

Rac1 蛋白调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分泌血管内皮生长因子的研究

马骥 赵庆丽 赵易 刘颖

【摘要】 目的 探讨 Rac1 蛋白对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分泌血管内皮生成因子(VEGF)的调控作用。**方法** 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中分别转染 Rac1 正显性真核表达质粒(V12Rac1 组)及空白对照质粒(空白对照组)和 Rac1 小干扰 RNA(siRac1 组)及对照小干扰 RNA(沉默对照组)后,通过 ELISA 分别检测转染后 24、48、72 h 由 MDA-MB-231 细胞分泌的 VEGF 蛋白水平;通过 Western blot 检测各组血管生成相关因子 p53 和 VEGF 表达的变化。两组 Western blot 定量分析数据比较采用 t 检验, VEGF 分泌数据采用重复测量的方差分析。**结果** ELISA 分析结果显示:当 MDA-MB-231 细胞中高表达 Rac1 时,细胞分泌的 VEGF 水平随着时间的延长而逐渐升高,与空白对照组相比组间差异有统计学意义(组间比较: $F = 837.122, P < 0.001$; 不同时间点比较: $F = 57\ 806.374, P < 0.001$; 交互作用: $F = 7\ 663.095, P < 0.001$);当 MDA-MB-231 细胞中低表达 Rac1 时,细胞分泌的 VEGF 水平随着时间的延长逐渐升高,但低于沉默对照组,差异有统计学意义(组间比较: $F = 511.891, P < 0.001$; 不同时间点比较, $F = 268.078, P < 0.001$; 交互作用: $F = 120.708, P = 0.001$)。Western blot 结果显示,当 MDA-MB-231 细胞高表达 Rac1,与空白对照组相比,p53 蛋白表达降低($t = -6.392, P = 0.003$),VEGF 蛋白表达升高($t = 7.497, P = 0.002$);当 MDA-MB-231 细胞中低表达 Rac1,与沉默对照组相比,p53 蛋白表达增加($t = 5.307, P = 0.006$),VEGF 蛋白表达降低($t = -7.395, P = 0.002$)。**结论** 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中,Rac1 表达高低可以引起细胞分泌 VEGF 的水平变化,Rac1 可能通过抑制 p53 表达而增加 VEGF 表达。

【关键词】 乳腺肿瘤; 血管内皮生长因子类; 肿瘤抑制蛋白质 p53; Rac1 蛋白质,人

【中图法分类号】 R737.9

【文献标志码】 A

Regulatory effect of Rac1 protein on vascular endothelial growth factor secreted in breast cancer MDA-MB-231 cells Ma Ji, Zhao Qingli, Zhao Yi, Liu Ying. Department of Breast Surgery, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China

Corresponding author: Zhao Qingli, Email: 76392201@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effect of Rac1, one member of Rho protein family, on vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** MDA-MB-231 cells were transfected by Rac1 constitutively-active mutant plasmid pCEFL-GST-V12Rac1 (V12Rac1 group), blank plasmid pCEFL-GST-neo (blank control group), small interference Rac1 RNA (siRac1 group) and small interference RNA of control (si-control group) respectively. VEGF expression levels in MDA-MB-231 cells were determined by ELISA assay at different time points (24, 48, 72 h after transfection). Western blot assay was performed to detect the relative expressions of angiogenesis-related factors p53 and VEGF. VEGF expression levels were compared by repeated measurement analysis of variance and t test was used to compare the quantitative data of Western blot. **Results** ELISA assays showed that after up-regulating Rac1 expression in MDA-MB-231 cells, VEGF level was gradually increased with time, indicating a significant difference compared with blank control group (group comparison: $F = 837.122, P < 0.001$; comparison of different time points: $F = 57\ 806.374, P < 0.001$; interaction of grouping and time: $F = 7\ 663.095, P < 0.001$).

