

### 【临床研究】

中图分类号: R739.6 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2018)01-0030-05

通信作者:余文发(1972-),男,河南信阳人,博士,主任医师,主要从事耳鼻咽喉头颈部肿瘤的防治;E-mail:venturerlu@163.com.

adjacent tissues was  $0.522 \pm 0.047$ ,  $0.053 \pm 0.011$  respectively. The expression of CXCR4 mRNA and protein in nasopharyngeal carcinoma tissue were significantly higher than those in adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). The protein expression of CXCR4, MMP-2, MMP-9,  $\beta$ -catenin, Cyclin D1 in cells, cell survival rate and the number of cell invasion in CXCR4 transfection group were significantly lower than those in the blank control group and negative control group ( $P < 0.05$ ); however, there was no significant difference in above indexes between the blank control group and negative control group ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion** Inhibiting of CXCR4 gene expression in nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells can significantly decrease the proliferation and invasion ability of cancer cells, and the mechanism may be related to down regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words:** nasopharyngeal carcinoma; chemine receptor 4 gene; small interfering RNA; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9;  $\beta$ -catenin; cyclin D1; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

鼻咽癌是一种地方性高发的鼻咽部鳞状上皮癌,常发生在鼻咽部顶壁和咽隐窝。主要治疗方法是放射治疗或放射治疗联合化学治疗,但对于晚期病灶、转移及局部复发患者的治疗效果很差,且不良反应重<sup>[1]</sup>。鼻咽癌的发生是包括环境因素、癌基因、抑癌基因、基因的易感性、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus, EBV)在内的多因素作用的结果。因此,阐明鼻咽癌发生的分子机制及寻找新的治疗靶点是该病治疗的关键。趋化因子受体 4(chemine receptor 4, CXCR4)是基质细胞衍生因子 1 唯一的趋化因子受体,参与各种生理及病理过程<sup>[2]</sup>。近年来研究显示,乳腺癌、胰腺癌、肝癌等多种肿瘤中 CXCR4 高表达,其表达与肿瘤细胞的播散、正常细胞的恶性转化及肿瘤细胞的非随机转移等有关<sup>[3-5]</sup>。也有研究指出,鼻咽癌中 CXCR4 也有高表达,其表达与鼻咽癌转移有关<sup>[6]</sup>。本研究拟采用 RNA 干扰技术,通过靶向沉默人鼻咽癌细胞系 CNE-2Z 中 CXCR4 基因的表达,观察其对鼻咽癌细胞增殖、侵袭的影响,并进一步研究其作用机制。

# 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集新乡医学院第一附属医院 2014 年 1 月至 2016 年 12 月保存的鼻咽癌及相应的癌旁组织各 42 例,男 28 例,女 14 例,年龄 19 ~ 85 ( $42.2 \pm 12.1$ ) 岁。鼻咽癌患者经病理证实均为鼻咽部低分化鳞癌,均未接受任何治疗,且为首次确诊,所有样本的实验均经过医院伦理委员会审查。

**1.2 试剂和仪器** 人鼻咽癌细胞系 CNE-2Z 购自广州吉妮欧生物科技有限公司,胎牛血清、RPMI-1640 培养基购于美国 Hyclone 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 和二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒购自江苏碧云天生物技

术研究所, Lipofectamine™ 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9、 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin)、细胞周期素 D1 (Cyclin D1) 抗体均购自美国 Abcam 公司;多功能酶标仪 (Synergy HT) 购自美国 Bio-Tec 公司,流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

**1.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测鼻咽癌及癌旁组织中 CXCR4 mRNA 表达** 参照 Trizol 试剂盒操作说明提取患者鼻咽癌组织和癌旁组织中的总 RNA,反转录为 cDNA,参照 GenBank 中的基因序列,利用 Primer Premier 6.0 引物设计软件设计目的基因 CXCR4 及内参基因磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的 RT-PCR 引物,送上海生工生物工程有限公司合成。CXCR4 引物序列:上游为 5'-TGGCCTTATCCTGCCTGGTAT-3',下游为 5'-GGAGTCGATGCTGATCCCAAT-3'。内参 GAPDH 引物序列:上游为 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',下游为 5'-GAAGATGGTGATGGGAT-TTC-3'。定量 PCR 扩增条件:95 ℃ 2 min; 95 ℃ 30 s; 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 以上共 35 个循环。72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。根据相对模板量  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 CXCR4 mRNA 相对表达量。

