文章编号:1000-5404(2012)12-1185-04

论著

接合物蛋白 Crk 与 CrkL 在卵巢癌细胞株 MCAS 细胞增殖中的不同作用

李文燕,高一萌,张 瑜,王 瑾,车亚玲,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** 探讨接合物蛋白 Crk 和 CrkL 在卵巢癌细胞株 MCAS 细胞增殖中的不同作用。**方法** 采用免疫共沉淀法检测上皮性卵巢癌细胞株 MACS 中 Crk 和 CrkL 蛋白与已知的与肿瘤增殖相关的上下游结合蛋白的内源性结合;用可调节性 siRNA 敲低 MACS 细胞中内源性的 Crk 及 CrkL,观察二者对细胞生长及存活能力的影响。**结果** 免疫共沉淀显示卵巢癌细胞株 MACS 中,Crk 与影响细胞生长增殖的上游蛋白 p130Cas 及下游蛋白 Sos 的结合明显强于 CrkL,尽管 Crk 与 CrkL 表现出部分相同的免疫原性。免疫印迹显示在加入 Dox 后即 Crk 或 CrkL 表达沉默被启动。Crki/CrkLi 细胞中加入 Dox 后 Crk 与 CrkL 表达明显降低[Dox +:Crk(0.021 ±0.001),CrkL(0.676 ±0.005);Dox −:Crk(0.544 ±0.003),CrkL(1.282 ±0.007),$P<0.05$]。对可调节性 siRNA 构建之可控性 Crki/CrkLi 细胞的连续动态观察发现,Crki 细胞表现出细胞增殖力受限仍保存生存活力,而 CrkLi 细胞则表现出逐渐脱壁至死亡。**结论** Crk 及 CrkL 在卵巢癌细胞 MCAS 的恶性增殖中扮演着不同的作用,Crk 蛋白的过度表达可能直接影响着卵巢癌细胞恶性增殖,而 CrkL 则可能更多地参与了细胞基本生存相关的生物行为。

[关键词] Crk;CrkL;接合物蛋白;卵巢癌细胞株 MCAS
[中图法分类号] R341;R730.23;R737.31 [文献标志码] A

Adaptor protein Crk differs from CrkL in promoting proliferation in ovarian cancer cell line MCAS

Li Wenyan, Gao Yimeng, Zhang Yu, Wang Jin, Che Yaling, Linghu Hua (Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To verify the different roles of adaptor proteins Crk and Crk-like (CrkL) in the proliferation in ovarian cancer cell line MCAS. **Methods** Co-immunoprecipitation was performed to detect Crk and CrkL endogenous binding proteins that were known to be associated with tumor malignant proliferation in ovarian cancer cell line MCAS. Inducible siRNA was employed to knock down endogenous Crk and CrkL expression in MCAS cells, respectively, and the growth and viability of the inducible Crk/CrkL-knockdown MCAS cells (MACS-Crki/CrkLi) were observed. **Results** Crk rather than CrkL strongly bound to p130Cas and Sos, which were reported to be related with cell proliferation, despite CrkL and Crk had partially the same immunogenicity. The result of Western blotting showed that Crk/CrkL started to be silenced and their expression significantly decreased when exposed to doxycycline (Dox) in MACS-Crki/CrkLi cells (Dox +: Crk 0.021 ±0.001, CrkL 0.676 ±0.005; Dox −: Crk 0.544 ±0.003, CrkL 1.282 ±0.007; $P<0.05$). Serial observation of the MACS-Crki/CrkLi cells demonstrated that the Dox-induced CrkL knockdown cells presented with gradual detachment from plastic dish and even death, as compared with the Dox-induced Crk knockdown cells with reduced cell growth but remaining viability. **Conclusion** As compared with the role of Crk in malignant proliferation of MCAS cells, CrkL may be involved in some basic biological events associated with MCAS cell survival.

