文章编号:1000-5404(2012)13-1277-04

论著

鸟嘌呤核苷交换因子 Dock180 与 Elmo1 在卵巢癌细胞中的共表达

张 瑜[1],高一萌[1],李文燕[1],彭慧娟[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** 寻找卵巢癌细胞中鸟嘌呤核苷交换因子 Dock180 与 Elmo1 呈相互协同作用的依据。**方法** 采用 Western blot 检测人卵巢癌组织、良性肿瘤组织及正常卵巢组织中的 Dock180 与 Elmo1 的表达水平;免疫组化检测卵巢癌组织中 Dock180 与 Elmo1 的分布;免疫荧光检测 Dock180 与 Elmo1 在卵巢癌细胞 SKOV3 中的定位分布;检测 Dock180 表达缺失的 SKOV3 细胞中内源性 Elmo1 的表达水平。**结果** Dock180 与 Elmo1 在人卵巢癌组织中的表达水平呈明显正相关($r=0.829$,$P<0.05$),在卵巢癌组织中二者的表达水平显著高于卵巢良性肿瘤组织组和卵巢正常组织组($P<0.05$)[Dock180:(1.054±0.114)、(0.518±0.126)、(0.425±0.072);Elmo1:(0.864±0.114)、(0.374±0.076)、(0.300±0.105)]。免疫组化及细胞化学染色均显示二者在人卵巢癌组织和细胞内的分布具有一致性。而且在 Dock180 表达缺失细胞中,Elmo1 的表达水平也同时降低。**结论** Dock180 与 Elmo1 在促进卵巢癌的癌变过程中可能具有相互协同作用。

[关键词] 鸟嘌呤核苷交换因子;Dock180; Elmo1; 卵巢癌
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.31 [文献标志码] A

Co-expression of guanine-nucleotide exchange factor DOCK180 and ELMO1 in ovarian cancer cells

Zhang Yu[1], Gao Yimeng[1], Li Wenyan[1], Peng Huijuan[1], Liu Bin[2], Wang Hui[1], Linghu Hua[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To seek evidence to support the synergic effect of guanine-nucleotide exchange factor (GEF) downstream of crk with moleculer weight of 180kDa of human (Dock180) and engulfment and cell motility1 (Elmo1) in ovarian cancer cells. **Methods** Dock180 and Elmo1 expression were detected by Western blotting in ovarian cancer tissues (EOC, $n=29$), benign ovarian tumors (BOT, $n=14$) and normal ovary tissues (Normal, $n=10$). Immunohistochemistry was performed to detect the distribution of Dock180 and Elmo1 in the ovarian cancer tissues. Immunofluorescence staining was utilized to detect the location and distribution of Dock180 and Elmo1 in ovarian cancer cell SKOV3. And finally, endogenous Elmo1 expression was assayed in Dock180 knockdown cells, which was established previously. **Results** Both Dock180 and Elmo1 expression presented at higher levels in EOC than those in benign and normal ovarian tissues ($P<0.05$), and no significant difference was found between BOT and normal group either for Dock180 or Elmo1 expression (Dock180: 1.054±0.114, 0.518±0.126, 0.425±0.072; Elmo1: 0.864±0.114, 0.374±0.076, 0.300±0.105, $P>0.05$). Dock180 expression displayed a consistence with that of Elmo1 in EOC tissues($r=0.829$, $P<0.05$). Their co-expression was also observed through immunohistochemical staining in EOC tissues. Moreover, consistent distribution of these two molecules was shown in SKOV3 cells through immunofluorescence staining. Finally, Dock180-knockdown SKOV3 cells presented with evidently decreased expression of Elmo1, as compared with wild-type, negative and mock controls. **Conclusion** Co-expression of Dock180 and Elmo1 in EOC tissues and their consistent distribution in ovarian cancer cells support their synergistic effect in the pathogenesis of EOC.