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2016.01.003

基金项目:国家青年科学基金资助项目(81202085);甘肃省科技计划资助项目(1506RJDA296);兰州市科技计划资助项目(2014-1-39)

作者单位:730050 解放军兰州军区兰州总医院乳腺科

通信作者:赵庆丽,Email: 76392201@qq.com

After down-regulating Rac1, VEGF level was significantly lower than that in si-control group (group comparison: $F=511.891, P<0.001$; comparison of different time points: $F=268.078, P<0.001$; interaction of grouping and time: $F=120.708, P=0.001$). Western blot assay showed that in MDA-MB-231 cells, the increased Rac1 expression could inhibit p53 expression ($t=-6.392, P=0.003$) and enhance VEGF expression ($t=7.497, P=0.002$) compared with blank control group, while decreased Rac1 expression could elevate p53 expression ($t=5.307, P=0.006$) and inhibit VEGF expression ($t=-7.395, P=0.002$) compared with si-control group. **Conclusion** Rac1 expression could affect VEGF expression in breast cancer MDA-MB-231 cells and Rac1 may promote VEGF expression through inhibiting p53 expression.

【Key words】 Breast neoplasms; Vascular endothelial growth factors; Tumor suppressor protein p53; RAC1 protein, human

Rho 蛋白属于小 G 蛋白家族,目前已经发现了至少 21 个 Rho 家族蛋白分子,包括 Rho 亚家族 (RhoA、RhoB、RhoC)、Rac 亚家族 (Rac1、Rac2、Rac3、RhoG)、Cdc42 亚家族 (Cdc42、TC10、TCL、Wrch1、chp/Wrch2)、Rnd 亚家族 (Rnd1、Rnd3/RhoE、Rnd2)、RhoBTB 亚家族 (RhoBTB1、RhoBTB2) 等^[1-3]。研究发现,Rho 蛋白在肿瘤中异常表达,可以激活多条信号途径,从而在肿瘤的恶性转型、异常增殖、侵袭和转移等方面发挥重要作用^[4]。Rac1 是目前研究较多的 Rho 蛋白家族成员,已证实其主要在恶性肿瘤进程中发挥作用。有研究发现,Rac1 蛋白在乳腺癌、胃癌组织中高表达,并且可以促进肿瘤细胞的过度增殖和侵袭^[5-6]。另外,Rac1 蛋白也参与恶性肿瘤血管生成,促进肿瘤血管腔的形成^[7]。尽管如此,Rac1 蛋白是否影响肿瘤血管生成相关因子的表达和调控尚不清楚。本研究主要探讨了 Rac1 蛋白对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 VEGF 分泌和表达调控的影响。

资料与方法

一、主要试剂

ELISA 试剂盒购自美国 Santa 公司。兔抗人 VEGF、鼠抗人 p53 等抗体购自英国 Abcam 公司,鼠抗人 β -actin 抗体购自武汉博士德公司。脂质体购自美国 Invitrogen 公司。

二、细胞培养

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购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 RPMI1640 培养液,在 37 ℃、5% 的 CO₂ 培养箱培养。

三、基因转染及实验分组

实验分组如下:(1) Rac1 正显性表达组(转染 Rac1 正显性真核表达质粒 pCEFL-GST-V12Rac1, V12Rac1 组)和 Rac1 正显性对照组(转染空白对照

质粒 pCEFL-GST-neo,空白对照组);(2) Rac1 沉默组(转染 Rac1 小干扰 RNA, siRac1 组)和 Rac1 沉默对照组(转染对照小干扰 RNA,沉默对照组)。空白对照质粒 pCEFL-GST-neo 及 Rac1 正显性真核表达质粒 pCEFL-GST-V12Rac1 由美国辛辛那提大学 (University of Cincinnati) Zheng Yi 教授馈赠。Rac1 小干扰 RNA 和对照小干扰 RNA 均由上海吉玛公司合成。按照脂质体说明书进行基因转染,细胞转染后 6~8 h 更换培养液并继续培养 48 h 后收集细胞。

四、ELISA 实验

为了消除血清对细胞的刺激,使用撤血清培养液将不同转染后的细胞分别培养 24、48、72 h,收集细胞培养上清液,将上清液离心后使用移液器加入到人源化的 VEGF 单克隆抗体 ELISA 试剂板上,置于 37 ℃ 恒温箱孵育 1 h 后,用 PBS 洗涤 5 次,每次 5 min,再将每孔中加入工作液,避光孵育 15 min 后,加入终止液并在 490 nm 酶标仪检测吸光值。每组设计 3 个复孔。

