

Rap1GAP 对胃癌细胞侵袭、迁移及上皮细胞-间充质转化的作用

高卫利, 叶国超, 陆伟, 顾栋桦, 钱福初, 高玉海, 王众

(湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000)

摘要: [目的] 分析 Rap1GAP 对胃癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响。[方法] 运用 qRT-PCR 及 Western blot 法检测 Rap1GAP 在胃癌细胞中的表达。Rap1GAP 载体慢病毒感染 MGC803 及 MKN-45 两个细胞系, 构建出 Rap1GAP 高表达胃癌细胞系。MTT、细胞克隆形成实验、Transwell 实验及划痕实验检测 Rap1GAP 对胃癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响。运用 qRT-PCR 及 Western blot 法检测上皮标志物 E-cadherin, Snail 和 N-cadherin 的表达。[结果] 正常细胞株 GES-1 中 Rap1GAP 表达量为 1.02 ± 0.08 , 而 SGC7901、AGS、MGC803、HGC-27、MKN-45 中表达量分别为 0.66 ± 0.10 , 0.51 ± 0.10 , 0.20 ± 0.08 , 0.31 ± 0.07 , 0.26 ± 0.11 (P 均 < 0.01)。体外实验显示 Rap1GAP 能抑制胃癌细胞的增殖(酶标仪检测波长为 570 nm 时的吸光度)、侵袭及迁移能力; 且 Rap1GAP 能抑制胃癌细胞的 EMT。[结论] Rap1GAP 在胃癌进展中起到抑癌作用, 具有成为胃癌治疗靶点的潜力。

关键词: 胃肿瘤; Rap1GAP; 增殖; 侵袭; 迁移; EMT

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)12-1170-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.12.B006

The Effect of Rap1GAP on Cell Invasion, Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer Cells

GAO Wei-li, YE Guo-chao, LU Wei, GU Dong-hua, QIAN Fu-chu, GAO Yu-hai, WANG Zhong

(Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of Rap1GAP on the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cells. [Methods] The expression of Rap1GAP in gastric cancer cells was determined by qRT-PCR and Western blot. Gastric cancer MGC803 and MKN-45 cells with high expression of Rap1GAP were constructed by infection with Rap1GAP lent virus vector. The effect of Rap1GAP on the cell proliferation was detected by MTT assay and cell clone formation assay. The effect of Rap1GAP on the cell invasion was detected by Transwell assay. The effect of Rap1GAP on the cell migration was detected by Scratch assay. The expression of epithelial markers (E-cadherin, Snail and N-cadherin) was detected by qRT-PCR and Western blot. [Results] The expression level of Rap1GAP in normal gastric GES-1 cells was 1.02 ± 0.08 , while the expression level in SGC7901, AGS, MGC803, HGC-27 and MKN-45 cells was 0.66 ± 0.10 , 0.51 ± 0.10 , 0.20 ± 0.08 , 0.31 ± 0.07 and 0.26 ± 0.11 , respectively (all $P < 0.01$). Rap1GAP can inhibited the proliferation, invasion, migration and EMT of gastric cancer cells. [Conclusion] Rap1GAP can inhibit proliferation, migration and invasion of gastric cancer cell, which may be potentially used as a therapeutic target for gastric cancer.

Subject words: gastric cancer; Rap1GAP; proliferation; invasion; migration; EMT

Rap1 属于小 G 蛋白 Ras 超家族成员之一, 和其他 G 蛋白一样, 存在无活性和有活性两种构象。G

蛋白有内在的 GTP 酶活性, 能水解 GTP 为 GDP 和无机磷, 但这种 GTP 酶活性太低, 不能发挥正常的生理作用, 需要 GTPase 激活蛋白(GTPase activating protein, GAP) 即 Rap1GAP 来激活。Rap1GAP 能与 Rap1-GTP 作用, 使后者变成无活性的 Rap1-GDP, 能

基金项目: 浙江省卫计委项目(2014RCA027); 湖州市科技局项目(2016GY28)
通讯作者: 高卫利, 副主任医师, 硕士; 湖州市中心医院普外科, 浙江省湖州市红旗路 198 号(313000); E-mail: gwl0974@163.com
收稿日期: 2018-08-20; **修回日期:** 2018-11-23

