文章编号:1000-5404(2013)14-1471-04

论著

C3G在卵巢癌组织中的表达及其在SKOV3细胞增殖中的作用

罗淑娟[1],车亚玲[1],彭慧娟[1],张 瑜[1],高一萌[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],基础医学院病理科[2])

[摘要] **目的** 探讨鸟苷酸交换因子C3G(Crk SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor)在卵巢癌组织中的表达及在卵巢癌SKOV3细胞增殖中的作用。**方法** 采用Western blot检测比较40例卵巢癌、8例卵巢良性肿瘤及4例正常卵巢组织中C3G的表达水平。应用特异性siRNA下调SKOV3细胞中C3G的表达,通过MTT法和平板克隆实验检测细胞增殖,建立裸鼠皮下种植瘤模型观察移植瘤生长情况。**结果** 卵巢癌组织中C3G的表达显著高于卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织,其在卵巢癌、卵巢良性肿瘤分别是正常卵巢组织中的(1.832±0.200)($P<0.05$)、(0.893±0.147)倍。siRNA干扰可使SKOV3细胞中内源性C3G的表达下调79.2%;与野生型细胞组、阴性对照组及空载体对照组相比,C3G干扰组细胞增殖变慢($P<0.05$),克隆形成率下降($P<0.05$),移植瘤的平均体积和质量显著下降($P<0.05$)。**结论** 鸟苷酸交换因子C3G在大多数上皮性卵巢癌中过表达,并促进卵巢癌细胞增殖。

[关键词] 卵巢癌;鸟苷酸交换因子;C3G;增殖
[中图法分类号] R394.2;R730.23;R737.31 [文献标志码] A

Expression of C3G in epithelial ovarian cancer and its role in proliferation of SKOV3 cells

Luo Shujuan[1], Che Yaling[1], Peng Huijuan[1], Zhang Yu[1], Gao Yimeng[1], Liu Bin[2], 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 determine the expression of guanine nucleotide exchange factor Crk SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor (C3G) in epithelial ovarian cancer tissues and its role in the proliferation of human ovarian cancer cell line SKOV3. Methods C3G was detected by Western blotting in the tissue samples of epithelial ovarian cancer ($n=40$), benign ovarian tumors ($n=8$) and normal ovarian ($n=4$), respectively. Endogenous C3G was knocked-down by siRNA in SKOV3 cells. Then, MTT assay and plate colony formation assay were used to evaluate the proliferation of cancer cells. Nude mice subcutaneous xenograft transplanted tumor model was established to assess tumor growth *in vivo*. Results The expression of C3G was significantly higher in epithelial ovarian cancer tissues than in benign ovarian tumors and normal ovarian tissues. The expression of C3G was 1.832±0.200 times higher in epithelial ovarian cancer tissues ($P<0.05$) and 0.893±0.147 times higher in benign tumors when compared with normal ovarian tissues, respectively. Specific siRNA knocked down resulted in the expression of C3G decreased by 79.2% in SKOV3 cells, and significant decrease in cell proliferation and clone formation rate ($P<0.05$). Nude mice xenograft transplanted tumor by C3G siRNA transfected SKOV3 cells had average smaller volume and lower weight of subcutaneous tumors ($P<0.05$). Conclusion Nucleotide exchange factor C3G, over-expressed in most epithelial ovarian cancer tissues, facilitates the proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells.

[**Key words**] human ovarian cancer; guanine nucleotide exchange factor; C3G; proliferation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81072120) and the Project of Science and Technology Research of Chongqing Commission of Education (KJ100303). Corresponding author: Liu Bin, E-mail:my0216@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81072120);重庆市教委科学技术研究项目(KJ100303)
[通信作者] 刘 斌,E-mail:my0216@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130305.1419.007.html(2013-03-05)

Rap1是类Ras的小分子GTP连接酶,作为分子开关参与多种信号转导,在细胞的增殖、分化、形态发生及凋亡中起着重要作用。鸟苷酸交换因子介导Rap1在GDP结合形式和GTP结合形式之间的转换,对Rap1的功能起正向调控作用[1]。C3G(Crk SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor)是1994年发现的能与Crk SH3结构域相结合的蛋白[2-3],其作为Rap1的鸟甘酸交换因子已得到广泛认可[4]。研究显示在不同的恶性肿瘤里,C3G/Rap1信号转导通路在肿瘤发生及演进中所起的作用不尽相同。在乳头状甲状腺癌[5]、非小细胞肺癌[6]及白血病[7-9]等肿瘤中起着促进肿瘤发生、发展的作用。而在神经母细胞瘤[10]、膀胱癌[11]、宫颈鳞状细胞癌[12]等恶性肿瘤中则起着抑制作用。目前关于C3G/Rap1在卵巢癌中的作用及机制并不完全清楚。本研究拟探讨C3G在上皮性卵巢癌组织中的表达及其对卵巢癌SK-OV3细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 组织和细胞 人上皮性卵巢癌组织取自重庆医科大学附属第一医院妇产科2011年4-10月手术切除标本。卵巢癌浆液性囊腺癌SKOV3细胞系购自重庆医科大学病理学教研室。

