

# 稳定过表达CXCR2受体的HEK-293细胞株的构建以及活性鉴定

张洁<sup>1</sup> 任广明<sup>2</sup> 马文兵<sup>2</sup> 葛志强<sup>1</sup> 詹轶群<sup>2</sup> 尹荣华<sup>2\*</sup> 杨晓明<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>天津大学化工学院, 天津 300072; <sup>2</sup>中国人民解放军军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 102206)

**摘要** CXC趋化因子受体2(the CXC chemokine receptor 2, CXCR2)介导的中性粒细胞趋化在细菌感染、慢性炎症、肿瘤发生发展过程中发挥着至关重要的作用, 但是目前对于CXCR2受体及下游信号的调控并未被完全揭示。该研究首先以Flag-CXCR2-Tango质粒为模板设计Flag-CXCR2的特异性引物, PCR扩增后将其连接至pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV慢病毒表达载体上, 随后对阳性克隆进行测序及表达验证。接着在HEK-293T细胞中包装过表达Flag-CXCR2的慢病毒颗粒并感染HEK-293细胞, 使用遗传霉素筛选后, 蛋白质免疫印迹和免疫荧光检测发现, Flag-CXCR2稳定表达在HEK-293细胞膜上。最后利用白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)刺激过表达Flag-CXCR2的细胞株, 检测发现CXCR2下游信号通路活化及F-actin组装。

**关键词** CXCR2; 慢病毒; HEK-293细胞; 中性粒细胞; 趋化性; F-actin

## Construction and Identification of HEK-293 Cell Lines with Stable Overexpression of CXCR2 Receptor

ZHANG Jie<sup>1</sup>, REN Guangming<sup>2</sup>, MA Wenbing<sup>2</sup>, GE Zhiqiang<sup>1</sup>, ZHAN Yiqun<sup>2</sup>,  
YIN Ronghua<sup>2\*</sup>, YANG Xiaoming<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; <sup>2</sup>Beijing Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206, China)

**Abstract** CXCR2 (the CXC chemokine receptor 2)-mediated neutrophil chemotaxis plays an important role in the process of bacterial infection, chronic inflammation and tumor development, but the regulation of the activation of CXCR2 receptor and downstream signals are not fully understood at present. In this study, Flag-CXCR2 was firstly amplified from Flag-CXCR2-Tango plasmid, then inserted it into pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV expression vector. The construction was confirmed by sequencing and the expression of Flag-CXCR2 was detected by Western blot. Then, the lentivirus particles expressing Flag-CXCR2 were generated in HEK-293T cells and transduced into HEK-293 cells. After screening with neomycin, Western blot and immunofluorescence detection showed that Flag-CXCR2 stably expressed on HEK-293 cell membrane. Finally, the overexpression of Flag-CXCR2 cell line was stimulated with IL-8 (interleukin-8). The activation of signal pathways downstream of CXCR2 and F-actin assembly were detected.

**Keywords** CXCR2; lentivirus; HEK-293 cell; neutrophil; chemotactic; F-actin

收稿日期: 2019-12-30 接受日期: 2020-03-16

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81870412)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-66931428, E-mail: yrh1980110@126.com; Tel: 010-61777000, E-mail: xiaomingyang@sina.com

Received: December 30, 2019 Accepted: March 16, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81870412)

\*Corresponding authors. Tel: +86-10-66931428, E-mail: yrh1980110@126.com; Tel: +86-10-61777000, E-mail: xiaomingyang@sina.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5304>

二十世纪八十年代, 分子生物学家LEFKOWITZ证实了G蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)的存在, 同时阐明GPCR的结构和功能<sup>[1-2]</sup>, 并于2012年获得诺贝尔化学奖。GPCR是七次跨膜蛋白<sup>[3]</sup>, 也叫七螺旋受体, 能够识别光、激素、胺、神经递质和脂质等多种物质, 并将信号传递到细胞内, 激活下游信号通路<sup>[4]</sup>。GPCR广泛存在于生物的细胞膜上, 种类繁多, 仅人类基因组就编码约1 000种。

中性粒细胞是人体固有的免疫细胞, 能够快速响应机体免疫反应, 特别是在宿主防御细菌感染中必不可少。在趋化因子的作用下, 下游相关的复杂信号网络发生激活, 进而引发中性粒细胞内可逆性肌动蛋白聚合和极化形态的产生, 随后中性粒细胞经历可逆性黏附和迁移等一系列反应, 并快速到达病变部位。研究发现, 中性粒细胞是在人体中已知运动最快的细胞, 无论是在组织损伤还是自身免疫性疾病中, 中性粒细胞都发挥着重要的作用<sup>[5]</sup>。

