

慢病毒介导 shRNA 静默 CXCR4 对 Eca109 细胞转移特性的影响

汪道峰¹, 娄宁¹, 李小东^{2*}, 曾灿光², 张旭², 林勇斌²

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心 1. ICU, 2. 胸科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】新近研究显示 CXCL12/CXCR4 通路在食管癌组织中有较高的表达,本研究探讨应用慢病毒介导的 RNA 干扰技术,有效静默食管癌细胞株 Eca109 细胞 CXCR4 的表达,研究 CXCL12/CXCR4 通路对食管癌 Eca109 细胞转移能力的影响。【方法】以人 CXCR4 mRNA 编码序列作为干扰靶点,构建靶向 CXCR4 的 vshRNA 表达质粒,另构建不针对任何已知 mRNA 的阴性对照 vshRNA 表达质粒,转染相应组别细胞。研究分为控制组、阴性对照组及静默组。应用实时定量 PCR 及 Western blot 检测转染后食管癌细胞 CXCR4 表达的变化。Transwell 侵袭小室实验以穿膜细胞的数量评估各组 Eca109 食管癌细胞的侵袭能力,MTT 法观察 Eca109 各组细胞与 Matrigel 胶黏附能力的变化,划痕法检测迁移能力改变。【结果】成功构建 CXCR4 shRNA 慢病毒载体 CXCR4-RNAi-LV。QPCR 及 Western blot 结果显示静默组 Eca109 细胞 CXCR4 mRNA 及蛋白的表达水平较阴性对照组及空白组显著降低($P < 0.05$)。CXCR4 有效静默后,食管癌 Eca109 细胞黏附、侵袭及迁移能力显著下降($P < 0.05$)。【结论】慢病毒介导的 shRNA 能有效地静默食管癌细胞 CXCR4 基因的表达,阻断 CXCL12/CXCR4 通路生物学效应,有效抑制食管癌 Eca109 细胞的转移潜能,提示 CXCL12/CXCR4 通路在食管鳞癌发展过程中具有重要作用。

关键词: RNA 干扰; 食管肿瘤; CXCR4; 转移

中图分类号: R734.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)06-0761-06

Effect of CXCR4 Gene Silencing by Lentivirus-shRNA on Metastatic Characteristics of Human Esophageal Carcinoma Cell Line Eca109

WANG Dao-feng¹, LOU Ning¹, LI Xiao-dong^{2*}, ZENG Can-guang², ZHANG Xu², LIN Yong-bin²

(1. Department of ICU; 2. Department of Thoracic Surgery, State Key Laboratory of Oncology in South China// Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】CXCL12/CXCR4 is highly expressed in esophageal squamous cell carcinoma (Escc). To study the effect of CXCR4 down-regulation by lentivirus-mediated RNA interference (RNAi) silencing technique on metastatic characteristics of human esophageal carcinoma cell line Eca109. 【Methods】One lentiviral vector for RNAi of CXCR4 containing a sequence of human CXCR4 mRNA coding region was constructed, the other lentiviral vector for RNAi of CXCR4 containing a sequence of no significant and homology to human gene sequences was constructed, and transfected into Eca109 cells, respectively. There were control group, NC-GFP-RNAi-LV group, and CXCR4-RNAi-LV group in our study. The expression of CXCR4 in the cells was detected by QRT-PCR and Western blot after transfection. The adhesive ability of Eca109 cells to extracellular matrix matrigel was evaluated by MTT assay. The invasive ability was measured by Transwell experiment. The locomotion ability was measured by scrape assay. 【Results】The lentivirus RNAi vector of CXCR4-RNAi-LV was constructed successfully. Compared with NC-GFP-RNAi-LV group and Control group cells, CXCR4 mRNA and protein expression in CXCR4-RNAi-LV group cells were down-regulated ($P < 0.05$). The number of Eca109 cells infiltrated Transwell membrane in NC-GFP-RNAi-LV group was decreased ($P < 0.05$). The adhesion rate of CXCR4-RNAi-LV group cells was obviously reduced ($P < 0.05$). The locomotion ability of CXCR4-RNAi-LV group cells was obviously reduced ($P < 0.05$). 【Conclusion】CXCR4-vshRNA can inhibit CXCR4 expression specifically

收稿日期: 2010-06-28

基金项目: 国家自然科学基金(30600731); 中山大学 985 二期工程资助

作者简介: 汪道峰, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤与炎症的临床与基础研究, E-mail: wdfmch@126.com, * 通信作者: 李小东, 副教授, 博士, 主要从事胸部肿瘤的临床及基础研究, E-mail: wdfmch@126.com

and effectively in esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109, CXCR4-vshRNA can inhibit metastatic potential of Eca109 cells through intervening the expression of CXCR4. Suggesting that CXCL12/CXCR4 might have an oncogene role in the progression of Escc.