**1.4 细胞转染** 人鼻咽癌细胞系 CNE-2Z 在 37 ℃, 95% 湿度, 含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基培养。收集对数生长期的细胞,以  $1.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$  接种于 6 孔细胞培养板中,细胞生长至孔底面积达 85% ~ 90% 时进行转染,分为空白对照组 (细胞未做任何处理)、阴性对照组 (细胞转染无义 siRNA 序列) 和 CXCR4 转染组 (细胞转染 CXCR4 的靶向 siRNA 序列)。具体操作按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒的操作说明进行。

**1.5 Western blot 法检测鼻咽癌组织、癌旁组织及**  
**各组细胞中 CXCR4、MMP-2、MMP-9、β-catenin 及**  
**Cyclin D1 蛋白表达** 用细胞裂解液分别处理鼻咽  
癌组织、癌旁组织和细胞中的蛋白,BCA 试剂盒检  
测蛋白浓度,取 50 μg 上样蛋白至十二烷基硫酸钠  
聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移到硝酸纤维素膜,质  
量分数 5% 脱脂奶粉封闭,分别加入 CXCR4、MMP-  
2、MMP-9、β-catenin、Cyclin D1 (均按照 1 : 500 稀  
释)和 GAPDH(1 : 1 000 稀释)一抗,4 ℃ 过夜,洗膜  
缓冲液 (tris buffered saline tween, TBST) 洗涤  
(3 次 × 10 min),加入 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化  
物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠  
IgG,37 ℃ 孵育 1 h,洗膜后在暗室 X 片曝光 1 min  
左右,显影、定影后成像拍照。

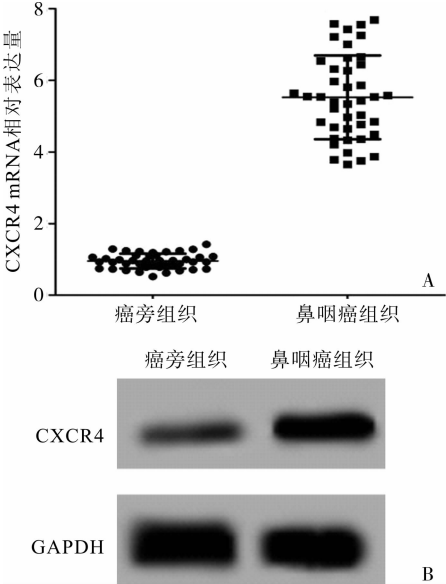
**1.6 CCK-8 检测细胞增殖能力** 以  $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$  浓  
度将对数生长的 CNE-2Z 细胞接种至 96 孔细胞培  
养板,每孔设置 3 个复孔,培养 24 h 进行同步化处  
理,分别于转染后 48 h 每孔细胞中加入 CCK-8 试剂  
10 μL,培养箱孵育 1 h。酶标仪测定 450 nm 的吸光  
度,重复 3 次。细胞增殖率 = (转染组细胞/对照组  
细胞) × 100%。

**1.7 Transwell 小室检测细胞侵袭能力** 4 ℃ 融化  
Matrigel 胶,与 RPMI-1640 培养液按照 1 : 4 比例稀  
释,取 50 μL 稀释后的胶铺在 Transwell 小室上层。  
常温放置 10 ~ 15 min 风干,转染 48 h 的各组细胞以  
每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 Transwell 小室的上层,下  
室中加入含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640  
培养基,培养 18 h,洗涤,棉球轻轻擦掉上室内的细  
胞,甲醛固定 30 min,结晶紫染色 5 min,磷酸盐缓冲  
液冲洗,随机取不同的 6 个视野 (× 200) 观察;并记  
录穿膜的细胞数,重复 3 次,求均值。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 21.0 软件进行统计  
分析,实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各组间  
差异比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有  
统计学意义。