CXC趋化因子受体2(the CXC chemokine receptor 2, CXCR2)属于GPCR家族<sup>[6]</sup>, 能够结合Gai类G蛋白。CXCR2广泛分布在中性粒细胞表面, 能够介导中性粒细胞的趋化<sup>[7-8]</sup>, 在免疫系统中发挥着重要的作用。有研究发现, 糖酵解抑制剂2-脱氧葡萄糖(2-deoxyglucose, 2-DG)显著提高了盲肠结扎穿刺(cecal ligation and puncture, CLP)诱导的败血症小鼠的存活率, 是由于2-DG处理的小鼠比未处理的小鼠募集了更多的中性粒细胞迁移至感染部位, 具有更高的细菌清除效率, 而中性粒细胞募集增加的现象与CXCR2的持续性激活有关<sup>[9]</sup>。此外, 中性粒细胞的募集还影响肝细胞活力<sup>[10]</sup>。也有研究表明, CXCR2还通过多种机制影响肿瘤的发展, 并可能根据情况促进或抑制肿瘤发生, 如CXCR2缺乏可显著抑制皮肤和肠内炎症驱动的肿瘤发生以及自发性腺癌的形成<sup>[11]</sup>。还有研究发现, 多种疾病都能使CXCR2的表达异常。根据CXCR2的表达差异, 可为疾病的前期、后期提供诊断标志物, 以及为疗效提供一个监测指标。如: CXCR2在白内障晶状体上皮细胞中的表达升高, 可为白内障的治疗提供临床意义<sup>[12]</sup>; CXCR2在结肠腺癌组织中高表达, 可为结肠癌术后疗效监测提供参考<sup>[13]</sup>; 在肌萎缩侧索硬化患者外周血中, CXCR2水平显著升高, 可作为患者后期治疗根据的生物标志物<sup>[14]</sup>。CXCR2的表达还与药物治

疗引起的肾毒性、肾纤维化<sup>[15]</sup>以及与慢性乙型肝炎相关<sup>[16]</sup>。不仅如此, CXCR2激动剂和非常晚期抗原4(very late antigen 4, VLA4)抑制剂组合与目前批准的造血干/祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC)动员方法相比更能够为小鼠提供更快更有效的动员, 在临床应用方面有很大的潜力<sup>[17]</sup>。由此可见, CXCR2受体及下游通路的分子机制研究和靶向药物设计能够为治疗上述疾病提供崭新的思路。

白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)是典型的CXC趋化因子, 与CXCR2有较高的亲和力, 在中性粒细胞的趋化和极化中起重要作用。IL-8与CXCR2受体结合后, 激活细胞内两条相对独立又互相参杂的信号通路<sup>[3]</sup>。一方面导致G蛋白解离, Gβγ激活PI3K、ERK、P38等信号通路; 另一方面, CXCR2受体发生磷酸化和泛素化修饰进而招募β-Arrestin2。β-Arrestin2不仅能激活MAPK、PI3K等信号通路, 同时促进Cofilin对actin蛋白的切割, 进而导致F-actin的组装。有趣的是, 虽然这两条途径均能导致MAPK等信号通路的活化, 但是其激活的时间却不相同<sup>[18-19]</sup>。目前, 我们对中性粒细胞CXCR2下游信号通路的活化及调控并不明确, 仍需开展大量的研究。

中性粒细胞寿命很短, 且无法在体外长期培养, 不利于基因编辑等操作手段的应用, 大大限制了我们对中性粒细胞趋化机制的研究。HEK-293细胞培养简单、转染效率较高, 是研究中常用的细胞系。在HEK-293细胞中稳定表达CXCR2, 模拟中性粒细胞趋化, 可以方便CXCR2活化的相关机制研究。本研究利用慢病毒系统构建了过表达Flag-CXCR2受体的HEK-293细胞稳定株, 为相关的基础研究提供了体外实验支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒和细胞

慢病毒包装质粒psPAX2、包膜质粒pMD2.G、表达质粒pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV以及Flag-CXCR2-Tango模板质粒均购自Addgene公司。HEK-293T和HEK-293细胞为本实验室保存。DH5a感受态细胞购自北京博迈德基因技术有限公司。

### 1.2 试剂与仪器

DMEM高糖培养基购自Gibco公司; Foundation胎牛血清购自GEMINI公司; 转染试剂jetPRIME(PT-114-01)购自Polyplus Transfection

公司; KOD-Plus-Neo(KOD-401)购自 TOYOBO 公司; T4 DNA Ligase(M0202L)、Nhe1(R3131V)和 BamH1(R3136T)限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; 氨苄青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; rabbit monoclonal anti-GAPDH(1:400 000, AC002)、HRP Goat Anti-Rabbit IgG(1:5 000, AS014)、HRP Goat Anti-mouse IgG(1:5 000, AS003)购自 Abclonal 公司; mouse monoclonal anti-Flag(1:8 000, E7398)购自 Sigma 公司; Akt(1:10 000, 4691)、p-Akt(1:5 000, 4046)、P38(1:10 000, 8690)、p-P38(1:5 000, 4511)、JNK(1:2 000, 9252)、p-JNK(1:1 000, 4668)均购自 Cell Signaling Technology 公司; 488 标记山羊抗小鼠 IgG(1:200, ZF0512)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 显色用 AB 液购自 Thermo 公司; 无内毒素质粒大提试剂盒(DP117)购自 QIAGEN 公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)以及质粒小提试剂盒(DP118)均购自天根生化科技(北京)有限公司; 甲醇购自国药集团化学试剂有限公司。

