

CXCR2 过表达结肠癌细胞株的建立及生物学功能的初步研究

刘津麟 庞珍珍 金卫东

摘要 **目的** 建立人 SW1116 结肠癌细胞中稳定过表达 CXCR2 稳定细胞株,分析过表达 CXCR2 基因对人结肠癌 SW1116 细胞迁移能力的影响。**方法** 分离健康人外周血单个核细胞,Trizol 提取总 RNA 并反转录为 cDNA,PCR 扩增 CXCR2 的 CDS 序列,连接至慢病毒穿梭质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1 多克隆位点,进行 CXCR2 基因的克隆,构建 pLVX-IRES-ZsGreen1-CXCR2 重组质粒。重组质粒与包装质粒通过磷酸钙共转染法包装出慢病毒上清并对人 SW1116 结肠癌细胞进行感染。real-time PCR 及 Western blot 方法分析转染 pLVX-IRES-ZsGreen1-CXCR2 重组质粒的人 SW1116 结肠癌细胞中 CXCR2 表达情况。Transwell 实验分析过表达 CXCR2 对结肠癌细胞体外迁移的影响。**结果** 成功建立稳定表达 CXCR2 基因的 SW1116 结肠癌细胞株,并初步阐明 CXCR2 能够促进结肠癌细胞体外迁移。**结论** 成功建立过表达 CXCR2 基因的结肠癌细胞并能促进其体外迁移。

关键词 CXCR2 SW1116 细胞 结肠癌转移

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Establishment of CXCR2 Overexpression Human Colorectal Cancer Cell Line and Its Effect on the Biological Function. Liu Jinlin, Pang Zhenzhen, Jin Weidong. Department of Clinical Laboratory, Zhejiang Provincial People's Hospital, Zhejiang 310014, China

Abstract Objective To establish the stable overexpressive human CXCR2 gene in human colorectal cancer SW1116 cells. **Methods** The CXCR2 cDNA was amplified with primers from the total RNA of the PBMC of the health person and then cloned to CDS sites of the pLVX-IRES-ZsGreen1 lentivirus shuttle vector. The lentivirus shuttle plasmid and package plasmid were co-transfected into HEK293T cell to produce the CXCR2 lentivirus, then the CXCR2 overexpress SW1116 cell line was established. The real-time-PCR and western blot were used to detect the CXCR2 expression in the stable CXCR2 overexpress SW1116 cell line. The transwell assay were used to evaluate the effect of overexpression of CXCR2 on the migration ability of SW1116 colorectal cancer cell line. **Results** We have successfully established CXCR2 overexpress SW1116 cell line and demonstrate that CXCR2 can facilitate the colorectal cancer migration *in vitro*. **Conclusion** CXCR2 overexpress SW1116 cell line had established and it can facilitate the migration *in vitro*.

Key words CXCR2; SW1116 cell; Colorectal cancer metastasis

肿瘤转移是一个多因素多步骤的进程,肿瘤细胞需要克服一系列的障碍才能到达远端转移部位:主要包括肿瘤细胞入侵相邻组织、进入血液循环、在全身血液中生存、在远端转移组织迁出血管、入侵到周围组织中并在远端器官中生长、最终形成远端转移灶。世界上每年有超过 100 万人发生结肠癌,其中 90% 的患者死于肿瘤转移^[1-4]。大量研究发现趋化因子受体在肿瘤的转移过程扮演着重要的角色,最著名的就是趋化因子受体 CXCR4,在至少 20 种的肿瘤转移过程中起着重要的作用^[5,6]。但至目前为止,趋

化因子受体 CXCR2 与结肠癌转移的研究未见报道, CXCR2 在结肠癌细胞迁移上到底扮演什么样的角色也未完全清楚。本研究尝试构建 CXCR2 慢病毒穿梭质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1-CXCR2 并包装病毒使其感染人 SW1116 结肠癌细胞,并检测感染病毒后 SW1116 细胞 CXCR2 的表达情况及 CXCR2 对结肠癌细胞体外迁移的影响。

