DOI:10.16016/j.1000-5404.201412219

论著

Rap1 酶激动剂 C3G 对Ⅰ型卵巢癌细胞增殖和侵袭的影响

李雪梅,罗淑娟,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 Rap1 酶激动剂鸟苷酸交换因子(Crk SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor,C3G)对Ⅰ型卵巢癌恶性增殖及侵袭能力的影响。**方法** Western blot 分别检测Ⅰ型和Ⅱ型人卵巢癌组织中 C3G 蛋白的表达水平;利用Ⅰ型卵巢癌细胞株 OVAR3,构建外源性过表达 C3G 蛋白的细胞株,通过 MTT、平板克隆、流式细胞学实验检测细胞的增殖和凋亡情况;Transwell 检测细胞迁移、侵袭能力;Western blot 检测细胞 MMP-2、MMP-9 的表达。**结果** Ⅰ型卵巢癌组织中 C3G 表达(0.377 6±0.083 1)与良性卵巢肿瘤(0.351 1±0.071 3)及正常对照类似,明显低于Ⅱ型卵巢癌组织[(0.873 5±0.174 6),$P<0.05$]。低转移潜能卵巢癌细胞株 OVAR3 在外源表达 C3G 后表现出增殖减慢($P<0.05$,$P<0.01$),凋亡增加($P<0.05$),但迁移和侵袭能力增强($P<0.05$),MMP-2、MMP-9 表达增高($P<0.05$)。**结论** C3G 蛋白有抑制增殖和促进侵袭作用,其在Ⅰ型卵巢癌组织中的低表达与其低转移潜能和膨胀型生长模式相关。

[关键词] Ⅰ型卵巢癌;OVCAR3;C3G;增殖;侵袭
[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.31 [文献标志码] A

Effect of Rap1 activator C3G on proliferation and invasion in type Ⅰ ovarian cancer cells

Li Xuemei, Luo Shujuan, Che Yaling, Linghu Hua (Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of guanine nucleotide exchange factor Crk SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor (C3G) on malignant proliferation and invasion of type Ⅰ ovarian cancer. **Methods** C3G expression in 6 samples of type Ⅰ and 43 samples of Ⅱ ovarian cancer tissues was detected by Western blotting. Exogenous C3G was transferred into type Ⅰ ovarian cancer cell line OVCAR3, and MTT assay, plate clone assay and flow cytometry were performed to analyze cell proliferation and apoptosis. Transwell chamber assay was adopted to evaluate cell invasion and migration. MMP-2 and MMP-9 expressions were examined by Western blotting. **Results** C3G expression in type Ⅰ ovarian cancer tissues (0.377 6±0.083 1) was similar to that in benign tumor tissues (0.351 1±0.071 3) and normal controls (0.336 2±0.073 9), but was lower than that in type Ⅱ ovarian cancer tissues (0.873 5±0.174 6, $P<0.05$). After C3G was over-expressed in the OVAR3 cells, cell proliferation was inhibited ($P<0.05$), and cell apoptosis was increased ($P<0.05$). Meanwhile the migration and invasion capacity was enhanced ($P<0.05$), and the expression of MMP-2 and MMP-9 was up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion** C3G can inhibit proliferation and promote invasion in OVCAR3 cells, and its low expression in type Ⅰ ovarian cancer is associated with swelling growth and low metastatic potential.

[**Key words**] type Ⅰ ovarian cancer; OVCAR3 cells; C3G; proliferation; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81072120) and the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-007). Corresponding author: Linghu Hua, E-mail: linghu_hua@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072120);重庆市卫生局重点项目(2012-1-007)
[通信作者] 令狐华,E-mail:linghu_hua@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150410.1506.013.html(2015-04-10)

