

网络出版时间: 2020-3-30 17:08 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.011.html>

Rac1 和 Cdc42 对横纹肌肉瘤细胞增殖、侵袭、迁移以及凋亡的影响

商 浩¹ 王 萍^{1,2*} 刘春霞¹ 李 锋^{1,3}

摘要 目的 探究 Rac1、Cdc42 在横纹肌肉瘤(RMS)细胞中的表达及对 RMS 细胞增殖、侵袭、迁移以及凋亡的影响。方法 运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 RMS 细胞和正常骨骼肌细胞中 Rac1、Cdc42 的表达。构建 Rac1、Cdc42 过表达质粒,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测其转染效率。使用 CCK-8、transwell、细胞划痕和流式细胞术检测 Rac1、Cdc42 对 RMS 细胞增殖、侵袭、迁移以及凋亡的影响。结果 在 RMS 细胞中, Rac1、Cdc42 的表达水平高于正常骨骼肌细胞。转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒后, 其在 RMS 细胞中的表达水平显著升高。与对照组相比, 过表达 Rac1、Cdc42 后 RMS 细胞的增殖、侵袭、迁移以及抗凋亡能力增强。结论 Rac1、Cdc42 在 RMS 细胞中高表达, 其可能通过影响 RMS 细胞的增殖、侵袭、迁移以及抗凋亡能力促进 RMS 细胞的恶性生物学行为。

关键字 横纹肌肉瘤; Rac1; Cdc42

中图分类号 R 738.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0379-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.011

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是儿童常见的软组织肉瘤之一, 约占所有小儿恶性肿瘤的 4.5%, 好发于头部和颈部^[1]。尽管肿瘤切除、放射疗法和化疗方案等综合治疗在 RMS 中广泛应用, 儿童患者 5 年生存率有所提高, 但高危患儿的存活率仍然较低^[2]。因此, 探究参与 RMS 发病的基因, 明确其在 RMS 中所发挥的作用, 将为 RMS 的诊断以及治疗提供新思路。

Rac1、Cdc42 属于小 G 蛋白超家族成员, 参与多

2019-12-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81660441、81460404)

作者单位:¹ 石河子大学医学院病理学系, 石河子 832002

² 陕西省人民医院病理科, 西安 710000

³ 首都医科大学附属北京朝阳医院病理科, 北京 100020

作者简介: 商 浩, 男, 硕士研究生;

刘春霞, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuliu2239@sina.com;

李 锋, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lifeng7855@126.com

* 对本文具有同等贡献

种细胞信号传导, 在维持细胞正常功能中起重要作用。近些年研究^[3-5]显示, Rac1、Cdc42 在卵巢癌、胃癌、嗜铬细胞瘤等肿瘤中异常表达, 参与肿瘤的发生发展。但是, 尚未见 Rac1、Cdc42 在 RMS 中的报道。该研究通过检测 Rac1、Cdc42 在 RMS 细胞中的表达, 并分析其对 RMS 细胞生物学特性的影响, 为 RMS 的分子诊断和靶向治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 胚胎性 RMS RD 细胞系购自中国科学院细胞库; 腺泡状 RMS RH30 细胞系购自上海复翔生物技术有限公司; 正常骨骼肌 HSKMC 细胞系购自北纳生物技术有限公司; Rac1 和 Cdc42 过表达质粒以及空载体(empty vector, EV) 购自上海吉凯基因化学技术有限公司; Lipofectamine 2000 购自美国 Life technologies 公司; Total RNA Kit I 购自美国 OMEGA 公司; miScript II RTKit 和 miScript SYBR Green PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司; anti-Rac1、anti-Cdc42 和 anti-β-actin 购自美国 Cytoskeleton, Inc 公司; CCK-8 试剂购自日本 Dojindo 公司; transwell 小室购自美国 Costar 公司; Matrigel 购自美国 BD Biosciences 公司; Annexin V-APC/PI Apoptosis Detection Kit 购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.1.2 主要仪器 倒置显微镜购自日本 OLYMPUS 公司; 7500 实时 PCR 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; 电泳仪、转膜仪、凝胶成像系统和全自动酶标仪购自美国 BIO-RAD 公司; PAS 型流式细胞仪购自德国 PARTEC 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 3 株细胞系均使用含 10% 胎牛血清(FBS) 和 1% 双抗(青-链霉素) 的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

