

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00990

肾癌转移相关 CXCR4 基因核定位序列的初步研究

刘 骞, 王林辉, 杨 庆, 徐 斌, 孙颖浩*

第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨基质细胞衍生因子 1(SDF-1)及其受体 CXC 趋化因子受体 4(CXCR4)在肾癌细胞转移中的作用机制,观察不同区段 CXCR4 在肾癌细胞内的定位。**方法:**应用核定位分析软件结合实验,构建不同长度的 CXCR4 与绿色荧光蛋白 pEGFP-N1 重组表达载体,转染肾透明细胞癌 A498 细胞株后用共聚焦显微镜观察重组表达载体在细胞内的定位。**结果:**生物信息学分析软件 PSORT II Prediction 发现第 146~149 位氨基酸残基 RPRK 可能是 CXCR4 的核定位序列,我们构建的重组质粒 EGFP-CXCR4(1~510 bp)、EGFP-CXCR4(1~765 bp)、野生型全长 EGFP-CXCR4 分别加 SDF-1 刺激因子后其表达产物主要呈细胞核分布,而加入 SDF-1 刺激因子后重组质粒 EGFP-CXCR4(1~267 bp)的表达产物呈细胞质分布,未经 SDF-1 刺激野生型全长 EGFP-CXCR4 其表达产物呈细胞质分布,与生物信息学分析软件预测结果初步吻合。**结论:**CXCR4 的第 90~170 位氨基酸残基含有核定位序列,为进一步精确定位 CXCR4 在肾癌细胞内的核定位序列以及寻找抑制肾癌转移的可能靶标奠定了实验和理论基础。

[关键词] 肾肿瘤;趋化因子;核定位序列;亚细胞定位

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-0990-04

Preliminary study on CXCR4 nuclear localization sequence in metastatic renal cell carcinoma

LIU Qian, WANG Lin-hui, YANG Qing, XU Bin, SUN Ying-hao*

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the role of SDF-1/CXCR4 in metastasis of renal cell carcinoma and to observe the intracellular location of different CXCR4 segments in renal carcinoma cells. **Methods:** The potential nuclear localization sequences of different CXCR4 were discovered by nuclear localization software and experiments. Full length and truncated forms of CXCR4 were fused with green fluorescent protein pEGFP-N1 and their influence on subcellular localization was examined by confocal microscopy after transfecting them into renal carcinoma cell line A498. **Results:** Analysis with PSORT II Prediction revealed that the nuclear localization sequence region of CXCR4 was located between amino acids 146 and 149 (RPRK). Expression products of the recombinant plasmids with SDF-1 stimulation, including EGFP-CXCR4(1-510 bp), EGFP-CXCR4(1-765 bp) and wild-type EGFP-CXCR4, were mainly located in the cell nuclei. However, expression product of EGFP-CXCR4(1-267 bp) with SDF-1 stimulation was mainly located in the renal cell cytoplasm. Expression product of wild-type EGFP-CXCR4 full length plasmid without SDF-1 stimulation was mainly located in the cell cytoplasm; these results accorded with the results of bioinformatics analysis. **Conclusion:** Nuclear localization sequence of CXCR4 is located in the amino acids 90 to 170, which provides a theoretical basis for further clarifying the nuclear localization sequences of CXCR4 in renal cell carcinoma cells and for finding new potential target for inhibiting the metastasis of renal cell carcinoma.

[KEY WORDS] kidney neoplasms; chemokine; nuclear localization sequence; subcellular localization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(9):990-993]

肾癌是常见的泌尿系肿瘤之一,占成人恶性肿瘤的 2%~3%^[1-2]。外科手术是治疗早期肾癌的主要方式,但对于大量已有局部或远处转移的中晚期肾癌目前并没有很好的治疗方式。因此,研究肾癌侵袭、转移的细胞和分子机制,为探索新的治疗方案奠定理论基础尤为必要。

在前期实验中,我们在共聚焦显微镜下观察到经基质细胞衍生因子 1(SDF-1)处理 24 h 后,EGFP-CXCR4 融合蛋白由肾透明细胞癌 A498 细胞株的细胞质转移至细胞核;同时研究肾癌病理标本发现,肾癌原发灶中 CXCR4 未出现核定位,而在肾癌转移灶中出现了 CXCR4 的核定位(另文发表)。

[收稿日期] 2009-03-17 **[接受日期]** 2009-04-17

[基金项目] 国家自然科学基金(30873040/C171010). Supported by National Natural Science Foundation of China (30873040/C171010).