从生存获益程度和经济成本效价比来看,只有精准的有的放矢的靶向治疗才可能达到事半功倍的治疗效能。卵巢癌是一组具有不同分子亚型的恶性肿瘤,具有多靶点作用[1],找到不同分子亚型的特定靶点才是关键。以组织类型和临床表现模式为基础的二元理论将卵巢癌进行重新分型是最近对卵巢癌认识的突出进展[2]。该二元模式将卵巢癌分为Ⅰ型和Ⅱ型,二者分别具有不同的侵袭和增殖潜能。因此,针对不同类型的卵巢癌合理选择手术及放化疗的时机至关重要。本课题组前期研究发现,Rap1 酶激动剂鸟苷酸交换因子(Crk SH3-domain-binding guanine nucleotide-releasing factor,C3G)促进Ⅱ型卵巢癌细胞的增殖和转移,但其在Ⅰ型卵巢癌中的作用尚不明确。因此,本研究旨在通过探讨 C3G 在低转移潜能的卵巢癌(Ⅰ型卵巢癌)中的作用,从而为个体化治疗卵巢癌提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与组织标本 人卵巢癌细胞株 OVCAR3 购自广州弗尔博生物科技有限公司。人卵巢癌组织来自重庆医科大学附属第一医院妇产科 2012 年 6 月至 2014 年 2 月手术切除的标本,其中正常卵巢组织及良性卵巢肿瘤共 7 例;Ⅱ型卵巢癌 43 例(中-低分化浆液性腺癌);Ⅰ型卵巢癌 6 例(透明细胞癌 2 例,子宫内膜样腺癌 4 例)。

1.1.2 主要试剂 PCXN2-Flag、PCXN2-Flag-C3G PBabe-puro 质粒均由日本北海道大学分子细胞病理教研室惠赠并在前期实验中验证[3],质粒提取盒购自 Omega Bio-Tek 公司,RPMI1640 为 Sigma 公司产品,胎牛血清购自康源生物公司,转染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,Western blot 试剂盒购自碧云天公司,兔抗 C3G 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,鼠抗 β-actin 单克隆抗体购自江苏碧云天公司,兔抗 MMP-2 多克隆抗体购自博士德公司,抗兔 MMP-9 多克隆抗体购自 Abcam 公司,Transwell 小室购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 OVCAR3 细胞的培养、质粒转染及稳定株筛选 OVCAR3 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,置于含 5% CO_2,37 ℃的培养箱中培养。用空白试剂、阴性对照质粒及 C3G 过表达质粒分别转染 OVCAR3 细胞,嘌呤霉素筛选出稳定株,将细胞分成 3 组:野生型组(WT)、阴性对照组(NT)、外源性 C3G 表达组(C3G)。

1.2.2 Western blot 检测 细胞及卵巢癌组织均用含 RIPA 的蛋白裂解液提取蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 膜电转,BSA 封闭液封闭,特异性抗体孵育,ECL 显影,Quantity One 软件进行条带灰度值分析,即目的条带值与 β-actin 的比值。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖率 分别取对数期生长的细胞,按 1×10^3 个/孔种于 96 孔板中,于 5% CO_2,37 ℃培养箱中生长,并在 0、1、2、3、4、5、6、7 d 加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL/孔,培养 4 d 后检测 570 nm 波长处的光密度值[$D(570)$],并绘制生长曲线。

1.2.4 平板克隆形成实验 按每孔 200 个细胞种于 24 孔板中,培养 14 d,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色,显微镜下计数克隆团(细胞数 >50 个)。克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 ×100%,实验重复 3 次。

1.2.5 细胞迁移和侵袭实验

1.2.5.1 细胞迁移实验 取 Transwell 小室,接种 2×10^5 个细胞,上室含 400 μL 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养基,24 孔板下室含 600 μL 同样培养基,培养箱培养 12 h,取出小室,甲醛固定,结晶紫染色,中性树脂封片,显微镜下计数,实验重复 3 次。

1.2.5.2 细胞侵袭实验 与迁移实验类似,预先在 Transwell 小室内包被 Matrigel 基质胶 40 μL,细胞接种数为 1×10^5 个,孵育 25 h。

1.3 统计学分析

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

2 结果

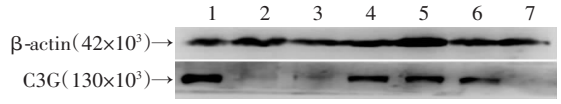
2.1 Ⅰ型和Ⅱ型卵巢癌组织中 C3G 的表达

通过 Western blot 检测,在Ⅱ型卵巢癌、Ⅰ型卵巢癌、良性肿瘤、正常组织中 C3G 的相对表达量分别为(0.873 5 ± 0.174 6)、(0.377 6 ± 0.083 1)、(0.351 1 ± 0.071 3)、(0.336 2 ± 0.0739 2),结果见图 1。与正常组织和良性肿瘤相比,在Ⅱ型卵巢癌组织中 C3G 表达增加明显($P<0.05$);而在Ⅰ型卵巢癌组织中表达增加不明显($P>0.05$);Ⅰ、Ⅱ型卵巢癌组织中 C3G 表达有明显差异($P<0.05$)。

