

研究论文

*IQGAP1*通过ERK信号通路促进 非小细胞肺癌细胞增殖

赵明娜 娄加陶*

(上海交通大学附属胸科医院检验科, 上海 200030)

摘要 该研究探讨了*IQGAP1*(IQ domain GTPase-activating protein 1)对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞增殖的影响及其对ERK信号通路的调节作用。将内源性*IQGAP1*低表达的A549细胞中分为空白组、空载组和*IQGAP1*过表达组;将内源性*IQGAP1*高表达的H1299细胞中分为空白组、阴性对照siRNA组和*IQGAP1* siRNA组;采用ERK1/2磷酸化抑制剂U0126处理上述两株细胞。MTT法检测细胞增殖能力,Western blot法检测ERK1/2和p-ERK1/2蛋白质水平。结果显示,在A549细胞中,过表达*IQGAP1*能促进细胞增殖并促进ERK1/2磷酸化;在H1299中,敲低*IQGAP1*表达能够抑制细胞增殖并下调ERK1/2磷酸化水平。用U0126处理后能抑制*IQGAP1*对细胞增殖的促进作用。研究结果表明,*IQGAP1*可通过ERK信号通路促进体外非小细胞肺癌细胞增殖。

关键词 非小细胞肺癌; *IQGAP1*; ERK; 信号通路; 细胞增殖

IQGAP1 Promotes Cell Proliferation through ERK Pathway in Non-small Cell Lung Cancer

Zhao Mingna, Lou Jiatao*

(Department of Laboratory, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

Abstract This study investigated the regulation of *IQGAP1* on proliferation and ERK pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. A549 cells, with low endogenous *IQGAP1* expression, were treated with blank, Ad-GFP and Ad-GFP-*IQGAP1*, respectively. H1299 cells, with high endogenous *IQGAP1* expression, were treated with blank, control siRNA and *IQGAP1* siRNA, respectively. Then, it was followed by MTT assay analysis for cell proliferation and Western blot analysis for ERK protein level. In addition, the two cell lines were treated with U0126, an ERK1/2 phosphorylation inhibitor. The results indicated that *IQGAP1* over expression promotes cell proliferation and up-regulate the p-ERK1/2 expression in A549 cells, while knock-down *IQGAP1* results in the opposite scenario in H1299 cells. Meanwhile, U0126 treatment restrained the promotion of *IQGAP1* on cell proliferation. These results suggested that *IQGAP1* promotes cell proliferation through ERK pathway in NSCLC.

Keywords NSCLC; *IQGAP1*; ERK; signal pathway; cell proliferation

收稿日期: 2016-02-19 接受日期: 2016-04-18

国家自然科学基金(批准号: 81372193)和上海市科委基础研究项目(批准号: 13JC405502)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-22200000-1503, E-mail: loujiatao@126.com

Received: February 19, 2016 Accepted: April 18, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81372193) and the Basic Research Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grant No.13JC1405502)

*Corresponding author. Tel: +86-21-22200000-1503, E-mail: loujiatao@126.com

网络出版时间: 2016-06-24 10:46:36 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160624.1046.002.html>

肺癌是我国癌症相关死亡的首要原因^[1]。肿瘤异质性、早期难以发现以及高复发率导致肺癌患者5年总生存率仅为16%^[2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌总数的80%~85%。目前,肺癌的治疗方法主要以手术切除、化疗以及放疗为主。探索肺癌发生发展的分子背景不仅有助于寻求最有效治疗方法,而且对肺癌早期诊断、精确分型分期以及预测复发和预后均有重要意义^[3]。

