

## SDF-1/CXCR4 在恶性胶质瘤细胞体外增殖、迁移及侵袭中的作用

刘佳鑫, 王崇谦, 王伟民, 丁鹏, 王波, 牟临杰, 王进昆  
(昆明医科大学第一附属医院神经外科, 云南昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨趋化因子 SDF-1 及受体 CXCR4 在恶性胶质瘤细胞中的增殖、迁移及侵袭的作用, 为临床治疗提供依据。 **方法** 免疫组化法检测 CXCR4 在恶性胶质瘤 C6 细胞中的表达; 用 MTT 法分别检测不同浓度的趋化因子 SDF-1 促恶性胶质瘤 C6 细胞体外增殖, 并应用 CXCR4 受体抑制剂 AMD3100 与 SDF-1 共培养细胞观察增殖情况及抗 CXCR4 单克隆抗体在恶性胶质瘤中上述指标的变化。通过细胞迁移实验和细胞侵袭实验评价不同处理组 C6 细胞的迁移和侵袭能力。 **结果** CXCR4 在恶性胶质瘤 C6 细胞系表达呈阳性。SDF-1 可以促进恶性胶质瘤 C6 细胞的体外增殖、迁移和侵袭, 而抗 CXCR4 单克隆抗体可以有效抑制其增殖、迁移和侵袭, 并呈浓度依赖性。AMD3100 可以抑制 SDF-1 的诱导作用。 **结论** SDF-1/CXCR4 轴在恶性胶质瘤细胞株的体外增殖、迁移及侵袭中的作用, 可能与恶性胶质瘤的侵袭和转移有关, 为治疗恶性胶质瘤提供新的治疗策略。

**[关键词]** 恶性胶质瘤 C6 细胞系; 趋化因子 SDF-1; 增殖; 迁移

**[中图分类号]** R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)01-0023-05

## The Role of SDF-1/CXCR4 Axis in Proliferation, Migration and Invasion of Malignant Glioma Cell Lines

LIU Jia-xin, WANG Chong-qian, WANG Wei-min, DING Peng, WANG Bo, MU Lin-jie,  
WANG Jin-kun  
(Dept. of Neurosurgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University,  
Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in malignant glioma cell proliferation, invasion and migration, so as to provide basis for clinical prevention and treatment. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the CXCR4 expression in malignant glioma cells. MTT assay was used to test different concentration of SDF-1 promoted in vitro proliferation of C6 cells malignant glioma. CXCR4 receptor inhibitor AMD3100 and SDF-1 were co-cultured to test cell proliferation and CXCR4 resistance in malignant glioma by observing the above indexes. The cell migration and invasion ability of C6 in different groups was tested by transwell migration and invasion assay. **Results** CXCR4 expressed positively in malignant glioma cell line C6. SDF-1 promoted C6 cells proliferation, invasion and migration in vitro. Anti-CXCR4 McAb could inhibit the proliferation, invasion and migration in a dose-dependent manner. AMD3100 inhibited the effects induced by SDF-1. **Conclusion** The role of SDF-1/CXCR4 in malignant glioma cell lines proliferation, invasion and migration in vitro is related to invasion and migration of malignant glioma, and may be a new therapeutic target for glioma.

**[Key words]** Malignant glioma cell line C6; SDF-1; Proliferation; Migration

恶性胶质瘤呈侵袭性生长, 导致肿瘤复发、远隔迁移和难以治愈<sup>[1]</sup>。CXCR4 仅有一种配体, 即基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)<sup>[2]</sup>, SDF-1 也是趋化因子家族一个重要的成员。CXCR4 是很多肿瘤细

