

· 论著 ·

癌基因 RhoA 对乳腺癌细胞血管内皮生长因子表达的调控机制研究

赵庆丽 马骥

【摘要】 目的 探讨乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中癌基因 RhoA 对 VEGF 蛋白表达和胞外分泌的影响及可能的分子机制。**方法** 将 RhoA 过表达质粒 pcDNA3.0-V14RhoA、对照质粒 pcDNA3.0、RhoA 沉默质粒 pcDNA3.0-shRhoA 转染到 MDA-MB-231 细胞中,通过 Western blot 和 ELISA 实验分别检测细胞内外 VEGF 蛋白的表达,通过 Western blot 和实时 PCR 方法分别检测 RhoA 对 p53 表达的影响及对 VEGF 的调控作用。均数比较用 t 检验;计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析。**结果** MDA-MB-231 细胞中上调 RhoA 表达后,胞内 VEGF 的蛋白表达水平增加;胞外分泌水平显著增加,与对照组相比差异具有统计学意义($F=4.020, P=0.032$);MDA-MB-231 细胞中沉默 RhoA 表达后,胞内 VEGF 的蛋白表达水平降低;胞外分泌水平显著降低,与对照组相比差异具有统计学意义($F=5.131, P=0.001$);并且与 0 h 相比,在 MDA-MB-231 细胞中上调 RhoA 可以抑制 p53 的表达(48 h: $F=3.231, P=0.043$),而 p53 表达的降低可以增加 VEGF 的表达水平(48 h: $F=3.226, P=0.015$),均差异具有统计学意义。**结论** 乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 RhoA 表达的变化可以引起胞内外 VEGF 水平的变化,并且 RhoA 可能是通过抑制 p53 的表达从而增加 VEGF 表达。

【关键词】 乳腺肿瘤; 血管内皮生长因子类; RhoA; p53

【中图法分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Regulatory mechanism of oncogene RhoA on the expression of vascular epithelial growth factor in breast cancer cells Zhao Qingli, Ma Ji. Department of Breast Diseases, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: Zhao Qingli, Email: zhaqingli@cscs.org.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of oncogene RhoA on protein expression of vascular epithelial growth factor (VEGF) and exocytosis in breast cancer cell line MDA-MB-231 and its potential molecular mechanism. **Methods** RhoA-overexpressed plasmid pcDNA3.0-V14RhoA, control plasmid pcDNA3.0 and RhoA-silencing plasmid pcDNA3.0-shRhoA were transfected into MDA-MB-231 cells. After that, VEGF protein expression was detected by Western blot and ELISA assay. The effects of RhoA on p53 expression and on VEGF regulation were examined by Western blot or real-time PCR. The means were compared using t text, and the measurement data were expressed as $\bar{x} \pm s$ and processed using analysis of variance. **Results** After up-regulating RhoA in MDA-MB-231 cells, intracellular VEGF protein level and extracellular secretion level were significantly increased compared with the control group ($F=4.020, P=0.032$), while after down-regulating RhoA in MDA-MB-231 cells, intracellular VEGF protein level and extracellular secretion level were significantly decreased compared with the control group ($F=5.131, P=0.001$). Compared with the control group, the upregulation of RhoA could inhibit p53 expression (48 h: $F=3.231, P=0.043$) and the decrease of p53 expression could promote VEGF expression (48 h: $F=3.226, P=0.015$). **Conclusion** In breast cancer MDA-MB-231 cells, the change of RhoA expression can cause the change of intracellular and extracellular VEGF expression, and RhoA may promote VEGF expression through inhibiting p53 expression.