IQGAP1(IQ domain GTPase-activating protein 1)是新近发现的一种Ras GTP酶活化蛋白质^[4],是Rho家族成员Rac1和cdc42的一个重要效应因子。*IQGAP1*可以结合多种信号分子和结构蛋白,通过与靶蛋白结合,*IQGAP1*能够参与多种细胞的分子生物学功能,包括细胞骨架重塑、细胞间黏附、细胞增殖、细胞分化,并且在细胞迁移、细胞外信号转导网络中发挥着重要的调控作用^[5-7]。近年来研究发现,*IQGAP1*在乳腺癌、胃癌、肝癌等多种肿瘤中发挥重要作用^[8-10]。然而,关于*IQGAP1*在肺癌,特别是非小细胞肺癌细胞增殖调控研究尚少。本研究以非小细胞肺癌细胞为研究对象,通过过表达和敲低*IQGAP1*来研究其对细胞增殖及ERK信号通路的影响,探讨*IQGAP1*诱导非小细胞肺癌细胞增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人NSCLC细胞株A549和H1299购自ATCC; RPMI 1640培养基、Opti-MEM和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自Gibco公司; TRIzol试剂和Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司; 反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成; *IQGAP1* siRNA和阴性对照siRNA购自广州锐博生物科技有限公司; 蛋白质印迹及蛋白质提取相关试剂购自碧云天生物技术研究所; β -actin抗体购自Abcam公司; 兔抗人*IQGAP1*抗体购自Proteintech公司; 兔抗人ERK1/2抗体和兔抗人p-ERK1/2抗体购自上海泊湾生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG抗体购自Cell Signaling Technology公司; MTT试剂购自北京Solarbiog公司; DMSO试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; ERK1/2磷酸

化抑制剂U0126购自Thermo Fisher公司。

1.2 细胞培养与转染

A549细胞和H1299细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。待细胞汇合度达70%~80%时,分别加入适量Ad-GFP及Ad-GFP-*IQGAP1*腺病毒进行病毒感染,设立空白组、空载组和感染组。待细胞融合度70%~80%时,参考Lipofectamine 2000说明书转染细胞,并设立空白组,阴性对照组和实验组,置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养,48 h后分别提取RNA和蛋白质,用于后续实验。

1.3 qRT-PCR

细胞提取总RNA后,测定RNA浓度。取2 μ g反转录成cDNA。以1 μ L cDNA为模板进行PCR, *IQGAP1*上游引物: 5'-GGG ACC AAC CAA AGT GTG TCA AC-3', 下游引物: 5'-CTG CTC ATT ATT GCC TGT CTT GGA-3', β -actin上游引物: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3', 下游引物: 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'。按试剂盒说明设置反应体系和程序,95 °C预变性50 s,然后,95 °C 5 s,60 °C 34 s,40个循环。所有反应设置3个复孔,采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法进行相对定量。

1.4 细胞免疫荧光

细胞置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养24 h,贴壁,弃去细胞培养液,用PBS洗3遍,冰甲醇固定10 min,5% Triton溶液处理3 min。称取2 g BSA粉剂溶解于20 mL PBS溶液中,配制1% BSA封闭液。加入封闭液室温放置30 min。1:1 000稀释*IQGAP1*,4 °C孵育过夜,PBS洗3遍,每遍3 min。二抗孵育:分别加入Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG抗体(1:50),室温孵育1 h,用PBS洗5遍,每遍5 min。封片,荧光显微镜观察、成像。

1.5 Western blot

10 μ mol/L的U0126处理实验细胞30 min后收集蛋白,裂解细胞时加入2 \times 蛋白质上样缓冲液,95 °C加热5 min,用10% SDS-PAGE蛋白质电泳分离样品,湿转法转至PVDF膜。2% BSA室温封闭2 h,加入一抗(稀释比均为1:800)于4 °C孵育过夜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育1 h,通过化学发光试剂检测蛋白质水平。

1.6 MTT

瞬转后的细胞铺在96孔板中,每孔约5 000个细

胞, 细胞贴壁后, 在培养液中加入5 mg/mL的MTT, 2 h后移去培养液, 加入200 μ L DMSO, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 检测 D_{570} 数值, 第1 d为0点, 以后每隔24 h测量1次, 共计4 d, 最后统计学分析后作出生长曲线。

1.7 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。实验数据用均数 \pm 标准差表示, 两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

