

## CXCR4-siRNA 表达载体的构建及其对体外乳腺癌细胞侵袭能力的影响

冯俊飞, 董 坚\*, 洪 敏, 高嫦娥

(昆明医学院 第一附属医院 生物治疗中心, 云南 昆明 650032)

**摘要:**目的 构建趋化因子受体(CXCR4)小分子干扰RNA(siRNA)表达载体,研究其对体外乳腺癌细胞侵袭能力的影响。方法 选择CXCR4高表达的乳腺癌MDA-MB-231细胞系,设计合成人CXCR4基因不同靶点的能编码siRNA的2条双链DNA序列,克隆到真核表达载体pGE-1-U6/kna中构建siRNA表达载体,体外脂质体介导转染MDA-MB-231细胞,用Western blot分析CXCR4蛋白表达,Transwell小室检测细胞的侵袭能力。结果 成功构建了CXCR4-siRNA表达载体,瞬时转染乳腺癌细胞后能显著降低CXCR4的蛋白表达,可有效抑制人类乳腺癌MDA-MB-231细胞的侵袭能力。结论 CXCR4-siRNA表达载体通过降低CXCR4基因的蛋白表达能显著抑制人类乳腺癌细胞的侵袭能力,有望为乳腺癌转移的基因治疗开辟新途径。

**关键词:** 乳腺癌; CXCR4; 小干扰RNA; RNA干扰

中图分类号: R 737.9 文献标志码: A

## Construction of a siRNA expression plasmid targeting CXCR4 and its effect on the invasion capability of the breast cancer cells *in vitro*

FENG Jun-fei, DONG Jian\*, HONG Min, GAO Chang-e

(Biotherapy Research Center, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

**Abstract: Objective** To construct and identify the siRNA eukaryotic expression vector targeting gene CXCR4 chemokine receptor-4 and explore its role in invasion process of breast cancer cells *in vitro*. **Methods** Two siRNAs were designed and synthesized according to the coding sequence of CXCR4 gene and cloned into eukaryotic expression plasmid pGE-1-U6/kna. The constructed CXCR4-siRNA expression vector was transfected into MDA-MB-231 cells by liposome. Western blot was used to evaluate the suppression of CXCR4 expression in different groups. The invasion and migration of MDA-MB-231 cells were evaluated by cell invasion assay *in vitro*. **Results** Enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the CXCR4-siRNA expression vector was successfully constructed. After transfection, the CXCR4-siRNA obviously suppressed the expression of CXCR4 compared with control groups and the ability of cell migration was decreased markedly. **Conclusion** CXCR4-siRNA expression vector can effectively suppress CXCR4 expression in the breast cancer cells and decrease potential of cell invasion, which may provide a novel strategy for gene therapy of breast cancer metastasis.

**Key words:** breast cancer; CXCR4; siRNA; RNAi

收稿日期: 2008-12-26 修回日期: 2009-06-26

基金项目: 云南省科技条件平台建设项目“生物治疗研究中心”(2007DA006)

\*通信作者(corresponding author): dongjian18@yahoo.com

对乳腺癌转移的束手无策是乳腺癌患者死亡率高的主要原因。恶性肿瘤的转移与多种基因的异常表达有关,其中某些基因在转移进程中起关键作用。当靶器官中配体趋化因子基质细胞衍生因子1(stromal cellderivedfactor-1,SDF-1)的表达高于原发乳腺癌组织,CXCR4(CXC chemokine receptor-4)阳性的人乳腺癌细胞系会逆着SDF-1浓度梯度差发生趋化反应,从而发生了转移<sup>[1]</sup>。

通过导入外源性的线性双链 siRNA 降低 CXCR4 的表达可以在体外抑制乳腺癌细胞的迁移<sup>[2]</sup>。但此 siRNA 在人的肿瘤细胞中作用不稳定,很难保证 siRNA 作用的持续性<sup>[3]</sup>。为了延长作用时间,提高 RNA 干扰效果,本研究将双链 siRNA 连接入真核表达载体,观察其在细胞内抑制 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力。旨在实现对乳腺癌转移的抑制,并进一步探索乳腺癌转移的机制。

