

RhoC 过表达对人脐静脉内皮细胞体外迁移及血管生成能力的影响

赵良平¹,张庆华¹,王薇娜²,田 训¹,梁逢奇¹,黄 磊¹,熊国平¹,马 丁³

Overexpression of RhoC Affects Human Umbilical Vein Endothelial Cell Migration and Angiogenesis in Vitro

ZHAO Liang-ping¹, ZHANG Qing-hua¹, WANG Wei-na², TIAN Xun¹, LIANG Feng-qi¹, HUANG Lei¹, XIONG Guo-ping¹, MA Ding³

1. Department of Gynecology & Obstetrics, The Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China; 2. Department of Cardiology, Zhongnan Hospital, Wuhan University; 3. Department of Gynecology & Obstetrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology

Abstract :Objective To investigate the effects of RhoC overexpression on human umbilical vein endothelial (HUVE) cell migration and angiogenesis *in vitro*. **Methods** Transfecting RhoC gene into HUVE cells by Lipofectamine-2000. The expression of RhoC mRNA and protein were detected respectively by RT-PCR and Western blot, respectively. Wound assay *in vitro* and three-dimensional culture were used to detect the migration and angiogenesis capacity of HUVE. **Results** RhoC expression was increased by transfecting RhoC gene into HUVE, meanwhile, the cells migration and angiogenesis capacity were enhanced. **Conclusion** RhoC may increase the capacity of HUVE migration and angiogenesis *in vitro*.

Key words :RhoC; Human umbilical vein endothelial cells (HUVE); Migration; Angiogenesis

摘 要:目的 探讨 RhoC 基因过量表达对内皮细胞体外迁移及血管生成过程的影响。方法 构建 RhoC 真核表达载体,以脂质体转染人脐静脉内皮细胞(HUVE),采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 RhoC 的 mRNA 及蛋白表达水平;划痕实验检测细胞迁移能力;胶原基质胶三维培养检测内皮细胞体外血管生成能力。结果 转染 RhoC 实验组与空载体对照组比较,RhoC mRNA 和蛋白表达明显增高;细胞迁移能力和血管样结构生成能力明显增强。结论 RhoC 高表达能促进人脐静脉内皮细胞体外迁移及血管生成。

关键词:RhoC; 人脐静脉内皮细胞; 细胞迁移; 血管形成

中图分类号:Q786;R73-37 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)11-0766-04

0 引言

RhoC 是小 G 球蛋白超家族 Rho 家族的成员 (Rho GTPases) 作为细胞迁移启动调节的关键分子,参与细胞头部伪足的延伸、新的粘附建立及细胞尾部收缩等过程,对肿瘤的恶性转型、增生、侵袭转移等过程均发挥作用^[1-3],且对血管形成有较强的影响。本研究通过 RhoC 转染人脐静脉内皮细胞,检测细胞 RhoC 的表达、体外迁移能力及血管样组织生成,从而探讨 RhoC 在内皮细胞迁移及血管生成过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胎牛血清、DMEM、TRIZOL 试剂 (Gibco 公司),人脐静脉内皮细胞系 HUVE(武汉大学典型培养物保藏中心),RT-PCR 检测试剂盒 (TaKaRaBiotechnology 公司),PCR 产物回收试剂盒、型胶原蛋白 (Sigma 公司),载体质粒为 pEGF-C1 (Clontech 公司),BamH^I、EcoR^I、T4 连接酶、RhoC 抗体和 β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司),胶回收试剂盒(上海华瞬生物公司)。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞系 HUVE(武汉大学典型培养物保藏中心),用含 10% 胎牛血清 (Gibco 公司)的 DMEM 培养液 (Gibco 公司),37℃、5% CO₂ 培养。

1.3 pEGFP-C1-RhoC 质粒的构建

根据 Genbank 上登录的 RhoC 全长 cDNA 序列,利用 Primer premier 软件设计 RhoC 引物:

收稿日期:2008-03-19;修回日期:2008-05-13
基金项目:国家重点基础研究发展规划 973 项目 (2002CB513100)
作者单位:1. 430014 武汉市中心医院妇产科;2. 武汉大学中南医院心内科;3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科
通信作者:马丁,E-mail:dma@tjh.tjmu.edu.cn
作者简介:赵良平(1974-),男,硕士,主治医师,主要从事妇科肿瘤的研究