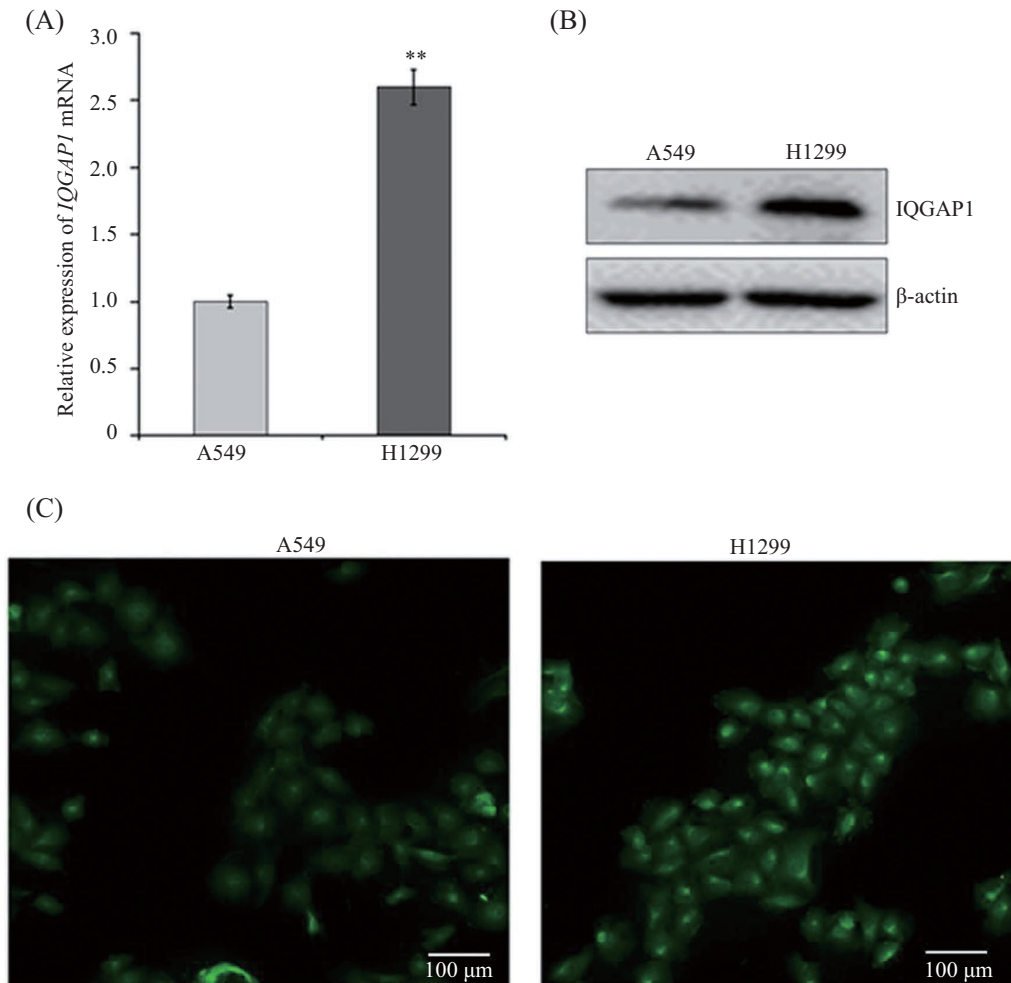
2.1 检测两种非小细胞肺癌细胞株中IQGAP1的表达

通过荧光定量PCR法、蛋白质印迹法和免疫

荧光法检测2种非小细胞肺癌细胞株A549和H1299中内源性IQGAP1表达。如图1所示, 3种方法检测结果一致, 即在A549和H1299中都有IQGAP1表达, 但H1299中IQGAP1的表达水平显著高于A549, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。因此, 这2种细胞株可用于后续实验研究。

2.2 qRT-PCR检测转染前后IQGAP1在非小细胞肺癌细胞中的表达

在内源性IQGAP1低表达的A549细胞中, 转染Ad-GFP-IQGAP1腺病毒质粒, 同时转染空载质粒做对照, 24 h后检测IQGAP1的表达。同样, 在IQGAP1高表达的H1299细胞中, 转染IQGAP1 siRNA, 同时转染对照siRNA, 24 h后用qPT-PCR检测IQGAP1的