[**Key words**] Crk; CrkL; adaptor protein; human ovarian cancer cell line

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

我们此前证实了接合物蛋白 Crk 对卵巢癌细胞 MCAS 株恶性增殖的作用[1],但其家族中的另一成员 CrkL (Crk-like)同样在上皮性卵巢癌中呈过度表达[2],因两者具有 60% 的同源性,又都作为接合物蛋白参与细胞活动,都能与磷酸化的底物 p130Cas、paxillin 等结合,且文献[3]报道二者拥有类似的下游靶向结合蛋白 C3G、Dock180 和 Sos,故总是被认为在细胞

[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

中作用类似,相互叠加,互相补充。不过这也仅限于推测,并无直接证据。如果真是这样,那么二者其中之一如出现表达或功能缺失,另一个就应该因为被扰乱了共同的信号途径而同时受损或出现代偿性表达增加且功能活跃,而最近的细胞表达缺失实验均不支持这种推测。为此,本研究对此进行进一步实验探讨,以明确二者在卵巢癌细胞株MCAS中的不同作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

卵巢粘液性囊腺癌细胞株MCAS,构建可诱导性siRNA系统所需之pTet-tTS、pGL3-Crk-pro2、pSIREN-RetroQ-Tet以及pSIREN-RetroQ-Tet-Luf均由日本北海道大学肿瘤病理教研室的田中伸哉教授惠赠。RPMI1640、胎牛血清购自Gibco公司。Crk小鼠单克隆抗体购自美国Transduction Laboratories(Lexington, KY, USA),鼠抗CrkL、p130Cas及Sos均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司。Crk siRNA的靶序列(5′-GAGTTTGATTCATTGCCTG-3′)位于编码区276~294,CrkL siRNA的靶序列(5′-TGATGCCGAAGACCTGCCC-3′)位于编码区410~428,片段均系上海Invitrogen公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养及传代 MCAS细胞在37 ℃,5% CO_2条件下,用RPMI1640加入10%胎牛血清培养液及双抗(100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素)中常规培养,3 d传代1次,所有的实验在细胞对数生长期进行。

1.2.2 PCR 用Trizol裂解细胞后,按TaKaRa的mRNA提取试剂盒说明书提取mRNA,再在37、15 min的条件下行逆转录为cDNA。GAPDH上游引物5′-AGATGACCCAGATCATGTTTGA-3′,下游引物5′-TTGGCATAGAGGTCTTTA-3′,产物长度821 bp。CrkL上游引物5′-CAGCACCCAACCTGCCTAC-3′,下游引物5′-CACGATGTCACCAACCTCTAATG-3′,产物长度452 bp。Crk上游引物5′-GGCAGGGTAGTGGAGTGAT-3′,下游引物5′-AGGCTGTCTTGTCGTAGGC-3′,产物长度402 bp。PCR反应条件为:94 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共进行35个循环。取PCR产物上样,2%琼脂糖凝胶电泳,Goldview染色,采用美国Quantity One软件照相保存,采用美国Quantity One软件计算灰度值。CrkL光密度/β-actin光密度表示CrkL mRNA的相对表达量。Crk光密度/β-actin光密度表示Crk mRNA的相对表达量。

1.2.3 Western blot 用细胞裂解液裂解(配制含150 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA、10%甘油、0.5% NP-40、1 mmol/L原钒酸钠、1 mmol/L PMSF和50 mmol/L氟化钠)细胞,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,在每孔上样蛋白40 μg中加入适量SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,沸水中加热3~5 min使蛋白变性,将样本进行SDS-PAGE,转印至硝酸纤维素(NC)膜,依次加入一抗稀释液,4 ℃孵育1 h,二抗4 ℃,1 h,用ECL试剂盒进行显影曝光蛋白检测。用Quantity One图像分析软件计算各组蛋白条带的灰度值(OD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。

1.2.4 免疫共沉淀 用细胞裂解液裂解细胞,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,每组取2 mg的总蛋白进行实验,实验组分别加入抗-Crk及抗-CrkL抗体,阴性对照组分别加入小鼠IgG及兔IgG,4 ℃摇床上反应1 h,之后加入孵育蛋白G或者蛋白A的琼脂糖磁珠(Calbiochem,德国)继续反应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Western blot分析,检测分别与Crk或CrkL结合的p130Cas及Sos蛋白量。

