

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00623

两种 CXCR4 稳定表达的肾癌 A498 细胞株的构建

王林辉^{1△}, 王志向^{1,2△}, 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

[摘要] **目的** 将表达 CXCR4 及增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)-CXCR4 质粒转入肾癌细胞 A498 中, 并建立稳定转染细胞株。**方法** 针对 CXCR4 基因构建稳定表达 CXCR4 质粒, 应用脂质体转染技术将稳定表达 CXCR4 及 EGFP-CXCR4 质粒转入肾癌 A498 细胞中, 经过 G418 抗性筛选细胞株。通过共聚焦显微镜观察转染 EGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞的表达情况。通过共聚焦显微镜观察 EGFP-CXCR4 融合蛋白在 A498 经 SDF-1 刺激前后的变换。通过蛋白质印迹法检测转染后 CXCR4 蛋白表达水平的变化, 应用 MTT 法检测转染后的 A498 细胞增殖能力水平, 并通过 Transwell 实验观察稳定表达 CXCR4 的肾癌 A498 细胞株侵袭能力的改变。**结果** 稳定表达 CXCR4 及 EGFP-CXCR4 的质粒构建后测序结果与 CXCR4 DNA 序列完全吻合。质粒转入 A498 细胞后进行 G418 抗性筛选挑选出合适的细胞株。共聚焦显微镜观察发现, 转染 EGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞中胞膜及胞质中均有绿色荧光表达, 经 SDF-1 刺激后 EGFP-CXCR4 向细胞内转移。蛋白质印迹法发现稳定转染 CXCR4 质粒的 A498 细胞的 CXCR4 表达水平高于正常 A498 细胞。第 3 天以后, 转染 pcDNA-CXCR4 及 pEGFP-CXCR4 质粒组的 A498 细胞增殖水平率高于正常 A498 细胞 ($P < 0.01$)。Transwell 实验证实稳定表达 CXCR4 的肾癌 A498 细胞株侵袭能力与正常 A498 细胞株相比增强 ($P < 0.01$)。**结论** 成功地构建了 CXCR4 稳定表达的肾癌 A498 细胞株, 转染后 A498 细胞的增殖能力增强, 侵袭能力增强, 为后续实验奠定了基础。

[关键词] 肾肿瘤; A498 细胞 CXCR4 受体; 绿色荧光蛋白质类; 转染

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0623-05

Establishment of two renal carcinoma A498 cell lines stably expressing CXCR4

WANG Lin-hui^{1△}, WANG Zhi-xiang^{1,2△}, 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

[Abstract] **Objective** To transfect CXCR4 and enhanced green fluorescent protein (EGFP)-CXCR4 plasmids into renal carcinoma cell line A498 cells to prepare cell lines stably expressing CXCR4. **Methods** Two specific plasmids containing CXCR4 or EGFP-CXCR4 were transfected into renal cell carcinoma cell line A498. Then the cells stably expressing CXCR4 were screened by using G418. Confocal microscopy was used to observe the changes of EGFP-CXCR4 fusion protein in A498 cells before and after stimulation with SDF-1. Western blotting analysis was used to determine CXCR4 expression after transfection. Proliferation of A498 cells was detected by MTT and the invasion ability of cells was detected by transwell assay. **Results** The sequencing result of two plasmids was consistent with CXCR4 DNA sequence, and two cell lines were screened out by G418 screening after the plasmids were transfected into A498 cells. EGFP-CXCR4 fusion protein was found in the cell membrane and cytoplasm of EGFP-CXCR4 transfection group under confocal microscopy. EGFP-CXCR4 migrated into cells after SDF-1 stimulation. Western blotting analysis revealed higher CXCR4 expression in A498 cells stably transfected with CXCR4 plasmids compared with normal A498 cells. The proliferation of cells in pcDNA-CXCR4 and pEGFP-CXCR4 groups were significantly higher than that in normal A498 cell group ($P < 0.01$). Transwell assay showed that the cell invasion ability of cells with stable CXCR4 expression was significantly increased compared with that in the normal A498 cell group ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2013-02-03 **[接受日期]** 2013-03-28

[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] 王林辉, 博士, 教授、主任医师, 博士生导师. E-mail: wlhui@medmail.com.cn; 王志向, 博士生, 主治医师. E-mail: wangzhixiangsmmu@hotmail.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81872077, E-mail: sunyhchanghai@yahoo.cn

Conclusion We have successfully established A498 cell lines stably expressing CXCR4, which have enhanced proliferation levels and higher invasive ability.