1 实验

1.1 材料

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系(中国科学院上海细胞生物研究所)。L15 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物制品公司)。脂质体 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen 公司)。单链 DNA 的合成及合成载体的测序鉴定均由北京三博远志生物技术公司完成。质粒(Stratagene 公司);限制性内切酶 BamH I、Xba I和 T4 DNA 连接酶(Takara 公司);兔抗人 CXCR4 单克隆抗体及其二抗,抗 β-actin 单克隆抗体及其二抗(Chemicon 公司)。Transwell 小室(Millipore 公司)。其余试剂均为实验室常规使用国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 siRNA 序列设计:NCBI 数据库中查找人 CXCR4 基因全序列(NM-001008540),从 CXCR4 基因的编码区中寻找符合设计原则的靶序列,通过 BLAST 软件确定与其他非相关基因无同源性,选出 2 条符合要求的靶序列。按照 pGE-1 载体的设计要求设计能编码 siRNA 的 DNA 模板链。寡核苷酸序列两端包含 BamH I、Xba I 酶切位点互补的黏端序列,中间包含一个8 bp的 LOOP 结构(表 1)。

1.2.2 siRNA 表达载体的构建及鉴定:pGE-1 质粒经内切酶 BamH I、Xba I 双酶切过夜,电泳,回收线性质粒。将 siRNA 各自的模板链退火得到 2 条双链的 DNA 模板链,将其定向克隆至 pGE-1 构建重组质粒,分别命名为 CXCR4-siRNA 1 和 CXCR4-siRNA 2。BamH I、Xba I 双酶切鉴定并基因测序。

1.2.3 实验分组:共分 4 组:1 组为空白对照组,不转染;2 组为转染重组质粒 CXCR4-siRNA 1;3 组为转染重组质粒 CXCR4-siRNA 2;4 组为共转染重组质粒 CXCR4-siRNA 1 和 CXCR4-siRNA 2。

1.2.4 细胞培养及转染:MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 L15 培养液,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育。收集对数生长期的细胞铺板。参照 Lipofectamine™2000 操作说明,按照表 2 方案分别转染。

1.2.5 细胞生长曲线的测定:取对数生长期的各细胞,调节细胞浓度为1 × 10<sup>4</sup> mL<sup>-1</sup>接种于 24 孔细胞培养板中,常规培养 7 d,每天取 1 组(7 个平行孔)细胞,行细胞计数。实验重复 3 次,取均数绘制 MDA-MB-231 细胞转染前后的生长曲线,作统计学对比。比较转染前后细胞生长曲线是否有差异。

表 1 靶序列及所设计的模板链  
Table 1 Designed of targeting sequences

targeting sequences	sense/antisense strands
siRNA 1 GGTGGTCTATGTTGGCGTCTG	sense strands:5'-GATCCCGGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGAAGCTTCGACACGCCAACATAGACCACTTTTTT-3'
	antisense strands:5'-CTAGAAAAAAGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGCAAGCTTCCAGACGCCAACATAGACCACCCGG-3'
siRNA 2 GGCAGTCCATGTCATCTAC	sense strands:5'-GATCCCGGGCAGTCCATGTCATCTACGAAGCTTGCTAGATGACATGGACTGCCTTTT-3'
	antisense strands:5'-CTAGAAAAAAGGCAGTCCATGTCATCTACCAAGCTTCGTAGATGACATGGACTGCCCCGG-3'

表2 实验分组及转染方案

Table 2 Transfection of MDA-MB-231 cells		
group	CXCR4-siRNA (μg)	lipofectamine™ 2000 (μL)
1	-	-
2	CXCR4-siRNA 1 3	6
3	CXCR4-siRNA 2 3	6
4	CXCR4-siRNA 1 1.5	6
	CXCR4-siRNA 2 1.5	