发挥抑制RAS-ERK-MAPK 途径活化的作用。本研究通过体外细胞实验观察 Rap1GAP 表达对胃癌细胞增殖、侵袭、迁移及上皮细胞-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)能力的影响。

1 材料与方法

1.1 一般材料

人胃黏膜细胞株 GES-1 及胃癌细胞株 MKN-45、MGC803、HGC-27、AGS、SGC7901 购自中国科学院上海细胞库。

Trizol 试剂和 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;胎牛血清、DMEM/F12 培养液购自美国 GIBCO 公司;Matrigel 胶购自美国 BD 公司;Transwell 小室购自美国 Costar 公司;一抗:鼠抗人 Ecadherin 抗体、鼠抗人 N-cadherin 抗体、鼠抗人 Snail 抗体及抗内参 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

胃癌细胞系 MKN-45、MGC803、HGC-27、AGS、SGC7901 使用 10%的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g mg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,在 37℃含 5%CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 慢病毒感染

上海吉凯基因技术有限公司负责构建含有 Rap1GAP 的慢病毒和绿色荧光蛋白(GFP-NC)空载慢病毒。处于对数生长期的目的细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液。将细胞悬液(细胞数约为 5×10^4)接种于 6 孔板中,37℃、5%CO₂ 培养箱培养待细胞融合度达到约 30%。根据细胞 MOI 值,加入适宜量的病毒。12h 后观察细胞状态:如果没有明显的细胞毒性作用,继续培养 24h 后更换培养基;如果有明显的细胞毒性作用,立即更换培养基。感染 3d 后观察慢病毒上报告基因 GFP 的表达情况,荧光率大于 80%者将细胞分成两份,一份分于 12 孔培养板中待长满后收集细胞用于 RNA 提取,一份分于 6 孔板中待长满后收集细胞用于蛋白提取。通过 qRT-PCR 及 Western blot 确认感染效率。

1.2.3 细胞增殖实验

将细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板,培养 1~5d,采用噻唑蓝(MTT)法检测胃癌细胞的增殖情况,酶标仪检测波长为 570nm 时的吸光度(A 值)。

1.2.4 细胞克隆形成实验

将细胞接种于密度为每孔 600 个细胞的 6 孔板中,每 3d 更换培养基 1 次。培养 10d 后,细胞用多聚甲醛固定 0.5h,室温吉姆萨染液(美国 Sigma 公司)染色 0.5h。手工计数克隆细胞数。

1.2.5 细胞侵袭实验

将上层铺有 Matrigel 胶、孔径 8 μ m 的 Transwell 小室(1×10^5 /孔)加入细胞培养。上层室培养液采用无血清培养基,下层室采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基。常规培养 24h 后,洗净 Transwell 小室内的细胞和 Matrigel 胶,固定后用吉姆萨染色,统计侵袭到下层的细胞数量。

1.2.6 划痕实验

将细胞以相同的密度接种于 6 孔板中,并生长至 100%汇合。细胞用丝裂霉素 C 预处理,用无菌枪头在细胞上划横线。通过用 PBS 洗除松散的细胞,然后加入无血清培养基。置 37℃培养箱培养,并于划痕后 0、12h 拍照。细胞迁移率=(0h 划痕宽度-12h 划痕宽度)/0h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.2.7 Western blot 检测

RIPA 蛋白裂解液裂解细胞,提取蛋白。使用 12%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳并转膜。然后,用 5%脱脂奶粉室温封闭 1h,加入相应一抗,4℃孵育过夜,加入相应二抗室温孵育 2 h。最后 ECL 发光试剂盒显色并分析条带。一抗如下:鼠抗人 Ecadherin 抗体(1:1000)、鼠抗人 N-cadherin 抗体(1:1000)、鼠抗人 Snail 抗体(1:1000)及抗内参 β -actin 抗体(1:2000)。

1.2.8 qRT-PCR 检测

采用 TRIzol 试剂,按说明书所述方法提取细胞总 RNA。使用 RNA 反转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit,按说明书所述方法进行反转录反应合成 cDNA。按照荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ 说明书的方法,以合成的 cDNA 为模板,加入反应试剂进行 qRT-PCR 反应。引物的序列如下: Rap1GAPF:5'-GCACTTTCTCGGCAAGGAGCATTT-3', R:5'-TGACATCATGGTATGTCCGGCACT-3'。E-cad-

herin F:5'-CGAGAGCTACACGTTACGG-3', R:5'-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3'.

