

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.009

· 基础研究 ·

RNA 干扰 CXCR4 表达抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、黏附和迁移

刘磊, 郭善禹, 顾岩, 钟强(上海交通大学医学院附属第九人民医院 普外科, 上海 200011)

[摘要] 目的: 构建 CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) RNA 干扰真核表达载体, 研究其对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖、黏附及迁移能力的抑制作用。方法: 构建针对 CXCR4 的带发夹结构的小 RNA 干扰序列, 并连接到 pGCsi-U6-Neo-GFP 载体中, 转染 293T 细胞, 筛选出干扰效率最高的表达载体。脂质体法转染 MDA-MB-231 细胞。利用 CCK8 法、细胞-基质黏附实验和划痕修复实验检测 shRNA 干扰 CXCR4 表达对 MDA-MB-231 细胞增殖、黏附和迁移能力的影响。结果: 成功构建 CXCR4-shRNA 重组质粒, 并转染 293T 细胞, 利用 RT-PCR 及 Western blotting 检测发现 CXCR4 沉默效率最高可达 81.3%。CXCR4-shRNA 转染能显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖 ($P < 0.05$) 以及细胞与细胞外基质的黏附 ($P < 0.05$)。CXCR4-shRNA 转染组 MDA-MB-231 细胞的迁移距离明显低于对照质粒组和空白对照组 ($P < 0.01$)。结论: CXCR4-shRNA 干扰载体能特异性抑制 CXCR4 的表达, 从而抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、黏附及迁移。

[关键词] CXC 趋化因子受体 4; RNA 干扰; 真核表达载体; 乳腺癌

[中图分类号] R730.54; R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0408-06

Interfering CXCR4 expression inhibits proliferation, adhesion and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells

LIU Lei, GUO Shan-yu, GU Yan, ZHONG Qiang (Department of General Surgery, The 9th People's Hospital of Shanghai, School of Medicine of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective:** To construct short-hairpin RNA (shRNA) eukaryotic expression vector targeting CXC chemokine receptor 4 (CXCR4), and to observe its impact on the proliferation, adhesion and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods:** The fragments of CXCR4 shRNA were synthesized and cloned into pGCsi-U6-Neo-GFP vector. The recombinant plasmids were transfected into 293T cells and the most effective interfering vector was selected. MDA-MB-231 cells were transfected by liposome assay. The effects of silencing CXCR4 expression by shRNA on the growth, adhesion and migration of MDA-MB-231 cells were determined by CCK8, cell-matrix adhesion and wound healing assays, respectively. **Results:** The shRNA eukaryotic expression vectors targeting CXCR4 (CXCR4-shRNA) were successfully constructed and transfected into 293T cells. RT-PCR and Western blotting results showed that the maximum inhibitory rate of CXCR4 expression was 81.3%. CXCR4-shRNA transfection significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$) and the adhesion between MDA-MB-231 cells and extracellular matrix ($P < 0.05$). Wound healing experiment showed that the migration distance of MDA-MB-231 cells in CXCR4-shRNA transfection group was significantly lower than those in the control plasmid and the blank control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** CXCR4-shRNA interfering vector can specifically inhibit CXCR4 expression, proliferation, adhesion and migration of MDA-MB-231 cells.

[Key words] CXC chemokine receptor 4; RNA interference; eukaryotic express vector; breast cancer

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 408-413]

CXC 趋化因子受体 4 (CXC chemokine receptor 4, CXCR4) 是 G 蛋白偶联受体超家族成员之一, 作为 CXC 趋化因子家族成员基质细胞衍生因子 1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 的高度特异性受体, 它参与了各种生理、病理过程, 在机体的免疫防御、抗感染等方面都发挥着重要的作用。近年研

[基金项目] 上海教育委员会科研基金资助 (No. 09yz79)。Project supported by the Research Foundation from Shanghai Education Commission (No. 09yz79)

[作者简介] 刘磊 (1983 -), 男, 河南省信阳市人, 硕士, 住院医师, 主要从事乳腺肿瘤的相关研究。E-mail: liulei1424@yahoo.com