2.2 外源性过表达 C3G 对卵巢癌细胞 OVAR3 增殖、凋亡的影响

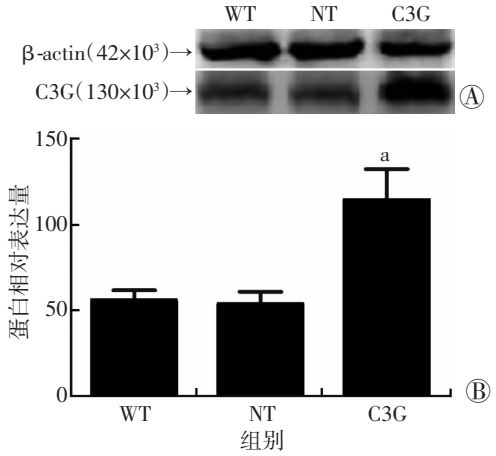
首先对转染并筛选出稳定表达 C3G 蛋白的

OVCAR3 细胞株进行 Western blot 检测结果显示，与野生型和阴性对照组相比，外源性 C3G 表达组的 C3G 蛋白表达明显上调（$P<0.05$，图 2）。



1、4～6：Ⅱ型卵巢癌组织；2：正常组织；3、7：Ⅰ型卵巢癌组织

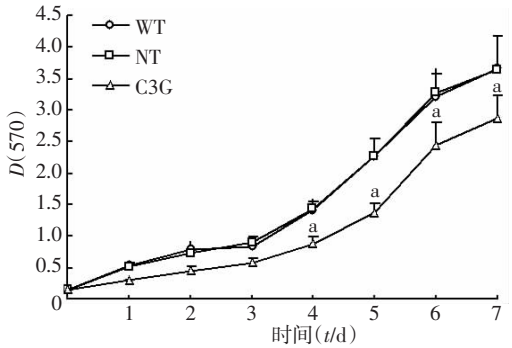
图 1　Western blot 检测卵巢癌组织中 C3G 表达水平



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与 WT 和 NT 比较

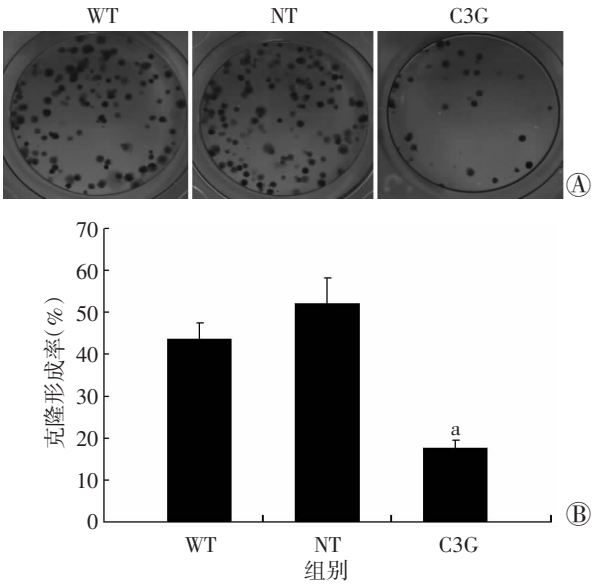
图 2　OVCAR3 细胞转染 C3G 表达情况

MTT 检测细胞增殖结果显示，与野生型组和阴性对照组比较，外源性 C3G 表达组的细胞株增殖能力明显降低（$P<0.05$，图 3）。平板克隆实验结果显示，与野生型、阴性对照组相比，外源性 C3G 表达组的克隆形成能力明显降低（$P<0.01$，图 4）。流式细胞检测结果显示，与阴性对照组（8.04 ± 0.71）% 相比，外源性 C3G 表达组（17.76 ± 2.39）% 的凋亡率增加（$P<0.05$，图 5）。



