

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.006

FAP 和 Rho 家族蛋白在卵巢癌侵袭迁移中的作用*

张健¹ 刘洪羽² 杨薇薇¹ 李春红¹ 郑芳¹
蒋淑婉¹ 李云¹ 刘端阳¹ 曲雪梅¹ 陈鹤^{1△}

(1 哈尔滨医科大学病理教研室 黑龙江 哈尔滨 150081; 2 齐齐哈尔市第一医院病理科 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要 目的:明确 FAP 是否通过 RhoA/ROCK、Rac1-GTP 通路发挥促增殖、侵袭和迁移作用。**方法:**用 MTT 实验, Transwell 实验和迁移实验检测 FAP、RhoA/ROCK、Rac1-GTP 对卵巢癌细胞系 HO-8910PM 的增殖、侵袭和迁移的影响。**结果:**1、MTT 法, 迁移和侵袭实验证实 Y-27632 抑制 RhoA/ROCK 途径能够促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 与 FAP 联合作用时促进作用增强。2、MTT 法, 迁移和侵袭实验证实 NSC23766 抑制 Rac1 途径能够抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 与 FAP 联合作用使 FAP 的促进作用减弱。**结论:**1、RhoA/ROCK 通路抑制 HO-8910PM 细胞增殖、迁移和侵袭; Rac1-GTP 促进 HO-8910PM 细胞增殖、迁移和侵袭。2、FAP 不是通过 RhoA/ROCK 而是通过 Rac1-GTP 信号通路在 HO-8910PM 细胞发挥促增殖、迁移和侵袭作用的。

关键词:成纤维细胞激活蛋白; 肿瘤转移; 卵巢癌细胞系 HO-8910PM; RhoA/ROCK; Rac1-GTP

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)04-624-04

FAP and Rho-GTPases on the Invasion and Metastasis of Ovarian Cancer*

ZHANG Jian¹, LIU Hong-yu², YANG Wei-wei¹, LI Chun-hong¹,

ZHENG Fang¹, JIANG Shu-wang¹, LI Yun¹, LIU Duan-yang¹, QU Xue-mei¹, CHEN He^{1△}

(1 Department of Pathology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China;

2 Department of Pathology, the first hospital of Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang, 161006, China)

ABSTRACT Objective: To determine whether the FAP promotes the ability of proliferation, invasion and migration of HO-8910PM cells by the RhoA/ROCK, Rac1-GTP enzymes. **Methods:** by detection of FAP using the transwell assay, MTT assay and migration assay, RhoA / ROCK, Rac1-GTP on ovarian cancer cell line HO-8910PM proliferation, invasion and migration. **Results:** 1, MTT, migration and invasion experiments confirmed with Y-27632 inhibited RhoA / ROCK pathway can promote ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion, FAP facilitating role was enhanced when combined with Y-27632. 2, MTT method, migration and invasion experiments confirmed NSC23766 inhibited Rac1 pathway to inhibit ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion, the promoting role of FAP was weakened when combined with NSC23766. **Conclusions:** 1. RhoA / ROCK pathway inhibition of HO-8910PM cell proliferation, migration and invasion; Rac1-GTP promote HO-8910PM cell proliferation, migration and invasion. 2. not by RhoA/ ROCK but Rac1-GTP signaling pathway, FAP plays a role in HO-8910PM cells proliferation, migration and invasion.

Key words: Fibroblast activation protein (FAP); Metastasis and invasion; Ovarian cancer cell line; HO-8910PM; RhoA/ROCK; Rac1-GTP

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-624-04

前言

肿瘤发生转移和侵袭是恶性肿瘤死亡率高的主要原因, 明确肿瘤转移机制并加以控制, 是目前肿瘤研究的难点。成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)作为一种丝氨酸蛋白酶, 可以水解基质中许多底物、降解 ECM, 利于肿瘤细胞从原发部位脱离, 从而促进肿瘤的侵袭和转移。