流式细胞仪(LSR Fortessa)购自美国 BD 公司; 激光共聚焦显微镜(UltraVIEW VoX)购自美国 Perkin Elmer 公司; PCR 扩增仪(My cyclor 型)、蛋白质电泳设备(Mini-PROTEIN<sup>®</sup>3 型)、蛋白质湿式电转仪(Mini Trans-Blot<sup>®</sup>型)、核酸电泳槽(Sub-Cells GT cells 型)、凝胶成像系统(Gel DocTMXR 型)均购自美国 Bio-RAD 公司; 细胞培养箱(311 REL 型)购自德国 Heraeus 公司。

### 1.3 重组质粒的构建

Flag-CXCR2 上游引物为 5'-CTA GCT AGC GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG-3', 下游引物为 5'-CGG GAT CCC AGG GTC GTG GAG GTG TGG CCG GAG C-3', 采用 KOD-Plus-Neo 高保真 PCR 酶两步法进行扩增。对扩增后的目的条带进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收。将载体质粒和胶回收片段进行双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 再切胶回收, 测定浓度, 16 °C 连接过夜。连接产物转化, 抗性 LB 板筛选, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 并接种摇菌使用质粒小提试剂盒提取质粒。

### 1.4 重组质粒的表达鉴定

吸取 20  $\mu$ L 重组质粒交于北京擎科生物科技有限公司测序, 随后采用 Snappgene 分析对比测序结果, 将测序对比正确的质粒保存备用。

将 HEK-293 细胞接种在 24 孔板中, 待细胞密度

为 80%~90% 时进行转染, 转染后 4~6 h 换液, 36 h 后弃去培养基, 加入 2 $\times$  上样缓冲液充分裂解细胞, 沸水浴 10 min, 放置于 -20 °C 冰箱保存。蛋白质免疫印迹 (Western blot, WB) 检测 Flag-CXCR2 的蛋白表达, 丙稀酰胺凝胶单孔上样 10  $\mu$ L, 先 80 V 后 120 V 进行恒压电泳, 80 mA 恒流电转, 用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育 12 h, 二抗室温孵育 1 h, 显影, 检测目的蛋白的表达。

### 1.5 慢病毒的包装与浓缩

将 HEK-293 细胞接种到 10 cm 的细胞培养皿中, 观察细胞的密度, 待细胞密度长到 80%~90% 时进行转染。具体如下: 首先将质粒 9  $\mu$ g psPAX2、3  $\mu$ g pMD2.G 以及 12  $\mu$ g pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV-Flag-CXCR2 加入到 500  $\mu$ L 的 jetPRIME 缓冲液中, 涡旋混匀, 随后加入 96  $\mu$ L 转染试剂, 涡旋后静置 10 min 后, 然后逐滴加入到细胞培养皿中, 轻轻晃匀, 放细胞培养箱中培养。转染 6 h 后换液, 按照每一个皿加 50 mL 培养基的量, 在 48 h 和 72 h 收集含有病毒颗粒的上清。将病毒 3 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 去除细胞碎片; 用 100 KDa 超滤管 6 500 r/min, 4 °C 离心 40 min, 对病毒进行浓缩; 收集浓缩液, 用 0.45  $\mu$ m 的滤膜过滤; 将滤液用 PBS 稀释到大体积, 并且加入 5 $\times$  PEG 过夜提纯, 4 000 r/min, 4 °C 离心 30 min, 收集沉淀, 按照一个皿加入 150  $\mu$ L 预冷 PBS 溶解病毒的量, 彻底溶解后分装为小体积于 -80 °C 保存。

### 1.6 细胞系的建立以及筛选

将 HEK-293 细胞接种在 24 孔板中, 密度控制在 50% 左右, 加入浓缩后的病毒颗粒。感染细胞 36 h 后加入遗传霉素, 同时以相同的筛选浓度感染 HEK-293 细胞, 遗传霉素筛选时间一般为 72 h 左右, 此时几乎没有存活的 HEK-293 细胞, 将阳性细胞进行扩大培养。

