

论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1402-04

Rac1 蛋白在卵巢癌组织中的表达及其对卵巢癌细胞株 SKOV3 增殖及迁移的作用

彭慧娟¹, 张瑜¹, 高一萌¹, 罗淑娟¹, 刘斌², 令狐华¹ (400016 重庆, 重庆医科大学: 附属第一医院妇产科¹, 基础医学院病理学教研室²)

[摘要] **目的** 研究 Rac1 蛋白在人卵巢浆液性腺癌组织中的表达及其对卵巢癌细胞株 SKOV3 恶性增殖和迁移的影响。**方法** Western blot 检测人卵巢浆液性腺癌组织、卵巢良性浆液性囊腺瘤组织及卵巢正常组织中 Rac1 蛋白的表达水平; 构建 Rac1 表达缺失的细胞株 SKOV3-Rac1i; 分别用细胞划痕实验、MTT 及平板克隆实验检测 SKOV3-Rac1i 细胞迁移能力、细胞增殖及克隆形成能力。**结果** 卵巢浆液性腺癌组织中 Rac1 蛋白表达水平显著高于卵巢良性浆液性囊腺瘤组织[(0.89 ± 0.17) vs (0.69 ± 0.24) , $P < 0.05$] 和卵巢正常组织[(0.89 ± 0.17) vs (0.72 ± 0.12) , $P < 0.05$]; 与亲代细胞相比, SKOV3-Rac1i 细胞表现出迁移能力减弱($P < 0.05$)和增殖能力明显受限($P < 0.05$)。**结论** Rac1 在人卵巢浆液性腺癌组织中呈高表达, 其可能是通过影响细胞迁移能力及细胞的增殖而促进卵巢癌细胞的恶性生物行为。

[关键词] 人卵巢浆液性腺癌; SKOV3; RNAi; Rac1

[中图分类号] R394.2; R730.23; R737.31

[文献标志码] A

Rac1 expression in ovarian cancer tissues and its role in malignant proliferation and migration of ovarian cancer cell SKOV3

Peng Huijuan¹, Zhang Yu¹, Gao Yimeng¹, Luo Shujuan¹, Liu Bin², 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 observe the expression of Rac1 in human ovarian serous adenocarcinoma tissues and its role in the malignant proliferation and migration of ovarian cancer cell SKOV3. **Methods** Western blotting was applied to detect the expression of Rac1 protein in ovarian serous adenocarcinoma tissues, benign ovarian serous cystadenoma tissues and normal ovarian tissues. Stable Rac1-silencing SKOV3 cells were constructed and named as SKOV3-Rac1i. Wound healing assay was conducted to evaluate the ability of the cell migration, and MTT assay and plate clone assay were performed to detect the proliferation rate of SKOV3-Rac1i cells. **Results** The expression level of Rac1 protein was significantly higher in human ovarian serous adenocarcinoma tissues than in benign ovarian serous cystadenoma tissues (0.89 ± 0.17 vs 0.69 ± 0.24 , $P < 0.05$) and normal ovarian tissues (0.89 ± 0.17 vs 0.72 ± 0.12 , $P < 0.05$). Moreover, suppressed migration and proliferation were observed in SKOV3-Rac1i cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Rac1 is highly expressed in human ovarian serous adenocarcinoma tissues, and suppressed migration and proliferation of SKOV3-Rac1i cells support its contribution to malignant biological behavior of ovarian cancer cells.

[Key words] human ovarian serous adenocarcinoma; SKOV3; RNAi; Rac1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772330) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Commission of Educational (KJ100303). Corresponding author: Liu Bin, Tel: 86-23-89011090, E-mail: my0216@126.com