Rho 属于小分子 G 蛋白超家族, 具有 GTP 酶活性, 因此被称为 Rho-GTP 酶。Rho 蛋白根据其序列和功能的相似性可分

为 6 个不同的亚家族分别为 Rho 蛋白 (包括 RhoA、RhoB 和 RhoC)、Rac 蛋白 (包括 Rac1、Rac2、Rac3 和 RhoG)、Cdc42 相似蛋白 (包括 Cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Chp)、Rnd 蛋白(Rnd1, Rnd2)。Rho GTP 酶尤其是 RhoA、Rac1 和 Cdc42 是关键的调控因子, 主要参与对细胞形态改变, 细胞与基质粘附及细胞骨架重组的调控, 调节肿瘤细胞的侵袭转移过程^[1]。

Y-27632 是最常应用的 Rho 激酶(ROCK)抑制剂, 被广泛应用于研究 Rho 激酶在许多系统中的作用, 包括血小板激活、创伤愈合和肿瘤细胞的浸润等^[2]。

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D201049)

作者简介: 张健(1983-), 女, 研究生, 研究方向: 肿瘤转移和侵袭

△ 通讯作者: 陈鹤, 电话: 18245161892, E-mail: chenhe_2008@aliyun.com

(收稿日期: 2013-08-18 接受日期: 2013-09-10)

NSC23766 是一种具有可溶性和膜渗透性的化合物,通过 Rac1 特异性的鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEFs) TrioN 和 Tiam1 抑制 Rac1 活性,但对 Cdc42 或 RhoA 的活性没有影响。在成纤维细胞中 NSC23766 抑制 Rac1 GTP 结合而不影响 Cdc42 或 RhoA 活性^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

高转移性卵巢癌细胞系 HO-8910PM (中科院上海生物科学研究所细胞库) (美国 Sigma 公司) NSC23766 (德国 BIOTREND 公司) Y-27632 (德国 BIOTREND 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Transwell 细胞侵袭实验 将 Matrigel 基质胶按 1:8 稀释铺在 transwell 小室上面,放入孵箱内平衡 5 h。HO-8910PM 细胞消化,每个孔加入 170 μ L (细胞上室),向 transwell 下室加入 800 μ L 10% FBS RPMI 1640 完全培养基。在 transwell 上室每组加入 FAP α 蛋白、Y-27632/NSC23766 使最后细胞上室液体 FAP α 蛋白、Y-27632/NSC23766 终浓度分别为 (100 pmol/L、100 μ mol/L、50 μ mol/L、50 ng/mL), 孵育 48 h 后取膜固定,苏木素染色。用棉棒擦拭去小室上面未穿过的细胞。显微镜观察,统计结果。

1.2.2 Transwell 细胞侵迁移实验 除 Transwell 小室上室不铺

metrigel 基底胶外,其余方法同细胞侵袭实验。

1.2.3 增殖试验 在 96 孔板的各孔接种 HO-8910PM 细胞分别加入 (Control、Y-27632/NSC23766、FAP α 、FAP α +Y-27632/FAP α +NSC23766), 每组设 5 个复孔。处理后的 48 h 内,每隔 12 h 用 MTT 法检测细胞的活性,在酶联免疫检测仪的 OD490nm 处测量各孔的吸光值。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。根据方差齐性与否分别用参数检验和非参数检验。单因素多均数比较采用方差分析 (ANOVA)。P<0.05 为差异有统计学意义, P<0.001 有显著差异。

2 结果

2.1 不同浓度 Y-27632 对 HO-8910PM 细胞侵袭作用

如图 1-2, 在 transwell 小室上室接种 HO-8910PM 细胞后, 分别给予不同浓度的 Y-27632 (0, 10 μ mol/L, 30 μ mol/L, 100 μ mol/L, 300 μ mol/L, 1000 μ mol/L) 孵育 48 h, 观察对卵巢癌细胞系 HO-8910PM 侵袭能力的影响。随着用药浓度的增加, 穿过的细胞明显增多, 在 100 μ mol/L (D) 时达到最大值 (P<0.001), 继续增加药物浓度, 药物浓度达到 300 μ mol/L (E)、1000 μ mol/L (F) 时穿过的细胞数并没有明显增加 (图 1-2)。

