

Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒对 SW480 结肠癌细胞株生长与侵袭的影响

王天宝, 林维浩, 石汉平, 韩方海, 董文广
(中山大学附属第一医院外科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒对结肠癌细胞株 SW480 生长、迁移与侵袭的抑制作用。【方法】应用我们已构建的 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒转染 SW480 细胞,检测 CXCR4 RNA 干扰对 CXCR4 RNA 和蛋白的抑制作用,MTS 法检测能否抑制细胞增殖,Transwell 小室评价对细胞迁移和侵袭的影响。【结果】重组 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒转染 SW480 细胞可见绿色荧光。SW480、阴性对照组及 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组 CXCR4 RNA 表达水平分别为 0.54 ± 0.06 、 1.00 ± 0.03 和 0.11 ± 0.04 ($P = 0.001$); CXCR4 蛋白相对表达量分别为 0.60 ± 0.03 、 0.72 ± 0.03 和 0.18 ± 0.02 ($P < 0.001$); MTS OD 值分别为 1.38 ± 0.04 ($P = 0.005$)、 1.28 ± 0.05 ($P = 0.026$) 和 0.92 ± 0.06 ; 迁移实验细胞数分别为 32.0 ± 6.8 、 32.6 ± 1.7 和 0.75 ± 0.71 ($P < 0.001$); 侵袭实验细胞数分别为 29.1 ± 10.3 、 30.4 ± 6.1 和 0.63 ± 0.74 ($P < 0.001$)。【结论】重组 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒可高效抑制 SW480 细胞 CXCR4 RNA 和蛋白表达水平,遏制细胞增殖,降低肿瘤细胞迁移和侵袭能力。

关键词: CXCR4; RNA 干扰; 慢病毒; SW480; 侵袭

中图分类号: R735.3 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)06-0744-05

Influence of Lenti-CXCR4-siRNA Lentivirus to Growth and Invasion of SW480 Colorectal Cell

WANG Tian-bao, LIN Wei-hao, SHI Han-ping, HAN Fang-hai, DONG Wen-guang
(Department of Surgery, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate if lenti-CXCR4-siRNA lentivirus which mediates CXCR4 RNA interference (RNAi) could inhibit the growth and invasive capacity of SW480 colorectal cancer cell. 【Methods】Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus transfected SW480. RT-PCR and Western blot was performed to measure the expression of CXCR4 RNA and protein, respectively. The cell proliferation of SW480 was calculated with MTS. Transwell chamber was used to estimate the inhibition effect for growth and invasion of SW480. 【Results】SW480 transfected lenti-CXCR4-siRNA lentivirus presented green fluorescence. CXCR4 RNA expression levels in SW480, negative control group (NC), and lenti-CXCR4-siRNA group were 0.54 ± 0.06 , 1.00 ± 0.03 , and 0.11 ± 0.04 ($P < 0.001$); CXCR4 protein were 0.60 ± 0.03 , 0.72 ± 0.03 , and 0.18 ± 0.02 ($P < 0.001$); OD values were 1.38 ± 0.04 ($P = 0.005$), 1.28 ± 0.05 ($P = 0.026$), and 0.92 ± 0.06 ; SW480 cell number in migration test were 32.0 ± 6.8 , 32.6 ± 1.7 , and 0.75 ± 0.71 ($P < 0.001$); SW480 cell number in invasion test were 29.1 ± 10.3 , 30.4 ± 6.1 , and 0.63 ± 0.74 ($P < 0.001$). 【Conclusion】Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus could effectively inhibit the expression level of CXCR4 RNA and protein, reduce cell proliferation and invasion capacity of SW480 cell.

Key words: CXCR4; RNA interference; lentivirus; SW480 cell; invasion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 744-748]

基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1)属于趋化因子亚家族, CXCR4 是

其唯一的肿瘤细胞表面受体。SDF-1/CXCR4 在结肠直肠癌组织中高度表达,表达的强度与肿瘤分期、

收稿日期: 2012-05-23

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2010B060900100, 2012B010300011)

作者简介: * 通信作者: 王天宝, 副教授, 研究方向: 胃肠道肿瘤的诊治, E-mail: wangtianbao1@163.com

淋巴及远处转移相关,CXCR4调节结直肠癌细胞的粘附与趋化,增强细胞运动和肿瘤转移,利于结直肠癌肝脏微转移灶中肿瘤细胞增殖^[1]。CXCR4和血管内皮生长因子均阳性的肿瘤细胞更易发生淋巴结和远处转移^[2]。目前认为SDF-1/CXCR4系统促进结直肠癌淋巴及远处转移,理论推测阻断该通路必将阻止局部及远处转移。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是目前最有效的基因敲除策略,应用CXCR4 RNA干扰有可能阻断该系统功能,从而达到阻止结直肠癌局部及远处转移之目的。慢病毒以其可感染分裂期和非分裂期细胞以及可在细胞内长期稳定表达的优势而成为RNA干扰理想的载体^[4-5]。本研究利用课题组前期构建的介导CXCR4 RNA干扰的重组慢病毒Lenti-CXCR4-siRNA,转染结肠癌细胞株SW480,探讨其对细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与仪器

