文章编号:1000-5404(2011)07-0675-04

论著

接合物蛋白 Crk Ⅰ在卵巢癌恶性潜能中的作用

车亚玲,王 瑾,令狐华 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科)

【摘要】 **目的** 证实接合物蛋白 Crk Ⅰ在卵巢癌恶性潜能中的作用。**方法** 采用 Western blot 法检测卵巢癌组织、卵巢良性肿瘤组织、正常卵巢组织中 Crk 和 Dock180 蛋白的表达;用免疫沉淀法检测 3 种卵巢癌细胞株中 Crk 与 Dock180 蛋白的内源性结合;用小干扰 RNA 敲低 SKOV3 细胞中内源性的 Crk,检测 Crk 表达缺失性细胞 Crk 蛋白表达水平、Rac1 酶活性和侵袭力的变化。**结果** Dock180 与 Crk Ⅰ的表达强度呈现明显的一致性,卵巢癌组织中二者的表达均显著高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织($P<0.05$);而在卵巢良性肿瘤组织与正常卵巢组织之间未发现明显差异($P>0.05$)。3 个卵巢癌细胞株中 Dock180 主要表现出与 Crk Ⅰ的内源性结合。和对照相比,敲低 Crk 基因的细胞表现出侵袭能力和 Rac1 酶活性明显下降($P<0.05$),而敲低 Crk Ⅰ的细胞和同时敲低 Crk Ⅰ和 Crk Ⅱ的细胞相比无明显差异($P>0.05$)。**结论** 卵巢癌的恶性生物学行为与 Crk/Dock180/Rac1 信号通路相关,其中 Crk Ⅰ在卵巢癌中扮演着主要角色。

【关键词】 信号接合物蛋白 Crk;Dock180;人卵巢癌
【中图法分类号】 R737.31;R394.3;R730.23 【文献标志码】 A

Adaptor protein Crk Ⅰ mediates malignant potential of human ovarian cancer

Che Yaling, Wang Jin, Linghu Hua (Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the role of adaptor protein Crk Ⅰ in malignant potential of human ovarian cancer. **Methods** Crk and Dock180 expression were detected by Western blotting in ovarian cancer tissues (EOC, $n=28$), benign ovarian tumors (BOT, $n=13$) and normal ovary tissues (Normal, $n=10$). Co-precipitation was performed to evaluate the *in vivo* protein-protein interaction of Dock180 and Crk in 3 different ovarian cancer cell lines (SKOV3, MCAS and RMUG-L cells). The expression of Crk in SKOV3 cells were silenced by using siRNA interference, and then Rac1 activity and cell invasion in the transfected cells were observed. **Results** The intensity of Crk Ⅰ and Dock180 expression was consistent with each other in EOC tissues. Both were observed to be significantly higher in EOC than those in the BOT and normal ovary tissues ($P<0.05$). No significant difference was found between BOT and Normal group either for Crk Ⅰ or Dock180 expression ($P>0.05$). In consistent with this result, Dock180 preferred to combine with Crk Ⅰ rather than with Crk Ⅱ in all 3 ovarian cancer cell lines. Furthermore, Crk knockdown cells presented with sustainable Crk Ⅰ expression depletion, significantly decreased Rac1 activity and cell invasion. **Conclusion** Crk might be involved in malignant potential of human EOC mainly through Crk Ⅰ/Dock180/Rac1 pathway.

【**Key words**】 adaptor protein Crk; Dock180; human ovarian cancer

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30672432, 30772330) and the Foundation of Medical Research of First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (YXJJ2009-06). Corresponding author: Linghu Hua, Tel: 86-23-89011090, E-mail: linghu_hua@163.com

卵巢癌死亡率居妇科恶性肿瘤之首[1]。近年来国内外学者对卵巢癌进行了大量的基础研究,发现其发生、发展是多因素、多基因共同作用的结果[2]。信号接合物蛋白 Crk(CT10 regulated kinase)最初作为一种癌基因产物发现于禽类肉瘤病毒 CT10 (chicken tumor 10)中,它主要由 SH2(src homology 2)和 SH3(src homology 3)结构域组成[3]。细胞内 Crk 基因的 mRNA 经可变剪切,表达形成由一个 SH2 和一个 SH3 结构域组成的 Crk Ⅰ和由 1 个 SH2 和 2 个 SH3 结构域组成的 Crk Ⅱ[4]。已经有研究发现,在多种恶性肿瘤中 Crk 上调,并促使肿瘤细胞增殖、转移和侵袭[5]。并有报道显示其变异剪切子 Crk Ⅰ参与了某些肿瘤细胞