### 1.7 细胞系 WB 鉴定

将对照细胞系与过表达细胞系用胰酶消化离心后用完全培养基重悬, 接种在 24 孔板中, 待其长满后收样, 参照 1.4 进行 WB 蛋白表达鉴定。

### 1.8 免疫荧光检测受体的表达情况

将清洗消毒后的细胞爬片放到 24 孔板中, 将细胞重悬液加入到 24 孔板中, 接种植密度通常为 80%, 待细胞贴壁后, 吸弃上清, 加入 PBS 洗两次, 加入 4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗两次, 1% Triton-X 100 打孔 15 min, PBS 洗两次, 10% 胎牛血清室温封闭

1 h, 一抗37 °C孵育1 h, PBS洗两次, 二抗室温孵育1 h, 洗两次, Hoechst 33342染核15 min, 封片, 60×油镜观察Flag-CXCR2膜蛋白的表达。

### 1.9 下游信号通路的活化检测

将对照和过表达细胞接种在24孔板中, 待细胞长到90%密度时, 细胞饥饿12 h, 分别按照时间点0、1、3、5、15 min加入20 ng/mL的IL-8刺激, WB检测Flag-CXCR2下游信号通路的活化情况。

### 1.10 流式细胞仪检测F-actin

将细胞用高糖培养基重悬, 按照时间点0、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 min加入20 ng/mL的IL-8刺激后立即用等体积8%多聚甲醛固定15 min, 加入2 mL的PBS洗一次, 加入Triton-X 100打孔15 min, 洗一次, 加入F-actin荧光染料, 染色30 min, 洗一次, PBS重悬, BD LSR Fortessa流式细胞仪检测F-actin活化。

### 1.11 Transwell检测细胞趋化能力

将消化的细胞用高糖培养基重悬, 调节密度为 $2 \times 10^6$ 个/mL。随后迁移板的底板中分别加入150  $\mu$ L的高糖培养基和含有20 ng/mL IL-8的高糖培养基, 缓慢盖上中间层板, 每孔上室小心加入100  $\mu$ L细胞悬液。37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育3 h后, 对迁移到下层的细胞进行计数。

### 1.12 统计学分析

利用Graph Pad Prism 7软件进行数据分析, 采用非配对 $t$ 检验统计分析方法,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV-Flag-CXCR2重组质粒的构建

以Addgene购买的Flag-CXCR2-Tango质粒作为模板, 设计特异性引物扩增Flag-CXCR2片段, 琼脂

糖电泳得到的片段大小约为1 104 bp, 与目的基因片段大小一致(图1A)。接着将目的片段和载体进行双酶切和连接反应, 然后将连接产物在DH5 $\alpha$ 感受态细胞中转化。随后在氨苄青霉素抗性的LB板中随机挑取克隆, 加入到200  $\mu$ L LB培养基中, 37 °C 160 r/min活化2 h。最后以活化的菌液作为模板进行菌落PCR, 琼脂糖电泳鉴定得到大小约为1 104 bp的片段(图1B), 与目的基因片段大小一致, 这表明片段成功插入。

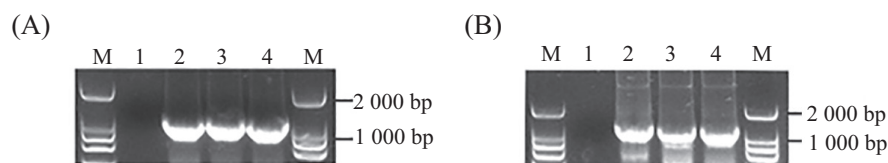
### 2.2 pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV-Flag-CXCR2重组质粒的鉴定

将提取的质粒交予北京擎科生物科技有限公司进行测序, 然后测序结果采用Snapgene比对分析, 结果显示, 重组的pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV-Flag-CXCR2质粒中Flag-CXCR2序列与Flag-CXCR2-Tango序列一致, 这表明, Flag-CXCR2序列被成功构建到慢病毒表达载体pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV上(图2A和图2B)。随后将测序成功的质粒转染至HEK-293T细胞中, 24 h后裂解细胞进行蛋白质免疫印迹检测。结果显示, Flag-CXCR2蛋白成功表达, 且蛋白大小约为44 kDa, 与预期结果一致(图2C)。

### 2.3 稳定过表达Flag-CXCR2的HEK-293细胞株的构建及鉴定

在HEK-293T细胞中分别包装对照和过表达Flag-CXCR2的病毒颗粒, 然后感染HEK-293细胞, 36 h后添加遗传霉素进行筛选。筛选一周后, 将对照和过表达细胞系胰酶消化后离心, 直接加入2 $\times$ 上样缓冲液裂解细胞后进行蛋白质免疫印迹。结果显示, 过表达细胞株蛋白样本在44 kDa左右出现特异性条带, 与Flag-CXCR2蛋白大小一致, 这表明HEK-293细胞株稳定表达Flag-CXCR2蛋白(图3A)。

CXCR2作为膜受体, 在静息状态下定位于细胞膜。本实验将对照和表达Flag-CXCR2的细胞株进



A: PCR扩增Flag-CXCR2基因。M: maker; 1: 空白对照; 2、3、4: 扩增Flag-CXCR2片段。B: 菌落PCR扩增Flag-CXCR2。M: maker; 1: 空白对照; 2、3、4: 扩增Flag-CXCR2片段。

A: PCR amplification of Flag-CXCR2. M: maker; 1: control; 2,3,4: amplification of Flag-CXCR2 fragment. B: colony PCR amplification of Flag-CXCR2. M: maker; 1: control; 2,3,4: amplification of Flag-CXCR2 fragment.

