

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.11.007

人次级淋巴组织趋化因子对宫颈癌 Siha 细胞侵袭能力的影响

刘宏杰¹, 胡萍², 张志丽³, 卢晓³, 沈关心⁴, 吴砂³

Effect of Human Secondary Lymphoid Tissue Chemokine on Invasive Ability of Cervical Cancer Cell Line Siha

LIU Hong-jie¹, HU Ping², ZHANG Zhi-li³, LU Xiao³, SHEN Guan-xin⁴, WU Sha³

1. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Immunology, Medical College, Jinan University; 3. Department of Immunology, Southern Medical University; 4. Institute of Basic Medicine, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology

Corresponding Author: WU Sha, E-mail: wushaemail@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effect of human secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) on invasive ability of Siha cell line. **Methods** The SLC gene was amplified from human spleen cDNA, and constructed into eukaryotic expression vector pDsRed2-N1. The plasmid was transfected into human cervical cancer Siha cell line. The tumor invasive ability was detected using transwell, and the activation of NF- κ B was tested by NF- κ B specific promoter Luciferase reporter system. **Results** The SLC plasmid was constructed and transfected Siha cell successfully, with PCR, enzyme digestion and ELISA. Siha-CCL21 had obviously increased ability of tumor invasion (2.34 ± 0.14 times) and NF- κ B activation (3.98 ± 0.194 times) compared with controls. **Conclusion** Although as a chemoattractant, the chemokine SLC plays multiple roles, including promotion of NF- κ B activation and invasion of cancer cells.

Key words: SLC; Cervical Cancer; Invasion; NF- κ B

摘要:目的 研究人次级淋巴组织趋化因子(SLC)对 Siha 细胞侵袭能力的影响。**方法** 从人脾脏 cDNA 扩增出 SLC, 构建真核表达载体, 转染宫颈癌细胞株 Siha。Transwell 检测肿瘤细胞侵袭能力, 利用 NF- κ B 特异性启动子荧光素酶报告系统检测肿瘤细胞内 NF- κ B 的活化。**结果** 经 PCR、酶切、测序及 ELISA 证实, SLC 真核表达载体构建表达成功。SLC 转染 Siha 细胞, 肿瘤侵袭能力增强约 (2.34 ± 0.14) 倍, 且肿瘤细胞内 NF- κ B 的活化增强约 (3.98 ± 0.194) 倍。**结论** SLC 作为趋化因子, 其作用已不局限于趋化作用, 还可诱导肿瘤细胞 NF- κ B 的活化, 促进肿瘤细胞侵袭, 有着多重作用。

关键词: 人次级淋巴组织趋化因子 SLC; 宫颈癌; 侵袭; NF- κ B**中图分类号:** R73-35; R392.1; R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)11-1238-03

0 引言

人次级淋巴组织趋化因子(Secondary Lymphoid Tissue Chemokine, SLC, 又名 CCL21, 6Ckine)

收稿日期: 2009-09-23; **修回日期:** 2010-03-10

基金项目: 广东省科技攻关项目(2008B030301001); 广东省自然科学基金博士启动项目(K1021187); 南方医科大学基础医学院院长基金项目(B1100363)

作者单位: 1. 510510 广州, 广州市第一人民医院胃肠外科; 2. 暨南大学医学院免疫学教研室; 3. 南方医科大学基础医学院免疫学教研室; 4. 华中科技大学同济医学院免疫学系

