

## Rab 基因家族在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足中的差异表达

张万秋<sup>1</sup>, 田寅辉<sup>2</sup>, 朱一超<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>泰州职业技术学院, 江苏 泰州 225300; <sup>2</sup>南京医科大学生理学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 以表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足分离, 在此基础上, 鉴定 Rab 基因家族在胞体和伪足中的差异表达谱。方法: 运用 Boyden 小室技术分离 EGF 刺激下 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足, 并鉴定 Rab 基因家族在乳腺癌细胞胞体和伪足中的差异表达谱。结果: RAB1A 等 21 个基因在胞体中高表达, RAB7A 等 16 个基因在伪足中高表达, RAB3B 等 24 个基因在胞体和伪足中的表达量大体相等。结论: 本研究建立的基于 Boyden 小室技术的实验方法可以有效分离乳腺癌细胞的胞体和伪足, 在此基础上鉴定了一类在 EGF 趋化刺激下乳腺癌细胞伪足中富集的 Rab 基因, 从而为进一步深入研究乳腺癌细胞伪足伸展的确切分子机制提供新的思路和研究方向。

**[关键词]** Boyden 小室; MDA-MB-231 乳腺癌细胞; Rab 基因家族; 基因表达

**[中图分类号]** R73-37

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)09-1192-07

### The differential expression of Rab gene family in cell bodies and pseudopodia in MDA-MB-231 breast cancer cells

ZHANG Wan-qiu<sup>1</sup>, TIAN Yin-hui<sup>2</sup>, ZHU Yi-chao<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; <sup>2</sup>Department of Physiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish Boyden chamber approaches for comparative analysis of the cell body and pseudopodium protein or RNA of chemotactic breast cancer cells. **Methods:** Under EGF stimulation, the cell body and pseudopodium protein or RNA of MDA-MB-231 breast cancer cells were separated using Boyden chamber approaches. Then the differential expression of Rab gene family in cell bodies and pseudopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells were analyzed. **Results:** Protein or RNA of cell bodies and pseudopodia were successfully separated and used to analyze the differential expression of Rab gene family in MDA-MB-231 breast cancer cells. We found that 21 Rab genes were highly expressed in cell bodies, 16 Rab genes were highly expressed in pseudopodia, and the other 24 Rab genes were equally expressed in cell bodies and pseudopodia. **Conclusion:** These results make advances in our understanding of the molecules that abundantly located in breast cancer cells pseudopodia.

**[Key words]** Boyden chamber; MDA-MB-231 breast cancer cell; Rab gene family; gene expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1192-1198]

细胞在受趋化因子的诱导发生定向运动时能感知趋化因子的方向并向其运动<sup>[1-3]</sup>。细胞在受到趋化因子刺激后, 细胞内一些生物大分子会响应刺激, 进而在细胞特定的部位募集和定位。这可使细胞在向着趋化因子前进方向的细胞膜内形成特定信号的活化和放大, 以迅速对趋化因子的刺激做出反应<sup>[3]</sup>。同时, 这一局部激活的信号会使细胞在运动前端形成一突出样的伪足结构<sup>[4]</sup>。伪足的形成标志着细胞发

生了极化, 即整个细胞体在形态上区分为运动前后端, 这一极性变化发生在细胞开始定向运动之前。恶性肿瘤细胞的趋化运动亦如此, 由此可见, 对恶性肿瘤细胞运动前端伪足伸出机制的深入研究对揭示恶性肿瘤细胞定向运动的机制有重要意义。

Boyden 小室是研究恶性肿瘤细胞侵袭或浸润的常用方法<sup>[5-7]</sup>。近来有文献报道, 改良的 Boyden 小室可用于细胞伪足的分离实验<sup>[7-10]</sup>, 这种微孔小室模型模拟了体内肿瘤转移时, 恶性肿瘤细胞向胞外基质和血管淋巴管壁的微孔间隙里伸出伪足<sup>[11]</sup>。已有研究运用改良的 Boyden 小室分析了成纤维细

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金资助(81101999)

\*通讯作者, E-mail: zhuyichao@njmu.edu.cn

胞<sup>[3,12]</sup>、神经细胞<sup>[8]</sup>及神经胶质细胞<sup>[10]</sup>伪足中富集的蛋白和 RNA。但对恶性肿瘤细胞伪足中富集的蛋白或 RNA 及其调控机制的研究鲜有报道。