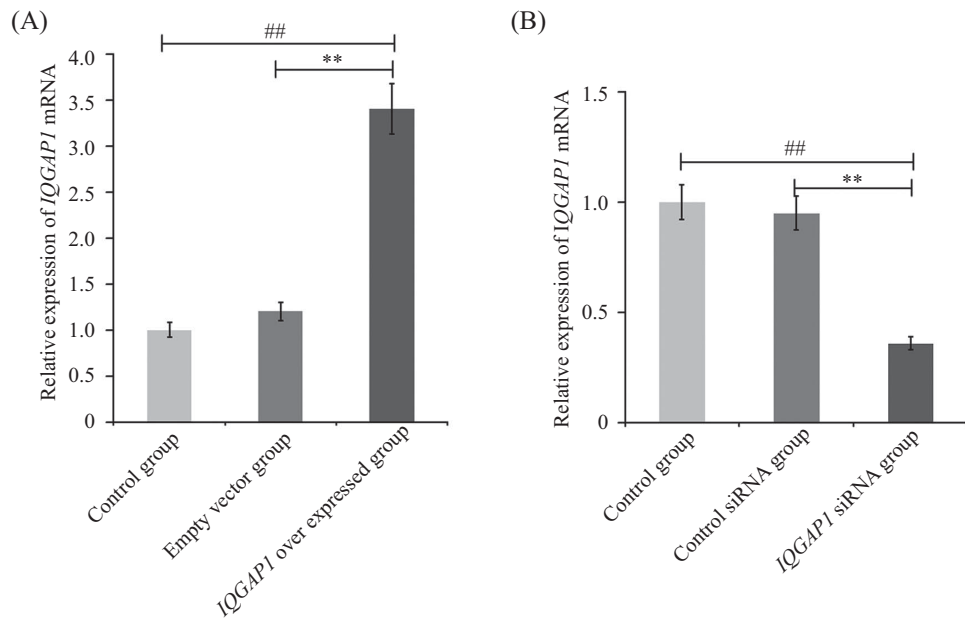


A: qRT-PCR检测两株非小细胞肺癌细胞中IQGAP1 mRNA水平, $**P < 0.01$, 与A549组比较; B: 蛋白质印迹法检测IQGAP1蛋白质水平; C: 免疫荧光观察IQGAP1在两株非小细胞肺癌细胞中定位。

A: the levels of IQGAP1 mRNA in two NSCLC cells detected by qRT-PCR, $**P < 0.01$ vs A549 group; B: the levels of IQGAP1 protein in NSCLC cells detected by Western blot; C: the IQGAP1 positioning in two strains of NSCLC cells observed by immunofluorescence.

