

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00702

热休克同源蛋白 73 与 CXCR4 在肾癌 A498 细胞核内相互作用

王志向, 王林辉, 王 梁, 杨 庆, 杨 波, 孙颖浩*

第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究热休克同源蛋白 73(heat shock cognate protein 73 000, Hsc73)在基质细胞衍生因子 1(SDF-1)/趋化因子 CXC 受体 4(CXCR4)轴促进肾癌转移中的作用,确定 Hsc73 是否参与了 CXCR4 的核定位。**方法** 通过蛋白电泳观察 CXCR4 高表达后 Hsc73 在 A498 细胞中的表达情况。通过免疫染色、核蛋白免疫共沉淀等方法观察 A498 细胞在经过 SDF-1 刺激后 Hsc73 在细胞内表达情况,以及 Hsc73 与 CXCR4 结合情况。**结果** CXCR4 高表达后, A498 细胞中 Hsc73 表达明显增高。Hsc73 主要表达在 A498 细胞胞质中,在 SDF-1 刺激后出现部分转移至细胞核。提取 SDF-1 刺激后的 A498 细胞核蛋白进行 CXCR4 免疫共沉淀,其中发现了 Hsc73。**结论** Hsc73 作为细胞内常见的分子伴侣蛋白,参与了 CXCR4 在细胞中的转运。对于 SDF-1/CXCR4 信号通路激活的部分环节起到了关键作用,并可能参与了 CXCR4 核转位的过程。

[关键词] 肾细胞癌; HSC70 热休克蛋白质类; CXCR4 受体; 趋化因子 CXCL12; 细胞核

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0702-04

Interaction of Hsc73 with CXCR4 in nuclei of renal cell carcinoma A498 cells

WANG Zhi-xiang, WANG Lin-hui, WANG Liang, YANG Qing, YANG Bo, SUN Ying-hao*

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

[Abstract] **Objective** To investigate the role of protein Hsc73 (heat shock cognate protein 73 000) in renal cell cancer metastasis promoted by SDF-1/CXCR4 axis, so as to determine whether Hsc73 participates in CXCR4 nuclear localization. **Methods** Western blotting analysis was used to observe the expression of Hsc73 in A498 cells over-expressing CXCR4. The location of Hsc73 and the interaction of CXCR4 with Hsc73 were investigated in SDF-1-stimulated A498 cells by immunohistochemical staining, Co-IP (Co-Immunoprecipitation) experiment, etc. **Results** Hsc73 was up-regulated in A498 cells over-expressing CXCR4. Hsc73 was mainly found in the cytoplasm of A498 cells; after stimulation with SDF-1, some Hsc73 appeared in the nuclei. Hsc73 protein was found in the nuclei of A498 cells after Co-IP with anti-CXCR4 antibody. **Conclusion** Hsc73 as a common molecular chaperone participates in the intra-cellular translocation of CXCR4; Hsc73 also plays a key role in the activation of SDF-1/CXCR4 signal pathway and may be involved in the nuclear translocalization of CXCR4.

[Key words] renal cell carcinoma; HSC70 heat-shock proteins; CXCR4 receptor; chemokine CXCL12; cell nucleus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):702-705]

基质细胞衍生因子 1(SDF-1)/趋化因子 CXC 受体 4(CXCR4)生物轴是指由 SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 特异性结合而组成的趋化因子对,在包括肿瘤、炎症、器官发生、HIV 感染等多种病理、生理过程中起作用。迄今为止,已经在包括肾癌在内的 23 种癌症中发现 CXCR4 的表达^[1]。近几年的多项研究表明, SDF-1/CXCR4 与肾细胞癌增殖、存活以及转移等密切相关。因此对 SDF-1/CXCR4 的研究将有助于进一步了解肾癌,丰富肾癌治疗的理论。文献^[2]曾报道了 CXCR4 在肾癌细胞上的表达情况,研

究发现人透明细胞癌细胞株——A498 细胞株高表达 CXCR4。SDF-1/CXCR4 激活促进了肾癌肿瘤相关血管生成,促进了肾癌癌细胞存活与增殖^[3],促进了肾癌转移^[4],此外多项研究还表明:阻断 SDF-1/CXCR4 通路可以抑制肾癌的生长及转移^[4-6]。