Key words: RNA interference; esophageal carcinoma; CXCR4; metastasis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 761-766]

食管癌细胞具有高转移的特性, 早期即易于发生黏膜下侵犯, 并通过食管黏膜及黏膜下淋巴管网、血管网发生播散转移。趋化因子是一类具有生物化学趋化性的细胞因子, 其中 CXCL12(C-X-C chemokine ligand 12)及其特异性受体 CXCR4(C-X-C chemokine receptor 4)在干细胞的迁移及各种免疫反应中发挥重要的作用, 新近的研究显示^[1-3] CXCL12 及其受体 CXCR4 组成的信号传导通路可能与肿瘤的发生、发展关系密切。本研究应用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术, 选用慢病毒(Lentivirus)构建 shRNA(short hairpin RNA)表达载体 vshRNA 转染人食管鳞癌细胞株 Eca109, 通过静默 CXCL12 的特异性受体 CXCR4, 阻断 CXCL12/CXCR4 信号通路的生物学效应, 研究 CXCL12/CXCR4 通路对食管鳞癌转移特性的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞 人食管鳞癌细胞株 Eca109 由中山大学肿瘤防治中心实验室保存提供。293T 细胞、大肠杆菌菌株 DH5 α 、pGC-LV 重组载体购自上海吉凯基因技术公司,

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 Age I、EcoR I 及 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, Taq 酶购自 Takara 公司, Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司, CXCR4 一抗购自 abcam 公司, 兔二抗购自 Amersham 公司。SDF-1 α (外源性 CXCL12)购自 Cytolab 公司, Transwell 细胞培养小室购自 Corning 公司, Matrigel 胶购自 BD 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞的培养与准备 Eca109 细胞在含 DMEM 的培养液(100 mL/L 胎牛血清)中, 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO $_2$ 、饱和湿度的条件下孵育箱中培养, 待细胞培养至 80%融合。

1.2.2 构建针对 CXCR4 mRNA 的质粒及验证 根据 shRNA 设计原则及人类 CXCR4 mRNA 结构

(NCBI:NM_001008540), 设计合成、预实验筛选阳性寡核苷酸片段(靶向 CXCR4 mRNA), 序列为 5'-TTCAAGAGA-3'。选用阴性对照片段(广泛用于 RNA 干扰试验的对照, 不针对任何已知人 mRNA)并合成双链 DNA 片段, 阴性对照序列为 5'-TTC TCCGAACGTGTCACGT-3', 合成上述设计的双链 DNA, 退火连接。Age I 和 EcoR I 酶切 pGCSIL-GFP 载体使其线性化, 与上述寡核苷酸链在 T4 连接酶作用下连接环化。并转化进入制备好的大肠杆菌感受态 DH5 α 细胞, AMP 抗性筛选质粒, 挑选阳性克隆扩增, 质粒提取, 进行重组质粒测序(上海美季), 验证序列的正确性。

1.2.3 慢病毒包装 转染前 2 h, 胰蛋白酶消化病毒包装细胞 293T 细胞向灭菌离心管中加入制备的 DNA 溶液(pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体、pHelp 2.0 载体)与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀, 加入 Lipofectamine 2000(含 Opti-MEM), 室温下温育 20 min, 将 DNA 与 Lipofectamine2000 混合液移至 293T 细胞培养液中, 混匀, 于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO $_2$ 细胞培养箱中培养 48 h。收集转染 48 h 后的 293T 细胞, 4 $^{\circ}$ C, 离心去细胞碎片, 过滤器过滤提取病毒粗液, 离心浓缩。应用孔稀释法测定、稀释病毒浓度, 选择适合浓度病毒液感染 Eca109 细胞, 将滴度为 2E + 09 TU/mL Human CXCR4-RNAi-LV(vshRNA)2 μ L 加入 Eca109 细胞悬液中, 培养 72 h。

