

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)20-1883-04

## 趋化因子受体 CCR7 促进乳腺癌细胞的趋化与侵袭

马飞<sup>1</sup>, 宁力<sup>2</sup>, 张颖妹<sup>3</sup>, 徐兵河<sup>1</sup> (<sup>1</sup>中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所内科, 北京 100021, <sup>2</sup>中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院基本外科, 北京 100730, <sup>3</sup>北京大学医学部, 北京 100083)

### CC chemokine receptor-7 induces chemotaxis and invasion of breast cancer cells

MA Fei<sup>1</sup>, NING Li<sup>2</sup>, ZHANG Ying-Mei<sup>3</sup>, XU Bing-He<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, Cancer Hospital & Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical University, Beijing 100021, China, <sup>2</sup>Department of General Surgery, Peking Union Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical University, Beijing 100730, China, <sup>3</sup>Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China

**【Abstract】** AIM: To study the chemotaxis and invasion of breast cancer cells facilitated by CC chemokine receptor-7 (CCR7). **METHODS:** Reverse transcription-PCR analysis of CCR7 was performed in three breast cancer cell lines. The chemotaxis and invasion assays were performed on breast cancer cells in presence of secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), a ligand of CCR7, and when CCR7 was blocked. **RESULTS:** Breast cancer cell lines expressed different levels of CCR7 mRNA. SLC-mediated chemotaxis and invasion could be checked in those breast cancer cells. Both chemotaxis and invasion could be blocked by neutralizing anti-CCR7 antibody. **CONCLUSION:** Chemotaxis and invasion of breast cancer cells can be facilitated by CCR7 expression. CCR7 may play an important role in the lymph node metastasis of breast cancer.

**【Keywords】** chemokine S CC; receptors, chemokine; CCR7; breast neoplasms; lymphatic metastasis

**【摘要】**目的:研究趋化因子受体 CCR7 的表达对乳腺癌细胞趋化活性与侵袭活性的促进作用。方法:RT-PCR 法测定 3 株乳腺癌细胞 MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361 中 CCR7 的表达,在 CCR7 的配体 SLC 作用下,通过趋化小室法检测不同乳腺癌细胞的趋化活性与侵袭活性,检测 CCR7 的封闭对乳腺癌细胞趋化活性和侵袭活性的影响。结果:3 株乳腺癌细胞中均存在不同程度 CCR7 的表达,其配体 SLC 对 3 种乳

腺癌细胞均存在不同程度的趋化活性和侵袭活性,CCR7 的封闭也能够不同程度上抑制乳腺癌细胞的这种趋化活性和侵袭活性。结论:趋化因子受体 CCR7 的表达能够促进乳腺癌细胞的趋化与侵袭,从而可能在乳腺癌细胞向淋巴结转移中发挥重要作用。

**【关键词】**趋化细胞因子类,CC,受体,趋化因子,CCR7,乳腺癌,淋巴转移

**【中图分类号】**R733.7 **【文献标识码】**A

## 0 引言

许多恶性肿瘤细胞都能够特异性表达特定的趋化因子受体,如 CXCR4, CCR7, CCR10 等,目前认为它们的表达在恶性肿瘤器官特异性转移中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。其中 CC 家族趋化因子受体 CCR7 的配体 SLC (secondary lymphoid tissue chemokine) 和 ELC (EBI1-ligand chemokine) 在淋巴结中特异性高表达,而许多肿瘤细胞表面有 CCR7 的表达。研究证实,CCR7 的表达与多种恶性肿瘤的淋巴结转移密切相关,其中包括食管癌<sup>[2]</sup>、胃癌<sup>[3]</sup>、肺癌<sup>[4]</sup>等,然而 CCR7 是否也参与了乳腺癌淋巴结转移的形成,尚无定论<sup>[1]</sup>。为此,我们体外检测了不同乳腺癌细胞株 CCR7 的表达,并且评价了 CCR7 的表达对体外 SLC 介导的乳腺癌细胞的趋化与侵袭的影响,为进一步研究乳腺癌细胞向淋巴结转移的机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 乳腺癌细胞株 MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361 由本室常规传代培养,Trizol RNA 提取试剂盒,购自 Life Technologies 公司;M-MLV 逆转录酶,DTT, DEPC 等购自 Gibco 公司;Oligo-dT15 购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自 TakaRa 公司;人趋化因子 SLC 由医科院肿瘤研究所张叔人教授惠赠;人 CCR7 mAb 购自 R&D Systems 公司;趋化小室与多聚碳酸酯膜(8.0 μm 孔径,25 mm × 80 mm) 购自 Neuroprobe 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 乳腺癌细胞 CCR7 表达的检测** 各取 1 × 10<sup>6</sup> 的不同乳腺癌细胞,按照 Trizol RNA 提取试剂盒说明