[通信作者] 郭善禹 (GUO Shan-yu, corresponding author), E-mail: guoshuyu@sina.com

究^[1-5]表明,许多肿瘤细胞高表达 *CXCR4*,而一些器官组织高表达其相应配体 SDF-1,两者的特异性结合在肿瘤细胞发生、发展和转移过程中发挥着重要作用。RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)作为阻断基因表达的新方法,已成为当前基因治疗研究的热点。本研究通过构建以 *CXCR4* 基因为靶点的发卡式小干扰 RNA (small hairpin interference RNA, shRNA),经体外转染 293T 模型细胞,并将筛选出的 RNA 干扰 *CXCR4* 真核表达载体作用于高侵袭乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,探讨体外沉默 *CXCR4* 对乳腺癌细胞增殖、黏附、迁移能力的影响,为以 *CXCR4* 为靶点的肿瘤基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肾胚细胞 293T 由同济大学医学院分子免疫实验室惠赠,人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购于中国科学院上海细胞库。pGCsi-U6-Neo-GFP 空白质粒

由上海交通大学医学院附属瑞金医院消化研究所提供, DH5 α 感受态细胞购于上海生物工程有限公司。胎牛血清、H-DMEM 培养基购自 Gibco 公司, RPMI 1640 购自凯基生物公司,内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Nhe* I 和 T4DNA 连接酶购自 Fermentas 公司,脂质体 Lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司,PCR 扩增试剂及质粒小量提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, RNA TRIzol 抽提试剂、*CXCR4* 兔抗人多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,逆转录试剂盒购自 Takara 公司, CCK8 试剂盒购自碧云天生物科技公司, Matrigel 购自 BD Biosciences 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 质粒载体的构建

1.2.1 载体序列设计 挑选 2 条 *CXCR4* 干扰序列和 1 条阴性对照序列(表 1),依据 pGCsi-U6-Neo-GFP 空白质粒酶切位点的要求,由上海生工生物公司合成 DNA 合成引物,并经 RT-PCR 和 Western blotting 筛选具有较高干扰效率的一对。

表 1 实验用 RNA 干扰序列片段
Tab.1 Sequences of interference RNA

Gene	Target sequence	shRNA sequences
CXCR4-1	TCCTGGCCTTCA – TCAGTCT ^[6]	5'-GATCCTCCTGGCCTTCATCAGTCTTCAAGAGAAGACTGAT – GAAGGCCAGGATTTTTGGAAGCTAGCA-3'
CXCR4-2	TGCCCACCATCT – ACTCCAT ^[7]	5'-GATCTGCCACCATCTACTCCATTCAAGAGAATGGAGTA – GATGGTGGGCATTTTTGGAAGCTAGCA-3'
Negative control	AATCGCATAGCG – TATGCCGT ^[6]	5'-GATCCAATCGCATAGCGTATGCCGTTTTCAAGAGAAACGGC – ATACGCTATGCCATTTTTTTGGAAGCTAGCA-3'

1.2.2 重组质粒构建 实验步骤为:(1)退火。分别取 2 μ l 正义与反义引物,将 2 条引物等量混合,加入退火缓冲液 2 μ l 和双蒸水 4 μ l, 95 $^{\circ}$ C 退火 2 min,以 0.05 $^{\circ}$ C/s 的速度从 95 $^{\circ}$ C 降至 25 $^{\circ}$ C,使引物结合形成双链。(2)目的干扰序列载体构建。利用内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 对 pGCsi-U6-Neo-GFP 空白质粒进行双酶切,37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。1% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物并回收线性化产物。(3)连接与转化。取 1 μ l 退火的引物稀释为 100 μ l,取稀释后退火引物,以 4:1 的比例,22 $^{\circ}$ C 连接线性化载体 1 h,后转化感受态受体菌 DH5 α 。(4)重组子的筛选鉴定。取菌液涂于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆菌落,扩增后抽提质粒,进行 *Nhe* I 酶切。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分

析酶切产物,对可能重组成功的克隆送上海生物工程有限公司进行 DNA 测序。测序证实重组成功后,迅速大量扩增制备的重组载体, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 筛选 RNA 干扰 *CXCR4* 真核表达载体