[Key words] kidney neoplasms; A498 cells CXCR4 receptors; green fluorescent proteins; transfection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6): 623-627]

肾细胞癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一,目前对于肾细胞癌的发生、癌细胞增殖、转移等机制尚未完全了解,临床上对于肾癌,尤其是转移性肾癌,缺乏确实可靠的治疗手段,因此需要进一步探究肾癌的发病机理,从新的领域来解释肾癌生长,细胞增殖、存活、转移^[1-2]。基质细胞衍生因子(SDF-1)及其受体 CXCR4 相互作用形成 SDF-1/CXCR4 生物轴,该生物轴已经被证实许多生理和病理过程中都发挥了重要的作用^[3]。研究发现 SDF-1、CXCR4 不仅在肾癌细胞中高表达^[4],而且 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^[1-2]。阻断 SDF-1/CXCR4 通路能够有效地抑制肾癌的生长及转移,为治疗肾癌开辟了新途径。

我们前期研究^[5]中发现 A498 细胞在 SDF-1 刺激下 CXCR4 出现核定位,并且发现 CXCR4 核定位序列粗略确定在第 90~170 氨基酸序列中^[6]。临床研究发现肾癌组织中 SDF-1、CXCR4 的高表达预示预后较差^[7]。我们的前期实验还发现 CXCR4 核定位与肾癌转移有关^[8],本研究采用质粒转染技术高表达肾癌细胞株 A498 细胞的 CXCR4 蛋白水平并建立 A498 稳定转染细胞株,为进一步研究 CXCR4 基因在肾癌中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂及设备 A498 细胞(ATCC 公司), MEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Gibco 公司), CXCR4 兔抗人多抗(货号: AB1846, Chemicon 公司), SDF-1 细胞因子(R&D 公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司), BD 侵袭迁移小室(BD 公司)。蛋白电泳及转染常规试剂由第二军医大学长海医院中心实验室提供。共聚焦荧光显微镜: LSM 510(Carl Zeiss 公司),生物分光光度计(Bio-Rad 公司),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。pcDNA3.1 及 pEGFP 质粒由第二军医大学长海医院中心实验室蔡在龙主任惠赠。

1.2 A498 细胞株培养 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,倒置显微镜下进行活细胞计数。

1.3 引物合成 引物合成均由上海生工生物工程技术服务有限公司根据 CXCR4 DNA 序列设计合成。分别利用 *Hind* III (AAGCTT)、*Bam* H I, *Bgl* II (GGATCC) 和 *Xho* I (CTCGAG) 位点设计引物。EGFP-CXCR4 质粒引物: CXCR4E-UP, 5'-AGC TTA ATG GAG GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA G-3'。CXCR4X-DN, 5'-CAG ATC TGA GCT GGA GTG AAA ACT TGA AGA CTC AGA-3'。pcDNA-CXCR4 质粒引物: 5'-ATC GTG AAG CTT ATG GAG GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA G-3', 5'-TGC ATA CTC GAG TTA GCT GGA GTG AAA ACT TGA AGA CTC A-3'。

1.4 质粒转染及 G418 筛选 实验选取空白对照组、空载体转染组, pcDNA-CXCR4 质粒组以及 EGFP-CXCR4 质粒组进行 Lipofectamine 2000 脂质体瞬时转染。按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行转染操作,待细胞生长至 85%满视野时,24 孔板每孔 0.5 μg 质粒 2.4 μL 脂质体。根据分级浓度梯度法测出 A498 细胞最低完全死亡的 G418 浓度为 500 μg/mL。用 100 μL 无菌枪头挑选单克隆,维持 G418 抗性培养,扩大培养,并用荧光显微镜观察细胞形态。

1.5 共聚焦显微镜观察 将稳定生长在玻片上的稳定表达 EGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞(实验组加入 SDF-1 达到 200 ng/mL 浓度,培养箱中孵育 24 h,对照组不加 SDF-1 刺激)经甘油封片后用共聚焦显微镜观察。