卵巢癌是我国女性生殖系统中常见肿瘤, 死亡率
高居妇科恶性肿瘤第 1 位^[1]。由于缺乏有效的早期诊

断工具, 大多数患者确诊时已经出现扩散转移^[2], 因此了解卵巢癌细胞扩散转移的机制至关重要。肿瘤细胞的扩散转移是一个复杂的过程, 其中包括肿瘤细胞从原发灶的迁移及定居位点的增殖, 而 Rac1 蛋白在调节细胞的迁移和增殖中起到关键作用^[3]。Rac1 蛋白在胰腺癌^[4]、乳腺癌^[5]、胃肠道肿瘤细胞系^[6]及肝癌^[7]中高表达, 其表达水平与肿瘤的转移呈正相关。

[基金项目] 国家自然科学基金(30772330); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ100303)

[通信作者] 刘斌, (023)89011090, E-mail: my0216@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130131.1705.006.html> (2013-01-31)

但是尚少见有关 Rac1 蛋白在卵巢癌中表达情况及其作用的研究。本课题旨在研究 Rac1 在卵巢浆液性腺癌组织中的表达情况,并通过体外实验研究其与卵巢癌细胞株 SKOV3 迁移和增殖的关系,为卵巢癌的治疗寻找新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 收集我院 2010 年 6 月至 2011 年 6 月收治的卵巢肿瘤标本 30 例,其中卵巢浆液性腺癌组织 20 例,卵巢良性浆液性囊腺瘤组织 10 例。并收集正常卵巢组织 7 例。所有卵巢浆液性腺癌患者均为初治手术,术前未接受放化疗,未合并其他系统恶性肿瘤。

1.1.2 细胞株 人卵巢浆液性囊腺瘤细胞株 SKOV3 来自于重庆医科大学基础医学院病理学教研室。

1.1.3 试剂 pSR-GFP/neo 质粒购自美国 Oligoengine 公司。阴性质粒 pSR-GFP/neo-NT 质粒由课题组前期构建^[8]。E. coli DH5 α 感受态细胞来自于重庆医科大学附属第一医院实验中心。Rac1 单克隆抗体为美国 Merk Millipore, actin 抗体为江苏碧云天、山羊抗鼠 IgG/HRP 二抗购于北京中杉金桥,其他所用试剂均购于北京鼎国公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Western blot 检测人卵巢组织中 Rac1 蛋白的表达 裂解组织或细胞提取蛋白,免疫印迹检测目标蛋白条带,Quantity One 软件分析结果。目的蛋白条带与 β 肌动蛋白条带光密度的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.2.2 构建稳定转染细胞株 设计的 siRNA 靶序列由 Invitrogen (上海) 生物有限公司合成,接入 pSR-GFP/neo 质粒获得目标质粒,转染细胞后经 G418 筛选获得稳定转染的细胞,筛选细胞经 Western blot 验证 Rac1 表达缺失细胞即为构建的目的细胞株 (SKOV3-Rac1i)。

1.2.3 细胞划痕实验 将细胞分为实验组 (SKOV3-Rac1i) 和野生组 WT (野生型 SKOV3),分别取对数生长期细胞 (5×10^5 /孔) 种植于 6 孔板内,用含丝裂霉素 C 的培养基培养细胞,并且用小无菌枪头在孔板底部划痕,换液后置于孵箱中培养,分别在 0、24、48、72 h 观察划痕变化,于在固定的范围取样拍照,用直尺测量同一部位的划痕宽度的变化。

1.2.4 MTT 检测细胞增殖 收集对数生长期的细胞 (野生型 WT、阴性对照组 NT 及实验组 SKOV3-Rac1i),制备细胞悬液 (细胞浓度为 1×10^4 /mL),按每孔 2×10^3 个细胞接种。常规条件下培养 7 d,每天每孔加入 5 mg/mL MTT (噻唑蓝) 溶液 20 μ L,培养 4 h 后更换为 DMSO (二甲亚砜) 200 μ L,室温下低速振荡 10 min。记录 570 nm 波长处每孔的光密度值,绘制生长曲线。

1.2.5 平板克隆形成实验 (clone formation assay) 制备细胞悬液后,每孔接种细胞 100 个左右 (重复 4 孔),常规条件下培养 10 ~ 14 d。4% 多聚甲醛室温固定 30 min,姬姆萨 (Giemsa) 染色室温 25 ~ 30 min。显微镜下观察,计数克隆 (细胞数 > 50 个的细胞团),平均细胞克隆形成率 = (平均细胞克隆数/接种细胞数) \times 100%。重复 3 次。