图1 重组质粒的构建

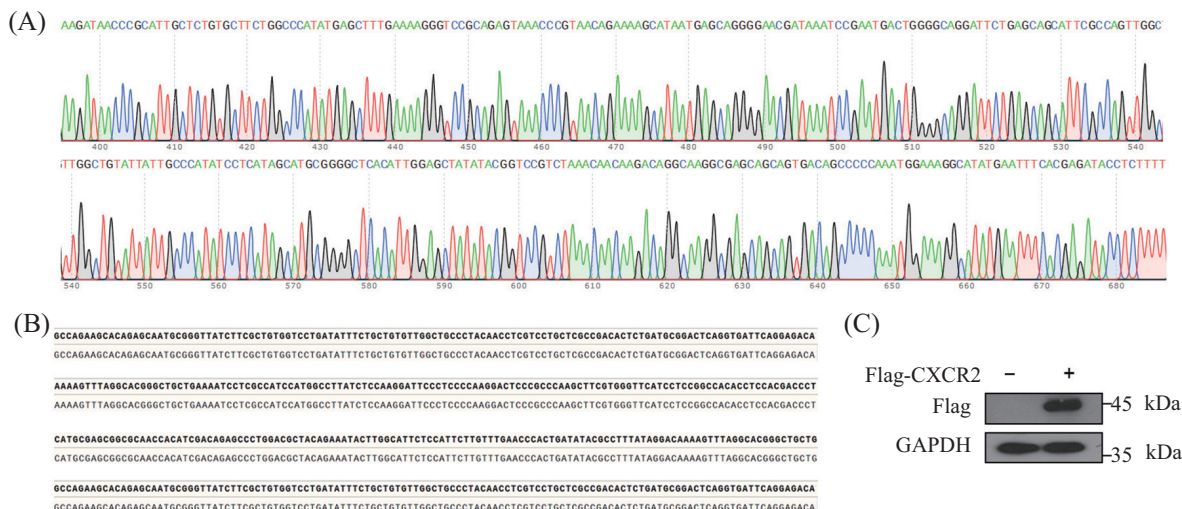
Fig.1 Construction of recombinant plasmid

行免疫荧光检测。结果显示, 稳定表达Flag-CXCR2受体的细胞株在细胞膜上能够明显看到绿光, 而对对照组则无绿光, 这表明Flag-CXCR2蛋白成功定位细胞膜(图3B)。

### 2.4 稳定过表达Flag-CXCR2的HEK-293细胞株的活性鉴定

CXCR2受体与配体结合后, 一方面能够导致

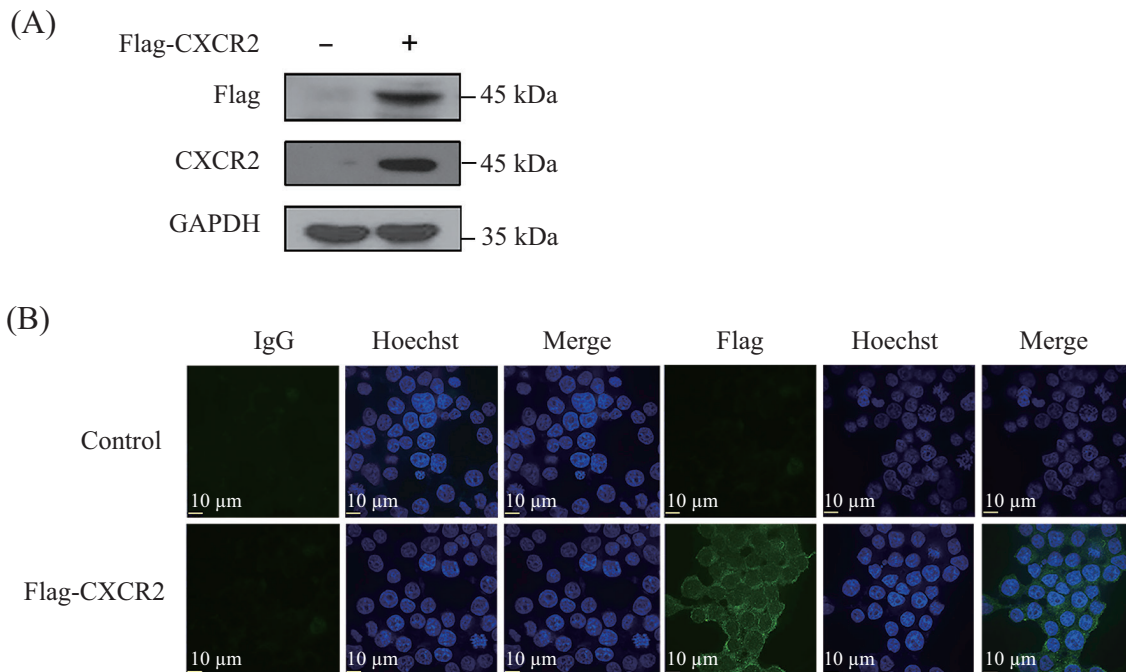
PI3K-AKT以及MAPK信号通路的活化, 另一方面能够促使F-actin发生极化, 为细胞运动做准备。本实验将对对照和稳定过表达Flag-CXCR2的细胞株进行IL-8刺激。蛋白质免疫印迹检测发现, 过表达Flag-CXCR2受体的细胞株中p-JNK、p-P38、p-AKT在IL-8刺激短时间内活化明显增强; 但在刺激后15 min时, 活化现象消失(图4A)。流式细胞仪检测发现, 在