收稿日期 2003-12-08; 修回日期 2004-07-14

作者简介:马飞(1976-)男(汉族),江苏省盐城市人,博士,主治医师。Tel. (010)67781331 Ext. 8120 Email. mcmf@sina.com

提取细胞总 RNA. 取 6  $\mu\text{g}$  总 RNA 与 0.5  $\mu\text{g}$  oligo-dT15 混合, 逆转录获得 cDNA. 以其作为模板, PCR 扩增 CCR7 中一大一小为 530 bp 的片段. 所用的上游引物为 5' - TCCTTCTCATCAGCAAGCTGT - 3', 下游引物为 5' - GAGGCAGCCCAGGTCCTTGAAG - 3'. 具体反应步骤为: 37  $^{\circ}\text{C}$  1 h, 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 完成逆转录, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 35 个循环完成 PCR 后, 再 72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 10 min. 以人 Tubulin 作为内对照, 其上游引物为 5'-CTCATCACAG-GCAAGGAAGAT-3', 下游引物为 5'-TTAAGGTAAGT-GTAGGTTGGG-3', 大小为 410 bp. 扩增产物进行 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 以各自 Tubulin 作为内对照调整上样量, 电泳图像经 Fluors Multi-Imager 凝胶成像扫描仪分析, 比较乳腺癌细胞中 CCR7 的相对表达量.

1.2.2 乳腺癌细胞趋化活性的检测 采用 Boyden 趋化小室法<sup>[5]</sup>体外行趋化活性分析, 趋化实验具体步骤如下: 在趋化小室的底孔中, 加入 27  $\mu\text{L}$  含 100 nmol/L SLC 的无血清 RPMI1640 培养液, 同时以无血清 RPMI1640 培养液作为阴性对照加入底孔中; 上面覆盖 8.0  $\mu\text{m}$  孔径的多聚碳酸酯膜, 再覆盖上顶板. 在趋化小室顶孔中加入 50  $\mu\text{L}$  乳腺癌细胞 ( $1 \times 10^9/\text{L}$  重悬于无血清 RPMI1640 培养液中); 将整个小室置 37  $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L  $\text{CO}_2$  孵育箱中作用 8 h. 取出多聚碳酸酯膜, 刮去上表面残留的乳腺癌细胞, 将整个膜置于 40 g/L 甲醛中固定, 再行姬姆萨染液染色, 每组行 3 个复孔平行检测, 每个小孔随机计数 5 个高倍视野下迁移至多聚碳酸酯膜背面乳腺癌细胞的总数, 并计算趋化指数 (chemotactic index, CI),  $\text{CI} = \text{检测组平均迁移细胞总数} / \text{阴性对照组平均迁移细胞总数}$ .

