

## CXCR4 抑制性多肽对不同乳腺癌细胞株中 CXCR4 表达的影响

章 菊<sup>1</sup>, 杨清玲<sup>1</sup>, 陈昌杰<sup>1</sup>, 刘臣彪<sup>1</sup>, 王 惠<sup>1</sup>, 丁勇兴<sup>2</sup>, 李成华<sup>2</sup>

**[摘要] 目的:**探讨 CXCR4 抑制性多肽(NT21MP)对 HER-2 受体表达不同的乳腺癌 MCF-7 细胞和 SKBR3 细胞 CXCR4 受体表达的影响。**方法:**免疫组化法和 RT-PCR 法检测 MCF-7、SKBR3 细胞中 HER-2 与 CXCR4 的表达;分别用 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NT21MP 处理乳腺癌 SKBR3、MCF-7 细胞 48 h 后,用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测 CXCR4 mRNA 及其蛋白的表达。**结果:**CXCR4 在乳腺癌细胞 SKBR3 和 MCF-7 表达水平相似( $P > 0.05$ ),HER-2 表达水平差异有统计学意义( $P < 0.01$ );NT21MP 显著下调人乳腺癌细胞 SKBR3、MCF-7 细胞中 CXCR4 受体的表达,但存在细胞差异性( $P < 0.01$ )。**结论:**NT21MP 能不同程度地下调乳腺癌细胞 MCF-7 和 SKBR3 CXCR4 受体表达。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;细胞株;抑制性多肽;CXCR4

**[中国图书资料分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A

### Influence of inhibitory polypeptide for CXCR4 on the expression of CXCR4 in the different strains of breast carcinoma cells

ZHANG Ju<sup>1</sup>, YANG Qing-ling<sup>1</sup>, CHEN Chang-jie<sup>1</sup>, LIU Chen-biao<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, DING Yong-xing<sup>2</sup>, LI Chen-hua<sup>2</sup>

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Surgical Oncology, Bengbu Third People's Hospital, Bengbu Anhui 233000, China)

**[Abstract] Objective:** To study the influence of inhibitory polypeptide for CXCR4 (NT21MP) on the expression of CXCR4 of the breast cancer cell strains SKBR3 and MCF-7 with different expression of HER-2 receptor. **Methods:** The expressions of HER-2 and CXCR4 in breast cancer cells MCF-7 and SKBR3 were detected by immunohistochemistry and RT-PCR; the two cells were treated by 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NT21MP for 48 h; the expressions of CXCR4 mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results:** The expression of CXCR4 was similar in both SKBR3 and MCF-7 ( $P > 0.05$ ), but the expression of HER-2 was statistically different ( $P < 0.01$ ); NT21MP could downregulate the expression of CXCR4 in MCF-7 and SKBR3 cells dramatically, but the difference exists in the different cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** NT21MP can downregulate the expressions of CXCR4 in MCF-7 and SKBR3 with different degree.

**[Key words]** breast neoplasms; cell line; inhibitory polypeptide; CXCR4

趋化因子受体 CXCR4 及其配体 SDF-1 $\alpha$  在乳腺癌的转移中起重要作用<sup>[1]</sup>,大量研究表明,乳腺癌细胞高表达 CXCR4 受体,且表达程度与转移率相关<sup>[2]</sup>。因此,下调受体表达,特异性阻断 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 的信号转导通路以抑制乳腺癌转移,已成为目前研究的热点。CXCR4 抑制性多肽(NT21MP)是趋化因子 vMIP-II N 端部分氨基酸序列,可选择性地结合 CXCR4 受体,阻断 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 信号转

导轴的作用,从而抑制癌细胞的趋化和转移。本研究旨在探讨 NT21MP 对 HER-2 表达不同的乳腺癌细胞上 CXCR4 表达的影响,检测多肽的生物学活性,为新药的开发和临床乳腺癌的治疗提供理论依据,并进一步为探讨其作用机制奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 试剂 NT21MP 由上海吉尔生化有限公司合成。乳腺癌细胞株 MCF-7 和 SKBR3 由本中心保藏,将其接种于含 10% 灭活小牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养液中,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中。CXCR4 和 HER-2 蛋白表达的免疫组织化学染色采用 SABC 法,一抗为 CXCR4 (R & D 公司)和 ErbB2 MAb (R & D 公司)。RNA 逆转录试剂盒及 GAPDH 购于 TaKaRa。辣根过氧化物酶标记羊抗兔和大鼠抗小鼠多克隆抗体购于北京中杉金桥。ECL 发光试剂盒购自 Amersham 公司。Western blot 中用的 PVDF 膜购自 Millipore 公司。预染标准分子质量蛋