**[基金项目]** 云南省科技计划联合专项基金资助项目 (2010CD157)

**[作者简介]** 刘佳鑫 (1985~), 男, 吉林延吉市人, 在读硕士研究生, 主要从事神经外科临床工作。

**[通讯作者]** 王进昆. E-mail:wjink2002@yahoo.com.cn

胞都表达的趋化因子受体<sup>[3]</sup>, SDF-1/CXCR4 轴参与了很多肿瘤的转移和扩散<sup>[4,5]</sup>。研究发现趋化因子及其受体除参与炎症反应外还能调控许多重要的生物学过程包括心脏与神经的发育干细胞运动血管形成凋亡及肿瘤发生<sup>[6,7]</sup>, 其中趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 与其配体基质细胞衍生因子-1 (stromal derived factor-1, SDF-1) 与肿瘤生成密切相关。但尚未见 SDF-1 诱导的恶性胶质瘤 C6 细胞迁移和侵袭中的作用报道。为探索 SDF-1/CXCR4 轴对恶性胶质瘤细胞生物学行为的影响, 为此, 本研究通过 SDF-1/CXCR4 轴在恶性胶质瘤 C6 细胞增殖、迁移及侵袭过程中的作用, 从而为恶性胶质瘤的防治提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

恶性胶质瘤 C6 细胞系购自上海中科院细胞库; 细胞培养板、DMEM/F12 培养基和胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司; CXCR4 抗体购自 ABCAM 公司; MTT 和 AMD3100 购自 sigma 公司; SDF-1 重组蛋白购自 peprotech 公司。

### 1.2 细胞培养方法

无菌操作, 将 C6 细胞接种于 6 孔板中, 培养方法: DMEM/F12 培养基, 10%胎牛血清, 青霉素双抗。置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每日观察细胞生长状况。

### 1.3 恶性胶质瘤细胞 C6 中 CXCR4 的表达

在细胞生长对数期, 去除上清培养基, 按以下步骤进行免疫化学染色: (1) 加入无菌的磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer saline, PBS) 清洗 3 次; (2) 加入 2 mL 无菌的 4%多聚甲醛在 4℃条件下固定细胞 30 min; (3) 无菌 PBS 液洗涤 3 次; (4) 3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶; (5) 含 0.1% Triton 的 5%羊血清室温下孵育 1 h 后, 加兔抗人 CXCR4 抗体 4℃过夜; (6) 加 PV-9000 二抗 37℃孵育 30 min, DAB 液显色, 显微镜下观察鉴定结果。

### 1.4 细胞增殖实验

采用 MTT 法。各组对数生长期细胞接种于 96 孔培养板, 细胞浓度为  $2.5 \times 10^4$ /mL, 每孔 0.2 mL。实验分为 3 组, 即: (1) 诱导组加含入不同浓度 SDF-1 (9、17、39.5、75 和 150 μg/L); (2) AMD3100 拮抗 SDF-1 加入含 35 μmol/L AMD3100 和 17 μg/L SDF-1; (3) 抗体封闭组加入 25

μg/mL 浓度抗 CXCR4 单抗; (4) 对照组只加培养液。分别培养 12、24、48 h 后, 按每孔 20 μL 加入 5 g/L MTT 孵育 4 h 吸弃上清, 按每孔 200 μL 加入 DMSO, 37℃摇床上低速震荡 10 min, 全自动酶标仪测定波长 490 nm 处读取吸光度值 (A 值)。取每次各浓度孔 A 值的均值作为该浓度的最终吸光度值。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次, 计数各组均值。

### 1.5 细胞迁移实验

细胞在无血清培养基中培养 9 h 后, 对拮抗组 SDF-1 和抗体封闭组, 对照组及诱导组 SDF-1 处理组加入 20 μL PBS, 3 h 后, 使用 1 mL 枪头尽量垂直于 6 孔板底部划痕, 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 拮抗组加入含 35 μmol/L AMD3100 和 17 μg/L SDF-1 的无血清培养基, 抗体封闭组加入含抗 CXCR4 单抗 25 μg/mL 的无血清培养基, 对照组加入 3 mL 无血清培养基。放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 24 h 后于倒置相差显微镜下观察细胞迁移的程度, 随机选取 18 个视野 (100 倍) 计数迁移到空白处的细胞总数, 每组重复实验 3 次。