据此, 本工作选用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 在建立了表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 诱导细胞在 3.0  $\mu\text{m}$  孔径的 Boyden 小室中趋化运动伸出伪足模型的基础上, 研究了人 Rab 基因家族在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足中的差异表达情况, 为进一步研究乳腺癌细胞趋化运动调控过程中 Rab 基因的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MDA-MB-231 人乳腺癌细胞系 (ATCC 公司, 美国); I 型胶原 (Sigma 公司, 美国), EGF (R&D Systems 公司, 美国), 鼠抗组蛋白 3 (Histone 3) 单克隆抗体 (南通碧云天生物技术研究), 鼠抗局部粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG-HRP (Santa Cruz 公司, 美国), ECL 发光试剂盒 (Pierce 公司, 美国)。TRIzol (Invitrogen 公司, 美国), Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (北京天根公司), Taq 酶 (大连宝生物公司)。Boyden 小室 (Corning 公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

MDA-MB-231 乳腺癌细胞使用添加 10% (V/V) 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 37°C 细胞培养箱中培养。

#### 1.2.2 细胞胞体和伪足的分离

细胞胞体和伪足分离的方法参考文献<sup>[13]</sup>, 大致方法如下: 3.0  $\mu\text{m}$  Boyden 小室的聚碳酸酯膜的上下表面均用 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  I 型胶原 37°C 包被 2 h。接种 (1.0~1.5)  $\times 10^6$  个、血清饥饿 24 h 的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞于胶原包被的 3.0  $\mu\text{m}$  Boyden 小室上室中。细胞在 3.0  $\mu\text{m}$  多孔膜上铺展 2 h 后, 在下室加入 10 ng/ml EGF。在 EGF 刺激条件下, 细胞向下伸出伪足 1 h 后, 用预冷的 PBS 漂洗小室, 并迅速用 100% 冰甲醇 (用于免疫印迹实验或 RT-PCR) 或 4% 多聚甲醛 (用于结晶紫染色实验) 固定细胞。将 Boyden 小室上室中的胞体用棉签拭去, 下室的伪足用 0.1% 结晶紫染色, 或刮取入蛋白裂解液或 TRIzol 中。同理, 用棉签拭去下室的伪足, 而将胞体用 0.1% 结晶紫染色, 或溶解于蛋白裂解液或 TRIzol 中。结晶紫染色后的胞体或伪足, 用数码相机照相观察, 溶

解于蛋白裂解液或 TRIzol 的细胞组分, 用于后续免疫印迹或 RT-PCR 实验。

#### 1.2.3 蛋白提取和 Western blot 实验

用蛋白裂解液 (1% SDS, 100 mmol/L Tris pH 7.4, 5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 正钒酸钠, 混合蛋白酶抑制剂) 分别裂解 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞的胞体和伪足, 提取总蛋白, 微量 BCA 比色法测定蛋白浓度。取相同量总蛋白行 SDS-PAGE, 250 mA 湿转印 60 min, 将蛋白转印到 PVDF 膜上, 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入抗 Histone 3 抗体 (1:3 000) 或抗 FAK (1:1 000) 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜, 羊抗鼠 IgG-HRP (1:2 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 暗室中加入 ECL 液孵育 5 min 后, 利用凝胶电泳成像系统进行读片分析。

#### 1.2.4 RT-PCR

用 TRIzol 分别裂解 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞的胞体和伪足, 提取总 RNA, 利用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA。以 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足 cDNA 为模板, 以 Rab 基因家族特异性引物为 RT-PCR 引物 (表 1), 行 RT-PCR, PCR 程序如下: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 20 s, 72°C 延伸 40 s, 运行 26 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物行 1% 琼脂糖电泳, 利用紫外凝胶电泳成像系统进行读胶分析。Quantity ONE 4.6.7 软件 (Bio-Rad 公司, 美国) 分析灰度值, 用胞体灰度值/伪足灰度值表示差异表达情况。

#### 1.2.5 基因序列的聚类分析

从 NCBI 核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 获取 61 个 Rab 基因家族成员的 mRNA 序列, 多重序列比对程序 Clustal X 2.1 比较分析 Rab 基因家族成员之间的聚类关系, 运用分子进化分析软件 MEGA 5.1 按 Neighbor-Joining (NJ) 模型分析并绘制 Rab 基因家族成员之间的分子进化关系。

## 2 结果

### 2.1 EGF 诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞伸出伪足

EGF 能诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞迁移能力加强<sup>[14]</sup>。本实验利用 3.0  $\mu\text{m}$  Boyden 小室实验进一步观察 10 ng/ml EGF 诱导的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞趋化运动能否向 Boyden chamber 下室伸出伪足。结果发现, EGF 趋化 1 h, MDA-MB-231 乳腺癌细胞可通过 3.0  $\mu\text{m}$  孔向 Boyden 小室下室伸出伪足 (图 1), 该结果表明, EGF 刺激能诱导乳腺癌细胞