[收稿日期] 2008-03-04

[基金项目] 安徽省自然科学基金资助项目(070413119);安徽省临床医学应用技术研究计划项目(06B105);安徽省蚌埠市科技计划项目(蚌科 200617 号)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院 临床检验诊断学实验中心,安徽 蚌埠 233030;2. 安徽省蚌埠市第三人民医院 肿瘤外科,233000

[作者简介] 章 菊(1975-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 陈昌杰,博士,研究生导师,副教授,E-mail: bbmccj@sohu.com

白购自 GIBCO/BRL 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测乳腺癌细胞株 MCF-7 和 SKBR3 中 CXCR4 和 HER-2 的表达 分别取  $1 \times 10^5$ /ml 人乳腺癌细胞 MCF-7 和 SKBR3 6 孔板爬片, 每孔加细胞悬液 2 ml, 待 70% ~ 80% 汇合后, 弃培养液, 以 PBS 清洗 3 次。按免疫组化试剂盒操作步骤, 分别与一抗 (CXCR4 抗体和 ErbB2 Mab, 1:100 稀释)、二抗 (生物素标记 IgG, 1:400 稀释) 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的链霉素亲和素复合物 (1:400 稀释) 孵育, DAB 显色, 苏木素复染。用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 RT-PCR 检测不同乳腺癌细胞 CXCR4 和 HER-2 mRNA 表达水平 细胞总 RNA 的提取参照 Trizol 试剂说明书进行。cDNA 合成参照说明书合成。Primer 5.0 设计引物, CXCR4 引物上游 5'-GAA CCC GTT TCC GTG AAG A-3', 下游 5'-CTT GTC CGT CAT GCT TCT CA-3' (产物 149 bp); HER-2 引物上游 5'-TGG TCA AGA GTC CCA ACC ATG-3', 下游 5'-ATC CCA TCG TAA GGT TTG GCC-3' (产物 223 bp)。GAPDH 引物上游 5'-GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC -3', 下游 5'-AGC AGA GGG GGC AGA GAT GAT-3' (产物 375 bp);  $\beta$ -actin 引物上游 5'-GCT CAC CAT GGA TGA TGA TAT C-3', 下游 5'-GCC AGA TTT TCT CCA TGT CGT C -3' (产物 275 bp)。PCR 反应体系的反应体积为 50  $\mu$ l: cDNA 10  $\mu$ l, 引物浓度 50 nmol/L, Taq 酶 1 u。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 63  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取 5  $\mu$ l 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 Bio-Rad 凝胶成像系统扫描并测定标本的灰度值, 计算出每组 CXCR4 与 GAPDH 的比值来判断 CXCR4 mRNA 的相对表达水平及 HER-2 在不同细胞中的表达水平。

1.2.3 免疫组化检测 NT21MP 作用后不同细胞 CXCR4 蛋白的表达 两种乳腺癌细胞实验分组相

同:分别为对照组及 NT21MP 0.5、2、10 和 50  $\mu$ g/ml。取对数生长期的细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个爬片, 48 h 后, 95% 乙醇固定,  $H_2O_2$  消除内源性过氧化物酶活性, 非免疫动物血清封闭, 分别加一抗洗涤后加卵白素标记的二抗孵育, 再洗涤, 加辣根过氧化物酶标记的酶工作液, DAB 显色, 苏木素复染。

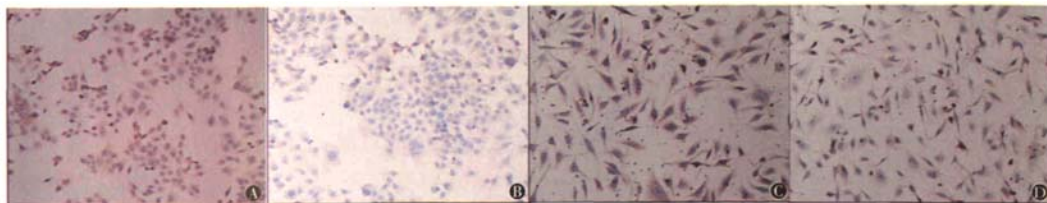
1.2.4 Western blot 检测 NT21MP 作用后不同细胞 CXCR4 蛋白的表达 两种乳腺癌细胞分别分为对照组和 NT21MP 1、10  $\mu$ g/ml 组。收集各组细胞, 用细胞裂解液提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝法测蛋白浓度。取 40  $\mu$ g 蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳后转到 PVDF 膜。室温封闭 1 h, 分别加兔抗人 CXCR4 一抗, 工作浓度 1:200, GAPDH 作为内参照, 于 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜, 用 TBST 洗涤 3 次, 再分别加入 1:2 000 稀释 HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h, 然后用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号, 在 Bio-Rad 凝胶仪上成像并进行密度分析, 以表示 CXCR4 蛋白的相对表达水平。