图1 IQGAP1在H1299和A549细胞株中表达水平的检测

Fig.1 The expression of IQGAP1 in H1299 and A549 cells

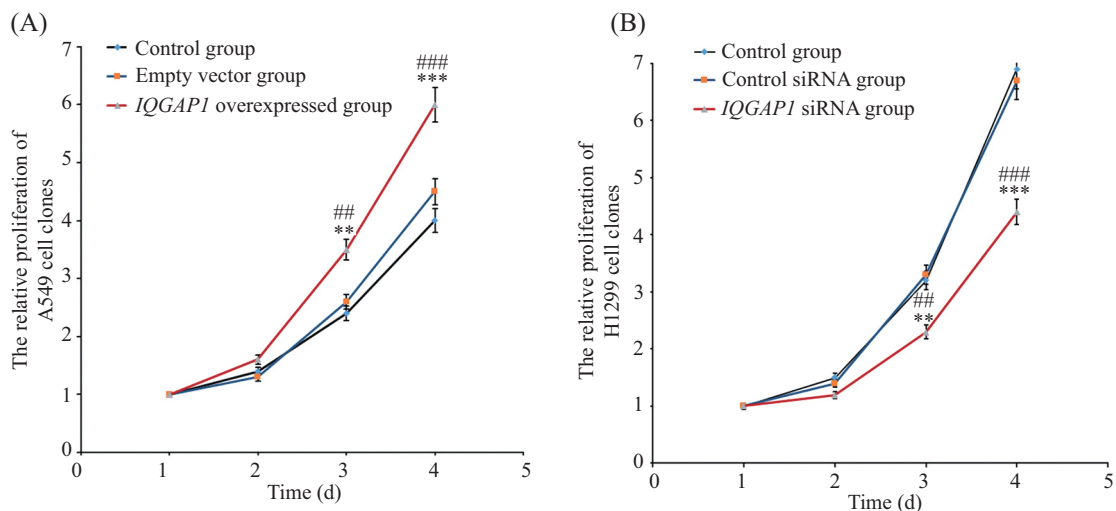


A: *IQGAP1*在A549细胞表达水平, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$; B: *IQGAP1*在H1299细胞表达水平, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

A: the expression level of *IQGAP1* in A549 cells, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$; B: the expression level of *IQGAP1* in H1299 cells, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图2 转染后*IQGAP1*的mRNA水平

Fig.2 The mRNA level of *IQGAP1* after transfection



A: *IQGAP1*对A549细胞增殖能力的影响, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *IQGAP1*过表达组与空白组比较; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ *IQGAP1*过表达组与空载组比较。B: *IQGAP1*对H1299细胞增殖能力的影响, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *IQGAP1* siRNA组与空白组比较; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, *IQGAP1* siRNA组与对照siRNA组比较。

A: the influence of *IQGAP1* in the proliferation of A549 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, *IQGAP1* overexpression group compared with blank group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ *IQGAP1* overexpression group compared with GFP group. B: the influence of *IQGAP1* in the proliferation of H1299 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ *IQGAP1* siRNA group compared with blank group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ *IQGAP1* siRNA group compared with control siRNA group.

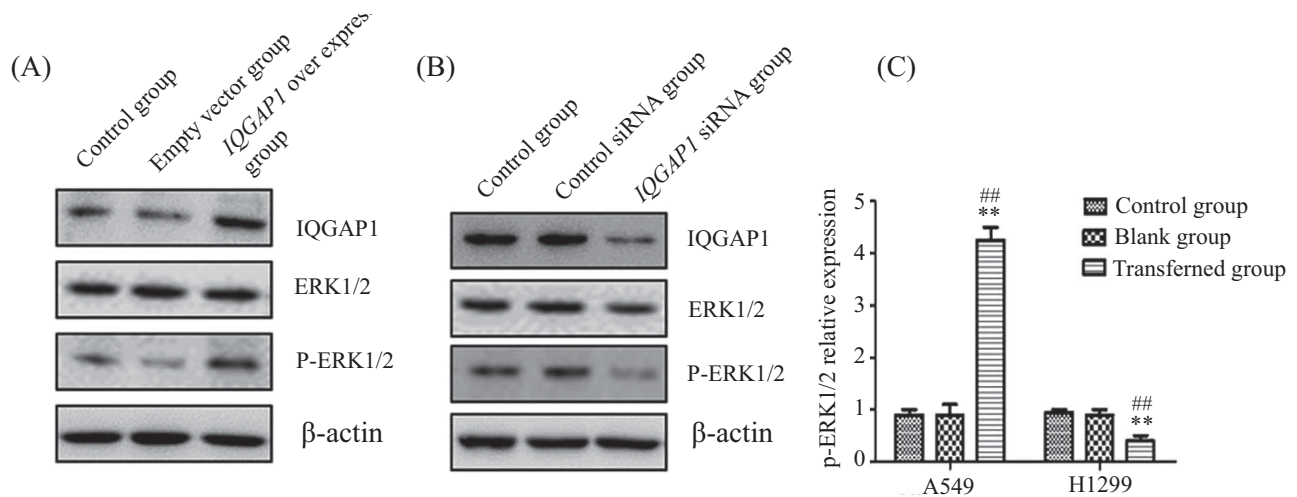
图3 *IQGAP1*对NSCLC细胞增殖能力的影响

Fig.3 The influence of *IQGAP1* in the proliferation of NSCLC cells

表达。结果如图2所示, 转染Ad-GFP-*IQGAP1*腺病毒质粒后, *IQGAP1*在A549中表达量显著提高; 转染*IQGAP1* siRNA后, *IQGAP1*在H1299中表达量显著降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$), 可用于后续研究。