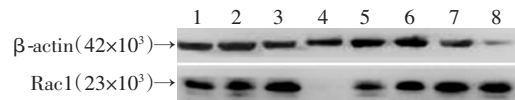
1.3 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Rac1 蛋白在卵巢组织中的表达

如图 1 所示,在人卵巢浆液性腺癌组织、卵巢良性浆液性囊腺瘤组织及卵巢正常组织中均检测到 Rac1 蛋白的表达,其相对表达水平分别为 (0.898 2 \pm 0.171 4)、(0.690 7 \pm 0.244 3)、(0.723 1 \pm 0.117 3)。其中卵巢浆液性腺癌组织中 Rac1 蛋白表达水平显著高于卵巢良性浆液性囊腺瘤组织及卵巢正常组织,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);而卵巢良性浆液性囊腺瘤组织及卵巢正常组织中 Rac1 的表达水平接近,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



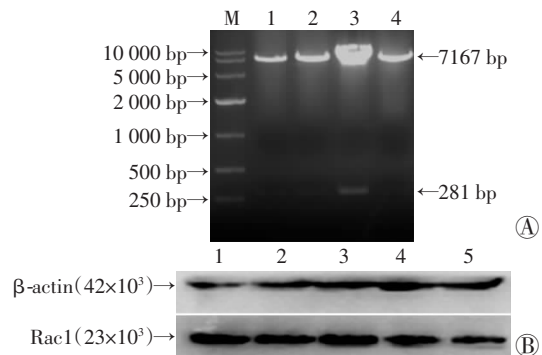
1-3、6-8:卵巢浆液性腺癌组织;4:卵巢正常组织;5:卵巢良性浆液性囊腺瘤组织

图1 Western blot 检测 Rac1 蛋白在卵巢组织中的表达

2.2 构建 Rac1 缺失性表达细胞株

为了沉默内源性 Rac1 的表达,我们采用了 siRNA 干扰技术。将设计合成的 3 条 Rac1 干扰片段分别与空质粒载体连接,即合成重组质粒。重组质粒经过双酶切鉴定 (图 2A)、测序 (上海 Invitrogen 生物公司),以检测质粒是否构建成功。

将构建成功的 3 条 Rac1 干扰质粒分别转染细胞,72 h 后提取总蛋白,Western blot 检测各载体对 Rac1 蛋白的抑制率。如图 2B 所示:与阴性质粒比较,1 号片段质粒的抑制率为 12.59%,2 号片段质粒为 56.48%,3 号片段质粒为 73.68%。故选取载体抑制效果较好的 3 号片段质粒命名为 SKOV3-Rac1i 在后续实验中使用。



A:重组质粒双酶切电泳结果 M:标准;1:阴性质粒;2:1号片段质粒;3:2号片段质粒;4:3号片段质粒 B:Western blot 检测 3 个干扰片段的干扰效果 1:野生型 SKOV3;2:阴性质粒 SKOV3;3:1号 Rac1 干扰质粒片段;4:2号 Rac1 干扰质粒片段;5:3号 Rac1 干扰质粒片段

图2 构建 Rac1 缺失性表达细胞株

2.3 SKOV3-Rac1i 细胞迁移能力的变化

与对照组相比,SKOV3-Rac1i 实验组细胞迁移速率明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3、4。