2 结果

**2.1 CXCR4 mRNA 和蛋白在鼻咽癌及癌旁组织**  
**中的表达** 结果见图 1。鼻咽癌及相应的癌旁组织  
中 CXCR4 mRNA 表达分别为  $5.526 \pm 0.143$ 、  
 $0.953 \pm 0.091$ ,蛋白表达分别为  $0.522 \pm 0.047$ 、  
 $0.053 \pm 0.011$ ,鼻咽癌组织中 CXCR4 mRNA 及蛋白  
表达均显著高于癌旁组织,差异有统计学意义 ( $P <$   
 $0.05$ )。



A: CXCR4 mRNA 表达; B: CXCR4 蛋白表达。  
图 1 CXCR4 在鼻咽癌中的表达  
Fig. 1 Expression of CXCR4 in human nasopharyngeal carcinoma tissue

**2.2 转染 CXCR4-siRNA 后 CNE-2Z 细胞中 CX-  
CR4 蛋白表达** 结果见图 2。空白对照组、阴性对  
照组和 CXCR4 转染组细胞中 CXCR4 蛋白表达分别  
为  $0.383 \pm 0.031$ 、 $0.369 \pm 0.029$  和  $0.037 \pm 0.010$ ,  
CXCR4 转染组细胞中 CXCR4 蛋白表达显著低于空  
白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义 ( $P <$   
 $0.05$ ),阴性对照组细胞中 CXCR4 蛋白表达与空白  
对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

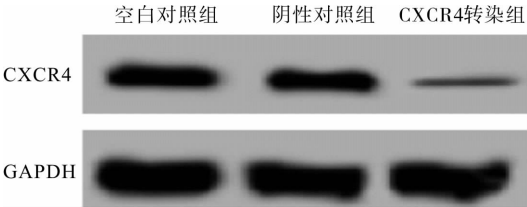


图 2 各组 CNE-2Z 细胞中 CXCR4 蛋白表达  
Fig. 2 Expression of CXCR4 protein in CNE-2Z cells in each group

**2.3 各组细胞增殖能力比较** 空白对照组、阴性对  
照组和 CXCR4 转染组的细胞存活率分别为  
( $95.62 \pm 3.23$ )%、( $93.45 \pm 3.13$ )% 和 ( $61.18 \pm$   
 $4.44$ )%,CXCR4 转染组细胞存活率显著低于空白  
对照组和阴性对照组,差异有统计学意义 ( $P <$   
 $0.05$ ),阴性对照组细胞存活率与空白对照组比较  
差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.4 各组细胞侵袭能力比较** 空白对照组、阴性对  
照组和 CXCR4 转染组细胞 Transwell 侵袭数分别为  
 $225 \pm 15$ 、 $217 \pm 14$  和  $102 \pm 12$ ,MMP-2 蛋白表达分

别为  $0.475 \pm 0.042$ 、 $0.498 \pm 0.041$  和  $0.223 \pm 0.027$ ,MMP-9 蛋白表达分别为  $0.481 \pm 0.036$ 、 $0.462 \pm 0.034$  和  $0.330 \pm 0.010$ ,CXCR4 转染组细胞侵袭数、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均显著低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),阴性对照组细胞侵袭数、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达与空白对照组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。MMP 蛋白表达结果见图 3。

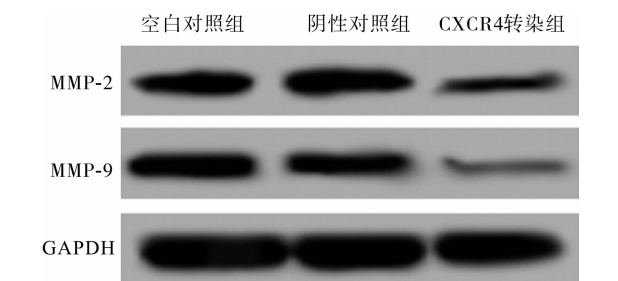


图 3 各组 CNE-2Z 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达  
Fig.3 Expression of MMP-2 and MMP-9 protein in CNE-2Z cells in each group

2.5 转染 CXCR4-siRNA 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 蛋白表达的影响  
结果见图 4。空白对照组、阴性对照组和 CXCR4 转染组细胞中  $\beta$ -catenin 蛋白表达分别为  $0.412 \pm 0.036$ 、 $0.407 \pm 0.038$  和  $0.174 \pm 0.025$ ,Cyclin D1 蛋白表达分别为  $0.153 \pm 0.021$ 、 $0.145 \pm 0.022$  和  $0.036 \pm 0.010$ ,CXCR4 转染组细胞中  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 蛋白表达均显著低于空白对照组和阴性对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),阴性对照组细胞中  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 蛋白表达与空白对照组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

