

Radil的异常表达对胆管癌细胞增殖和运动的影响

周正君 柯爱武 孙海香*

(复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032)

摘要 Radil(Ras association and DIL domains)是细胞黏附运动的重要调控分子, 但其在肿瘤中研究较少。该文探讨Radil在胆管癌中的表达特点, 分析其对细胞增殖和运动的影响, 探索调控Radil表达的分子机理。通过实时荧光定量PCR和Western blot分别对癌及癌旁组织进行mRNA和蛋白质水平检测; 利用CCK8、Transwell和划痕实验分析Radil对细胞增殖和运动的影响; 最后利用Chip-PCR和荧光素酶报告系统分析HIFs与Radil的关系。结果表明, Radil在癌组织中的表达显著高于癌旁组织; 高表达Radil导致其增殖速度增加, 运动能力增强, 而低表达Radil则导致胆管癌细胞的增殖速度下降, 运动能力显著减慢; Radil的表达受HIFs调节, Radil是HIFs的靶基因。上述结果表明, HIFs调控的Radil表达可促进胆管癌细胞的增殖和运动, 此发现有望为胆管癌的治疗提供参考。

关键词 胆管癌; Radil; HIFs; 增殖

Abnormal Expression of Radil Affects Proliferation and Migration of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells

ZHOU Zhengjun, KE Aiwu, SUN Haixiang*

(Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract Radil (Ras association and DIL domains) was an important factor that is previously known to regulate cell adhesion and cell migration. However, its functions have not yet been fully realized in various tumors. In this study, both characteristics of Radil expression and the Radil affected cell adhesion and cell migration were investigated in ICC (intrahepatic cholangiocarcinoma) tissues, in order to elucidate the molecular mechanism of regulation on Radil expressions. Assay of Real time-PCR and Western blot were used to detect the levels of mRNA and protein for Radil in collected ICC and peri-ICC tissues. Assays of CCK8, Transwell and wounding experiments were used to analyze its potential effects on cell proliferation and cell movement. Finally, assays of both Chip-PCR and Luciferase reporting system were used to determine the possible regulation of HIFs (hypoxia inducible factors) on Radil gene expression. Our results indicated that the expression levels of Radil in peri-ICC tissues were all significantly lower than those in ICC tissues. The increased Radil expression in ICC cells might promote their proliferation and migration levels, while reduced Radil expression in ICC cells decreased proliferation and migration levels. As a target gene, Radil was known to be regulated by HIFs. Together, our findings indicate that HIF-regulation promotes the high expression level of Radil, which further promotes both prolifera-

收稿日期: 2020-05-19 接受日期: 2020-07-22

国家自然科学基金(批准号: 81302100、81773069)和中山医院优秀青年基金(批准号: 2015ZSYXQN03)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-64041990, E-mail: sun.haixiang@zs-hospital.sh.cn

Received: May 19, 2020 Accepted: July 22, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81302100, 81773069), and Zhongshan Hospital Outstanding Youth Fund (Grant No.2015ZSYXQN03)

*Corresponding author. Tel: +86-21-64041990, E-mail: sun.haixiang@zs-hospital.sh.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5330>

tion and migration of ICC cells. Our findings provide the potential application to use Radil as a marker for treating prognosis of ICC.

Keywords ICC; Radil; HIFs; proliferation

胆管癌是全球第二大常见肝脏恶性肿瘤,在全球范围内其发病率和死亡率逐年增加^[1]。目前根治性手术切除是胆管癌治疗的有效方法,但很多病人在就诊时已处于中晚期,失去了最佳手术机会;并且该病术后易复发,胆管癌病人5年生存率很低。因此,深入探索分析胆管癌的发病、发展机理对于提高病人的治疗效果具有非常重要的指导意义。