N-cadherin F:5'-CACTGCTCAGGACCCAGAT-3', R:5'-TAAGCCGAGTGATGGTCC-3'. Snail F:5'-GAGGCGGTGGCAGACTAG-3',

R:5'-GACACATCGGTCAGACCAG-3'. GAPDH 基因作为内参。GAPDH F:5'-TCCTCTCCCAAGTC-CACACA-3', R:5'-GCACGAAGGCTCATCATTCA-3'.

1.3 统计学处理

统计分析使用 SPSS 19.0 软件进行。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Student *t* 检验进行统计分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rap1GAP 在不同胃癌细胞株中的表达

采用 qRT-PCR 检测了 5 株胃癌细胞株中 Rap1GAP 的表达水平,结果显示,正常细胞株 GES-1 表达量为 1.02 ± 0.08 ,而 SGC7901、AGS、MGC803、

HGC-27、MKN-45 表达量分别为 0.66 ± 0.10 、 0.51 ± 0.10 、 0.20 ± 0.08 、 0.31 ± 0.07 、 0.26 ± 0.11 (P 均 <0.01) (Figure 1A)。同时 Western blot 验证检测胃癌细胞株中 Rap1GAP 的蛋白表达水平,结果同样显示在 MGC803 及 MKN-45 中, Rap1GAP 的表达水平最低 (Figure 1B)。因此,取 MGC803 及 MKN-45 行进一步细胞学实验。

2.2 qRT-PCR 及 Western blot 验证胃癌细胞感染效率

Rap1GAP 载体及对应空载体慢病毒感染 MGC803 及 MKN-45 两种细胞系,构建出 Rap1GAP 高表达胃癌细胞系 OE-Rap1GAP 与相应对照 LV-NC。然后采用 qRT-PCR 及 Western blot 法验证 Rap1GAP 表达量。结果显示,在 MGC803 细胞系中, OE-Rap1GAP 组 Rap1GAP 的表达量比对照组 LV-NC 明显增加 (5.43 ± 0.14 vs 0.99 ± 0.04 , $P<0.01$)。在 MKN-45 细胞系中, OE-Rap1GAP 组 Rap1GAP 的表达量比对照组 LV-NC 也明显增加 (5.80 ± 0.21 vs 0.99 ± 0.04 , $P<0.01$) (Figure 2)。

