

文章编号:1000-5404(2012)11-1031-04

论著

C3G/Rap1 和 Dock180/Rac1 信号通路在卵巢癌浸润中的作用

高一萌¹, 张瑜¹, 李文燕¹, 车亚玲¹, 王瑾¹, 刘斌², 王辉¹, 令狐华¹ (400016 重庆, 重庆医科大学: 附属第一医院妇产科¹, 基础医学院病理科²)

[摘要] **目的** 探讨鸟嘌呤核苷酸交换因子 C3G/Rap1 酶和鸟嘌呤核苷酸交换因子 Dock180/Rac1 酶信号通路在卵巢癌浸润中的可能作用。**方法** Western blot 检测 Dock180 沉默的卵巢癌细胞 SKOV3 中 C3G 的表达, 验证上皮性卵巢癌组织中 Dock180 与 C3G 的表达相关性; 免疫组化比较卵巢癌组织中 Dock180 与 C3G 的表达趋势; 免疫荧光观察 SKOV3 中 Dock180 与 C3G 及它们各自的下游蛋白 Rac1/Rap1 的定位。**结果** Dock180 基因沉默的细胞中 C3G 表达明显增强 ($P < 0.05$); Dock180 与 C3G 在卵巢癌组织中的表达呈现相反趋势 ($P < 0.05$); C3G/Dock180 均主要分布于细胞质, 下游效应蛋白 Rap1/Rac1 在细胞膜和细胞质都有表达, 但 Rap1 以细胞质为主, 而 Rac1 可以伸展至细胞膜及细胞膜皱褶。**结论** 卵巢癌细胞和组织中 C3G 与 Dock180 表达呈相反趋势, 下游蛋白 Rap1 与 Rac1 在细胞内的定位分布差异, 可能与 C3G/Rap1 和 Dock180/Rac1 信号通路在卵巢肿瘤浸润中的不同作用有关。

[关键词] 鸟嘌呤核苷酸释放因子 2; rap1 GTP 结合蛋白质类; 卵巢肿瘤; 肿瘤细胞, 培养的; 肿瘤浸润

[中图分类号] R394.3; R730.23; R737.31

[文献标志码] A

Role of C3G/Rap1 and Dock180/Rac1 signal pathway in infiltration of ovarian cancer

Gao Yimeng¹, Zhang Yu¹, Li Wenyan¹, Che Yaling¹, Wang Jin¹, Liu Bin², Wang Hui¹, Linghu Hua¹ (¹Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, ²Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study the potential role of C3G/Rap1 and Dock180/Rac1 signal pathway in infiltration of ovarian cancer. **Methods** Expressions of C3G in Dock180-silenced ovarian cancer SKOV3 cells were detected by Western blotting. Expressions of C3G and Dock180 in ovarian cancer tissue were compared by immunohistochemical analysis. The locations of D180/C3G and their downstream Rac1/Rap1 proteins were demonstrated in ovarian cancer cell SKOV3 by means of immunofluorescence staining. **Results** The expression level of C3G was significantly higher in Dock180-silenced SKOV3 cells than in wild type, blank plasmid transfected, and negative plasmid transfected cells ($P < 0.05$). The expression of C3G in ovarian cancer tissue was inversely related with that of Dock180 ($P < 0.05$). Both C3G and Dock180 were mainly distributed in the cytoplasm. The downstream Rap1 and Rac1 proteins were expressed both in the cytomembrane and in the cytoplasm. However, Rap1 was mainly expressed in the cytoplasm while Rac1 was mainly expressed in the cytomembrane and its folds. **Conclusion** The expression of C3G in ovarian cancer cells and tissue is inversely related with that of Dock180. The Rap1 and Rac1 are differently distributed in ovarian cancer cells, which may be related with the different roles of C3G/Rap1 and Dock180/Rac1 signal pathway in the infiltration of ovarian cancer.