具有DIL结构域的Ras相关蛋白(Ras association and DIL domains, Radil)是小分子G蛋白Ras相关蛋白1(Ras associated protein 1, Rap1)的下游效应分子,发挥作用时其可以与Rap1、G β γ 亚基结合形成复合物,并从胞质转移到细胞与基质黏附处,促进细胞与基质的黏附连接^[2],是细胞黏附、运动的必需分子。研究发现,低表达Radil可以显著降低细胞的黏附能力^[3],过表达Radil可以激活整合素通路,影响中性粒细胞的趋化作用。Radil还可以激活黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号通路,促进间质细胞对纤连蛋白的黏附,但敲低Radil可以减弱甲酰甲硫氨酸(N-formyl methionyl leucyl phenylalanine, fMLP)受体对细胞黏附的影响^[4]。Radil可以促进乳腺癌细胞的增殖,并促进乳腺癌到肺脏的转移,而降低Radil表达水平可以有效降低乳腺癌细胞的运动、侵袭能力,并阻断乳腺癌的发展^[5]。综上所述, Radil对细胞黏附、运动有着重要的影响,但是Radil在胆管癌中的作用还没有得到充分认识,尤其缺乏对其表达调控的研究。本研究旨在检测胆管癌组织中Radil的表达水平,通过改变Radil表达水平分析其对胆管癌细胞生长及运动的作用,探索其对胆管癌发展的影响;并分析缺氧诱导因子对Radil的调控作用,旨在为胆管癌的诊治提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

RPMI-1640培养液、胰酶和胎牛血清购自美国GIBCO公司。Trizol购自Sigma公司。引物购自上海生工生物工程股份有限公司。细胞裂解液(货号: P0013B)、BCA蛋白测定试剂盒(货号: P0010S)、BeyoECL star发光液(货号: P0018AFT)购

自上海碧云天生物技术有限公司。Radil(ab108032)、GAPDH(ab9484)、E-cadherin(ab1416)、vimentin(ab8978)抗体购自英国Abcam公司。cleaved caspase3(9661S)购自CST公司。HIF-1 α (100-105)、HIF-2 α (100-122)抗体均购自Novus公司。pIRES puro-GLUE-RADIL-HA过表达载体和pLKO.1-shRADIL敲低病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。超净工作台购自苏州净化设备公司。细胞培养箱、离心机购自美国Thermo公司。倒置显微镜购自德国Leica公司。

1.2 主要方法

1.2.1 临床标本与细胞系 选取复旦大学附属中山医院肝外科手术切除的胆管癌和对应的癌旁标本,实验均获得病人知情同意书且通过复旦大学附属中山医院伦理审查委员会批准(伦理审批号: 2019-181)。样品经液氮速冻后立即置入-80℃冰箱中保存。人胆管癌细胞系Hccc9810(9810)、RBE均购自中国科学院细胞库,用含10%胎牛血清的高糖RPMI-1640培养液进行培养。待细胞生长至90%融合度时,用0.25%的胰蛋白酶进行消化传代。利用pIRES puro-GLUE-RADIL-HA过表达载体和pLKO.1-shRADIL敲低病毒分别转染目的细胞,在感染72 h后加入终浓度为2 μ g/mL的嘌呤霉素,并维持该浓度7天,即可得到稳定表达的细胞株,以备进行后续实验。

1.2.2 实时荧光定量PCR 取对数生长期的胆管癌细胞, Trizol裂解进行抽提。引物序列如下: GAPDH F: 5'-CAA ATT CCA TGG CAC CGT CAA G-3', R: 5'-CAT CAG CAG AGG GGG CAG AGA-3'; Radil F: 5'-ATC ACA GGC TCG AAG GAA TC-3', R: 5'-CTT GGA GAC ATA GTA GAC GC-3'。

1.2.3 细胞增殖检测 取对数生长期的细胞,密度为3 $\times$ 10⁴个/mL,接种到96孔板中,每隔24 h各加入10 μ L CCK8检测液,用酶标仪进行吸光度(D)值检测。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western blot) 取对数生长期细胞加入RIPA裂解液,BCA法检测蛋白浓度,用酶标仪检测562 nm波长处的吸光度(D)值,根据标准曲线计算出样品的蛋白浓度。按照说明书配制分离胶和浓缩胶,上样量为80 μ g。经电泳、转膜