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes

| 基因名称   | 上游引物(5'→3')               | 下游引物(5'→3')               |
|--------|---------------------------|---------------------------|
| RAB1A  | ACTTCAGTGGTTCAGGGAGCT     | TTTGCCAATFAGGAAAGGTGC     |
| RAB1B  | TCACTGACCAGGAATCCTACGC    | AACTCCTTGGCTGTGGTGTG      |
| RAB2A  | TTCAGCCAGTGCATGACCTTA     | TACGACCTTGTGATGGAACGA     |
| RAB2B  | AGCAGGGTTTATTTGATGTCC     | TAAGCCTATTGATCTGAAGCTATTC |
| RAB3A  | GGTTTCGAGTCTTTGAGGCA      | GCTGGTCACTGAGCTGTGGG      |
| RAB3B  | CTGAAGGAACGAAGAAGAGGGAT   | GGATGTGGAGAAAGGAGTGGC     |
| RAB3C  | ATTTAGGAGAACAGCTTGGGTTTG  | GCAGCAGTGATGGCAGGATC      |
| RAB3D  | TCCTTCCTGTCCGATACGC       | TCTTGTGATGGCGGTAGACC      |
| RAB4A  | ATACAGTGGCATTGGGACA       | TTGACTGGCTTGCAGAACAC      |
| RAB4B  | TGGGTGGGAAGACTGTGAAGC     | CCAGGCAGCCAGTGAGTTGTA     |
| RAB5A  | GGAGCAGAAAGGAAAGAGGAAG    | AGACTGTATCTATGCCGGTGGT    |
| RAB5B  | CTTGAGCAGGAGTGAAGATG      | AAGGCAGAAGAGGTGGTAGGA     |
| RAB5C  | TCCGACTGGTCTTTGGTTTTG     | CGTGGCTGTCACAATAATGCT     |
| RAB6A  | TCTTTCCTCTTCCTCCTCCACT    | AAGCACTTTACAACCTCCATCCC   |
| RAB6B  | CTCCTTGCTATCTATCGCTGCTC   | TACCACCATTTCATCCTTGTGTTTC |
| RAB6C  | TCAGGAGCAAACAGTCAGCG      | TCCACGAGACAGGCAGCAAT      |
| RAB7A  | TCCGTTTACTCTCCTCCTCG      | GTGGCTTTGACTGATTGCT       |
| RAB7B  | TTTGGGTATCTACTATGTACGATG  | CCTGTCACTCTATCCCATTACC    |
| RAB8A  | TGACTTCCAATGGCAAACCT      | AAACAGAACCCTAATGATGACG    |
| RAB8B  | GGAGCGAGAAGATGGCGAAGA     | CCGATGGTGGAGATGAAGGTG     |
| RAB9A  | CCTTGGAGATGGTGGAGTTGG     | AAATGGTGTCTCAGGCTTCG      |
| RAB9B  | CCCTTTCCTCTTAGCCATAACC    | CAGATTTACGCTTTTGGTGTG     |
| RAB10  | TCCTGCCACCATTTCTTCTCC     | TTCCGTTTACCTAGCAAGTTACATC |
| RAB11A | GTAGAGCGATGGCTGAAAGAAC    | GTAGGAACTGCCCTGAGATGAC    |
| RAB11B | CCAAAGCCCGAAGAACCAGG      | TGCATCAATCAACAGGCAGAGG    |
| RAB12  | CAAGGATAACTTCAATGTGGACGAG | GGCAGTTCTGGCGGTATCTCA     |
| RAB13  | AAAGAAGGCAAGGAGGTAGGA     | CAAGTGACAGAACAGGAGCAAA    |
| RAB14  | GGAAGATACTGAGGGAGCACA     | GTCAGGACCAGGAACAGGAGT     |
| RAB15  | GCAGAAGGAGAATTGGGATT      | GCAGAGGTGGTGACGAGTAAA     |
| RAB17  | TGCTGCTCTTGACCTCTGCT      | TTGCTACCTGTCTCCGCTTT      |
| RAB18  | AGGAGGAGCCTGTGGTGGTTAT    | GGGTCCGATGAGTGGGATTTCTT   |
| RAB19  | CCAGGGCAGCAGATGAGAAC      | TCAAGGGAACGCACGGTAAA      |
| RAB20  | CTGGGTGTGTGCCTGACTT       | TTGCTGTTCCTTGTCTCTTT      |
| RAB21  | AGGCAATGGCTCTAGTCAGC      | TCCAGAAGAACAGCACCCCTC     |
| RAB22A | TCCATCTCATCAGCCCTTTG      | CACGAGAAACAGTGGCGAGT      |
| RAB23  | CCAACAAACAAAGGACCAAG      | AGAGCCATTAGGAGCAAAGT      |
| RAB24  | CAGAAAGTGGCAGAGGATTACG    | CTACCCAAGCCAGAAAAGGA      |
| RAB25  | TCCACCCGCACTGTGATGTT      | GCATAGGTCTGGTCTTGGTTA     |
| RAB26  | GGAGCGTTCGCACTGTTA        | GTACTCGTGATCTCGGTCAGC     |
| RAB27A | TTGATTGAAGGGTCAGGGAAC     | CAAATAACTCGGCATAAGCACC    |
| RAB27B | TAGTTATCCCTGAGGCCCTTTT    | TTCTCCCTTTAGTGCTTACCCT    |
| RAB28  | CITGGGATCAAATTAACAAAGCAG  | AGGGCAGCCAGAATATCAACA     |
| RAB30  | CCATTACCCAGAGTTACTACCG    | GGTCAATCTTGTGGCCACT       |
| RAB31  | AAAGGTTGAAGGCCGAAAC       | GCCACCACATGCCAAAGTCC      |
| RAB32  | CAAGACCAGCATCATCAAGCG     | GTCATGTTGCCAAATCGCTCC     |
| RAB33A | TGCCGTGGTCTTCCGTCTATG     | TTCAGGGCTAAGTTGGAGGG      |
| RAB33B | GCTCAAGCAATCCTCCCACCTC    | GCCTTCTTATCCCAGTGAAC      |
| RAB34  | ACCTAACTGCCAGCAAGAAGA     | GGGAATACTGCCACCAAGAG      |
| RAB35  | GGCTCCTTTGTAAGTCAGGCTG    | CACGCCACTTCATGGCATGTGG    |