1.1.2 主要试剂 兔抗C3G单克隆抗体购自Santa Cruz公司(美国),鼠抗β-actin单克隆抗体购自江苏碧云天公司(中国),载体pSUPER. retro. neo-GFP购自Invitrogen公司(美国),RPMI1640培养基购自Gibco公司(美国),胎牛血清购自四季青公司(中国杭州)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和siRNA干扰 SKOV3细胞用含10%胎牛血清的RPMI1640完全培养基,置于37 ℃、含5% CO_2 的培养箱中培养。C3G干扰序列为:正义链5′-GATCCCCGCCTCGCCAACCTCATTCGTTCAAGAGACGAATGAGGTTGGCGAGGCTTTTTGGAAA-3′,反义链5′-AGCTTTTCCAAAAAGCCTCGCCAACCTCATTCGTCTCTTGAACGAATGAGGTTGGCGAGGCGGG-3′,连接入pSUPER. retro. neo-GFP载体,构建重组质粒pSUPER. retro. neo/GFP -C3Gi,阴性对照shRNA片段及空载体对照为课题组前期构建,转染SKOV3细胞,G418筛选出稳定转染株。

1.2.2 Western blot检测 卵巢癌组织及细胞均以RIPA裂解液裂解提取蛋白,经SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、特异性抗体孵育后ECL显影。Quantity One软件对条带灰度值进行分析,蛋白条带灰度值与其内参灰度值的比值代表该蛋白的相对表达量。

1.2.3 MTT检测细胞增殖 于96孔板中每孔加入 2×10^3 个细胞。置于37 ℃、含5% CO_2 的混合气体培养箱中培养。在培养第0、1、2、3、4、5、6、7天行MTT检测,紫外分光光度仪测定波长570 nm处光密度值[$D(570)$],并绘制生长曲线。

1.2.4 平板克隆形成实验 以100个/孔细胞接种24孔板,置5% CO_2、37 ℃恒温培养箱内培养2周,瑞士染液染色,于倒置光学显微镜下观察,细胞数>50个细胞团作为克隆计数。重复进行3次实验,计数细胞集落,取其平均值。

平均克隆形成率=(平均克隆数/每孔加入的单细胞数)×100%

1.2.5 裸鼠皮下种植瘤模型构建 选用4~6周龄雌性BALB/c nu/nu鼠(体质量平均16.8 g,由重庆医科大学实验动物中心提供),按随机数字法分为阴性对照组和C3G干扰组,每组5只。制备成 6×10^7 个/mL的细胞悬液,每只裸鼠注射100 μL细胞悬液(即 6×10^6 个细胞)于右侧背部皮下。30 d后取瘤,测量皮下移植瘤质量和体积。

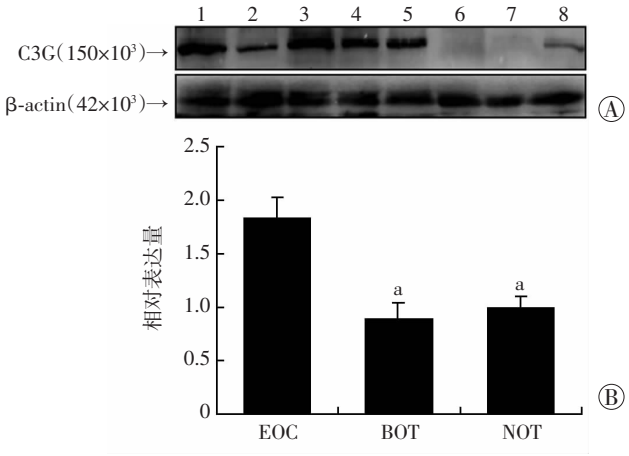
1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 C3G在上皮性卵巢癌组织中的表达

C3G在卵巢癌组织中的表达不完全一致,但与卵巢良性肿瘤和正常组织相比,C3G在72.5%(29/40)的卵巢癌组织中表达明显增加(图1A)。其在卵巢癌、卵巢良性肿瘤组织中的表达分别是正常卵巢组织中的(1.832±0.200)($P<0.05$)、(0.893±0.147)倍(图1B)。