后,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入对应的一抗Radil(1:200)、GAPDH(1:1 000)、E-cadherin(1:500)、vimentin(1:500)、cleaved caspase3(1:500),4 °C孵育过夜,用对应种属的二抗(1:5 000)室温孵育1 h。最后用化学发光试剂曝光分析结果。

1.2.5 划痕实验 接种 3×10^4 个细胞至24孔培养皿中,待融合度到达100%时,换为无血清培养液,用枪头在培养皿上划“+”字,PBS洗涤,0、24、48 h后分别于倒置显微镜下拍照观察。

1.2.6 运动实验 将细胞稀释成 1×10^6 个/mL无血清的细胞悬液,取100 μ L细胞悬液加入上室,下室加入300 μ L培养液。培养72 h后经4%多聚甲醛固定10 min,吉姆萨染色,显微镜下计数并拍照。

1.2.7 染色质免疫共沉淀技术(chromatin immunoprecipitation PCR, Chip-PCR) 细胞经甲醛室温固定10 min,PBS洗涤。将收集的细胞放入超声水浴锅内,在冰水混合物中进行超声处理,将基因组长链DNA超声断裂成200~1 000 bp大小的DNA片段,离心取上清。取20 μ L样品作为input,其余样品中分别加入HIFs抗体和对应的IgG,4 °C孵育过夜,第二天加入

磁珠室温孵育2 h。 $16\ 000 \times g$ 离心2 min,取沉淀,分别利用低盐缓冲液、高盐缓冲液等缓冲液逐级洗脱,加入NaCl溶液65 °C孵育过夜解除染色质的固定,加入EDTA、Tris-HCl和蛋白酶65 °C孵育1 h,最后用酚氯仿法抽提,得到50 μ L纯化产物,用于PCR检测。

1.2.8 荧光素酶报告实验 取对数生长期细胞,接种 3×10^4 个细胞至24孔板。待细胞生长到60%的融合度时,利用Lipofectamine 2000转染试剂将过表达HIFs的质粒(pBabe)和过表达Radil启动子的质粒(GV272)共转染进细胞,空白载体作为阴性对照。48 h后,RIPA裂解细胞,按照说明书检测萤火虫荧光素荧光值和海肾荧光酶荧光值。

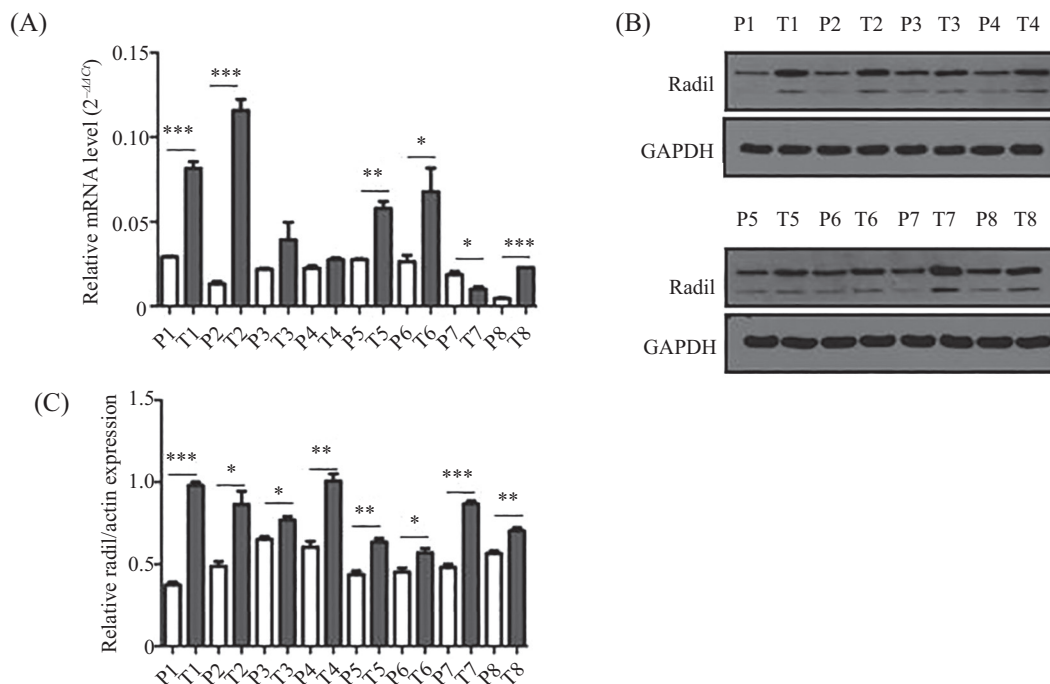
1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计分析软件处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Radil在胆管癌及癌旁组织中的表达情况