1.2.2 细胞转染 将 RD 和 RH30 细胞消化、重悬, 以 4 × 10⁵ 细胞/孔接种于含有 2 ml 10% FBS-DMEM 培养基的 6 孔细胞培养板中, 待细胞密度达到 60% ~ 70% 时, 按照 Lipofectamine 2000 说明书进

行转染。

1.2.3 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

使用 Total RNA Kit I 从细胞中提取总 RNA。使用 miScript II RTKit 将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 miScript SYBR Green PCR Kit 在 7500 实时 PCR 系统中进行扩增。Rac1 和 Cdc42 为 目的基因, β -Actin 为内参基因。实验组和对照组表达差异以 RQ 值为准, 表示实验组中目的基因相对于对照组表达的差异倍数。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列
Rac1	F 5'-CCGGTGAATCTGGGCTTATG-3' R 5'-CTCGGATCGCTTCGTCAAAC-3'
Cdc42	F 5'-CAGGTGTGCTGCTATGAACATC-3' R 5'-GTAGGTGCAGGGATTGTCATTA-3'
β -actin	F 5'-AGCACAGAGCCTGCCCTTG-3' R 5'-ACATGCCGAGCCGTTGT-3'

1.2.4 Western blot 裂解细胞, 提取蛋白。配置 10% SDS-PAGE 胶, 每孔蛋白上样 15 μ l, 电泳分离, 切取目的蛋白条带电转至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭 2 h, 一抗 (anti-Rac1, 1 : 1 000; anti-Cdc42, 1 : 1 000; anti- β -actin, 1 : 2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜; 对应二抗室温孵育 2 h, 洗膜、显色、曝光。

1.2.5 细胞增殖 将转染不同质粒的细胞以 4.5×10^3 细胞/孔接种于含有 0.1 ml 10% FBS-DMEM 培养基的 96 孔细胞培养板中, 待细胞贴壁后以 0、24、48 和 72 h 为时间节点向每孔中加入 10 μ l CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 使用酶标仪测定在 450 nm (OD 450) 处的吸光度。

1.2.6 细胞侵袭和迁移 利用 transwell 小室检测细胞侵袭和迁移能力。将 0.2 ml DMEM 培养基重悬的 2.5×10^4 细胞接种于用 Matrigel 处理的 transwell 上室中, 将 0.6 ml 20% FBS-DMEM 培养基加入 transwell 下室中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 48 h, 取出小室, 对侵袭到膜下的细胞固定、染色、拍照、计数。细胞迁移能力检测基本与细胞侵袭能力检测步骤相同, 但无需将 Matrigel 加入上室中, 且细胞加入后只需培养 24 h。同时, 通过划痕实验进一步检测迁移。在 12 孔细胞培养板中进行细胞转染, 第 2 天使用无菌的 10 μ l 枪头在长满细胞的孔板中划十字交叉垂线两条, PBS 漂洗细胞 3 次, 加 2 ml DMEM 培养基, 分别以 0、12 和 24 h 为时间节点观察并拍照。

1.2.7 细胞凋亡 细胞转染 48 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞成单细胞悬液 (消化时间不宜过长, 否则容易引起假阳性), 预冷的 PBS 漂洗细胞 2 次, 收集 $(2 \sim 5) \times 10^5$ 个细胞, 按照 Annexin V-APC/PI Apoptosis Detection Kit 说明书使用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理 本实验所有数据均为 3 次独立实验结果, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 SPSS 18.0 软件包进行数据处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rac1、Cdc42 在 RMS 细胞中高表达 在 RMS 细胞和正常骨骼肌细胞中分别检测 Rac1、Cdc42 的表达, 以确定 Rac1、Cdc42 在 RMS 中的潜在作用。结果如图 1 A、B 所示, 相对于 HSKMC 细胞系, 在 RD 和 RH30 细胞系中 Rac1、Cdc42 mRNA 以及蛋白的表达水平明显升高。