材料与方法

1. 材料: pLVX-IRES-ZsGreen1 慢病毒穿梭质粒以及 psPAX2 和 pMD2G 包装质粒为浙江省人民医院检验中心保存质粒,大肠杆菌 DH5(菌株为浙江省人民医院检验中心保存菌种,慢病毒 293T 包装细胞,人 SW1116 结肠癌细胞购于中国科学院上海细胞库,Transwell 细胞培养板为美国 Corning 公司产品,限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I(美国 Fermentas 公

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LQ14H100001)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院检验中心

通讯作者:刘津麟,电子信箱:liujinlinhz@163.com

司);T4 连接酶(美国 Fermentas 公司);质粒抽提试剂盒(上海生工生物技术有限公司);ProFection 磷酸钙转染试剂盒(Promega 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);抗人 CXCR2 及 β -actin 一抗(Abcam 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(碧云天生物技术研究所有限公司)。

2. 人 SW1116 结肠癌细胞的培养:细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖完全培养基中,置于 37℃,5% CO₂ 孵育箱中贴壁培养,每隔 3 天用 0.25% 胰酶消化传代培养。

3. CXCR2 基因的 CDS 序列扩增:取健康人外周血,用淋巴细胞分离液分离单个核细胞并以此为模板提取总 RNA,在 Pubmed 上获取 CXCR2 的 CDS 编码区并设计相应 CDS 序列全长克隆引物,并加入 EcoR I 和 BamH I 酶切位点,用高保真聚合酶扩增 CXCR2 的 CDS 序列。

4. pLVX-IRES-ZsGreen1-CXCR2 重组质粒构建、包装与感染:将 PCR 反应电泳回收产物和 pLVX-IRES-ZsGreen1 质粒分别经 EcoR I 和 BamH I 限制性内切酶 37℃ 双酶切 4h,进行电泳后进行凝胶回收,取 5 μ l 酶切好的 PCR 片段与 5 μ l 酶切好的质粒 DNA 反应液混合并加入 T4 连接酶 4℃ 连接 18h。将连接产物转化至 DH5(感受态细胞并在 37℃ 培养箱中培养过夜。次日挑取单克隆菌落并摇菌 16h,抽提菌液质粒 DNA,RT-PCR 行阳性菌落筛选重组质粒。每个六孔板细胞培养板接种 8×10^5 个 293T 细胞并使细胞密度达 80%。使用磷酸钙共转染法将 10 μ g psPAX2、5 μ g pMD2G 和 15 μ g pLVX-IRES-ZsGreen1 或 pLVX-IRES-ZsGreen1-CXCR2 共同转染至 293T 细胞。转染 96h 后收集病毒上清并用 0.45 μ m 滤器过滤,滤液直接感染 SW1116 细胞并大量培养。

5. 慢病毒感染的 SW1116 细胞 CXCR2 mRNA 表达的检测:根据 GenBank 的人 CXCR2 基因序列,设计荧光定量 PCR 引物并由上海生工生物公司合成。上游引物序列:5'-CCT-GTCTTACTTTTCCGAAGGAC-3',下游引物序列:5'-TTGCT-GTATTGTTGCCCATGT-3',设计并合成内参照 β -actin 引物,上游引物序列:5'-AAGGAGCCCCACGAGAAAAAT-3',下游引物序列:5'-ACCGAAGTTCATTGATTCCAG-3'。提取细胞总 RNA,反转录后 cDNA 后进行 real-time PCR。反应条件为 95℃ 10min;95℃ 15s 及 60℃ 55s 共 40 个循环。各组 mRNA 同内参基因相比得到相对表达量。

6. 感染慢病毒的 SW1116 细胞 CXCR2 蛋白检测:RIPA 细胞裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白。蛋白浓度测定试剂盒调整各组蛋白浓度后进行 PAGE 蛋白电泳,并转移至 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭 0.5h,分别加入 CXCR2 和 β -actin 一抗 4℃ 孵育 16h 后用 1 $\times$ PBS 洗膜 3 次,每次 5min,充分洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的相应种属 IgG 二抗室温孵育 0.5h,再用 1 $\times$ PBS 洗膜 3 次,加入显影液并显影。

7. 过表达 CXCR2 对结肠癌 SW1116 细胞迁移的影响:预先培养的细胞(SW1116 和 CXCR2-SW1116)常规消化、离心、无血清培养基重悬、计数并将细胞密度调整到 1.5×10^5 /ml 后,取 0.2ml 接种到 Transwell 上室中,并在下室中加入