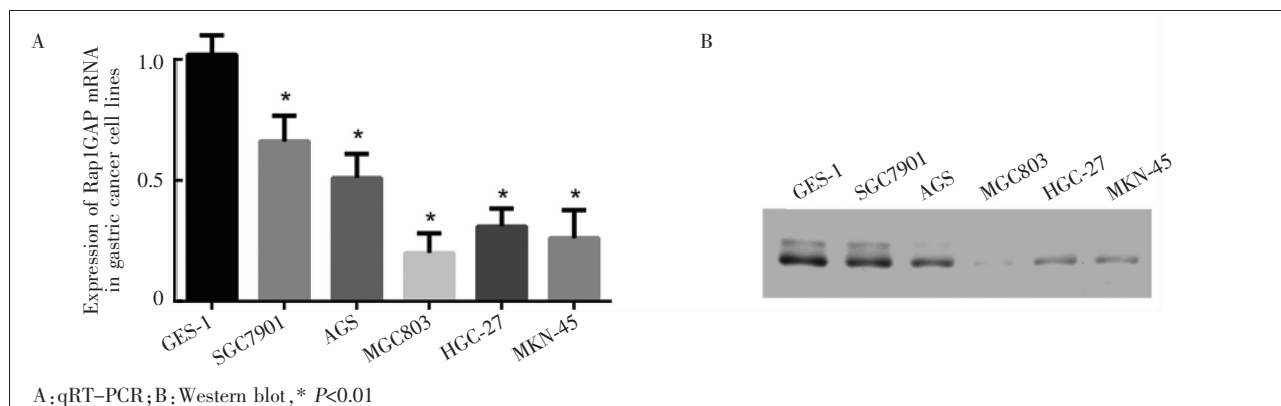


Figure 1 The expression of Rap1GAP in different gastric cancer cell lines

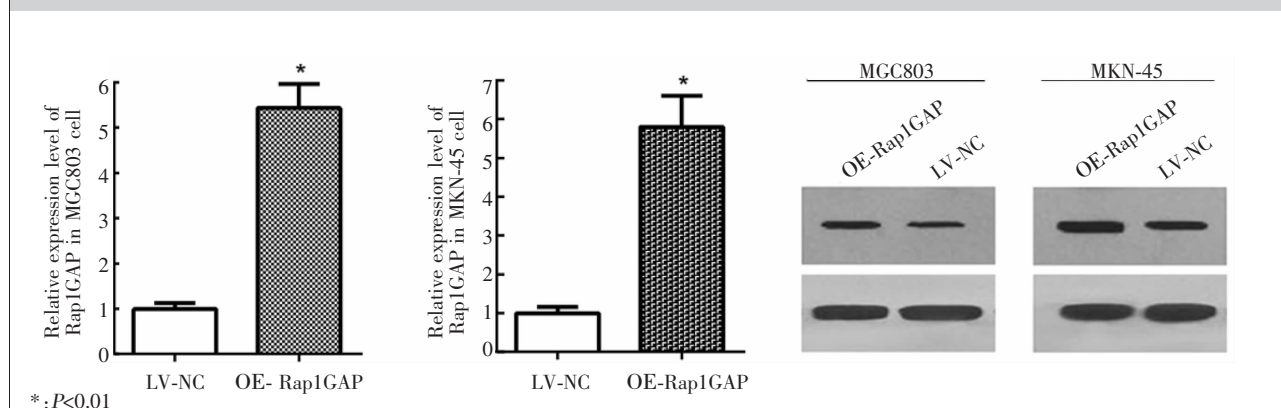


Figure 2 The infection efficiency of gastric cancer cells was verified by qRT-PCR and WB

2.3 Rap1GAP 可抑制胃癌细胞的增殖能力

MTT 实验发现, 培养 2d 后, 在 MGC803 及 MKN-45 两种细胞系中, OE-Rap1GAP 组中细胞的 A 值开始低于 LV-NC 组细胞 ($P<0.01$), 见 Figure 3A。克隆形成实验显示, 转染增加 Rap1GAP 后, MGC803 (124.7 ± 3.22 vs 209.3 ± 4.42 , $P<0.01$) 及 MKN-45 (110.0 ± 2.59 vs 198.7 ± 4.35 , $P<0.01$) 两种细胞的克隆形成能力均受到抑制, 见 Figure 3B。

2.4 Rap1GAP 可抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力

Transwell 侵袭实验发现, 在 MGC803 细胞系中, OE-Rap1GAP 组中侵袭到下层中的细胞数量比 LV-NC 组明显减少 (3.73 ± 0.21 vs 15.40 ± 0.33 , $P<0.01$); 在 MKN-45 细胞系中, OE-Rap1GAP 组中侵袭到下层中的细胞数量比 LV-NC 组也明显减少 (3.73 ± 0.21 vs 14.57 ± 0.49 , $P<0.01$) (见 Figure 4A)。划痕实验发现, 在 MGC803 (10.47 ± 0.34 vs 22.67 ± 0.37 , $P<0.01$) 及 MKN-45 (7.80 ± 0.28 vs 20.67 ± 0.44 , $P<0.01$) 两种细胞系中, OE-Rap1GAP 组中划痕愈合速度均比 LV-NC 组明显减慢 (见 Figure 4B)。