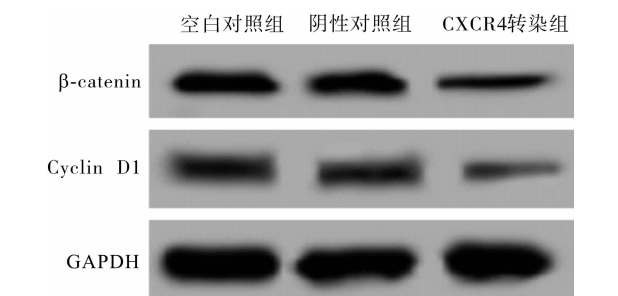


图 4 各组 CNE-2Z 细胞中  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 蛋白表达  
Fig.4 Expression of  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 protein in CNE-2Z cells of each group

3 讨论

趋化因子及其受体在大部分肿瘤中有表达,其表达影响肿瘤的发生、发展,因此,以趋化因子或其受体为靶点,通过抑制趋化因子受体的信号传导而

调节趋化因子系统的功能对于恶性肿瘤的防治具有重要意义。研究显示,CXCR4 是在组织中表达最广泛的细胞趋化因子受体之一,与其配体结合激活后可形成假伪足,影响多种恶性肿瘤的生长、侵袭、迁移<sup>[7]</sup>。在多种恶性肿瘤中有 CXCR4 基因的异常表达<sup>[8-9]</sup>。研究显示,抑制 CXCR4 基因的表达可显著降低卵巢癌、胃癌、肾癌等多种肿瘤细胞的增殖、侵袭及迁移能力<sup>[10-12]</sup>。CXCR4 基因在鼻咽癌中也呈现高表达,其表达与鼻咽癌的转移、放射治疗史有关,可作为判断鼻咽癌预后的指标<sup>[13]</sup>。但 CXCR4 对鼻咽癌侵袭及其机制研究尚未清楚。RNA 干扰是由 RNA 介导的转录后沉默调控,具有高度的特异性和有效性,是研究基因功能有效的途径<sup>[14]</sup>。

肿瘤细胞的侵袭能力是恶性肿瘤的一个重要生物学特性,也是治疗失败的重要因素。恶性肿瘤细胞的侵袭是由多步骤、多阶段控制的复杂过程,其中细胞外基质降解是侵袭的关键。MMPs 可降解细胞外基质及基膜中的大多数蛋白质,在肿瘤中由于其表达增强,促进细胞外基质降解,进而增强细胞的转移、侵袭能力<sup>[15-16]</sup>。MMP-2 和 MMP-9 在 MMPs 家族中研究的较多,既往研究表明,鼻咽癌中 MMP-2 和 MMP-9 过表达与鼻咽癌的浸润生长、淋巴转移、不良预后等有关,抑制其表达可降低鼻咽癌细胞的侵袭和迁移能力<sup>[17-18]</sup>。本实验通过转染 CXCR4-siRNA 抑制鼻咽癌细胞中 CXCR4 mRNA 和蛋白水平,抑制了 MMP-2 和 MMP-9 的表达,显著降低了鼻咽癌细胞的侵袭能力,提示 CXCR4 基因在鼻咽癌的侵袭能力可能与其调控 MMP-2 和 MMP-9 密切相关。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路由 Wnt 蛋白、核内转录因子、跨膜受体胞质蛋白和下游的靶基因组成,是一条经典的 Wnt 信号通路,与肿瘤、衰老和退化、骨质疏松等疾病有关<sup>[19]</sup>。 $\beta$ -catenin 是 Wnt 信号通路的核心原件,在细胞膜及细胞质中均有分布,当有 Wnt 信号刺激时,可导致  $\beta$ -catenin 的大量聚集并进入细胞核,最终激活和启动下游的 Cyclin D1、c-myc 基因的表达,从而影响肿瘤的发生、发展。既往研究认为,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路可降低人鼻咽癌细胞的增殖、侵袭,促进细胞的凋亡能力<sup>[20]</sup>。本研究结果提示,抑制 CXCR4 表达后  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 蛋白表达水平显著降低,同时鼻咽癌细胞的增殖和侵袭能力也对应降低。因此,CXCR4 基因可能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路参与到鼻咽癌细胞的恶性增殖和侵袭能力的调控;另外,本研究也观察到鼻咽癌细胞的恶性侵袭能力与 MMP-2 和 MMP-9 表达相