2.3 *IQGAP1*对NSCLC细胞增殖能力的影响

通过MTT实验检测*IQGAP1*对细胞增殖能力的影响, 结果如图3所示, 与空白组和空载组比较, A549细胞过表达*IQGAP1*基因后, 能够显著提高A549细胞增殖能力。H1299细胞敲低*IQGAP1*基因后, 能够



A: *IQGAP1*对A549细胞ERK1/2和p-ERK1/2的蛋白质水平的影响; B: *IQGAP1*对H1299细胞ERK1/2和p-ERK1/2的蛋白质水平的影响; C: A549、H1299细胞p-ERK1/2相对含量。** $P < 0.01$, 与空白组比较; ### $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: the effect of *IQGAP1* on the protein levels of ERK1/2 and p-ERK1/2 of A549 cells; B: the effect of *IQGAP1* on the protein levels of ERK1/2 and p-ERK1/2 of H1299 cells; C: the relative levels of p-ERK1/2 in A549 and H1299 cells. ** $P < 0.01$ vs blank group, ### $P < 0.01$ vs control group.

图4 *IQGAP1*对ERK1/2和ERK1/2磷酸化水平的影响

Fig.4 The effect of *IQGAP1* on the protein levels of ERK1/2 and p-ERK1/2

显著降低H1299细胞增殖能力, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。此结果提示, *IQGAP1*能够促进非小细胞肺癌细胞的增殖。

2.4 *IQGAP1*对ERK表达水平的影响

通过Western blot法检测ERK信号通路中ERK蛋白的表达水平, 结果如图4所示, 在A549细胞中, 过表达*IQGAP1*能够促进ERK1/2蛋白的磷酸化, 与空白组、空载组之间的差异具有统计学意义; 在H1299中, 敲低*IQGAP1*表达能够下调ERK1/2蛋白的磷酸化水平, 与空白组、对照siRNA组比较的差异具有统计学意义($P < 0.01$)。以上提示, *IQGAP1*可促进ERK1/2的磷酸化。

2.5 *IQGAP1*联合U0126处理对非小细胞肺癌细胞增殖作用的影响

在A549和H1299细胞分别用10 $\mu\text{mol/L}$ 的U0126处理30 min, 抑制ERK1/2的磷酸化, 之后分别过表达和下调*IQGAP1*, 用MTT实验检测细胞增殖能力。结果如图5所示, U0126能够逆转*IQGAP1*对细胞增殖的促进作用, 与空白组和对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果说明, *IQGAP1*通过上调ERK1/2的磷酸化水平促进细胞增殖。