[Key words] guanine nucleotide-releasing factor 2; rap1 gtp-binding proteins; ovarian neoplasms; tumor cells, cultured; neoplasm invasiveness

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772330, 81072120) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5387). Corresponding author: Linghu Hua, Tel: 86-23-89011090, E-mail: linghu_hua@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30772330, 81072120); 重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5387)

[通信作者] 令狐华, 电话: (023) 89011090, E-mail: linghu_hua@163.com

浸润和转移是影响上皮性卵巢癌预后的最主要因素之一,而肿瘤细胞内的各种信号通路在肿瘤的浸润和转移过程中扮演着重要的角色。在人类的许多恶性肿瘤中,信号接合物 Crk 在其 mRNA 及蛋白水平出现了高表达^[1]。与 Crk 结合的下游效应分子主要有 Dock180 和 C3G,二者分别是小分子 GTP 连接酶 Rac1 和 Rap1 的鸟嘌呤核苷交换因子(guanine exchange factor, GEF)^[2-3]。鸟嘌呤核苷酸交换因子参与跨膜受体和细胞内 GTPase 家族成员联系起来的信号通路,从而调控许多细胞作用,如细胞增殖、分化、黏附、凋亡等。研究^[4]证实,Rap1 和 Rac1 在细胞的迁移、黏附等方面发挥重要作用。Rap1 与整合素介导的黏附、扩散和迁移密切相关^[5],而 Rac1 是板状伪足形成所必需的^[6]。前期的研究^[7-8]明确显示 Crk 在卵巢癌浸润、转移等致肿瘤作用中的意义,并发现 Crk/Dock180/Rac1 参与了卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞的增殖、转移和侵袭。本研究对前期工作^[7-8]构建之 Dock180 表达缺失性 SKOV3 细胞中 Crk 的另一个下游结合分子 C3G 进行检测发现其表达有增强,之后对卵巢癌组织中该两个指标的表达水平及细胞定位进行了检测,拟阐明 Dock180/Rac1 和 C3G/Rap1 信号途径在卵巢癌浸润中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞来源 卵巢浆液性囊腺癌细胞株 SKOV3 购于重庆医科大学病理学教研室,且在前期工作中,本课题组已建立了 SKOV3-Dock180-RNAi 稳定转染细胞株,空载体(Empty)和阴性质粒(NT)转染细胞株^[8]。

1.1.2 组织标本来源 选取重庆医科大学附属第一医院妇产科 2009 年 9 月至 2010 年 8 月手术切除的卵巢标本,其中浆液性卵巢癌组织标本 12 例,患者平均年龄 52 岁;卵巢良性肿瘤组织标本 10 例,患者平均年龄 49 岁;另选同期因子宫肌瘤而需行卵巢切除的正常卵巢组织标本 10 例,患者平均年龄 53 岁。标本切除离体立即置于液氮中保存,用于 Western blot 检测;用于免疫组织化学检测的石蜡包埋块来自重庆医科大学病理科。所有标本的病理诊断均由病理科医师阅片证实。所有患者的临床病历资料均完整收集。

卵巢癌患者均未合并其他系统恶性肿瘤,术前未进行放疗。标本收集均在获得患者知情同意并签订知情同意后后进行。

1.1.3 主要试剂 鼠抗 Dock180 单克隆抗体、兔抗 C3G 单克隆抗体、鼠抗 Rac1 单克隆抗体、兔抗 Rap1 单克隆抗体、兔抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;S-P 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司;RPMI1640 培养基及胎牛血清购自 HyClone 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验

1.2.1.1 细胞培养 实验所用细胞分为 SKOV3 野生型组(WT 组)、空载体转染组(Empty 组)、阴性质粒转染组(NT 组)、

Dock180 沉默组(Dock180i1 组、Dock180i2 组),均于 37 °C、含 5% CO₂ 的混合气体培养箱中,用含 100 ml/L 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基常规培养,0.02% EDTA + 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.1.2 Western blot 检测 裂解各组细胞提取总蛋白,用 Bioford 法测定蛋白浓度。每个上样孔取 60 μ g 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 90 min 后加一抗 4 °C 过夜,弃去一抗后加入二抗,室温孵育 1 h, ECL 显色。用凝胶成像仪照相后保存图片,用 Quantity One 图像分析软件计算各组蛋白条带的灰度值。每种蛋白条带的灰度值与内参灰度值的比值代表该种蛋白的相对表达量。