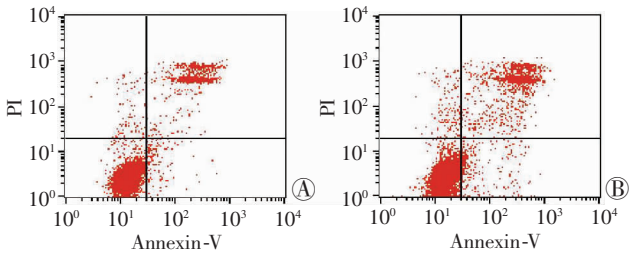
a：$P<0.05$，与 WT 和 NT 比较

图 3　外源性过表达 C3G 抑制 OVCAR3 细胞增殖的细胞生长曲线



A：形态学观察；B：定量分析克隆形成率　a：$P<0.01$，与 WT 和 NT 比较

图 4　平板克隆形成实验



A：阴性对照组；B：外源性 C3G 表达组

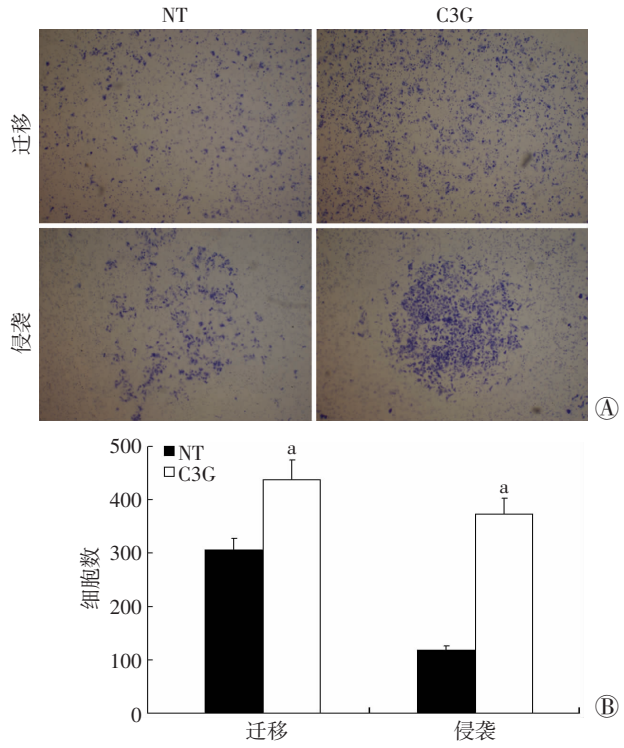
图 5　流式细胞检测外源性过表达 C3G 促进 OVCAR3 细胞凋亡

2.3　外源性 C3G 对卵巢癌细胞 OVAR3 浸润能力的影响

细胞迁移实验结果显示，与阴性对照组相比，外源性 C3G 表达组进入微孔膜内的细胞数较多（$P<0.05$）。同样在细胞侵袭实验中，外源表达 C3G 细胞破坏 Matrigel 基质胶进入膜内的数目较多（$P<0.05$，图 6）。

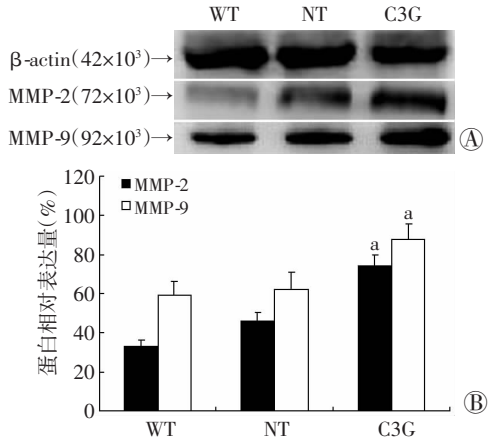
2.4　外源性 C3G 对卵巢癌细胞 OVAR3 MMP 表达的影响

Western blot 检测结果显示，与野生型和阴性对照组相比，外源性 C3G 表达组的 MMP-2、MMP-9 蛋白表达上调（图 7）。由此提示，在 OVCAR3 细胞株中上调 C3G 蛋白的表达，能够促进细胞的迁移和侵袭能力，可能与 MMP-2、MMP-9 蛋白的分泌增加有关。



A:OVCAR3 细胞迁移实验和侵袭实验(×100);B:定量分析结果 a:$P<0.05$,与 NT 比较

图6 外源性表达 C3G 促进 OVAR3 迁移和侵袭



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,分别与 WT 和 NT 比较

图7 Western blot 检测 OVCAR3 细胞中蛋白的表达

3 讨论

卵巢癌研究进展最突出的表现是在以二元模式对上皮性卵巢癌依据重新进行分型,即依据组织学类型和临床恶性行为将卵巢癌分为Ⅰ型卵巢癌和Ⅱ型卵巢癌。相对以低分化浆乳癌为代表的Ⅱ型卵巢癌,Ⅰ型卵巢癌常可较早被诊断,惰性进展,但化疗相对不敏感[2,4],临床上Ⅰ型卵巢癌由于化疗抵抗进而复发转移导致治疗失败并非少见。因此,明确调控Ⅰ型和Ⅱ型卵巢癌不同进展的机制,实现个体化治疗,是未来卵巢恶性肿瘤治疗的新方向。