0.5ml 含 10% FBS 的完全培养基。置于 37℃,5% CO₂ 的环境下培养,24h 后将小室置于另一个 24 孔板中并加入 100% 甲醇固定 10min。固定完成后用 0.1% 结晶紫染色液染色 30min,再用双蒸水清洗残余染料,最后将薄膜进行分割并进行拍照。

8. 统计学方法:数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析,采用 Mann-Whitney U test 分析 SW1116 细胞和 CXCR2-SW1116 细胞之间 mRNA 表达水平以及细胞体外迁移能力的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CXCR2 基因的提取与鉴定:高包真酶 PCR 扩增外周血单个核细胞中 CXCR2 基因 CDS 序列后,PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测,可见 1083bp 的特异条带,与 Pubmed 上公布的 CXCR2 的 CDS 序列一致(图 1)。

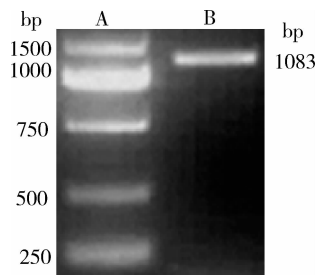


图 1 PCR 扩增健康人外周血单个核细胞中 CXCR2 基因(1.5% 琼脂糖凝胶)

2. CXCR2 慢病毒上清感染人 SW1116 结肠癌细胞后 CXCR2 mRNA 表达的检测: CXCR2-SW1116 结肠癌细胞组 CXCR2 的 mRNA 表达量明显高于人 SW1116 结肠癌细胞组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

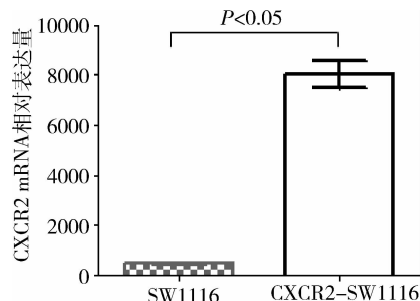


图 2 real-time PCR 检测感染慢病毒各组 SW1116 细胞 CXCR2 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3. Western blot 法检测慢病毒上清液感染 SW1116 细胞 CXCR2 蛋白表达:见图 3,在约 55kDa (CXCR2)、42kDa (β -actin) 处见到特异性条带, CXCR2-SW1116 组条带颜色相比 GFP-SW1116 组颜

色明显加深。经过对各条带灰度值进行统计分析,显示 CXCR2 - SW1116 组 CXCR2 的蛋白表达明显增强,说明重组 pLVX - IRES - ZsGreen1 - CXCR2 质粒能在 SW1116 细胞中正确表达及翻译。

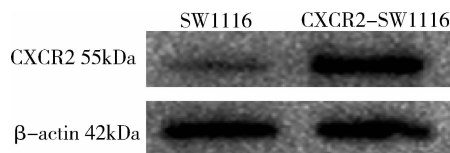


图 3 Western blot 法检测 CXCR2 过表达 SW1116 细胞及 SW1116 细胞中 CXCR2 蛋白表达水平

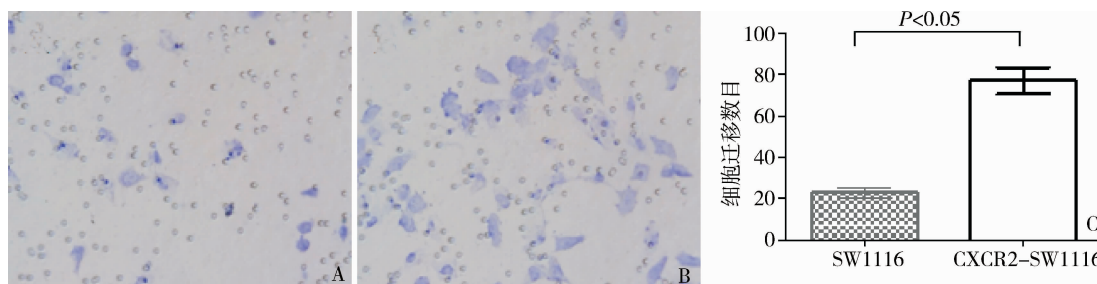


图 4 显微镜下观察 SW1116 (A) 以及 CXCR2 - SW1116 细胞 (B) 体外迁移能力 ($\times 200$) 及细胞迁移数目统计结果图 (C) ($n = 8$)