[作者简介] 刘 骞,硕士生,住院医师. E-mail:zlailqyeath6000@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81873409, E-mail:sunyh@medmail.com.cn

我们推测 SDF-1 与 CXCR4 结合后, CXCR4 向细胞核内转移, 直接或间接传递了某些信号, 激活某些信号通路, 这些信号通路可能与肾癌转移相关, 如果从 CXCR4 蛋白可能存在的核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)入手, 阻断其 NLS, 将为寻找抑制肾癌转移的可能靶标奠定实验和理论基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、细胞及试剂 EGFP-CXCR4 质粒由第二军医大学长海医院泌尿外科王志向硕士惠赠; pEGFP-N1 由本实验室保存, 肾透明细胞癌 A498 细胞株购自中国医学科学院基础研究所细胞中心; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; MEM 培养液购自 Gibco 公司; pMD19-T Simple Vector、T₄ DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; 各种 DNA 限制性内切酶、胶回收试剂盒购自 Ferments 公司; 转染试剂 Fugene HD 购于 Roche 公司; 质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司。

1.2 细胞培养 肾透明细胞癌 A498 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液, 培养条件为湿润状态下 37℃、5% 二氧化碳。

1.3 重组质粒的构建 生物信息学分析软件 PSORT II Prediction (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) 发现, 第 146~149 位氨基酸残基 RPRK 可能是 CXCR4 的 NLS。本研究利用 PCR 技术构建 3 种 C 端缺失体: 1~89 位氨基酸残基(由 CXCR4 1~267 bp 翻译), 1~170 位氨基酸残基(由 CXCR4 1~510 bp 翻译), 1~255 位氨基酸残基(由 CXCR4 1~765 bp 翻译)。以含有全长 EGFP-CXCR4 质粒为模板, 设计了 4 条引物: 引物 1: 5'-caagcttaatggaggggatcagtatatacacttcag-3' (下划线为 Hind III 酶切位点), 引物 2: 5'-cagatctgagatgacaaagaggaggtcgccac-3' (下划线为 Bgl II 酶切位点), 引物 3: 5'-cagatctgaggaatagtcagcaggagggcagg-3' (下划线为 Bgl II 酶切位点), 引物 4: 5'-cagatctgagtaaggcagccaacaggcgaagaaagc-3' (下划线为 Bgl II 酶切位点), 均由上海赛百盛基因技术有限公司合成, 引物 1 和引物 2 用于扩增 CXCR4 第 1~267 bp 片段, 引物 1 和引物 3 用于扩增 CXCR4 第 1~510 bp 片段, 引物 1 和引物 4 用于扩增 CXCR4 第 1~765 bp 片段, PCR 扩增条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。割胶回收后连接于 pMD19-T Simple Vector 载体中, 转化含有目的片段的 T 载体进入大肠杆菌, 筛选阳性克隆, 摇菌并扩增含有相应目的片段的 T 载体质粒, 利用目的片段两端的 Bgl II/Hind III 酶切位点将其从 T 载体上切下, 绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-N1 用 Bam HI/Hind III 消化, 酶切后

的目的片段和载体连接, 得到能表达 CXCR4 不同长度片段的重组质粒, 分别命名为: EGFP-CXCR4 (1~267 bp)、EGFP-CXCR4 (1~510 bp)、EGFP-CXCR4 (1~765 bp), 同时保证目的基因的读码框不变, 送华大基因科技股份有限公司(上海分公司)测序验证。

1.4 Fugene HD 介导转染肾透明细胞癌 A498 细胞株 将构建的 3 个重组质粒 EGFP-CXCR4 (1~267 bp)、EGFP-CXCR4 (1~510 bp)、EGFP-CXCR4 (1~765 bp) 转染肾透明细胞癌 A498 细胞株, 并设立 pEGFP-N1 空载体, 野生型全长 EGFP-CXCR4 (加 SDF-1 和不加 SDF-1 刺激) 为对照。

用 Fugene HD 转染肾透明细胞癌 A498 细胞株, 12 孔前 6 孔细胞培养板放置无菌盖玻片, 细胞接种密度为 1×10^4 / 孔, 进行细胞爬片。转染前一天更换无血清 opti-MEM 培养液, 900 μ l / 孔, 第 2 天将 1.6 μ g DNA 和 4 μ l Fugene HD 用 100 μ l opti-MEM 培养液稀释, 混匀, 室温放置 15 min, 将混合物分别滴入前 6 孔中, 5% CO₂、37℃ 孵育 24 h, 后加入 200 ng/ml SDF-1 刺激因子, 24 h 后 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 1% Tritox-100 透化 30 min, 用 DAPI 染色细胞核 5 min, 加 50 μ l 甘油封片。

