

IQGAP3 通过上调 WNK1 促进胆管癌细胞增殖

邵子诚, 张耀东, 卢泽法, 李相成*

南京医科大学第一附属医院肝移植中心, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨IQGAP3在胆管癌中的表达情况及其临床意义。方法:通过RT-PCR和Western blot测定胆管癌组织和细胞系中IQGAP3的表达量,通过平板克隆、CCK8、EdU增殖实验等来评价IQGAP3在胆管癌细胞增殖中的作用,通过Western blot和磷酸化蛋白芯片验证IQGAP3调控胆管癌细胞增殖中可能存在的相关机制。结果:IQGAP3在胆管癌组织和细胞中均高表达,体外实验表明IQGAP3可以促进胆管癌细胞增殖。结合临床样本数据分析发现IQGAP3的表达和胆管癌患者肿瘤大小、病理分级以及AJCC TNM分期相关,且具有统计学差异($P < 0.05$)。Kaplan-meier生存分析结果显示高表达IQGAP3的胆管癌患者的生存时间比低表达IQGAP3的胆管癌患者生存时间短。在胆管癌细胞中IQGAP3和WNK1的表达水平呈正相关。结论:IQGAP3在胆管癌中高表达,且可能通过上调WNK1促进胆管癌细胞的增殖。

[关键词] 胆管癌;IQGAP3;增殖

[中图分类号] R735.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1043-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180806

IQGAP3 promotes the proliferation of CCA cells by up-regulating WNK1

Shao Zicheng, Zhang Yaodong, Lu Zefa, Li Xiangcheng*

Liver Transplant Center, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of IQGAP3 in cholangiocarcinoma (CCA) and its clinical significance. **Methods:** RT-PCR and Western blot were performed to determine the levels of IQGAP3 in CCA tissues and CCA cell lines. Colony formation assay, CCK8 and EdU proliferation experiment were used to reveal the role of IQGAP3 in CCA cell proliferation *in vitro*. Western blot and phosphorylated proteinchip array were used to verify the possible mechanisms of IQGAP3 in regulating the proliferation of CCA cells. **Results:** IQGAP3 was overexpressed in the CCA tissues and cell lines. IQGAP3 promoted the proliferation of CCA cell lines *in vitro*. The expression of IQGAP3 was significantly correlated with tumor size, pathological grading and AJCC TNM staging in CCA patients combined with clinical sample data. Kaplan-meier survival analysis showed that the survival time of the CCA patients with high IQGAP3 expression was significantly lower than that those with low IQGAP3 expression. The expression level of IQGAP3 was positively correlated with the expression of WNK1. **Conclusion:** IQGAP3 was overexpressed in CCA and might promote the proliferation of CCA cells by up-regulating WNK1.

[Key words] cholangiocarcinoma; IQGAP3; proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1043-1048]

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)通常是指起源于肝内肝外胆管上皮的恶性肿瘤^[1]。近年来胆管肿瘤的发病率不断提高,约占消化道肿瘤的3%,已是肝胆系统肿瘤中的第二大肿瘤^[2]。根据胆管肿瘤发生的部位不同,胆管癌可分为肝内胆管癌、肝门部

[基金项目] 国家自然科学基金(81670570);江苏省重点病种规范化诊疗研究基金(BE2016789)

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

胆管癌、远端胆管癌^[3]。胆管癌患者的主要临床症状包括皮肤巩膜黄染、腹痛、食欲减退、消瘦等^[4]。目前,外科手术切除仍是治疗胆管癌的主要手段,但是由于缺乏早期诊断的方法,大部分患者初次就诊时已失去根治性手术机会,仅30%~40%的患者可行外科手术治疗^[5]。由于缺乏敏感的分子靶向化疗药物,胆管癌患者的总体生存率不佳,5年生存率仅为5%~10%^[6]。因此,探索其潜在的分子靶向机制