1.2.6 Western blot 分析:转染48 h后,收集细胞,提取蛋白质。Bradford 法测定蛋白浓度,取蛋白质50 μg以 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电转移蛋白到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉37 ℃ 封闭2 h,TBST 洗液洗涤 3 次膜,每次 10 min。用兔抗人 CXCR4单克隆抗体(1:500)和小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体(1:20 000)4 ℃ 杂交过夜,洗膜,用过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(1:2 000)和羊抗小鼠二抗(1:2 000)37 ℃ 孵育1 h,洗膜后与 ECL 化学发光试剂反应1 min,暗室曝光1 min,定影30 min,用 Bio-Rad 图像分析系统照相,用 Quantity One 软件分析,以相应蛋白条带的灰度值/β-actin 蛋白条带的灰度值表示相对蛋白含量。实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 小室侵袭实验:按照60 μL/孔向每个 24 孔悬挂式 Transwell 小室的上室中加入1:6稀释后的 Matrigel 基质,37 ℃ 干燥4~5 h。分别用含有1%胎牛血清的 L15 细胞培养基以 $0.6 \times 10^4$ 的浓度稀释对数生长期的各组 MDA-MB-231 细胞。向各组每个 Transwell 小室的上室加入被稀释的相应的单细胞悬液100 μL;下室中加入含 10% 胎牛血清的 L15 培养基600 μL。37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养30 h,用姬姆萨染液

(1:20)染色15 min,用棉棒擦去基质上未侵袭的细胞,将吊桶倒置在显微镜下,随机计数 5 个视野的细胞数,取平均值进行统计处理,每组计数 3 份样本。

1.3 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 siRNA 表达载体的构建及鉴定

酶切鉴定结果显示,克隆中有大小约为60 bp的插入片段(图1)。进一步序列测定显示,插入位置和方向及序列大小与预期相符,证明克隆构建完全正确。

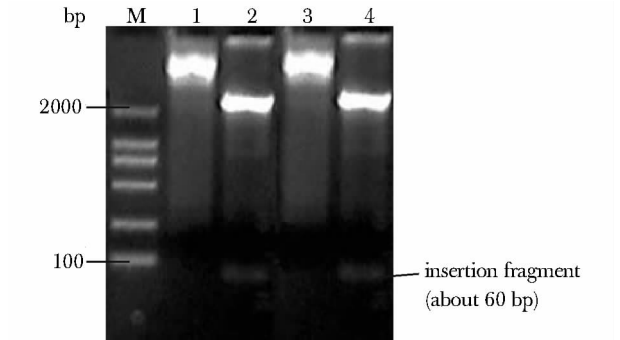


图1 CXCR4-siRNA 表达载体的酶切鉴定  
Fig 1 Restriction endonuclease analysis of CXCR4-siRNA

M. marker; 1. CXCR4-siRNA1; 2. CXCR4-siRNA1 digested with BamH I and Xba I; 3. CXCR4-siRNA2; 4. CXCR4-siRNA2 digested with BamH I and Xba I

2.2 细胞生长曲线的测定

用细胞计数法绘制转染前后各组 MDA-MB-231 细胞的生长曲线并进行比较。表3显示2株转染重组 siRNA 载体的细胞与原代细胞比较,细胞生长曲

表3 转染前后各组 MDA-MB-231 细胞生长情况比较

Table 1 Cell growth analysis for cell viability of MDA-MB-231 cells before and after transfected with recombinant plasmids( $\bar{x} \pm s$ , cell member/mL, <i>n</i> = 3)			
time(d)	MDA-MB-231	CXCR4-siRNA 1	CXCR4-siRNA 2
1	$1.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$
2	$1.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$	$1.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$ *	$1.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$ *
3	$1.6 \times 10^4 \pm 4 \times 10^2$	$2.0 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$ *	$1.6 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$ *
4	$4.0 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$	$4.5 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$ *	$4.1 \times 10^4 \pm 1 \times 10^2$ *
5	$7.2 \times 10^4 \pm 6 \times 10^2$	$8.2 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$ *	$8.0 \times 10^4 \pm 2 \times 10^2$ *
6	$8.7 \times 10^4 \pm 4 \times 10^2$	$9.0 \times 10^4 \pm 4 \times 10^2$ *	$8.9 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$ *
7	$10.0 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$	$10.8 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$ *	$10.8 \times 10^4 \pm 3 \times 10^2$ *