### 1.6 Transwell 细胞侵袭实验

matfigel 胶 70 μL 均匀平铺于 24 孔 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上, 37℃预置 2 h 聚合成凝胶备用。上室每孔加入  $1 \times 10^5$  个细胞, 细胞悬液的体积为 200 μL; 对照组下室每孔中加入 500 μL 无血清培养基, 诱导组下室每孔中加入 500 μL 含 17 μg/L SDF-1 的无血清培养基, 拮抗组下室每孔中加入 500 μL 含 35 μmol/L AMD3100 和 17 μg/L SDF-1 的无血清培养基, 抗体封闭组下室每孔中加入 500 μL 含抗 CXCR4 单抗 25 μg/mL 的无血清培养基, 将装有 Transwell 小室的培养板置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 条件下培养 24 h, 取出小室, 进行苏木精染色, 在倒置显微镜下观察迁移到膜下的细胞数。计数方法: 分别于每张膜的中央部分和周围部分随机选取 18 个不重复视野 (100 倍), 计数每个视野穿过膜的细胞数目, 每组重复实验 3 次。

### 1.7 统计学处理

采用 SPSS 统计软件对实验数据进行统计处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组样本均数间的比较用方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 正常恶性胶质瘤 C6 细胞中 CXCR4 的表达情况

恶性胶质瘤 C6 细胞呈贴壁生长, 细胞呈梭形或多边形. 在正常培养的 C6 胶质瘤细胞中, 均可

见 CXCR4 阳性染色, 主要是胞浆和包膜着色, 呈棕黄色, 呈高表达, 见图 1.

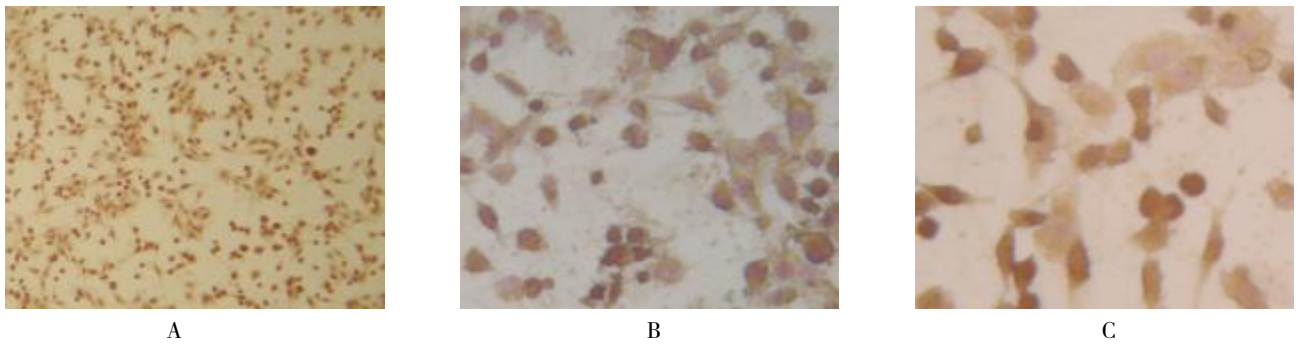


图 1 CXCR4 在 C6 的表达

Fig. 1 Expression CXCR4 in C6

A: 50 倍镜下; B: 100 倍镜下; C: 200 倍镜下.

### 2.2 恶性胶质瘤 C6 细胞增殖实验结果

与对照组相比, 各种浓度的 SDF-1 (9、17、39.5、75 和 150  $\mu\text{g/L}$ ) 在 12、24、48 h 都能明显诱导恶性胶质瘤 C6 细胞增殖, 各组平均吸光度 (A) 值均显著增高 ( $P < 0.05$ ); SDF-1 在 (9、17、39.5、75)  $\mu\text{g/L}$  浓度内以剂量依赖性诱导细胞增殖, 随着加入因子浓度的增加, 其增殖效果越明显, 其中诱导恶性胶质瘤 C6 细胞的最佳浓度为 75  $\mu\text{g/L}$  浓度, 12 h 对照组与 SDF-1 9  $\mu\text{g}$  相比差异无统计学意义, 其它都有阳性意义 (见图 2). 与 17  $\mu\text{g/L}$  SDF-1 诱导组比较, 拮抗组 AMD3100 35  $\mu\text{mol/L}$  和 17  $\mu\text{g/L}$  SDF-1 在 12、24、48 h 皆能有拮抗 SDF-1 诱导的恶性胶质瘤 C6 细胞增殖作用 ( $P < 0.05$ ) (见图 3), 抗 CXCR4 单抗 25  $\mu\text{g/mL}$  对恶性胶质瘤 C6 细胞增殖有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ ).