实时荧光定量PCR发现,Radil在癌和癌旁组织中均有表达,癌组织中的表达量显著高于癌旁组织



A: 实时荧光定量PCR检测Radil在胆管癌(T)和癌旁组织(P)的mRNA表达水平; B: Western blot检测Radil的蛋白表达水平; C: 蛋白灰度相对分析。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: Real time PCR was used to test the mRNA levels of Radil expression in ICC (T) and peri-ICC (P) tissues; B: Western blot was used to test the protein level of Radil; C: the relative protein expression level of Radil to actin was quantitatively analyzed by densitometer. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图1 Radil在胆管癌组织中的表达分析

Fig.1 The expression levels of Radil in ICC tissues

(图1A); Western blot结果也表明,不同病人的Radil表达量不同,癌旁组织中的表达量显著低于癌组织(图1B和图1C)。这些数据均表明, Radil可能对肝癌的发展具有促进作用。

2.2 Radil在胆管癌细胞系中的表达

通过实时荧光定量PCR和Western blot检测分析细胞系RBE和9810中Radil的表达水平(图2A)。在RBE细胞中转染shRNA载体,利用药物筛选,通过实时荧光定量PCR和Western blot验证得到低表达Radil的细胞株(图2B);同样,用构建的高表达Radil载体转染9810细胞,得到高表达Radil的9810细胞株(图2C)。

2.3 Radil对胆管癌细胞增殖的影响

细胞增殖实验结果发现:与对照组相比,高表达Radil可以显著提高9810细胞的生长速度,而Radil

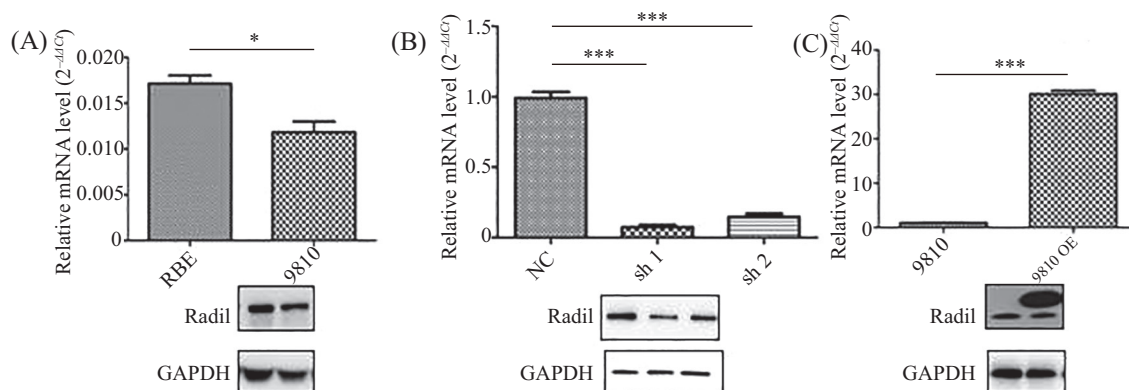
的低表达则显著降低RBE细胞的生长速度(图3)。

2.4 Radil对胆管癌细胞运动的影响

划痕实验分析发现,与对照组相比,在9810细胞中高表达Radil显著增加了细胞的运动能力,而低表达Radil则削弱了RBE细胞的运动能力(图4A);Transwell运动实验同样证明了这一结论(图4B)。Western blot结果发现, Radil过表达显著降低了凋亡分子cleaved caspase3的表达,而EMT相关分子则表达增加(图4C)。

