

Wnt5a/Dvl2/Rac1 信号通路调控 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞的迁移

张万秋¹, 田寅辉², 朱一超², 沈恬^{2*}

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

[摘要] 目的:探讨 Wnt5a 信号通路调控 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移的分子机制。方法:在建立了划痕实验检测 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移模型的基础上,研究 Wnt5a/Dvl2/Rac1 信号通路对 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移的调控。结果:高表达的 Rac1 可促进 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞的迁移,干扰 Rac1 的表达可显著降低其迁移,Rac1 活性受 Wnt5a/Dvl2 信号通路的调控。结论:Wnt5a/Dvl2/Rac1 信号通路可调控 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞的迁移,此为深入阐明乳腺癌细胞转移的分子调控机制提供了新线索。

[关键词] Wnt5a; Rac1; MDA-MB-231 人乳腺癌细胞; 迁移

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1664-05

doi:10.7655/NYDXBNS20131204

Wnt5a/Dvl2/Rac1 signaling pathway regulates migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells

Zhang Wanqiu¹, Tian Yinhui², Zhu Yichao², Shen Tian^{2*}

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

[Abstract] **Objective:**To investigate the underlying mechanisms whereby MDA-MB-231 human breast cancer cell migration is regulated through Wnt5a signaling pathway. **Methods:**The migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells was detected using wound healing assay, and then the migratory ratio of MDA-MB-231 human breast cancer cells blocking the Rac1 expression was measured using siRNA. **Results:**The activated Rac1 promoted the migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. Blocking of Wnt5a/Dvl2 signaling pathway was capable of retarding the Rac1 activation. **Conclusion:**We demonstrated that MDA-MB-231 human breast cancer cell migration is regulated by Wnt5a/Dvl2/Rac1 signaling pathway. These findings could provide evidences for designing novel therapy based on inhibition of breast carcinoma metastasis.

[Key words] Wnt5a; Rac1; MDA-MB-231 human breast cancer cells; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1664-1668]

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率约占全身各种恶性肿瘤的 7%~10%^[1]。乳腺癌的侵袭和转移是其威胁患者健康乃至生命的主要原因,因此,其转移调控机制的研究备受关注。现有的研究发现,一方面,Rho 蛋白家族可通过对细胞骨架的调控,进而影响恶性肿瘤细胞的迁移^[2];另一方面,调控 Rho 蛋白家族的信号通路仍不十分清楚^[3],因此这方面工作的深入对阐明恶性肿瘤细胞迁移的

机制极为重要。本课题组前期研究表明,Wnt5a/Dvl2 信号通路可通过调控 Rho 蛋白家族中 RhoA 进而影响乳腺癌细胞的迁移^[4]。那么,在乳腺癌细胞迁移过程中,Wnt5a 是否可通过调控 Rho 蛋白家族中的其他分子进而调控乳腺癌细胞的迁移呢?本工作研究 Rho 蛋白家族成员 Rac1 是否参与 Wnt5a/Dvl2 信号通路对 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

MDA-MB-231 人乳腺癌细胞系购自美国模式菌种收藏中心(ATCC)。

[基金项目] 江苏省卫生厅科技项目(JZ201210);国家自然科学基金青年基金(81101999)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:levytian@njmu.edu.cn

鼠抗 Wnt5a 单克隆抗体(Novus 公司,美国),兔抗 Dvl2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),鼠抗 Rac1 单克隆抗体(Chemicon 公司,美国),鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(Kang Chen 生物公司,上海)。ECL 发光试剂盒(Pierce 公司,美国)。重组 Wnt5a(rWnt5a, R&D Systems, 美国)。siRNA-Wnt5a(5'-AGUGCAAUGUCU-UCCAAGUTT-3')、siRNA-Dvl2-1(5'-GUGAGAGC-UACCUAGUCAATT-3')、siRNA-Dvl2-2(5'-CGCUAA-ACAUGGAGAAGUATT-3')、siRNARac1-1(5'-GAGG-AAGAGAAAAUGCCUGTT-3')、siRNA-Rac1-2(5'-G-UUCUUAUUUGCUUUUCCTT-3')均由上海吉玛制药技术有限公司合成,转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MDA-MB-231 人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% CO₂、饱和湿度的 37℃ 细胞培养箱中培养。