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30672432,30772330);重庆医科大学附属第一医院医学科学基金(YXJJ2009-06)
【通信作者】 令狐华,电话:(023)89011090,E-mail:linghu_hua@163.com

的转移和侵袭[6]。前期工作证实其在卵巢癌细胞株MCAS的恶性潜能中的作用[7]。Dock180(downstream of crk with molecular weight of 180kDa of humans)是小分子GTP酶Rac1的鸟嘌呤核苷转换因子,是与Crk的SH3结构域相结合的下游分子[8]。在卵巢癌细胞株SKOV3中的研究发现Crk/Dock180/Rac1参与了SKOV3细胞的增殖、转移和侵袭[9]。为进一步明确到底是CrkⅠ/Dock180/Rac1还是CrkⅡ/Dock180/Rac1信号转导途径对人卵巢癌的恶性潜能起着决定性的作用,本实验采用免疫印迹和免疫共沉淀技术在人卵巢癌组织和多种卵巢癌细胞株(SKOV3、MCAS和RMUG-L)中检测2种相关信号蛋白的共表达,并利用小干扰RNA技术敲低CrkⅠ及CrkⅠ和CrkⅡ后检测细胞Rac1酶活性变化和侵袭力改变,以期明确在CrkⅠ/Dock180/Rac1信号转导途径中对人卵巢癌的恶性潜能发挥主导作用的信号蛋白是CrkⅠ还是CrkⅡ。

1 材料与方法

1.1 细胞与抗体

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,卵巢黏液性囊腺瘤细胞株MCAS和RMUG-L购买于日本健康科学研究资源库(HSRRB, Osaka, Japan)。Crk小鼠单克隆抗体购自美国BD公司(BD Biosciences公司,USA),鼠抗Dock180单克隆抗体、兔抗β-actin多克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司(Santa Cruz公司, CA, USA)。

1.2 标本来源

选取2009年8-12月于重庆医科大学第一附属医院妇产科手术切除的28例卵巢癌组织和13例卵巢良性肿瘤组织及10例正常卵巢组织标本,均为手术后立即取材然后置于液氮中保存,临床病历资料完整。恶性肿瘤组:术前患者均未接受放化疗,未合并其他系统恶性肿瘤,取卵巢癌组织28例,患者中位年龄52岁。良性肿瘤组:取卵巢良性肿瘤组织13例,患者中位年龄49岁。正常卵巢组:取相近年龄段因其他原因需行卵巢切除的正常卵巢组织10例,患者中位年龄53岁。所有组织标本经术后病理确诊。标本的收集均获得患者的知情同意,并签订知情同意书。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 所有细胞培养条件为:含有10%的胎牛血清、100 U/ml的青霉素、100 U/ml的链霉素的RPMI1640培养基,37 ℃、含5% CO_2的混合气体培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

1.3.2 Western blot 用细胞裂解液裂解组织或细胞,提取总蛋白,二羧基二喹啉(BCA)法测定蛋白浓度,每个上样孔上60 μg总蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转印至二氟化树脂(PVDF)膜,5%脱脂奶粉室温下封闭1.5 h,依次加入一抗4 ℃过夜、二抗室温下反应1.5 h,用增强化学发光(ECL)试剂盒显影曝光,用Quantity One图像分析软件计算各组蛋白条带的灰度值,以目的蛋白条带的灰度值和β-actin的灰度值之比表示目的蛋白的相对表达水平。

1.3.3 免疫共沉淀法 用细胞裂解液提取总蛋白,每一组取2 mg的总蛋白进行实验,实验组加入兔抗Dock180多克隆抗体,空白对照组不加任何东西,阴性对照组加入小鼠IgG,最后加入琼脂糖珠子(Sigma公司, USA)4 ℃摇床上反应1 h,离心后弃掉上清,加入20 μl 2×蛋白上样缓冲液,煮沸5 min后用蛋白质印迹法分析。