1.2.4 筛选稳定静默细胞克隆 荧光显微镜下观察慢病毒上报基因 GFP 表达情况, 选 5 个 200 倍视野计算呈绿色荧光的细胞数, 占视野中全部细胞的比例, 计算转染率, 筛选稳定静默 CXCR4 表达的细胞克隆。

1.3 实时定量 PCR 检测 CXCR4 mRNA 的变化

Trizol 法分别提取各组细胞中总 RNA, 取 2 μ g 逆转录, Actin 基因为内参。待 RNA 基本透明时, 加入 20 μ L RNase-free 水, 至完全溶解, 紫外分光光度计分析测定所抽提 RNA 的浓度, 每个样本设 3 个复孔, 取均数作为结果。CXCR4 引物序列: 上游引物为 5'-ATCATCTTCTTAACTGGCATTGTG-

3',下游引物为 5'-GCTGTAGAGGTTGACTGTGTA G-3'。Actin 引物序列:上游引物 5'-GGCGGCACC ACCATGTACCCT-3',下游引物 5'-AGGGGCCGGA CTCGTCATACT-3'。设定程序为两步法 Real-Time PCR:预变性 95℃,15 s;之后每一步变性 95℃,5 s;退火延伸 60℃,30 s;共进行 45 个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。以相对定量法计算 CXCR4 mRNA 的变化。

1.4 Western blot 法检测 CXCR4 蛋白表达的变化

转染后 72 h 后,收集各组细胞进行总蛋白提取,分光光度计测蛋白浓度、定量,样品蛋白 SDS-PAGE 电泳分离,电转至 PVDF 膜上,Blocking Buffer 中孵育,加入 CXCR4 羊抗人多克隆一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,含 Tween20 的 Tris 盐溶液室温下洗 2 次,每次 10 min,加入兔抗羊二抗(1:2 000),室温下摇床孵育 1 h,放入含 Tween20 的 Tris 盐溶液室温下洗 4 次,每次 10 min。暗室曝光, β -actin 为内参,X 线片进行灰度扫描,计算 CXCR4 的相对表达量,CXCR4 相对表达量=CXCR4 灰度值/ β -actin 灰度值。

1.5 食管鳞癌 Eca109 细胞体外侵袭能力测定

带有微孔的聚碳酸酯膜的 Transwell 小室,小室上铺 25 μ g Matrigel 胶。取转染后 72 h 的各组细胞消化,用培养液调成密度为 5×10^4 /mL 的细胞悬液,每孔各取 200 μ L 加入上室,下室加入含 DMEM(10%胎牛血清)细胞培养液及 100 ng/mL 的 SDF-1 α 在 37℃、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度下共同孵育 24 h,每组设 3 个平行样本,取出滤膜,生理盐水清洗,擦净上室面的细胞,40 g/L 多聚甲醛固定 30 min,1 g/L 结晶紫中染色 30 min,PBS 液洗两遍。400 倍光镜下随机选取 10 个视野,计数滤过膜下室面的细胞数。每孔设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.6 食管鳞癌 Eca109 细胞体外黏附能力测定

无血清培养液稀释 Matrigel 胶至 0.04 mg/mL 96 孔板至于冰上并每孔加入 8 μ g 已稀释的 Matrigel 胶,冷冻干燥,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵育 1 h,加入 100 mL/L 胎牛血清 200 μ L,包被备用。取转染后 72 h 的各组细胞消化后,用细胞培养液调整各组细胞浓度为 5×10^5 /mL,每孔加入培养液 200 μ L,第 4 孔内另加入 100 ng/mL SDF-1 α 20 μ L,摇床轻摇 5 min,置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 孵育 2 h;弃细胞培养液,PBS 液轻洗 3 次,洗去未黏附的细胞;每孔加入 0.4 g/L MTT

100 μ L,轻摇 5 min,细胞培养箱培养 4 h,吸去 MTT 液,加入二甲亚砜 200 μ L,轻摇 10 min,酶标仪检测(490 nm)。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。黏附率=黏附细胞酶标仪检测值(490 nm)/总细胞酶标仪检测值(490 nm)。

