

RhoA 在上皮性卵巢癌细胞中的表达与侵袭性的相关性

李娟 唐良菝* 汤为学¹ 王辉 Shu-Wing Ng²

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016; ¹重庆医科大学病理生理学教研室, 重庆 400016;

²哈佛医学院布莱根妇女医院妇科肿瘤研究室, 波士顿 02115)

摘要 培养上皮性卵巢癌细胞HO8910PM、HO8910及正常卵巢上皮细胞HOSEA 3种细胞。对3种细胞分别采用免疫细胞化学法检测RhoA的表达、Transwell小室体外侵袭试验测定体外侵袭能力、与人脐静脉内皮细胞HUVEC建立细胞共培养系统测定血管形成能力。结果表明,RhoA在HO8910PM细胞中表达最强,在HO8910中次之,在HOSEA中最弱;3种细胞的侵袭能力以HO8910PM最强,HO8910较弱,HOSEA无侵袭能力;HO8910PM的血管形成能力最强,HO8910其次,HOSEA无血管形成能力($P<0.01$)。Pearson相关分析结果显示,RhoA表达水平分别与细胞侵袭能力及血管形成能力呈正相关($P<0.05$)。RhoA在上皮性卵巢癌细胞中表达水平越高,细胞体外侵袭及血管形成能力随之更强。RhoA可能作为重要因子参与上皮性卵巢癌的侵袭转移过程。

关键词 RhoA; 上皮性卵巢癌; 侵袭; 血管形成

恶性肿瘤最致命的危害就在于肿瘤的侵袭性与转移性。侵袭是转移的前提,血管生成是肿瘤侵袭转移的基础。肿瘤细胞侵袭力的改变以及由血管生成因子与血管生成抑制因子比例失调引起的血管形成能力的变化都直接影响肿瘤转移进程。许多研究表明Rho蛋白家族参与肿瘤转移,但RhoA在人卵巢上皮性恶性肿瘤细胞中的表达及参与转移的信号途径尚不明确。本研究通过测定RhoA在人上皮性卵巢细胞中的表达及RhoA与肿瘤侵袭力、血管形成能力的相关性,以探讨RhoA在卵巢上皮性恶性肿瘤转移过程中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人上皮性卵巢癌细胞株HP8910PM、HP8910、人脐静脉内皮细胞HUVEC及小鼠胚胎成纤维细胞NIH3T3均来自重庆市外科重点实验室,正常人卵巢上皮细胞株HOSEA由哈佛医学院布莱根妇女医院(BWH)妇科肿瘤研究室赠予。RPMI1640、DMEM/F12及胎牛血清均购自Gibco公司。羊抗人RhoA单克隆抗体购自Santa Cruz Biotech公司。Transwell细胞趋化小室购自Millipore公司。免疫组化试剂盒(SP-9003试剂盒)及DAB染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HOSEA采用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液,HO8910PM、HP8910、HUVEC和NIH3T3细胞均采用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液,在37℃、5%CO₂的饱和湿度条件下培养。

1.2.2 免疫细胞化学法测定3种细胞中RhoA的表达 抗RhoA单克隆抗体以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成1:50。采用细胞爬片技术,使细胞生长于玻片上。常规培养48h后取出玻片,PBS洗3次后以丙酮固定30min,其余操作按照SP-9003试剂盒说明书,DAB染色,以黄褐色或棕色着色为阳性。200倍光镜下随机选取细胞分布均匀视野,以医学图像分析系统测定平均光密度值。

1.2.3 Transwell小室体外侵袭实验 NIH3T3细胞生长至80%时,用PBS液洗涤干净后以无血清的RPMI1640培养液培养24h(每100ml培养瓶中加入6ml无血清的RPMI1640培养液),收集上清液备用。将微孔直径为8μm的Transwell细胞趋化小室置于24孔板中,小室滤膜上平铺一层按1:3稀释的DMEM基底膜基质胶Growth Factor-reduced Matrigel(BD公司)40μl,紫外线下消毒过夜后,以无血清的

收稿日期: 2008-03-07 接受日期: 2008-05-19

* 通讯作者。Tel: 023-89011092, E-mail: ldtang2002@yahoo.com.cn

信号途径, 结果发现, 从卵巢良性上皮发展到浸润性癌的过程中, RhoA 抑制缺失。在上皮性卵巢肿瘤中, RhoA 的 mRNA 及蛋白质水平在侵袭性卵巢癌中的表达明显高于良性肿瘤^[8]。而另有研究者指出, 上皮性卵巢癌细胞 SW626、Skov-3、A2780 和 Caov-3 中 RhoA mRNA 和蛋白质表达水平均与癌细胞的体外侵袭及迁移能力无关^[9]。本实验采用 Transwell 小室体外侵袭实验测定 3 种细胞体外侵袭能力, 结果显示, HO8910PM 侵袭能力最强, HO8910 较弱, 正常卵巢癌细胞 HOSEA 无侵袭能力($F=105.80, P<0.01$)。结合 RhoA 在各组细胞中的表达情况进行分析, 高侵袭性的 HO8910PM 高表达 RhoA, 侵袭性较低的 HO8910 中 RhoA 表达水平次之, 而没有侵袭能力的 HOSEA 细胞中 RhoA 表达水平最低; Pearson 相关分析表明, HO8910PM 及 HO8910 中 RhoA 表达水平均与体外侵袭能力呈正相关。本研究结果提示 RhoA 表达水平改变, 肿瘤细胞侵袭迁移能力亦随之变化, 考虑二者可能为因果关系, 即 RhoA 表达水平改变导致肿瘤细胞侵袭迁移能力变化, 影响肿瘤发生发展。