1.3.1 *CXCR4* 真核表达载体转染 293T 细胞 取对数生长期的 293T 细胞按密度 1×10^5 /ml 接种于六孔板中,培养 24 h,近 70% 融合时应用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染。转染 24、48、72 h 后分别在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况,计算质粒转染率。质粒转染率(%) = 每视野绿色荧光细胞数/同视野细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.2 RT-PCR 法检测 293T 细胞中 *CXCR4* mRNA 的表达 转染 48 h 后,依据 TRIzol 法抽取 293T 细胞 mRNA。取 2 μ l mRNA,利用逆转录试剂盒 37 $^{\circ}$ C

15 min, 65 °C 5 min 逆转录成 cDNA, PCR 扩增。β-actin 引物序列: 上游引物 5'-GACAGGATGCAGAAG-GAGATTACT-3', 下游引物 5'-TGATCCACATCTGCT-GGAAGGT-3', 扩增片段长 318 bp。CXCR4 引物序列: 上游引物 5'-GGAGGCTGGCAACATAAC-3', 下游引物 5'-TGGCAGGGAACGTCTAAT-3'; 扩增片段为 227 bp。反应程序: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min, 共 30 个循环。扩增产物置于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 拍照并分析各产物灰度值, 计算干扰效率。

1.3.3 Western blotting 检测 293T 细胞中 CXCR4 蛋白表达量 转染 72 h 后, 用 RIPA 和 PMSF 抽取 293T 细胞总蛋白。BCA 法检测蛋白浓度。取 50 μg 蛋白抽提液与上样缓冲液混合, 99 °C 变性 10 min, 经 SDS-PAGE, 蛋白从凝胶中转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶封闭 2 h。加一抗(CXCR4, 1:200; β-actin, 1:500) 4 °C 过夜。次日加二抗(CXCR4, 1:10 000; β-actin, 1:10 000) 室温孵育 2 h, ECL 显影。

1.4 RNA 干扰载体转染 MDA-MB-231 细胞

依据 RT-PCR 和 Western blotting 检测结果挑选干扰效率最高的 RNA 干扰 CXCR4 真核表达载体, 转染 MDA-MB-231 细胞, 2 d 后加入含有 500 mg/L G418 的培养液进行筛选。10~14 d 后, 利用有限稀释法筛选获取单克隆抗性细胞, 200 mg/L G418 维持培养并扩增。

1.5 CCK8 法检测 CXCR4 沉默对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

96 孔板每孔接种 1×10^5 /ml MDA-MB-231 细胞, 常规培养 24 h 后, 从各孔中取出 100 μl 培养液, 加入 10 μl/孔的 CCK8, 37 °C 孵育 1 h, 在 450 nm 波长处测定各孔光密度值, 连续检测 5 d。每样品设 5 个平行孔, 实验重复 3 次。

1.6 细胞基质黏附实验检测 MDA-MB-231 细胞的黏附能力

以纤维连接蛋白(fibronectin, FN)模拟细胞外基质环境, BSA 为对照基底膜。取 96 孔培养板分别包被 20 mg/L 的 FN 和 10 g/L 的 BSA, 每孔 50 μl, 置超净台内风干, 置 4 °C 冰箱备用。使用前 PBS 洗 2 次重新水化, 每孔加入 50 μl 含 10 g/L BSA 的无血清培养液, 37 °C 30 min。收集对数生长期细胞悬液于含 0.1% BSA 的 RPMI 1640 培养基中, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml。每孔加入细胞悬液 100 μl, 37 °C 孵育, 分别于 30、60、90 min 时弃培养液, 用无血清培养液洗 3 次, 除去未黏附的细胞, 每孔加入 90 μl 无血清培养液和 10 μl CCK8 试剂, 37 °C 孵育

1 h, 用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔光密度值(D)。以 BSA 组细胞 D 值为参照, 计算各实验组细胞黏附率。黏附率(%) = 实验组细胞 D 值/BSA 组细胞 D 值 × 100%。每种细胞各设 6 个平行孔, 实验重复 3 次。

