

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00068

· 研究快报 ·

蛋白免疫共沉淀筛选肾癌 A498 细胞 CXCR4 核定位结合蛋白

王志向^{1,2△}, 蔡晨^{3△}, 王林辉¹, 刘冰¹, 杨庆¹, 孙颖浩^{1*}

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

2. 解放军 188 医院泌尿外科, 潮州 521000

3. 第二军医大学长海医院特需诊疗科, 上海 200433

[摘要] **目的** 筛选肾癌 A498 细胞 CXCR4 核定位结合蛋白。**方法** 采用蛋白免疫共沉淀实验寻找特异性条带, 再通过蛋白质谱分析、生物信息学分析寻找可能与 CXCR4 结合的蛋白。**结果** CXCR4 抗体进行蛋白免疫共沉淀, 发现有 3 条特异性条带。选取特异性条带行质谱分析提示可能的蛋白共有 36 个。将这 36 个蛋白与 CXCR4 进行生物信息学分析发现 NR1D2、c-src 及 HSPA8 有可能与 CXCR4 相互作用, 参与 CXCR4 核定位。**结论** NR1D2、c-src 及 HSPA8 可能参与了 A498 细胞 CXCR4 核定位的过程。

[关键词] 肾肿瘤; NR1D2; c-src; HSPA8; CXCR4 核定位; 免疫共沉淀**[中图分类号]** R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)01-0068-04

Co-immunoprecipitation in screening proteins interacting with CXCR4 during nuclear localization in renal cell carcinoma A498 cells

WANG Zhi-xiang^{1,2△}, CAI Chen^{3△}, WANG Lin-hui¹, LIU Bing¹, YANG Qing¹, SUN Ying-hao^{1*}

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

2. Department of Urology, No. 188 Hospital of PLA, Chaozhou 521000, Guangdong, China

3. Department of Special Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To screen for the proteins interacting with CXCR4 during nuclear localization in renal cell carcinoma (RCC) A498 cells. **Methods** Specific band in co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments was sent for mass spectrometry. With the results of Co-IP experiments and mass spectrometry, the proteins interacting with CXCR4 were determined by bioinformatics analyses. **Results** Three specific bands were found after Co-IP with anti-CXCR4 antibody, and the results of mass spectrometry of the three specific bands showed 36 proteins possibly interacting with CXCR4. Bioinformatics analyses showed that NR1D2, c-src and HSPA8 might interact with CXCR4 and participate in CXCR4 nuclear localization. **Conclusion** NR1D2, c-src and HSPA8 might have participated in CXCR4 nuclear localization in RCC A498 cells.

[Key words] kidney neoplasms; NR1D2; c-src; HSPA8; CXCR4 nuclear localization; co-immunoprecipitation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 68-71]

基质细胞衍生因子 1(stromal cell derivation factor 1, SDF-1)通过与其受体 CXCR4 相互作用转导特定信号, 在许多生理和病理过程中发挥重要作用。CXCR4 在肾癌细胞中高表达^[1], SDF-1/CXCR4 与肾癌细胞的增殖、存活、靶器官特异性转移等密切相关^[2-3]。阻断 SDF-1/CXCR4 通路能够有效地抑制肾癌的生长及转移^[2], 为治疗肾癌开辟了新途径。

我们前期研究中发现在 SDF-1 刺激下, 肾癌 A498 细胞 CXCR4 发生核定位^[4], 并且将 CXCR4 核定位序列粗略确定在第 90~170 氨基酸序列中^[5]。进一步的研究发现 CXCR4 核定位与肾癌转移有关^[6], 因此寻找 CXCR4 核定位以后的结合蛋白对了解 SDF-1/CXCR4 生物轴在肾癌中的信号通路至关重要。国外已有文献报道在细胞质内与 CXCR4

[收稿日期] 2012-10-16 **[接受日期]** 2012-11-13**[基金项目]** 国家自然科学基金(81272817/H1619). Supported by National Natural Science Foundation of China (81272817/H1619).**[作者简介]** 王志向, 博士生, 主治医师. E-mail: wangzhixiangsmmu@hotmail.com; 蔡晨, 硕士, 主治医师. E-mail: cai_chen1978@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-35030006, E-mail: sunyhchanghai@yahoo.cn

相互作用的几个蛋白,如 HSC73^[7]、铁蛋白重链^[8]、Myosin II A^[9]等。为了找到 CXCR4 核定位过程中与肾癌转移有关的 CXCR4 结合蛋白,本实验通过 CXCR4 蛋白免疫共沉淀技术研究细胞核内与 CXCR4 相互作用的蛋白,以进一步完善 SDF-1/CXCR4 在肾癌细胞核内的信号通路。