肿瘤血管生成为肿瘤细胞运输营养物质并排出代谢产物, 对肿瘤转移也有决定性作用。本实验采用 Transwell 小室将 HUVEC 分别与 HO8910PM、HO8910、HOSEA 进行共培养, 结果显示, HO8910PM 诱导 HUVEC 形成新生血管能力最强, HO8910 次之, HOSEA 则无法测到血管形成。Pearson 相关分析结果表明, HO8910PM 及 HO8910 中 RhoA 表达均与血管形成能力呈正相关, RhoA 表达水平越高的细胞株, 血管形成能力越强, 提示 RhoA 可能在上皮性卵巢癌细胞转移过程中形成新生血管时起重要作用。有文献报道 RhoA 表达水平上调可促进血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达水平提高^[10]。结合本实验结果, RhoA 高表达的同时卵巢癌细胞血管形成能力提高,

推测 RhoA 的过度表达可能促使 HO8910PM、HO8910 产生促血管生成因子如 VEGF 等, 刺激 HUVEC 细胞游走, 细胞首尾相连, 最后管腔形成; 也可能引起癌细胞分泌生长因子导致 HUVEC 细胞分泌促血管生成因子, 血管生成因子与血管生成抑制因子比例失调, 从而促进肿瘤新生血管形成, 影响恶性肿瘤转移进程。

理论上, RhoA 功能的发挥有赖于其下游效应蛋白。迄今为止, 已发现 Rho 激酶 ROCKI、ROCKII 及 mDia 等数十种 Rho 蛋白下游效应分子。本研究结果提示 RhoA 高表达促进上皮性卵巢癌侵袭转移, 但这种促进作用是否由 RhoA 激活 Rho 激酶等下游效应分子引起, 是否有其他 Rho 蛋白和(或)下游效应分子共同参与, 尚需进一步探讨。

总之, RhoA 作为 Rho 蛋白家族中重要的一员可能直接或间接参与恶性肿瘤的侵袭转移过程。本研究显示 RhoA 的表达与肿瘤侵袭和血管形成能力呈正相关, 较强表达的 RhoA 提示肿瘤具有较强的转移能力。因此, RhoA 可能在上皮性卵巢癌的侵袭转移过程中发挥关键作用, 有望成为卵巢上皮性恶性肿瘤抗转移治疗新靶点。

参考文献(References)

- [1] Adnane J *et al. Clin Cancer Res*, 2002, **8**: 2225
- [2] Touge H *et al. Int J Oncol*, 2007, **30**: 709
- [3] Shimada T *et al. Kobe J Med Sci*, 2007, **53**: 125
- [4] Kusama T *et al. Cancer Sci*, 2006, **97**: 848
- [5] Pille JY *et al. Mol Ther*, 2005, **11**: 267
- [6] Sahai E *et al. J Cell Biol*, 2007, **176**: 35
- [7] Berman DM *et al. Proteomics*, 2004, **4**: 812
- [8] Horiuchi A *et al. Lab Invest*, 2003, **83**: 861
- [9] 韩志强等. *中华肿瘤杂志*, 2004, **26**: 385
- [10] Hayashi M *et al. J Clin Endocrinol Metab*, 2005, **90**: 1712

Expression of RhoA in the Epithelial Ovarian Cells and the Correlation of RhoA with Ovarian Cancer Metastasis

Juan Li, Liang-Dan Tang*, Wei-Xue Tang¹, Hui Wang, Shu-Wing Ng²

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

¹Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Gynecologic Oncology Research, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston 02115, USA)

Abstract Two ovarian cancer cell lines, HO8910PM and HO8910, and one normal epithelial ovarian cell line HOSEA was cultured to investigate the expression of RhoA in the epithelial ovarian cells and its correlation with invasion and metastasis of epithelial ovarian carcinoma. Expression of RhoA in three cell lines was detected by immunohistochemical method. Matrigel invasion assay using three epithelial ovarian cell lines was done in Transwell chambers, so was angiogenic ability. Results demonstrated that the expression levels of RhoA varied in three cell lines examined. The expression levels of RhoA in HO8910 decreased comparing with HO8910PM but increased comparing with HOSEA ($F=35.73$, $P<0.01$). HO8910PM had the strongest invasiveness, HO8910 was sub-invasive, while HOSEA had non-invasive property ($F=105.80$, $P<0.01$). Angiogenic capability of HO8910PM was strongest, HO8910 was weaker, while HOSEA had no angiogenesis. The difference between angiogenic capability of three cells was statistically significant ($F=24.69$, $P<0.01$). The expression levels of RhoA in ovarian cancer cells was significantly positive correlated with both the invasiveness and angiogenic capability of these cells ($r=0.89$ or 0.84 , $P<0.05$; $r=0.81$ or 0.88 , $P<0.05$). These results suggest that expression of RhoA is correlated with both the invasiveness and angiogenic capability of the epithelial ovarian carcinoma cells *in vitro*. With the overexpression of RhoA, both invasiveness and angiogenesis of the epithelial ovarian carcinoma cells increase. RhoA may serve as an important parameter in the metastasis of epithelial ovarian carcinoma.

Key words RhoA; epithelial ovarian carcinoma; invasion; angiogenesis

Received: March 7, 2008 Accepted: May 19, 2008

*Corresponding author. Tel: 86-23-89011092, E-mail: ldtang2002@yahoo.com.cn