五、Western blot

使用细胞裂解液裂解细胞沉淀并收集裂解物上清液,Bradford 法测定蛋白浓度并计算上样量,按每条泳道蛋白样品 100 μ g 上样,电泳结束后采用湿转法恒压 100 V 转膜 120 min,将碳酸纤维素膜浸于 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。采用抗体稀释液稀释 β -actin 抗体 (1 : 5 000)、p53 抗体 (1 : 1 000) 和 VEGF 抗体 (1 : 1 000),4 ℃ 冰箱孵育过夜,清洗碳酸纤维素膜,孵育辣根酶标记的二抗 (1 : 5 000) 1 h,清洗后电化学发光法显影。

六、统计学分析

应用 SPSS17.0 软件对实验数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 t 检验。ELISA 法检测 VEGF 数据采用重复测量的方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P<0.050$ 为差异有统计学意义。Western blot 灰度值采用 Kodak Digital Science 1D 软件分析。

结 果

一、Rac1 表达对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞分泌 VEGF 的影响

ELISA 检测结果显示:在空白对照组中,随着观察时间的延长,MDA-MB-231 细胞分泌的 VEGF 表达逐渐增加;在 V12Rac1 组中,Rac1 正显性表达后 MDA-MB-231 细胞分泌的 VEGF 随时间延长显著增加,高于空白对照组,差异有统计学意义,具体统计数据见表 1。在 siRac1 组中,Rac1 沉默表达后 MDA-MB-231 细胞分泌的 VEGF 逐渐升高,但仍低于沉默对照组,差异有统计学意义,具体统计数据见表 2。

表 1 ELISA 检测 V12Rac1 对 MDA-MB-231 细胞分泌 VEGF 的影响

组别	实验次数	VEGF 蛋白表达水平 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	3	102.21 \pm 2.01	135.31 \pm 3.60	168.09 \pm 2.62
V12Rac1 组	3	113.54 \pm 4.53	173.11 \pm 3.55	255.02 \pm 4.55

注:分组比较, $F = 837.122$, $P < 0.001$;不同时间点比较, $F = 57806.374$, $P < 0.001$;时间因素和分组之间有交互作用, $F = 7663.095$, $P < 0.001$;同一时间点各组两两比较, P 均 < 0.050

表 2 ELISA 检测 siRac1 对 MDA-MB-231 细胞分泌 VEGF 的影响

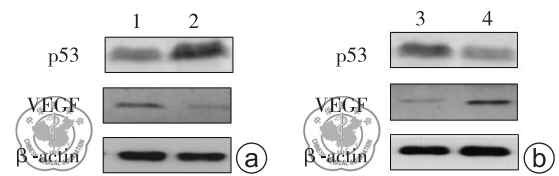
组别	实验次数	VEGF 蛋白表达水平 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)		
		24 h	48 h	72 h
沉默对照组	3	102.04 \pm 3.11	136.55 \pm 3.72	168.62 \pm 4.35
siRac1 组	3	93.11 \pm 3.20	104.23 \pm 4.00	107.15 \pm 3.83

注:分组比较, $F = 511.891$, $P < 0.001$;不同时间点比较, $F = 268.078$, $P < 0.001$;时间因素和分组之间有交互作用, $F = 120.708$, $P = 0.001$;同一时间点各组两两比较, P 均 < 0.050

二、Rac1 通过调控 p53 蛋白而影响 VEGF 表达

Western blot 实验显示:当 siRac1 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞内 Rac1 表达时,血管生成抑制因子 p53 蛋白在 siRac1 组中的相对表达量明显高于沉默对照组,差异具有统计学意义 ($t = 5.307$, $P = 0.006$, 图 1a);VEGF 蛋白在 siRac1 组中的相对表达量明显低于沉默对照组,差异具有统计学意义 ($t = -7.395$, $P = 0.002$, 图 1a,表 3)。当 V12Rac1 正显性激活 MDA-MB-231 细胞内 Rac1 表达时,p53 蛋白在 V12Rac1 组中的相对表达量明显低于空白对照组,差异具有统计学意义 ($t = -6.392$, $P = 0.003$, 图 1b);VEGF 蛋白在 V12Rac1 组中的相对