A、B: 重组质粒与Flag-CXCR2-Tango序列对比; C: 蛋白质免疫印迹检测Flag-CXCR2蛋白的表达。  
A,B: sequence alignment of recombinant plasmid and Flag-CXCR2-Tango; C: Western blot analysis of Flag-CXCR2.

图2 重组质粒的鉴定

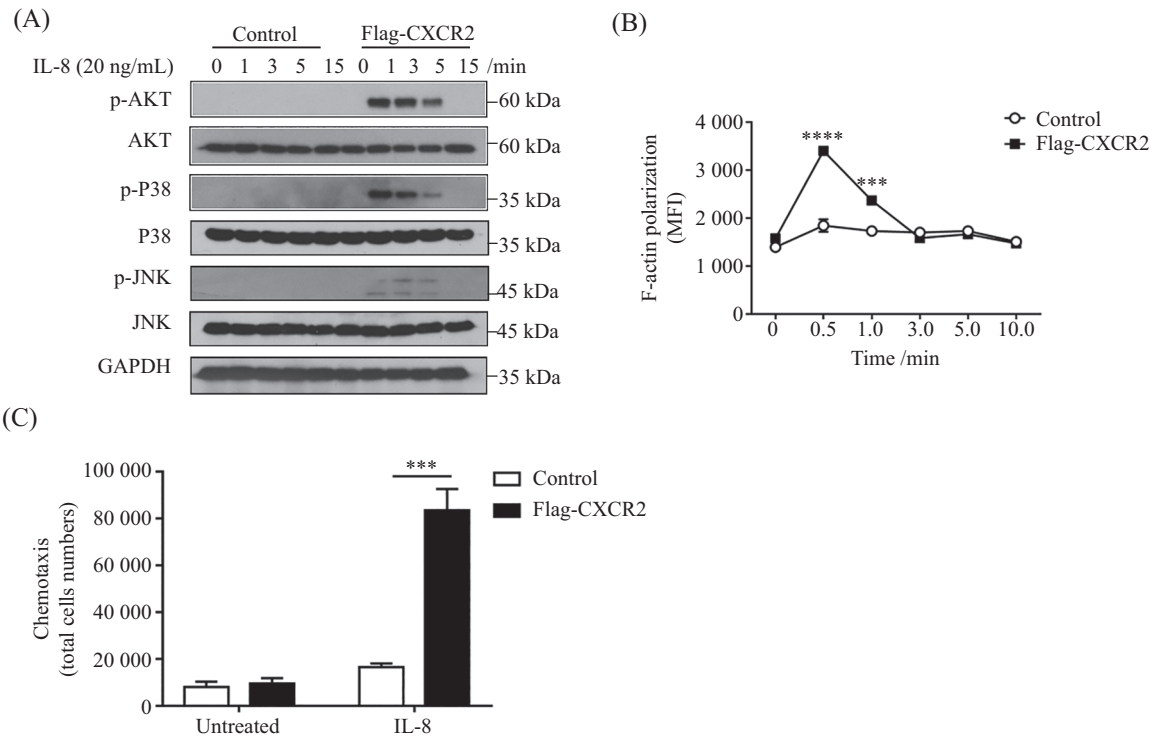
Fig.2 Identification of recombinant plasmid



A: 蛋白质免疫印迹检测HEK-293细胞株中Flag-CXCR2的表达; B: 免疫荧光检测HEK-293细胞株中Flag-CXCR2的定位。  
A: Western blot analysis of Flag-CXCR2 in HEK-293 cell lines; B: immunofluorescence analysis of the location of Flag-CXCR2 in HEK-293 cell lines.