RPMI-1640培养基、胎牛血清、青链霉素、Polybrene及PBS磷酸钾缓冲液(Hyclone),RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒及Western blot试剂盒(武汉博士德),matrigel胶(BD),SW480人结肠癌细胞,Lenti-CXCR4-siRNA慢病毒,CellTiter96AQ单溶液细胞增殖检测试剂盒(Promega)。低速离心机(中佳),倒置光学显微镜(Olympus),细胞恒温培养箱(Thermo scientific),倒置荧光显微镜(Leica),Transwell细胞培养板(BD)。酶标仪(Thermo Fisher Scientific)。

1.2 慢病毒感染建立表达CXCR4 shRNA细胞株

1.2.1 SW480人结肠癌细胞复苏并培养 实验前一天接种 $3 \sim 5 \times 10^3$ 个细胞于96孔培养板中,培养基体积为90 μL ,设20个孔。

1.2.2 Lenti-CXCR4-siRNA慢病毒转染SW480细胞 准备2个无菌的1.5 mL Ep管,在每个管中加入45 μL 的常规培养基,吸取5 μL 的 1×10^8 TU/mL的Lenti-CXCR4-siRNA慢病毒加入到第一个管中,轻柔混匀,勿使产生泡沫。同样从第一管中吸取5 μL 的病毒到第二个管中,混匀。于是第一个管中的病毒滴度为 1×10^7 TU/mL,而第二个管中的滴度为 1×10^6 TU/mL。另取一个Ep

管,取2 μL Polybrene稀释到400 μL 。设置添加Polybrene的孔,加入稀释后的Polybrene 10 μL ,由于最后的体积为100 μL ,所以Polybrene相当于被稀释了2000倍,最后的浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。先将10 μL 三个不同梯度的病毒加到各组的相应孔中。加入的病毒量分别为 1×10^6 TU, 1×10^5 TU, 1×10^4 TU,此时细胞的数约为 1×10^4 个,所以三个孔的MOI分别为100、10和1。在设定需要添加Polybrene的孔中加入10 μL 的Polybrene稀释液。在水平方向轻轻拍打培养板,使培养基和病毒等试剂充分混匀,然后把细胞板放回培养箱孵育。培养8~12 h以后观察细胞状态,弃去细胞上清,更换为新鲜培养基。感染3~4 d后,观察荧光表达情况。

1.2.3 筛选克隆 第1天把SW480细胞铺于6孔板,用无双抗培养基培养过夜;第2天细胞融合度为50%~60%时,开始感染病毒;第3天后荧光显微镜观察,把有荧光细胞群用标记笔在细胞培养板上圈出;用胰酶消化画圈的细胞群,每一团荧光细胞群收集于24孔板的一个孔培养;再用荧光显微镜观察,挑选出荧光细胞群正常传代。

1.2.4 Q-PCR检测 总RNA抽提、纯度和完整性检测、逆转录参见试剂盒说明书,定量PCR检测序列片段内参18SrRNA片段112 bp,目的片段CXCR4 159 bp,引物设计如下: CXCR4-F1: 5' AT CAGTCTGGACCGCTACCT, CXCR4-R1: 5' GTCATC TGCCTCACTGACGT; 18srRNA-F: 5' CCTGGATACC GCAGCTAGGA, 18srRNA-R: 5' GCGGCCAATAC GAATGCCCC。反应体系: cDNA 5.0 μL , 上、下游引物各5.0 μL , 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , dH₂O 4 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 32 s, 40个循环,每个样重复3次。

1.2.5 Western Blot 总蛋白抽提、蛋白样品初步定量、SDS-PAGE电泳及蛋白质转移参照试剂盒说明书。取出杂交膜, TBST漂洗5 min, 3次。脱脂奶粉溶液室温封闭, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST洗膜5 min, 3次。滴加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST洗膜5 min, 3次。滴加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。TBST洗膜5 min, 3次。蒸馏水漂洗膜2 min, 弃去液体。共洗3次。将杂交膜置于一透明塑料板上, 注意不要让膜干燥。用一干净移液器将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面, 并使反应持续5 min。用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液, 放至暗盒、显影。