1.2.5 构建稳定表达四环素(Tet)控制系统的MCAS细胞 将pTet-tTS质粒转染入MCAS,新霉素筛选存活克隆。将存活克隆扩增后分为3份,每份均同时转染含有Crk基因启动子的荧光素酶报告基因质粒pGL3-Crk-pro2以及由Tet调控之荧光素酶基因的沉默质粒pSIREN-RetroQ-Tet-Luc,于其中1份加入四环素的衍生物(doxycycline,Dox,1 μg/ml),通过荧光素酶活性检测荧光素酶沉默效果最好,背景酶活性最低的克隆作为进一步实验的工具细胞。

1.2.6 构建由Tet系统调控的Crk/CrkL表达缺失细胞株 利用含有嘌呤霉素抗性基因的pSIREN-RetroQ-Tet质粒,分别构建针对Crk/CrkL的质粒pSIREN-RetroQ-Tet-Crk和pSIREN-RetroQ-Tet-CrkL。将两种构建的质粒分别转染入1.2.4的工具细胞,由嘌呤霉素puromycin(2 μg/ml)筛选出存活细胞即为目的细胞。我们将这些细胞分别命名为MCAS-Crki和MCAS-CrkLi细胞,并用RT-PCR和免疫印迹法验证Dox能否调控Crk或CrkL的表达沉默。

1.2.7 对MCAS-Crki和MCAS-CrkLi细胞生长及活力的动态观察 将上述MCAS-Crki和MCAS-CrkLi以1×10^3细胞数接种于60 mm直径的培养皿中,用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液常规培养,在第24、72、120、148小时连续用相差显微镜观察。

1.2.8 对Dox激活后不同时间的MCAS-Crki和MCAS-CrkLi细胞进行焦点粘连(focal adhesion,FA)及肌动蛋白(actin)双染色 Dox作用不同时间后,分别将MCAS-Crki和MCAS-CrkLi细胞孵育于盖玻片,4 ℃ PBS清洗后,4%多聚甲醛室温固定20 min,1%白蛋白封闭非特异性抗原30 min,用抗-Paxillin抗体孵育,4 ℃过夜。37 ℃ PBS液清洗3次后,同时加入FITC标记(绿色荧光)的羊抗鼠抗体和Alexa594结合的鬼笔环肽室温孵育60 min后,封片,于激光共聚焦显微镜观察,照相。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,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

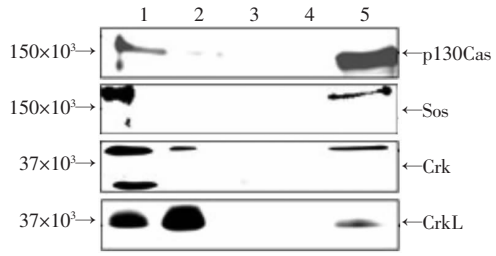
2.1 Crk和CrkL在细胞株MCAS中不同的结合靶蛋白

Crk和CrkL的结合蛋白中,p130Cas与Sos被报道主要与细胞增殖相关,如图1所示,在MCAS中,与CrkL相比,Crk表现出与p130Cas及Sos的明显优势结合,提示在MCAS恶性细胞增殖中Crk起着主要作用。

2.2 Tet系统调控的Crk/CrkL表达缺失型细胞株MCAS-Crki和MCAS-CrkLi的建立及验证

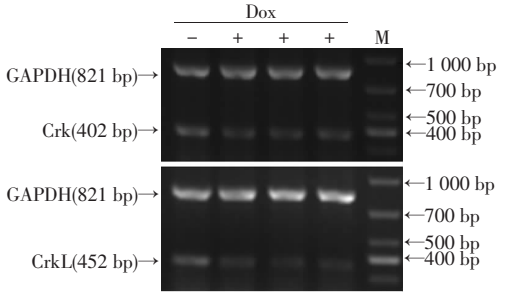
我们构建了由Tet系统调控的Crk/CrkL表达缺失细胞株MCAS-Crki和MCAS-CrkLi,如图2所示,RT-PCR结果提示加入