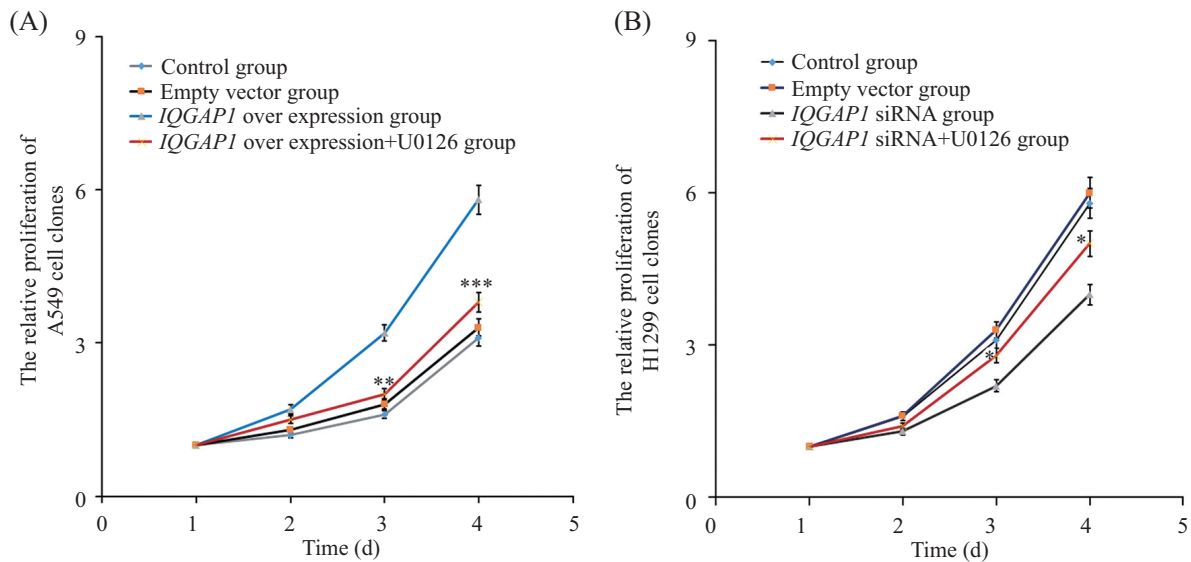
3 讨论

*IQGAPs*是近年来新发现的一个蛋白质家族^[4],

*IQGAP1*在人类*IQGAP*蛋白质家族中最早被发现, 能够调节细胞黏附、增殖、迁移和分化。研究证实, *IQGAP1*在乳腺癌^[9]、肝癌^[8]、胃癌^[10]等多种肿瘤中均高表达。进一步研究发现, *IQGAP1*过表达增强MCF-7乳腺上皮细胞增殖能力, siRNA干扰所致内源性*IQGAP1*表达减少阻碍乳腺癌细胞血清依赖性生长和不依赖支持物生长^[11]。在食管鳞状细胞癌细胞中, 抑制*IQGAP1*表达显著减弱肿瘤细胞生长、转移和侵袭, 同时显著抑制移植鼠体内肿瘤生长、侵袭和淋巴结、肺部转移^[12]。Hayashi等^[13]也通过干扰*IQGAP1*表达的方法, 证实*IQGAP1*对结肠癌细胞侵袭作用十分关键。另有研究表明, *IQGAP1*通过抑制mTOR信号通路^[14-15]、活化Cdc42、Rac1和Akt等相关蛋白质^[16], 促进细胞增殖。以上研究表明, *IQGAP1*是一个潜在致癌基因。

细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)信号通路, 属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号转导通路家族, 参与多种肿瘤恶性生物行为调节。ERK1/2可调节蛋白质或催化新陈代谢反应关键酶, 是介导细胞反应重要信号系统。ERK1/2由Ras蛋白激活, 以磷酸化和去磷酸化方式应答外来刺激信号。

本研究中通过在非小细胞肺癌细胞中高表



A: U0126对A549细胞增殖的影响。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, *IQGAP1*过表达+U0126组与*IQGAP1*过表达组比较。B: U0126对H1299细胞增殖的影响。* $P<0.05$, *IQGAP1* siRNA+U0126组与*IQGAP1* siRNA组比较。

A: the effect of U0126 on A549 cells proliferation. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ *IQGAP1* overexpression+U0126 group compared with *IQGAP1* overexpression group. B: the effect of U0126 on H1299cells proliferation. * $P<0.05$ *IQGAP1* siRNA+U0126 group compared with *IQGAP1* siRNA group.

图5 U0126对NSCLC细胞增殖的作用

Fig.5 The effect of U0126 on NSCLC cells proliferation

达或敲低*IQGAP1*基因表达,证实*IQGAP1*能够促进癌细胞增殖。有研究报道,在多发性骨髓瘤中,*IQGAP1*通过促进ERK1/2的磷酸化上调ERK信号通路^[17]。因此,我们通过过表达*IQGAP1*发现其能够上调非小细胞肺癌细胞中ERK1/2磷酸化水平,与以往研究报道一致。此外,我们应用ERK1/2磷酸化抑制剂U0126处理细胞,能够抑制*IQGAP1*促细胞增殖能力,提示ERK1/2可能是*IQGAP1*诱导细胞增殖的下游信号通路。本研究结果表明,*IQGAP1*可通过ERK1/2信号通路促进非小细胞肺癌细胞增殖。除此之外,*IQGAP1*是否参与MAPK通路其他蛋白磷酸化过程以及*IQGAP1*对在非小细胞肺癌发生转移过程中是否发挥作用都有待我们进一步研究。