A:Western blot检测结果 1~5:卵巢癌组织;6~7:卵巢良性肿瘤组织;8:正常卵巢组织;B:半定量分析 EOC:卵巢癌组织;BOT:卵巢良性肿瘤组织;NOT:正常卵巢组织;a:$P<0.05$,与卵巢癌组织比较

图1 Western blot检测C3G在上皮性卵巢癌中的表达

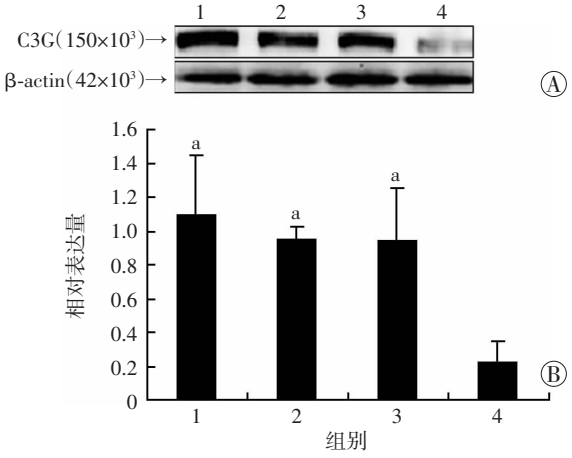
2.2 siRNA干扰卵巢癌SKOV3细胞中C3G的表达

采用siRNA下调SKOV3细胞中C3G的表达,C3G干扰组的表达水平明显下降,与野生型SKOV3细胞组、阴性对照组和空载体组比较,分别下降79.2%、76.1%和75.9%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)(图2)。

2.3 干扰C3G表达抑制SKOV3细胞增殖

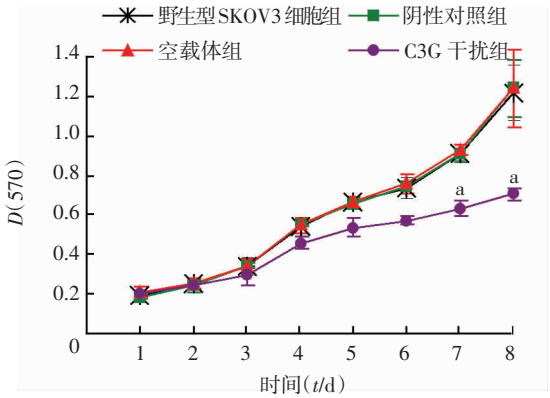
MTT法检测细胞增殖,与野生型SKOV3细胞组、阴性对照组和空载体组的细胞比较,C3G干扰组细胞生长速度下降,在

培养的第 6 天时出现显著性差异($P<0.05$)(图 3)。



1:野生型 SKOV3 细胞组;2:阴性对照组;3:空载体组;4:C3G 干扰组;A:Western blot 检测结果;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与 C3G 干扰组比较

图 2 Western blot 检测 C3G 在各组卵巢癌 SKOV3 细胞中的表达

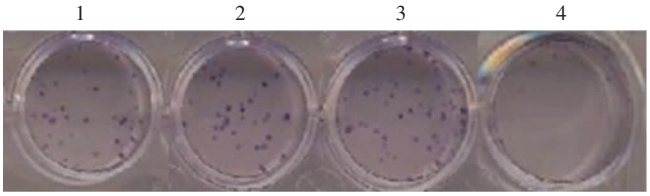


a: $P<0.05$,与其他 3 组比较

图 3 干扰 C3G 表达抑制 SKOV3 细胞增殖

2.4 干扰 C3G 表达抑制 SKOV3 细胞克隆形成

野生型 SKOV3 细胞组、阴性对照组和空载体组克隆形成率分别为(49.67 ± 4.50)%、(55.33 ± 4.53)%、(59.00 ± 5.87)%,C3G 干扰组为(15.67 ± 5.82)%,与前 3 组比较,细胞的克隆形成率显著下降($P<0.05$)。见图 4。