1.2.3 乳腺癌细胞侵袭活性的检测 仍然采用 Boyden 趋化小室法体外检测乳腺癌细胞的侵袭活性, 方法大致同趋化实验, 改动包括: 在趋化小室顶孔的多聚碳酸酯膜上预先铺入 Matrigel 基质胶 (每孔约 50  $\mu\text{g}$ ), 并且趋化小室在孵育箱中作用时间延长至 20 h, 每组同样行 3 个复孔平行检测, 每孔随机计数 5 个高倍视野下迁移至多聚碳酸酯膜背面的乳腺癌细胞总数. 以侵袭指数 (invasion index, II) 表示侵袭活性,  $\text{II} = \text{检测组穿过基质胶平均细胞总数} / \text{阴性对照组穿过基质胶平均细胞总数}$ .

1.2.4 CCR7 的封闭对乳腺癌细胞趋化活性和侵袭活性的影响 Boyden 趋化小室法检测趋化活性和侵袭活性的具体方法同上, 底孔中各加入 27  $\mu\text{L}$  含 100 nmol/L SLC 的无血清 RPMI1640 培养液, 顶孔中各加入 50  $\mu\text{L}$  的  $1 \times 10^9/\text{L}$  乳腺癌细胞的无血清 RP-

MI1640 培养液, 再加入 5 mg/L 的 CCR7 mAb 进行受体封闭 (此为处理组, 同时以不加 CCR7 mAb 的孔为对照组), 每组均行 5 个复孔的平行检测, 分别行趋化活性和侵袭活性检测, 并分别计算抑制率. 抑制率 = (对照组平均迁移细胞总数 - 处理组平均迁移细胞总数) / 对照组平均迁移细胞总数  $\times 100\%$ .

统计学处理: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间方差齐时采用 *t* 检验, 方差不齐时采用非参数 Mann-Whitney 检验, 统计学处理均采用 SPSS 10.0 统计软件包进行.

## 2 结果

2.1 乳腺癌细胞 CCR7 的表达 乳腺癌细胞系 MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361 中, 通过 RT-PCR 法均能扩增出人 Tubulin 基因片段和 CCR7 中选定的基因片段, 以 Tubulin 为参照, 比较各株乳腺癌细胞 CCR7 的相对含量. 结果发现, 3 株乳腺癌细胞均有不同程度 CCR7 的 mRNA 表达, 其中以 MDA-MB-361 表达量最高, MDA-MB-231 次之, MCF-7 表达量最低, 三者 CCR7 相对含量分别为 2.54, 0.43, 0.29 (Fig 1).



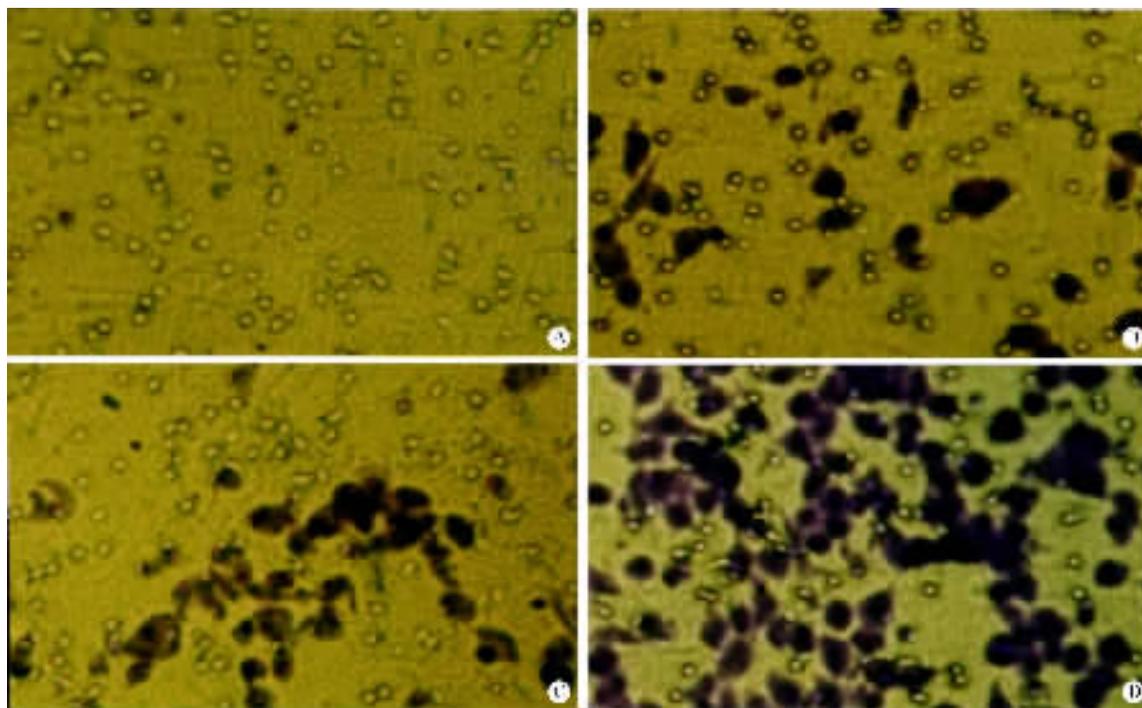
1: MDA-MB-361; 2: MCF-7; 3: MDA-MB-231.