For: 5'-CGGAATTCTCCTCATCGTCTTCA G-CAA G3 内含 *Bam*H 酶切位点; Rev: 5'-CGG GATCCCA TAA GGGCTGTGCTTGCA G-3; 内含 *Eco*R 酶切位点; 以细胞总 RNA 为模板, PCR 扩增 RhoC 基因片断, 并将其插入到 pEGFP-C1 真核表达载体 CMV 启动子的下游, 构建 pEGFP-C1-RhoC 表达质粒, 该质粒携带有新霉素基因 (NEO 基因), 转化大肠杆菌 DH5, 常规扩增后挑选阳性单克隆进行酶切鉴定和测序。上述引物合成和核酸序列分析均由大连宝生物有限公司完成。

1.4 脂质体 (Lipofect-2000, LF) 介导的转染

按 LF 说明书在 6 孔板中进行转染。预先将 HUVE 接种于 6 孔板, 2×10^5 / 孔, 待细胞融合 50% ~ 80% 时分别转染重组体 pEGFP-C1-RhoC (实验组) 和空载体 pEGFP-C1 (对照组), 4 h 后加 10% 血清终止。12 h 后进行三维培养, 24 h 后进行划痕实验。72 h 荧光显微镜下观察转染效率约 30%, 收集细胞提取总 RNA 和蛋白质, 采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测实验组和对照组 RhoC 基因的表达水平。以 RhoC 与 GAPDH 比值表示 RhoC mRNA 的相对表达水平; 以 RhoC 与 β -actin 比值表示 RhoC 蛋白质的相对表达水平。实验重复 3 次。

1.5 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 RhoC-mRNA 水平

TRIZOL 试剂 (Gibco 公司) 一步法提取总 RNA、紫外分光光度计测纯度与浓度。取 2 μ g 总 RNA, 用 AMV 逆转录酶进行反转录, PCR 扩增 RhoC, 同时扩增 GAPDH 作为内参照, 引物由上海生物工程公司合成。RhoC 引物序列为: 5'-CGGAA TTCTCCTCA TCGTCTTCA GCAA G-3 下游引物: 5'-CGGGA TCCCA TAA GGGCTGTGCTTGCA G-3; 内参基因 GAPDH 引物序列为: 上游引物: 5'-ACGGA TTTGGTCGTA TTGGG-3; 下游引物: 5'-TGA TTTTGGAGGGA TCTCGC-3。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 60 s, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 28 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。RhoC 扩增片段为 590 bp, GAPDH 为 230 bp。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统摄像, 软件 Gel works ID advanced V4d 分析各条带强度, 基因表达值为各种细胞 mRNA 吸光值/内参吸光值。

1.6 Western blot 分析

收集细胞, 以三去污剂 50 μ l、100 μ g/ml PMSF 和 1 μ g/ml Aprotinin 各 1 μ l 裂解细胞, 4 12 000 r/min \times 15 min 离心, 取上清采用 Bradford 法进行蛋白质定量。取 50 μ g 蛋白上样, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移至硝酸纤维素

膜, 5% 脱脂奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 分别加 1:1 000 稀释的 RhoC 抗体和 β -actin 抗体 (Santa Cruz 公司) 4 过夜, 碱性磷酸酶标记的二抗进行蛋白杂交。图像经 Uvp grab-it Image 软件采集, Gel works ID advanced V4d 软件测定条带的吸光度值, 取其与 β -actin 的比值为相对吸光度值。

1.7 划痕实验

转染 24 h 后, 实验组和对照组细胞均贴壁融合, 以同一 20 μ l 的 Tip 头划痕, 倒置显微镜下观察测量, 培养 24 h 后再次观察测量。重复实验共 3 组。

1.8 三维培养体外血管生成试验

以 α 型胶原蛋白 (Sigma) 配制胶原基质^[4-5]。2 mg/ml α 型胶原 24 倍体积、10 \times EBSS 3 倍体积、0.1 mmol NaOH 3 倍体积、DMEM 30 倍体积、FBS 20 倍体积均在 4 $^{\circ}$ C 混合, 六孔板每孔加 2 ml 混合培养液及转染 12 小时后的细胞 1×10^4 个, 5 天后在倒置显微镜下观察比较实验组和对照组的细胞排列及结构。重复实验 3 次。

1.9 统计学方法

实验数据均以均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

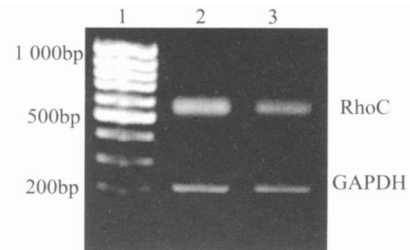
2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞 RhoC 的表达