1.3 免疫组化阳性结果判定标准<sup>[3]</sup> 按 FDA 推荐的 HER-2/neu 蛋白染色强度分级。- : 未着色或 < 10% 的肿瘤细胞膜着色; + : > 10% 的肿瘤细胞膜呈弱着色, 且仅为细胞膜的不完整着色; ++ : > 10% 的肿瘤细胞膜呈中度完全着色; +++ : > 10% 的肿瘤细胞膜呈强的完全着色。其中 - 为阴性表达, + 为阳性低表达, ++ ~ +++ 为阳性高表达。CXCR4 以细胞膜或细胞质呈现棕黄色为阳性细胞, 按背景染色分为低、中和强染色。阳性细胞百分比评估以阳性肿瘤细胞数与总肿瘤细胞数的比率。

1.4 统计学方法 采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 不同乳腺癌细胞株中 CXCR4 和 HER-2 的表达 在 MCF-7 细胞中 CXCR4 呈高表达, HER-2 呈低表达; 在 SKBR3 细胞中 CXCR4 和 HER-2 均呈高表达 (见图 1)。



A: MCF-7 细胞中 CXCR4 的表达; B: MCF-7 细胞中 HER-2 的表达; C: SKBR3 细胞中 CXCR4 的表达; D: SKBR3 细胞中 HER-2 的表达

图 1 乳腺癌 MCF-7 和 SKBR3 细胞中 HER-2 和 CXCR4 的表达 (SABC 法  $\times 100$ )

2.2 乳腺癌细胞株 SKBR3 和 MCF-7 中 HER-2 和 CXCR4 mRNA 的表达水平 经 RT-PCR 扩增, 2%

琼脂糖凝胶电泳成像后,采用目的条带和 GAPDH 的灰度比值表示目的基因的表达水平(见图 2),两细胞株 CXCR4 mRNA 的基因表达水平相似( $P > 0.05$ ),但 SKBR3 细胞的表达水平显著高于 MCF-7 细胞( $P < 0.01$ )(见表 1)。

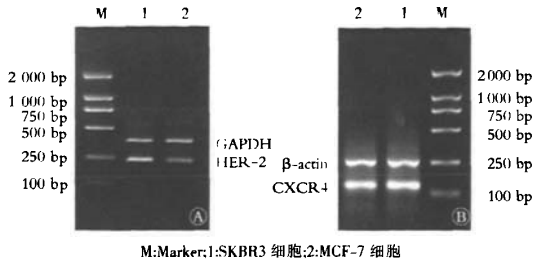
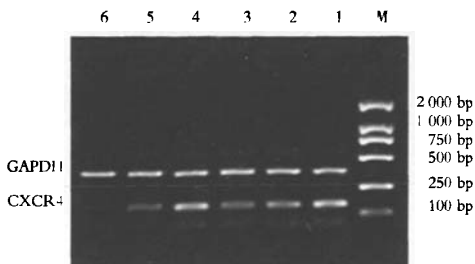


图 2 A 和 B 分别为 HER-2 和 CXCR4 mRNA 在乳腺癌 MCF-7 和 SKBR3 中的表达

表 1 两细胞株 CXCR4 和 HER-2 mRNA 与 GAPDH mRNA 表达的密度比值 (%) 比较 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

细胞株	CXCR4	HER-2
SKBR3	101 ± 15.7	129 ± 14.6
MCF-7	92 ± 5.7	85 ± 5.3
<i>t</i>	0.93	4.91
<i>P</i>	>0.05	<0.01