1 材料和方法

1.1 材料和设备 肾癌 A498 细胞(ATCC 公司), MEM 培养液、胎牛血清(Gibco 公司), CXCR4 兔抗人多克隆抗体(AB1846, Chemicon 公司), SDF-1(R&D 公司),核蛋白提取试剂盒(NE-PER, Pierce 公司)。蛋白电泳常规试剂、实验中常用设备由第二军医大学长海医院中心实验室提供。

1.2 肾癌 A498 细胞株培养及处理 肾癌 A498 细胞株培养于含 10%胎牛血清的 MEM 培养液中,于 37℃、5%CO₂ 孵箱孵育,倒置显微镜下观察其生长情况,按 1:3 传代,收集生长期细胞,胰酶消化,新鲜培养液制备细胞悬液,在倒置显微镜下进行活细胞计数。然后将质量浓度为 200 ng/mL 的 SDF-1 加入 A498 细胞中,刺激细胞 24 h。

1.3 核蛋白提取及蛋白免疫共沉淀 按试剂盒说明书进行核蛋白提取。在提取的核蛋白中加入 40 μL Protein A+G 微球,4℃孵育 1 h,14 000×g 离心 2 min 后取上清,加入 10 μL CXCR4 多克隆抗体,4℃过夜。加入 40 μL Protein A+G 微球,4℃孵育 2 h(摇床)后 50 000×g 离心 20 s,去除上清,收集微球,用 PBS 漂洗后加入 50 μL 包含 5%β-巯基乙醇的 SDS 上样缓冲液。加热到 85℃,10 min,50 000×g 离心 2 min。取上清进行蛋白电泳,将电泳胶进行银染。

1.4 质谱分析及生物信息学分析 质谱分析由中国科学院上海生命科学院生化与细胞学研究所协助完成,蛋白结构域相互作用分析由上海众信生物技术有限公司协助完成。蛋白相互作用信息查询 String 数据库(<http://string.embl.de/>)获得。

2 结果

对经 SDF-1 刺激后的 A498 细胞核蛋白进行 CXCR4-抗蛋白免疫共沉淀,免疫共沉淀结果的蛋白再行蛋白质电泳,银染后发现 34 000 以及 72 000 左右位置共出现 3 条特异性条带(图 1)。

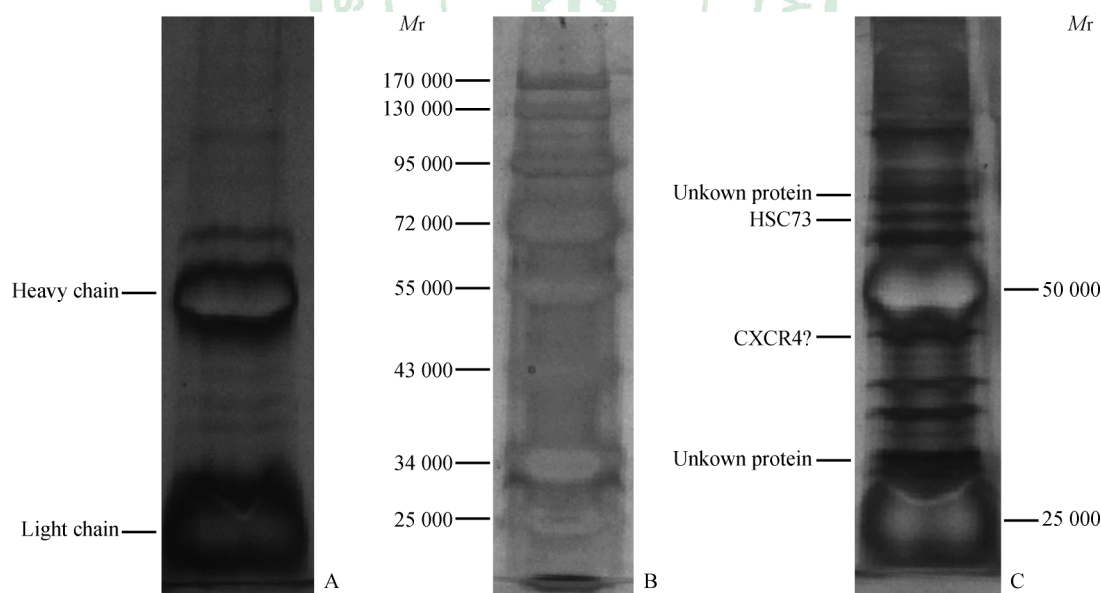


图 1 蛋白免疫共沉淀结果

Fig 1 Result of co-immunoprecipitation

A: CXCR4 anti-body after Western blotting analysis; B: Marker; C: Co-immunoprecipitation experiments of A498 cells after stimulated by SDF-1, which showing specific bands around 34 000 and 72 000