1.5 激光共聚焦观察 Leica SP2 型激光扫描共聚焦显微镜下观察(63 \times 油镜), 激发光波长为 488 nm, 发射光波长为 507 nm, EGFP 呈绿色, 标记 EGFP-CXCR4 (1~267 bp)、EGFP-CXCR4 (1~510 bp)、EGFP-CXCR4 (1~765 bp)、野生型全长 EGFP-CXCR4 及 pEGFP-N1 空载体; 激发光波长为 358 nm, 发射光波长为 461 nm, DAPI 呈蓝色标记细胞核。

2 结果

2.1 重组 T 载体质粒酶切鉴定 目的片段以 EGFP-CXCR4 为模板进行 PCR 扩增, 引物两端分别携带 Bgl II/Hind III 酶切位点, 将扩增后目的片段与 pMD19-T Simple Vector 载体连接, 利用 Bgl II/Hind III 酶切位点将其从相应 T 载体中切下, 酶切电泳如图 1。

2.2 共聚焦显微镜观察 EGFP-CXCR4 及 pEGFP-N1 空载体转染肾透明细胞癌 A498 细胞株后其表达产物核定位情况 pEGFP-N1 空载体转染肾透明细胞癌 A498 细胞株 24 h 后加入 SDF-1 (200 ng/ml) 刺激因子 24 h 后其表达产物呈细胞均匀分布; 野生型全长 EGFP-CXCR4 转染肾透明细胞癌 A498 细胞株未经 SDF-1 刺激 48 h 后其表达产物主要呈细胞质分布; 野生型全长 EGFP-CXCR4 转染肾透明细胞癌 A498 细胞株 24 h 后加入 SDF-1 (200 ng/ml) 刺激因子 24 h 其表达产物呈细胞核聚集, 部分定位于

细胞质。EGFP-CXCR4 在加入 SDF-1 后出现核定位,如图 2。

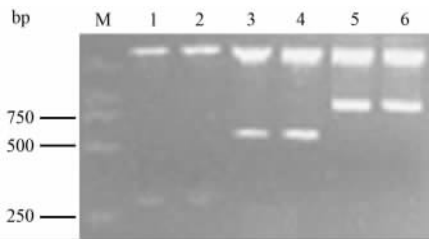


图 1 重组 T 载体酶切鉴定图

Fig 1 Recombinant T-vector identification by restriction enzyme digestion

1,2:T (1-267 bp) double digestion with *Bgl* II/*Hind* III; 3,4:T (1-510 bp) double digestion with *Bgl* II/*Hind* III; 5,6:T (1-765 bp) double digestion with *Bgl* II/*Hind* III. M:Maker DL2000

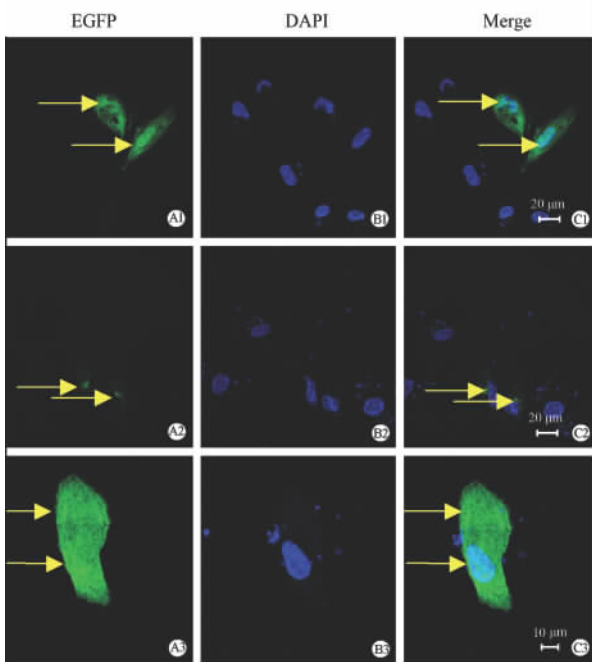


图 2 共聚焦显微镜观察 EGFP-CXCR4 及 pEGFP-N1 在细胞内核定位情况

Fig 2 Intracellular location of EGFP-CXCR4 and pEGFP-N1 as examined by fluorescence confocal microscopy

A: The cellular distribution of EGFP in A498 cells; B: Nuclei were stained with DAPI; C: Overlay of A and B. A1, B1, C1: Cells transfected by EGFP-CXCR4 treated with SDF-1; A2, B2, C2: Cells transfected by EGFP-CXCR4 treated without SDF-1; A3, B3, C3: Cells transfected by pEGFP-N1 treated with SDF-1. Transfection efficiency of pEGFP-N1 is 40%; others are 15%-20%