【Key words】 Breast neoplasms; Vascular endothelial growth factors; RhoA; p53

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2014.05.004

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81202085)

作者单位:730050 兰州,中国人民解放军兰州军区兰州总医院乳腺科

通信作者:赵庆丽, Email: zhaqingli@cscs.org.cn

RhoA 作为小 G 蛋白家族中的一员,参与了肿瘤细胞的转移、侵袭、增殖、凋亡和周期调控等多个环节,并且扮演着众多信号通路分子开关的角色^[1-3]。肿瘤血管生成是内皮细胞和肿瘤细胞共同作用的结果,有关 RhoA 参与肿瘤血管生成的研究已经表明,RhoA 可以通过促进细胞激动纤维蛋白的合成增加血管内皮细胞的成环能力^[4]。但是,RhoA 是否也能通过对肿瘤细胞的调控参与肿瘤血管生成还不清楚。为了回答这一问题,笔者以乳腺癌细胞 MDA-MB-231 为研究对象,观察 RhoA 对细胞内外 VEGF 表达的影响,探讨其可能的分子机制。

1 材料方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购买于中国科学院上海细胞库,采用含有 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素的 L-15 培养液,37 ℃、5% 的 CO₂ 培养箱常规培养。调整细胞的培养状态,当细胞处于对数生长期时进行实验。

1.2 基因转染

按照质粒提取说明书,分别提取 RhoA 过表达质粒 pcDNA3.0-V14RhoA、对照质粒 pcDNA3.0、RhoA 沉默质粒 pcDNA3.0-shRhoA。以上质粒均购自美国 Addgene 公司。按照脂质体 2000 转染试剂盒进行转染,转染后的细胞在孵箱培养 48 h 后,收集细胞。实验总共分为 3 组:对照组、过表达组、沉默组。

1.3 Western blot 实验

将转染的细胞用 PBS 清洗 3 次,使用裂解液裂解细胞,低温离心后收集裂解物上清液,用 Bradford 法测定蛋白浓度,配制分离胶和浓缩胶,按每条泳道蛋白样品 80~100 μg 上样电泳,半干法恒压 100 V 转膜 120 min,丽春红染液染色,初步观察蛋白转移情况,再用 TBST 溶液洗净丽春红,5% 脱脂奶粉于室温封闭 1 h,TBST 溶液稀释 RhoA 抗体(1:1000)、β-actin 抗体(1:3000)、p53 抗体(1:1000)和 VEGF 抗体(1:1000)(以上抗体均购自美国 Sigma 公司),4 ℃孵育过夜后 TBST 室温摇洗 3 次,8~10 min/次,TBST 稀释辣根酶标记的二抗,于室温下孵育 1 h,TBST 摇洗 3 次,8~10 min/次,电化学发光(ECL)显色。

1.4 ELISA 实验

将转染不同质粒的细胞撤血清培养,分别收集细胞培养上清液,将上清液离心后加到人源化的 VEGF 单克隆抗体 ELISA 检测试剂板上,37 ℃孵育 1 h 后,用漂洗液洗涤 3~5 次,每孔加入工作液,避光继续孵育 15 min 后每孔加入终止液,最后在 490 nm 酶标仪上检测吸光度值,设计 3 个复孔。

1.5 实时 PCR 实验

按 Trizol 操作说明书,分别提取不同转染细胞的总 RNA,逆转录反应合成 cDNA 后,以 β-actin 为内参照,按照实时 PCR 试剂盒进行 PCR 反应,最后使用 Applied biosystems 7500 实时 PCR 系统 SDS 软件分析数据。RhoA 引物:上游 5'-CA TCCGGAAGAACTGGT-3';下游 5'-TCCCACAAA GCCAACTC-3';VEGF 引物:上游 5'-CGCCTCTCC AAAAAGCTACAC-3';下游 5'-CTCACAGGAAACC GGACA TC-3';p53 引物:上游 5'-CGTCAGAAGCA CCCAGGACT-3';下游 5'-CATCCTCCTCCCCACA ACAA-3'。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,不同分组的均数比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染质粒对 MDA-MB-231 细胞中 RhoA 表达的影响

Western blot 和实时 PCR 检测结果显示,无论是蛋白水平还是 RNA 水平,转染沉默质粒 pcDNA3.0-shRhoA 后,细胞 RhoA 的表达降低(图 1a、1b);而转染过表达质粒 pcDNA3.0-V14RhoA 后,细胞 RhoA 的表达明显升高(图 1c、1d)。与对照组相比,沉默组和过表达组中 RhoA 的 mRNA 表达差异具有统计学意义(*t* = 2.343, *P* = 0.023; *t* = 2.094, *P* = 0.039)。