表达量 (1.323 ± 0.089) 明显高于空白对照组,差异具有统计学意义 ($t = 7.497$, $P = 0.002$, 图 1b,表 4)。



注:1 为沉默对照组;2 为 siRac1 组;3 为空白对照组;4 为 V12Rac1 组

图 1 Western blot 检测过表达 Rac1 对 p53 和 VEGF 表达的影响

表 3 siRac1 组及沉默对照组 Western blot 实验定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	p53 ^a	VEGF ^a
沉默对照组	3	1.407 \pm 0.077	1.163 \pm 0.140
siRac1 组	3	2.623 \pm 0.389	0.483 \pm 0.075
t 值		5.307	-7.395
P 值		0.006	0.002

注:^a表中数据为 p53 或 VEGF 的相对表达量

表 4 V12Rac1 组及空白对照组 Western blot 实验定量分析结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	实验次数	p53 ^a	VEGF ^a
空白对照组	3	2.043 \pm 1.114	0.643 \pm 0.130
V12Rac1 组	3	1.425 \pm 0.123	1.323 \pm 0.089
t 值		-6.392	7.497
P 值		0.003	0.002

注:^a表中数据为 p53 或 VEGF 的相对表达量

讨 论

Rac1 是 Rho 蛋白家族成员之一。现已发现,Rac 亚家族主要包括 Rac1、Rac2、Rac3 和 Rac1 的剪切突变体 Rac1b,虽然它们在蛋白质序列方面有 85% 以上的同源性,但是具体的生物学功能不尽相同^[8-9]。Rac2 主要在造血细胞中表达,参与血液系统相关功能调控;而 Rac3 在脑组织中表达较高,在脑细胞基本功能及相关疾病中发挥作用^[10-11]。Rac1 是一个癌基因,参与细胞的恶性转化,尤其是在细胞骨架重组、侵袭迁移、凋亡等方面发挥作用^[12]。

文献报道,Rac1 在乳腺癌、胃癌等组织中呈高表达,并且与肿瘤高 TNM 分期、高增殖、易转移复发等临床病理学因素密切相关^[5-6]。笔者的前期研究也证实,Rac1 蛋白在正常乳腺组织中几乎不表达,而在乳腺癌组织中的阳性表达率为 35.9%,该蛋白

的高表达与患者的年龄、肿瘤大小、组织分化程度等均无相关性,而与 TNM 分期、淋巴结转移、肿瘤侵袭、Ki67 表达等相关^[13]。这些研究再次证实了 Rac1 在恶性肿瘤进程中的促癌作用。Rho 蛋白成员 RhoA 在肿瘤血管生成中发挥作用,RhoA 在缺氧条件下能够促进肿瘤细胞分泌 VEGF,促进血管内皮细胞形成初级血管腔,而且 RhoA 本身能够增加血管内皮细胞的增殖活性和肌动纤维蛋白的形成;机制研究发现,RhoA 通过抑制血管生长抑制因子 p53 的表达从而增加 VEGF 的表达,最终促进血管生成^[14-17]。尽管如此,有关 Rac1 在肿瘤血管生成中的研究还较少,其相关分子机制还未阐明。本研究以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象,通过转染正显性 Rac1 和小干扰 RNA 分别在细胞中激活和抑制 Rac1 的表达,随着时间的延长,肿瘤细胞分泌的 VEGF 发生变化,激活 Rac1 时能够显著增加肿瘤细胞分泌 VEGF,而抑制 Rac1 时肿瘤细胞 VEGF 的分泌也受到了抑制。这就说明,Rac1 确实促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分泌 VEGF,促进血管生成。接着,本研究探讨了 Rac1 调控 VEGF 水平的机制。本研究发现当抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞内 Rac1 蛋白表达时,p53 蛋白表达明显增加,VEGF 表达显著减少;而当激活细胞内 Rac1 蛋白时,p53 蛋白表达降低,VEGF 表达反而增加。这不仅和笔者之前有关 RhoA 蛋白对 p53 和 VEGF 的调控研究结果^[15]相一致,而且也表明了肿瘤细胞中 Rac1 蛋白也可以通过对 p53 和 VEGF 蛋白的调控参与肿瘤血管的生成。这些研究结果证实了 Rho 蛋白家族重要成员 RhoA 和 Rac1 都能够参与并调控肿瘤血管生成,并且主要通过对血管抑制因子 p53 和血管生长因子 VEGF 的调控来实现的。