[**Key words**] guanine-nucleotide exchange factor; Dock180; Elmo1; human ovarian cancer

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30772330) 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);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

诊断时已广泛浸润转移是卵巢癌高死亡率的一个主要原因,也是造成卵巢癌治疗困难的一个重要因素[1]。而目前寻求肿瘤特异性靶标是卵巢癌生物治疗研究的重点。Dock180 (downstream of crk with moleculer weight of 180×10^3 of human)即人 Crk 下游结合分子,相对分子质量约 180×10^3[2]。Dock180 作为小 GTP 酶 Rho 家族的鸟嘌呤核苷交换因子(guanine-nucleotide exchange factor,GEF),是调节肌动蛋白细胞骨架及细胞形态的重要分子[3]。Crk/Dock180/Rac1 信号通路在恶性肿瘤中的作用在头颈部肿瘤、乳癌细胞中得到验证,我们前期工作中也显示该信号通路,尤其是 CrkI/Dock180/ Rac1 在卵巢癌的恶性生物学行为中起着重要的作用[4-5]。Elmo1(engulfment and cell motility 1)即细胞移动吞噬因子 1,相对分子质量约为 72×10^3,是进化上非常保守的序列,无明显催化区域,作为接合物蛋白参与了与细胞移动有关的多种生理病理过程,如细胞骨架的重组、上皮迁移,并且与多种上皮细胞起源的肿瘤发生密切相关[6-9]。为了解 Elmo1 与 Dock180 在卵巢癌是否协同作用共同激活效应靶酶 Rac1,我们检测了卵巢癌组织及细胞株中二者的共表达及定位分布,同时对 Dock180 表达缺失细胞的相关蛋白表达进行检测。

1 资料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源与细胞 收取 2009 年 8 月至 2009 年 12 月我科手术切除的卵巢癌组织 29 例(其中浆液性癌 16 例,黏液性癌 10 例,子宫内膜样癌 2 例,低分化腺癌 1 例;组织学分级Ⅰ级 6 例,Ⅱ级 12 例,Ⅲ级 11 例),卵巢良性肿瘤组织 14 例(其中浆液性囊腺瘤 6 例,黏液性囊腺瘤 8 例),正常卵巢组织 10 例。所有组织标本均为手术后立即取材并保存于液氮中,相应临床病历资料完整。所有卵巢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,患者平均年龄 52 岁。FIGO 分期 Ⅰ~Ⅱ期 5 例,Ⅲ/Ⅳ期 24 例。良性肿瘤组患者平均年龄 50 岁;正常卵巢组:取相近年龄段因其他原因而行卵巢切除的正常卵巢组织 10 例,患者平均年龄 53 岁。标本的收集获得患者的知情同意,并签订知情同意书。

卵巢癌细胞株 SKOV3 来自于重庆医科大学病理学教研室。

1.1.2 试剂 RPMI1640(GIBCO,USA),胎牛血清(四季青,中国),Western blot 试剂盒(碧云天,中国),Dock180 单克隆抗体(BD transduction,USA),Elmo1 单克隆抗体(Santa Cruz ,CA,USA),鼠抗 actin 单克隆抗体(四正柏,中国),山羊抗兔(鼠)IgG/HRP、山羊抗小鼠 IgG/FITC 标记、山羊抗小鼠 IgG/TRITC 标记(中杉金桥,中国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV3 细胞培养在含有 10% 的胎牛血清、100 U/ml 的青霉素、100 U/ml 的链霉素的 RPMI1640 完全培养基,置于 37 ℃、含 5% CO_2 的混合气体培养箱中常规培养,选取处于对数生长期细胞作为实验细胞。

1.2.2 Western blot 裂解组织或细胞提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,每个样本上 60 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,封闭,再依次加入一抗 4 ℃过夜、二抗 37 ℃反应 90 min,ECL plus 试剂盒显影曝光,凝胶成像仪照相后用 Quantity One 图像分析软件计算各组蛋白条带的灰度值,计算目的蛋白条带的灰度值与 β-actin 灰度值的比值,得出目的蛋白的相对表达水平。

1.2.3 免疫组化 4 μm 石蜡连续切片,常规脱蜡、水化,微波抗原修复,正常山羊血清封闭 30 min。一抗 4 ℃过夜,二抗 37 ℃孵育 30 min。DAB 显色,显微镜下观察控制显色时间。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知阳性切片作为阳性对照。

1.2.4 免疫荧光 制备细胞爬片,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,0.1% Triton X100 室温作用 15 min,正常山羊血清封闭 30 min,一抗 4℃孵育过夜,避光加入荧光二抗后 37 ℃孵育 30 min,50% 甘油封片,激光共聚焦观察并摄像。