图3 HEK-293细胞株中Flag-CXCR2的表达与定位

Fig.3 Expression and localization of Flag-CXCR2 in HEK-293 cell lines



A: 蛋白质免疫印迹检测IL-8(20 ng/mL)刺激HEK-293细胞株不同时间点信号通路的活化; B: 流式细胞仪检测IL-8(20 ng/mL)刺激HEK-293细胞株不同时间点F-actin的极化。图中MFI为平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI); C: Transwell检测IL-8(20 ng/mL)刺激HEK-293细胞株的趋化能力。n=3, 以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示, \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

A: Western blot analysis of activation of signal pathways in HEK-293 cell lines stimulated with 20 ng/mL IL-8 for indicated times; B: flow cytometric analysis of polarization of F-actin in HEK-293 cell lines stimulated with 20 ng/mL IL-8 for indicated times. MFI represents mean fluorescence intensity in the figure; C: transwell analysis of chemotaxis in HEK-293 cell lines stimulated with 20 ng/mL IL-8. n=3, data are presented as  $\bar{x}\pm s$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

图4 稳定过表达Flag-CXCR2的HEK-293细胞株的活性鉴定

Fig.4 Activity identification of HEK-293 cell lines with stable overexpression of Flag-CXCR2

IL-8刺激30 s时, 过表达Flag-CXCR2受体细胞株F-actin瞬间发生极化且明显高于对照组, 随着时间的增加, 其F-actin极化逐渐减少, 直到恢复到静息状态(图4B)。CXCR2是重要的趋化受体, 能够响应IL-8的刺激, 促使细胞发生趋化。本实验将对照和表达Flag-CXCR2的细胞株进行Transwell实验。结果显示, 稳定表达Flag-CXCR2受体的细胞株趋化能力增强, 发生趋化的细胞明显多于对照组, 这表明Flag-CXCR2蛋白成功介导细胞趋化(图4C)。以上结果表明, 稳定过表达Flag-CXCR2的HEK-293细胞株能够良好响应配体刺激。

### 3 讨论

本研究首先构建pCDH-MCS-T2A-Neo-MSCV-Flag-CXCR2慢病毒表达载体, 随后包装慢病毒, 慢病毒感染后采用遗传霉素筛选稳定株, 然后利用蛋白质免疫印迹和免疫荧光检测发现, Flag-CXCR2稳

定表达在HEK-293细胞膜上。进一步研究发现, IL-8刺激下, CXCR2信号通路活化以及F-actin发生极化。与经典的瞬时转染相比, 慢病毒感染体系能够更加高效地过表达CXCR2蛋白, 并且由于慢病毒能够将序列插入基因组, 稳定过表达CXCR2的HEK-293细胞大大减少了实验操作的时间。同时, 本研究在CXCR2序列前面加入了Flag标签, 为后续分子机制实验提供了方便。

众所周知, 中性粒细胞是天然免疫系统的重要组成部分, 在感染、自身免疫学疾病、肿瘤等疾病发生发展中发挥着重要的作用<sup>[20]</sup>。正常的中性粒细胞主要存在于骨髓和血液中<sup>[21-22]</sup>, 当机体被病原体入侵后, 中性粒细胞被招募到病灶并杀伤入侵的细菌, 然而过量的中性粒细胞侵入脏器会导致组织损伤甚至脏器衰竭。因此, 精准调控中性粒细胞的趋化性对治疗败血症、肺纤维化、癌症等疾病至关重要。

中性粒细胞表面存在大量的趋化性受体, 其中

CXCR2是重要的趋化性受体之一。CXCR2是七次跨膜的Gi/o蛋白耦联受体, 当与配体结合后, CXCR2受体发生构象变化, G蛋白发生解离, G $\beta$ 和G $\gamma$ 激活PLC $\beta$ 和PI3K $\gamma$ 等信号通路上调胞内钙离子和F-actin极化, 进而促进中性粒细胞的趋化。此外, CXCR2受体被GRK2磷酸化, 进而发生泛素化修饰, 随后与 $\beta$ -Arrestin2结合并内陷于细胞质中。由此可见, CXCR2的翻译后修饰是精准调控中性粒细胞趋化性的关键。然而, 中性粒细胞是高度分化的细胞, 寿命极短且难以转染等, 非常不利于分子机制的研究以及高通量药物的筛选。有趣的是, HEK-293细胞虽不表达CXCR2受体, 但受体活化相关蛋白均有表达, 为异种细胞研究提供了可能。

本研究利用慢病毒感染体系成功构建稳定表达CXCR2的HEK-293细胞株, 并且成功模拟了中性粒细胞内CXCR2受体活化过程。CXCR2受体调控不仅为治疗败血症提供了潜在目标, 同时在癌症的治疗和预防也存在巨大的潜力。总之, 我们的工作为大规模研究CXCR2分子机制和高通量筛选小分子药物打下了坚实的基础。