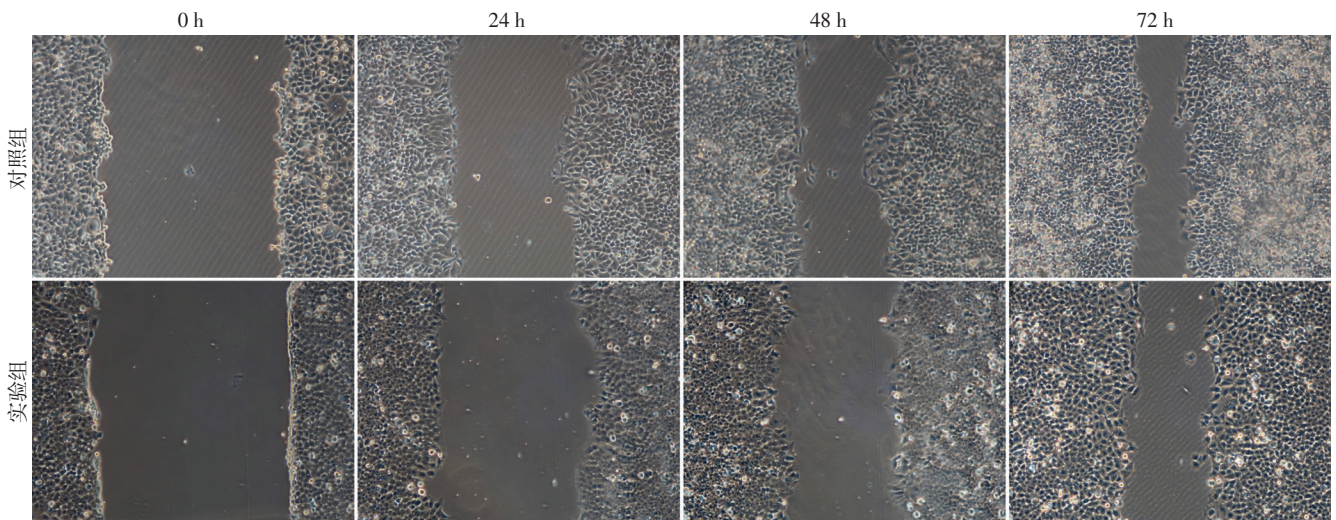


图3 倒置显微镜观察各时间点细胞划痕宽度的变化 ($\times 100$)

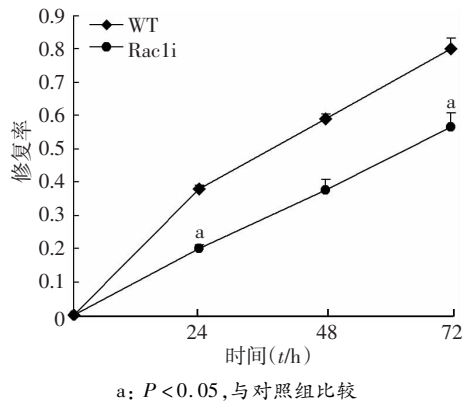


图4 划痕实验检测 SKOV3-Rac1i 细胞迁移能力变化

2.4 SKOV3-Rac1i 细胞增殖能力的变化

为了研究 Rac1 对 SKOV3 细胞增殖的影响,我们采用 MTT 和平板克隆形成实验来检测 SKOV3-Rac1i 细胞增殖的改变。如图 5 所示,野生型组、对照组细胞增殖能力无显著差异($P > 0.05$), SKOV3-Rac1i 组和野生型组、对照组比较,细胞增殖速度明显降低($P < 0.05$)。平板克隆实验结果提示:野生型组、对照组、SKOV3-Rac1i 组细胞克隆形成率分别为 0.52、0.47、0.07, SKOV3-Rac1i 组细胞克隆形成能力显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明, Rac1 表达降低后, SKOV3 细胞的增殖受到抑制。