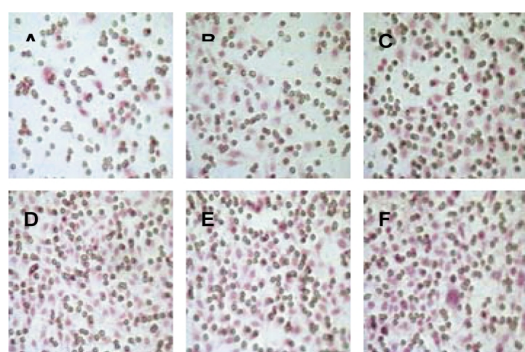


图 1-2 Y-27632 诱导 HO-8910PM 卵巢癌细胞系侵袭 (苏木素染色 $\times 200$)

(A-F Y-27632 浓度分别为 0, 10 μ mol/L, 30 μ mol/L, 100 μ mol/L, 300 μ mol/L, 1000 μ mol/L)

Fig.1-2 Effect of Y-27632 on invasion ability of HO-8910PM cells ($\times 200$) The concentrations of Y-27632 are 0, 10 μ mol/L, 30 μ mol/L, 100 μ mol/L, 300 μ mol/L, 1000 μ mol/L (A-F)

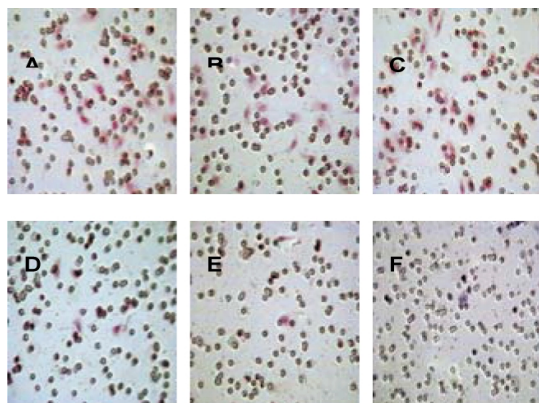
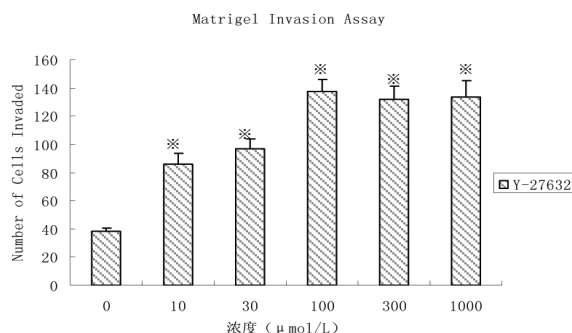
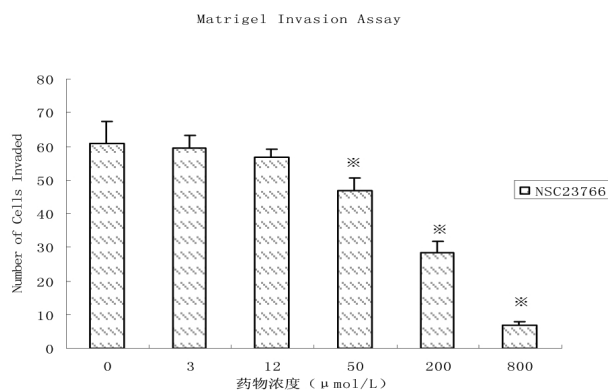


图 3-4 NSC23766 诱导 HO-8910PM 卵巢癌细胞系侵袭 (苏木素染色 $\times 200$)

(A-F NSC23766 浓度分别为 0, 3 μ mol/L, 12 μ mol/L, 50 μ mol/L, 200 μ mol/L, 800 μ mol/L)

Fig.3-4 Effect of NSC23766 on invasion ability of HO-8910PM cells ($\times 200$)

The concentrations of NSC23766 are 0, 3 μ mol/L, 12 μ mol/L, 50 μ mol/L, 200 μ mol/L, 800 μ mol/L (A-F)