2.2 RhoA 上调或沉默对 MDA-MB-231 细胞内外 VEGF 表达的影响

从图 2 可见,上调 RhoA 后无论是胞内(图 2a)还是胞外(图 2b) VEGF 的表达水平均显著增加;沉默 RhoA 后胞内表达和胞外分泌的 VEGF 水平明显降低。与对照组相比,沉默组和过表达组 VEGF 的分泌水平差异具有统计学意义(*F* = 4.020,

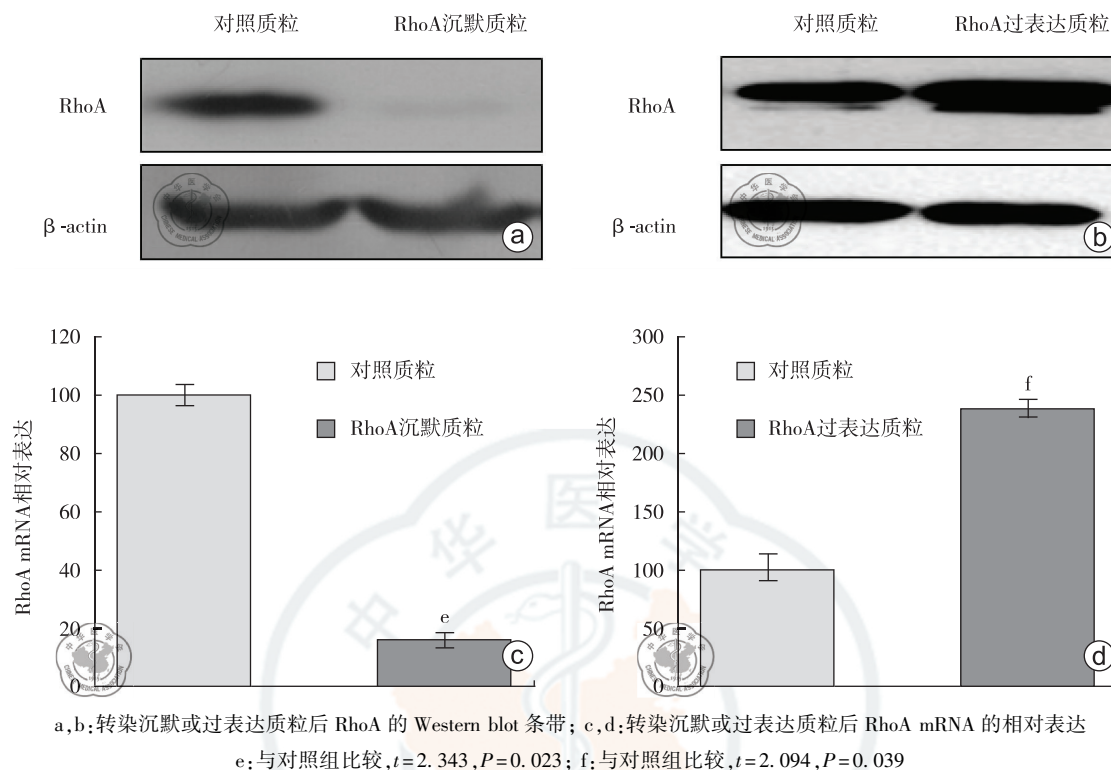


图1 转染沉默或过表达质粒后 MDA-MB-231 细胞中的 RhoA mRNA 的表达

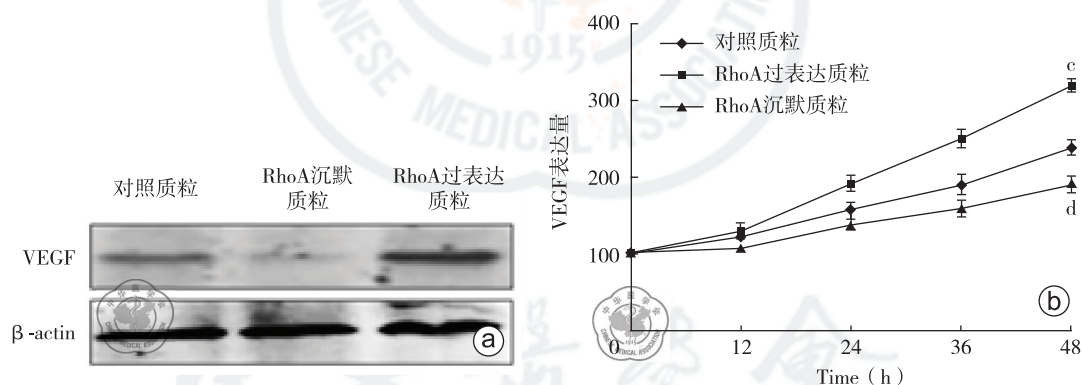


图2 RhoA 的上调或沉默对 MDA-MB-231 细胞 VEGF 表达的影响

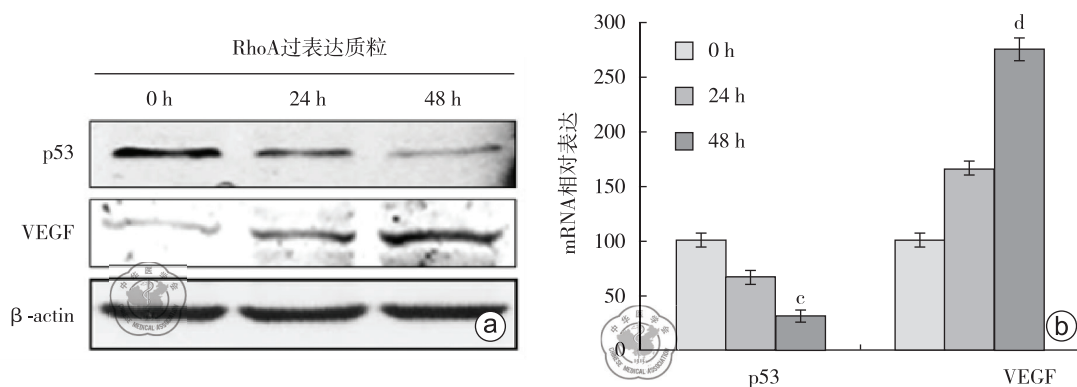
$P=0.032$; $F=5.131, P=0.001$)。这些结果表明, RhoA 可以影响乳腺癌细胞 VEGF 的表达。

2.3 RhoA 抑制 p53 从而上调 VEGF 的表达

从图 3 可见, 上调 RhoA 可以抑制 p53 在蛋白和转录水平的表达, 从而增加 VEGF 的水平, 并且处理时间越长, 这种调控效应越明显。与 0 h 相比, p53 或 VEGF 在 48 h 的表达差异具有统计学意义 (p53: $F=3.231, P=0.043$; VEGF: $F=3.226, P=0.015$)。

3 讨论