(转下表)

(接上表)

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of target genes

| 基因名称   | 上游引物(5'→3')              | 下游引物(5'→3')            |
|--------|--------------------------|------------------------|
| RAB36  | GCTCCTGCTTCATCTTCCTCG    | CACGTTCTCGCCAGTCTTGG   |
| RAB37  | TTACACGCAGAAGGCACCAT     | AACCCAGGAGGGCTAAACAC   |
| RAB38  | GAAACATGACGAGGGTCTATTACC | GGTTTGCCATTAGGGAGACTTA |
| RAB39  | CAGGAGCGGTTTCAGATCAATAA  | GCAGAAATACAATCCGAAATGG |
| RAB39B | GTACCAGTTCCGGCTCATTG     | TCTGGAGCTTGATGCGTTTT   |
| RAB40A | CCCTAGTACTCGACCCATCA     | ACTTTGCTTACGTCCTGT     |
| RAB40B | GGAAGGCACTGAAAGAAACACG   | TTCATGCACATCCACGTAGAAA |
| RAB40C | GATGAGAACCTTCCTGCTGTGATG | AGCGACAGAAGCTGCCGAGA   |
| RAB41  | CAAGGACTTCACCTCCACCA     | GGCAAGCCCAAATGTAAGAA   |
| RAB42  | CCTTTGACACCCTCGCTGAT     | CCTTTGACACCCTCGCTGAT   |
| RAB43  | CTGGCTCTGACCGTTTCTCT     | GCACCAAGTCTGTGGTCTCAT  |
| RAB44  | GAGCGGATGCTGAGGAGAA      | CCCACAGTTGCCAGATTTCC   |
| Arpc3  | ATACCAAACCTCATCGGAAAC    | AAGACATTGGCCTTGAAGTA   |

伸出伪足。

### 2.2 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足的分

为了有效地分析不同细胞组分中分子的不均匀分布情况, 分别固定并分离趋化运动时 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足。将提取获得的伪足

和胞体蛋白用 SDS-PAGE 分离, 以 FAK 为内参, Histone 3 免疫印迹结果显示, 只有胞体部分有核内成分——组蛋白存在, 而伪足部分则没有(图 2)。该结果表明, 基于 3.0 μm Boyden 小室实验体系分离胞体和伪足组分的实验方案是成功的。