2.2 不同浓度 NSC23766 对 HO-8910PM 细胞侵袭作用

如图 3-4, 在 transwell 小室上室接种 HO-8910PM 细胞后, 分别给予不同浓度的 NSC23766 (0, 3 $\mu\text{mol/L}$, 12 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$, 800 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 48h, 观察对卵巢癌细胞系 HO-8910PM 侵袭能力的影响。加入 3 $\mu\text{mol/L}$ 、12 $\mu\text{mol/L}$ NSC23766 穿过的细胞数量与对照相比略有减少, 但差别无统计学意义。加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 和 800 $\mu\text{mol/L}$ NSC23766 穿过的 HO-8910PM 细胞数量较对照组进一步减少, 差别有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 3-4)。

2.3 抑制剂 Y-27632、NSC23766 对 FAP α 功能的影响

实验分为 6 (control、Y-27632、NSC23766、FAP α 、FAP α +Y-

27632、FAP α +NSC23766) 对卵巢癌细胞系 HO-8910PM 进行作用。如图 2-5, Y-27632 (100 $\mu\text{mol/L}$) 能够促进 HO-8910PM 细胞的侵袭; NSC23766 (50 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 HO-8910PM 细胞的侵袭; FAP α 蛋白 (100 pmol/L) 诱导, 能够促进 HO-8910PM 细胞的侵袭。Y-27632 (100 $\mu\text{mol/L}$) 和 FAP α 蛋白 (100 pmol/L) 联合作用诱导, 穿过的 HO-8910PM 细胞数量最多 ($P < 0.05$); 加入 NSC23766 (50 $\mu\text{mol/L}$) 和 FAP α 蛋白 (100 pmol/L) 诱导, 图中穿过的 HO-8910PM 细胞数量比对照组和 NSC23766 单独作用组增多 ($P < 0.05$), 但较 FAP α 单独作用组穿过的细胞减少 (如图 5-6)。

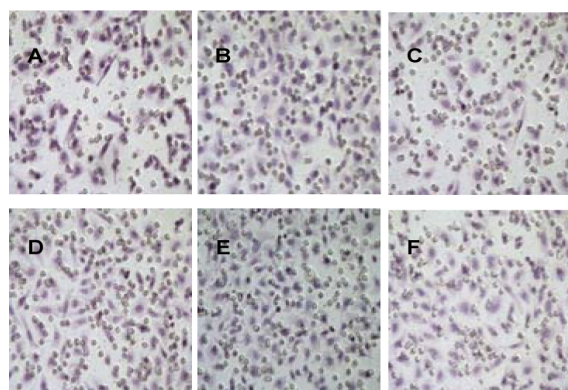
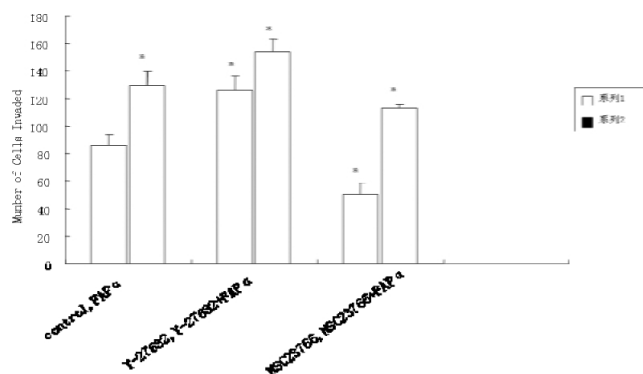


图 5-6 抑制剂 Y-27632、NSC23766 对 FAP α 功能的影响 $\times 200$

control(A)、Y-27632(B)、NSC23766(C)、FAP α (D)、FAP α +Y-27632(E)、FAP α +NSC23766(F)
Y-27632、NSC23766、FAP α 终浓度分别为 100 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、50 ng/mL、100 pmol/L

Fig.5-6 Effect of inhibitors Y-27632, NSC23766 on FAP α

The concentrations of Y-27632, NSC23766, FAP α are 100 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 50 ng/mL, 100 pmol/L