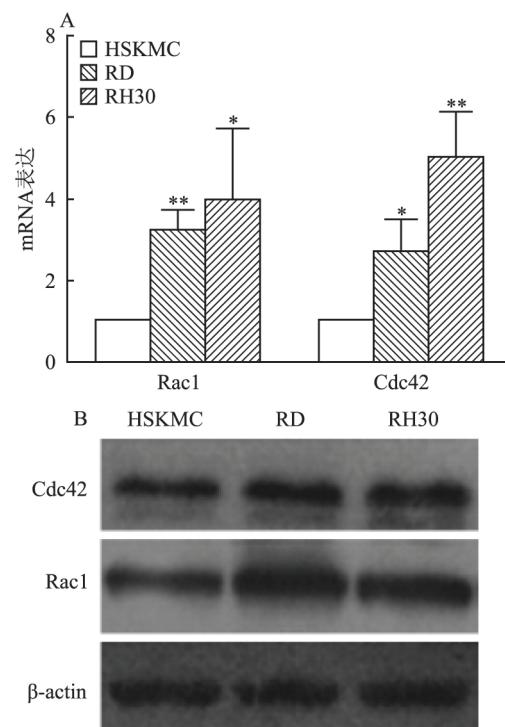


图 1 Rac1、Cdc42 在 RMS 细胞中高表达

A: Rac1、Cdc42 mRNA 表达水平; B: Rac1、Cdc42 蛋白表达水平; 与 HSKMC 细胞系比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 转染后细胞中 Rac1、Cdc42 的 mRNA 以及蛋白表达 在 RD 和 RH30 细胞系中分别转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒, 提取总 RNA 以及总蛋白检测转染效率。结果如图 2A、B、C、D 所示, 与 EV 相比, 转