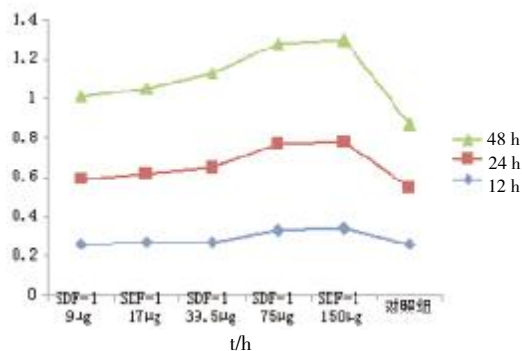


图 2 不同浓度的 SDF-1 诱导 C6 增殖

Fig. 2 Proliferation of C6 induced by different concentration of SDF-1

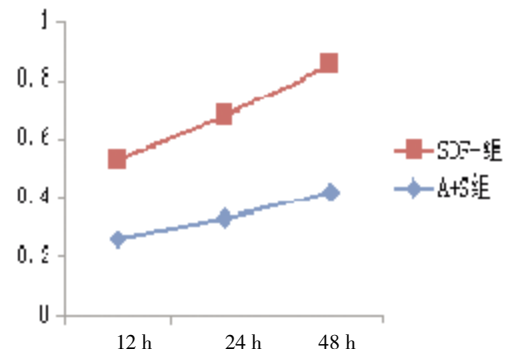


图 3 AMD3100 拮抗 SDF/CXCR4 诱导的 C6 增殖作用

Fig. 3 AMD3100 attenuated proliferation of C6 induced by SDF-1/CXCR4

### 2.3 恶性胶质瘤 C6 细胞迁移和侵袭能力的影响

对照组与拮抗组的恶性胶质瘤 C6 细胞迁移至空白处数较诱导组低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 见图 4, 表 1. 对照组与拮抗组穿过膜的恶性胶质瘤 C6 细胞较诱导组低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4, 表 1.

## 3 讨论

恶性胶质瘤的预后极差, 其侵袭转移是多环节、多步骤且连续的复杂生物学过程, 涉及到细胞迁移的信号通路的调节失常, 肿瘤细胞与宿主细胞间相互作用等<sup>[8,9]</sup>. CXCR4 是 SDF-1 高度特异性的受体, 在分子结构上是一个编码 352 个氨基酸且高度保守的 G 蛋白耦联的七次跨膜受体, SDF-1 与 CXCR4 具有高度的亲和力, 两者特异性