1.2.2 siRNA

将细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种至 6 孔板中,置于 5% CO₂ 细胞培养箱中 37℃ 培养。待细胞生长至融合度约 50% 时,将添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基更换为无血清 DMEM 培养基,并立即按转染试剂说明书进行 siRNA 转染。用 200 μ l DMEM 无血清培养基稀释 5 μ l siRNA (2 种及以上 siRNA 共同作用时,每种各 5 μ l 用共 200 μ l DMEM 无血清培养基稀释),柔和混匀。再用 200 μ l DMEM 无血清培养基稀释 5 μ l Lipofectamine 2000 试剂,轻轻混匀,室温放置 5 min。然后将稀释好的 siRNA 和 Lipofectamine 2000 试剂混合,轻柔混匀,室温放置 20 min。将 siRNA、Lipofectamine 2000 混合物逐滴加入含无血清 DMEM 培养基的细胞培养板中并混匀。培养 4~6 h 后,再将培养液更换成添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。

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)裂解 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞,提取总蛋白,BCA 比色法测定蛋白浓度。取相同量总蛋白行 SDS-PAGE 电泳:80 V 电压 20~30 min 后,110 V 电压约 1 h;250 mA 湿转印 120 min,将蛋白转印到 PVDF 膜上,膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。根据实验需要,分别加入抗 Wnt5a 抗体(1:1 000),或抗 Dvl2 抗体(1:1 000),或抗 Rac1

抗体(1:1 000),4℃ 孵育过夜,次日 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,然后膜根据其一抗再加入相应的鼠二抗(1:1 000 或 1:2 000)或兔二抗(1:1 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜两次,每次 5 min, TBS 洗膜 1 次 5 min,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 Pull-down 实验

Rac1 蛋白所起的生物作用,其关键决定于活化的 Rac1 (Rac1-GTP),因此,为研究 Rac1-GTP,首先将等量表达 GST-RBD 的 BL21 大肠杆菌裂解液与 Magne GST-谷胱甘肽磁珠(Promega 公司,美国)混合,并在 4℃ 条件下匀速旋转 > 40 min,该过程使仅能与 Rac1-GTP 结合的 RBD 结构域结合到磁珠上,收集磁珠,用预冷的洗脱缓冲液(4.2 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, 280 mmol/L NaCl 和 10 mmol/L KCl, pH 7.2)洗涤磁珠 3 遍,弃缓冲液。将上述结合了 RBD 结构域的磁珠与等量的细胞总蛋白混合,4℃ 条件下匀速旋转 > 1 h,以使活化的 Rac1 (Rac1-GTP)结合到磁珠上,收集磁珠。用预冷的洗脱缓冲液洗涤磁珠 3 次。最后,用 2 \times SDS 上样缓冲液重新悬浮磁珠,并将磁珠煮沸,进行免疫印迹分析。

1.2.5 划痕实验

将 1×10^5 个/孔 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞接种于 96 孔板,常规培养至形成完全融合的细胞单层。无血清 DMEM 高糖培养基中饥饿过夜,用 10 μ l 移液器枪头沿培养板底部作“—”字形划痕后,加入含 500 ng/ml rWnt5a 的 DMEM。倒置显微镜下拍照并确定划痕边缘区域后,置 5% CO₂ 细胞培养箱中 37℃ 培养 4 h,倒置显微镜再次观察并确定划痕边缘,从而计算出处理前后划痕边缘相对距离的差值,以确定细胞迁移距离。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,采用 *t*-test 法分析, $P \leq 0.05$ 表示有统计学差异。每组实验独立重复 3 次或以上。