2.5 Rap1GAP 可抑制胃癌细胞的 EMT

qRT-PCR 检测结果显示, 转染 OE-Rap1GAP 后

MGC803 细胞上皮化标志物 E-cadherin 的表达量减少 (0.28 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.03 , $P<0.01$), 而间质化标志物 Snail 表达量增加 (5.38 ± 0.13 vs 1.00 ± 0.02 , $P<0.01$), 间质化标志物 N-cadherin 表达量也增加 (4.50 ± 0.14 vs 1.01 ± 0.02 , $P<0.01$), 见 Figure 5A。Western blot 结果显示, OE-Rap1GAP 细胞的 EMT 相关蛋白表达较 LV-NC 细胞发生显著变化, 其中 Ecadherin 表达明显降低, 而 Snail 和 N-cadherin 表达均升高 (Figure 5B)。

3 讨论

胃癌是世界范围内常见恶性肿瘤之一, 据统计, 全球每年新发胃癌病例约 989 600 例, 占有新发癌症病例的 8%, 仅次于肺癌、乳腺癌和肠癌, 位居第 4 位; 每年近 738 000 人死于胃癌, 占有癌症死因的 10%, 位居癌症死因的第 2 位^[1]; 胃癌确诊时, 有 60% 以上的患者属于晚期并失去手术根治机会, 而进行了标准根治性切除及术后化疗、放疗的患者, 其中 50% 最终也将出现复发转移, 胃癌 5 年生存率仅 20%。胃癌的侵袭与转移是一个复杂的进程, 其