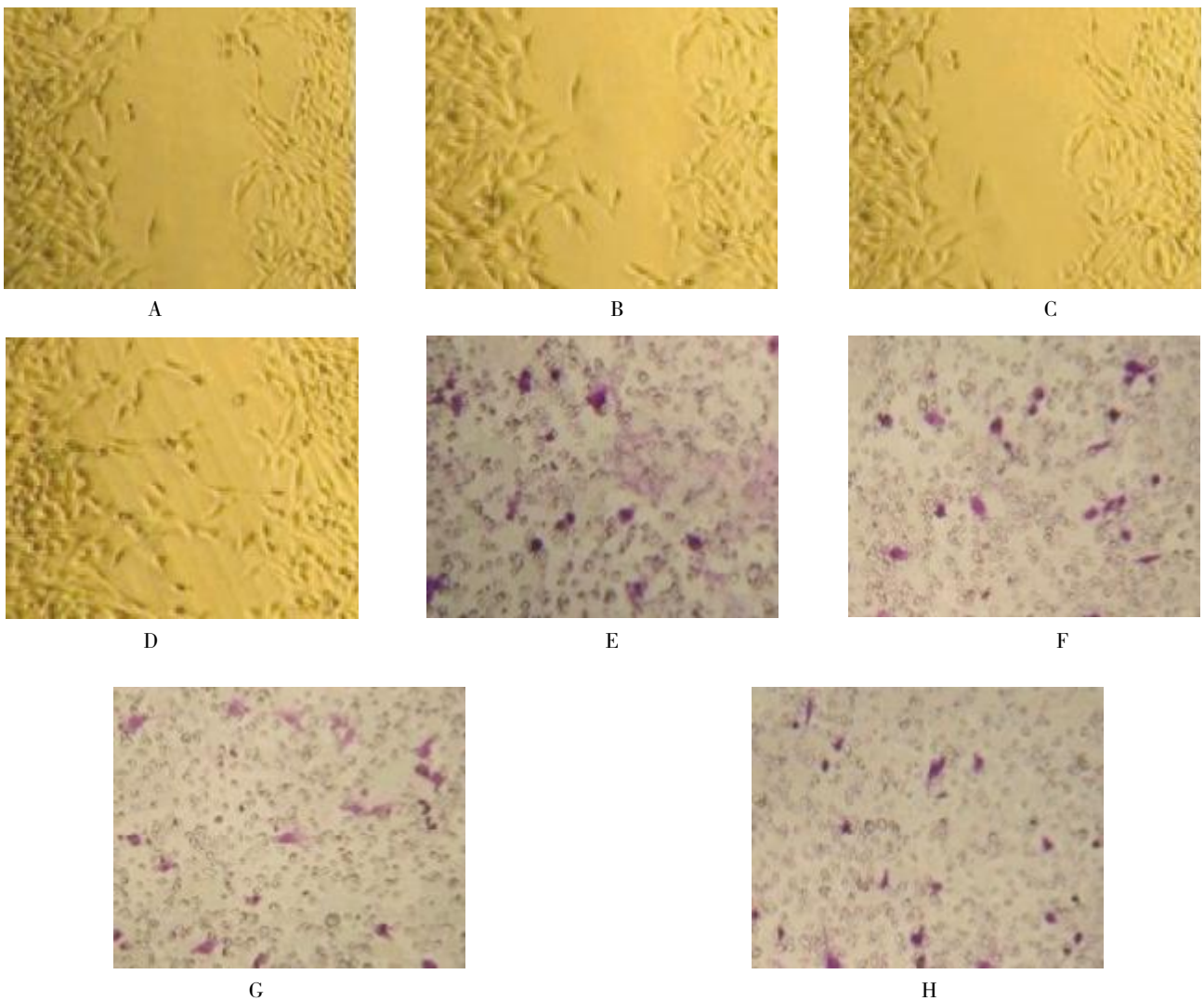


图 4 A-D: 迁移实验后 24h, 对照组、抗体封闭组、AMD3100 拮抗 SDF-1 组、诱导组可见空白区左右视野的细胞向空白区迁移; E-H: 对照组、抗体封闭组、AMD3100 拮抗 SDF-1 组、诱导组穿过聚碳酸酯微膜的细胞

Fig. 4 A - D migration experiment within 24 h, and the control group, the antibody closed group, AMD3100 antagonistic SDF - 1 group, induced group visible gap vision about the cell to the blank area migration; E - H control group, antibody closed group, AMD3100 antagonistic SDF - 1 group, induced group through the polycarbonate micro membrane of cells

表 1 迁移和侵袭实验的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of the migration and invasion of C6 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	迁移细胞 (个)	侵袭细胞 (个)
对照组	18	74.83 ± 5.74*	29.33 ± 6.81*
SDF-1 组	18	125.17 ± 7.92	53.00 ± 9.63
抗 CXCR4 组	18	70.06 ± 5.48	23.50 ± 6.21
AMD3100+SDF-1 组	18	86.33 ± 7.35*	42.83 ± 3.65*

与 SDF-1 组比较, \* $P < 0.05$ .

结合后形成的 SDF-1/CXCR4 轴是其生物学功能实现的基础<sup>[10,11]</sup>。SDF-1 是一种重要的趋化因子, 能调控许多重要的生物过程, 包括心脏与神经的发育、干细胞运动、血管形成、凋亡及肿瘤发生<sup>[12]</sup>细

胞的迁移运动由趋化因子的浓度梯度触发, 当趋化因子与其膜受体结合会诱发一系列的细胞内反应, 例如细胞的肌动蛋白骨架发生重组形成片状伪足, 这些复合反应细胞运动提供必要的力量.SDF-1 作

