度,塑造 SDF-1 的浓度梯度,为 CXCR4 阳性细胞的定向运动创造必要的条件^[18],因此,CXCR7 被归入“清道夫受体”之列^[19]。有论文^[20]报道,CXCR7 往往同时表达 EGFR 和 CXCR4,CXCR4 和 CXCR7 通过形成异源二聚体来调节 CXCR4 的活性参与调控肿瘤的生长和迁移,同样,CXCR7 也能与 EGFR 结合形成异源二聚体。然而 CXCR7 和 CXCL12 结合后能够激活相关的信号通路,如 MAPK 和 AKT 信号通路,由此推断,EGFR 与 MAPK 信号通路的激活密切相关。

综上,探讨 CXCL12/CXCR7、CXCL12/CXCR4 两条趋化因子轴在 EC 细胞生物学行为中可能发挥复杂和重要的作用,充分揭示其调控机制将为 EC 的发生机制和治疗策略提供新思路。

[参考文献]

- [1] 胡旭民,胡晓光,张常华. CXCR7 在疾病发生和发展中的作用 [J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(7): 1455-1459.
- [2] Benshushan A. Endometrial adenocarcinoma in young patients: Evaluation and fertility-preserving treatment [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2004, 117(2): 132-137.
- [3] 吴鸣,郎景和. 子宫内膜癌的热点问题 [J]. 癌症进展, 2006, 4(1): 7-12.
- [4] 宋萌萌. 趋化因子 CXCL12/CXCR4 在子宫内膜癌组织中的表达特征及意义 [D]. 青岛:青岛大学, 2011.
- [5] Melchionna R, Di Carlo A, De Mori R, et al. Induction of myogenic differentiation by SDF-1 via CXCR4 and CXCR7 receptors [J]. Muscle Nerve, 2010, 41(6): 828-835.

- [6] 赵静,张佳,宋萌萌,等. 趋化因子 CXCL12 及其受体 CXCR4 在子宫内膜癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(8): 653-656.
- [7] Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F, et al. The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer [J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26(3): 261-268.
- [8] Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development [J]. J Exp Med, 2006, 203(9): 2201-2213.
- [9] Wang J, Shiozawa Y, Wang J, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer [J]. J Biol Chem, 2008, 283(7): 4283-4294.
- [10] Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer [J]. Cancer, 2009, 115(11): 2580-2593.
- [11] 孙炜,蔡绍哲,晏小清,等. CXCR7 对 HeLa 细胞增殖,粘附和侵袭能力的影响 [J]. 中国科学技术大学学报, 2012, 42(4): 311-317.
- [12] 罗乐,孔佩艳,刘红,等. 基质细胞衍生因子-1 受体 CXCR7 在急性白血细胞的表达及意义 [J]. 中国输血杂志, 2012, 25(2): 7.
- [13] Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, et al. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis [J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(6): R128-R128.
- [14] Wang Y, Li G, Stanco A, et al. CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration [J]. Neuron, 2011, 69(1): 61-76.
- [15] Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, et al. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties [J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(5): 1240-1247.
- [16] Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34⁺ cells [J]. J Leu Biol, 2008, 84(4): 1130-1140.
- [17] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes [J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35760-35766.
- [18] Knaut H, Schier AF. Clearing the path for germ cells [J]. Cell, 2008, 132(3): 337-339.
- [19] Naumann U, Cameron E, Pruenster M, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11 [J]. PLoS ONE, 2010, 5(2): e9175.
- [20] Schrevel M, Karim R, Ter Haar NT, et al. CXCR7 expression is associated with disease-free and disease-specific survival in cervical cancer patients [J]. Br J Cancer, 2012, 106(9): 1520-1525.

[收稿日期] 2015 - 01 - 25

[修回日期] 2015 - 04 - 28

[本文编辑] 阮芳铭