染 Rac1、Cdc42 过表达质粒后 Rac1、Cdc42 mRNA 以及蛋白的表达水平显著升高。

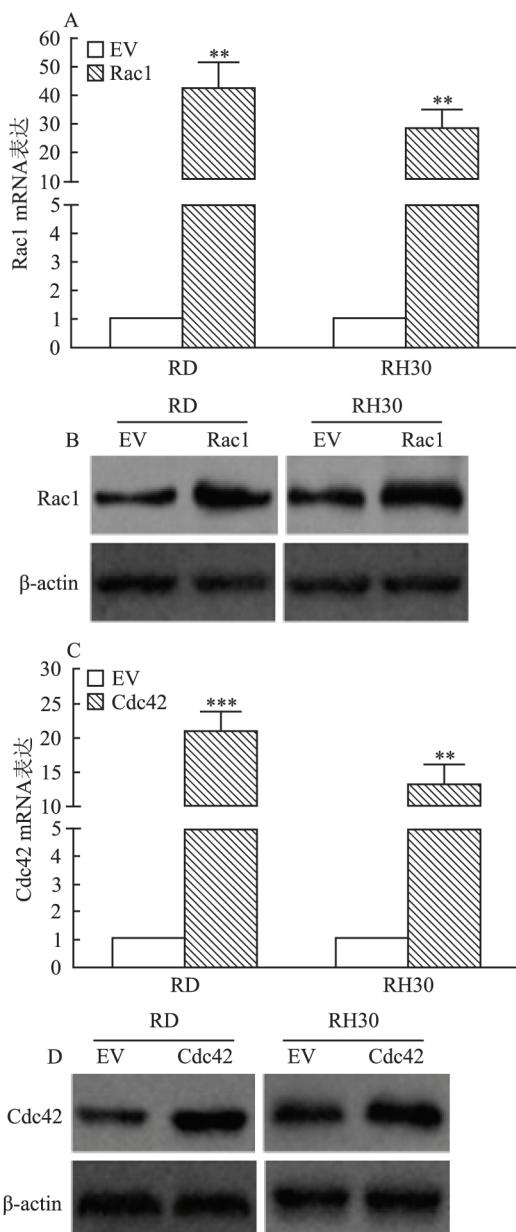


图 2 转染后细胞中 Rac1、Cdc42 的 mRNA 以及蛋白表达

A: Rac1 mRNA 表达水平; B: Rac1 蛋白表达水平; C: Cdc42 mRNA 表达水平; D: Cdc42 蛋白表达水平; 与 EV 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 Rac1、Cdc42 促进 RMS 细胞增殖 为研究 Rac1、Cdc42 对 RMS 细胞增殖能力的影响,课题组在 RD 和 RH30 细胞系中分别转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒,使用 CCK-8 实验检测细胞的增殖能力。结果显示与 EV 相比,过表达 Rac1、Cdc42 后 RMS 细胞的增殖能力增强。见图 3A、B。

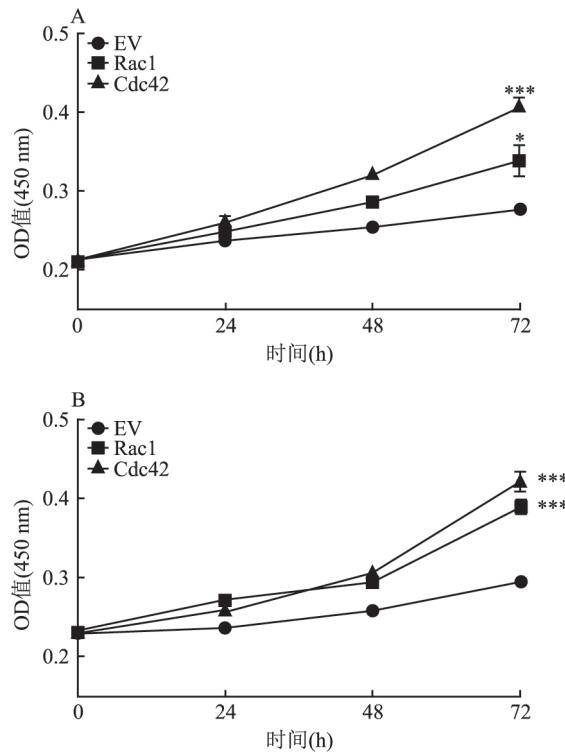


图 3 Rac1、Cdc42 促进 RMS 细胞增殖

A: RD 细胞系; B: RH30 细胞系; 与 EV 比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

2.4 Rac1、Cdc42 促进 RMS 细胞侵袭和迁移 为研究 Rac1、Cdc42 对 RMS 细胞侵袭和迁移能力的影响,课题组在 RD 和 RH30 细胞系中分别转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒,使用 transwell 实验检测细胞的侵袭和迁移能力。结果显示,与 EV 相比,过表达 Rac1、Cdc42 后 RMS 细胞的侵袭(图 4A)和迁移(图 4B)能力增强。在此基础上,进一步使用细胞划痕实验检测细胞的迁移能力。结果如图 4C、D 所示,与 EV 相比,过表达 Rac1、Cdc42 后 RMS 细胞的迁移能力增强。

2.5 Rac1、Cdc42 抑制 RMS 细胞凋亡 为研究 Rac1、Cdc42 对 RMS 细胞凋亡的影响,课题组在 RD 和 RH30 细胞系中分别转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒,使用流式细胞术检测细胞的凋亡。结果如图 5 所示,与 EV 相比,过表达 Rac1、Cdc42 后 RMS 细胞的抗凋亡能力增强。

3 讨论

Rac1 全称为 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1,其主要功能是通过启动 p21 活化的 PAK1、PAK2 和 PAK3 调节肌动蛋白细胞骨架,通过丝裂原活化蛋白激酶