Fig 1 CCR7 expression in breast cancer cells

图1 乳腺癌细胞 CCR7 的表达

2.2 乳腺癌细胞的趋化活性 趋化小室法催化实验发现: 在 100 nmol/L 的 SLC 作用下, 迁移至多聚碳酸酯膜背面的 3 种乳腺癌细胞数, 均明显多于各自相应的阴性对照组迁移细胞数 (Tab 1). 说明 CCR7 的配体 SLC 对 3 种乳腺癌细胞均有不同程度的趋化活性 (Fig 2).

2.3 乳腺癌细胞的侵袭活性 同样选择 100 nmol/L 浓度的 SLC 置于趋化小室底孔, 行侵袭实验检测不同乳腺癌细胞的侵袭活性. 结果发现: 在 SLC 作用下, 3 种乳腺癌细胞均能够穿透 Matrigel 基质胶到达多聚碳酸酯膜的背面, 膜背面细胞数均明显多于相应的阴性对照组, 说明在 SLC 作用下, 3 种细胞均表现出不同程度的侵袭活性 (Tab 2).



A : Control ; B : MCF-7 ; C : MDA-MB-231 ; D : MDA-MB-361.  
 Fig 2 Breast cancer cells on the back side of chemotactic membrane ×200  
 图2 趋化膜背面的乳腺癌细胞

表1 100 nmol/L SLC 作用下乳腺癌细胞的趋化活性

Tab 1 Chemotaxis of breast cancer cells treated with 100 nmol/L SLC (n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

Cell line	Migrating cell number		CI
	SLC group	Control group	
MDA-MB-361	76.3 ± 15.5*	9.0 ± 3.6	8.48
MDA-MB-231	62.3 ± 15.0*	8.7 ± 2.1	7.19
MCF-7	36.0 ± 13.2*	6.7 ± 4.0	5.40

\*P < 0.05 vs control group. CI : Chemotactic index ; SLC : Secondary lymphoid tissue chemokine.

表2 乳腺癌细胞的侵袭活性

Tab 2 Invasion of breast cancer cells (n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

Cell line	Migrating cell number		II
	SLC group	Control group	
MCF-7	48.3 ± 14.0*	3.3 ± 1.5	14.50
MDA-MB-231	34.7 ± 12.0*	3.0 ± 2.0	11.56
MDA-MB-361	19.3 ± 8.4*	2.0 ± 1.7	9.67

\*P < 0.05 vs control group. II : Invasion index ; SLC : Secondary lymphoid tissue chemokine.