2 结果

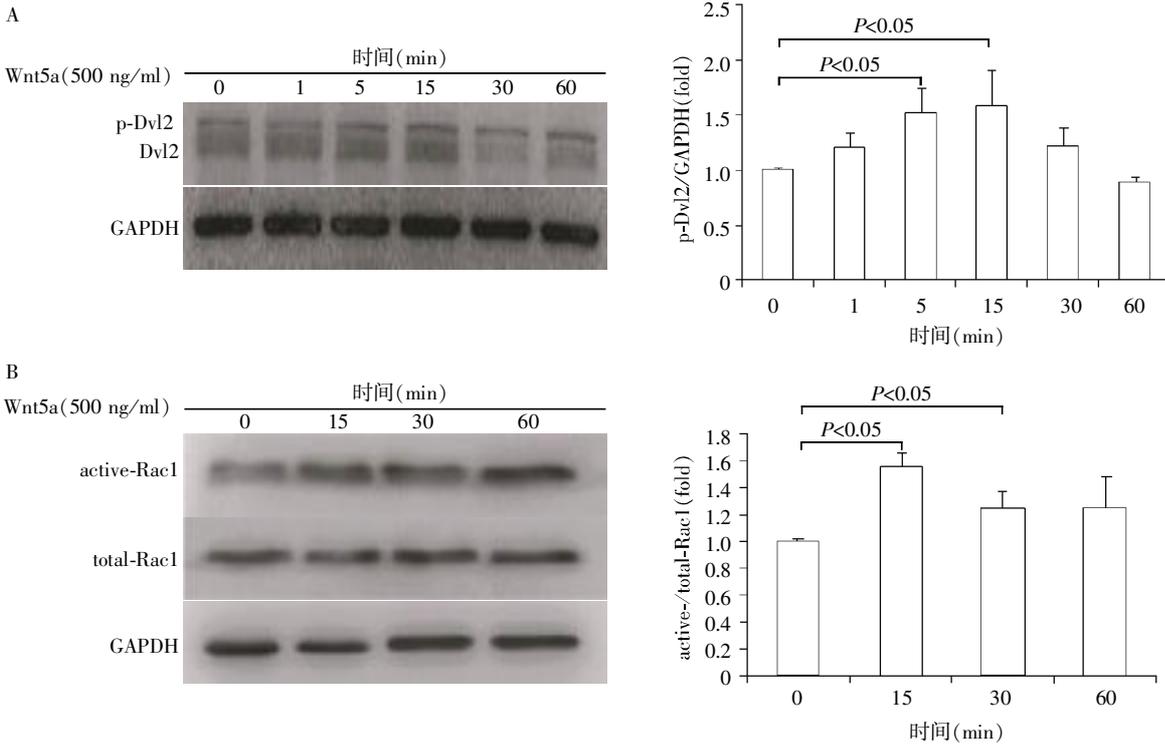
2.1 Wnt5a 刺激诱导 Dvl2 和 Rac1 活化

为了研究 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Rac1 活化与 Wnt5a/Dvl2 信号通路之间的关系,用 rWnt5a 刺激 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞,然后检测细胞中 Dvl2 和 Rac1 的表达量和活性的改变。研究结果表明,rWnt5a 可显著增加 MDA-MB-231 细胞中 Dvl2 的磷酸化(图 1A)和 Rac1 的活性(图 1B)。

2.2 Rac1 参与 MDA-MB-231 细胞迁移的调控

为了确定 Rac1 与 MDA-MB-231 细胞迁移的关系,利用 siRNA-Rac1 转染 MDA-MB-231 细胞,siRNA-Rac1 转染后的 MDA-MB-231 细胞其 Rac1 的表达明显降低(图2A)。划痕实验结果表明,在未给予 rWnt5a 刺激的环境下,未干扰组 MDA-MB-231 细胞

的迁移能力是干扰组的约 1.6 倍(图 2B)。此外, rWnt5a 可明显促进未经 siRNA-Rac1 处理的 MDA-MB-231 细胞迁移;而在 siRNA-Rac1 干扰组,给予 rWnt5a 刺激,MDA-MB-231 细胞的迁移则无明显改变(图 2B)。该结果清楚表明,Rac1 参与 Wnt5a 信号通路介导的 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞的迁移。



A:rWnt5a 诱导 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Dvl2 的磷酸化(n = 3);B:rWnt5a 诱导 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Rac1 的活化(n = 3)。

图1 rWnt5a 诱导 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Dvl2 与 Rac1 活化

Figure 1 Activation of Dvl2 and Rac1 induced by rWnt5a in MDA-MB-231 human breast cancer cells