2.5 HIFs对Radil在胆管癌细胞中表达的调控作用

经缺氧培养处理后的细胞中HIFs和Radil表达量均随着缺氧时间增长而增加(图5A)。Chip-PCR分析发现,与IgG相比,无论HIF1还是HIF2均显著富集了Radil(图5B)。荧光素酶报告系统证实:与对照组

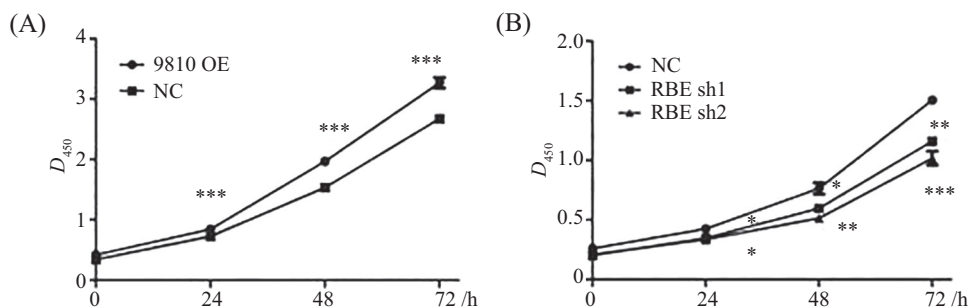


A: Radil在胆管癌细胞系(RBE和9810)中的表达分析; B: 敲低后Radil在RBE中的表达水平; C: 过表达转染后Radil在9810的表达水平。NC: 阴性对照组; sh: 敲低组; OE: 过表达组。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: Radil expression levels was analyzed in ICC cell lines (RBE and 9810); B: the knockdown level of Radil in RBE cell line; C: the overexpression level of Radil in 9810 cell line. NC: negative control; sh: shRNA group; OE: over expression group. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图2 Radil在胆管癌细胞中的表达