1.3 细胞活力检测(MTS)

分为 SW480 组、阳性对照组(negative control group, NC)及 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组,取转染后细胞进行实验。胰酶消化细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,分到 96 孔板,每孔 100 μ L,即每孔细胞为 1×10^4 个。细胞贴壁完全,收集各时间点细胞进行检测。收集各个时间点的细胞 24 h、48 h、72 h 及 96 h 加入 MTS 溶液细胞增殖检测试剂,比例为 1/10。即 100 μ L 培养液加入 10 μ L 检测液。在孵育 4 h 后,酶标仪读取 490 nm 的光密度(optical density, OD)。

1.4 Transwell 检测 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒对细胞迁移能力影响

同 1.3 所述分为 3 组,细胞转染 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒第 2 天,计数 1×10^5 个细胞,用 100 μ L 无血清 1640 培养基重悬,加入 Transwell 小室上室,在下室加入 600 μ L 完全培养基。37 $^{\circ}$ C, CO₂ 孵育,在 24 h 及 48 h 时分别取出小室,用棉签擦去上室的细胞,多聚甲醛溶液固定 15 min, PBS 洗涤一次,结晶紫染色 10 min, PBS 洗涤一次,检测细胞是否穿过小孔,如有穿过终止其他实验组,并拍照统计。

1.5 Transwell 检测 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒对细胞侵袭能力影响

同 1.3 所述分为 3 组,4 $^{\circ}$ C 溶解 Matrigel 过夜,用预冷的无血清培养基以 1:3 的体积比稀释 Matrigel,取 40 μ L 加入预冷的 Transwell 小室中,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 使 Matrigel 凝固。吸走小室中多余的液体,并在上室、下室分别加入 100 μ L 和 600 μ L 无血清培养基,37 $^{\circ}$ C 平衡过夜。以下操作同 1.4 所述。

1.6 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计软件处理数据,采用 *t* 检验比较组间差别, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SW480 细胞感染 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒

在荧光显微镜下大部分细胞可见绿色荧光,证实转染效果理想(图 1)。

2.2 基因检测

SW480、NC 及 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒

组样品 CXCR4 RNA 表达水平分别为 0.54 ± 0.06 、 1.00 ± 0.03 及 0.11 ± 0.04 , CXCR4 RNAi 组 CXCR4 RNA 水平最低,和 SW480 及 NC 组差别均具有显著意义($P < 0.001$)。

2.3 CXCR4 蛋白检测

SW480、NC 及 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组实验样品蛋白浓度分别为 4.61、3.58 和 3.08 μ g/ μ L。Western Blot 电泳结果显示 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组 CXCR4 蛋白浓度最低,相对表达量 SW480、NC 及 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组分别为 0.60 ± 0.03 、 0.72 ± 0.03 和 0.18 ± 0.02 ($P < 0.001$; 图 2)。

2.4 MTS 结果

感染后第 4 天, Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组 OD 值为 0.92 ± 0.06 , 显著低于 SW480 组 (1.38 ± 0.04 , $P = 0.005$) 和 NC 组 (1.28 ± 0.05 , $P = 0.026$), 证实 CXCR4 RNAi 显著抑制 SW480 细胞生长(图 3)。

2.5 细胞迁移实验

Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组细胞迁移数仅为 0.75 ± 0.71 , 显著低于 SW480 组 (32.0 ± 6.8 , $P < 0.001$) 与 NC 组 (32.6 ± 1.7 , $P < 0.001$), 证实 CXCR4 RNAi 抑制 SW480 细胞迁移效果明显(图 4)。

2.6 细胞侵袭实验

SW480、NC 和 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组细胞迁移细胞数分别为 29.1 ± 10.3 、 30.4 ± 6.1 和 0.63 ± 0.74 , Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组明显低于 SW480 和 NC 组 ($P = 0.001$), 证实 CXCR4 RNAi 显著降低 SW480 细胞侵袭能力(图 5)。

3 讨 论

RNAi 也称为转录后基因沉默,具有强大的阻断靶基因表达的特性,是目前基因治疗的重要方法。课题组前期成功构建介导 CXCR4RNA 干扰的重组慢病毒 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒,SW480 细胞感染该病后,大部分细胞出现绿色荧光,证实转染的高效性。在三组样品中, Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组 CXCR4 RNA 表达最低,较 SW480 细胞组下降 79.6%, 与 NC 组相比下降 89%; CXCR4 蛋白则分别下降 70% 和 75%, 证实 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒可有效抑制 CXCR4 基因与蛋白的表达。陈东平等采用介导 CXCR4 RNAi 的