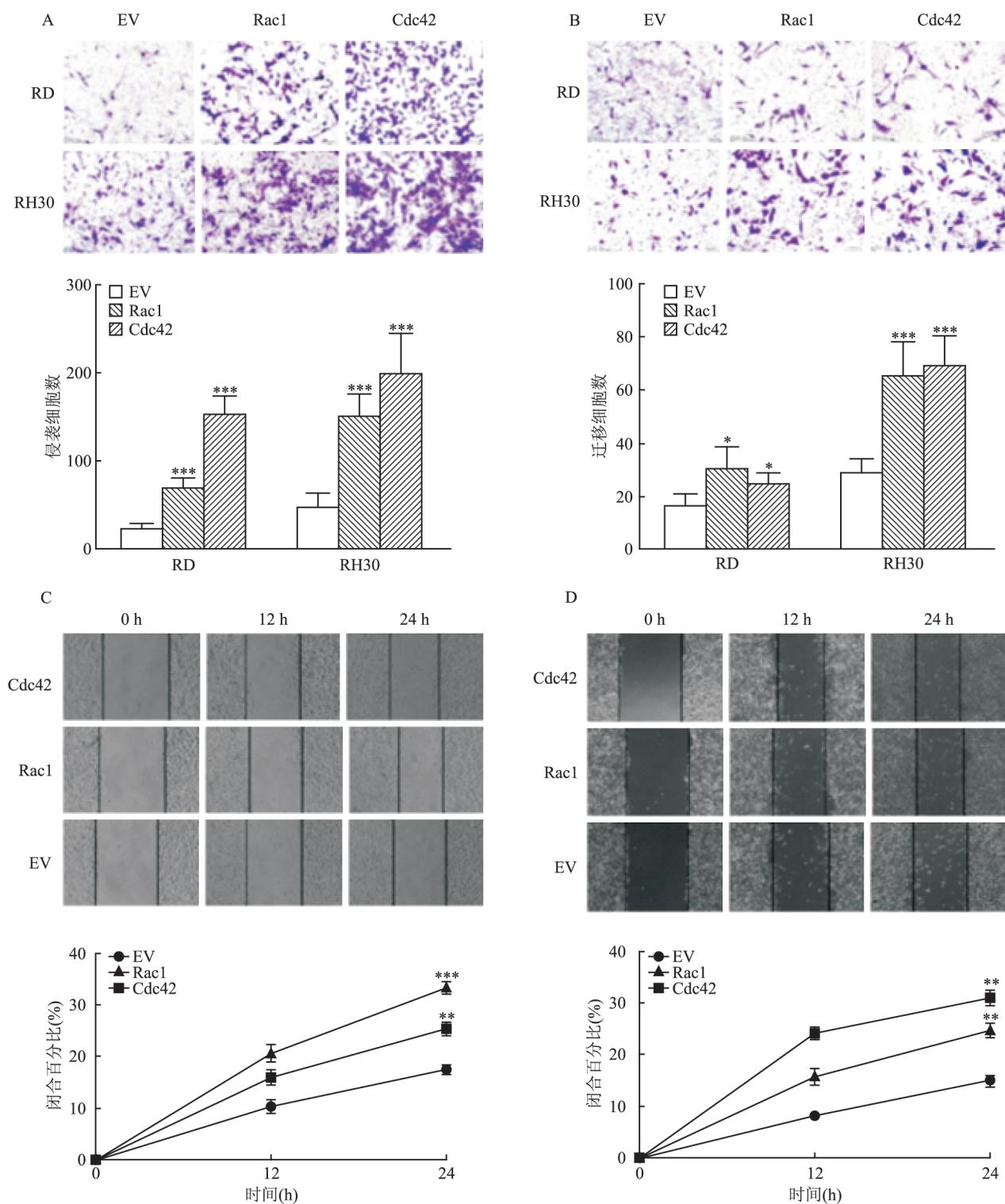


图 4 Rac1、Cdc42 促进 RMS 细胞侵袭和迁移

A: 侵袭实验; B: 迁移实验; C: RD 细胞系 划痕实验; D: RH30 细胞系 划痕实验; 与 EV 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