1.7 划痕实验检测 MDA-MB-231 细胞的迁移能力

以 2×10^6 /ml 的密度接种各组 MDA-MB-231 细胞于 6 孔板, 细胞融合达 80% 后, 利用细胞刮刀在孔中央垂直划痕, 并于镜下记录划痕区相对位置。无血清培养基洗细胞 3 次, 加入含 10% 新生牛血清的无抗生素 RPMI 1640 培养液, 继续培养 24 h, 倒置显微镜下摄影。沿划痕边缘等距离间隔作 4 个标记作为数据测定点, 并根据原始细胞致伤区距离计算出细胞实际迁移距离, 测量时取平均值。每组实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

使用 SAS8.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 干扰重组质粒鉴定结果

将构建所得 RNA 干扰载体进行酶切, 进行琼脂糖凝胶电泳。结果发现, 重组质粒可被切成 5 600 bp 和 650 bp 的两条 DNA 片段。CXCR4 RNA 干扰片段均与预期一致(图 1)。CXCR4 RNA 干扰片段测序结果与设计序列完全相同(测序图略)。

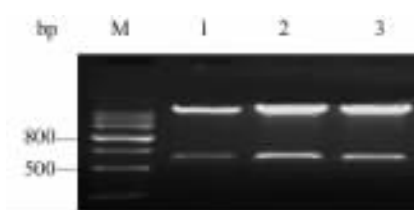


图 1 CXCR4 RNA 干扰重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant CXCR4 interfering RNA plasmid by restriction enzyme digestion

M: Marker; 1: pGCsi-CXCR4-1/ShRNA;

2: pGCsi-CXCR4-2/ShRNA; 3: Negative control

2.2 sRNA 干扰重组质粒对 293T 细胞的转染率

将各组质粒转染 293T 细胞, 24、48 和 72 h 后在倒置荧光显微镜进行观察。结果显示, 以转染 72 h 的绿色荧光最强, 转染率达 90% 左右(图 2)。

2.3 RNA 干扰抑制 293 细胞中 CXCR4 的表达

2.3.1 293T 细胞中 CXCR4 mRNA 的表达 质粒转染 48 h 后, CXCR4 mRNA 相对表达量, pGCsi-CX-

CR4-1/ShRNA 为 1.13 ± 0.19 、pGCsi-CXCR4-2/ShRNA 为 0.30 ± 0.09 、阴性对照组为 1.28 ± 0.11 、空白对照组为 1.60 ± 0.61 。阴性对照组与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明阴性对照组细胞未发生针对 CXCR4 mRNA 的干扰作用。pGCsi-CXCR4-2/ShRNA 与阴性对照组和空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),沉默效率为 81.3%(图 3)。

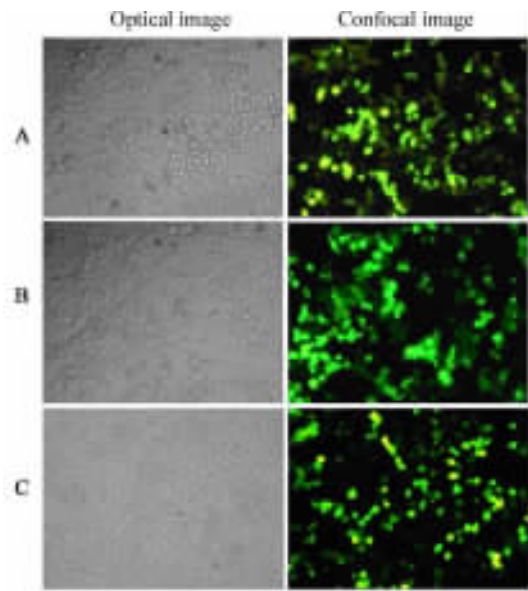


图 2 RNAi CXCR4 载体转染 293T 细胞的效率 (×100)

Fig. 2 Transfection efficiency of RNAi CXCR4 vector in 293T cells (×100)