#### 2.4 CCR7 的封闭对趋化活性和侵袭活性的抑制

将乳腺癌细胞经 CCR7 单克隆抗体孵育后, 分别检测 CCR7 受体的封闭对 SLC 介导的乳腺癌细胞的趋化活性和侵袭活性的影响。结果发现, CCR7 受体的封

闭均能不同程度上抑制 3 种乳腺癌细胞 SLC 介导的趋化活性和侵袭活性( Tab 3 4)。结果说明, SLC 对 3 种乳腺癌细胞的趋化活性和侵袭活性都应该都是通过其受体 CCR7 介导的。

表3 CCR7 的封闭对乳腺癌细胞趋化活性的抑制

Tab 3 Inhibition of chemotaxis of breast cancer cells by neutralizing anti-CCR7 antibody (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

Cell line	Migrating cell number		IR/%
	Control group	Treatment group	
MCF-7	47.4 ± 6.7	9.8 ± 4.8*	79.3
MDA-MB-231	50.6 ± 8.1	12.2 ± 3.7*	75.9
MDA-MB-361	75.6 ± 7.2	20.2 ± 3.7*	73.3

\*P < 0.05 vs control group. IR : Inhibition rate.

表4 CCR7 的封闭对乳腺癌细胞侵袭活性的抑制

Tab 4 Inhibition of invasion of breast cancer cells by neutralizing anti-CCR7 antibody (n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

Cell line	Migrating cell number		IR/%
	Control group	Treatment group	
MCF-7	24.8 ± 5.4	3.6 ± 2.4*	85.5
MDA-MB-231	36.4 ± 4.4	7.6 ± 2.9*	79.1
MDA-MB-361	44.2 ± 5.6	10.8 ± 2.7*	75.6

\*P < 0.05 vs control group. IR : Inhibition rate.

### 3 讨论

在生理状况下,趋化因子及其受体对血细胞在体内的迁移与定位发挥重要的调节作用<sup>[6]</sup>。然而近来研究发现,趋化因子及其受体在恶性肿瘤器官特异性转移中也同样发挥关键性作用<sup>[7]</sup>。一般认为,不同的器官由于存在不同的趋化因子,对特异性表达相应受体的肿瘤细胞产生不同的趋化或募集作用,从而导致肿瘤细胞选择性地向相应器官转移。其中研究最多的是趋化因子受体 CXCR4,它的配体 SDF-1 在淋巴结、肺脏、肝脏、骨髓等器官中高表达,肿瘤细胞表达 CXCR4 被认为与多种恶性肿瘤的淋巴结转移、肝转移、肺转移、以及骨髓转移密切相关,其中就包括乳腺癌<sup>[1]</sup>、前列腺癌<sup>[8]</sup>、淋巴瘤<sup>[9]</sup>、神经母细胞瘤<sup>[10]</sup>等。CCR6 的配体 CCL20 在肝脏高表达,CCR6 的表达可以介导恶性肿瘤细胞向肝脏转移<sup>[11]</sup>;表达 CCR10 的恶性黑色素瘤可以向表达相应配体 CTACK 的皮肤特异性转移<sup>[11]</sup>。对于趋化因子受体 CCR7,其配体 SLC、ELC 主要在淋巴结中特异性高表达,生理状况下 CCR7 及其配体介导淋巴细胞向淋巴结迁移与归巢。然而 Mashino 等<sup>[3]</sup>研究却发现,大约 2/3 的胃癌组织也表达 CCR7,并且 CCR7 的表达与胃癌淋巴结转移密切相关,Takanami<sup>[4]</sup>研究证实,CCR7 的表达是一项与淋巴结转移相关的小细胞肺癌的独立预后因素,但是在乳腺癌中,尚没有类似的临床病理研究证据。我们推测 CCR7 及其配体可能也参与了乳腺癌细胞向淋巴结特异性转移的过程。