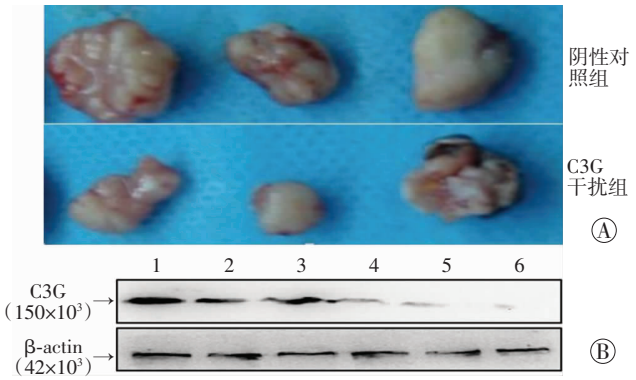


1:野生型 SKOV3 细胞组;2:阴性对照组;3:空载体组;4:C3G 干扰组

图 4 平板克隆实验检测对照组及干扰组细胞的克隆形成

2.5 干扰 C3G 表达抑制裸鼠皮下移植瘤生长

用免疫缺陷小鼠构建皮下异种移植瘤模型,阴性对照组和 C3G 干扰组各 5 只裸鼠,各有 3 只成瘤,成瘤率 60%。在种植后第 30 天,阴性对照组移植瘤体积为(1.15 ± 0.25) cm^3,瘤质量为(0.73 ± 0.12) g,C3G 干扰组体积为(0.30 ± 0.11) cm^3,瘤质量为(0.27 ± 0.10) g,均显著低于前者($P<0.05$)(图 5A)。3 只阴性对照组皮下瘤中 C3G 的相对表达量为(1.01 ± 0.18),而 3 只 C3G 干扰组皮下瘤 C3G 的相对表达量为(0.28 ± 0.15),显著低于前者($P<0.05$)(图 5B)。



A:皮下移植瘤;B:移植瘤 C3G 表达 1 ~ 3:阴性对照组;4 ~ 6:C3G 干扰组

图 5 干扰 C3G 表达后裸鼠皮下移植瘤生长变化及皮下瘤 C3G 的表达

3 讨论

信号结合物蛋白 Crk(CT10 regulated kinase)是 1988 年从禽类肉瘤病毒 CTIO(chicken tumor 10)中发现的癌基因[13],被发现在肺癌和脑部肿瘤等多种恶性肿瘤中过度表达。Crk 下游主要介导 C3G/Rap1 和 DOCK180/Rac1 两条信号通路,C3G 和 DOCK180 分别是小分子 GTP 酶 Rap1 和 Rac1 的鸟嘌呤核苷转换因子。本课题组前期研究已证实 Crk/DOCK180/Rac1 信号通路在卵巢癌细胞恶性浸润中的促进作用[14]。值得注意的是,干扰 SKOV3 细胞中 DOCK180 的表达后,Crk 的下游另 1 个结合蛋白 C3G 的表达及 Rap1 酶活性均出现上调[14],提示这 2 条信号通路可能存在相互作用。目前 Crk/C3G/Rap1 信号路径在卵巢癌中的作用国内外均未见报道。本研究发现 C3G 在绝大多数上皮性卵巢癌组织中高表达;siRNA 干扰其在 SKOV3 细胞中表达后,细胞增殖、克隆形成及抑制瘤的生长均出现显著下降,提示其在卵巢癌细胞增殖中起重要作用,抑制肿瘤组织里 C3G 的表达有可能抑制其增殖,从而遏制肿瘤的发生和发展。

C3G 在不同的恶性肿瘤里呈现并不一致的表达。Hirata 等[6]发现在非小细胞肺癌中组织中 C3G 的表达较非癌组织明显增强。Radha 等[10]发现 C3G 表达在神经细胞瘤分化过程中增加。Okino 等[12]发现在宫颈鳞状细胞癌组织中,C3G 呈过度甲基化,而甲基化可以在转录水平上抑制 C3G 基因的表达。本课题组前期研究发现卵巢癌组织中 C3G 和 DOCK 呈现相反状态,大部分(7/12)DOCK 表达增强的病例中 C3G 表

达偏低[15]。本研究进一步检测了40例卵巢癌标本中C3G的表达,发现与卵巢良性肿瘤及正常卵巢组织相比,72.5%的标本可见C3G过表达,平均相对表达量也高于后二者,提示C3G在卵巢癌的发生、发展中可能起一定作用。

研究提示C3G在不同的细胞里对细胞增殖的作用可能截然不同[16]。组成性激活果蝇细胞膜部位的C3G可以激活Ras-MAKP和Rap1,从而导致细胞的过度增殖[17]。在人造血祖细胞里表达靶向到胞膜的C3G后,CD4/CD8双阳性的T细胞显著增加,这些克隆细胞导致了急性T淋巴细胞性白血病在许多重要脏器的转移[18]。而在人宫颈鳞癌SIHA细胞中,下调C3G的表达水平后的细胞增殖水平增加[12]。在人神经母细胞瘤细胞IMR-32里短暂表达C3G后,p21阳性细胞由13.6%升至57%[10],p21是细胞分裂抑制因子,这表明C3G在IMR-32细胞增殖里起着负性调控作用。为明确C3G在卵巢癌SKOV3细胞增殖中的作用,本研究运用siRNA技术干扰C3G的表达后,MTT和平板克隆实验结果提示细胞增殖潜能明显受抑,提示C3G在维持卵巢癌细胞增殖中扮演重要角色。体内实验也发现随着C3G的表达下降,裸鼠皮下移植瘤的生长也明显受挫,与体外实验结果相符,共同说明C3G在卵巢癌SKOV3细胞增殖、生长中具有重要作用。