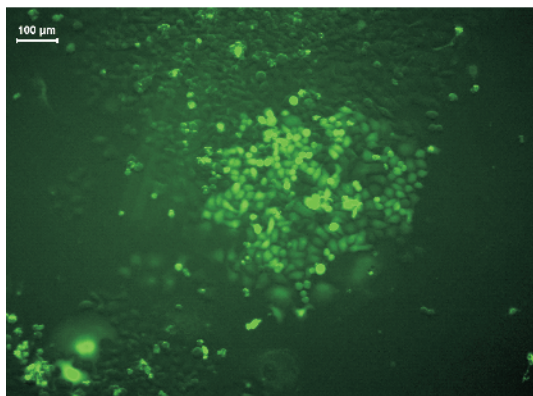


图 1 SW480 细胞感染 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒 ($\times 100$)

Fig.1 SW480 cell transfected with Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus ($\times 100$)

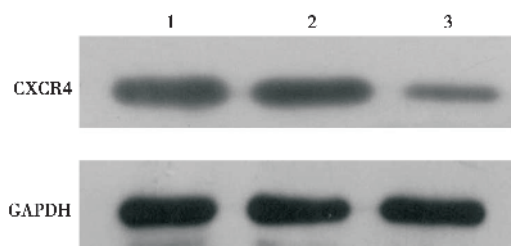


图 2 CXCR4 蛋白检测

Fig.2 Western blot analysis of CXCR4

1: SW480 group; 2: NC group; 3: Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus group

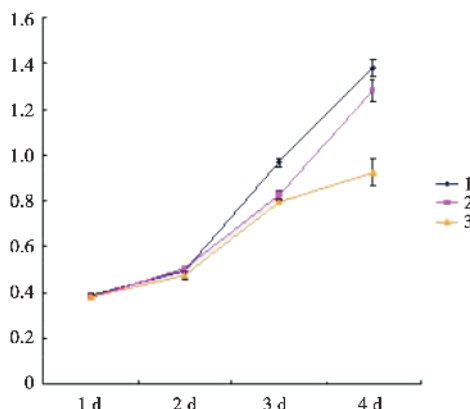


图 3 三个实验组的 MTS 检测

Fig.3 MTS test for 3 groups

1: SW480 group; 2: NC group; 3: Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus group.

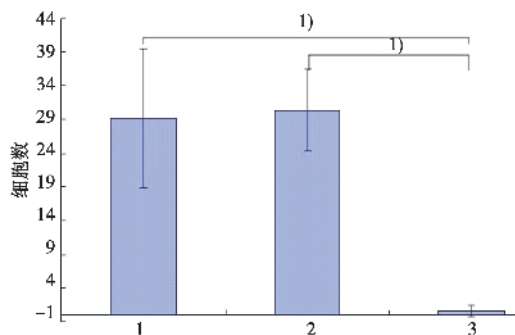


图 5 SW480 细胞侵袭实验

Fig.5 SW480 cell invasion test

1: SW480 group; 2: NC group; 3: Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus group; 1) $P < 0.0001$

慢病毒转染骨髓干细胞, CXCR4 mRNA 水平下降 95.6%, 亦证实慢病毒是介导 CXCR4 RNAi 的理想载体^[3]。

肿瘤细胞增殖与凋亡失衡是恶性肿瘤生长的基本特性。本研究 MTS 检测显示 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒组细胞增殖最低, 较 SW480 和 NC 组下降率分别为 33.3% 和 28.1%, 差别具有显著意义, 提示 CXCR4 参与 SW480 肿瘤细胞增殖, 抑制

其表达可遏制细胞生长。Chungkang C 报道骨髓增生异常综合征高表达 CXCR4 者细胞凋亡水平下降^[5]。De Falco 等证实 CXCR4 RNAi 可以阻断未分化甲状腺癌细胞的增殖分化^[6]。Kim JM 等研究发现 CXCR4 拮抗剂可明显抑制肿瘤细胞增殖和促