3 讨论

近年来,越来越多的研究表明,肿瘤的发生是肿瘤和微环境中的各种间质细胞相互转移的结果。大多数上皮来源的肿瘤的基质细胞以及他们释放的多种产物如转化生长因子- β 、细胞外基质成分和蛋白酶(特别是胶原蛋白和蛋白酶)参与肿瘤的生长、血管生成、侵袭和转移。FAP 也成为在一个在肿瘤微环境中活化的成纤维细胞的标志物^[47]可降解多种细胞外基质的多种成分,因而对肿瘤间质的形成,维持和重塑有着重要作用。陈鹤等^[48]证明 FAP 能够促进卵巢癌的增殖、侵袭和转移。在本实验中,我们也验证了当 FAP 单独作用时,促进卵巢癌细胞 HO-8910PM 的增殖、侵袭和转移。我们实验的目的是探究 FAP 与 RhoGTP 酶家族的关系。

Rho-GTP 酶是细胞内多条信号转导通路的关键分子,作为分子开关在胞内信号转导中发挥桥梁作用^[9]。Rho-GTP 酶主要参与对细胞形态改变,细胞与基质粘附及细胞骨架重组的调控,调节肿瘤细胞的侵袭转移过程^[10]。Christopher L. Hall^[11]人证实 I 型胶原信号可通过 RhoC-GTP 酶促进前列腺癌的侵袭。ROCK 是 RhoA 的下游效应分子,属于丝氨酸-苏氨酸激酶。ROCK 有两种亚型,分别为 ROCK-I (ROCK β) 和 ROCK-II (ROCK α), Y-27632 是其特异性的抑制因子,通过与 ROCK-I 和 ROCK-II 竞争 ATP 而发挥作用^[12]Rac1 通过调节片状伪足,

与 Rho A、cdc42 协调作用,可以调控血管形成过程中不同的形态改变。Rac 亚家族在细胞运动以及血管的生成中起着重要作用,这些作用对肿瘤的生存和转移非常重要^[13,14]。

在本实验中我们主要研究了 RhoA/ROCK 和 Rac1-GTP 途径。我们用 ROCK 特异性的抑制剂 Y27632 分析 RhoA/ROCK 通道对卵巢癌细胞 HO-8910PM 的影响。结果显示,给予 ROCK 特异性的抑制剂 Y27632 后,卵巢癌细胞 HO-8910PM 的增殖、侵袭和转移能力增强。Seema Grewal^[15]也证实抑制 Rho 激酶通道,可促进人类子宫内膜间质细胞(hESCs)的生存和侵袭能力。当 Y27632 与 FAP 联合作用时,促进作用更加明显,说明 FAP 不是通过 RhoA/ROCK 发挥作用的。

Rac1-GTP 酶对卵巢癌细胞 HO-8910PM 的作用的研究是通过其特异性的抑制剂 NSC23766 抑制其活性来完成的。我们发现给予 Rac1-GTP 酶抑制剂 NSC23766 后,明显抑制卵巢癌细胞 HO-8910PM 的增殖、侵袭和转移。与 FAP 联合作用时, FAP 的促进作用大大削弱。这给了我们一个提示, FAP 可能是通过 Rac1-GTP 途径而进一步发挥促进肿瘤侵袭和迁移的作用的。Salhia^[16]等发现, ROCK 抑制剂 Y-27632 作用于星状细胞瘤促进细胞运动和侵袭,这与激活 Rac1 有关。在多种细胞类型上已发现 RhoA 和 Rac1 之间存在复杂的信号平衡^[17]。经过 Y27632 处理的 Swiss 3T3 细胞 Rac1 的活性增强从而导致细胞的运动性增强。另外,拮抗 Rac1 活性的一种 ROCK 依赖性

的 RhoGAP 最近被确定^[18-20]持 RhoA 和 Rac1 之间相互对立的观念。RacGAP1 可能对 RhoA 和 Cdc42 和 Rac1^[21,22] 产生其 GAP 活性,并且这一活性发挥依赖于其磷酸化水平^[23]。相反,一些研究显示 RacGAP1 可以调节其自身功能而不依赖于 GAP 活性^[24]。

我们的研究证明了 FAP 通过 Rac1-GTP 途径对卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖、迁移和侵袭的作用。我们提出 Rac1-GTP 酶可作为卵巢癌潜在的治疗靶点。虽然 FAP 与 RhoA/ROCK 途径无关,但是它们对肿瘤的生长、侵袭和转移都有着重要的影响,因此,对它们进一步的研究可提供卵巢癌治疗的理论基础,以提高卵巢癌患者的生存率。