2.3 共聚焦显微镜观察不同长度 CXCR4 缺失体转染肾透明细胞癌 A498 细胞株后其表达产物核定位情况 CXCR4 不同缺失体转染肾透明细胞癌 A498 细胞株 24 h 加入 SDF-1(200 ng/ml) 刺激因子 24 h 后,观察到 EGFP-CXCR4(1~267 bp)表达产物主要

呈细胞质分布,EGFP-CXCR4 (1~510 bp)、EGFP-CXCR4(1~765 bp)表达产物主要呈细胞核聚集,部分定位于细胞质,如图 3。

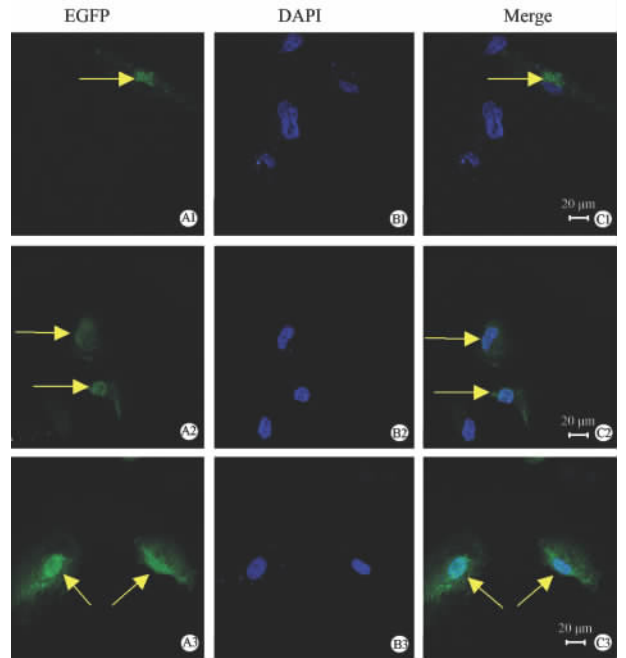


图 3 共聚焦显微镜观察 CXCR4 不同缺失体在细胞内核定位情况

Fig 3 Intracellular location of different CXCR4 mutants as examined by fluorescence confocal microscopy

A: The cellular distribution of EGFP in A498 cells; B: Nuclei were stained with DAPI; C: Overlay of A and B; A1, B1, C1: Cells transfected by EGFP-CXCR4(1-267 bp) treated with SDF-1; A2, B2, C2: Cells transfected by EGFP-CXCR4(1-510 bp) treated with SDF-1; A3, B3, C3: Cells transfected by EGFP-CXCR4(1-765 bp) treated with SDF-1. Transfection efficiency of EGFP-CXCR4(1-267 bp), EGFP-CXCR4(1-510 bp), and EGFP-CXCR4(1-765 bp) are 15%-20%

3 讨论

CXCR4 是一个 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体,编码 352 个氨基酸。近年来研究发现 CXCR4 选择性地与 SDF-1 结合,促进肿瘤细胞的发生、增殖、转移及肿瘤新生血管形成^[3]。SDF-1 又称 CXCL12,属于趋化因子 CXC 家族成员。CXCR4 是 SDF-1 的特异性专属受体,二者具有高度的亲和力及绝对特异性。SDF-1/CXCR4 被认为对多种实质性肿瘤的转移调控起到主要作用^[4]。

研究发现不同的肿瘤表达不同的趋化因子受体,并且在肿瘤转移好发部位表达相应的配体^[5]。Otsuka 等^[6]在非小细胞肺癌的研究中发现肿瘤细胞高水平地表达 CXCR4 不表达 SDF-1,并且被 SDF-1 激活的 CXCR4 能促使转移和侵袭;高表达 CXCR4

的肿瘤患者比低表达的肿瘤更容易转移。而 SDF-1/CXCR4 在肾癌中的发生、发展、转移、侵袭中的作用目前尚不完全清楚, Jones 等^[7]用 DNA 微点阵方法发现 CXCR4 在肾透明细胞癌中表达水平更高。我们目前研究发现: (1) 肾癌细胞中 CXCR4 高表达; (2) 肾癌转移好发部位 SDF-1 表达水平较高; (3) SDF-1 可以促进肾癌细胞 A-498 定向迁移; (4) EGFP-CXCR4 融合蛋白在 SDF-1 刺激 24 h 后转移至细胞核(另文发表)。基于前期研究, 我们认为, CXCR4 与 SDF-1 结合后向细胞核内迁移的过程中可能传递了某些信号, 促进肿瘤细胞增殖或转移, 至于是 CXCR4 的哪一段氨基酸序列在引导 CXCR4 蛋白入核中起关键作用, 推测这段引导 CXCR4 蛋白的氨基酸序列就是 CXCR4 的 NLS, 目前该方面的研究国内外尚未见报道。