促进细胞增殖,通过 NF- κ B 途径调节炎症反应等^[6-8]。Cdc42 全称为细胞分裂周期蛋白 42,其可介导 20 多种下游分子活化,包括蛋白激酶、脂质激酶、支架蛋白等,从而参与一系列细胞功能调节,包括细胞极性、增殖、侵袭、迁移、肌动蛋白细胞骨架重

塑等^[9]。Rac1 和 Cdc42 的活性主要受鸟嘌呤核苷酸交换因子、GTP 酶活化蛋白和鸟嘌呤核苷酸解离抑制剂调节,使其在与二磷酸鸟嘌呤核苷结合的非启动状态和与三磷酸鸟嘌呤核苷结合的启动状态间循环转换,进而扮演了“分子开关”的角色^[5]。

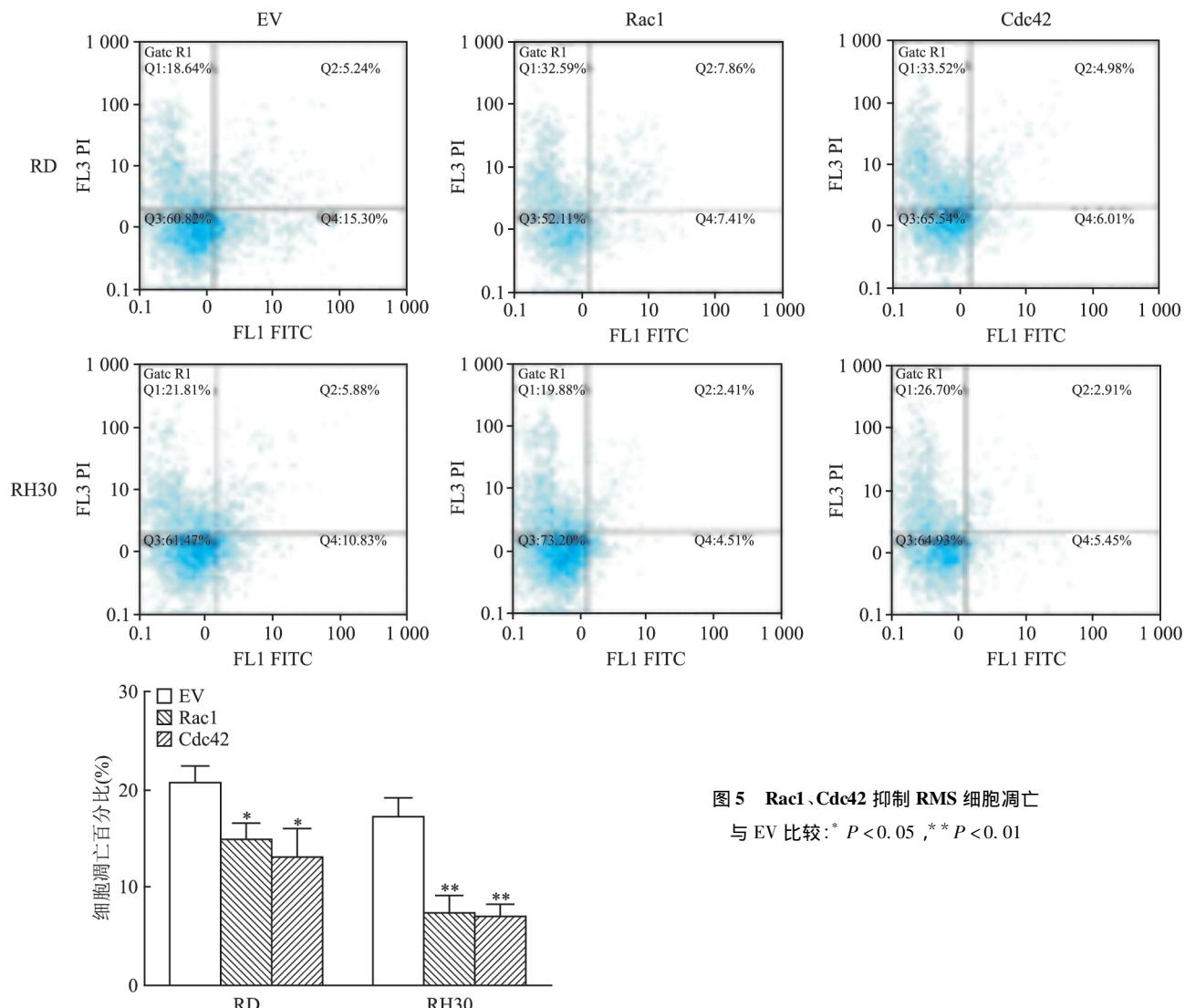


图 5 Rac1、Cdc42 抑制 RMS 细胞凋亡
与 EV 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Rac1、Cdc42 在肿瘤中同样具有重要作用, 其在多种肿瘤中启动或过表达, 参与多种细胞信号传导, 调节肿瘤细胞周期、侵袭、迁移、凋亡以及肿瘤新生血管生成等。本研究显示, Rac1、Cdc42 在正常骨骼肌细胞中低表达, 而在 RMS 细胞中高表达。在此基础上, 课题组在 RD 和 RH30 细胞系中转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒, 以验证 Rac1、Cdc42 对 RMS 细胞功能学的影响。