为趋化因子, 与其受体 CXCR4 相互作用的反应轴 SDF-1/CXCR4 在肿瘤细胞转移中的作用越来越受到人们的关注. 除此之外, 越来越多的研究表明 CXCR4 与肿瘤的增殖和分化等恶性表现也有重要关联. CXCR4 在脑恶性胶质瘤细胞中的表达, 抑制瘤细胞 CXCR4 基因是人恶性胶质瘤细胞增殖所需要的结合后可使肿瘤细胞肌动蛋白丝聚合, 形成片状伪足, 诱导肿瘤向周围组织浸润. 通过激光捕获显微切割技术从鼠颅内 C6 胶质瘤中获得的侵袭性细胞中. SDF-1 和 CXCR4 的转录均增强, 证明 SDF-1/CXCR4 轴能够在体内影响胶质瘤侵袭性. SDF-1 与 CXCR4 相互作用激发细胞内信号传导, 导致下游效应分子的聚集, 使细胞内骨架蛋白重排, 从而诱导细胞的趋化迁移, 并进而形成了肿瘤的侵袭特性. 本研究发现在 C6 胶质瘤细胞中加入 SDF-1 重组因子蛋白水平均表达增高, 说明 SDF-1 可促 C6 表达, 联系胶质瘤的生长特性, 可知 SDF-1 与胶质瘤有密切正相关, 而在加入 SDF-1/CXCR4 特异性抑制剂 AMD3100 后, C6 表达下降, 说明 AMD3100 可抑制 C6 胶质瘤细胞表达. CXCR4 与 SDF-1 的联合作用, 还可以对多种细胞产生趋化诱导作用, 并能产生明显的增殖功能. 以上结果均表明: CXCR4/SDF-1 信号在肿瘤细胞体外增殖和迁移中发挥着重要的促进作用<sup>[13,14]</sup>. 但其协同作用的更深层次的机制, 目前尚不清楚, 需要更多相关的基础实验进一步验证明确.

综上所述, 本研究结果证明了 SDF-1/CXCR4 在恶性胶质瘤细胞中增殖、迁移及侵袭中发挥着重要作用. 增殖率和运动性是评价肿瘤体外转移潜能的其中两个指标, 因此笔者推断抑制肿瘤表面 CXCR4 的表达, 干扰 SDF-1/CXCR4 的表达可能对判断胶质瘤的预后具有重要意义, 为恶性胶质瘤的新的治疗策略建立基础.

#### [参考文献]

- [1] NAKADA M, NAKADA S, DEMUTH T, et al. Molecular targets of glioma invasion [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 458 - 478.
- [2] BARRERO-VILLAR M, CABRERO J R, GORDON - ALONSO M, et al. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(1): 103 - 113.
- [3] FURUSATO B, MOHANED A, UHLEN M, et al. CXCR4 and cancer [J]. *Pathol Int*, 2010, 60(7): 497 - 505.
- [4] CHENG Z, ZHOU S, WANG X, et al. Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human CXCR4: cell proliferation and migration regulation for glioma cell line in vitro by CXCR4/SDF-1 alpha signal [J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2009, 28(1): 33 - 41.
- [5] BALKWILL F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4 [J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(3): 171 - 179.
- [6] BURNS J M, SUMMERS B C, WANG Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival cell adhesion and tumor development [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(9): 2 201 - 2 213.
- [7] DUDA D G, KOZIN S V, KIRKPATRICK N D, et al. CXCL12 SDF1 alpha -CXCR4/CXCR7 pathway inhibition an emerging sensitizer for anticancer therapies [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(8): 2 074 - 2 080.
- [8] GUPTA G P, MASSAGUE J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127: 679 - 695.
- [9] CHRISTOFORI G. New signals from the invasive front [J]. *Nature*, 2006, 441: 444 - 450.
- [10] ROBIN A M, ZHANG Z G, WANG L, et al. Stromal cell-derived factor 1 alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(1): 125 - 134.
- [11] FRICKER S P, ANASTASSOV V, COX J, et al. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(5): 588 - 596.
- [12] BALABANIAN K, LAGANE B, INFANTINO S, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35 760 - 35 766.
- [13] LAPTEVA N, YANG A G, SANDERS D E, et al. CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(1): 84 - 89.
- [14] ANDER F, XIA W, CONFORTI R, et al. CXCR4 expression in early breast cancer and risk of distant recurrence [J]. *Oncologist*, 2009, 14(12): 1 182 - 1 188.

(2012 - 10 - 14 收稿)