1.2.5 质粒及 Dock180 缺失型稳定转染细胞株的构建 由前期工作构建成功[4]。

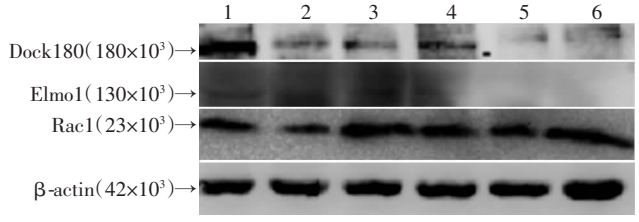
1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,行方差分析和 Sperman 相关性分析。

2 结果

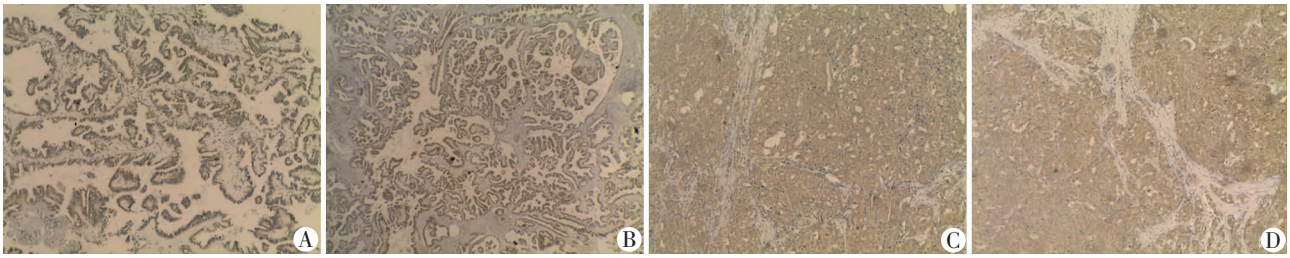
2.1 Western blot 检测 Dock180 与 Elmo1 蛋白在 3 种卵巢组织中的表达

如图 1 所示,Dock180 和 Elmo1 蛋白的表达强度表现出明显正相关($r=0.829$,$P<0.05$)。卵巢癌组织中,Dock180 蛋白表达水平显著高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织,其相对灰度值分别为(1.054 ± 0.114)、(0.518 ± 0.126)、(0.425 ± 0.072),差异显著($P<0.05$);而在卵巢良性肿瘤组织与正常卵巢组织之间无显著差异($P>0.05$)。卵巢癌组织中,Elmo1 蛋白的表达水平显著高于卵巢良性肿瘤组织和正常卵巢组织,其相对灰度值分别为(0.864 ± 0.114)、(0.374 ± 0.076)、(0.300 ± 0.105),差异显著($P<0.05$);而在卵巢良性肿瘤组织与正常卵巢组织之间无显著差异($P>0.05$)。Rac1 在 3 种卵巢组织中的表达水平一致。