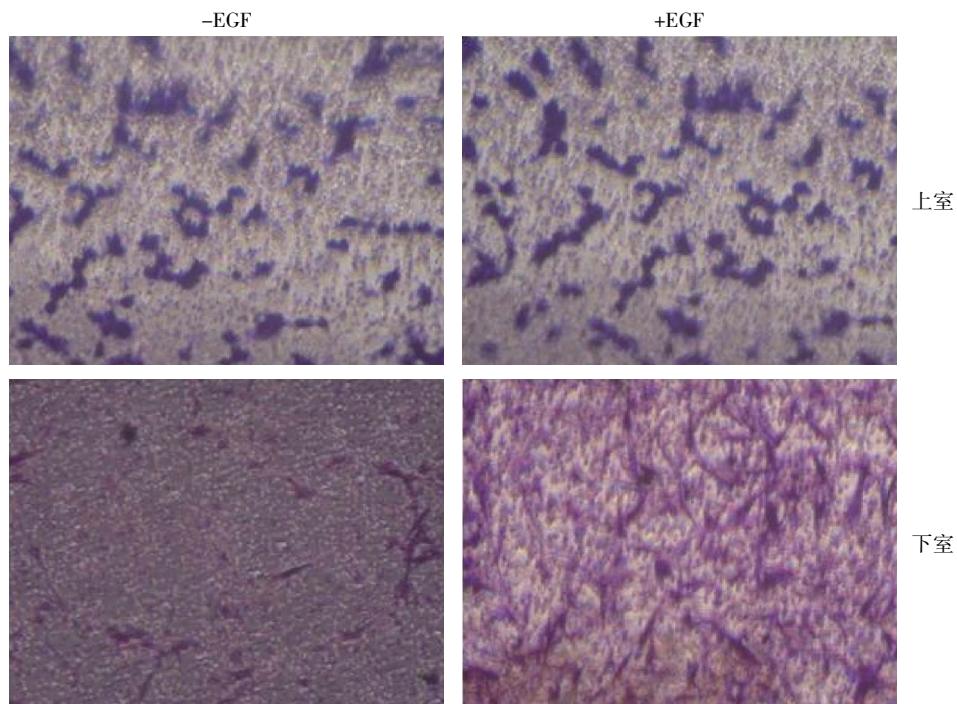


图 1 EGF(10 ng/ml)诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞伸出伪足(× 200)

Figure 1 MDA-MB-231 breast cancer cells extend pseudopodia in response to EGF (10 ng/ml) stimulation (× 200)

### 2.3 Rab 基因家族在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足中的差异表达

首先分析人类 Rab 基因家族 61 个成员的分子进化关系。人 Rab 基因家族的进化关系较复杂, 可分为 3 大簇, 各大簇分别以 RAB1A、RAB35 和

RAB44 为代表(图 3)。在分析了 Rab 基因家族的分子进化关系后, 进一步研究 Rab 基因家族的 mRNA 在乳腺癌细胞的不同组分中的差异表达。在 EGF 刺激 1 h 后, 提取 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足的总 RNA, Arpc3 mRNA 为内参, RT-PCR 实验结