2.3 NT21MP 作用后 SKBR3 和 MCF-7 细胞中 CXCR4 mRNA 的表达 各组经 RT-PCR 扩增,2% 琼脂糖凝胶电泳成像后,采用目的条带和 GAPDH 的灰度比值表示目的基因的表达水平(见图 3),各组细胞在 149 bp 处均可见 CXCR4 mRNA 的表达,结果同蛋白检测一致。NT21MP 下调 MCF-7 细胞的 CXCR4 mRNA 的作用较 SKBR3 明显( $P < 0.01$ )(见表 2)。



M:Marker; 1: 对照组; 2:NT21 MP 1 μg/ml; 3:NT21 MP 10 μg/ml; 4: 对照组; 5:NT21 MP 1 μg/ml; 6:NT21 MP 10 μg/ml; 其中 1-3 为 SKBR3 细胞, 4-6 为 MCF-7 细胞

图 3 不同浓度 NT21 MP 作用 SKBR3 和 MCF-7 细胞后 CXCR4 mRNA 的表达

2.4 NT21 MP 作用 SKBR3 和 MCF-7 细胞后 CXCR4 蛋白表达 结果显示 NT21 MP 下调 MCF-7

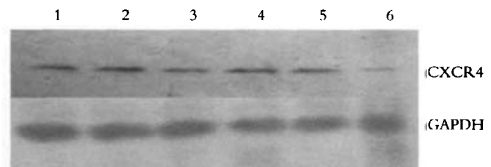
的 CXCR4 的蛋白表达较 SKBR3 细胞显著 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ) (见表 3、图 4)。

表 2 SKBR3 和 MCF-7 细胞 CXCR4 mRNA 表达与 GAPDH 的密度比值 (%) ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

细胞株	对照组	NT21MP	NT21MP
		1 μg/ml	10 μg/ml
SKBR3	96.17 ± 8.25	81.08 ± 6.90	60.41 ± 6.91
MCF-7	98.33 ± 13.60	43.67 ± 12.50	13.66 ± 3.80
<i>t</i>	0.24	4.54	10.27
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01

表 3 SKBR3 和 MCF-7 细胞 CXCR4 蛋白表达与 GAPDH 的密度比值 (%) 比较 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

细胞株	对照组	NT21MP	NT21MP
		1 μg/ml	10 μg/ml
SKBR3	47.06 ± 1.91	46.23 ± 2.82	33.70 ± 1.41
MCF-7	48.43 ± 1.92	39.57 ± 1.45	10.80 ± 1.18
<i>t</i>	0.88	3.64	21.57
<i>P</i>	>0.05	<0.05	<0.01



1: 对照组; 2:NT21 MP 1 μg/ml; 3:NT21 MP 10 μg/ml; 4: 对照组; 5: NT21 MP 1 μg/ml; 6:NT21 MP 10 μg/ml; 其中 1-3 为 SKBR3 细胞, 4-6 为 MCF-7 细胞  
图 4 不同浓度 NT21 MP 作用 SKBR3 和 MCF-7 细胞后 CXCR4 蛋白的表达

### 3 讨论

乳腺癌是威胁妇女健康的恶性肿瘤,而转移是大多数癌症患者死亡的主要原因,乳腺癌的转移过程是个复杂的病理生理过程,包括高度的器官选择性以及癌细胞和宿主的相互作用,但具体的分子机制仍不是完全清楚。大量研究表明,许多恶性肿瘤组织中均表达趋化因子受体 CXCR4,而且高表达者与转移有很大关系<sup>[4]</sup>。恶性乳腺癌细胞表达趋化因子受体 CXCR4,乳腺癌特异性转移器官(如肺、肝、骨等)分泌大量 SDF-1α<sup>[3]</sup>,SDF-1α/CXCR4 相互作用导致乳腺癌细胞迁移至这些靶器官,增殖和诱导血管形成,形成癌症转移灶<sup>[5,6]</sup>。因此 SDF-1α/CXCR4 轴的相互作用是乳腺癌转移的分子基础,在乳腺癌转移中发挥着关键作用。