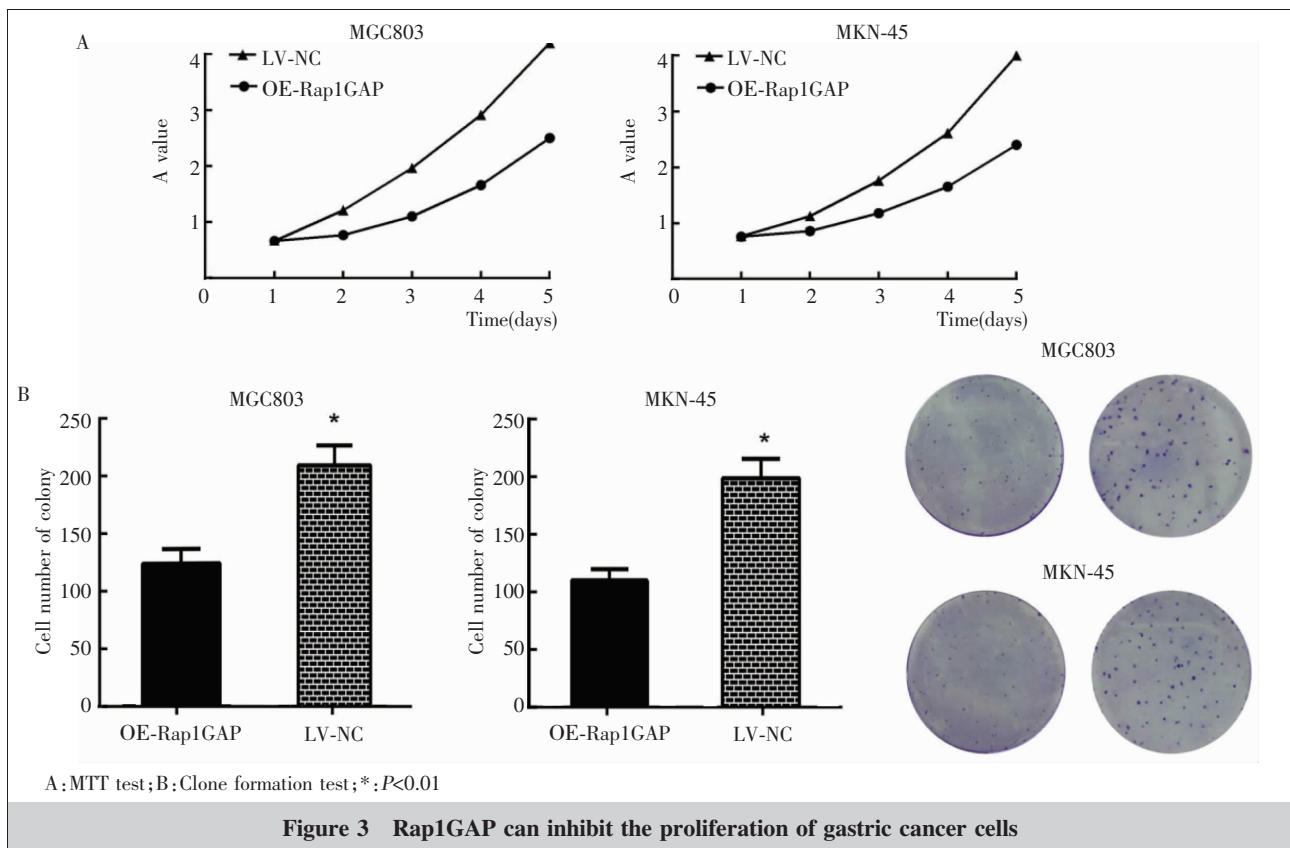


Figure 3 Rap1GAP can inhibit the proliferation of gastric cancer cells

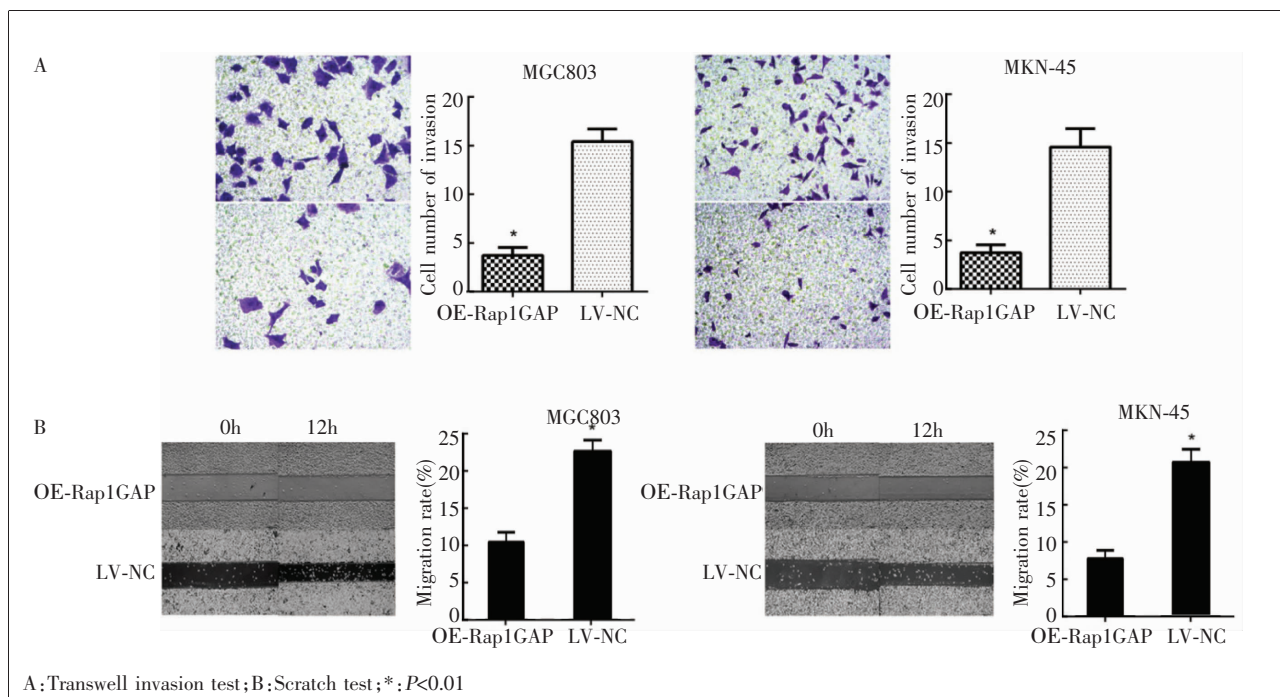


Figure 4 Rap1GAP can inhibit the invasion and migration of gastric cancer cells

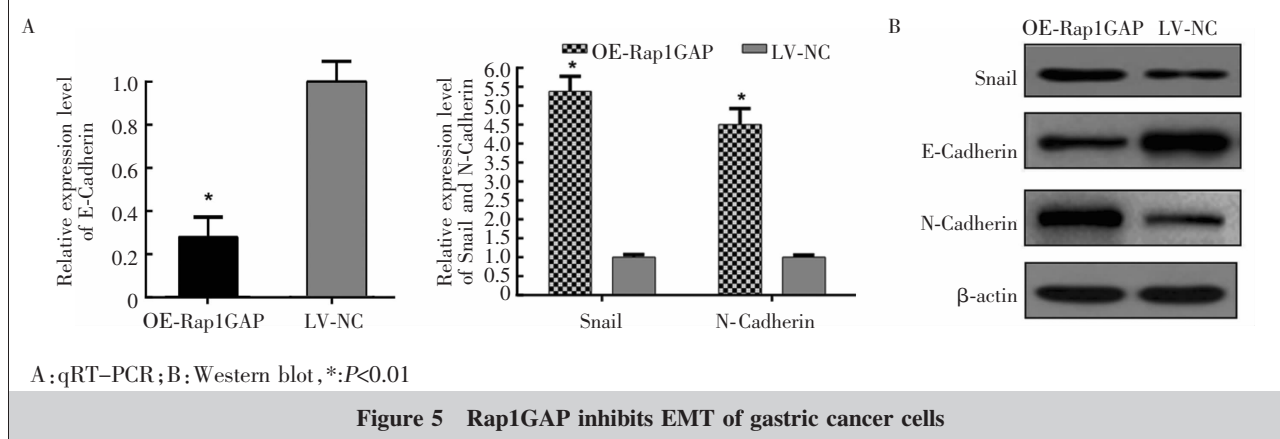


Figure 5 Rap1GAP inhibits EMT of gastric cancer cells

起源于原发肿瘤中特定细胞在基因或表观遗传学上的改变,其机制至今尚未完全阐明^[2]。

Rap1 属于小 G 蛋白 Ras 超家族的成员之一,和其他 G 蛋白一样,存在无活性和有活性两种构象。G 蛋白有内在的 GTP 酶活性,能水解 GTP 为 GDP 和无机磷,但这种 GTP 酶活性太低,不能发挥正常的生理作用,需要 GTPase 激活蛋白(GTPase activating protein, GAP) 来激活。GTPase 激活蛋白,能帮助 Rap1 发挥其内在的 GTP 酶的作用,将 Rap1-GTP 水解,从而转变为失活状态,变为无活性的 Rap1-GDP^[3]。GTPase 激活蛋白包括 Rap1GAP 和 Rap1GAP2、SPA-1/SIPA1 和 SIPA1L1/SPAR^[3]。Rap1GAP 定位于