热休克同源蛋白 73(heat shock cognate protein 73 000, Hsc73)被认为是细胞内的分子伴侣蛋白之一,最近的研究表明: Hsc73 参与 CXCR4 从细胞膜转移至细胞质内的过程,通过干扰 Hsc73 的表达可以阻止 CXCR4 的内化^[7]。进一步通过免疫荧光染

[收稿日期] 2010-03-24 **[接受日期]** 2010-04-27

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

[作者简介] 王志向, 硕士, 住院医师。E-mail: wangzhixiangsmmu@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81872077, E-mail: sunyhchanghai@yahoo.cn

色发现:Hsc73与CXCR4在细胞质内相互作用,并且被认为与CXCR4促进肿瘤的趋化作用有关^[7]。

在前期实验中,我们发现CXCR4在SDF-1刺激24h出现核转位^[8]。CXCR4核定位促进了肾癌细胞株A498的侵袭和转移。通过阻断SDF-1/CXCR4轴有可能阻断肾癌细胞的特异性靶器官转移。因此我们希望通过研究Hsc73在SDF-1/CXCR4轴中的作用以期完善SDF-1/CXCR4通路,为临床治疗肾癌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料及仪器 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),BD侵袭迁移小室(BD公司),山羊抗人Hsc73抗体(货号Sc-1059,Santa Cruz公司),FITC标记小鼠抗山羊抗体(货号sc-2356,Santa Cruz公司),G418(Gibco BRL公司)核蛋白提取试剂盒(货号:NE-PER,Pierce公司)。蛋白电泳及转染常规试剂由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),实验中常用设备由长海医院中心实验室提供。pcDNA-CXCR4质粒及高表达CXCR4的A498细胞株由本课题组前期制作^[8]。pcDNA3.1质粒由长海医院中心实验室蔡在龙主任赠予。

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 pcDNA-CXCR4质粒构建及转染 收集A498细胞进行细胞总RNA提取。引物如下:5'-ATC GTG AAG CTT ATG GAG GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA G-3',以及5'-TGC ATA CTC GAG TTA GCT GGA GTG AAA ACT TGA AGA CTC A-3'。设计酶切位点为:Hind III和Xho I。pcDNA3.1上的酶切位点是:Hind III和Xho I。通过转染大肠杆菌后挑选单克隆送检测序。将构建好的pcDNA-CXCR4质粒转染A498细胞,经G418(500 μg/ml)筛选2周后挑选单克隆,用蛋白电泳挑选高表达CXCR4的A498细胞株。

1.4 免疫荧光及共聚焦显微镜观察 将稳定生长

在玻片上的A498细胞经过3%多聚甲醛固定30 min,然后加入1%BSA抑制,PBS漂洗后按试剂盒说明加入一抗、二抗,孵育后用50 ng/ml的碘化吡啶复染细胞核。甘油封片后用共聚焦显微镜观察。

1.5 核蛋白提取及免疫蛋白共沉淀 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多抗,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。

1.6 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

通过将转染pcDNA3.1-CXCR4质粒的A498细胞和转染空pcDNA3.1质粒的A498细胞提取蛋白后进行蛋白电泳,结果如图1所示,高表达的CXCR4 A498细胞中Hsc73表达明显增高。

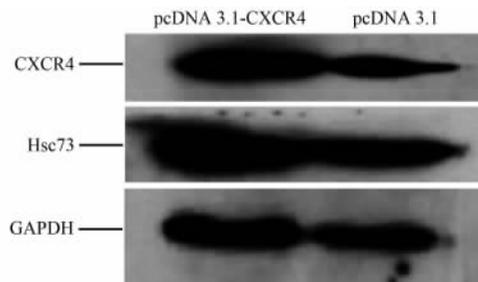


图1 蛋白质印迹法检测高表达CXCR4的A498细胞胞质内Hsc73的表达

Fig 1 Hsc73 expression in A498 cells highly expressing CXCR4 as detected by Western blotting analysis

如图2A所示,A498细胞在没有SDF-1刺激时,Hsc73表达于细胞质内,细胞核内基本没有Hsc73的表达。如图2B所示,在A498细胞在SDF-1刺激24h后,Hsc73部分表达于细胞核内,细胞质内仍有大量Hsc73表达。这说明Hsc73在SDF-1刺激后部分转移至细胞核内。