Dox(设 3 个复组)后即 Crk(0.277 ± 0.054)和 CrkL(0.091 ± 0.008)表达沉默被启动,与不加 Dox 组[Crk:(0.641 ± 0.104),CrkL:(0.142 ± 0.035)]有明显差异($P < 0.05$)。进一步用免疫印迹验证,结果提示加入 Dox 后 Crk(0.021 ± 0.001)或 CrkL(0.676 ± 0.005)表达较不加 Dox 组[Crk:(0.544 ± 0.003),CrkL:(1.282 ± 0.007)]表达明显降低($P < 0.05$)。见图 3。



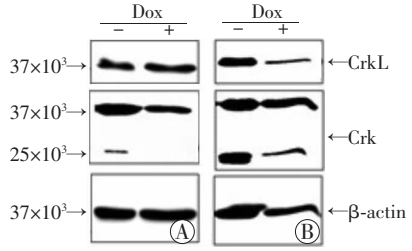
1:Crk; 2: CrkL;3、4:阴性对照;5:总的细胞裂解液

图 1 免疫共沉淀检测与 Crk/CrkL 结合的上下游蛋白 p130Cas 和 Sos



M:标准; −:不加 Dox; +:加入 Dox

图 2 RT-PCR 验证四环素衍生物对 Crk/CrkL 表达沉默的调控



−:不加 Dox; +:加入 Dox;A: MCAS-Crki; B:MCAS-CrkLi

图 3 Western blot 验证四环素衍生物对 Crk/CrkL 表达沉默的成功调控

2.3 Crk/CrkL 表达缺失型细胞生长及存活能力的动态观察

我们将筛选获得之 Tet 系统调控的 Crk/CrkL 表达缺失型细胞株 MCAS-Crki 和 MCAS-CrkLi 标记后进行动态观察。如图 4 所示,随着观察时间推移(1、3、5、7 d),MCAS-Crki 细胞簇形态改变不明显,但没有出现预期的细胞增殖,不过仍然保存活力;与之相对,我们观察到 MCAS-CrkLi 细胞不但没有增殖,细胞数目日渐减少,不断有细胞自培养皿脱壁死亡。

2.4 Crk/CrkL 表达缺失型细胞的焦点粘连和肌动蛋白染色观察

如图 5 所示,在 Crk/CrkL 表达沉默被 Dox 激活的第 1 天,2 种细胞都保存有良好的片状伪足;第 5 天时,MCAS-Crki 细胞的片状伪足形成明显受到抑制,但 MCAS-CrkLi 细胞的片状伪足形成还能清晰地看到。

3 讨论

过去几十年,人类对于包括癌症在内的广大疾病病理生理机制的理解取得了相当大的进展,从而为研发特异性靶向抑制参与肿瘤细胞内信号转导的癌基因蛋白提供了很好的平台。这种治疗理念已经超越了实验论证阶段,有很多这样的抑制剂被成功研发并用于临床,其中一些也产生了相当好的效果[4]。上皮性卵巢癌中,卵巢粘液性囊腺癌是比较特殊的,常常表现对传统化疗的原发耐药[5-6],对其晚期病变的临床处理非常棘手,寻找特异性的靶向治疗标记物尤为重要。但我们也知道,目前大量被发现的很多癌基因蛋白除了对恶性肿瘤的发生、发展有作用,很多同时也被发现参与了胚胎发育,组织修复等生理过程,如果对这些蛋白进行靶向抑制,负面意义也是不言而喻的。因此找到特异性的对癌细胞恶性增殖起关键调节作用的分子是靶向生物治疗研究不可忽视的。