1.2.1.3 免疫荧光染色 将 SKOV3 细胞培养于 0.8 cm \times 0.8 cm 的盖玻片上,于 37 °C、含 5% CO₂ 的混合气体培养箱中生长 24 h 后,4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 37 °C 封闭 30 min, 一抗 4 °C 过夜,二抗 TRITC 标记(红色荧光)的羊抗兔以及 FITC 标记(绿色荧光)的羊抗鼠抗体,先后分别室温孵育 1 h, 封片,激光共聚焦显微镜下观察荧光染色结果,并照相记录。

1.2.2 组织标本检测 采用 Western blot 检测卵巢癌组织相关信号蛋白的表达,并选取卵巢上皮性良性肿瘤及正常卵巢组织进行比较。

1.2.3 免疫组织化学染色方法 采用免疫组化 S-P 法,4 μ m 石蜡连续切片,常规脱蜡、水化,一抗 4 °C 过夜,二抗 37 °C 孵育 30 min, DAB 显色,苏木精复染,中性树脂封片,光镜下观察,成像。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知卵巢癌阳性切片作阳性对照。结果判定:C3G、Dock180 蛋白定位于细胞质和细胞膜,以出现明显的棕黄色颗粒细胞判定为阳性。采用 Biosens Digital Imaging Systems V 1.6 软件分析阳性产物光密度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较行单因素方差分析。

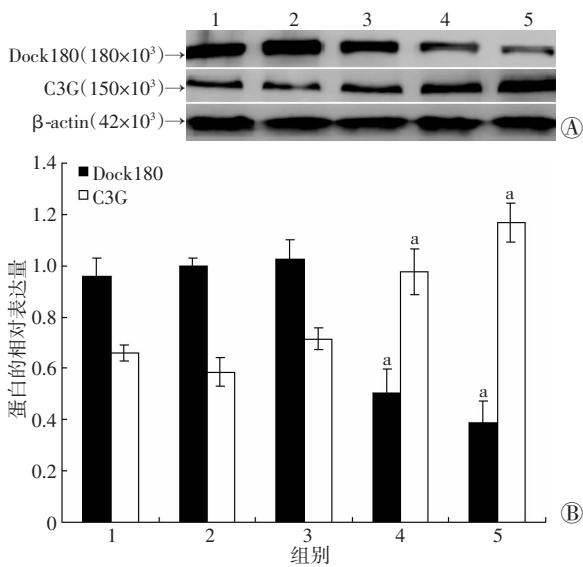
2 结果

2.1 Dock180 沉默的卵巢癌细胞 SKOV3 中 C3G 的表达

如图 1 所示:与 WT 组、Empty 组、NT 组相比,Dock180i1 组、Dock180i2 组细胞中 Dock180 表达水平下降,而 C3G 的表达明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而在 WT 组、Empty 组、NT 组之间均未发现明显差异($P > 0.05$)。

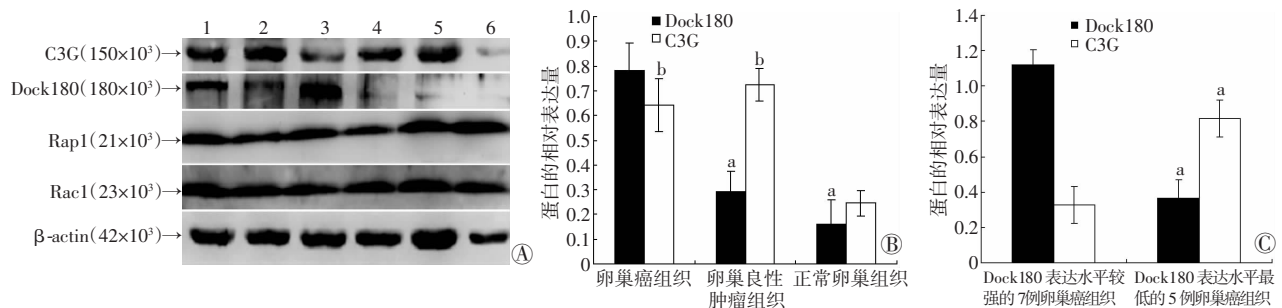
2.2 卵巢癌组织中两条信号途径中相关信号蛋白 C3G/Rap1 以及 Dock180/Rac1 蛋白的表达

与卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织相比,卵巢癌组织中 Dock180 的表达呈现上调($P < 0.05$),见图 2A、B。C3G 的表达水平则不完全一致。我们观察到二者在卵巢癌中的表达呈相反趋势,在 Dock180 表达水平较强的卵巢癌组织内,其 C3G 的表达偏低(本实验检测的 12 例卵巢癌组织中有 7 例);而在 Dock180 表达水平最低的卵巢癌组织中,其 C3G 表达较强(本实验检测的 12 例卵巢癌组织中有 5 例),见图 2C。而在卵巢癌、卵巢良性肿瘤、正常卵巢组织中,C3G 和 Dock180 的下游信号分子 Rap1 和 Rac1 的表达水平未发现明显差异[Rap1: (0.890 ± 0.048) vs (0.879 ± 0.050) vs (0.853 ± 0.022) , Rac1: (0.814 ± 0.019) vs (0.808 ± 0.020) vs (0.806 ± 0.012) , $P > 0.05$]。



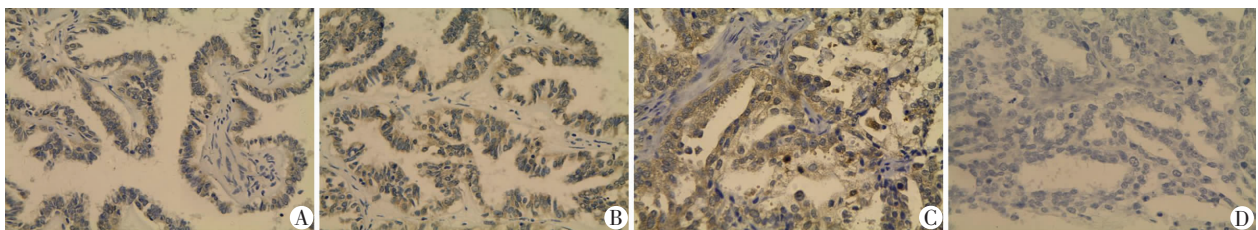
1: WT组;2: Empty组;3: NT组;4: Dock180i 1组;5: Dock180i 2组
A: Western blot; B: 半定量分析 a: $P < 0.05$, 与 WT、Empty、NT组比较

图1 Western blot 检测 Dock180 表达缺失的卵巢癌细胞 SKOV3 中 C3G 的表达



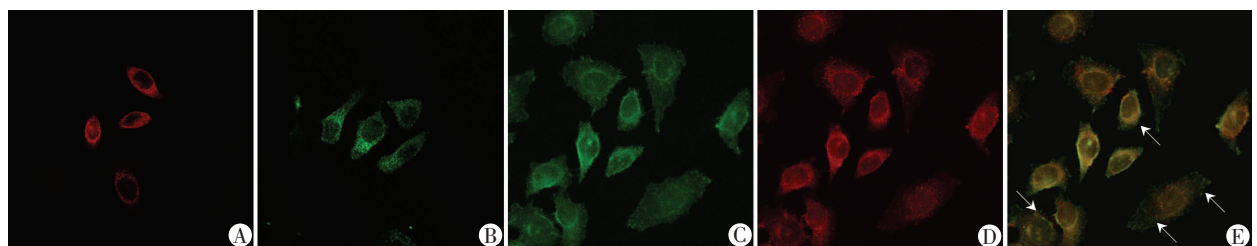
A: Western blot 1~4: 卵巢癌组织;5: 卵巢良性肿瘤组织;6: 正常卵巢组织; B: 3 种组织中 Dock180、C3G 蛋白表达 a: $P < 0.05$, 与卵巢癌组织比较; b: $P < 0.05$, 与正常卵巢组织比较; C: 12 例卵巢癌组织中 Dock180、C3G 蛋白表达趋势相反 a: $P < 0.05$, 与 Dock180 表达水平较强的 7 例卵巢癌卵巢癌组织比较