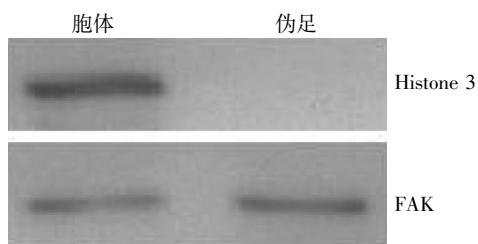


图 2 Histone 3 在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足中的表达

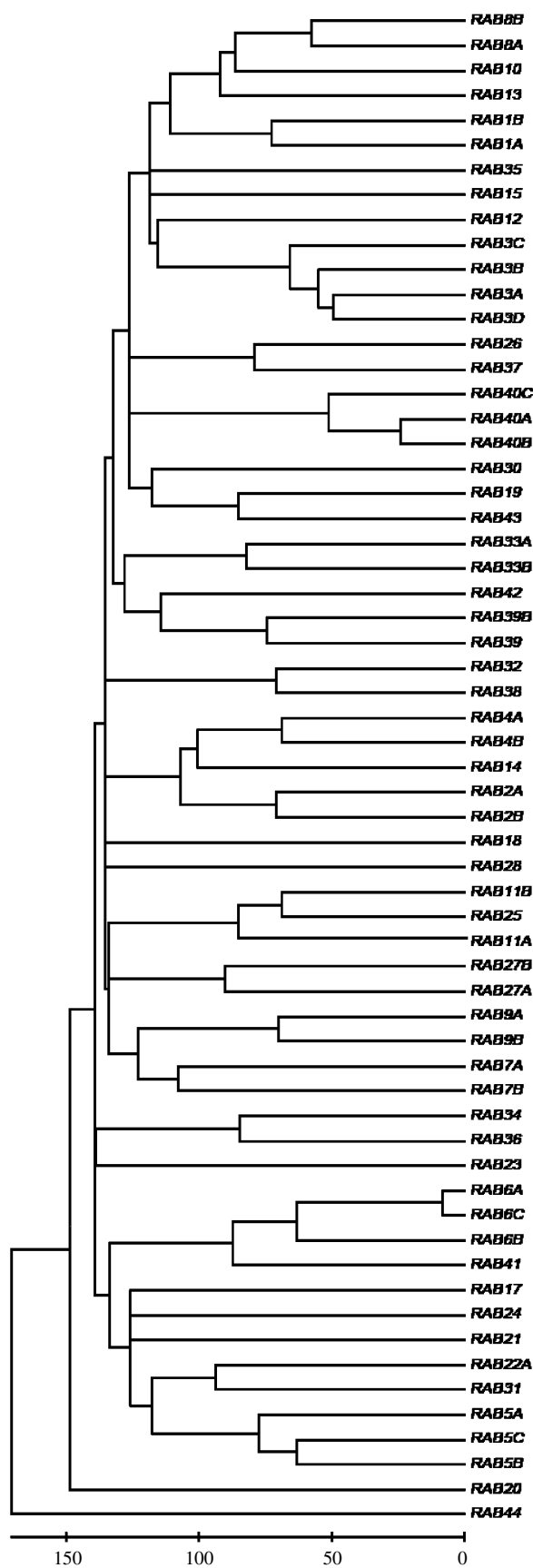
Figure 2 The expression of histone 3 in cell bodies and pseudopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells

果显示了 Rab 基因家族的 mRNA 在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足中的差异表达谱 (图 4)。RAB1A 等 21 个基因在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体中高表达, RAB7A 等 16 个基因在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的伪足中高表达, 而 RAB3B 等 24 个基因在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足中的表达量大体相等(表 2)。

### 3 讨论

细胞通过伸出伪足探究细胞周围的环境, 伪足能感知胞外环境中的黏附因子、趋化物的浓度梯度及周围存在的其它细胞的位置<sup>[2]</sup>。这一过程可以将外界信息传递到细胞体内, 使细胞做出正确的行为决定。所以, 深入阐明在伪足中富集的信号分子及其在时空顺序上的组织调控方式, 对了解细胞形态极性的形成和定向运动的发生有重要意义。

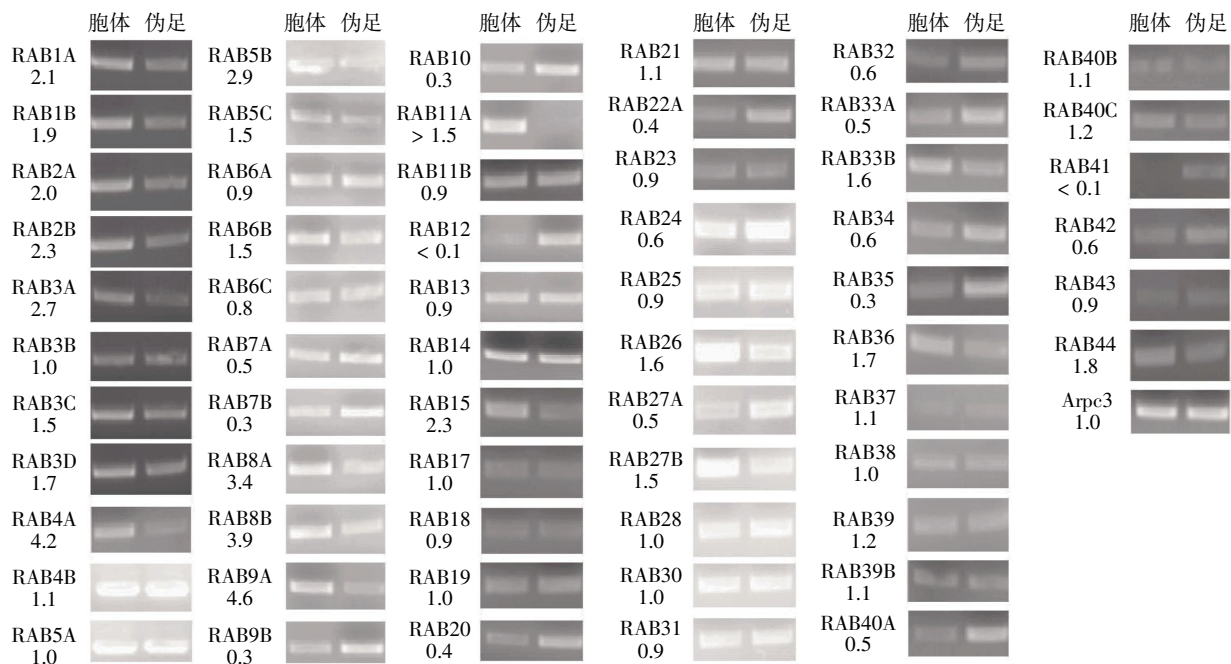
目前在肿瘤细胞运动过程中蛋白和 mRNA 局部定位分布的研究报道很少, 这其中很大一部分原因在于没有简便有效的方法将细胞的胞体和伪足部分分离。有一些研究报道了利用 Boyden 小室的方法成功分离了成纤维细胞、成神经瘤细胞及神经星型胶质细胞胞体和伪足中的蛋白和 mRNA<sup>[3,8,10]</sup>, 但尚未有在乳腺癌细胞中运用和研究的报道。本研究显示, 可以用这种小室方法可靠分离乳腺癌细胞的胞体和伪足, 所得到的蛋白和 RNA 均可运用于进一步的定量生化分析。本研究发现细胞只有伪足部分可以穿过 3.0 μm 的多孔膜到达 Boyden 小室下室, 而胞体部分则滞留在上室, 因为组蛋白 Histone 3 的免疫印迹实验结果充分证实了这种分离的可靠性, 这是该实验体系是否成功建立的最关键的判定, 因为只要胞体进入下室, 无论多少, 都会使伪足组分杂带有胞体内的物质, 进而影响实验的准确性。同时, 这一实验体系很好地模拟了在体内生理环境中, 肿瘤细胞向周围基质空隙伸出伪足进而开始浸润侵袭的