细胞的异常增殖是肿瘤发生和演进的基础,研究肿瘤细胞增殖的分子机制、寻找其特异性靶标也是世界范围内抗肿瘤药物研究的基础和焦点。本研究发现下调SKOV3细胞里C3G的表达能显著抑制其增殖及异种移植瘤的生长,提示C3G有可能作为新的抗肿瘤药物的作用靶点,抑制其表达有可能遏制肿瘤的发生及演进,从而为卵巢癌的治疗提供新的思路。

综上所述,C3G在绝大多数卵巢癌组织中过表达。在卵巢癌SKOV3细胞中,干扰C3G的表达导致细胞增殖水平和克隆形成率及裸鼠异种移植瘤生长显著受抑。这些结果提示C3G在卵巢癌SKOV3细胞增殖中具有重要作用,其具体分子机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Bos J L, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins[J]. Cell, 2007, 129(5): 865-877.

[2] Knudsen B S, Feller S M, Hanafusa H. Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk[J]. J Biol Chem, 1994, 269(52): 32781-32787.

[3] Tanaka S, Morishita T, Hashimoto Y, *et al*. C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(8): 3443-3447.

[4] Gotoh T, Hattori S, Nakamura S, *et al*. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(12): 6746-6753.

[5] De-Falco V, Castellone M D, De-Vita G, *et al*. RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic signaling through the Rap1 small GTPase[J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 381-390.

[6] Hirata T, Nagai H, Koizumi K, *et al*. Amplification, up-regulation and over-expression of C3G (CRK SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor) in non-small cell lung cancers[J]. J Hum Genet, 2004, 49(6): 290-295.

[7] Oda A, Miyakawa Y, Druker B J, *et al*. Crkl is constitutively tyrosine phosphorylated in platelets from chronic myelogenous leukemia patients and inducibly phosphorylated in normal platelets stimulated by thrombopoietin[J]. Blood, 1996, 88(11): 4304-4313.

[8] Cho Y J, Hemmeryckx B, Groffen J, *et al*. Interaction of Bcr/Abl with C3G, an exchange factor for the small GTPase Rap1, through the adapter protein Crkl[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333(4): 1276-1283.

[9] ten-Hoeve J, Arlinghaus R B, Guo J Q, *et al*. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia + leukemia[J]. Blood, 1994, 84(6): 1731-1736.

[10] Radha V, Rajanna A, Gupta R K, *et al*. The guanine nucleotide exchange factor, C3G regulates differentiation and survival of human neuroblastoma cells[J]. J Neurochem, 2008, 107(5): 1424-1435.

[11] Petit V, Boyer B, Lentz D, *et al*. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells[J]. J Cell Biol, 2000, 148(5): 957-970.

[12] Okino K, Nagai H, Nakayama H, *et al*. Inactivation of Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor (C3G) in cervical squamous cell carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2006, 16(2): 763-771.

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

[14] Wang H, Linghu H, Wang J, *et al*. The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SK-OV3[J]. Tumour Biol, 2010, 31(1): 59-67.

[15] 高一萌, 张瑜, 李文燕, 等. C3G/Rap1和Dock180/Rac1信号通路在卵巢癌浸润中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(11): 1031-1034.

[16] Radha V, Mitra A, Dayma K, *et al*. Signalling to actin: role of C3G, a multitasking guanine-nucleotide-exchange factor[J]. Biosci Rep, 2011, 31(4): 231-244.

[17] Ishimaru S, Williams R, Clark E, *et al*. Activation of the Drosophila C3G leads to cell fate changes and overproliferation during development, mediated by the RAS-MAPK pathway and RAP1[J]. EMBO J, 1999, 18(1): 145-155.

[18] Wang S F, Aoki M, Nakashima Y, *et al*. Development of Notch-dependent T-cell leukemia by deregulated Rap1 signaling[J]. Blood, 2008, 111(5): 2878-2886.

(**收稿**:2012-12-25;**修回**:2013-01-21)

(编辑 吴培红)