结果显示, 转染 Rac1、Cdc42 过表达质粒后二者表达升高, 且相对于空白对照组, RD 和 RH30 细胞的增殖、侵袭、迁移以及抗凋亡能力增强, 表明 Rac1、Cdc42 在 RMS 中可能发挥癌基因的作用。

近些年随着研究的深入, 人们意识到不应单纯的把 Rac1、Cdc42 看成独立的个体。虽然 Rac1、Cdc42 的具体作用机制不同, 但约有 70% 的氨基酸序列相同^[10], 且结构相似, 上下游调控分子也常一样, 并在多种肿瘤中共同表达, 参与肿瘤的发生发

展, 提示 Rac1、Cdc42 在参与肿瘤的发生发展过程中可能具有协同作用。研究^[11]显示, 在移动的细胞中 Rac1、Cdc42 的定位不断改变, 其主要聚集于细胞运动方向的膜前端, 当移动方向发生变化时, 原部位的 Rac1、Cdc42 的表达量降低, 表明二者可能与肿瘤细胞的转移存在联系。在肿瘤血管生成的研究^[12]中证实, Rac1、Cdc42 可通过增强 p53 蛋白泛素化降低其稳定性, 促进血管内皮生长因子的表达。同时, 在骨和软骨形成的研究^[13]中, Rac1、Cdc42 的共同缺失表型比单一缺失表型对骨和软骨形成的影响更加明显, 表明 Rac1、Cdc42 在调节骨和软骨形成过程中具有协同作用。本研究显示, Rac1 和 Cdc42 在 RMS 细胞中均高表达, 且促进细胞的恶性生物学行为。以上研究为 Rac1、Cdc42 在肿瘤中可能具有协同作用提供了理论基础。