本研究以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象,应用 Rac1 正显性激活质粒或小干扰 RNA 在肿瘤细胞内激活 Rac1 或抑制 Rac1 表达,通过 ELISA 实验检测到 Rac1 可以影响肿瘤细胞 VEGF 的分泌,进一步通过 Western blot 检测发现,Rac1 通过抑制 p53 蛋白表达,增加 VEGF 表达,从而参与肿瘤血管生成过程。本研究明确了 Rac1 参与和调控肿瘤血管生成的作用和机制,为 Rac1 成为肿瘤抗血管生成治疗的新靶点提供了理论依据。

参 考 文 献

[1] Loirand G, Sauzeau V, Pacaud P. Small G proteins in the

cardiovascular system: physiological and pathological aspects [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(4): 1659-1720.

- [2] Stankiewicz TR, Linseman DA. Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8:314.
- [3] Van de Velde S, De Groef L, Stalmans I, et al. Towards axonal regeneration and neuroprotection in glaucoma: Rho kinase inhibitors as promising therapeutics [J]. *Prog Neurobiol*, 2015, 131:105-119.
- [4] Matsuoka T, Yashiro M. Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(38): 13 756-13 766.
- [5] 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.
- [6] Ji J, Feng X, Shi M, et al. Rac1 is correlated with aggressiveness and a potential therapeutic target for gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3): 1343-1353.
- [7] Gonzalez-Villasana V, Fuentes-Mattei E, Ivan C, et al. Rac1/Pak1/p38/MMP-2 axis regulates angiogenesis in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(9): 2127-2137.
- [8] Li SM, Zeng LW, Feng L, et al. Rac1-dependent intracellular superoxide formation mediates vascular endothelial growth factor-induced placental angiogenesis in vitro [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(11): 5315-5325.
- [9] Kato T, Kawai K, Egami Y, et al. Rac1-dependent lamellipodial motility in prostate cancer PC-3 cells revealed by optogenetic control of Rac1 activity [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97749.
- [10] Braun AC, Olayioye MA. Rho regulation: DLC proteins in space and time [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(8): 1643-1651.
- [11] Braet F. Rac1, caveolin-1 and vascular endothelial growth factor-mediated liver sinusoidal endothelial cell angiogenesis [J]. *Liver Int*, 2009, 29(2): 143-144.
- [12] Zins K, Lucas T, Reichl P, et al. A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74924.
- [13] 刘颖,蔡黔,乔如丽,等. Rac1 和 Cdc42 在乳腺癌中的表达和临床意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(1): 92-95.
- [14] Ma J, Xue Y, Cui W, et al. Ras homolog gene family, member A promotes p53 degradation and vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis through an interaction with murine double minute 2 under hypoxic conditions [J]. *Cancer*, 2012, 118(17): 4105-4116.
- [15] 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.
- [16] 马骥,赵庆丽,钟翠萍,等. RhoA 对食管癌 Eca-109 细胞 VEGF 表达的调控作用 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2014, 19(6): 486-489.
- [17] 马骥,赵庆丽,任晖,等. RhoA 在缺氧诱导的乳腺癌细胞 VEGF 分泌和血管内皮细胞增殖、迁移及管腔形成中的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(6): 784-788.

(收稿日期:2015-08-25)

(本文编辑:刘军兰)

马骥,赵庆丽,赵易,等. Rac1 蛋白调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分泌血管内皮生长因子的研究 [J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2016, 10(1): 10-13.