C3G 蛋白能够通过细胞外信号的调节参与多种细胞功能[5-6]。如调节肌动蛋白微丝骨架的重塑;通过 Ras-MAPK 通路促进血液细胞增殖;通过激活 Hck 蛋白能够促进多种细胞凋亡;通过整合素信号通路活化 Rap-GTP,促进多种肿瘤细胞粘附、迁移[7-9]。我们曾对同为接头蛋白 Crk 的下游信号蛋白的 C3G/Rap1 及 Dock180/Rac1 的组织细胞内表达及分布进行比较,推测 C3G/Rap1 在卵巢癌中具有抑癌基因功能[10],但预实验结果显示其在Ⅱ型卵巢癌细胞 SKOV3 及 HEY 中有促增殖、促侵袭功能[11]。本研究旨在通过检测 C3G 在Ⅰ型和Ⅱ型卵巢癌组织是否具有区别表达,以及外源强制表达对低转移潜能的Ⅰ型卵巢癌细胞株 OVCAR3 恶性增殖和侵袭潜能的影响,反向验证 C3G 的功能。

本研究表明,C3G 蛋白在Ⅰ型和Ⅱ型卵巢癌中表达差异明显。由于Ⅰ型卵巢癌进展缓慢,呈惰性,即由良性的囊腺瘤逐渐发展为不典型增生或交界性肿瘤,直至最终发展为侵袭性肿瘤[12]。相反Ⅱ型卵巢癌由于基因不稳定,常伴有 TP53 突变、甲基化或 BRCA 基因的功能失活,具有更强的侵袭性[2]。本研究发现与正常及良性肿瘤表达类似,Ⅰ型卵巢癌中 C3G 呈低表达状态,提示与临床观察到的Ⅰ型卵巢癌的低度侵袭潜能可能存在相关性。因此,在接下来的研究中将通过与临床分期、分型以及患者疗效及预后的分析,探讨 C3G 能否作为预测卵巢癌预后的一项指标。

为了明确其在Ⅰ型卵巢癌中的作用,本研究通过筛选具有低恶性潜能的粘液性腺癌细胞株 OVCAR3[13-14],质粒外源性增加 C3G 在其中的表达,发现 C3G 表达可引起细胞增殖、克隆形成均出现明显下降,细胞凋亡也明显增加。Dayma 等[15]发现,C3G 蛋白能够促进 β-catenin 降解,使其在胞核内聚集减少,负性调节 Wnt/β-catenin 通路,参与抑制肿瘤细胞增殖。因此,在Ⅰ型卵巢癌中,C3G 蛋白的低表达可能使 Wnt 通路激活而引起肿瘤细胞增殖活性增加。

MMP 是一类通过降解细胞外基质,参与肿瘤细胞浸润、转移的蛋白水解酶[16]。其中 MMP-2、MMP-9 是该家族中极其重要的成员,在卵巢恶性肿瘤进展中,能通过重塑肿瘤微环境,促进癌细胞向周围组织粘附、侵袭以及转移[17]。Guvakova 等[18]发现通过 IGF-IR-C3G 通路中激活 Rap1 能够促进上皮细胞运动。Liu 等[19]的研究中发现 MMP 的分泌主要是通过 Ras-MEK1 通

路激活,而C3G-JNK通路在这个过程中并无影响。而我们最近的研究发现,在浆液性卵巢癌中通过C3G/Rap1通路,激活Rap1活性,促进MMP-2、MMP-9的分泌,增强细胞的浸润能力[20]。本实验结果显示,外源性表达C3G后,MMP-2、MMP-9的表达升高,并且在细胞表型实验中也发现其迁移和浸润能力增强。这表明Ⅰ型卵巢癌的低转移潜能可能是由于C3G蛋白的低表达减少了MMP-2和MMP-9的分泌而抑制侵袭和迁移的结果。