1.7 食管鳞癌 Eca109 细胞体外迁移能力测定

取转染后 72 h 的各组细胞消化,将 Eca109 细胞种于六板孔中。37℃、5% CO₂ 及饱和湿度下的条件培养,细胞长至 90%时,弃原培养基,以 100 μ L 枪头划痕。PBS 液清洗,去 PBS 液后即时快速拍照。分 4 个组,控制组、阴性对照组、静默组及 SDF-1 α 组。前 3 组以 DMEM 培养液(100 mL/L 胎牛血清)培养,SDF-1 α 组加入 SDF-1 α (100ng/mL),每日拍摄照片。拍摄照片前吸出培养基置入 EP 管中,生理盐水清洗后拍摄,拍摄结束后将培养基移入 6 孔板。放置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度下继续培养,观察不同组食管鳞癌细胞迁移爬满六孔板的时间。

1.8 统计学分析及方法

实时定量 PCR 及 Western blot 所得相应的条带,采用图像分析软件进行扫描。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS10.0 软件处理,QPCR 分析选用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法,独立样本均数间的比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 质粒构建及验证

构建分别是编码靶序列的重组质粒 hCXCR4-vshRNA 及阴性对照质粒。连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为:343bp(从载体中切掉 24 bp);没有连接入 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为:306 bp(图 1)。

2.2 细胞转染

细胞转染设立 3 个组,无转染组为控制组(control group),阴性序列转染组为阴性对照组(NC-GFP-RNAi-LV group),慢病毒靶序列干扰组为静默组(CXCR4-RNAi-LV group)。干扰 72 h 后,用荧光显微镜观察,CXCR4-RNAi-LV 组的转染率为(87.3 \pm 1.2)%,NC-GFP-RNAi-LV 组的转染率为(90.1 \pm 1.4)%。

2.3 vshRNA 对 CXCR4 蛋白及 mRNA 表达的抑制

Western blot 法检测转染后 72 h 各组细胞

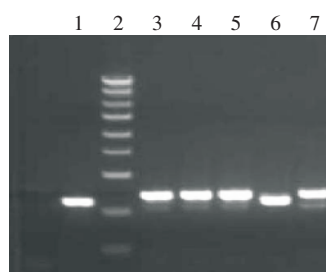


图 1 阳性克隆 PCR

Fig. 1 Identification of positive clone PCR

Lane 1: negative control group (no load); Lane 2: Marker (from top to bottom: 5, 3, 2, 1.5, 1, 750, 500, 250, 100 bp); Lane 3 ~ 7: hCXCR4-vshRNA group.

CXCR4 蛋白的表达情况。控制组 CXCR4 蛋白相对值为 $(84.5 \pm 2.3)\%$, 阴性对照组为 $(80.2 \pm 3.2)\%$, 静默组为 $(21.5 \pm 3.1)\%$, 静默组较控制组及阴性对照组差异明显 ($P < 0.05$, 图 2), QPCR 检测显示 mRNA 相对值, 静默组较阴性对照组及控制组减少, 差异明显 ($P < 0.05$), 阴性对照组与控制组间比较, 两者差异不明显 ($P > 0.05$, 图 3)。

2.4 鳞癌细胞侵袭能力的改变

转染 72 h 后, 通过显微镜观察在相同浓度 (100 ng/mL) SDF-1 α 作用下不同组食管癌细胞穿过仿人基底膜的细胞数。控制组为 81.80 ± 12.22 , 阴性对照组为 78.20 ± 18.57 , 静默组为 34.50 ± 8.77 。静默组侵袭能力较控制组及阴性对照组

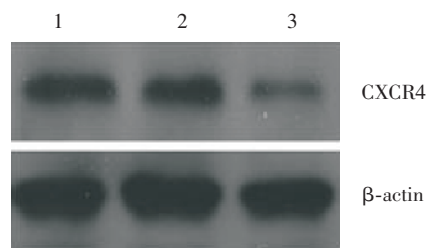


图 2 vshRNA 对 Eca109 细胞 CXCR4 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of CXCR4-RNAi-LV on CXCR4 protein expression on Eca109 cells