进化树下方的数值表示 1 000 次循环的置信度。

图 3 人类 Rab 基因家族成员的聚类关系

Figure 3 The phylogenetic relationship of homo Rab genes



基因符号下的数字: 差异表达分析, 用胞体灰度值/伪足灰度值表示; Arpc3 为内参。

图 4 人类 Rab 基因家族在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足中的表达

Figure 4 The expression of homo Rab genes in cell bodies and pseudopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells

表 2 人类 Rab 基因家族在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞胞体和伪足中的表达模式

Table 2 The expression patterns of homo Rab genes in cell bodies and pseudopodia of MDA-MB-231 breast cancer cells

| 差异表达模式         | 差异表达的基因   |
|----------------|---|
| 胞体中高表达         | RAB1A、RAB1B、RAB2A、RAB2B、RAB3A、RAB3C、RAB3D、RAB4A、RAB5B、RAB5C、RAB6B、RAB8A、RAB8B、RAB9A、RAB11A、RAB15、RAB26、RAB27B、RAB33B、RAB36、RAB44(21 个基因)                    |
| 在胞体和伪足中表达量大体相等 | RAB3B、RAB4B、RAB5A、RAB6A、RAB6C、RAB11B、RAB13、RAB14、RAB17、RAB18、RAB19、RAB21、RAB23、RAB25、RAB28、RAB30、RAB31、RAB37、RAB38、RAB39、RAB39B、RAB40B、RAB40C、RAB43(24 个基因) |
| 伪足中高表达         | RAB7A、RAB7B、RAB9B、RAB10、RAB12、RAB20、RAB22A、RAB24、RAB27A、RAB32、RAB33A、RAB34、RAB35、RAB40A、RAB41、RAB42(16 个基因)   |

过程。除了可以分离 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的胞体和伪足, 对上皮来源的肿瘤细胞也均可参照本方法分离肿瘤细胞的局部组分。这种伪足分离方法可以进一步联合运用生物信息学的分析方法, 进而作深入的分析。已有报道运用这种伪足分离方法联合质谱分析鉴定伪足中表达的蛋白质组<sup>[15]</sup>。还有通过全基因组的 RNA 芯片扫描鉴定成纤维细胞伪足中富集的 mRNA 表达谱<sup>[3]</sup>。未来, 用蛋白质或基因组学技术了解肿瘤细胞伪足中蛋白和 mRNA 的表达谱, 对深入阐明侵袭转移机制有重要意义。

本研究对利用 Boyden 小室方法分离提取到的伪足成分进行了初步的生化分析, 结果发现 Rab 基因家族在乳腺癌细胞的胞体和伪足中的差异表达谱。本研究发现, Rab25 在 EGF 趋化运动的乳腺癌