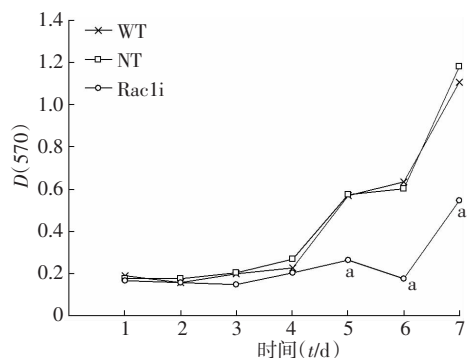


图5 SKOV3-Rac1i 细胞生长曲线

3 讨论

与其他恶性肿瘤一样,超过 90% 的卵巢癌患者最终死于转移,对其转移机制的探讨就十分必要。Rac 蛋白属于 Ras 超家族中的 Rho 亚家族,含有 3 个亚型, Rac1、Rac2、Rac3。其中 Rac1 蛋白广泛表达于机体各组织,并可以结合或水解 GTP 核苷酸,从而在 GTP 结合形式(活性形式)和 GDP 结合形式(无活性形式)之间进行相互转换^[9]。活性形式的 Rac1 蛋白参与调节细胞丝状伪足的生成以及膜皱缩,从而调节细胞的运动^[3,9-10]。

前期我们已经证实 Crk/Dock180/Rac1 信号通路在卵巢癌细胞 SKOV3 恶性潜能中的作用^[8,11-12],研究发现 Crk、Dock180 作为信号通路的上游分子调控 Rac1 蛋白的活性,从而发挥对卵巢细胞的促癌作用。在此我们检测了卵巢组织中 Rac1 蛋白的表达,结果发现 Rac1 蛋白在卵巢组织中均有较高的表达,其中上皮性卵巢癌组织中 Rac1 蛋白的表达是高于卵巢良性肿瘤组和卵巢正常组的,而卵巢良性肿瘤组和卵巢正常组之间的表达差异无统计学意义,提示 Rac1 分子本身在上皮性卵巢癌的发生和发展中可能起到不可忽视的作用。而已有文献报道,卵巢恶性肿瘤组织中 Rac1 蛋白的表达较高可能与整合素、细胞因子和钙粘蛋白等多条信号途径均可激活 Rac1 蛋白相关^[13],但具体机制还待进一步研究。

为了了解 Rac1 蛋白在卵巢癌发生发展中作用,我们引用了 siRNA 技术沉默内源性 Rac1 的表达,进而检测细胞迁移及增殖能力的改变。我们发现,与对照细胞相比,SKOV3-Rac1i 细胞的迁移和增殖能力明显下降,提示 Rac1 蛋白可能是通过调节细胞的迁移及增殖能力而参与卵巢癌的扩散转移。

虽然目前针对卵巢癌治疗有很大进步,包括手术治疗、化疗、放疗或多方案的联合应用,但是患者5年生存率仍然很低。靶向治疗是目前研究的热点,可以通过特异性的干扰某些基因的表达,达到治疗疾病,并且文献[14]报道已有RNAi药物进入I期临床研究。我们的研究结果提示Rac1蛋白在卵巢癌发生、发展中的重要作用,它作为Crk/Dock180/Rac1信号通路的下游调节卵巢癌细胞的增殖和迁移,通过抑制内源性Rac1基因的表达而抑制卵巢癌细胞的增殖及迁移,或许能成为一个治疗卵巢癌或抑制其浸润、转移的新途径。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] Chambers A F, Groom A C, MacDonald I C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(8): 563-572.
- [3] Ridley A J, Schwartz M A, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back[J]. Science, 2003, 302(5651): 1704-1709.
- [4] Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, et al. Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia[J]. Oncogene, 2001, 20(50): 7437-7446.
- [5] Schnelzer A, Prechtel D, Knaus U, et al. Rac1 in human breast cancer:

overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b[J]. Oncogene, 2000, 19(26): 3013-3020.

- [6] 潘阳林, 毕锋, 刘娜, 等. Rac亚家族在胃肠道肿瘤细胞系中的表达及活性[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(5): 441-444.
- [7] 鄢毅权, 李介秋. Rac1基因在肝细胞癌中的过表达与转移侵袭的关系[J]. 医学临床研究, 2007, 24(9): 1493-1495, 1498.
- [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]. Tumour Biol, 2010, 31(1): 59-67.
- [9] Heasman S J, Ridley A J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from *in vivo* studies[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(9): 690-701.
- [10] del-Pozo M A, Alderson N B, Kiosses W B, et al. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains[J]. Science, 2004, 303(5659): 839-842.
- [11] 车亚玲, 王瑾, 令狐华. 接合物蛋白Crk I在卵巢癌恶性潜能中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(7): 675-678.
- [12] 张瑜, 高一萌, 李文燕, 等. 鸟嘌呤核苷酸交换因子Dock180与Elnol在卵巢癌细胞中的共表达[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(13): 1277-1280.
- [13] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology[J]. Nature, 2002, 420(6916): 629-635.
- [14] Castanotto D, Rossi J J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics[J]. Nature, 2009, 457(7228): 426-433.