参考文献(References)

- [1] Burridge K, Wen erberg K. Rho and rac take center stage[J]. Cell, 2004, 116(2): 167-179
- [2] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension [J]. Nature, 1997, 389(6654): 990-994
- [3] Xu Shi-wen, Liu Shang-xi, Mark Eastwood, et al. Rac inhibition reverses the phenotype of fibrotic fibroblasts[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7-438
- [4] Henry LR, Lee HO, Lee JS. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(6): 1736-1741
- [5] Cohen SJ, Alpaugh RK, Palazzo I, et al. Fibroblast activation protein and its relationship to clinical outcome in pancreatic adenocarcinoma [J]. Pancreas, 2008, 37: 154-158
- [6] Goscinski MA, Suo Z, Flørenes VA, et al. FAP-alpha and uPA show different expression patterns in premalignant and malignant esophageal lesions[J]. Ultrastruct Pathol, 2008, 32: 89-96
- [7] Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, et al. Molecular cloning of fibroblast activation protein a, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A, 1994, 91: 5657-5661
- [8] He Chen, Wei-Wei Yang, Qiu-Ting Wen, et al. TGF- beta-induced fibroblast activation protein expression, fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM[J]. Exp Mol Pathol, 2009, 87(3): 189-194
- [9] 易龙. Rho 家族蛋白在肿瘤侵袭转移中作用 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(4): 492-494
Yi Long. The role of Rho-family on the invasion and metastasis of tumor[J]. Chin J Public Health, 2007, 23(4): 492-494
- [10] Klingauf M, Beck M, Berge U, et al. The tumour suppressor DiRas3 interacts with C-RAF and downregulates MEK activity to restrict cell migration[J]. Biol Biol Cell, 2013, 105(2): 91-107
- [11] Christopher L.Hall, Cara W, et al. Type I Collagen Receptor($\alpha 2\beta 1$) Signaling Promotes Prostate Cancer Invasion through RhoC GTPase [J]. Neoplasia, 2008, 10: 797-803
- [12] James K. Liao, Minoru Seto, Kensuke Noma. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors[J]. Cardiovasc Pharmacol, 2007, 50(1): 17-24
- [13] Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors[J]. Int J Cancer, 1999, 81(5): 682-687
- [14] Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, et al. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior[J]. J Cell Biol, 1999, 147(5): 1009-1022
- [15] Seema Grewal, Janet G. Carver, Anne J. Ridley, et al. Mardon Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration[J]. PNAS, 2008, 105(42): 16189-16194
- [16] Salhia B, Rutten F, Nakada M, et al. Inhibition of Rho-Kinase Affects Astrocytoma Morphology, Motility, and Invasion through Activation of Rac1[J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8792-8800
- [17] Burridge K, Wen erberg K. Rho and rac take center stage [J]. Cell, 2004, 116(2): 167-197
- [18] Sloan CM, Quinn CV, Peters JP, et al. Divergence of Rho residue 43 impacts GEF activity[J]. Small GTPases, 2012, 3(1): 15-22
- [19] Kawashima T, Hirose K, Satoh T, et al. MgcRacGAP is involved in the control of growth and differentiation of hematopoietic cells[J]. Blood, 2000, 96: 2116-2124
- [20] Hirose K, Kawashima T, Iwamoto I, et al. MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody [J]. BiolChem, 2001, 276: 5821-5828
- [21] Toure A. MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to Drosophila rotund RacGAP gene product, is expressed in male germ cells[J]. Biol Chem, 1998, 273: 6019-6023
- [22] Jantsch-Plunger V, Gönczy P, Romano A, et al. CYK-4: A Rho family GTPase-activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis[J]. Cell Biol, 2000, 149: 1391-1404
- [23] Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, et al. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to aRhoGAP during cytokinesis[J]. Dev Cell, 2003, 4: 549-560
- [24] Yamada T, Hikida M, Kurosaki T. Regulation of cytokinesis by MgcRacGAP in B lymphocytes is independent of GAP activity [J]. Exp Cell Res, 2006, 312: 3517-3525