因此,我们推测在Ⅰ型卵巢癌中,C3G表达降低减弱了对β-catenin的降解,进而激活Wnt/β-catenin通路,促进肿瘤细胞的增殖;同时,C3G的降低减少了MMP-2和MMP-9的分泌,抑制了肿瘤细胞的转移。这与临床所观察到的现象是吻合的,即Ⅰ型卵巢癌在被诊断时常常呈现出生长巨大的肿瘤包块,而极少转移的现象[21]。结合在Ⅱ型卵巢癌细胞中的发现,即C3G对高级别浆液性卵巢癌恶性侵袭性行为的促进作用,我们预测基于癌基因C3G的靶向治疗可能会有利于肿瘤浸润能力的逆转,但必须联合手术才能达到清除肿瘤的目的。不过C3G过表达对低度恶性潜能的卵巢癌细胞的增殖抑制作用原因还不完全清楚,是否提示Ⅰ型卵巢癌中的肿瘤生长可能有其他因素调控,尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Christie M, Oehler M K. Molecular pathology of epithelial ovarian cancer[J]. J Br Menopause Soc, 2006, 12(2): 57-63.

[2] Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type Ⅰ and type Ⅱ[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 934261.

[3] 张旭, 李刚. 鸟苷酸交换因子C3G对心肌细胞生存力的影响及其可能机制[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(11): 1172-1177.

[4] Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis[J]. Am J Pathol, 2010, 177(3): 1053-1064.

[5] Chrzanowska-Wodnicka M. Regulation of angiogenesis by a small GTPase Rap1[J]. Vascul Pharmacol, 2010, 53(1/2): 1-10.

[6] 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.

[7] Birukova A A, Tian X, Tian Y, *et al*. Rap-afadin axis in control of Rho signaling and endothelial barrier recovery[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(17): 2678-2688.

[8] Maia V, Ortiz-Rivero S, Sanz M, *et al*. C3G forms complexes with Bcr-Abl and p38α MAPK at the focal adhesions in chronic myeloid leukemia cells: implication in the regulation of leukemic cell adhesion[J]. Cell Commun Signal, 2013, 11(1): 9.

[9] Kloog Y, Mor A. Cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 receptor signaling for lymphocyte adhesion is mediated by C3G and Rap1[J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(6): 978-988.

[10] 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.

[11] 罗淑娟, 车亚玲, 彭慧娟, 等. C3G在卵巢癌组织中的表达及其在SKOV3细胞增殖中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(14): 1471-1479.

[12] Kurman R J, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm[J]. Hum Pathol, 2011, 42(7): 918-931.

[13] Hills CA, Kelland LR, Abel G, *et al*. Biological properties of ten human ovarian carcinoma cell lines: calibration *in vitro* against four platinum complexes[J]. Br J Cancer, 1989, 59(4): 527-534.

[14] Chen H, Wu X, Pan Z K, *et al*. Integrity of SOS1/EPS8/ABI1 tri-complex determines ovarian cancer metastasis[J] Cancer Res, 2010, 70(23): 9979-9990.

[15] Dayma K, Ramadhas A, Sasikumar K, *et al*. Reciprocal negative regulation between the guanine nucleotide exchange factor C3G and β-catenin[J]. Genes Cancer 2012, 3(9/10): 564-577.

[16] Lutgendorf S K, Lamkin D M, Jennings N B, *et al*. Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21): 6839-6846.

[17] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. Cell, 2010, 141(1): 52-67.

[18] Guvakova M A, Lee W S, Furstenau D K, *et al*. The small GTPase Rap1 promotes cell movement rather than stabilizes adhesion in epithelial cells responding to insulin-like growth factor Ⅰ[J]. Biochem J, 2014, 463(2): 257-270.

[19] Liu E, Thant A A, Kikkawa F, *et al*. The Ras-mitogen-activated protein kinase pathway is critical for the activation of matrix metalloproteinase secretion and the invasiveness in v-crk-transformed 3Y1[J]. Cancer Res, 2000, 60(9): 2361-2364.

[20] Che Y L, Luo S J, Li G, *et al*. The C3G/Rap1 pathway promotes secretion of MMP-2 and MMP-9 and is involved in serous ovarian cancer metastasis[J]. Cancer Lett, 2015, 359(2): 241-249.

[21] Brown P O, Palmer C. The preclinical natural history of serous ovarian cancer: defining the target for early detection[J]. PLoS Med, 2009, 6(7): e1000114.

(**收稿**:2014-12-13;**修回**:2015-01-30)

(编辑 吴培红)