肿瘤血管生成是肿瘤发生发展中的重要事件, 它涉及多个步骤和阶段, 并且有众多促血管和抗血管生成因子的参与^[5]。VEGF 是一种强大的血管生成促进因子, 在血管的生成和维持中起着关键的作用^[6]。除了 VEGF 之外, RhoA 也参与肿瘤血管生成过程。研究发现, 使用细胞毒素和化学物质抑制 RhoA 蛋白, 或用腺病毒介导 RhoA 蛋白负显性突变体, RhoA 信号都能够抑制 VEGF 依



a: 转染过表达质粒后 VEGF 与 p53 的 Western blot 条带; b: 转染过表达质粒后 VEGF 与 p53 的 mRNA 表达

c: 与 0 h 比较, $F=3.231$, $P=0.043$; d: 与 0 h 比较, $F=3.226$, $P=0.015$

图 3 RhoA 抑制 p53 表达上调 VEGF 表达

赖的毛细血管的形成^[7],而且 RhoA 和其下游效应分子能够在 VEGF 诱导的毛细血管形成中发挥关键的调控作用。VEGF 还能够使得内皮细胞中的 RhoA 激活,并且向膜表面移动,同时引起 F-actin 的形成和重组,而抑制 RhoA 的活性则减弱 VEGF 所诱导的内皮细胞中的 RhoA 的移动和新生血管的产生^[8]。这说明 RhoA 不仅通过 VEGF 通路参与了肿瘤新生血管的形成,而且能够使得内皮细胞重组排列。尽管如此,这些研究都集中在 RhoA 与内皮细胞的调控关系上,至于 RhoA 对肿瘤细胞 VEGF 分泌的影响还不清楚。本研究发现,RhoA 上调或沉默后,能够显著的增加或降低乳腺癌细胞 VEGF 的表达和分泌。