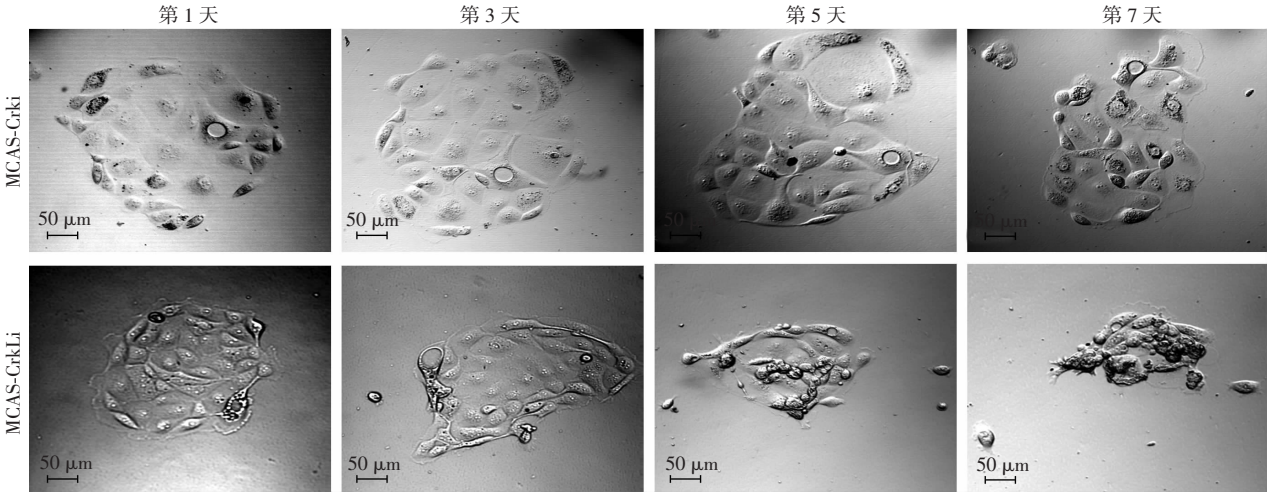


图 4 相差显微镜观察四环素衍生物诱导 Crk/CrkL 表达沉默细胞的增殖动态

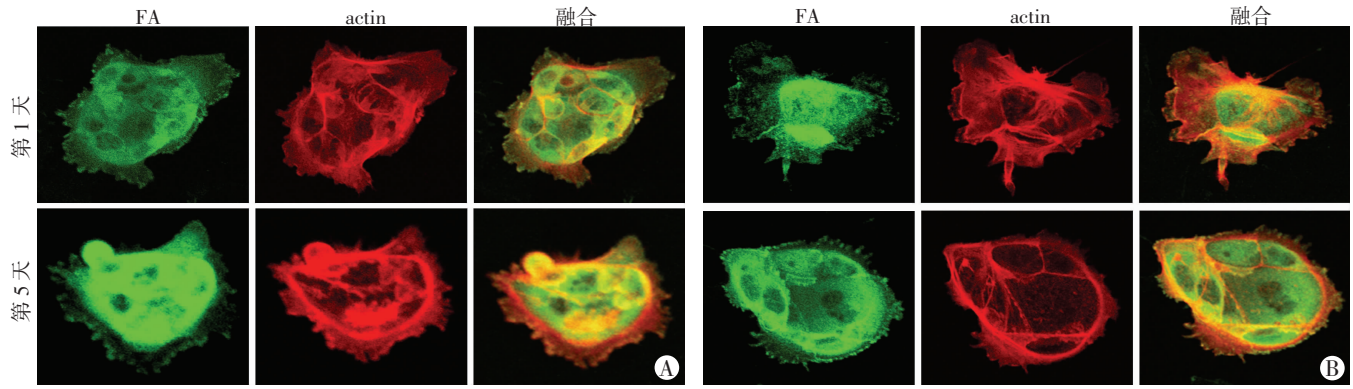


图5 四环素衍生物激活 MCAS-Crki(A)和 MCAS-CrkLi(B)第1、5天焦点粘连与肌动蛋白染色 (标尺:20 μm)