通过阻断 SDF-1α/CXCR4 相互作用来治疗转移性乳腺癌患者已成为非常新型的治疗理念。通过 MRI 和核欧沃蒙斯效应研究发现,NT21MP、vMIP-II

的 N 末端主要结合 CXCR4<sup>[7]</sup>, 我们通过固相合成技术合成 NT21MP, 可选择性地阻断 CXCR4 信号传导而抑制其在乳腺癌转移过程中的作用<sup>[8]</sup>。为进一步探讨 NT21MP 生物学活性的潜能及其可能存在的信号机制, 本研究采用了两种乳腺癌细胞株。通过实验检测发现, MCF-7 细胞高表达 CXCR4, 而低表达另一个乳腺癌转移的生物学指标—HER-2 (c-erbB-2)。而 SKBR3 细胞两者均高表达。HER-2 是表皮生长因子受体家族成员, 20% ~ 30% 的乳腺癌中可以检测到该基因的扩增和过表达, 过表达者极易发生特异性器官转移, 但机制了解甚少。在高侵袭性的乳腺癌中, HER-2 和 CXCR4 常同时呈现出过表达, 存在相关性 ( $P < 0.05$ )<sup>[9]</sup>。本实验发现 NT21MP 能显著下调 MCF-7 和 SKBR-3 细胞中 CXCR4 受体蛋白和 mRNA 的表达水平, 但存在细胞差异, 对 MCF-7 的作用更显著。可能是由于细胞株 SKBR3 较 MCF-7 高表达 HER-2, HER-2 能提高 CXCR4 转录活性, 抑制由 SDF-1 诱导的 CXCR4 蛋白降解有关<sup>[8]</sup>。前期研究发现 NT21MP 能明显抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的迁移<sup>[9]</sup>。因此证明其对乳腺癌细胞的转移抑制可能不是通过对细胞的毒性作用, 而是抑制其信号转导通路, 从而抑制了乳腺癌细胞表面受体表达及其向高表达配体的特异性器官转移, 因此有望为防止乳腺癌患者转移和治疗赢得时间。

我们发现 HER-2 在诱导的乳腺癌特定器官转移中, CXCR4 是必须的, HER-2 特异性抑制剂 Herceptin 在 HER-2 和 CXCR4 均高表达的 SKBR3 细胞中, 对 HER-2 和 CXCR4 表达的抑制存在相关性 ( $P < 0.005$ )<sup>[10]</sup>。Li 等<sup>[11]</sup>解释 HER-2 通过刺激 CXCR4 的翻译和减少 CXCR4 的降解而提高 CXCR4 的表达。因此, 联合抑制 HER-2 和 CXCR4 这两种

乳腺癌转移生物学指标可能更为有效。

#### [参 考 文 献]

- [1] Altundag K, Morandi P, Altundag O, et al. Possible role of CXCR4-mediated chemotaxis in breast cancer patients with central nervous system metastases [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 89(3):317.
- [2] 丁勇兴, 李成华, 杨清玲, 等. CXCR4 表达水平对判断乳腺癌淋巴结转移潜能的意义 [J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(2): 76-78.
- [3] Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer migration [J]. *Nature*, 2001, 410(6824):50-56.
- [4] Brand S, Dambacher J, Beigel F, et al. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 310(1):117-130.
- [5] Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell derived factor21/CXCR4 pathway in prostate cancer migration to bone [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6):1832-1837.
- [6] Zeelenberg IS, Ruuls-van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13):3833-3839.
- [7] Nakano K, Isegawa Y, Zou P, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-encoded vMIP-1 and vMIP-2 induce signal transduction and chemotaxis in monocytic cells [J]. *Arch Virol*, 2003, 148(5):871-890.
- [8] 杨清玲, 李成华, 丁勇兴, 等. CXCR4 抑制性多肽对乳腺癌转移作用的研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2008, 20(2):89-92.
- [9] 杨清玲, 丁勇兴, 李成华, 等. CXCR4 表达上调与 HER-2 介导乳腺癌转移的相关性研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2008, 20(3):136-138.
- [10] McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2 [J]. *Drugs*, 2002, 62(1):209-243.
- [11] Li YM, Pan Y, Wei YK, et al. Up regulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor migration [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(5):459-469.

## 郑 重 声 明

近日接到作者反映, 有某些公司及社会团体盗用本刊编辑部名义进行组稿、征稿, 或借以推荐到我刊发表稿件为名收取作者高额版面费, 造成投稿人疑惑, 严重损害了本刊声誉。为此, 本刊郑重声明:

本刊一切编辑活动均在《蚌埠医学院学报》编辑委员会指导下开展, 并严格执行《期刊管理暂行规定》和《高等学校学报管理办法》的有关审稿、编辑、校对等出版规定; 本刊编辑部没有外设任何分支机构, 也没有委托任何其他组织及个人为本刊组织稿件, 如有此活动均属非法行为, 本刊保留追究其法律责任的权利; 本刊仅接受作者自由投稿。因作者不慎与他人私自协议造成的损失, 本刊不负连带责任。