A: pGCsi-CXCR4-1/ShRNA; B: pGCsi-CXCR4-2/ShRNA; C: Negative control

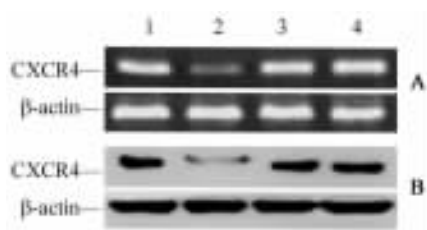


图 3 RNA 干扰对 293T 细胞中 CXCR4 表达的抑制

Fig. 3 Inhibition of CXCR4 expression in 293T cells by RNA interference

1: pGCsi-CXCR4-1/ShRNA; 2: pGCsi-CXCR4-2/ShRNA; 3: Negative control; 4: Blank control; A: RT-PCR; B: Western blotting

2.3.2 293T 细胞中 CXCR4 蛋白的表达 质粒转染 72 h 后,各组 CXCR4 蛋白经检测显示,pGCsi-CXCR4-2/ShRNA 的蛋白表达水平相对最低,阴性对照组与空白对照组的 CXCR4 蛋白表达未见明显

差异,结果与 RT-PCR 一致(图 3)。

2.4 沉默 CXCR4 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖

CCK8 实验结果显示,CXCR4-shRNA 转染组与空白对照组和阴性对照组 MDA-MB-231 细胞增殖的比较均有统计学意义($P < 0.05$),但空白对照组与阴性对照组之间无统计学差异($P > 0.05$),即 RNA 干扰沉默 CXCR4 基因表达能明显抑制 MDA-MB-231 细胞增殖(图 4)。

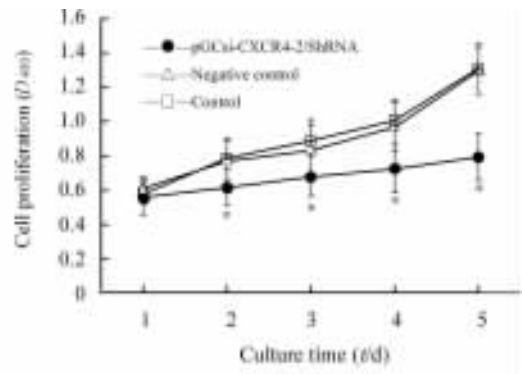


图 4 沉默 CXCR4 表达抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖

Fig. 4 Silencing CXCR4 expression inhibited proliferation of MDA-MB-231 cells

* $P < 0.05$ vs negative control or control

2.5 沉默 CXCR4 抑制 MDA-MB-231 细胞的黏附

CXCR4-shRNA 转染组与阴性对照组和空白对照组相比,黏附细胞明显减少($P < 0.05$),而阴性对照组与空白对照组之间比较未见明显差别($P > 0.05$),说明 CXCR4 基因表达下调能显著抑制乳腺癌细胞体外黏附能力(表 2)。

2.6 沉默 CXCR4 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移

划痕修复实验结果显示,CXCR4-shRNA 转染组 MDA-MB-231 细胞的迁移距离为 (0.42 ± 0.09) mm,较阴性对照组的 (2.16 ± 0.44) mm 和空白对照组的 (2.38 ± 0.56) mm 明显降低($P < 0.01$),CXCR4 基因表达下调能显著抑制细胞的迁移能力。

3 讨论

乳腺癌是女性最常见恶性肿瘤之一,近年来发病率呈不断上升和年轻化趋势,而肿瘤复发转移是影响乳腺癌患者预后的重要因素。涉及恶性肿瘤复发和转移的因素很多,其中包括细胞基因调控的改变、多种细胞因子的异常分泌、肿瘤免疫耐受能力的增强、细胞外基质的降解以及黏附能力的抑制等。

表2 沉默 CXCR4 表达抑制 MDA-MB-231 细胞的黏附(%)
 Tab.2 Silencing CXCR4 expression inhibited adhesion of MDA-MB-231 cells(%)

Group	30 min	60 min	90 min
pGCsi-CXCR4-2/ShRNA	5.97 ± 2.41 *	6.64 ± 2.80 *	7.81 ± 0.77 *
Negative control	12.04 ± 3.31	13.43 ± 2.50	14.51 ± 5.44
Blank contrl	12.42 ± 3.49	14.37 ± 1.73	15.49 ± 1.38