通信作者: 吴砂, E-mail: wushaemail@yahoo.com.cn

作者简介: 刘宏杰(1967-), 男, 学士, 主任医师, 主要从事肿瘤生物治疗研究

是 CC 族趋化因子, 高表达于人次级淋巴组织高内皮小静脉^[1]。其受体 CCR7 高表达于初始 T 细胞、B 细胞、树突状细胞, 促进淋巴细胞归巢及抗原呈递^[2], 但亦高表达于多种肿瘤细胞, 如乳腺癌, 胃癌, 胰腺癌, 黑色素瘤^[3]。宫颈癌作为发病率及病死率都仅次于乳腺癌的妇科恶性肿瘤^[4], SLC 对其生物学行为影响的研究很少。本文通过由人脾脏扩增 SLC 基因并构建成 SLC 红色荧光蛋白融合基因真核表达载体, 转染宫颈癌细胞 Siha 细胞株, 观察其对肿瘤细胞侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒, T4 连接酶、dNTP、*BamH* I, *EcoR* I 购自 Fermentas 公司。*E. coli*. DH5 α 、宫颈癌 Siha、红色荧光蛋白真核表达载体 pDsRed2-N1 由本室常规传代培养。G418 购自 Sigma 公司, 脂质体购自 invitrogen 公司。人 CCL21 ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司, 侵袭用 0.8 μ m 孔径 Transwell 板及 Matrigel 胶购自美国 Corning Coaster 公司。NF- κ B 荧光素酶报告基因质粒 pSV40 κ B-luc 由同济医学院黄波副教授惠赠。荧光素酶细胞裂解液及荧光素酶检测试剂盒均购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 SLC 基因克隆及真核表达载体构建 参考本科室前期工作^[5], 引物由上海英骏生物公司合成, P1: 5'-GCGAATTCCACCATGGCTCAGTCACTGGCTCT-3', 含 *EcoR* I 酶切位点, P2: 5'-AGGGGATCCCATGGCCCTTTAGGGGTCTGT-3', 含 *BamH* I 酶切位点。以本室保存健康人脾脏 cDNA 为模板进行扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min。94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。纯化 PCR 产物, 限制性内切酶 *BamH* I, *EcoR* I 消化 PCR 产物及 pDsRed2-N1, 10mg/ml 琼脂糖凝胶电泳后, 按胶回收试剂盒操作手册纯化回收 DNA 片段, 连接反应过夜, 转化 DH5 α , 提取质粒 *BamH* I, *EcoR* I 双酶切及测序鉴定。

1.2.2 细胞转染及鉴定 按 Lipofectine2000 操作说明将 pDsRed2-N1, pDsRed2-N1-SLC 转染 SIHA 细胞, 转染 24 h 后, 利用 800 μ g/ml G418 筛选, 有限稀释后单克隆化, 21 d 建立抗性稳定转染细胞株。实验分为三组: 空白组、对照组及 SLC 转染组。ELISA 检测 24h 10⁵ SLC 转染组 Siha 细胞表达上清中 CCL21 水平。

1.2.3 肿瘤细胞侵袭检测 用 50 μ g/ml Matrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 4 $^{\circ}$ C 风干备用。制备肿瘤细胞悬液, 调整 Siha 细胞浓度为 2 \times 10⁵/ml, 加细胞悬液 100 μ l 入 Transwell 小室, 下室加入 500 μ l 含 20% 新生牛血清的 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 6h, 胰酶消化侵袭至下室细胞, 应用流式细胞仪计数, 以空白组肿瘤细胞为基数, 侵袭指数 = 实验组下室细胞数/空白组下室细胞数。

1.2.4 细胞内 NF- κ B 活化检测 pSV40NF- κ B-luc 包含 4 个特异性序列 5'-CTAGTGGGGACTTTT-

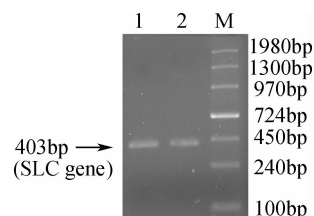
CACCTGGGGACTTTCCACCT-3', 而每个序列中又有 2 个 NF- κ B 结合位点。8 个 NF- κ B 结合位点与 TATA 基序共同控制质粒中火蝇荧光素酶基因表达。细胞 NF- κ B 活化后, 其亚基将结合 pSV40NF- κ B-luc 的 NF- κ B 结合位点, 导致火蝇荧光素酶基因表达。将 pSV40 κ B-luc 瞬时转染空白组、载体对照组及 SLC 转染组。PBS 洗 2 次, 转染 24h 后, 荧光素酶细胞裂解液裂解各组细胞, 收集裂解液, 检测荧光素酶表达。以空白组肿瘤细胞荧光素酶表达量为基数, 荧光素酶表达指数 = 实验组细胞荧光素酶表达量/空白组肿瘤细胞荧光素酶表达量。