基因组 1p36.1-35 区域,该区域编码一个由 663 个氨基酸构成的蛋白质^[4]。在细胞内,Rap1GAP 分子一般以二聚体形式存在,Rap1GAP 分子主要由二聚化结构域和催化结构域两个结构域组成,每个结构域都有一个由 α 螺旋围绕的 β 折叠建构的特殊结构,C-末端的长 α 螺旋反向折叠至氨基末端的二聚化结构域并与之相结合^[5]。

目前,Rap1GAP 在肾细胞癌和甲状腺癌等肿瘤中存在表达下调现象,被认为是一种抑癌基因^[6,7]。在这些癌细胞中 Rap1GAP 的表达上调能抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移等生物学行为。体外实验表明 Rap1GAP 的过度表达能抑制人类肿瘤细胞的侵

袭和迁移^[8,9],以及抑制动物体内肿瘤细胞转移^[10,11]。先前报道说明 Rap1GAP 对人类肿瘤发生及发展可能起到一定的作用^[9]。

我们前期研究^[12]发现,Rap1GAP 在胃癌中表达下调,与胃癌患者的淋巴结转移、T 值及 TNM 分期密切相关。同时生存分析结果显示 Rap1GAP 低表达患者无病生存期(DFS)和总生存期(OS)明显低于高表达者。Cox 回归模型分析结果显示,Rap1GAP 低表达是影响胃癌患者预后的独立危险因素。此研究结果与国外报道一致^[13]。在本研究中,我们首先通过慢病毒感染方式增加胃癌细胞的表达水平;随后通过 MTT 实验及克隆形成实验,结果表明 Rap1GAP 能够明显降低胃癌细胞的增殖能力;Transwell 实验及划痕愈合实验发现,Rap1GAP 能够明显降低胃癌细胞的侵袭和迁移能力。综合前期研究和本实验结果,我们推测 Rap1GAP 是一种抑癌基因,也许可以作为预测胃癌患者不良预后的分子标志物。