Lane 1: CONTROL group; Lane 2: NC-GFP-RNAi-LV group; Lane 3: CXCR4-RNAi-LV group

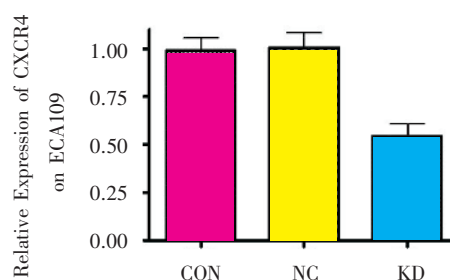
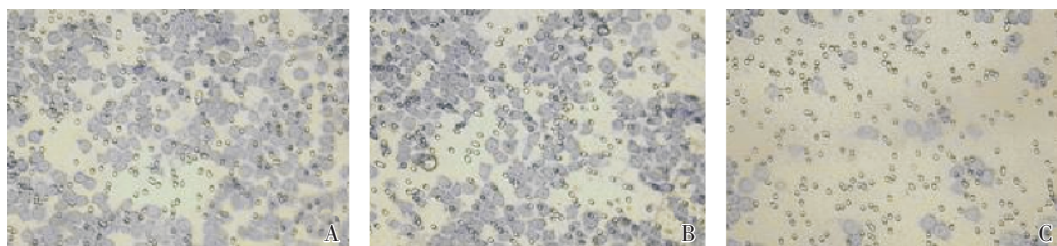


图 3 vshRNA 对 Eca109 细胞 CXCR4 mRNA 表达的影响

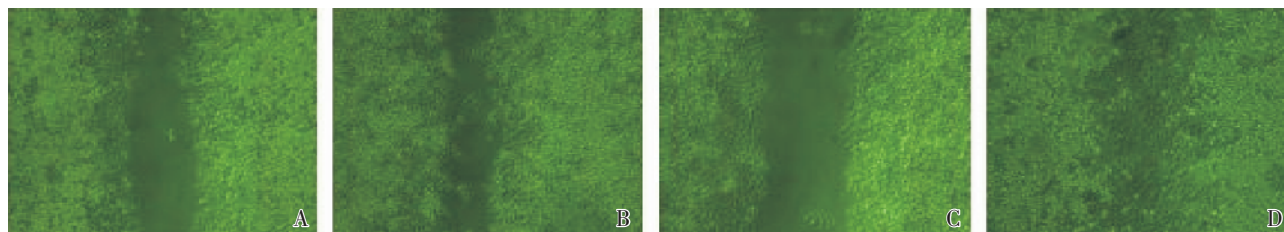
Fig. 3 Effect of CXCR4-RNAi-LV on CXCR4 mRNA expression on Eca109 cells

CON: CONTROL group; NC: NC-GFP-RNAi-LV group; KD: CXCR4-RNAi-LV group

减弱 ($P < 0.01$), 阴性对照组与控制组间侵袭能力差异无显著性 ($P > 0.05$, 图 4)。

图 4 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 ($\times 200$)Fig. 4 Cell invasion detected with transwell chambers ($\times 200$)

A: CONTROL group; B: NC-GFP-RNAi-LV group; C: CXCR4-RNAi-LV group

图 5 划痕试验检测细胞迁移能力 ($\times 200$)Fig. 5 Cell locomotion detected with scrape assay ($\times 200$)

A: CONTROL group; B: NC-GFP-RNAi-LV group; C: CXCR4-RNAi-LV group; D: SDF-1 α group (100 ng/mL)

2.5 鳞癌细胞黏附能力的改变

静默组、控制组及阴性对照组黏附率分别为 $(5.8 \pm 0.4)\%$ 、 $(13.2 \pm 0.4)\%$ 、 $(12.4 \pm 0.3)\%$,静默组黏附率较控制组及阴性对照组明显下降 ($P < 0.01$),控制组与阴性对照组黏附率差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.6 鳞癌细胞迁移能力的改变