1.6 蛋白质印迹法检测 CXCR4 蛋白表达 实验组分为转染 pcDNA-CXCR4 质粒组、转染 pcDNA 空白质粒组、转染 pEGFP-CXCR4 质粒组、转染空 pEGFP 质粒组。采用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白,每孔上样 20 μL,进行 10% SDS-PAGE 分离,半干电转 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗(1:1 000)4℃过夜,二抗室温温度 2 h, ECL 显

色并对 X 线片曝光,经显影定影处理后,胶片用凝胶成像分析系统拍照。

1.7 MTT 法检测 A498 细胞增殖水平分析 实验分 5 组,即转染 pcDNA-CXCR4 质粒组、转染 pcDNA 空白质粒组、转染 pEGFP-CXCR4 质粒组、转染空 pEGFP 质粒组、正常 A498 细胞组。取对数生长期 A498 细胞,经胰酶消化后配成 5×10^5 /mL 的细胞悬液,每孔 0.2 mL 细胞悬液加入 96 孔培养板在 CO_2 孵箱(37°C , $5\% \text{CO}_2$, 饱和湿度)中培养 3 d。每孔加入 20 μL MTT 母液(5 mg/mL),继续培育 3 h 后将培养基吸干去除上清,加 200 μL 二甲亚砜,振荡培育板,使得 formazan 产物充分溶解。用酶标仪读取测试孔在 490 nm 处的光密度值。

1.8 Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力 实验组分为正常 A498 SDF-1(-)组,正常 A498 SDF-1(+)组,转染 pcDNA-CXCR4 质粒 A498 SDF-1(-)组以及转染 pcDNA-CXCR4 质粒 A498 SDF-1(+)组。在含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中培养 A498 细胞至对数生长期,加入无血清 MEM 培养基继续培养 48 h,在预先铺有基质胶的 Transwell 小室的上室内加入 500 μL 无血清培养的 A498 细胞(1×10^5 /ml),下室加入含有 20% 胎牛血

清的 MEM 培养基,SDF-1(+)组下室加入 SDF-1 至浓度 200 ng/mL。于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 24 h 后,取出 Transwell 小室,PBS 溶液冲洗 3 次,棉签轻轻拭去微孔膜上层的细胞,0.1% 结晶紫染色 30 min,加入 200 μL 的 33% 乙酸溶液 10 min 后用酶标仪读取 540 nm 光密度(D)值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 质粒构建 将已装入 CXCR4 序列的 T 载体送上海生工生物工程技术有限公司测序,显示 T 载体中 CXCR4 序列与 CXCR4 DNA 序列完全吻合。

2.2 共聚焦显微镜下观察稳定表达 EGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞 发现稳定表达 EGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞中胞膜及胞质内存在大量绿色荧光,且稳定表达 EGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞经 200 ng/mL SDF-1 刺激 24 h 后发现绿色荧光蛋白向细胞质及细胞核聚集(图 1A、1B)。而稳定表达空 EGFP 的 A498 细胞在 SDF-1 刺激下荧光蛋白未见明显改变(图 1C、1D)。

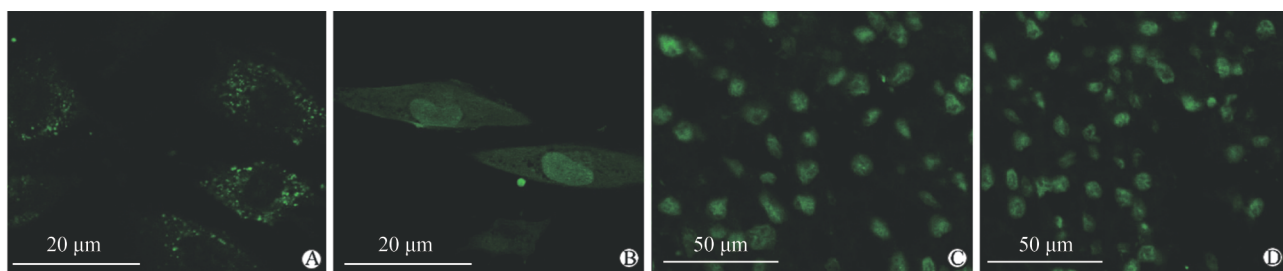


图 1 分别转染 EGFP-CXCR4 质粒及 pEGFP 质粒的 A498 细胞在 SDF-1 刺激下细胞内荧光定位情况

Fig 1 Fluorescence localization in A498 cells transfected with EGFP-CXCR4 and pEGFP plasmids with SDF-1 stimulation