抑癌基因 p53 作为一种抗血管生成因子在肿瘤血管生成中发挥作用,它能够抑制 VEGF 的表达,从而抑制血管生长。p53 基因具有转录因子和肿瘤抑制因子的双重作用,它涉及肿瘤的发生发展,在一半以上的人类癌症中缺失或突变^[9]。已有研究证实,p53 通过调控 Sp1 的转录活性和下调 Src 激酶的活性,有效抑制 VEGF 的表达^[10-11]。本研究也发现,RhoA 对 VEGF 的调控可能也是通过下调 p53 的表达来实现的,无论是在蛋白还是转录水平,上调 RhoA 的表达后,p53 的表达受到抑制,而 VEGF 的水平增加。这也就解释了 RhoA 的表达能够影响胞外 VEGF 分泌的现象,因为只有分泌到胞外的 VEGF 才能发挥功能。

本研究主要研究 RhoA 对乳腺癌细胞 VEGF 的生成和可能涉及的分子机制。这对以往关于 RhoA 通过对内皮细胞的影响而参与血管生成的认识是一种补充,因为肿瘤血管生成是内皮细胞

和肿瘤细胞共同作用的结果,而 RhoA 不仅可以影响内皮细胞的增殖和成环,而且可以增加肿瘤细胞分泌 VEGF,从而参与肿瘤血管生成。这为以 RhoA 为治疗靶点的抗血管生成治疗提供了理论依据和实验证据。

参 考 文 献

- [1] Wang Y, Zheng XR, Riddick N, et al. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 2009, 104(4): 531-540.
- [2] Aspenström P, Ruusala A, Pacholsky D. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(17): 3673-3679.
- [3] Wu M, Wu ZF, Rosenthal DT, et al. Characterization of the roles of RHOC and RHOA GTPases in invasion, motility, and matrix adhesion in inflammatory and aggressive breast cancers [J]. Cancer, 2010, 116(11 Suppl): 2768-2782.
- [4] Chang CC, Tsai SY, Lin H, et al. Aryl-hydrocarbon receptor-dependent alteration of FAK/RhoA in the inhibition of HUVEC motility by 3-methylcholanthrene[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(19): 3193-3205.
- [5] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 401-410.
- [6] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(6): 789-791.
- [7] Ogata S, Morishige K, Sawada K, et al. Fasudil inhibits lysophosphatidic acid-induced invasiveness of human ovarian cancer cells[J]. Int J Gynecol Cancer, 2009, 19(9): 1473-1480.
- [8] Li H, Peng W, Jian W, et al. ROCK inhibitor fasudil attenuated high glucose-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and monocyte-endothelial cell adhesion [J]. Cardiovasc Diabetol, 2012, 11: 65.
- [9] Quartuccio SM, Lantvit DD, Bosland MC, et al. Conditional inactivation of p53 in mouse ovarian surface epithelium does not alter MIS driven Smad2-dominant negative epithelium-lined

- inclusion cysts or teratomas [J]. PLoS One, 2013, 8 (5): e65067
- [10] Zietz C, Rössle M, Haas C, et al. MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up-regulation in angiosarcomas[J]. Am J Pathol, 1998, 153(5): 1425-1433.
- [11] Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma [J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6952-6957.
- (收稿日期: 2014-01-22)
- (本文编辑: 刘军兰)

赵庆丽, 马骥. 癌基因 RhoA 对乳腺癌细胞血管内皮生长因子表达的调控机制研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2014, 8(5): 319-323.