图2 Western blot 检测卵巢癌、卵巢良性肿瘤和正常卵巢组织中 Dock180、C3G 的表达



A: 标本 1 C3G 表达; B: 标本 1 Dock180 表达; C: 标本 2 C3G 表达; D: 标本 2 Dock180 表达

图3 C3G 和 Dock180 在卵巢癌组织中的表达 (S-P × 400)



A: C3G; B: Dock180; C: Rac1; D: Rap1; E: C、D 图合成图 ↑: 细胞膜褶皱
图4 激光共聚焦显微镜下观察 C3G/Dock180 及 Rap1/Rac1 在 SKOV3 细胞的亚细胞定位 (× 800)

2.3 免疫组化观察 C3G 和 Dock180 蛋白在卵巢癌组织中的表达

C3G 和 Dock180 蛋白阳性染色都集中于细胞质和细胞膜, 呈棕黄色颗粒状, 如图 3。在 C3G 表达较少的标本 1 中, Dock180 的表达较强 (C3G: 0.432 ± 0.040 , Dock180: 0.572 ± 0.030); 而在 C3G 表达较强的标本 2 中, Dock180 的表达则相对较弱 (C3G: 0.667 ± 0.020 , Dock180: 0.440 ± 0.032), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 卵巢癌细胞 SKOV3 中 C3G/Dock180 及 Rap1/Rac1 的定位

通过免疫荧光技术对 C3G/Dock180 及 Rap1/Rac1 进行荧光标记, 然后在激光共聚焦显微镜下进行观察 (图 4), 发现 C3G/Dock180 均主要定位于细胞质, Rap1 (红色) 和 Rac1 (绿色) 在细胞质和细胞膜都有表达, 但 Rap1 的表达在细胞质更为明显, 而 Rac1 可以延伸至细胞膜的特化结构如细胞膜褶皱, 如图 4E 箭头所示。

3 讨论

类 Ras 家族成员, 如 Rap1 等作为分子开关参与调节多种信号通路, 包括细胞的增殖、分化、形态发生和调

亡等过程。有研究发现 Rap1 过度表达可以抑制 Ras 的转化作用,而且在 C3G 逆转化成功的细胞中分离得到的 Crk 突变细胞株还提示正常 Crk-C3G-Rap1 信号通路可能有着抗转化的机理^[9]。另有人发现在大鼠膀胱癌细胞 NBT-II 中 C3G/Rap1 信号通路的激活引起了 paxillin/Crk/Dock180 复合物以及 Rac1 酶活性的降低^[10]。我们的前期研究^[8]发现在 SKOV3 细胞中 Crk/Dock180/Rac1 信号通路可以促进细胞的生长和迁移,从而促进侵袭和转移。而 C3G/Rap1 在卵巢癌中的作用国内外未见有报道。

为明确 C3G/Rap1 和 Dock180/Rac1 两条信号通路在卵巢癌细胞中的关系,我们使用了本课题组前期构建的 SKOV3-Dock180-RNAi 稳定转染细胞株,检测在 Dock180 基因沉默的条件下,C3G 表达水平的变化。结果发现,在 Dock180 基因沉默的细胞株中,C3G 的表达水平明显升高;而在没有进行沉默的野生型细胞株和转入空质粒和阴性质粒的 SKOV3 细胞株中,C3G 的表达水平则呈低水平表达。为证实在卵巢癌中二者这种表达关系存在普遍性,我们通过蛋白质印迹法检测了卵巢癌组织中 C3G/Rap1 和 Dock180/Rac1 两条信号途径中 C3G 和 Dock180 的表达,结果发现与良性卵巢肿瘤和正常卵巢组织相比,卵巢癌中的 Dock180 表达水平上调。而 Dock180 表达最强的卵巢癌组织中,其 C3G 表达水平最低,而 C3G 表达多的组织,Dock180 的表达较少,即在卵巢癌组织中二者的表达趋势也相反,提示二者在卵巢癌的生长、浸润和迁移等过程中可能起着相反的作用。本研究主要在细胞水平探讨 C3G/Rap1 和 Dock180/Rac1 两条信号途径在卵巢癌恶性浸润行为中的可能作用。至于二者在不同卵巢癌组织中的表达相关性是否预示着肿瘤不同的恶性程度及预后,还需扩大样本量并结合患者临床病理资料及预后随访结果进一步加以验证。