A498细胞在SDF-1刺激24h后,通过PIERCE公司的核蛋白提取试剂提取细胞核蛋白进行分析。

再将提取的核蛋白用抗 CXCR4 的抗体进行免疫共沉淀,结果发现免疫沉淀法得到的蛋白中有较高的 Hsc73 蛋白。如图 3 所示,经 SDF-1 刺激后的 A498

细胞核蛋白出现了 Hsc73 蛋白条带,而未加 SDF-1 刺激的对照组没有发现 Hsc73 蛋白条带。

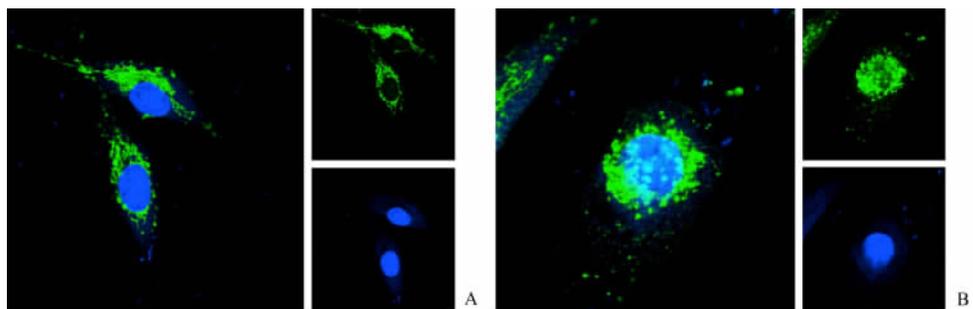


图 2 免疫荧光显示肾癌 A498 细胞在未加入 SDF-1(A)和加入 SDF-1 刺激 24 h(B)后 Hsc73 的细胞内定位情况

Fig 2 Immunofluorescence location of Hsc73 in A498 cells without (A) and with 200 ng/ml SDF-1 stimulation for 24 h

Propidium iodide (red) was used to display the nuclei and Hsc73 was labeled by FITC (green)

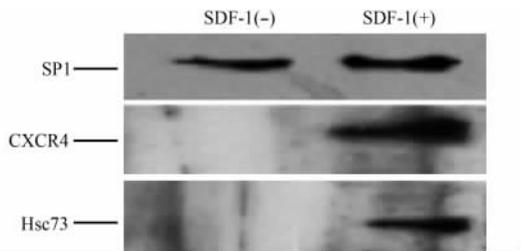


图 3 经 SDF-1 刺激 24 h 后的

A498 细胞的核蛋白进行 CXCR4 免疫共沉淀

Fig 3 Interaction of CXCR4 and Hsc73 in nuclear protein of A498 cells stimulated with SDF-1 for 24 h as detected by co-immunoprecipitation with anti-CXCR4 antibody

SP1 was used as a control protein for nuclear protein

3 讨论

SDF-1/CXCR4 生物轴是指由 SDF-1 与其特异性受体 CXCR4 特异性结合而组成的趋化因子对,在包括肿瘤、炎症、器官发生、HIV 感染等多种病理、生理过程中起作用。SDF-1 是由 Tashiro 等^[9]从骨髓源性的间质细胞 ST2 株第一个克隆出来的,它作为 CXCR4 唯一特异性的配体而存在。SDF-1 在包括骨髓、淋巴结、肝脏、肺、脑等多种器官或组织中表达^[10-12]。这些高表达 SDF-1 的器官大部分是肾癌转移的靶器官。CXCR4 作为趋化因子的一种,属于 G 蛋白偶联受体,是肿瘤中表达最广泛的受体。迄今为止,已经在包括肾癌在内的 23 种癌症中发现 CXCR4 的表达^[1]。

SDF-1/CXCR4 生物轴与肿瘤特异性转移的现

象最早在乳腺癌的研究中被发现^[13]。至今大量的研究表明 SDF-1/CXCR4 生物轴在肿瘤的存活、侵袭、转移中起着重要作用。肾癌高表达 CXCR4,使得肿瘤新生血管增生^[14],肿瘤细胞更易存活,增殖和侵袭能力都有所增强,更在机体内 SDF-1 浓度梯度下向高表达 SDF-1 的靶器官转移^[4]。