1.3.4 质粒及Crk缺失型稳定转染细胞株的构建 真核表达质粒pSUPER-Crki的Crk基因特异性的短发夹状RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列(5′-UGCCUACGACAAGACAGCC-3′)引自参考文献[10]。用脂质体Lipofectamine 2000将pSUPER-Crki质粒转染进SKOV3细胞中,用含嘌呤霉素的选择培养基筛选2周,挑出单个细胞克隆扩大培养,即获得Crk缺失型稳定转染细胞株。我们将这些细胞命名为Crki1和Crki2细胞,同时以阴性质粒转染细胞为空白对照。

1.3.5 GST-pull down实验测定Rac1酶的活性 用细胞裂解液提取总蛋白,取1 ml的总蛋白加入GST-PAK-1 RBD琼脂糖珠子(Upstate, Millipore Technology)15 μl,4 ℃摇床上反应1 h,离心后弃掉上清,加入30 μl 2×蛋白上样缓冲液,煮沸5 min后用Western blot分析。

1.3.6 Transwell体外侵袭实验 将各实验组细胞制备成单细胞悬液,以1×10^5/孔细胞接种于铺好基质胶(BD Biosciences, USA)的Transwell小室(Upstate, Millipore Technology)的上室内,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液稀释总体积到400 μl,下室用600 μl含10%胎牛血清的RPMI1640培养液作为趋化因子,常规培养24 h后用棉签擦去Transwell小室膜上尚未侵袭的细胞,95%酒精常温下固定30 min,用0.5%的甲基蓝染色,每组实验重复3次。在200倍光学显微镜下随机取3个视野,取其侵袭的细胞数均值表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.4 统计学方法

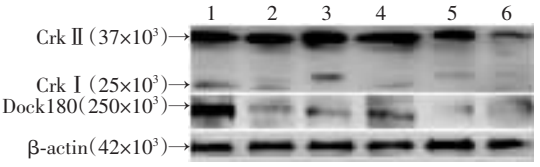
用SPSS 17.0统计软件,计量资料实验结果用$\bar{x}\pm s$表示,组间均数比较行方差分析。

2 结果

2.1 Crk、Dock180蛋白在3种不同组织中的表达

如图1所示,CrkⅠ蛋白和Dock180蛋白的表达强度呈明显的一致性,卵巢癌组织中CrkⅠ蛋白的表达显著高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织,代表其表达量的相对光密度值分别为0.394±0.097、0.242±0.013和0.239±0.010,差异具有统计学意义($P<0.05$),而在卵巢良性肿瘤组织与正常卵巢组织之间未发现明显差异($P>0.05$)。卵巢癌组织中Dock180蛋白的表达显著高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织,其相对光密度值分别为0.265±0.077、0.157±0.020和0.160±0.020,差异有统计学意义($P<0.05$),而在卵巢良性肿瘤组织与正常卵巢组织之间未发现明显差异($P>0.05$)。

卵巢癌组织中CrkⅡ蛋白的表达显著高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织,其相对光密度值分别为1.054±0.217、0.732±0.085和0.239±0.010,3组之间的差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