* $P < 0.05$ vs negative control or blank control

CXCR4 是首先用 *IL-8R* 基因探针从人血单核细胞基因库中分离提纯的一个高度保守的 G 蛋白偶联受体, α 螺旋跨膜 7 次, 编码 352 个氨基酸; 在人体内, 编码基因位于人染色体 2q21, 是 SDF-1 的高度特异性受体^[8]。有关 CXCR4 的早期研究^[9] 主要围绕其在 HIV 感染上的重要作用, 因为 CXCR4 和 CD4 分子是 HIV 感染人体细胞所必需的共同受体, 对 HIV 病毒进入 T 细胞和扩散等起重要作用。CXCR4 在多种肿瘤细胞中普遍表达^[10-12]。而 CXCR4/SDF-1 轴在介导恶性肿瘤的生长、黏附、浸润和转移中也发挥着重要作用^[13-15]。Muller 等^[16] 发现, 在乳腺癌原发灶和转移灶中的癌细胞均呈 CXCR4 高表达; 此外, 乳腺癌最常见的转移部位肺、肝脏和骨髓也都相应地高表达其配体 SDF-1, 二者结合后能促进调节肌动蛋白的聚合和伪足的形成, 从而导致肿瘤细胞趋化和侵袭。Smith 等^[16] 实验也证实, 将 CXCR4 的拮抗剂 AMD3100 注射入小鼠尾静脉, 可延缓乳腺癌细胞在小鼠肺部的转移。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi) 技术作为基因治疗方法中的一种, 是由内源性或人为转染进入细胞的小干扰双链 RNA 诱导产生的一种转录后基因沉默现象, 即双链 RNA 介导的同源 mRNA 特异性降解过程^[18-20]。它能高效特异地终止目的蛋白的翻译过程, 阻断肿瘤相关基因的表达, 抑制这些基因表达的功能, 达到治疗肿瘤的目的^[21]。本实验利用 shRNA 技术通过发卡结构进行序列特异性降解, 从而有效封闭 CXCR4 mRNA 和降低其蛋白表达水平; 利用 293T 模型细胞成功筛选出干扰效率达 81.3% 的一组 CXCR4-shRNA 序列, 其与空白对照组、阴性对照组比较, 差异均有统计学意义。

为进一步研究 CXCR4 基因沉默对乳腺癌细胞恶性生物学特性的影响, 本实验将筛选出的 CXCR4-shRNA 序列转染到 MDA-MB-231 细胞, 并利用 CCK8 试剂盒、细胞黏附实验和划痕实验检测 shRNA 干扰前后细胞肿瘤学特性的变化。CCK8 法可检测体外细胞的增殖能力, 结果显示, 与阴性和空白

对照组相比, CXCR4-shRNA 组细胞的增殖速率明显受到抑制($P < 0.05$)。该结果提示 CXCR4 在乳腺癌细胞生长和增殖中起重要作用的同时, 也说明本实验筛选的表达载体能显著抑制乳腺癌细胞的体外增殖, 这与 Lapteva 等^[22] 的研究结果一致。

癌细胞浸润转移主要包括黏附、降解和移动 3 个步骤。Yukiko 等^[23] 研究表明, CXCR4 与其配体 SDF-1 结合可下调上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin) 的表达, 抑制乳腺癌细胞间的黏附能力, 促进肿瘤细胞的转移, 而采用 CXCR4 单克隆抗体可阻断这一效应^[24]。Zeelenberg 等^[25] 实验亦证实, SDF-1/CXCR4 能够引起乳腺癌细胞内骨架蛋白的聚合与再分布, 从而调节细胞的运动和迁移。而 CXCR4 拮抗剂可使癌细胞转移能力显著降低, 能阻断乳腺癌细胞向肺和骨等器官的浸润^[26-27]。本实验利用细胞-基质黏附实验和划痕修复实验来检测 CXCR4-shRNA 对乳腺癌细胞黏附和迁移能力的影响, 结果显示, 抑制 CXCR4 表达能明显降低癌细胞的基质黏附能力和迁移能力($P < 0.05$), 从而进一步说明 CXCR4 表达增高可导致上皮细胞结构不稳定, 促进癌细胞侵袭和远处转移。