热休克蛋白是在从细菌到哺乳动物中广泛存在一类热应激蛋白质。当有机体暴露于高温的时候,就会由热激发合成此种蛋白,来保护有机体自身。许多热休克蛋白具有分子伴侣活性。Hsc73 作为热休克蛋白家族成员之一,被证实在 SDF-1/CXCR4 通路中起重要作用^[7]。Ding 及其同事通过免疫染色发现:Hsc73 和 CXCR4 在 SDF-1 刺激下共同表达在胞质内,其位置和时间具有共同性。他们的进一步研究发现,Hsc73 是 CXCR4 转移到细胞内过程中一个必不可少的蛋白分子。在用 RNA 干扰技术阻断细胞内 Hsc73 的表达后,细胞膜上的 CXCR4 将不能在 SDF-1 的刺激下内化^[7]。并且在神经胶质瘤 U87 细胞株中发现,在 Hsc73 缺失后,CXCR4 介导的细胞迁移明显受到抑制。Hsc73 在 SDF-1/CXCR4 通路介导的肿瘤细胞迁移中起重要作用。Ding 及其同事的实验报道是目前首次研究 Hsc73 在 SDF-1/CXCR4 通路中的作用。

在前期的实验研究中我们发现:肾癌细胞株 A498 细胞中 CXCR4 在 SDF-1 刺激下转移至细胞核内,出现 CXCR4 核转位的肾癌细胞其侵袭力更强^[8]。因此阻断 SDF-1/CXCR4 通路对肾癌的治疗

作用备受关注。目前的大量动物实验研究发现阻断SDF-1/CXCR4生物轴可以引起肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞转移^[4,6,15]。

因此我们认为Hsc73作为SDF-1/CXCR4生物轴中的重要蛋白分子,有必要进一步了解其在SDF-1/CXCR4生物轴中的作用。通过实验,我们发现:在肾癌细胞高表达CXCR4后Hsc73明显增强,而且在SDF-1刺激后Hsc73部分转移至细胞核。这说明Hsc73很有可能参与了CXCR4的核定位过程。但由于本实验自身的限制,市场上没有合适的抗体,不能通过免疫染色直观地显示CXCR4与Hsc73在细胞核内的定位情况。但是细胞核蛋白免疫共沉淀的结果证实: CXCR4与Hsc73在细胞核内相互作用。

综上所述, Hsc73作为SDF-1/CXCR4生物轴在肾癌增殖和转移中的重要蛋白,参与了CXCR4的内化、胞质内转位以及核定位。本研究证实Hsc73与CXCR4在细胞核内相互作用,是参与CXCR4核定位的可能靶蛋白之一,为进一步研究Hsc73与SDF-1/CXCR4生物轴的关系提供了一定的线索。阻断Hsc73在SDF-1/CXCR4生物轴的信号通路有可能抑制肾癌细胞的增殖,并进一步为临床治疗肾癌提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4[J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14: 171-179.
- [2] Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, et al. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis[J]. *Faseb J*, 2004, 18: 1240-1242.
- [3] Zeelenberg I S, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 3833-3839.
- [4] 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.

- [5] Jacobson O, Weiss I D, Szajek L, Farber J M, Kiesewetter D O. ⁶⁴Cu-AMD3100-a novel imaging agent for targeting chemokine receptor CXCR4[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 1486-1493.
- [6] Hirbe A C, Morgan E A, Weilbaecher K N. The CXCR4/SDF-1 chemokine axis: a potential therapeutic target for bone metastases[J]? *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 1284-1290.
- [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] 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] Lotan D, Sheinberg N, Kopolovic J, Dekel B. Expression of SDF-1/CXCR4 in injured human kidneys[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23: 71-77.
- [11] Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Matsuda S, Tanaka K, Yokoyama R, et al. CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis[J]. *Mod Pathol*, 2006, 19: 738-745.
- [12] Luker K E, Luker G D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2006, 238: 30-41
- [13] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan M E, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2001, 410: 50-56.
- [14] Gerritsen M E, Peale F V Jr, Wu T. Gene expression profiling in silico: relative expression of candidate angiogenesis associated genes in renal cell carcinomas[J]. *Exp Nephrol*, 2002, 10: 114-119.
- [15] Pusic I, Dipersio J F. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Curr Opin Hematol*, 2010[Epub ahead of print].

[本文编辑] 尹 茶