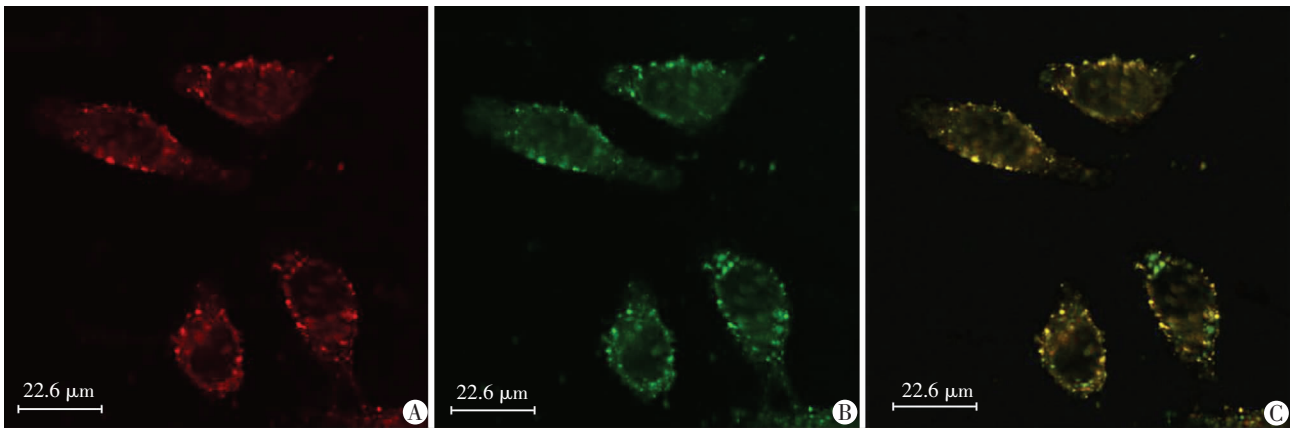
1~4:卵巢癌组织;5:卵巢良性肿瘤组织;6:正常卵巢组织

图 1 Western blot 检测 Dock180、Elmo1 及 Rac1 蛋白在 3 种卵巢组织中的表达



A：高分化，Dock180；B：高分化，Elmo1；C：低分化，Dock180；D：低分化，Elmo1

图 2　免疫组化检测 Dock180、Elmo1 蛋白在卵巢癌组织中的表达　（S-P ×100）



A：Dock180；B：Elmo1；C：二者融合后

图 3　激光共聚焦检测 Dock180 、Elmo1 蛋白在卵巢癌细胞株中的分布

2.2　免疫组化检测 Dock180 与 Elmo1 蛋白在卵巢癌组织中表达具有一致性

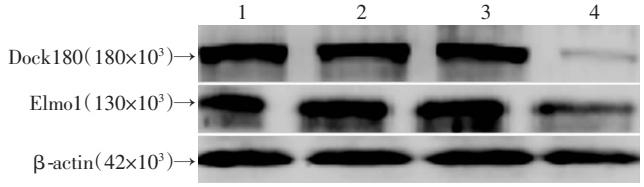
虽说我们没有检测到组织分化程度与 Dock180 及 Elmo1 表达水平之间具有显著相关性，但同一标本中二者表达强度表现出明显一致性。如图 2 所示，在卵巢癌组织中检测到 Dock180 与 Elmo1 蛋白的表达，并且这两种蛋白均主要定位于细胞膜和细胞质，为棕黄色或棕色颗粒，呈弥漫性分布。

2.3　Dock180 与 Elmo1 在卵巢癌细胞株 SKOV3 中的定位分布

如图 3 所示，Dock180 主要分布于细胞膜以及细胞膜皱褶等特化结构，细胞质中也有少量分布。同时 Elmo1 也表现出相似的分布。二者融合以后，定位重叠，其细胞内定位分布表现出一致性。

2.4　Dock180 表达缺失型 SKOV3 细胞中 Dock180、Elmo1 蛋白表达及相互关系

用 siRNA 干扰 SKOV3 细胞株中内源性表达的 Dock180 蛋白，建立 Dock180 表达缺失型细胞株 Dock180i-SKOV3。Dock180i-SKOV3 细胞中 Dock180 的表达（0.225 ± 0.101）与对照组（1.064 ± 0.131）相比，蛋白降低 78.85%。Dock180 表达缺失型细胞株构建成功（图 4）。在 Dock180 表达缺失的细胞中，我们检测到 Elmo1 的表达水平也随之降低，Dock180i 组中 Elmo1 蛋白表达水平（0.202 ± 0.103）与对照组（0.766 ± 0.175）相比，蛋白降低 73.6%。在 Dock180i-SKOV3 细胞株中 Dock180 和 Elmo1 的表达水平呈正相关（$r=0.531$，$P<0.05$）。



1：对照组 SKOV3；2：阴性质粒 SKOV3；3：空质粒 SKOV3；4：Dock180iSKOV3

图 4　Western blot 检测 Dock180 、Elmo1 蛋白在 SKOV3 细胞中的表达

3　讨论

恶性肿瘤发生浸润和转移的首要条件是肿瘤细胞动力的增加，而这种变化与细胞信号传导有着密切关系[1]。小分子 GTP 连接酶 Rac1 参与了细胞移动的调控，在细胞丝状伪足、片状伪足、粘着斑的形成中具有重要的作用。鸟嘌呤核苷交换因子 Dock180 位于细胞内信号结合物蛋白 Crk 的上游，能与 Crk 的 SH3 结构域特异性的结合，将上游的细胞内信号传递给下游的小分子 GTP 酶 Rac1，并通过激活 Rac1 而参与调节细胞骨架、细胞增殖等重要生理过程，如果在细胞信号传导中出现效应酶 Rac1 异常激活，则可能会导致肿瘤的发生[12-13]。我们的实验结果显示卵巢组织中总的