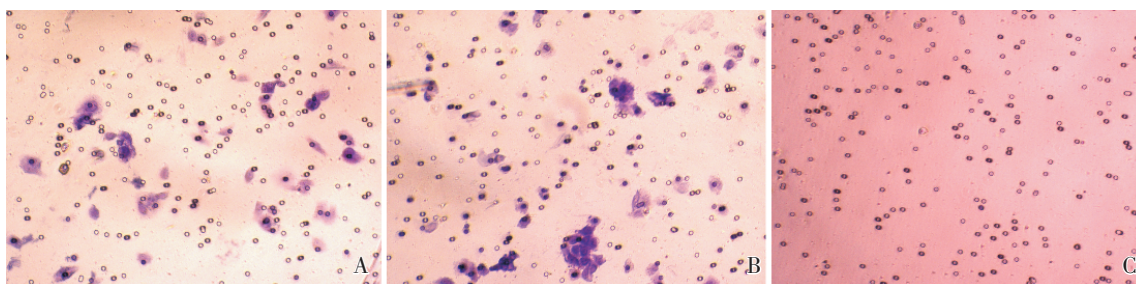


图 4 SW480 细胞迁移实验

Fig.4 SW480 cell migration test

A: SW480 group; B: NC group; C: Lenti-CXCR4-siRNA lentivirus group. $\times 100$

进细胞凋亡^[7]。因此,Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒可抑制肿瘤细胞增殖,从而遏制肿瘤生长。

文献报到 RNAi 遏制 CXCR4 表达可抑制乳腺癌细胞株浸润与转移,小鼠乳腺癌瘤株生长缓慢,未发现转移灶,提示 CXCR4 RNAi 是转移性乳腺癌的治疗之一^[8-9]。我们资料显示 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒显著降低 SW480 细胞的迁移能力,迁移细胞数较 SW480 组和 NC 组均下降约 97.7%,显示 SW480 细胞感染 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒后细胞运动能力极度下降;在进一步分析 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒对 SW480 细胞的侵袭特性的影响时,发现侵袭能力分别下降 97.8%和 98.0%,提示 Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒介导的 CXCR4 RNAi 可有效抑制 SW480 细胞的运动迁移和向深层浸润的潜能。Rubie 资料显示 SW480 细胞过表达 CXCR4,采用 RNAi 技术可降低该细胞的迁移特性^[10]。Heckmann 报道 CXCR4 过表达促进 SW480 细胞基于 SDF-1 浓度梯度而出现趋化和迁移,以慢病毒为载体介导 CXCR4 RNAi,敲除 CXCR4 基因,显著降低 SW480 细胞株的迁移特性^[11]。汪道峰等报道慢病毒介导 CXCR4 RNAi 可有效降低食管癌细胞 CXCR4 RNA 的表达水平,阻断 SDF-1/CXCR4 生物学通路,抑制癌细胞的转移能力^[4]。

总之,Lenti-CXCR4-siRNA 慢病毒介导的 CXCR4 RNAi 可抑制恶性肿瘤细胞 SW480 的增殖、运动和侵袭转移,有望成为治疗结直肠癌局部和远处转移的有效方法之一。

参考文献:

- [1] 戴伟刚,董文广,王天宝. SDF-1/CXCR4 轴在结直肠癌中的研究进展[J]. 中华普通外科文献,2009,3(6): 520-523.
- [2] Ottaiano A, di Palma A, Napolitano M, et al. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, 54 (8): 781-791.
- [3] 陈东平,张志坚,吴秀丽,等. 大鼠 CXCR4 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及其在骨髓间质干细胞中的表达[J]. *生物工程学报*, 2009,25(2):299-305.
- [4] 汪道峰,娄宁,李小东,等.慢病毒介导 shRNA 静默 CXCR4 对 Eca109 细胞转移特性的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*,2010,31(6):761-766.
- [5] Chunkang C, Rui Y, Feng X, et al. The roles of SDF-1/CXCR4 axis and its relationship with apoptosis in the myelodysplastic syndromes [J].*Med Oncol*, 2011, 28 (S1): 494-500.
- [6] De Falco V, Guarino V, Avilla E, et al. Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11821-11829.
- [7] Kim JM, Lee YH, Ku CR, et al. The cyclic pentapeptide d-Arg3FC131, a CXCR4 antagonist, induces apoptosis of somatotrope tumor and inhibits tumor growth in nude mice [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(2): 536-544.
- [8] Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, et al. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 967-971.
- [9] 张树成,乔雷,高红.利用 RNA 干扰抑制 CXCR4 基因表达对乳腺癌细胞转移和侵袭能力的影响[J].*中华外科杂志*,2007,45(7):473-475.
- [10] Rubie C, Frick VO, Ghadjar P, et al. CXCR4 mRNA silencing abrogates CXCL12-induced migration of colorectal cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2011, 9 (1): 22-28.
- [11] Heckmann D, Laufs S, Maier P, et al. A Lentiviral CXCR4 overexpression and knockdown model in colorectal cancer cell lines reveals plerixafor-dependent suppression of SDF-1 α -induced migration and invasion [J].*Onkologie*, 2011, 34(10): 502-508.

(编辑 王晓鹰)