细胞的胞体和伪足中均匀分布, 暗示 Rab25 在乳腺癌伪足的伸展过程中可能不起关键作用。Rab25 和 Rab11A、Rab11B 的分子进化关系较近, Rab11B 的表达模式和 Rab25 类似, Rab11A 则在伪足中高表达, 暗示 Rab11A 可能在乳腺癌伪足的伸展过程中起作用。有研究发现, 在溶血磷脂酸(LPA)的刺激下, Rab13 在 NIH3T3 细胞的伪足中富集, 并可介导其伪足的形成<sup>[16]</sup>。本研究发现, Rab13 在 EGF 趋化运动的乳腺癌细胞的胞体和伪足中均匀分布, 表明在不同的趋化因子刺激下, Rab13 的亚细胞分布可以明显不同, 说明 Rab13 在真核细胞中行使多种功能, 参与细胞的多种生理生化活动。Thomsen 等<sup>[17]</sup>发现, 鼠星形胶质细胞的伪足中有大量 18S rRNA 的存在, 该现象说明运输到伪足中的 mRNA 可以在伪

足中原位合成蛋白。这种通过输送 mRNA 到细胞的局部再合成蛋白的方式,有效地避免了蛋白质在运输过程中被修饰或降解,并使目标蛋白在细胞局部大量富集后迅速行使功能。本研究发现的诸多在 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的伪足中富集的 Rab 家族基因是否可在伪足中原位合成蛋白,需要进一步的研究和确认。

综上所述,本文利用 Boyden chamber 模型成功分离了乳腺癌细胞的胞体和伪足,对分离的 RNA 进行初步分析发现 Rab 基因家族在胞体和伪足中的差异表达谱。这些结果为进一步研究 Rab 基因家族在乳腺癌细胞伪足形成过程中的确切调控机制奠定基础,为深入阐明乳腺癌转移侵袭分子机制调控提供新的理论基础和研究方向。

#### [参考文献]

- [1] Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, et al. Spatial regulation of b-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1[J]. *Nature*, 2005, 438(7067): 512-515
- [2] Fusco D, Accornero N, Lavoie B, et al. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(2): 161-167
- [3] Latham VM, Yu EH, Tullio AN, et al. A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes b-actin mRNA in fibroblasts [J]. *Curr Biol*, 2001, 11(13): 1010-1016
- [4] Liu G, Grant WM, Persky D, et al. Interactions of elongation factor 1a with F-actin and b-actin mRNA; implications for anchoring mRNA in cell protrusions [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(2): 579-592
- [5] Sansom OJ, Reed KR, Hayes AJ, et al. Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(12): 1385-1390
- [6] Gu W, Wells AL, Pan F, et al. Feedback regulation between zipcode binding protein 1 and b-catenin mRNAs in breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(16): 4963-4974
- [7] Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, et al. CRD-BP mediates stabilization of bTrCP1 and c-myc mRNA in response to b-catenin signalling[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 898-901
- [8] Watanabe T, Wang S, Noritake J, et al. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration [J]. *Dev Cell*, 2004, 7(6): 871-883
- [9] Leung KM, van Horck FP, Lin AC, et al. Asymmetrical b-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1 [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(10): 1247-1256
- [10] Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, et al. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3b and functions of the microtubule plus end binding protein APC[J]. *Neuron*, 2004, 42(6): 897-912
- [11] Koester MP, Müller O, Pollerberg GE. Adenomatous polyposis coli is differentially distributed in growth cones and modulates their steering [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(46): 12590-12600
- [12] Rusan NM, Akong K, Peifer M. Putting the model to the test; are APC proteins essential for neuronal polarity, axon outgrowth, and axon targeting [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(2): 203-212
- [13] Cho SY, Klemke RL. Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold [J]. *J Cell Biol*, 2002, 156(4): 725-736
- [14] Yang Y, Du J, Hu Z, et al. Activation of Rac1-PI3K/Akt is required for epidermal growth factor-induced PAK1 activation and cell migration in MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *J Biomedical Res*, 2011, 25(4): 237-245
- [15] Piper M, Anderson R, Dwivedy A, et al. Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of Xenopus retinal growth cones[J]. *Neuron*, 2006, 49(2): 215-228
- [16] Mili S, Moissoglou K, Macara IG. Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions [J]. *Nature*, 2008, 453(7191): 115-119
- [17] Thomsen R, Nielsen AL. A Boyden chamber-based method for characterization of astrocyte protrusion localized RNA and protein[J]. *Glia*, 2011, 59(11): 1782-1792

[收稿日期] 2012-04-22