实验过程中我们还发现,C3G 和 Dock180 的下游效应蛋白 Rap1 和 Rac1 的表达水平似乎并没有明显的改变,提示卵巢癌细胞中作为 Rap1 和 Rac1 被激活产生效应可能主要靠上游的鸟嘌呤核苷酸交换因子 C3G 和 Dock180 的作用。我们采用免疫荧光分别标记 C3G/Dock180 以及 Rap1/Rac1,通过激光共聚焦显微镜观察到,C3G 和 Dock180 都主要位于在卵巢癌细胞 SKOV3 细胞质,Rap1 和 Rac1 在细胞膜和细胞质中都有表达,但存在区别:Rap1 的表达定位主要限于细胞质,相比之下 Rac1 的表达在细胞膜,尤其是细胞膜的特化结构如细胞膜褶皱表达更为明显,而且主要在细胞伸展的前缘聚集,这与前人的发现是一致的^[11-12]。我们可以推测,Rap1 和 Rac1 在细胞的迁移、黏附等方面发挥的作用不同,可能正是由其亚细胞定位不同所导致。

有研究发现,Rap1 的激活参与了上皮的形成^[10],

而这与上皮-间质的恶性转化过程正好相反^[13],由此我们推测 C3G/Rap1 信号途径可能具有内在的肿瘤抑制作用,而卵巢癌中 Dock180 基因表达的增强以及其介导之 Rac1 酶活性的激活可能抑制了 C3G 的表达,从而抑制了其介导之 Rap1 酶活性,这可能就是卵巢癌癌变的重要机理之一。

综上所述,在卵巢癌组织与细胞中,Dock180 与 C3G 的表达呈相反趋势,二者可能通过相互抑制作用来影响卵巢癌的发生、发展;而 Rap1 和 Rac1 分别作为 C3G 和 Dock180 的下游效应因子,二者在亚细胞结构中分布的差异,可能是导致卵巢癌中 C3G/Rap1 和 Dock180/Rac1 两个信号通路最终功能差异的重要原因。对二者相互作用机理的深入探讨,可能为卵巢癌的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Rodrigues S P, Fathers K E, Chan G, *et al.* Crk I and Crk II function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3(4): 183-194.
- [2] Tanaka S, Morishita T, Hashimoto Y, *et al.* C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(8): 3443-3447.
- [3] Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, *et al.* DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(4): 1770-1776.
- [4] Wittchen E S, van-Buul J D, Burrige K, *et al.* Trading spaces: Rap, Rac, and Rho as architects of transendothelial migration[J]. *Curr Opin Hematol*, 2005, 12(1): 14-21.
- [5] Reedquist K A, Ross E, Koop E A, *et al.* The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion[J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(6): 1151-1158.
- [6] Raftopoulos M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way[J]. *Dev Biol*, 2004, 265(1): 23-32.
- [7] Linghu H, Tsuda M, Makino Y, *et al.* Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS[J]. *Oncogene*, 2006, 25(25): 3547-3556.
- [8] Wang H, Linghu H, Wang J, *et al.* The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3[J]. *Tumor Biology*, 2010, 31(1): 59-67.
- [9] Hattori S, Matsuda M. Activation of Rap1, antagonist to ras, by Crk-C3G[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1997, 24(11): 1414-1421.
- [10] Valles A M, Beuvin M, Boyer B. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44490-44496.
- [11] Lee H, Gaughan J P, Tsygankov A Y. c-Cbl facilitates cytoskeletal effects in v-Abl transformed fibroblast through Rac1- and Rap1-mediated signaling[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(9): 1930-1943.
- [12] Joffre C, Barrow R, Menard L, *et al.* A direct role for Met endocytosis in tumorigenesis[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(7): 827-837.
- [13] Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7443-7454.

(收稿:2011-11-02;修回:2011-12-10)

(编辑 吴培红)