### 参考文献 (References)

- [1] 肖晗, 张幼怡. G蛋白偶联受体的探索之路-记2012年诺贝尔化学奖得主Robert J. Lefkowitz和Brian K. Kobilka [J]. 中国科学: 生命科学(XIAO H, ZHANG Y Y. The discovery road of g-protein-coupled receptors: introduction of the nobel prize winners in Chemistry 2012, Robert J. Lefkowitz and Brian K. Kobilka [J]. *Scientia Sinica Vitae*), 2012, 42(12): 1018-30.
- [2] SNYDERMAN R. Introduction of Robert J. Lefkowitz [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10): 4192-200.
- [3] FUTOSI K, FODOR S, MÓCSAI A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 638-50.
- [4] GERHARDT T, LEY K. Monocyte trafficking across the vessel wall [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 107(3): 321-30.
- [5] GREGOR C, PHILIP G A, MICHAEL G. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly [J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002, 13(3): 220-8.
- [6] OLSON T S, LEY K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking [J]. *Am J Physiol Integrative Comp Physiol*, 2002, 283(1): R7-28.
- [7] LERMAN Y V, KIM M. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2015, 15(1): 19-28.
- [8] NIGGLI V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(12): 1619-38.
- [9] CHUYI T, JIA G, HUAN C, et al. Inhibition of aerobic glycolysis promotes neutrophil to influx to the infectious site via cxcr2 in sepsis [J]. *Shock*, 2019, 53(1): 114-23.
- [10] TAKANORI K, REBECCA M S, HOLLY S G, et al. Cell-specific regulatory effects of CXCR2 on cholestatic liver injury [J]. *Am J Physiol*, 2019, 317(6): G773-83.
- [11] JAMIESON T, CLARKE M, STEELE C W, et al. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(9): 3127-44.
- [12] 程丽娜, 宋蔚, 闫春妮. IL-8及CXCR1、CXCR2在白内障晶状体上皮细胞中的表达及其意义[J]. 现代医学(CHENG L N, SONG W, YAN C N. Expressions and significances of IL-8, CXCR1 and CXCR2 in cataract lens epithelial cells [J]. *Modern Medical Journal*), 2019, 47(10): 1197-201.
- [13] 刘鸿章, 刘力, 周超熙, 等. CXCR2蛋白在结肠腺癌组织中的表达及意义[J]. 广东医学(LIU H Z, LIU L, ZHOU C X, et al. Expression and significance of CXCR2 protein in colorectal adenocarcinoma [J]. *Guangdong Medical Journal*), 2019, 40(23): 3255-9.
- [14] 苏丹丹, 张勇, 毕方方, 等. 肌萎缩侧索硬化患者外周血中IL-8、CXCR1、CXCR2的表达及意义[J]. 中国临床研究(SU D D, ZHANG Y, BI F F, et al. Expressions and significances of IL-8, CXCR1 and CXCR2 in peripheral blood of patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Chinese Journal of Clinical Research*), 2019, 32(10): 1327-30.
- [15] WANG D D, CHEN X, FU M, et al. Tacrolimus increases the expression level of the chemokine receptor CXCR2 to promote renal fibrosis progression [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(6): 2181-8.
- [16] 刘欣燕, 王宏飞. CXCL8及其受体CXCR1、CXCR2在慢性乙肝中的表达及意义[J]. 基因组学与应用生物学(LIU X Y, WANG H F. Expression and significance of CXCL8 and its receptor CXCR1 and CXCR2 in chronic hepatitis [J]. *Genomics and Applied Biology*), 2018, 37(9): 4055-61.
- [17] DARJA K, MICHEAL P R, JULIE R, et al. Targeting VLA4 integrin and CXCR2 mobilizes serially repopulating hematopoietic stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7): 2745-59.
- [18] LOUIS M L, DIANE G. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(2): 305-30.
- [19] FREEDMAN N J, SHENOY S K. Regulation of inflammation by  $\beta$ -arrestins: not just receptor tales [J]. *Cell Signal*, 2018, 41(41): 41-5.
- [20] de Bont C M, EERDEN N, BOELENS W C, et al. Neutrophil proteases degrade autoepitopes of NET-associated proteins [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, 199(1): 1-8.
- [21] VOLKMANN J, SCHMITZ J, NORDLOHNE J, et al. Kidney injury enhances renal G-CSF expression and modulates granulopoiesis and human neutrophil CD177 *in vivo* [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, 199(1): 97-108.
- [22] JULIEN R, VINCENZO T, ANIA Z, et al. Corrigendum: RNA-seq profiling of leukocyte populations in zebrafish larvae reveals a cxcl11 chemokine gene as a marker of macrophage polarization during mycobacterial infection [J]. *Front Immunol*, 2019, 10(10): 832.