割胶进行质谱分析提示可能的 36 个蛋白如下: SFRS1、CPS1、RPS3、PRSS3、EXOSC6、HBE1、ZC-CHC11、THOC4、RAP1GDS1、NR1D2、HBA2、c-src、

RAB11FIP1、CHTF18、HNRPM、HSPA8、DDX5、LMNA、THRSP、PARP8、CUL2、MTDH、RTTN、GART、TTC27、LARP7、KIAA0460、RBM14、NAV3、NKD2、

TUBB6、SNED1、X12451、SFRS7、CD82/kangai-1/KAI1、AF036905。根据蛋白结构域相互作用分析发现 NR1D2 及 c-src 存在能与 CXCR4 的结构域相互作用的结构域。根据 String 数据库分析发现 c-src(图 2A)、HSPA8(图 2B)可与 CXCR4 相互作用。

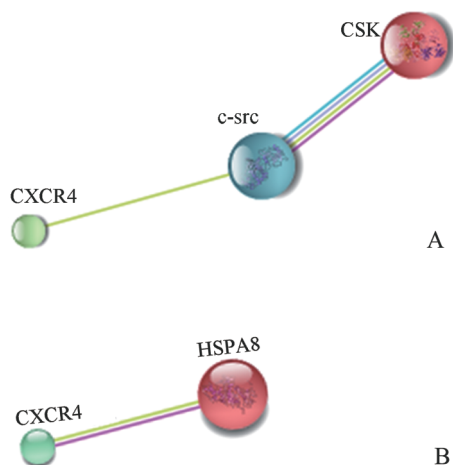


图 2 String 数据库提示 CXCR4 与 c-src(A)、HSPA8(B)相互作用

Fig 2 String database showed CXCR4 interacting with c-src (A) and HSPA8 (B)

3 讨论

CXCR4 作为跨膜 7 次的趋化因子受体,已经被证实具有失活、内化及降解等 G 蛋白偶联受体均具有的特性,可以激活细胞内 G 蛋白依赖性的多种信号通路^[10]。在 SDF-1 刺激后,CXCR4 迅速磷酸化及内化^[11],CXCR4 在内化后可以回收至细胞浆膜上或者选择性到溶酶体降解^[12]。目前的研究发现 CXCR4 除了上述途径外,还有和细胞内其他蛋白结合的信号途径,如 HSC73^[7]、铁蛋白重链^[8]、Myosin II A^[9]等。

本课题组前期实验发现 CXCR4 经 SDF-1 刺激后进入细胞核^[5-6],本实验通过蛋白免疫共沉淀、质谱分析、生物信息学等方法发现 NR1D2、c-src 及 HSPA8 可能与核内 CXCR4 存在相互作用。NR1D2 为核受体,与 CXCR4 在细胞核内相互作用的可能性大。HSC73 是 HSPA8 蛋白的一种亚型,我们前期实验通过蛋白免疫共沉淀后的蛋白质印迹分析^[13]验证了国外文献报道的 HSC73 与 CXCR4 存在相互作用^[7]。我们前期实验也发现 HSC73 蛋白与 CXCR4 在 A498 细胞核内存在相互作用^[13]。考虑 c-src 为 src 癌基因产物的一种,为细胞膜受体,不排除与 CXCR4 在细胞核内相互作用的可能性。Src 是最早被发现的癌基

因,其表达产物的氨基酸序列具有较高同源性和酪氨酸蛋白激酶活性以及同细胞膜结合的性质,定位于胞膜内侧或跨膜分布。在 SDF-1 刺激后肾癌细胞内的 c-src 水平升高^[1],在功能上也与 SDF-1/CXCR4 存在一致性^[14]。因此 c-src 很可能作为 CXCR4 在细胞核内的一个相互作用蛋白而存在,但还需进一步实验验证。