在 mRNA 水平, 实验组和对照组 RhoC 的表达丰度 (RhoC / GAPDH) 分别为 (12.01 \pm 1.72) 和 (6.81 \pm 1.24), 两组差异具有统计学意义 (*P* < 0.05, *n* = 3), 见图 1。在蛋白质水平, 实验组和对照组 RhoC 的表达丰度 (RhoC / β -actin) 分别为 (4.81 \pm 0.56) 和 (3.02 \pm 0.32), 两者差异亦具有统计学意义 (*P* < 0.05, *n* = 3), 见图 2。

2.2 RhoC 对人脐静脉内皮细胞迁移能力的影响

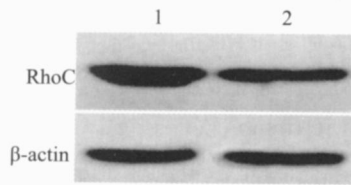
细胞对损伤的反应性增生在 24 h 内不会开始,



1: marker; 2: ECs transfected with RhoC; 3: sham treated ECs

图 1 人脐静脉内皮细胞 RhoC mRNA 的表达水平

Fig 1 The expression levels of RhoC mRNA of the HUVE cells



1:ECs transfected with RhoC; 2:sham treated ECs

图 2 人脐静脉内皮细胞 RhoC 蛋白质的表达水平

Fig 2 The expression levels of RhoC protein of the HUVE cells

因此,24 h 内汇合静止的单层细胞受伤只能靠细胞移动来愈合。划痕愈合实验反应细胞迁移能力^[5]。比较划痕后 0 h 的宽度与 24 h 的宽度差,0 h 的宽度,实验组与对照组相同,而 24 h 的宽度,实验组较对照组明显变窄,愈合百分比分别为(65 ±6.4) %和(54 ±5.5) % (P < 0.05, n = 3),表明转染 RhoC 后,细胞迁移能力明显增强,见图 3。

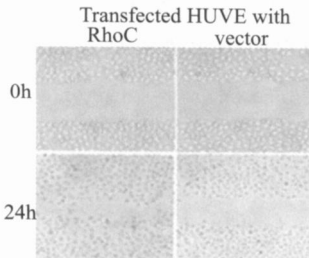
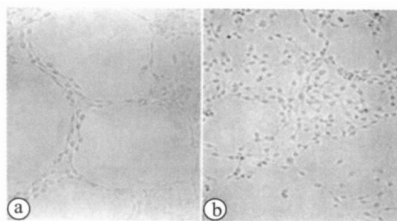


图 3 转染 RhoC 对人脐静脉内皮细胞迁移能力的影响

Fig 3 Effects of RhoC on HUVE cells migration in vitro

2.3 RhoC 对人脐静脉内皮细胞体外形成类血管结构能力的影响

转染 12 h 后的细胞于三维培养基中培养,5 天后在倒置显微镜下观察,实验组与对照组各随机取 6 个高倍镜视野对血管样结构计数,实验组为(5.01 ±1.48),对照组为(1.72 ±1.05),两者差异有统计学意义(P < 0.05, n = 6),见图 4。



A:ECs transfected with RhoC; B: sham treated ECs.

图 4 RhoC 对人脐静脉内皮细胞体外形成类血管结构能力的影响

Fig 4 Effects of RhoC on HUVE cells organization into precapillary cords

3 讨论

血管形成在许多生理、病理过程中(如炎症、创伤愈合、肿瘤生长和转移等)起重要作用。无论是原发肿瘤还是继发肿瘤在生长和扩散过程中都依赖血

管生成^[6]。进一步弄清血管形成的机理以应用血管生成抑制剂阻断肿瘤转移成为肿瘤研究领域的重要热点。血管形成过程包括基质降解、内皮移行、内皮增殖、分支形成及管腔化等过程^[7]。这一过程受许多因素影响,包括细胞外基质、生长因子、膜嵌合蛋白、整合素等。这些分子产生的信号导致细胞骨架的改变,从而引起细胞迁移、增生、出芽、管腔化,最终形成新血管^[8]。其中肌动蛋白和细胞微管骨架可调节内皮细胞的增生,维持和改变内皮细胞的形态,增加其运动活性,在血管形成过程中起重要作用^[9]。