讨 论

本研究主要采用慢病毒感染系统用以感染难转染的人 SW1116 结肠癌细胞,实现了 CXCR2 在 SW1116 细胞株的稳定过表达,为研究 CXCR2 在结肠癌转移的作用机制提供了重要工具。通过慢病毒 pLVX - IRES - ZsGreen1 穿梭载体,将 CXCR2 和绿色荧光 ZsGreen 基因构建在一起,这将有利于结肠癌细胞进行示踪。另外,通过 pLVX - IRES - ZsGreen1 穿梭载体的内部核糖体进入位点序列 (IRES),达到 GFP 和 CXCR2 的分开表达,避免后续 ZsGreen 蛋白对 CXCR2 蛋白功能的影响。

已有研究发现趋化因子受体在肿瘤的转移过程扮演着重要的角色。其中 CXCR4 已经发现它们在至少 20 种肿瘤的转移过程中扮演重要作用^[7]。另外趋化因子受体 CCR7 也和乳腺癌、胃癌、食管癌病人的生存期强烈相关^[1,8]。这些研究都证明了肿瘤细胞表达趋化因子受体不是偶然的,而是和肿瘤细胞的转移有着密切的关系,它们在肿瘤的血管形成、肿瘤细胞的生存以及转移都发挥作用^[6-9]。另外,也有研究提示 CXCR2 与肺癌的转移有相关性,但未见 CXCR2 与结肠癌转移的相关报道^[10]。本研究结果提示趋化因子受体 CXCR2 在结肠癌的转移中扮演重要作用并

4. 过表达 CXCR2 对结肠癌 SW1116 细胞体外迁移能力的影响:Transwell 上室细胞穿过 8mm 膜的下室,其数量的多少反映了细胞运动迁移能力的大小。在 Transwell 趋化小室的下室分别加入 10% FBS 检测 SW1116 细胞的迁移能力。稳定表达 CXCR2 的 SW1116 细胞在 10% FBS 的作用下其迁移能力明显增强 (图 4 中 A、B),各组随机抽取 8 个视野,分别计数其迁移细胞数并进行统计,统计结果显示过表达 CXCR2 的 SW1116 细胞体外迁移能力明显增强, $P < 0.05$ (图 4C)。

建立了稳定过表达 CXCR2 的 SW1116 结肠癌细胞株,从而为下一步研究 CXCR2 在结肠癌细胞转移中的具体机制铺垫了前期基础。

参考文献

- 1 Pitkin L, Luangdilok S, Corbishley C, *et al.* Expression of CC chemokine receptor 7 in tonsillar cancer predicts cervical nodal metastasis, systemic relapse and survival [J]. *Br J Cancer*, 2007, 97 (5): 670 - 677
- 2 Olkhanud PB, Baatar D, Bodogai M, *et al.* Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (14): 5996 - 6004
- 3 Li JY, Ou ZL, Yu SJ, *et al.* The chemokine receptor CCR4 promotes tumor growth and lung metastasis in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 131 (3): 837 - 848
- 4 Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, *et al.* Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi - institution pathology review [J]. *J Gastroenterol*, 2013 [Epub ahead of print]
- 5 Brennecke P, Arlt MJ, Muff R, *et al.* Expression of the chemokine receptor CXCR7 in CXCR4 - expressing human 143B osteosarcoma cells enhances lung metastasis of intratibial xenografts in SCID mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e74045
- 6 Nannuru KC, Sharma B, Varney ML, *et al.* Role of chemokine receptor CXCR2 expression in mammary tumor growth, angiogenesis and metastasis [J]. *J Carcinog*, 2011, 10: 40
- 7 Takaoka K, Hidaka S, Hashitani S, *et al.* Effect of a nitric oxide syn-

- thase inhibitor and a CXC chemokine receptor - 4 antagonist on tumor growth and metastasis in a xenotransplanted mouse model of adenoid cystic carcinoma of the oral floor [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(3): 737 - 745
- 8 Cunningham HD, Shannon LA, Calloway PA, *et al.* Expression of the C - C chemokine receptor 7 mediates metastasis of breast cancer to the lymph nodes in mice [J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(6): 354 - 361
- 9 Zheng J, Yang M, Shao J, *et al.* Chemokine receptor CX3CR1 con-

tributes to macrophage survival in tumor metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 141