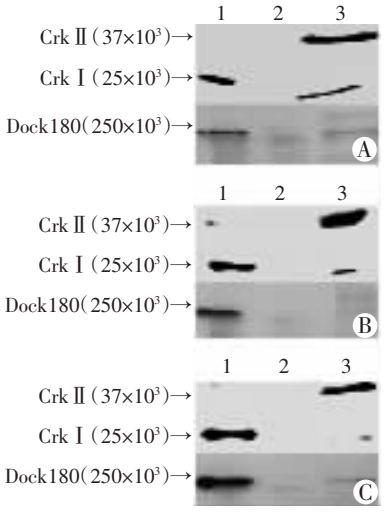


1～4:卵巢癌组织 5:卵巢良性肿瘤组织 6:正常卵巢组织

图 1　Western blot 检测 Crk、Dock180 蛋白在 3 种组织中的表达

2.2　上皮性卵巢癌细胞株中 Dock180 和 Crk 的关系

在 3 个卵巢癌细胞株中,内源性的 Dock180 和 CrkⅠ及 CrkⅡ都有结合,但是主要和 CrkⅠ结合。见图 2。



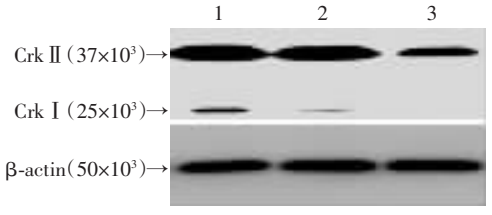
A:SKOV3 B:MCAS C:RMUG-L

1:实验组 2:阴性对照组 3:空白对照组

图 2　免疫共沉淀检测 3 种卵巢癌细胞株中 Dock180 和 Crk 的内源性结合

2.3　敲低 Crk 基因的 SKOV3 稳定转染细胞株的建立

我们用 siRNA 来敲低 SKOV3 细胞株中内源性的 Crk 基因,并成功建立了 Crki 1 和 Crki 2 2 个 Crk 表达缺失性的细胞株。Crki 1 细胞中 CrkⅡ蛋白的表达(1.36 ± 0.07)与对照相比无统计学差异(1.44 ± 0.08,$P > 0.05$),而 Crki 2 细胞中 CrkⅡ蛋白的抑制率为 71.6%;Crki 1 和 Crki 2 细胞中 CrkⅠ的表达都有明显的降低,Crki 2 细胞中几乎无 CrkⅠ蛋白的表达。见图 3。

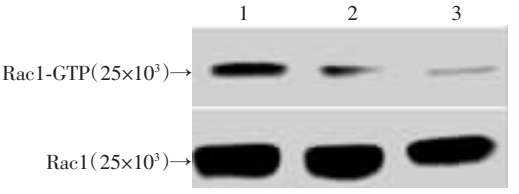


1:对照 2:Crki 1 3:Crki 2

图 3　Western blot 检测 Crk-KD 细胞中 Crk 蛋白的表达

2.4　Rac1 酶活性改变的检测

Crk 可以通过 Dock180 来调节 Rac1 酶活性,因此我们检测了 Crki 细胞中 Rac1 酶活性的改变,与对照相比(0.404 ± 0.094),Crki 1 和 Crki 2 细胞中 Rac1 酶活性明显降低(分别为 0.076 ± 0.016、0.025 ± 0.005,$P < 0.05$),但和 CrkⅠ表达的降低关系似乎更为密切。见图 4。

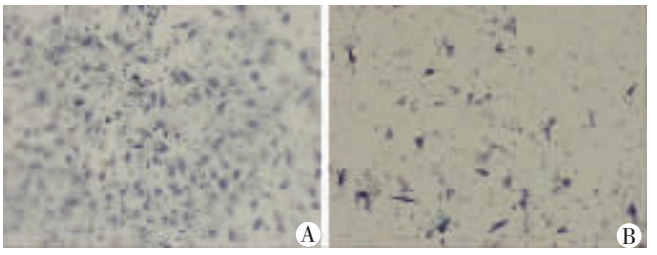


1:对照 2:Crki 1 3:Crki 2

图 4　GST-pull down 实验检测 Crk-KD 细胞中 Rac1 酶活性的改变

2.5　敲低 Crk 基因的 SKOV3 细胞株侵袭能力的分析

我们用体外侵袭实验来检测 3 组细胞的侵袭能力,Crki 1 和 Crki 2 穿过人工基底膜的细胞数目分别为 20 ± 2 和 17 ± 3,明显的低于对照(158 ± 9,$P < 0.05$),Crki1 和 Crki2 相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 5。结果提示 CrkⅠ对 SKOV3 细胞株的侵袭能力起主要作用。



A:对照 B:Crki1

图 5　Transwell 体外侵袭实验检测 Crk 基因下调前后细胞侵袭能力的变化　(×400)

3　讨论

国内外多个学者在以前的研究中发现在人类神经恶性胶质瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃癌、宫颈癌等多种恶性肿瘤中均检测到 Crk mRNA 及蛋白水平的过度表达,这种过度表达与恶性肿瘤的发生相关[11-12]。前期工作中我们证实了 Crk 参与人卵巢癌细胞 MCAS 增殖、侵袭和迁移[7]。本研究结果显示卵巢癌组织中 Crk 表达上调,支持 Crk 在卵巢癌生物学行为中的作用。