EMT 表现为上皮细胞失去细胞极性和黏附作用,细胞活动性增强并向间质细胞转化,是肿瘤细胞获得侵袭和转移能力的主要途径之一^[14],其中 E-cadherin 表达缺失及 N-cadherin 表达增加是 EMT 的特征性变化^[15]。Snail 是 E-cadherin 最重要的转录抑制因子,通过 Smad 相互作用蛋白 SIP1 与 E-cadherin 基因启动子近端的 E-box 序列相结合,抑制 E-cadherin 的表达^[16]。本研究结果提示 Rap1GAP 可能抑制胃癌细胞 EMT 的发生,从而抑制肿瘤的增殖、侵袭与转移。

总之,本研究证实了 Rap1GAP 作为抑癌基因,可发挥抑制胃癌细胞增殖、侵袭及迁移的作用,从而有望成为胃癌潜在的治疗靶点。以后我们将通过敲减 Rap1GAP 基因体外实验、体内动物实验及研究相关分子机制进一步验证该基因作为胃癌潜在治疗靶点的价值。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies [J]. Lancet, 2007, 369 (9574): 1742-1757.
- [3] Raaijmakers JH, Bos JL. Specificity in Ras and Rap signaling[J]. J Biol Chem, 2009, 284(17):10995-10999.
- [4] Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers[J]. Science, 2006, 314(5797):268-274.
- [5] European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16[J]. Cell, 1993, 75(7):1305-1315.
- [6] Kim WJ, Gersey Z, Daaka Y. Rap1GAP regulates renal cell carcinoma invasion[J]. Cancer Lett, 2012, 320(1):65-71.
- [7] Zuo H, Gandhi M, Edreira MM, et al. Downregulation of Rap1GAP through epigenetic silencing and loss of heterozygosity promotes invasion and progression of thyroid tumors[J]. Cancer Res, 2010, 70(4):1389-1397.
- [8] Tsygankova OM, Wang H, Meinkoth JL, et al. Tumor cell migration and invasion are enhanced by depletion of Rap1 GTPase-activating protein(Rap1GAP)[J]. J Biol Chem, 2013, 288(34):24636-24646.
- [9] Vuchak LA, Tsygankova OM, Meinkoth JL. Rap1GAP impairs cell-matrix adhesion in the absence of effects on cell-cell adhesion[J]. Cell Adhesion Migration, 2011, 5(4):323-331.
- [10] Lin KB1, Tan P, Freeman SA, et al. The Rap GTPases regulate the migration, invasiveness and in vivo dissemination of B-cell lymphomas[J]. Oncogene, 2010, 29(4):608-615.
- [11] Freeman SA, McLeod SJ, Dukowski J, et al. Preventing the activation or cycling of the Rap1 GTPase alters adhesion and cytoskeletal dynamics and blocks metastatic melanoma cell extravasation into the lungs [J]. Cancer Res, 2010, 70(11):4590-4601.
- [12] Gao WL, Ye GC, Liu LW, et al. Down-regulated expression of Rap1GAP predicts unfavorable prognosis in diffuse type gastric cancer and may be correlated with EMT[J]. Int J Clin Exp, 2017, 10(8):12101-12111.
- [13] Yang Y, Zhang J, Yan Y, et al. Low expression of Rap1GAP is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) and poor prognosis in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(5):8057-8068.
- [14] Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. [J]. Pharmacol Ther, 2015, (150):33-46.
- [15] Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis[J]. Genes Dev, 2013, 27(20):2192-2206.
- [16] Wang Y, Shi J, Chai K, et al. The role of Snail in EMT and tumorigenesis [J]. Current Cancer Drug Targets, 2013, 13(9):963-972.