我们体外研究结果证实:乳腺癌细胞系也表达不同程度的 CCR7,CCR7 的配体 SLC 在体外可以促进乳腺癌细胞的趋化与侵袭,并且该两种活性均可以通过 CCR7 受体的封闭而被抑制;另外,趋化活性与侵袭活性的强弱与乳腺癌细胞 CCR7 的表达水平可能相关,在 MDA-MB-361 细胞中 CCR7 表达高,表现出的趋化活性与侵袭活性也比较强。这些结果表明,CCR7 及其配体促进了乳腺癌细胞的趋化与侵袭。而趋化活性和侵袭活性正是恶性肿瘤转移的基本特性,CCR7 的表达可能就促使了乳腺癌细胞向表达相应配体的淋巴结特异性转移,当然结论的得出还需要进一步的体内研究和临床证实。

我们早期的预实验还发现,配体(SLC)的浓度明显与乳腺癌细胞的趋化活性和侵袭活性相关,浓度过高或者过低均会影响趋化活性和侵袭活性,理想的 SLC 浓度是 50~500 nmol/L。这一现象在 SLC 对 T 淋巴细胞的趋化中已经发现<sup>[12]</sup>,50~500 nmol/L 的浓度范围也恰恰就是 SLC 对 T 细胞的最佳趋化浓度<sup>[13]</sup>。这在一定程度上也说明,CCR7 及其配体对恶

性肿瘤细胞趋化活性与侵袭活性的调控也是精细的,肿瘤细胞可能就是巧妙地借鉴了淋巴细胞正常的归巢机制而实现其向淋巴结特异性地转移。

但是乳腺癌细胞 CCR7 的表达是如何被调控的,CCR7 在淋巴结转移动态过程中如何具体发挥作用,以及 CCR7 的表达能否成为特异性评价乳腺癌淋巴结转移潜能的新的分子标志物,或者预后因素等等问题尚待进一步解决<sup>[14]</sup>。

### 【参考文献】

- [1] Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001; 410: 50-56.
- [2] Ding Y, Shimada Y, Maeda M, et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 3402-3412.
- [3] Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2002; 62: 2937-2941.
- [4] Takanami. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: Correlation with lymph node metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2003; 105(2): 186-189.
- [5] 李树钧, 戚好文, 叶江枫, 等. MIP4 的突变体构建及其对嗜酸粒细胞趋化的抑制 [J]. 第四军医大学学报, 2003; 24(6): 495-498.  
Li SJ, Qi HW, Ye JF, et al. Inhibition of eosinophil chemotaxis by mutant of macrophage inflammatory protein 4 [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(6): 495-498.
- [6] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic [J]. *Nature*, 1998; 392: 565-568.
- [7] Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis [J]. *N Engl J Med*, 2001; 345: 833-835.
- [8] Taichman Rs, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone [J]. *Cancer Res*, 2002; 62: 1832-1837.
- [9] Bertolini F, Agnola CD, Mancuso P, et al. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for Non-Hodgkin's Lymphoma [J]. *Cancer Res*, 2002; 62: 3106-3112.
- [10] Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXCL chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma [J]. *J Immunol*, 2001; 167(8): 4747-4757.
- [11] Dellacasa grande J, Schreurs OJ, Hofgaard PO, et al. Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6 [J]. *Scand J Immunol*, 2003; 57(6): 534-544.
- [12] 马飞, 张叔人, 宁力, 等. 小鼠 SLC 基因真核表达载体的构建及其趋化活性鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003; 19(6): 528-530.  
Ma F, Zhang SR, Ning L, et al. Construction and characterization of its chemotactic function of eukaryotic expression vector of murine SLC gene [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2003; 19(6): 528-530.
- [13] Nomura T, Hasegawa H. Chemokines and anti-cancer immunotherapy: Anti-tumor effect of EB11-ligand chemokine (ELC) and secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) [J]. *Anticancer Res*, 2000; 20(6A): 4073-4080.
- [14] 崔大祥, 王岭, 闫小君, 等. nm23-H1 与 mucl 基因在乳腺癌中的表达及其临床意义 [J]. 第四军医大学学报, 1999; 20(9): 823-826.  
Cui DX, Wang L, Yan XJ, et al. Alteration of expression of nm23-H1 and mucl and their clinical significance [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 1999; 20(9): 823-826.