Fig.2 Expression levels of Radil in ICC cell lines

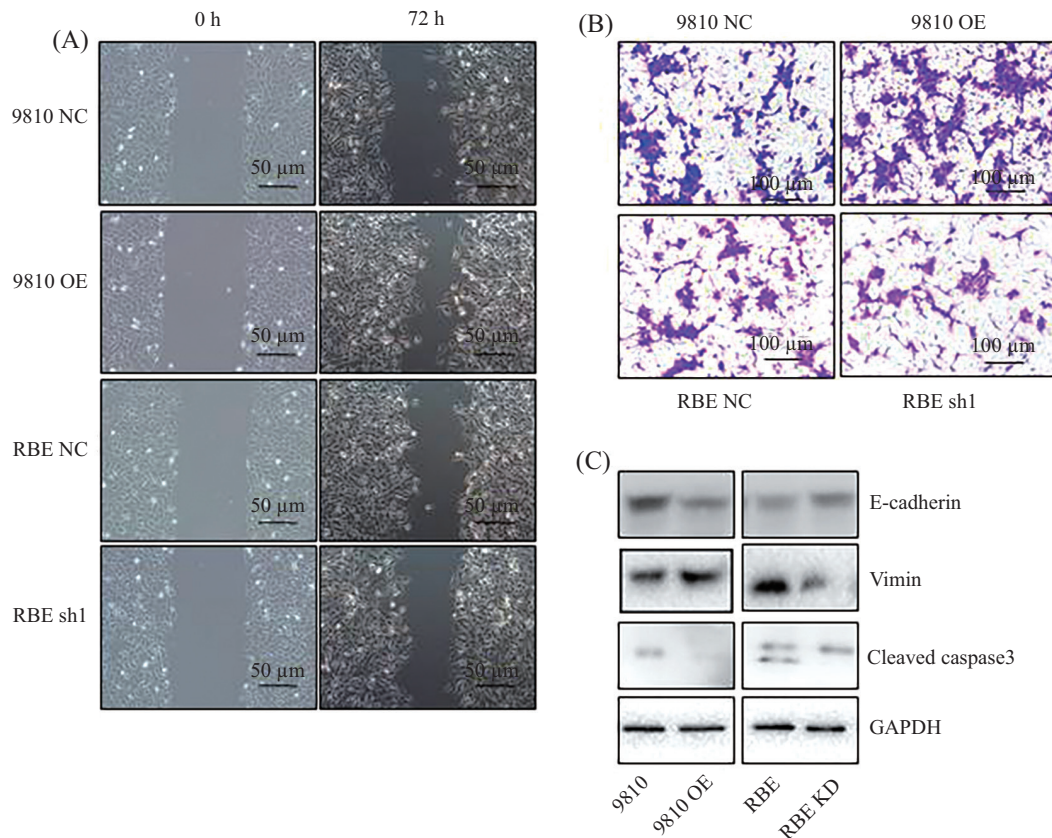


A: CCK8实验检测Radil对9810细胞增殖的影响; B: CCK8 检测Radil对RBE细胞增殖的影响。NC: 阴性对照组; sh: 敲低组; OE: 过表达组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较。

A: the effect of Radil on proliferation of 9810 cells were detected using CCK8 assay; B: the effect of Radil on proliferation were detected in RBE cells using CCK8 assay. NC: negative control; sh: shRNA group; OE: over expression group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with NC group.

图3 Radil对胆管癌细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of Radil on the proliferation of ICC cell lines



A: 划痕实验; B: transwell运动实验; C: Western blot检测凋亡和EMT相关蛋白表达情况。NC: 阴性对照组; sh: 敲低组; OE: 过表达组。

A: wound healing assay; B: transwell experiments; C: the apoptosis related protein and EMT related proteins expressions levels were analyzed by Western blot. NC: negative control; sh: shRNA group; OE: over expression group.

图4 Radil对胆管癌细胞运动的影响

Fig.4 The effect of Radil on ICC cell migration

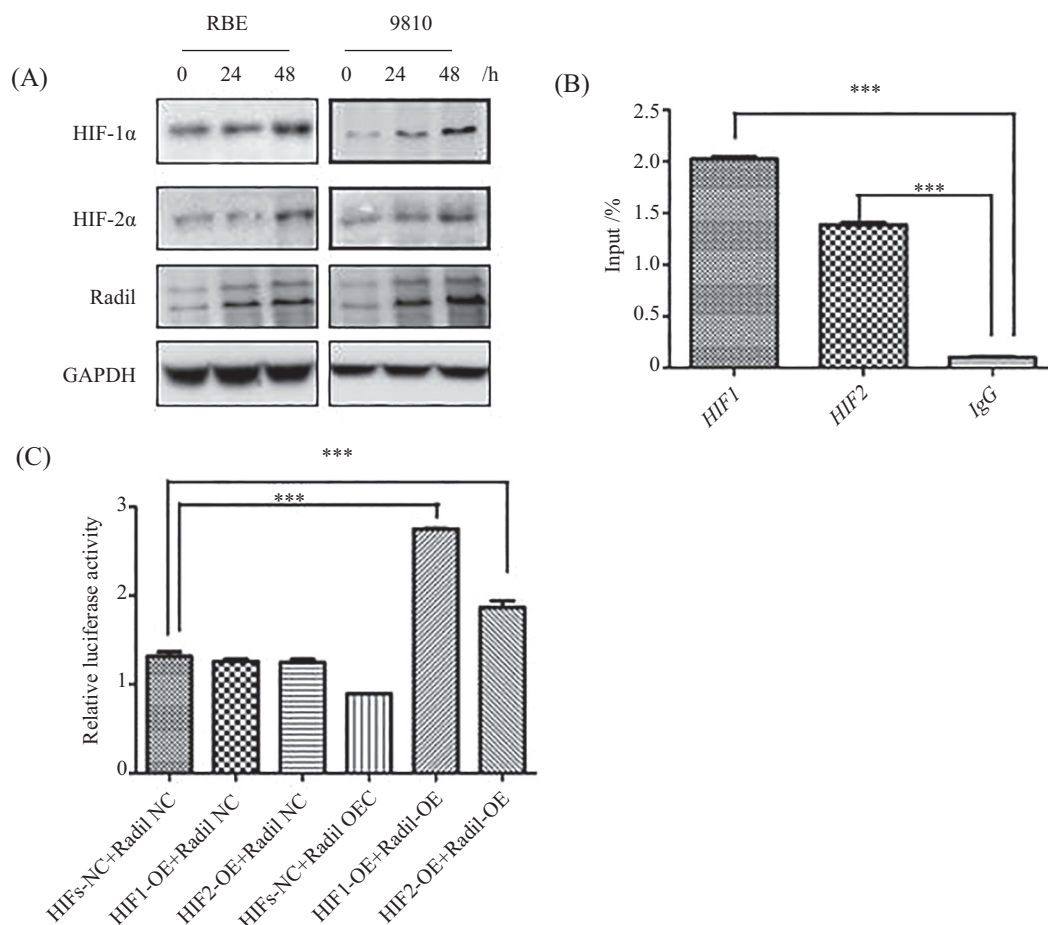
相比, 无论HIF1还是HIF2均对Radil的表达具有调控作用, 可以显著提高其转录(图5C), 以上结果表明, Radil是HIFs的靶基因之一。