阴性对照组与控制组需 5 d 爬满六孔板,静默组需 6 d,SDF-1 α 组需 4 d(图 5)。

3 讨论

转移是恶性肿瘤的重要特点之一,也是大部分肿瘤治疗最后失败的原因之一。现有研究^[4]证实:肿瘤的转移与炎症反应有着极其相似的过程,许多肿瘤细胞表达某些炎症趋化因子受体,而某些肿瘤及其易于转移的靶器官则存在相应配体的表达,从而引导肿瘤细胞转移扩散。CXCL12 又称基质细胞衍生因子 1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)或前 B 细胞刺激因子(pre-B cell stimulatory factor, PBSF),CXCR4 是其特异性受体。相关的研究^[5]显示: CXCR4 在食管癌组织中有较高表达, CXCR4 表达阳性的食管癌细胞有更强的局部浸润及淋巴结转移特性,是食管癌预后不良的因数之一。现有的 CXCR4 的拮抗剂如 AMD3100、T140 等已在实验研究中使用^[6-7],但此类药物特异性较低。本研究设计针对 CXCR4 基因的有效序列 vshRNA 片段,应用慢病毒构建 shRNA 表达载体特异靶向静默食管癌细胞 CXCR4 基因,此方法具高效及静默持续时间长等特点,实验中应用于研究基因功能^[8],为深入了解 CXCL12/CXCR4 通路在食管鳞癌发生发展过程中的作用提供良好的工具。

食管癌细胞的转移过程是多步骤多因素参与的过程,本研究从转移的三个重要步骤:侵袭、黏附及迁移来探讨 CXCL12/CXCR4 通路对食管鳞癌细胞转移能力的影响。侵袭是肿瘤发展及转移过程中重要的阶段,有研究^[9]显示: CXCL12 通过上调 MMP-9 的表达,进而提高肿瘤细胞侵袭细胞外基质的能力,在宫颈癌的研究^[10]亦发现 CXCL12/CXCR4 通路可通过调控宫颈癌细胞 MMP-2 的表达,使宫颈癌细胞更易于分解细胞外基质的纤维连接蛋白及层粘连蛋白,使肿瘤细胞侵袭更易发生。本研究中,利用 h CXCR4-vshRNA

高效静默受体 CXCR4,导致 CXCL12 失去特异性的结合位点,并利用 Matrigel 胶模拟组织基底膜,在外源性 CXCL12(100 ng/mL)的作用下,静默组穿膜食管癌细胞数显著少于控制组及阴性对照组。此结果与 Tu 等^[11]在恶性胶质瘤细胞的研究相吻合,表明通过静默受体 CXCR4 可有效抑制 CXCL12/CXCR4 通路的生物学作用,减弱食管鳞癌细胞的侵袭潜能。

在肿瘤转移过程中,肿瘤细胞与基底膜黏附作用可协助肿瘤细胞完成从原发灶脱离并侵入及破坏基底膜的过程。CXCL12/CXCR4 通路作用可增加肿瘤细胞与细胞外基质的黏附作用^[12-13]。有研究显示^[14]:应用 CXCR4 单抗 12G5 可有效抑制胃癌细胞的黏附潜能,从而证实 CXCL12/CXCR4 在白血病细胞向骨髓基质层黏附有重要的作用。本实验显示:静默组食管肿瘤细胞黏附能力明显较控制组及阴性对照组低,而阴性对照组与控制组差异不明显。由此可见外源性 CXCL12 可明显增强 Eca109 细胞与基质的黏附能力,静默组食管癌细胞由于 CXCR4 被高效静默,阻断了内源性 CXCL12 的作用途径,导致食管鳞癌细胞与基质的黏附能力明显下降。此结果与 Shen^[15]的研究结论相似。其机制可能是 CXCL12/CXCR4 通过提高整联蛋白表达从而提高肿瘤细胞的黏附能力,但也有学者^[16]发现 CXCR4 的生物抑制剂并不能降低外源性 CXCL12 作用后增强的细胞黏附能力, CXCL12 对 $\alpha 5\beta 3$ 受体的调节还受到生物环境及其它因子的限制。我们推测 CXCL12/CXCR4 通路是影响食管肿瘤细胞黏附潜能的一条重要通路,但并非唯一通路,其确切的作用机理还需更进一步的研究。