RMS 在治疗上取得的重大进步, 归因于人们对肿瘤发病机制的深入研究。但危重患儿的 5 年生存

率仍然较低，因此寻找新的诊断标志和治疗靶点具有重要意义。本研究显示，Rac1、Cdc42 在 RMS 中高表达，并促进 RMS 细胞的增殖、侵袭、迁移以及抑制凋亡，说明 Rac1、Cdc42 在 RMS 中可能扮演癌基因的角色。这将为深入研究 RMS 的分子诊断及靶向治疗提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Pontes F S , De Oliveira J I , De Souza L L , et al. Clinicopathological analysis of head and neck rhabdomyosarcoma: A series of 10 cases and literature review [J]. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* , 2018 , 23(2) : e188 - 97.
- [2] Dasgupta R , Fuchs J , Rodeberg D. Rhabdomyosarcoma [J]. *Semin Pediatr Surg* , 2016 , 25(5) : 276 - 83.
- [3] Guo Y , Kenney S R , Muller C Y , et al. R-Ketorolac Targets Cdc42 and Rac1 and alters ovarian cancer cell behaviors critical for invasion and metastasis [J]. *Mol Cancer Ther* , 2015 , 14 (10) : 2215 - 27.
- [4] Li X , Jiang M , Chen D , et al. miR-148b-3p inhibits gastric cancer metastasis by inhibiting the Dock6/Rac1/Cdc42 axis [J]. *J Exp Clin Cancer Res* , 2018 , 37(1) : 71.
- [5] Croisé P , Brunaud L , Tóth P , et al. Inhibition of Cdc42 and Rac1 activities in pheochromocytoma, the adrenal medulla tumor [J]. *Small GTPases* , 2017 , 8(2) : 122 - 7.
- [6] Cuadrado A , Martín-Moldes Z , Ye J , et al. Transcription factors NRF2 and NF-κB are coordinated effectors of the Rho family GTP-binding protein RAC1 during inflammation [J]. *J Biol Chem* , 2014 , 289(22) : 15244 - 58.
- [7] Kogai T , Liu Y Y , Mody K , et al. Regulation of sodium iodide symporter gene expression by Rac1/p38 β mitogen-activated protein kinase signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Biol Chem* , 2012 , 287(5) : 3292 - 300.
- [8] Salkier M S , Schierbaum N , Alowayed N , et al. LeftyA decreases actin polymerization and stiffness in human endometrial cancer cells [J]. *Sci Rep* , 2016 , 6: 29370.
- [9] Arias-Romero L E , Chernoff J. Targeting Cdc42 in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets* , 2013 , 17(11) : 1263 - 73.
- [10] Le Cour L Jr , Boyapati V K , Liu J , et al. The structural basis for Cdc42-induced dimerization of IQGAPs [J]. *Structure* , 2016 , 24 (9) : 1499 - 508.
- [11] Itoh R E , Kurokawa K , Ohba Y , et al. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells [J]. *Mol Cell Biol* , 2002 , 22(18) : 6582 - 91.
- [12] Ma J , Xue Y , Liu W , et al. Role of activated Rac1/Cdc42 in mediating endothelial cell proliferation and tumor angiogenesis in breast cancer [J]. *PLoS One* , 2013 , 8(6) : e66275.
- [13] Ikehata M , Yamada A , Fujita K , et al. Cooperation of Rho family proteins Rac1 and Cdc42 in cartilage development and calcified tissue formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2018 , 500 (3) : 525 - 9.

Effect of Rac1 and Cdc42 on proliferation, invasion, migration and apoptosis of rhabdomyosarcoma cell lines

Shang Hao¹, Wang Ping^{1,2}, Liu Chunxia¹, et al

(¹*Dept of Pathology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002;*

²*Dept of Pathology, Shanxi Provincial People's Hospital Xi'an 710000)*

Abstract Objective To investigate the expression of Rac1 and Cdc42 in rhabdomyosarcoma (RMS) cells and their effect on proliferation, invasion, migration and apoptosis of RMS cells. **Methods** The expressions of Rac1 and Cdc42 were detected by qRT-PCR and Western blot in RMS cells and human skeletal muscle cells. The Rac1 and Cdc42 overexpression plasmids were constructed, and transfection efficiency was detected by qRT-PCR and Western blot. The effects of Rac1 and Cdc42 on the proliferation, invasion, migration and apoptosis of RMS cells were detected by CCK-8 assay, transwell system, wound-healing assay and flow cytometry assay. **Results** The expression levels of Rac1 and Cdc42 in RMS cells were higher than those in normal skeletal muscles cells. RMS cells transfected with Rac1 or Cdc42 overexpression plasmid had higher intracellular Rac1 and Cdc42 levels than those transfected with the empty vector (EV). Compared with the control group, overexpressing Rac1 and Cdc42 in RMS cells remarkably promoted proliferation, invasion, migration and anti-apoptosis. **Conclusion** Rac1 and Cdc42 are highly expressed in RMS cells and promote the malignant biological behavior of RMS cells by affecting the proliferation, invasion, migration and anti-apoptotic ability of RMS cells.

Key words rhabdomyosarcoma; Rac1; Cdc42