3 讨论

胆管癌是指原发于胆管系统的癌症, 包括肝内和肝外胆管癌, 其发病原因尚不清楚, 有研究指出胆管癌与肝炎病毒包括乙肝、丙肝对细胞的侵犯有相关性, 也可以继发于胆管的良性腺瘤恶变。胆管癌虽不常见, 但是流行病学研究显示, 其发病率呈现逐年明显上升的趋势^[6]。目前根治性手术是最有效的治疗方法, 然而大多数胆管癌患者就诊时已发展为中晚期, 失去了最佳治疗时机。另外, 胆管癌术后易发生局部复发, 术后5年生存率非常低, 只有30%左右^[7]。可见, 探索研究胆管癌的发病机理, 分析其发展、转移复发机制具有重要的临床和理论意义。

Radil蛋白是小分子G蛋白Rap1的下游分子效

应物之一, 影响Rap调控的生物学功能: 细胞黏附和细胞运动。Radil由1 075个氨基酸组成, 具有RA、DIL和PDZ三个结构域, RA结构域可与GTPases酶结合, PDZ结构域是蛋白与蛋白结合的重要部位, DIL结构域功能尚不清楚, 但其在细胞骨架相关蛋白如肌球蛋白上有表达^[4]。研究发现, Radil低表达可以显著降低乳腺上皮细胞与基质的黏附能力, 可以影响神经鞘祖细胞的运动和分化, 导致肠神经元和虹膜蛋白缺陷, 并伴随大量凋亡细胞的产生^[4]。而细胞黏附、运动对于肿瘤的发展、转移具有重要的作用。有研究发现Radil可以促进乳腺癌细胞的增殖, 并促进乳腺癌到肺脏的转移, Radil低表达可以有效降低乳腺癌细胞的运动、侵袭能力, 并阻断乳腺癌的发展^[6]。我们也发现, Radil在胆管癌病人中广泛表达, 可以显著增强胆管癌细胞的增殖和运动能力, 而低表达Radil可以明显抑制胆管癌细胞的增殖和运动能力, 使凋亡相关分子表达显著增加。



A: Western blot analysis of HIFs and Radil expression levels in ICC cell lines cultured under hypoxic conditions for 0, 24, and 48 h; B: ChIP-PCR; C: luciferase reporter assay. NC means negative control, OE means overexpression. *** $P < 0.001$.

A: Western blot assay was used to analyze the expression level of HIFs and Radil in ICC cell lines that were cultured under hypoxic condition after 0, 24, 48 h; B: ChIP-PCR assay; C: promoter-luciferase analysis. NC means negative control, OE means overexpression. *** $P < 0.001$.