目前关于 SDF-1/CXCR4 在肿瘤细胞内的信号通路研究尚未见报道,本研究通过蛋白质免疫共沉淀技术对肾癌细胞内 CXCR4 相互作用的蛋白进行研究,初步确定了与 CXCR4 核定位中相互作用的蛋白。通过生物信息学分析、从氨基酸序列、目前国内外文献以及计算机三维蛋白相互作用数据库等多方面分析提示 NR1D2、c-src 及 HSPA8 可能与 CXCR4 存在相互作用并参与 CXCR4 的核定位过程。客观条件的限制导致本实验具有一定的缺陷:(1)CXCR4 抗体为多克隆抗体,可能出现非特异性结合。(2)免疫共沉淀蛋白电泳对照组为 CXCR4 多克隆抗体,可能将 A498 细胞核的某些蛋白作为目的蛋白条带带入实验。(3)CXCR4 为正常 A498 细胞内表达量很低的蛋白,而且本实验用的是 A498 细胞核蛋白,再加上蛋白免疫共沉淀中丢失的 CXCR4 蛋白,CXCR4 免疫共沉淀的蛋白量达不到二维电泳所需的量,因此本实验采用了一维蛋白电泳,但一维蛋白电泳存在分离困难的缺点。(4)质谱分析是通过打散蛋白氨基酸序列,然后通过比对实验数据库得到可能的蛋白,这可能造成割胶分析的蛋白和质谱分析的结果之间有出入。(5)通过生物信息学的分析,我们可以从功能一致性、细胞内定位一致性、蛋白相对分子质量一致性等多方面来分析可能与 CXCR4 相互作用的蛋白,而且通过现有的蛋白相互作用结构域可以比较科学地推测两个蛋白是否存在相互作用,但这些目前都不能直接确凿地证实与 CXCR4 核定位之间的关系。因此,本实验结果尚停留在理论阶段,无切实实验证据证实。进一步明确蛋白 NR1D2、c-src 及 HSPA8 是否与 CXCR4 在肾癌细胞核内相互作用仍需要进行免疫荧光、蛋白质免疫共沉淀等相关实验验证。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Schrader A J, Lechner O, Templin M, Dittmar K E, Machten S, Mengel M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86: 1250-1256.
- [2] 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.
- [3] Haviv Y S, van Houdt W J, Lu B, Curiel D T, Zhu Z B. Transcriptional targeting in renal cancer cell lines via the human CXCR4 promoter[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3: 687-691.
- [4] Wang L, Wang L, Yang B, Yang Q, Qiao S, Wang Y, et al. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26: 1049-1054.
- [5] Wang L H, Liu Q, Xu B, Chen W, Yang Q, Wang Z X, et al. Identification of nuclear localization sequence of CXCR4 in renal cell carcinoma by constructing expression plasmids of different deletants[J]. *Plasmid*, 2010, 63: 68-72.
- [6] Wang L, Wang Z, Yang B, Yang Q, Wang L, Sun Y. CXCR4 nuclear localization follows binding of its ligand SDF-1 and occurs in metastatic but not primary renal cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 22: 1333-1339.
- [7] Ding Y, Li M, Zhang J, Li N, Xia Z, Hu Y, et al. The 73-kDa heat shock cognate protein is a CXCR4 binding protein that regulates the receptor endocytosis and the receptor-mediated chemotaxis [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69: 1269-1279.
- [8] Li R, Luo C, Mines M, Zhang J, Fan G H. Chemokine CXCL12 induces binding of ferritin heavy chain to the chemokine receptor CXCR4, alters CXCR4 signaling, and induces phosphorylation and nuclear translocation of ferritin heavy chain[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 37616-37627.
- [9] Rey M, Valenzuela-Fernández A, Urzainqui A, Yáñez-Mó M, Pérez-Martínez M, Penela P, et al. Myosin II A is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1alpha[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 6): 1126-1133.
- [10] Lin S Y, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong K Y, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 802-808.
- [11] Cheng Z J, Zhao J, Sun Y, Hu W, Wu Y L, Cen B, et al. Beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 2479-2485.
- [12] Marchese A, Chen C, Kim Y M, Benovic J L. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking[J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28: 369-376.
- [13] 王志向, 王林辉, 王 梁, 杨 庆, 杨 波, 孙颖浩. 热休克同源蛋白 73 与 CXCR4 在肾癌 A498 细胞核内相互作用[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31: 702-705.
- [14] Wang Z X, Wang L H, Wang L, Yang Q, Yang B, Sun Y H. Interaction of Hsc73 with CXCR4 in nuclei of renal cell carcinoma A498 cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31: 702-705.
- [14] Mateucci E, Ridolfi E, Maroni P, Bendinelli P, Desiderio M A. c-Src/histone deacetylase 3 interaction is crucial for hepatocyte growth factor dependent decrease of CXCR4 expression in highly invasive breast tumor cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2007, 5: 833-845.

[本文编辑] 商素芳, 孙 岩