A: SDF-1(-); B: SDF-1(+); A and B showed EGFP-CXCR4 fusion protein transferred to nucleus under confocal microscopy after stimulated by SDF-1 in A498 cells. C: SDF-1(-); D: SDF-1(+); C and D showed EGFP in A498 cells under confocal microscopy after stimulated with SDF-1. EGFP: Enhanced green fluorescent protein

2.3 蛋白质免疫印迹法检测 CXCR4 蛋白表达 实验发现,转染 pcDNA-CXCR4 质粒的 A498 细胞的 CXCR4 蛋白表达量高于正常 A498 细胞(图 2)。转染 pEGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞表达 EGFP-CXCR4 融合蛋白。

2.4 MTT 方法检测 A498 细胞增殖水平 结果

(图 3)显示,转染 pcDNA-CXCR4 及 pEGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞组增殖水平相对于空白对照组提高,从第 3 天开始差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 Transwell 小室侵袭实验结果 图 4 显示,转染 pcDNA-CXCR4 质粒 A498 组细胞侵袭能力较未转染 pcDNA-CXCR4 质粒 A498 组升高。同时发现

加入 SDF-1 刺激后 A498 细胞的侵袭能力提高。正常 A498 SDF-1(-)组、正常 A498 SDF-1(+)组,转染 pcDNA-CXCR4 质粒 A498 SDF-1(-)组以及转染 pcDNA-CXCR4 质粒 A498 SDF-1(+)组的 D_{540} 值分别为 0.42 ± 0.03 、 0.69 ± 0.03 、 0.56 ± 0.04 、 0.75 ± 0.04 , 组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, $n = 9$)。

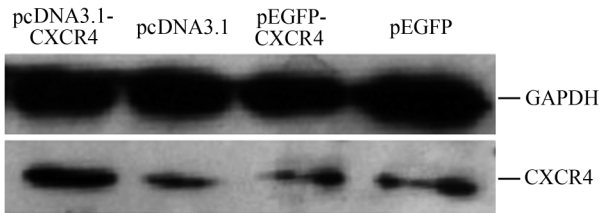


图 2 分别转染 pcDNA-CXCR4 及 pEGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞表达 CXCR4 融合蛋白的情况

Fig 2 CXCR4 protein expression in A498 cells stably transfected with pcDNA-CXCR4 or pEGFP-CXCR4 plasmid
EGFP: Enhanced green fluorescent protein

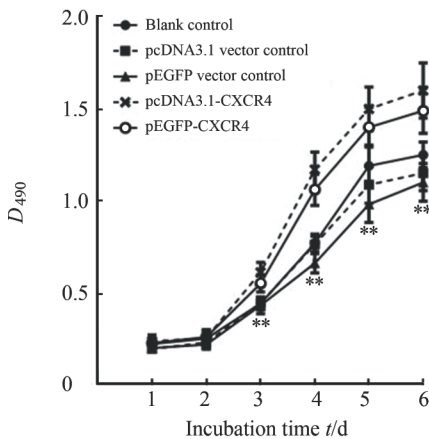


图 3 MTT 法检测 A498 细胞增殖情况

Fig 3 A498 cell proliferation detected by MTT
EGFP: Enhanced green fluorescent protein. ** $P < 0.01$ vs blank control group. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

SDF-1/CXCR4 生物轴是指由趋化因子基质细胞衍生因子-1 与其特异性受体 CXCR4 相互作用而构成的一个与细胞间信息传递、细胞迁移有密切关系的偶联分子对,其实质在于 CXCR4 对其配体 SDF-1 的高度亲和力和绝对特异性,即 CXCR4 作为 SDF-1 的专属受体 (specific receptor) 而存在^[9]。SDF-1/CXCR4 生物轴作为重要的趋化因子对,已

被证实肾癌的生长、侵袭、特异性靶器官转移等方面起着重要的作用^[1,10]。SDF-1/CXCR4 生物轴已被认为是治疗肾癌很有潜力的一个靶点^[2]。

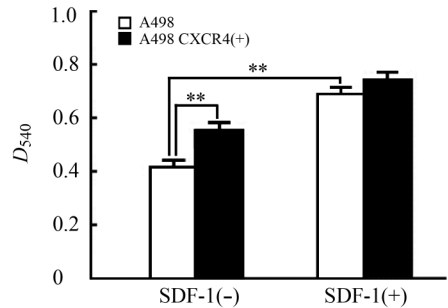


图 4 各组细胞侵袭能力的比较
Fig 4 Comparison of cell invasion abilities among the four groups