综上所述,本研究首次报道了*IQGAP1*在非小细胞肺癌细胞增殖过程中发挥重要作用,其可能为非小细胞肺癌基因治疗、寻找新的治疗靶分子提供实验依据,为肺癌的治疗提供新可能。然而,本研究尚存在不足之处,本文选取两株NSCLC细胞系进行离体实验,今后将开展动物实验进一步予以证实。

参考文献 (References)

1 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.*

- Cancer statistics in China 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 2 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60(5): 277-300.
- 3 Cherni I, Weiss G J. miRNAs in lung cancer: Large roles for small players. *Future Oncol* 2011; 7(9): 1045-55.
- 4 Hart MJ, Callow MG, Souza B, Polakis P. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO J* 1996;15(12): 2997-3005.
- 5 Song Y, Qian L, Song S, Chen L, Zhang Y, Yuan G, *et al.* Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. *Mol Immunol* 2008; 45(1): 137-43.
- 6 Zhou R, Guo Z, Watson C, Chen E, Kong R, Wang W, *et al.* Polarized distribution of IQGAP proteins in gastric parietal cells and their roles in regulated epithelial cell secretion. *Mol Biol Cell* 2003; 14(3): 1097-108.
- 7 Adachi M, Kawasaki A, Nojima H, Nishida E, Tsukita S. Involvement of IQGAP family proteins in the regulation of mammalian cell cytokinesis. *Genes Cells* 2014; 19(11): 803-20.
- 8 Zoheir KM, Abd-Rabou AA, Harisa GI, Ashour AE, Ahmad SF, Attia SM, *et al.* Gene expression of IQGAPs and Ras families in an experimental mouse model for hepatocellular carcinoma: A mechanistic study of cancer progression. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(8): 8821-31.
- 9 Sun G, Liu Y, Wang K, Xu Z. miR-506 regulates breast cancer cell metastasis by targeting *IQGAP1*. *Int J Oncol* 2015; 47(5): 1963-70.
- 10 Tseng PC, Chen CL, Shan YS, Chang WT, Liu HS, Hong TM, *et al.* An increase in integrin-linked kinase non-canonically confers

- NF-kappaB-mediated growth advantages to gastric cancer cells by activating ERK1/2. *Cell Commun Signal* 2014; 12: 69.
- 11 Jadeski L, Mataraza J M, Jeong H W, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 2008; 283(2): 1008-17.
- 12 Wang XX, Wang K, Li XZ, Zhai LQ, Qu CX, Zhao Y, *et al.* Targeted knockdown of *IQGAP1* inhibits the progression of esophageal squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2014; 9(5): e96501.
- 13 Hayashi H, Nabeshima K, Aoki M, Hamasaki M, Enatsu S, Yamauchi Y, *et al.* Overexpression of IQGAP1 in advanced colorectal cancer correlates with poor prognosis-critical role in tumor invasion. *Int J Cancer* 2010; 126(11): 2563-74.
- 14 Wang JB, Sonn R, Tekletsadik YK, Samorodnitsky D, Osman MA. IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel CDC42-mTOR pathway. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 12): 2024-33.
- 15 Chen F, Zhu HH, Zhou L F, Wu SS, Wang J, Chen Z. *IQGAP1* is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation by Akt activation. *Exp Mol Med* 2010; 42(7): 477-83.
- 16 Meyer RD, Sacks DB, Rahimi N. IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *PLoS One* 2008; 3(12): e3848.
- 17 Ma Y, Jin Z, Huang J, Zhou S, Ye H, Jiang S, *et al.* IQGAP1 plays an important role in the cell proliferation of multiple myeloma via the MAP kinase (ERK) pathway. *Oncol Rep* 2013; 30(6): 3032-8.