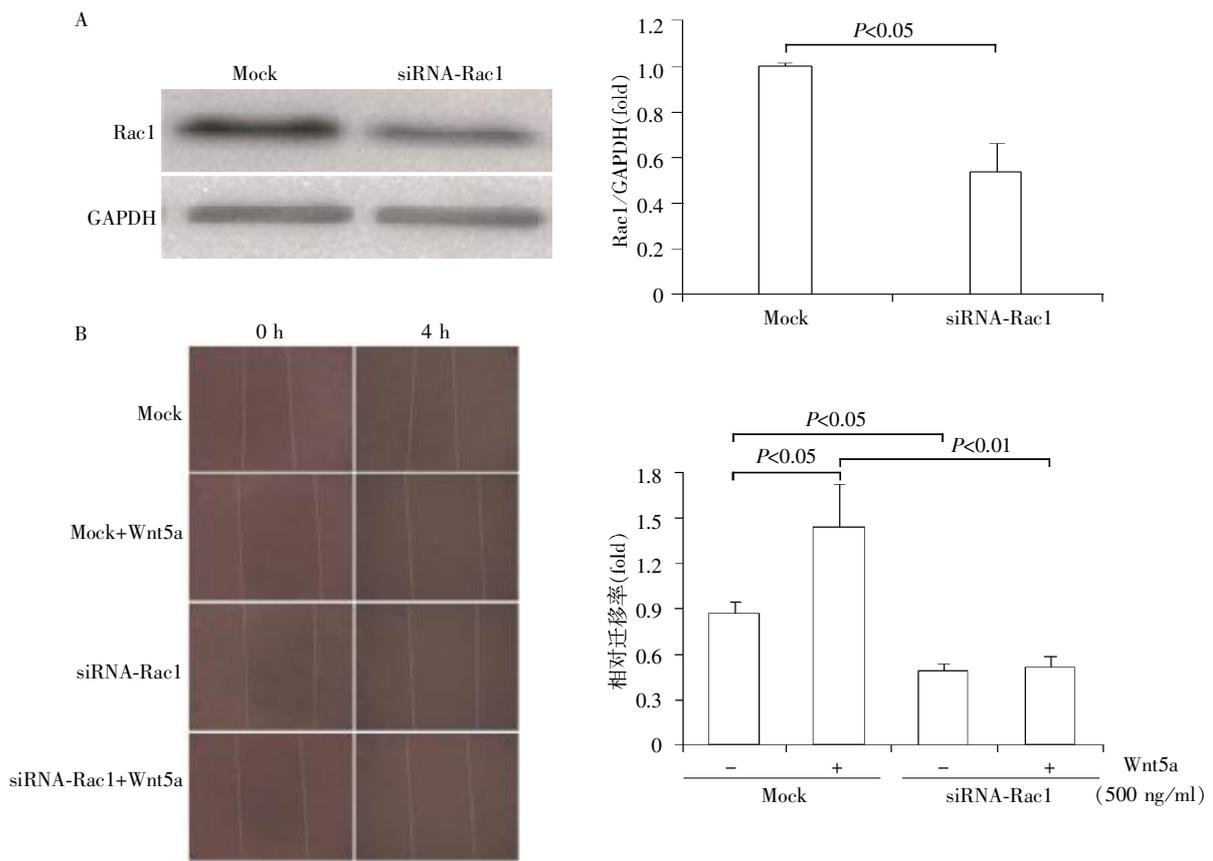
2.3 Wnt5a/Dvl2 信号通路调节 Rac1 的活性

为了进一步确定 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Wnt5a/Dvl2 信号途径与 Rac1 的关系,首先分别干扰 Wnt5a 和 Dvl2,然后检测 Rac1 的活性。结果显示,干扰 Wnt5a 或 Dvl2 均可显著降低 Rac1 活性,而经 rWnt5a 诱导的 MDA-MB-231 细胞,其 Rac1 活性在未干扰组显著增加,而在干扰组则无明显变化(图 3A)。反之,干扰 Rac1 的表达对 Dvl2 的活性没有明显影响(图 3B)。这些结果清楚表明,Wnt5a 信号通路调控着 Rac1 活性,且 Rac1 位于 Wnt5a/Dvl2 信号通路的下游。

Rho 蛋白家族中的重要一员,参与细胞膜褶皱和片层伪足形成的调控^[7],Rac1 在多种不同肿瘤中表达。越来越多的证据表明,依赖于 Rac1 的信号通路在肿瘤恶性转化过程中发挥重要作用^[8]。近来有关乳腺癌研究发现,Rho 家族蛋白受 Wnt/PCP 信号通路的调控^[9]。本实验室前期的研究已发现,Wnt5a/Dvl2/Daam1/RhoA 信号通路能调控 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移^[4]。RhoA 与 Rac1 同为小 G 蛋白 Rho 家族成员,在细胞骨架重构和功能调控中发挥着重要的作用,但不同的是,RhoA 主要与细胞内应力纤维的重构相关。本研究发现,活化的 Rac1 可促进 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移,干扰 Rac1 可使其迁移显著降低(图 2)。有研究表明,在 L 细胞(来源于正常的皮下组织细胞,但在培养过程中受甲基胆蒽处理则恶变,移植于 C3H 系小白鼠皮下则形成肉瘤)中 Rac1 可以作为磷酸化 Dvl2 信号的下游