肿瘤细胞的运动主要表现为伪足样的伸展、膜流动性等形式。Gao 等^[17]人的研究认为 CXCL12 重组体可激活下游区信号,活化黏着斑激酶和衔接蛋白,使基质细胞丝状肌动蛋白丝重组,从而趋化肿瘤细胞的迁移。本实验显示,在相同的培养条件下(增殖效应相互抵消),静默组细胞较控制组细胞与阴性对照组细胞的迁移速度慢, CXCL12 组迁移速度最快,此结果与 Retz^[18]的研究相似。我们认为这主要是由于: Eca109 细胞伪足细长,加入外源性的 CXCL12 作用于 CXCR4 刺激细胞伪足的进一步生成,导致其迁移速度加快。伪足还可黏附于靶器官或组织,伸入正常细胞间隙,甚至穿过组织基底膜。当食管癌细胞的 CXCR4 被高效静默后,内源性 CXCL12 的

受体明显减少,CXCL12/CXCR4 通路的生物学效应被阻断,直接导致食管癌细胞迁移能力的下降。

综上所述,CXCL12/CXCR4 通路影响食管鳞癌细胞的侵袭、黏附及迁移能力,运用慢病毒介导的 shRNA 可高效静默食管癌细胞的 CXCR4,有效抑制食管鳞癌细胞的转移潜能。这为深入研究食管癌发生、发展的分子机制以及寻找针对食管鳞癌分子靶点治疗提供了实验依据及新的线索,可能可以为食管鳞癌治疗提供新的方法及切入点。对于 CXCL12/CXCR4 通路在食管鳞癌中的作用机制我们将作进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Imai H, Sunaga N, Shimizu Y, et al. Clinicopathological and therapeutic significance of CXCL12 expression in lung cancer [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2010, 23(1):153-164.
- [2] Liu Y, Ji R, Li J, et al. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 16.
- [3] Ingold B, Schulz S, Budezies J, et al. The role of vascular CXCR4 expression in colorectal carcinoma[J]. *Histopathology*, 2009, 55(5): 576-586.
- [4] Peled A, Grabovsky V, Habler L, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34 (+) cells on vascular endothelium under shear flow[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(9):1199-1211.
- [5] 汪道峰,娄宁,曾灿光,等. CXCL12 和 CXCR4 在食管癌组织中的表达及其与预后的关系[J].*癌症*,2009, 28(2):187-192.
- [6] Burger JA, Stewart DJ. CXCR4 chemokine receptor antagonists: perspectives in SCLC [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009, 18(4): 481-490.
- [7] Burger JA, Peled A. CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers [J]. *Leukemia*, 2009, 23(1):43-52.
- [8] 吴立蓉,姚开泰. 慢病毒携带 shRNA 抑制 CR-1 基因表达对 CNE-2 细胞特性的影响[J]. *中山大学学报: 医学科学版*,2009,30(6):671-676.
- [9] Kenig S, Alonso MB, Mueller MM, et al. Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9p [J]. *Cancer Lett*, 2010, 289(1):53-61.
- [10] 沈晓燕,王绍海,梁铭霖,等. CXCR4 及其配体 SDF-1 在宫颈癌转移中的作用及其机制研究 [J]. *癌症*, 2008,27(10):1044-1049.
- [11] Tu H, Zhou Z, Liang Q, et al. CXCR4 and SDF-1 production are stimulated by hepatocyte growth factor and promote glioma cell invasion [J]. *Onkologie*, 2009, 32(6):331-336.
- [12] Zhou J, Hu L, Cui Z, et al. Interaction of SDF-1alpha and CXCR4 plays an important role in pulmonary cellular infiltration in differentiation syndrome [J]. *Int J Hematol*, 2010, 91(2):293-302.
- [13] Li M, Yu J, Li Y, et al. CXCR4 positive bone mesenchymal stem cells migrate to human endothelial cell stimulated by ox-LDL via SDF-1alpha/CXCR4 signaling axis[J]. *Exp Mol Pathol*, 2010, 88(2):250-255.
- [14] 罗君,吴小翎. 抗 CXCR4 单克隆抗体 12G5 对胃癌细胞黏附与侵袭的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(7):817-820.
- [15] Shen X, Wang S, Wang H, et al. The role of SDF-1/CXCR4 axis in ovarian cancer metastasis [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29(3): 363-367.
- [16] Sun YX, Fang M, Wang J, et al. Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXCR4 increases the aggressiveness of prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2007, 67(1):61-73.
- [17] Gao H, Priebe W, Glod J, et al. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(4):857-865.
- [18] Retz MM, Sidhu SS, Blaveri E, et al. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(2): 182-189.

(编辑 张恩健)