1.2.5 统计学方法 数据采用 Student's *t* test, χ^2 检验, SPSS 13.0 软件进行数据处理。

2 结果

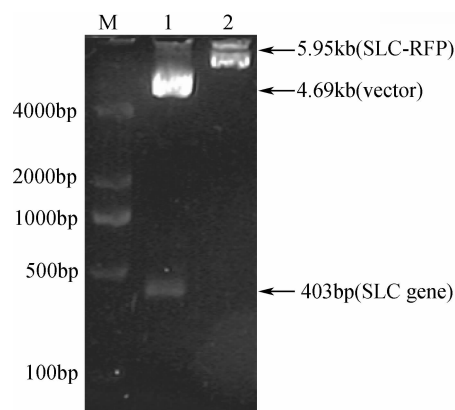
2.1 人 SLC-红色荧光蛋白真核表达载体的构建

以健康人脾脏 cDNA 为模板, 用 SLC 特异性引物扩增出 1 条特异性条带, 大小约为 400 bp, 与预期大小一致, 见图 1。 *BamH* I, *EcoR* I 双酶切鉴定 pDsRed2-N1-SLC, 亦证实构建成功, 见图 2。测序与 Genbank 公布序列一致。



1, 2: SLC cDNA; M: DNA marker

图 1 人 SLC 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定
Figure 1 Identification of PCR production of TRAIL cDNA by agarose gel electrophoresis



M: DNA marker; 1: pDsRed2-N1-SLC/*BamH* I + *EcoR* I; 2: pDsRed2-N1-SLC

图 2 重组质粒 pDsRed2-N1-SLC 双酶切鉴定
Figure 2 The restrictive endonuclease digestion analysis of recombinant vector pDsRed2-N1-SLC

2.2 SLC 稳定转染表达细胞株的构建及其鉴定

ELISA 检测 24h 10^5 Siha-SLC 细胞培养上清含 457 pg/ml SLC,证实 SLC 转染组 Siha 细胞成功表达 SLC。

2.3 SLC 促进细胞侵袭

应用流式细胞术证实,与对照组相比,SLC 转染组趋化小室膜上肿瘤细胞数明显多于对照组,说明 SLC 组肿瘤细胞侵袭指数(2.43 ± 0.14)强于对照组,显著促进肿瘤侵袭($P < 0.01$),见图 3。

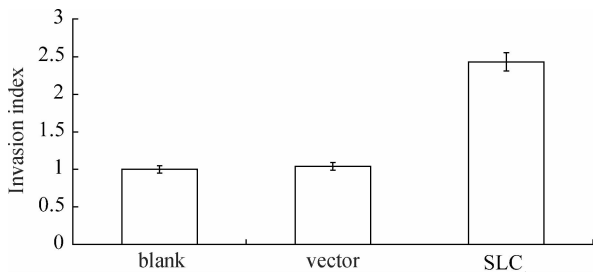


图 3 SLC 促进 Siha 侵袭

Figure 3 SLC improves the invasion of Siha cellline

2.4 SLC 促进肿瘤细胞胞内 NF- κ B 活化

通过应用 NF- κ B 特异性启动子荧光素酶报告基因检测发现,SLC 组 NF- κ B 活化指数(3.98 ± 0.194)明显高于对照组($P < 0.01$),见图 4,证实 SLC 明显激活了 Siha 细胞 NF- κ B。