3 讨论

Rho 蛋白属于小 G 蛋白 Ras 超家族,主要参与细胞骨架重构、细胞迁移、细胞增殖等过程的调控^[5],其在肿瘤的发生和发展中也发挥重要作用^[6]。Rac1 是



A: siRNA-Rac1 显著抑制 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Rac1 表达量 ($n=3$); B: siRNA-Rac1 显著降低 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移 ($n=3$)。

图 2 siRNA-Rac1 显著降低 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞迁移

Figure 2 MDA-MB-231 human breast cell migration significantly inhibited by Rac1 siRNA

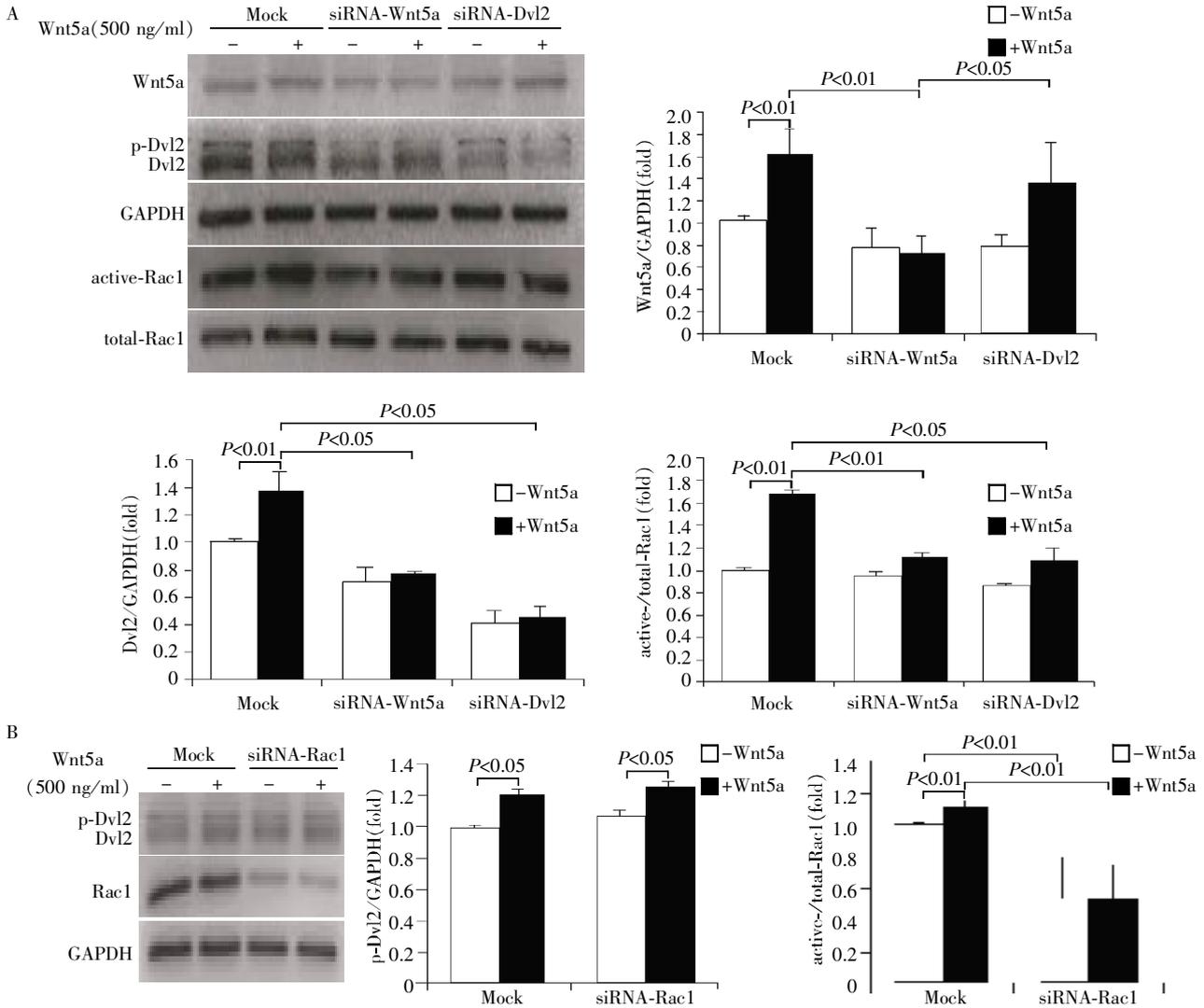
与其共定位,介导 Wnt5a 对 AP-1 活化的调控^[10]。

Wnt 信号通路可调节细胞增殖、分化以及细胞在胚胎发育中的命运^[11]。Wnt 信号通过 β -连环蛋白依赖性通路(经典 Wnt 信号)和 β -连环蛋白非依赖性通路(非经典 Wnt 信号)转导^[12]。研究发现,Wnt 信号通路肿瘤的发生及发展有关,在多种癌症中发现其有不同程度的过表达。Wnt5a 是非经典 Wnt 信号通路家族中的重要一员,其在肿瘤发生和发展中的作用尚存争议:一方面,与 Wnt1、Wnt3a 和 Wnt7a 相比,Wnt5a 起了抑癌基因的作用,如在转移性神经母细胞瘤中,Wnt5a 表达比原发性神经母细胞瘤低;另一方面,与良性组织相比,Wnt5a 在多种癌症中过表达,如乳腺癌、黑色素瘤和胃癌,暗示其为促癌因子^[4,13-14]。本研究结果证明,Wnt5a/Dvl2 信号通路可促进 MDA-MB-231 细胞迁移。实验发现,在 MDA-MB-231 细胞中,Rac1 可被 Wnt5a 显著激活,干扰 Wnt5a 或 Dvl2 表达则可显著抑制 Rac1 的活性,同时,Wnt5a 对 MDA-MB-231 细胞迁移的促进作用明显降低。进一步的研究表明,在 Wnt5a/Dvl2/Rac1 信号通路对 MDA-MB-231 细胞迁移的调

控中,Rac1 是作为 Wnt5a/Dvl2 信号通路的下游进而发挥作用的。结合本课题组以往的实验结果,本文认为,Wnt5a/Dvl2 信号通路除通过 RhoA 促进 MDA-MB-231 细胞的迁移外,Wnt5a/Dvl2 信号通路也可通过调控 Rac1 活化进而促进 MDA-MB-231 细胞的迁移。这些结果为进一步研究 Wnt5a-小 G 蛋白信号通路在乳腺癌细胞迁移过程中的调控机制进行了有益的尝试。

[参考文献]

- [1] Moreno-Aspitia A. Clinical overview of sorafenib in breast cancer[J]. Future Oncol,2010,6(5):655-663
- [2] Han G,Fan B,Zhang Y,et al. Positive regulation of migration and invasion by vasodilator-stimulated phosphoprotein via Rac1 pathway in human breast cancer cells [J]. Oncol Rep,2008,20(4):929-939
- [3] Klaus A,Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer [J]. Nat Rev Cancer,2008,8(5):387-398
- [4] Zhu Y,Tian Y,Du J,et al. Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer



A: siRNA-Wnt5a 或 siRNA-Dvl2 对 Rac1 活性的影响 (n = 3); B: siRNA-Rac1 对 Dvl2 磷酸化的影响 (n = 3)。

图3 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞中 Wnt5a/Dvl2 信号途径调节下游分子 Rac1 活性

Figure 3 Regulation of Rac1 activation by Wnt5a/Dvl2 signaling pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells

cell migration [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37823

[5] Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking [J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(10): 522-529

[6] Ridley AJ. Rho family proteins; coordinating cell responses [J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(12): 471-477

[7] Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, et al. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck [J]. Nature, 2002, 418(6899): 790-793

[8] Valderrama F, Thevapala S, Ridley AJ. Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1 [J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 14): 3310-3319

[9] Lai SL, Chien AJ, Moon RT. Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis [J]. Cell Res, 2009, 19(5): 532-545

[10] Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, et al. Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(14): 3610-3619

[11] Kim W, Kim M, Jho EH. Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus [J]. Biochem J, 2013, 450(1): 9-21

[12] Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, et al. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(6): 346-354

[13] 张万秋, 朱一超. 缺氧对人肝癌细胞 MHCC-97L 迁移的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(11): 1522-1526

[14] 张万秋, 田寅辉, 朱一超. 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 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2012, 32(9): 1192-1198