RhoC 存在三磷酸鸟苷(GTP)结合的活性态和二磷酸尿苷(GDP)结合的非活性态两种形式,两者之间转换使他们能够发挥一种类似“分子开关(molecular switch)”的作用。RhoC 最重要的功能是调节肌动蛋白细胞骨架,肌动蛋白细胞骨架不仅在细胞形状改变、细胞运动和吞噬作用中起重要作用,还在细胞的各种生命活动如增殖、生长和凋亡中起关键作用。在真核细胞中,RhoC 控制肌动蛋白细胞骨架的重组。其中,RhoC 可以使肌动蛋白聚集张力纤维(stressfiber)以维持细胞的形态并赋予细胞韧性和强度;RhoC 可以使整合素以及相关蛋白质如纤维连接蛋白(FN)聚集成黏连复合物^[10];RhoC 与细胞骨架相关蛋白如黏着斑激酶(FAK)、桩蛋白(paxillin)、肌球蛋白轻链(MLC)和内收蛋白(ad2ducin)的磷酸化直接相关且参与调节细胞运动和迁移。RhoC 还能明显上调 MMPs 的表达水平,同时能增强 MMPs 的活性,使其降解细胞外基质能力增强,从而促进细胞迁移^[11]。许多研究表明,RhoC 促进肿瘤的侵袭转移。本研究发现,上调 RhoC 表达水平后内皮细胞体外迁移能力和形成血管样组织能力明显增强。这表明 RhoC 可能在内皮细胞的迁移、血管形成过程中起重要作用。促进血管生成可能是 RhoC 促进肿瘤转移的机制之一。

血管形成包括一系列复杂过程,进一步研究明确血管形成的机制将有助于找到有效的治疗靶点,以此通过抗血管生成从而达到抗肿瘤转移及其他血管增生疾病的目的。

参考文献:

[1] Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoC [J]. Circ Res, 2002, 91(2): 143-150.
 [2] Celina G, Kleer, Theodoros N, Teknos, Mozaffarul Islam, et al. RhoC GTPase Expression as a Potential Marker of Lymph Node Metastasis in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(15): 4485-4490.
 [3] P Ó, Z S á r á y G, M ú ller K, et al. Phenotypic Profiling of Engi-

- neered Mouse Melanomas with Manipulated Histamine Production Identifies Histamine H2 Receptor and Rho-C as Histamine-Regulated Melanoma Progression Markers [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(10):4458-4466.
- [4] Ibrahim S, Ramamurthi A. Hyaluronic acid cues for functional endothelialization of vascular constructs[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(1):22-32.
- [5] Van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, et al. Involvement of RhoA/ Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2):211-217.
- [6] Turcotte S, Desrosiers RR, Beliveau R. HIF-1alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(11):2247-2260.
- [7] Hoang MV, Whelan MC, Senger DR. Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(7):1874-1879.
- [8] Davis GE, Bayless KJ, Mavila A. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices [J]. *Anat Rec*, 2002, 268(3):252-275.
- [9] Bayless KJ, Davis GE. Microtubule depolymerization rapidly collapses capillary tube networks in vitro and angiogenic vessels in vivo through the small GTPase Rho [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(12):11686-11695.
- [10] Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68(1):459-486.
- [11] Ikoma T, Takahashi T, Nagano S, et al. A definitive role of RhoC in metastasis of orthotopic lung cancer in mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3):1192-1200.

[编辑:周永红;校对:贺文]

· 简讯 ·

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于 1973 年,是我国第一本独立的全国性肿瘤专业高级学术刊物。由国家卫生部主管,中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(JC)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、美国《剑桥科学文摘》(CSAI)及国内所有大型数据库收录。

本刊以报道国内外肿瘤防治研究领域最新之研究成果及新进展为主,读者对象为肿瘤防治研究工作者及相关专业的医药科技人员。

主要栏目有:专题论坛、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、研究简报、技术交流、论著摘要、综述、短篇个案、简讯等。

2008 年,随着独立网站的建成和开通,《肿瘤防治研究》杂志的网络化水平、传播手段和传播效率踏上了一个新的台阶,为广大关心本刊发展的作者朋友、读者朋友和审稿专家服务的手段及能力有了新的提高。

2009 年,希望广大朋友们能一如既往地给予本刊以热忱的关注:将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展;订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤防治研究事业取得的进步。同时,编辑部将进一步加强自身的建设,努力提升自己的办刊能力,紧紧围绕内容为王、快速反应的要旨,竭尽全力打造精品期刊,以回报朋友们的支持与厚爱。

邮发代号:38-70; 国外代号:MO6482; 定价:8.00元/册; 出版周期:月刊

印刷装帧:80 页码 哑光铜版彩色印刷

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42 - 1241/ R

电话/ 传真:0086-27-87670126

投稿网站: <http://www.zlfzyj.com.cn> E-mail: zlfzyj@263.net.cn

《肿瘤防治研究》编辑部