- 10 Sharma B, Nawandar DM, Nannuru KC, *et al.* Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(5): 799 - 808

(收稿日期: 2014 - 04 - 22)

(修回日期: 2014 - 04 - 25)

SD 大鼠三叉神经痛样模型的建立与痛阈测定

秦泗佳 王 福

摘 要 **目的** 建立原发性三叉神经痛样的 SD 大鼠动物模型, 研究其对机械刺激的行为反应和疼痛阈值变化。**方法** 选取雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分为手术组、假手术组和空白对照组。手术组经口内切口行右侧三叉神经的眶下神经 (ION) 结扎术; 假手术组只分离暴露右侧眶下神经不予以结扎; 空白对照组未接受手术干预。记录大鼠术前及术后 1 ~ 12 周的行为反应和疼痛阈值。**结果** 手术组于术后 2 周出现痛觉超敏反应, 一直持续到术后 6 周才逐渐恢复, 术后 10 ~ 12 周左右才恢复到术前水平。**结论** 大鼠眶下神经的慢性压迫性损伤 (CCI - ION) 可建立三叉神经痛样的动物模型, 该法具有操作简单、存活率高等特点。

关键词 三叉神经痛 动物模型 疼痛阈值

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

Changes of Pain Threshold in a SD Rat Model of Trigeminal Neuralgia. Qin Sijia, Wang Fu. *Department of Anatomy, College of Stomatology, Shaanxi Medical University, Shaanxi 710021, China*

Abstract Objective To study the changes of the pain - related behaviours and pain threshold in Sprague Dauley rat model of trigeminal neuralgia - like. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into 3 groups (operative groups, sham - operative groups and control groups). In the operative group, a chronic constriction injury (CCI) was produced by placing loose chronic gut ligatures around the right infraorbital nerve (ION). In the sham - operative group, the right infraorbital nerve was only exposed using the same procedure without ligation. The control group was not subject to any treatment. The behavioral reactions and the pain threshold of the 3 groups were recorded at different time after operation. **Results** An allodynia to mechanical stimulation in the territory of ligated ION was found from the 2nd week after operation. The thresholds started to increase gradually from the 6th week and reached the original level on 10 - 12th week after operation. **Conclusion** A trigeminal neuralgia - like animal model in SD rat is successfully established using CCI - ION method with features of simple operation and higher survival.

Key words Trigeminal neuralgia; Animal model; Pain threshold

三叉神经痛或称痛性痉挛 (抽搐), 是指三叉神经所支配的区域发生的强烈的阵发性疼痛。发生率约 8/10 万^[1], 多见于中老年人, 平均发病年龄 62.7 ± 15.8 岁^[2]。随着人口老龄化, 其发生率亦有增高趋势。尽管研究人员业已进行了大量的临床和动物模型的研究, 相继提出了许多新的观点和治疗手段, 其发病机制尚不清楚^[3]。因此, 建立一种操作简单

且稳定可靠的动物模型来探究其发病机制就显得十分必要。本实验通过结扎 SD 大鼠眶下神经建立三叉神经痛模型, 观察大鼠的行为反应和疼痛阈值在不同时间点的变化, 对进一步探究三叉神经痛的病因机制具有一定的指导意义。

材料与方法

1. 实验材料及分组: 选择健康成年清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 体质量 180 ± 20g。随机各选取 10 只作为手术组、假手术组和空白对照组。手术组采用经口内右侧眶下神经慢性压迫性缩窄环技术 (chronic constriction injury to the infraorbital nerve, CCI - ION) 建立三叉神经痛样动物模型, 假手术组行右侧眶下神经假手术, 手术同前, 但只分离暴露右侧眶下神经不

基金项目: 辽宁省自然科学基金计划资助项目 (2013023014)

作者单位: 710021 西安医学院口腔医学系口腔解剖生理学教研室 (秦泗佳); 116044 大连医科大学口腔医学院 (秦泗佳、王福)

通讯作者: 王福, 电子信箱: dywangfu@gmail.com