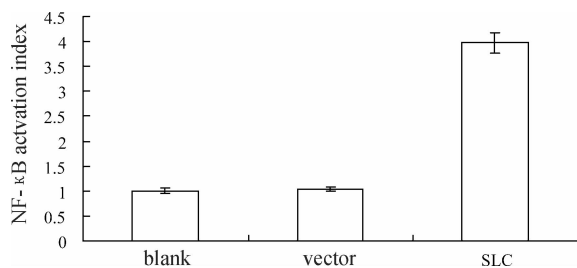


图 4 SLC 促进 NF- κ B 活化

Figure 4 SLC improves NF- κ B activation

3 讨论

次级淋巴组织趋化因子(secondary lymphoid tissue chemokine, SLC)属于趋化因子 CC 亚族,其氨基端前两个保守的半胱氨酸紧密相连。人 SLC 定位于 9 号染色体短臂 1 区 3 带(9p13),全长 cDNA 由 406 个碱基组成的,编码 134 个氨基酸,氨基端有一个 23 个氨基酸残基组成的信号肽,其通过与 G-蛋白偶联七次穿膜受体 CCR7 结合发挥生物学功能^[1]。它可以促进表达 CCR7 淋巴细胞发生归巢,但又与肿瘤细胞淋巴结转移密切相关。SLC 研究主要集中对 CCR7 表达的成熟树突状细胞、T 细胞、NKT 细胞、中性粒细胞等多种免疫细胞上。肿瘤局部的 SLC 可趋化多种免疫细胞至肿瘤部位,通过 SLC-CCR7 作用促进机体抗癌免疫应答,如增强

树突状细胞吞噬能力^[6],促进肿瘤局部炎症反应^[7]。在本课题组前期工作也发现 SLC 促进肿瘤细胞表达 MHC-I 类,诱导产生 Th1 类细胞因子,抑制其产生抑制性细胞因子 TGF- β ^[5]。

现有研究已经证实, Siha 细胞是一种 HPV 病毒阳性的宫颈癌细胞株,是常用宫颈癌研究细胞模型^[8]。我们本次成功构建人 SLC 红色荧光蛋白真核表达载体,建立稳定表达 SLC 蛋白的 Siha 细胞株, SLC-红色荧光蛋白持续高表达。结果证实,在 SLC 作用下,肿瘤细胞原位侵袭能力有所增强。肿瘤淋巴结转移后,受到淋巴结高内皮小静脉表达的 SLC 刺激,肿瘤细胞本身侵袭能力增强,更可促进转移发生,有利于肿瘤生长。

不仅如此,我们证实 SLC 诱导肿瘤细胞 NF- κ B 的活化增强。相关研究也证实, NF- κ B 活化的肿瘤细胞其侵袭与转移能力较强,可能是由于 NF- κ B 活化可刺激基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)表达, MMP-9 通过降解细胞外基质、诱导生长因子及降低癌细胞间黏附性等方式促进肿瘤细胞侵袭及转移^[9]。

综上所述,虽然早已证实 SLC 增强多种免疫细胞抗癌应答能力,但是本实验从另一角度证实其可促进肿瘤细胞侵袭转移,有助于对 SLC 在肿瘤生物学的多重作用进行深入了解。

参考文献:

- [1] Nagira M, Imai T, Hieshima K, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13[J]. J Biol Chem, 1997, 272(31): 19518-19524.
- [2] Henning G, Ohl L, Junt T, et al. CC chemokine receptor 7-dependent and-independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720[J]. J Exp Med, 2001, 194(12): 1875-1881.
- [3] Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis[J]. J Leukoc Biol, 2006, 79(4): 639-651.
- [4] 于利利,王泽华. Livin 异构体特异性 shRNA 对宫颈癌 Hela 细胞凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15(3): 228-232.
- [5] Wu S, Xing W, Peng J, et al. Tumor transfected with CCL21 enhanced reactivity and apoptosis resistance of human monocyte-derived dendritic cells[J]. Immunobiology, 2008, 213(5): 417-426.
- [6] 王爽,鲁娟,吕丽春,等. 趋化因子受体 CXCR4 在鼻咽癌中的表达及意义[J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(1): 8-12.
- [7] Malmberg KJ. Effective immunotherapy against cancer: a question of overcoming immune suppression and immune escape? [J]. Cancer Immunol Immunother, 2004, 53(10): 879-892.
- [8] 王晓娜,马力,安春丽,等. 鸦胆子油乳对宫颈癌 SiHa 细胞的抑制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(5): 494-497.
- [9] 袁云霞,徐文方,刘健,等. 基质金属蛋白酶抑制剂 LY52 对人卵巢上皮癌细胞 SKOV3 中 MMP-2, MMP-9 表达及其侵袭转移能力的抑制作用[J]. 癌症, 2006, 25(6): 663-670.

[编辑:杨 卉;校对:安 凤]