\**P* < 0.05 compared with MDA-MB-231 group

线较为一致( $P>0.05$ ),提示转染对MDA-MB-231的生长无影响。

2.3 蛋白质提取和 Western blot

空白对照组、CXCR4-siRNA1 转染组、CXCR4-siRNA2 转染组、CXCR4-siRNA1 和 CXCR4-siRNA2 共转染组的 CXCR4/ $\beta$ -actin 分别为  $0.4532 \pm 0.0012$ 、 $0.2103 \pm 0.0030$ 、 $0.3922 \pm 0.0021$  和  $0.1089 \pm 0.0011$ 。各组间有明显差异( $P<0.05$ ),且 CXCR4-siRNA1 和 CXCR4-siRNA2 共转染组的效果要明显优于二者分别转染的各组(图2)。

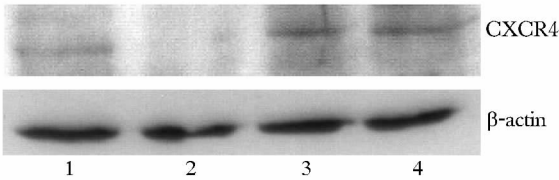


图2 Western blot 分析 CXCR4 蛋白表达情况  
Fig 2 Western blot analysis of CXCR4 protein expressions

1. CXCR4-siRNA1; 2. CXCR4-siRNA1 + 2;  
3. CXCR4-siRNA2; 4. control group

2.4 Transwell 小室实验

各组细胞穿过 Matrigel 基质的细胞数不同(表4),CXCR4-siRNA1 转染组、CXCR4-siRNA2 转染组、CXCR4-siRNA1 和 CXCR4-siRNA2 共转染组细胞的穿膜细胞数均少于空白对照组( $P<0.05$ )。

表4 细胞体外侵袭能力比较

Table 4 Invasion of MDA-MB-231 cells transfected with CXCR4-siRNAs( $\bar{x} \pm s$ , cells/mm<sup>2</sup>,  $n=5$ )

group	invasion number of cell
control	48.3 ± 1.7
CXCR4-siRNA1	18.7 ± 2.4 *
CXCR4-siRNA2	24.5 ± 1.9 *
CXCR4-siRNA1 + 2	9.1 ± 3.6 *

\* $P<0.05$  compared with control group

3 讨论

乳腺癌转移缩短了无病生存期,增加了病死率,是目前临床上的治疗难点。乳腺癌转移受多基因调

控,构成一个重要的基因调控系统。以这些调节基因为靶标,阻断基因调控的某个或某些环节,对乳腺癌转移的治疗有重大意义。

CXCR4 的高表达造成的乳腺癌转移与乳腺癌患者的低生存率密切相关<sup>[4]</sup>,干预阻断 SDF-1/CXCR4生物轴的措施在一定程度上能减少乳腺癌远处转移的发生率<sup>[5-6]</sup>。已有报道称,通过导入外源性的线型双链 siRNA 沉默 CXCR4 可以成功抑制乳腺癌在裸鼠体内向肺脏转移<sup>[2]</sup>。为了提高转染效率,延长作用时间,我们成功构建了 CXCR4-siRNA1 和 CXCR4-siRNA2 两个载体。

研究表明,在靶基因上寻找理想的 siRNA 序列时,越靠近靶基因的 3'端,其基因沉默效果可能越好<sup>[7]</sup>。我们所选 CXCR4 基因的干扰靶点 siRNA1 (474-494)比 siRNA2 (343-362)更靠近 3'端。理论上 CXCR4-siRNA1 干扰效果要比 CXCR4-siRNA2 好。为了进一步验证,我们选择高表达 CXCR4 的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞作为研究对象。相同条件转染后,Western blot 和肿瘤细胞的小室侵袭实验结果均证明干扰有效,结果与通过 RNAi 技术降低 CXCR4 表达可以抑制乳腺癌转移的研究成果<sup>[2]</sup>相一致。同时结果证明,由于 siRNA1 比 siRNA2 更远离靶基因 CXCR4 的起始密码子而靠近 3'端,重组子 CXCR4-siRNA1 干扰效果要好于 CXCR4-siRNA2。