尽管如此,目前对于 CrkⅠ和 CrkⅡ的不同表达及其意义还存在着争议。有人提出 CrkⅠ是 Crk 的激活形式,CrkⅡ的第 221 位氨基酸上的酪氨酸残基可以发生自身磷酸化而使 CrkⅡ失活[13]。研究还发现,在成纤维细胞株 3Y1 细胞中,CrkⅠ表现出了恶性转化的活性,而 CrkⅡ则不具有这一功能[14]。在胶质母细胞瘤中的研究发现主要是 CrkⅠ参与了胶质母细胞瘤的发生、发展[6,15]。我们用蛋白质印迹法检测了卵巢癌组织、卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织中 Crk 的表达,结果显示与卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织差异更明显的是 CrkⅠ,其在卵巢癌组织中的相对表达水平明显高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织。而且其表达强度与 Crk 的一个下游分子 Dock180 表达呈明显一致性。后者是小分子 GTPases Rac1 的鸟嘌呤核苷

酸交换因子，此前我们已经证明在SKOV3细胞中Dock180/Rac1信号转导通路在其恶性生物学行为中发挥了重要的作用[9]，Dock180敲除的细胞动力和侵袭及转移能力受到了不同程度的消弱，Rac1酶活性也出现了下调。本研究通过蛋白质印迹法证明了卵巢癌组织中Dock180的过表达，这进一步证实Dock180参与了卵巢癌的发生过程。而卵巢癌组织中CrkⅠ与Dock180的共表达提示卵巢癌恶性浸润行为很可能是通过CrkⅠ/Dock180/Rac1信号途径得以实施。为进一步阐明该推测，我们通过免疫共沉淀技术在卵巢癌细胞株SKOV3、MCAS和RMUG-L中证明了接合物蛋白Crk和Dock180的结合，显示在卵巢癌细胞中Dock180主要是和CrkⅠ相结合，并利用小干扰RNA技术沉默CrkⅠ及CrkⅠ和CrkⅡ后检测细胞Rac1酶活性的变化和侵袭力的改变，结果提示CrkⅠ/Dock180/Rac1信号转导途径对人卵巢癌的恶性潜能发挥着主要作用。

总之，本研究结果提示癌基因Crk在卵巢癌恶性潜能中的作用主要是由CrkⅠ/Dock180/Rac1信号转导通路介导的。

参考文献：

[1] Davidson B, Risberg B, Berner A, *et al*. The biological differences between ovarian serous carcinoma and diffuse peritoneal malignant mesothelioma[J]. Semin Diagn Pathol, 2006, 23(1): 35-43.

[2] Lee J K, Hong Y J, Han C J, *et al*. Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: which is the optimal specimen? [J]. Int J Oncol, 2000, 17(1): 149-152.

[3] Mayer B J, Hamaguchi M, Hanafusa H. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C [J]. Nature, 1988, 332(6161): 272-275.

[4] Matsuda M, Tanaka S, Nagata S, *et al*. Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities[J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(8): 3482-3489.

[5] Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M, *et al*. Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers [J]. Cancer Lett, 2002, 180(1): 55-61.

[6] Takino T, Nakada M, Miyamori H, *et al*. CrkⅠ adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(9): 2335-2337.

[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] Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, *et al*. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180 [J]. Genes Dev, 1998, 12(21): 3331-3336.

[9] 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.

[10] Nagashima K, Endo A, Ogita H, *et al*. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells[J]. Mol Boil Cell, 2002, 13(12): 4231-4242.

[11] Miller C T, Chen G, Gharib T G, *et al*. Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas[J]. Oncogene, 2003, 22(39): 7950-7957.

[12] Rodrigues S P, Fathers K E, Chan G, *et al*. CrkⅠ and CrkⅡ function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells[J]. Mol Cancer Res, 2005, 3(4): 183-194.

[13] Kobashigawa Y, Sakai M, Naito M, *et al*. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(6): 503-510.

[14] Park T J, Boyd K, Curran T. Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(16): 6272-6282.

[15] Wang L, Tabu K, Kimura T, *et al*. Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 362(4): 976-981.

（收稿：2010-10-18 修回：2010-11-22）

（编辑 王小寒）

关于论文统计学分析方法的选择

对于定量资料，应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的，选用合适的统计学分析方法，不应盲目套用*t*检验和单因素方差分析；对于定性资料，应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的，选用合适的统计学分析方法，不应盲目套用成组χ^2检验；对于回归分析，应结合专业知识和散布图，选用合适的回归类型，不应盲目套用直线回归分析；对于重复实验数据检验回归分析资料，不应简单化处理；对于多因素、多指标资料，要在一元分析的基础上，尽可能运用多元统计学分析方法，以便对各因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价；对于涉及复杂统计学的论文建议请统计学专家把关。

本刊编辑部