一般出现核定位的蛋白通常含有 NLS, 我们推测全长 CXCR4 必定含有一段 NLS 将其带入细胞核内。常见的 NLS 通常为一个基本的包含几个 K/R 氨基酸残基所组成的 4~8 个氨基酸短序列, 称一元 NLS^[8]。实验结果可以看出, EGFP-CXCR4(1~267 bp) 表达产物主要定位于细胞质, EGFP-CXCR4(1~510 bp) 表达产物主要呈细胞核聚集。姚峰等^[9]构建了 SDF-1 与绿色荧光蛋白的融合蛋白表达载体, 转染 COS-7 细胞, 共聚焦的结果显示融合蛋白定位于细胞质, 可以排除 SDF-1 可能含有 NLS。目前根据本实验结果可以推断 CXCR4 的 NLS 不在 1~89 位氨基酸残基, 而可能定位于 90~170 位氨基酸残基, 生物信息学预测 CXCR4 可能的 NLS 为第 146~149 氨基酸残基 RPRK, 与生物信息学预测结果基本吻合, 但准确性有待进一步实验证实。

本实验虽然转染效率比较低, 但同期共聚焦观察相同质粒转染肾透明细胞癌 A498 细胞株与文中照片结果一致(未全部列出), 表明实验结果并非偶然现象。肾癌病理标本发现肾癌原发灶中 CXCR4 未出现核定位, 而在肾癌转移灶中出现了 CXCR4 的核定位, 本研究就 CXCR4 可能的 NLS 进行探讨, 体外转染肾透明细胞癌 A498 细胞株, 证明含有 NLS 的 EGFP-CXCR4(1~510 bp)、EGFP-CXCR4(1~765 bp) 具有定向迁移至细胞核的核定位效

应, CXCR4 依赖 NLS 入核, 一旦其 NLS 区域发生关键氨基酸残基突变或 CXCR4 构象发生改变使 NLS 被掩盖, CXCR4 就失去了核定位功能。

综上所述, 通过 CXCR4 核定位序列的研究, 使我们进一步了解了 NLS 的概念, 为今后构建删除 NLS 的 CXCR4 重组表达载体, 进一步验证生物信息学分析软件的预测结果创造了实验基础, 但是 CXCR4 在其存在的 NLS 引导下入核后如何与相关基因或蛋白作用而促进肿瘤的转移尚不完全清楚, 对于其机制有待进一步研究。

(志谢 感谢第二军医大学长海医院中心实验室蔡在龙、汪佳琪老师给予的无私指导与帮助, 感谢长海医院泌尿外科王志向硕士赠送质粒!)

[参考文献]

- [1] Heldwein F L, McCullough T C, Souto C A, Galiano M, Barret E. Localized renal cell carcinoma management: an update[J]. Int Braz J Urol, 2008, 34: 676-689.
- [2] Zubac D P, Bostad L, Seidal T, Wentzel-Larsen T, Haukaas S A. The prognostic relevance of interactions between venous invasion, lymph node involvement and distant metastases in renal cell carcinoma after radical nephrectomy[J]. BMC Urol, 2008, 8: 19.
- [3] Burger J A, Kipps T J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment[J]. Blood, 2006, 107: 1761-1767.
- [4] Zlotnik A. Chemokines and cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 119: 2026-2029.
- [5] Pan J, Mestas J, Burdick M D, Phillips R J, Thomas G V, Reckamp K, et al. Stromal derived factor-1(SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis[J]. Mol Cancer, 2006, 5: 56.
- [6] Otsuka S, Bebb G. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2008, 3: 1379-1383.
- [7] Jones J, Otu H, Spentzos D, Kolia S, Inan M, Beecken W D, et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11: 5730-5739.
- [8] 张晓楠, 黄 勇, 曹 蔚, 侯 颖, 赵玮钦, 关璐媛, 等. Red 系统三种蛋白在哺乳动物细胞核中定位表达的设计和构建[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8: 1809-1812.
- [9] 姚 峰, 周军媚, 王 佐, 危当恒, 姜志胜, 刘录山, 等. SDF-1 α 基因与绿色荧光蛋白融合载体的构建及亚细胞定位[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18: 1-4.

[本文编辑] 尹 茶