(收稿:2012-12-05;修回:2013-01-12)

(编辑 吴培红)

(上接 1401 页)

1.5 术后观察及护理

病情观察:严密观察生命体征变化,去枕平卧6~8h,持续心电监护,每1h测心率、呼吸、血压1次,吸氧2L/min。观察患者有无腹痛及腹痛性质、观察大便的颜色、性质及量。一旦发现大便带暗红色血,应立即报告医师,积极配合处理。本例患者未见黑便等并发症的发生。

术后护理:①心理护理:及时告知患者及家属手术的成功性,消除患者的恐惧、紧张心理。在术后并发症的预防及处理上取得患者及家属的配合。②疼痛护理:因结肠肠壁较薄,穿孔更为常见。如患者出现突然剧烈腹痛、有压痛和反跳痛、肌紧张者,考虑为术后穿孔的表现,应立即报告医生并紧急处理。本例患者未见上述明显症状,腹痛即考虑为手术过程中注入气体过多所致胀气腹痛,予曲马多0.1g肌注后缓解。③饮食护理:此患者因手术创面大,恢复慢,需禁食48h,术后第3天肛门排气后,仍无特殊病情变化,嘱其进食少量流质饮食,如稀饭、酸奶等,少量多餐。逐步过渡到半流质和普食。④出院指导:嘱患者养成良好的生活习惯,保持心情舒畅,注意劳逸结合、适量运动,选择易消化、高维生素、无刺激性食物,保持大便通畅,戒烟酒,3~6个月定期到医院复查肠镜。

2 讨论

LST的治疗方法主要有EMR、EPMR、ESD和外科手术。考虑巨大的LST与直肠癌关系密切,做EPMR治疗后,可能残留病变,引起复发,复发的病变再做EMR、EPMR或ESD较为困难,且易发生出血和穿孔等并发症。因此,为一次性完整电切

除病变,近年多数学者主张巨大的LST做ESD治疗^[4]。本例LST患者因病灶大小受限制,患者又不愿意选择创面大,风险高的外科手术治疗,经过科主任及主刀医师详细评估后决定采用ESD进行治疗。本科室内镜中心ESD治疗LST的操作技术相对成熟,用时7h将此巨大LST整个病灶完全切除,残留率低,治愈率高。在治疗此巨大LST的围手术期护理过程中,我们采取一对一的个案跟踪护理,有计划、有针对性地对患者实施各项护理措施,定期与经管医师进行病情商讨。术前有效的与患者沟通,使患者对此手术的方法及过程有更详尽的了解,术后密切观察病情变化,进行出院康复指导这是手术成功的重要保证。

参考文献:

- [1] Kiesslich R, Neurath M F. Endoscopic mucosal resection: an evolving therapeutic strategy for non-polypoid colorectal neoplasia[J]. Gut, 2004, 53(9): 1222-1224.
- [2] 王兔生. 腹腔镜下结肠旷置术治疗慢传输性便秘的围手术期护理[J]. 护士进修杂志, 2011, 26(14): 1334-1335.
- [3] 付兰英, 王雷, 杨小军, 等. 内镜黏膜剥离术治疗41例大肠侧向发育型肿瘤的疗效分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(21): 2200-2203.
- [4] Terasaki M, Tanaka S, Oka S, et al. Clinical outcomes of endoscopic submucosal dissection and endoscopic mucosal resection for laterally spreading tumors larger than 20 mm[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(4): 734-740.

(收稿:2013-01-21;修回:2013-02-28)

(编辑 张维)