据报道,Crk 及 CrkL 均参与癌症形成,但两者作用机制是否相同,暂无相关研究[7-9]。我们的结果提示在粘液性卵巢癌细胞 MCAS 中,与 CrkL 相比,Crk 表现出对上游蛋白 p130Cas 及下游蛋白 Sos 的内源性结合,而 p130Cas 与 Sos 都被报道与细胞增殖相关[10-11],该结果支持 MCAS 细胞内 Crk 可能通过 p130Cas/Crk/Sos 信号途径发挥对其恶性增殖的促进作用。而 CrkL 则没有显示此作用。

前期工作中我们用 siRNA 技术,证实 Crk 在粘液性卵巢癌细胞株 MCAS 恶性增殖潜能中的作用[1],但构建 CrkL 表达缺失型细胞株却屡次失败,细胞逐渐离散脱落死亡,最终无法形成稳定传代生长的转染株,因此推测 CrkL 是否参与了细胞生理性生长的调控,敲低其内源性表达可能会引发致命结果。考虑到普通 siRNA 技术的局限性,我们引入了可调节性 siRNA 技术,得到的 MCAS-Crki 细胞的观察结果与前期工作的结论是一致的,即支持 Crk 对 MCAS 细胞恶性增殖的贡献;与之相对,我们观察到 MCAS-CrkLi 细胞不但没有增殖,细胞数目日渐减少,不断有细胞自培养皿脱壁死亡。我们通过对细胞焦点粘连和 actin 染色,观察到随着 Dox 作用时间的延长,MCAS-Crki 细胞的焦点粘连和片状伪足形成受到明显抑制,但 MCAS-CrkLi 细胞则不明显,支持 Crk 对 MCAS 细胞的恶性增殖作用的贡献与焦点粘连的形成以及肌动蛋白微丝细胞骨架重建的相关性,但 CrkL 表达沉默所导致的细胞死亡似乎与此关系不大。联想到之前 CrkL 敲除小鼠的类似结果[12],我们有理由推测,与 Crk 相比,接合物蛋白 CrkL 可能更多的参与了影响细胞生存的基本生理活动。因此,本研究结果提示接合物蛋白 Crk 和 CrkL 在粘液性卵巢癌细胞 MCAS 的恶性增殖中的作用不同,Crk 蛋白的过度表达与细胞的恶性增殖关系更为密切,而 CrkL 蛋白则可能更多参与了影响细胞生存的基本生理活动。我们的这一实验结果为卵巢癌合理的分子靶向治疗提供了必要的理论依据。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Feller S M. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles[J]. Oncogene, 2001, 20(44): 6348-6371.

[4] Sawyers C. Targeted cancer therapy[J]. Nature, 2004, 432(7015): 294-297.

[5] Cooke S L, Brenton J D. Evolution of platinum resistance in high-grade serous ovarian cancer[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(12): 1169-1174.

[6] Lage H, Denkert C. Resistance to chemotherapy in ovarian carcinoma [J]. Recent Results Cancer Res, 2007, 176: 51-60.

[7] Watanabe T, Tsuda M, Tanaka S, *et al*. Adaptor protein Crk induces Src-dependent activation of p38 MAPK in regulation of synovial sarcoma cell proliferation[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(9): 1582-1592.

[8] Hernandez-Boluda J C, Cervantes F. Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2009, 22(3): 343-353.

[9] Fathers K E, Rodrigues S, Zuo D, *et al*. CrkⅡ transgene induces atypical mammary gland development and tumorigenesis[J]. Am J Pathol, 2010, 176(1): 446-460.

[10] Tikhmyanova N, Little J L, Golemis E A. CAS proteins in normal and pathological cell growth control[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(7): 1025-1048.

[11] Feller S M, Knudsen B, Hanafusa H. Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways[J]. Oncogene, 1995, 10(8): 1465-1473.

[12] Guris D L, Fantes J, Tara D, *et al*. Mice lacking the homologue of the human 22q11. 2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome[J]. Nat Genet, 2001, 27(3): 293-298.

(**收稿**:2011-11-08;**修回**:2012-02-15)

(编辑 吴培红)