** $P < 0.01$, $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

我们课题组对 SDF-1/CXCR4 与肾细胞癌之间的关系进行了大量的研究,发现: CXCR4 在肾癌细胞大量表达与预后较差相关^[7],阻断 CXCR4 可以明显减少肾癌的生长、侵袭能力^[11],并进一步发现 CXCR4 在 SDF-1 刺激下转入细胞核内^[5,8],而且初步分析出 CXCR4 的核定位序列^[6]。因此本研究构建两种 CXCR4 高表达的细胞株,以期以后进一步实验打下基础。

蛋白质印迹法检测发现,转染 pEGFP-CXCR4 的 A498 细胞有融合蛋白的表达。且通过共聚焦显微镜下观察以及 SDF-1 刺激后 EGFP-CXCR4 融合蛋白的核定位可以基本确定构建的 EGFP-CXCR4 稳定表达的 A498 细胞株成功,而且其融合蛋白具有活性。CXCR4 作为趋化因子的一种,属于 G 蛋白偶联受体。本实验将 EGFP 蛋白设计在 CXCR4 膜内侧,防止干扰 SDF-1 与 CXCR4 结合。从图 1 结果来看,SDF-1 刺激后 EGFP-CXCR4 融合蛋白具有生物活性,表明设计成功。但由于设计在 CXCR4 跨膜融合蛋白的细胞内侧,是否会因为 EGFP 蛋白而影响 CXCR4 在细胞内的其他一些功能,这还需要实验验证。

蛋白质印迹法检测显示,稳定表达 pcDNA-CXCR4 的 A498 细胞中 CXCR4 蛋白表达量有提高。MTT 法结果表明,转染 pcDNA-CXCR4 及 pEGFP-CXCR4 质粒的 A498 细胞增殖能力高于对照组 A498 细胞。而且 Transwell 小室侵袭实验也从另

一个角度证实: pcDNA-CXCR4 质粒表达的 CXCR4 蛋白具有生物学活性。高表达 CXCR4 蛋白的肾癌细胞侵袭能力增强。这也说明所构建的 pcDNA-CXCR4 稳定表达 A498 细胞株是成功的。

我们前期实验发现: CXCR4 在 SDF-1 刺激下进入核内^[5,8],但具体信号通路还不明确。我们通过生物信息学、蛋白质免疫共沉淀等技术推测出可能与 CXCR4 结合的蛋白^[12]。因此本实验所成功构建的两种稳定表达 CXCR4 蛋白的 A498 细胞株将为进一步研究 CXCR4 细胞核内转移中信号转导的机制奠定初步的工作基础。

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] 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.
- [2] 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.
- [3] Teicher B A, Fricker S P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16:2927-2931.
- [4] Schrader A J, Lechner O, Templin M, Dittmar K E, Machtens S, Mengel M, et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86:1250-1256.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma[J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10:212.
- [8] Wang L, Wang Z, Yang B, Yang Q, 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.
- [9] Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins[J]. *Science*, 1993, 261:600-603.
- [10] Zhao F L, Guo W. Expression of stromal derived factor-1 (SDF-1) and chemokine receptor (CXCR4) in bone metastasis of renal carcinoma[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38:1039-1045.
- [11] Wang L, Huang T, Chen W, Gao X, Zhou T, Wu Z, et al. Silencing of CXCR4 by RNA interference inhibits cell growth and metastasis in human renal cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28:2043-2048.
- [12] 王志向, 蔡晨, 王林辉, 刘冰, 杨庆, 孙颖浩. 蛋白免疫共沉淀筛选 A498 细胞 CXCR4 核定位结合蛋白[J]. *第二军医大学学报*, 2013, 34:68-71.
- Wang Z X, Cai C, Wang L H, Liu B, Yang Q, Sun Y H. Co-immunoprecipitation in screening proteins interacting with CXCR4 during nuclear localization in renal cell carcinoma A498 cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2013, 34:68-71.

[本文编辑] 尹茶