图5 HIFs对Radil在胆管癌细胞中表达的调控作用

Fig.5 Regulation effect of HIFs on the Radil expression in ICC cells

Rap1可以促进整合素与配体的结合,促进整合素聚集,可以调节皮质肌动蛋白形成,影响细胞骨架形成,抑制运动细胞的膜突出,从而控制细胞黏附和整合素激活,影响细胞对外界刺激做出反应^[8]。这些功能主要依赖于Radil^[2-3]、Riam^[9-10]、Arap3^[11]、AF6^[12-13]等下游效应分子。但是,目前关于机体如何调控上述分子,如何调控Rap1通路的研究还较少。在本研究中,我们发现,缺氧可以促进Radil表达量增加,缺氧诱导因子HIFs可以促进Radil的转录。肿瘤组织内普遍存在着缺氧区域,而缺氧会抑制HIFs泛素化,使其在肿瘤内积聚^[14]。大量的HIFs蛋白进入细胞核中发挥转录因子的作用,上调了Radil的表达。胆管癌内Radil表达又进一步促进了胆管癌细胞的增殖和运动,从而促进了胆管癌的发展、转移。

综上所述,Radil可以促进胆管癌细胞的增殖和

运动,对胆管癌的发展具有促进作用;而缺氧、HIFs可以促进Radil在胆管癌细胞中的表达,有望为胆管癌的治疗和预后判断提供参考。

参考文献 (References)

- [1] MEJIA J C, PASKO J. Primary liver cancers: intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma [J]. *Sug Clin North Am*, 2020, 100(3): 535-49.
- [2] AHMEDSM, DAULAT A M, MEUNIER A, et al. G protein betagamma subunits regulate cell adhesion through rap1a and its effector radil [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(9): 6538-51.
- [3] SMOLEN G A, SCHOTT B J, STEWART R A, et al. A rap GT-Pase interactor, RADIL, mediates migration of neural crest precursors [J]. *Genes Dev*, 2007(17), 21: 2131-6.
- [4] LIU L, AERBAJINAI W, AHMED S M, et al. Radil controls neutrophil adhesion and motility through beta2-integrin activation [J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23(24): 4751-65.
- [5] AHMEDSM, THERIAULT B L, UPPALAPATI M, et al. KIF14 negatively regulates rap1a-radil signaling during breast cancer

- progression [J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(6): 951-67.
- [6] SALEH M, BIRARKAR M, BURAV, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis, current staging, and radiological findings [J]. *Abdom Radiol (NY)*, 2020, doi: 10.1007/s00261-020-02559-7.
- [7] MEJIA J C, PASKO J. Primary liver cancers: intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma [J]. *Surg Clin N Am*, 2020, 100(11): 535-49.
- [8] Ross S H, Post A, Raaijmakers J H, et al. Ezrin is required for efficient rap1-induced cell spreading [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(11): 1808-18.
- [9] LAFUENTE E M, VAN PUIJENBROEK A A, KRAUSE M, et al. RIAM, an ena/VASP and profilin ligand, interacts with rap1-GTP and mediates rap1-induced adhesion [J]. *Dev Cell*, 2004, 7(4): 585-95.
- [10] LAFUENTE E, BOUSSIOTIS V A. Rap1 regulation of RIAM and cell adhesion [J]. *Method Enzymol*, 2006, 407: 345-58.
- [11] KRUGMANN S, WILIANMS R, STEPHENS L, et al. ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(15): 1380-4.
- [12] BOETTNER B, GOVEK E E, CROSS J, et al. The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(16): 9064-9.
- [13] ZHANG Z, EHMANN H, PRICE L S, et al. AF6 negatively regulates rap1-induced cell adhesion [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(39): 33200-5.
- [14] SUN H X, XU Y, YANG X R, et al. Hypoxia inducible factor 2 alpha inhibits hepatocellular carcinoma growth through the transcription factor dimerization partner 3/E2F transcription factor 1-dependent apoptotic pathway [J]. *Hepatology*, 2013, 57(3): 1088-97.