Rac1表达水平都不低,与Dock180及Elmo1表达强度似乎没有关联。提示作为二者下游蛋白的Rac1,其表达总量是不受上游激活蛋白Dock180/Elmo1的影响的。受影响的应该是与GTP结合的活性形式。因为Rac1酶活性测定需要新鲜卵巢癌组织或新鲜提取的细胞,我们目前还没能在组织中证实Dock180/Elmo1的共表达与Rac1酶活性之间的相关性。不过,Dock180/Elmo1共表达与Rac1酶活性之间的正相关在Dock180表达缺失型SKOV3细胞中已得到验证(参考文献[4]及本研究)。

既往研究[10]认为Elmo1通过不同的途径激活并稳定细胞内Dock180的活性,包括:协助Dock180稳定Rac,缓减Dock180的自我抑制并促进Dock180定位于细胞膜以便于更容易接近其靶向目标Rac;以及作为Dock180泛素化抑制剂,延缓细胞内Dock180的降解[11]。而Dock180对Elmo1是否具有调控作用则没有相关报道。我们前期免疫组化结果提示,鸟嘌呤核苷交换因子Dockl80在卵巢交界性肿瘤中表达开始逐渐增高,在卵巢癌中明显增高,提示Dock180可能参与了卵巢癌癌变的早期过程[14]。通过RNA沉默敲低卵巢癌细胞SKOV3的内源性Dock180表达阐明Crk/Dock180/Rac1信号通路在卵巢癌细胞SKOV3恶性潜能中的作用[4-5]。考虑到Elmo1对Dock180的正向调节作用以及二者协同作用对恶性肿瘤侵蚀能力的促进作用[15-16],我们对这两种蛋白在卵巢癌细胞/组织中的表达进行了检测。结果验证了二者在卵巢癌细胞及组织均存在共表达且卵巢癌组织中表达明显高于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织,二者在卵巢癌细胞中的定位分布也是一致的,提示Dock180与Elmo1蛋白在卵巢癌发生发展中的协同作用。

此外,我们对前期构建Dock180表达缺失SKOV3细胞的Elmo1蛋白进行检测,发现对Dock180表达敲低后,其协同蛋白Elmo1表达也明显受阻。该现象提示,Dock180与Elmo1之间的协同作用应该是相互的,除了已知的Elmo1对Dock180的促进作用[16],Dock180对Elmo1同样具有正向调节作用。但其正向调节作用的具体机理还有待进一步阐明。

Elmo1与Dock180在卵巢癌组织中共表达,及卵巢癌细胞中二者相同的定位分布,提示在卵巢癌发生发展过程中,二者可能对对方的细胞内活性维持都具有正向调控作用。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. Science, 1998, 279(5350): 509-514.

[4] 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.

[5] 车亚玲, 王瑾, 令狐华. 接合物蛋白CrkⅠ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.

[6] Ravichandran K S, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(12): 964-974.

[7] Gumienny T L, Brugnera E, Tosello-Trampont A C, *et al*. CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration[J]. Cell, 2001, 107(1): 27-41.

[8] Erickson M R, Galletta B J, Abmayr S M. Drosophila myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization[J]. J Cell Biol, 1997, 138(3): 589-603.

[9] Wu Y C, Horvitz H R. C. elegans phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180[J]. Nature, 1998, 392(6675): 501-504.

[10] Lu M, Ravichandran K S. Dock180-ELMO cooperation in Rac activation[J]. Methods Enzymol, 2006, 406: 388-402.

[11] Makino Y, Tsuda M, Ichihara S, *et al*. Elmo1 inhibits ubiquitylation of Dock180[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 5): 923-932.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 王辉, 令狐华, 姚珍薇. 鸟嘌呤交换因子Dock180在卵巢肿瘤组织中的表达和意义[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(5): 517-520.

[15] Grimsley C M, Kinchen J M, Tosello-Trampont A C, *et al*. Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration[J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 6087-6097.

[16] Jarzynka M J, Hu B, Hui K M, *et al*. ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion[J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7203-7211.

(收稿:2011-11-02;修回:2012-02-06)

(编辑 吴培红)