而令我们感兴趣的是,Western blot 和小室侵袭试验的结果都显示, CXCR4-siRNA1 和 CXCR4-siRNA2共转染的 RNAi 效果要明显好于二者单独转染。这是由于靶基因转录的长 mRNA 通常会形成二、三级的高级结构,使得 RNAi 片段不能有效地与之结合<sup>[8]</sup>,因此,在整个 CXCR4 基因中,不同靶点跟与之互补的 siRNA 特异性结合效率不同,所产生的干扰效果也有差别。如果多个靶点同时进行干扰,可以避免因某一个靶点结合率低而导致干扰效率的削弱。由此可见,在 RNAi 技术的应用中,针对某个靶基因的不同位置的多个靶点同时进行干扰的效果要优于单个靶点的干扰效果。

实验结果不仅证实了 CXCR4 基因与乳腺癌转移密切相关,而且使我们对 RNAi 的应用有了一个新的了解,为我们后续的体内实验奠定了实验基础。

## 参考文献:

- [1] Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, *et al.* 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.
- [2] Liang Z, Wu H, Reddy S. *et al.* Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(3):542-546.
- [3] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411(6836):494-498.
- [4] LI YM, Pan Yong, Wei Yongkun, *et al.* Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(5):459-469.
- [5] Yang Jiyun, Zhang Ben, Lin Yin, *et al.* Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits SDF-1alpha-induced migration of non-small cell lung cancer by decreasing CXCR4 expression [J]. *Cancer Lett*, 2008, 269(1):46-56.
- [6] Liang Zhongxing, Wu Tao, Lou Hong, *et al.* Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4 [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(14):4302-4308.
- [7] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, *et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs [J]. *Methods*, 2002, 26(2):199-213.
- [8] Jason W, James E. RNAi 中的 Dicer 酶:体内作用和体外应用 [M]//K. 阿帕萨尼主编;殷勤伟等译. *RNA 干扰技术——从基础医学到药物开发*. 北京:科学出版社, 2007:14-39.

---

## 《医学细胞生物学实验指导与习题集》(第2版)出版

《医学细胞生物学实验指导与习题集》是医学细胞生物学配套教材。该教材的出版有诸多的好处。首先,它表明细胞生物学不只是一门纯理论课,而且有强的实践性。细胞生物学实验不仅可以佐证理论的科学性、严密性,而且丰富了或补充了理论知识,使医学细胞生物学成为一门立体性的学科。其次,通过实验,学生们不仅可以巩固课堂学到的理论知识,还具备一定的实际动手操作能力,成为较全面的人才。第三,该教材所选的实验内容都是细胞生物学中最基本、最重要的技术方法,一旦使用者掌握了这些技术方法,他们便获得了从事科学研究的基本能力,为今后更深层次的科学探索奠定了基础。

本版的实验内容如下:显微镜技术、光镜标本制作技术、细胞结构与成分的显示技术、细胞生理学技术、细胞培养和分析、细胞成分的分离与分析、细胞工程基础技术、细胞凋亡测定、染色体技术、分子细胞生物学技术。由上可知,其内容包括最经典的技术方法,也包括当代最新的技术方法。

习题集主要以陈誉华教授主编的《医学细胞生物学》第4版为蓝本,萃其精粹,模拟考试,无疑对学生巩固课堂所学以及取得考试好成绩起着事半功倍的作用。

本书由北京协和医学院章静波任主编,汕头大学医学院黄东阳、中国医科大学方瑾任副主编,有19个院校的教师参与编写,是一部技术方法的力作,理论学习的指南。更多信息可访问 [www.pmph.com](http://www.pmph.com)。

章静波