关,但其具体调控方式和机制仍需进一步探讨。

综上所述,抑制鼻咽癌 CXCR4 表达可通过下调 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来降低鼻咽癌细胞的增殖及侵袭能力。CXCR4 基因可能成为鼻咽癌检测的一个重要指标及作为分子治疗的潜在靶点,但其作用机制仍需进一步深入研究。

# 参考文献:

- [1] BLANCHARD P, LEE A, MARGUET S, *et al.* Chemotherapy and radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: an update of the MAC-NPC meta-analysis[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(6): 645-655.
- [2] QIN L, KUFAREVA I, HOLDEN L G, *et al.* Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine [J]. *Science*, 2015, 347(6226): 1117-1122.
- [3] YI T, ZHAI B, YU Y, *et al.* Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways downstream of SDF-1/CXCR4 in breast cancer stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(21): E2182-E2190.
- [4] 李鹏, 刘冰, 王志向, 等. 肾癌转移相关基因 CXC 趋化因子受体 4 核定位信号的结构分析与功能鉴定[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(2): 86-89.
- [5] LIU J Y, CHIANG T, LIU C H, *et al.* Delivery of siRNA using CXCR4-targeted nanoparticles modulates tumor microenvironment and achieves a potent antitumor response in liver cancer[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(11): 1772-1782.
- [6] LU J, LUO H, LIU X, *et al.* miRNA-9 targets CXCR4 and functions as a potential tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 35(3): 554-563.
- [7] TREON S P, CAO Y, XU L, *et al.* Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia[J]. *Blood*, 2014, 123(18): 2791-2796.
- [8] CHEN Y, RAMJIAWAN R R, REIBERGER T, *et al.* CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology*, 2015, 61(5): 1591-1602.
- [9] GRAVINA G L, MANCINI A, MUZI P, *et al.* CXCR4 pharmacological inhibition reduces bone and soft tissue metastatic burden by affecting tumor growth and tumorigenic potential in prostate cancer preclinical models[J]. *Prostate*, 2015, 75(12): 1227-1246.
- [10] LIU W, WANG Y, WANG H, *et al.* Anticancer effects of chemokine receptor 4 (CXCR4) gene silenced by CXCR4-siRNA in nude mice model of ovarian cancer[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(3): 1893-1900.
- [11] KINOSHITA H, YASHIRO M, FUKUOKA T, *et al.* Diffuse-type gastric cancer cells switch their driver pathways from FGFR2 signaling to SDF1/CXCR4 axis in hypoxic tumor microenvironments [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(12): 1511-1520.
- [12] TANG B, TANG F, LI Y, *et al.* Clinicopathological significance of CXCR4 expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(3): 1026-1031.
- [13] TAO H, WEI Y, WANG C, *et al.* Expression of chemokine receptor CXCR4 is closely correlated with clinical outcome in human nasopharyngeal carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5): 6099-6105.
- [14] DENG Y, WANG C C, CHOY K W, *et al.* Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies[J]. *Gene*, 2014, 538(2): 217-227.
- [15] 毛治尉, 李巧玲, 王平, 等. 曲美他嗪对慢性心力衰竭患者心功能和血清 MMP-9、TIMP-1 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(10): 2817-2819.
- [16] MERDAD A, KARIM S, SCHULTEN H J, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(3): 1355-1366.
- [17] SUN W, LIU D B, LI W W, *et al.* Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5): 1551-1560.
- [18] ZERGOUN A A, ZEBBOUDJ A, SELLAM S L, *et al.* IL-6/NOS2 inflammatory signals regulate MMP-9 and MMP-2 activity and disease outcome in nasopharyngeal carcinoma patients[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3505-3514.
- [19] HUANG J, XIAO D, LI G, *et al.* EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric cancer cells[J]. *Oncogene*, 2014, 33(21): 2737-2747.
- [20] WU D, ZHANG Y, HUANG J, *et al.* Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell *in vitro* and suppresses tumor growth *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2): 712-717.

( 本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)