总之, 本实验利用 RNA 干扰技术成功构建了沉默 CXCR4 基因的真核表达载体, 并初步证明了 CXCR4-shRNA 能显著抑制乳腺癌细胞的体外增殖、黏附及迁移能力, 为进一步从体内途径探讨 CXCR4 在乳腺癌生长和转移中的作用机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Kulbe H, Levinson NR, Balkwill F, Wilson JL. The chemokine network in cancer - much more than directing cell movement [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5/6): 489-496.
- [2] Kuhlmann CR, Schaefer CA, Reinhold L, Tillmanns H, Erdogan A. Signalling mechanisms of SDF-induced endothelial cell proliferation and migration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(4): 1107-1114.
- [3] Wang J, Wang J, Sun Y, Song W, Nor JE, Wang CY, et al. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine

- axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis [J]. *Cell Signal*, 2005, 17(12): 1578-1592.
- [4] Chu H, Zhou H, Liu Y, Liu X, Hu Y, Zhang J. Functional expression of CXC chemokine receptor-4 mediates the secretion of matrix metalloproteinases from mouse hepatocarcinoma cell lines with different lymphatic metastasis ability [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 197-205.
- [5] 蔡永芳, 辛建保, 石新兰, 田淑君. 非小细胞肺癌中 SDF-1、CXCR4 的表达及临床意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(8): 578-580.
- [6] Hong JS, Pai HK, Hong KO, Kim MA, Kim JH, Lee JI, et al. CXCR-4 knockdown by small interfering RNA inhibits cell proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38(2): 214-219.
- [7] Wen DS, Zhu XL, Guan SM, Wu YM, Yu LL, Wu JZ. Silencing of CXCR4 inhibits the proliferation, adhesion, chemotaxis and invasion of salivary gland mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells *in vitro* [J]. *Oral Oncol*, 2008, 44(6): 545-554.
- [8] David NB, Sapède D, Saint-Etienne L, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudière C, et al. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 16297-16302.
- [9] Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(5): 3378-3385.
- [10] Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, et al. Expression of CXCR4 and SDF-1(SDF-1) in human prostate cancers(PCa) *in vivo* [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(3): 462-473.
- [11] Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12): 1676-1686.
- [12] Koshiha T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, et al. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: A possible role for tumor progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3530-3535.
- [13] Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth [J]. *Cancer Lett*, 2007, 256(2): 137-165.
- [14] Sun YX, Fang M, Wang J, Cooper CR, Pienta KJ, Taichman RS. Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2007, 67(1): 61-73.
- [15] Sutton A, Friand V, Brulé-Donneger S, Chaigneau T, Ziol M, Sainte-Catherine O, et al. Stromal cell-derived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5(1): 21-33.
- [16] Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
- [17] Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnicka-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(23): 8604-8612.
- [18] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [19] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188-200.
- [20] Aravin AA, Klenov MS, Vagin VV, Rozovskii IaM, Gvozdev VA. Role of double-stranded RNA in eukaryotic gene silencing [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2002, 36(2): 240-251.
- [21] Sanguino A, Lopez-Berestein G, Sood AK. Strategies for *in vivo* siRNA delivery in cancer [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8(3): 248-255.
- [22] Lapteva N, Yang AG, Sanders DE, Strube RW, Chen SY. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth *in vivo* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(1): 84-89.
- [23] Ueda Y, Neel NF, Schutyser E, Raman D, Richmond A. Deletion of the COOH-terminal domain of CXC chemokine receptor 4 leads to the down-regulation of cell-to-cell contact, enhanced motility and proliferation in breast carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(11): 5665-5675.
- [24] Yoon Y, Liang Z, Zhang X, Choe M, Zhu A, Cho HT, et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(15): 7518-7524.
- [25] 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.
- [26] Huang EH, Singh B, Cristofanilli M, Gelovani J, Wei C, Vincent L, et al. A CXCR4 antagonist CTCE-9908 inhibits primary tumor growth and metastasis of breast cancer [J]. *J Surg Res*, 2009, 155(2): 231-236.
- [27] Richert MM, Vaidya KS, Mills CN, Wong D, Korz W, Hurst DR, et al. Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(3): 761-767.

[收稿日期] 2010 - 04 - 22

[修回日期] 2010 - 06 - 05

[本文编辑] 王莹