对于提高胆管癌患者的长期生存具有重大意义。

IQGAP3 (IQ motif containing GTPase activating protein3)是IQGAPs蛋白家族中的一员,其主要组成结构包括 Calponin 同源结构域、多聚脯氨酸结合结构域、钙调蛋白结合花样、GTPase 激活蛋白相关结构域等^[7]。在人体中, IQGAPs 家族中一共有 IQGAP1、IQGAP2、IQGAP3 3位成员。IQGAP1 是最早发现的家族成员,在人体中 IQGAP1 几乎没有组织特异性,在肿瘤发生发展中起促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的作用^[8]。IQGAP2 与 IQGAP1 有 62%的同源性,功能却与 IQGAP1 相反,主要参与抑制肿瘤的增殖过程^[9]。IQGAP3 是 IQGAPs 家族中最后发现且研究最少的家族成员, IQGAP3 的功能与 IQGAP1 类似,通过与目标蛋白结合,能够促进细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[10]。迄今为止, IQGAP3 的表达情况及功能已经在肺癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌、直肠癌、胃癌等肿瘤中有过相关报道^[11-15],但其在胆管肿瘤中的表达及相关功能目前并不明确。

1 材料和方法

1.1 材料

选取在南京医科大学第一附属医院肝移植中心接受外科手术的 47 对胆管癌肿瘤标本和癌旁组织。组织标本的获取均经患者及家属知情同意,并通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会同意。组织标本术后均通过南京医科大学第一附属医院病理科确诊为胆管癌。组织离体后立即切取并存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱里。

胆管癌细胞株 HUCCT1、QBC939、RBE、HCCC9810 和正常胆管上皮细胞株 HiBEC (中国科学院上海生命研究所),所有细胞均用 DMEM 培养基 (Gibco 公司,美国)加 10%胎牛血清及 1%青霉素、链霉素在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的温箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

取对数生长期的 HCCC9810 和 RBE 细胞种植于 6 孔板中培养 24 h, IQGAP3 敲低慢病毒 (shRNA, 上海和源生物)及其阴性对照通过 Polybrene (上海和源生物)进行转染,具体实验步骤参照慢病毒感染操作手册。转染 24 h 更换新鲜培养基,孵育 48 h 行 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选细胞后收集细胞检测转染效率并进行功能实验。

1.2.2 免疫组织化学染色

组织切片用浓度 10%的福尔马林固定后脱蜡;切

片在柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) 中浸泡 15 min; IQGAP3 抗体 (武汉 Protein Tech 公司,美国)浓度稀释为 1:100 滴加到组织切片上, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,滴加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (武汉 Protein Tech 公司,美国)后,用苏木素复染。最后通过光学显微镜拍照摄取图像,并用 NIS-Elements v4.0 软件评价染色情况。

1.2.3 实时定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定

组织和细胞的 RNA 提取均根据试剂商说明书使用 TRIzol 液 (Invitrogen 公司,美国)提取,通过使用 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 吸光度比值来评估 RNA 的浓度和纯度。使用 RNA 逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司,日本)并根据其说明书逆转录成总 cDNA。根据 Roche 定量试剂盒 (Roche 公司,瑞士)配制相应的反应体系,其中相关引物序列为 IQGAP3: 上游引物 5'-GCAGCCTATGAACGCCTCA-3', 下游引物 5'-GGA-GGGTGCAAACAGTGG-3'; GAPDH: 上游引物 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3', 下游引物 5'-AAGT-GGTCGTTGAGGGCAATG-3'。然后放入 Stepone Plus 实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司,美国)中进行扩增,扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s, 40 个循环,最后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s。在 ABI7500 系统中检测记录目的基因和相应内参的 C_t 值,最终结果采用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算。每组实验重复 3 遍。

1.2.4 蛋白印迹实验 (Western blot)

组织和细胞蛋白均通过蛋白提取试剂盒 (北京 Applygen 基因技术公司)提取。通过使用 BCA 蛋白试剂盒 (Pierce Chemical 公司,美国)测定蛋白浓度。SDS-PAGE 进行电泳分离后采用湿转膜法转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 加入一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 15 min; 加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗稀释液孵育 2 h; 最后将 ECL 两种化学发光试剂 (Millipore 公司,美国) 1:1 混合后均匀涂于 PVDF 膜上,在暗室中显影。实验重复 3 遍, GAPDH、IQGAP3、WNK1 抗体稀释比例均为 1:1 000。此外,还通过磷酸化蛋白芯片实验来探索 IQGAP3 作用于胆管癌细胞的相关机制,具体操作步骤参照蛋白芯片试剂商 (BD 公司,美国)说明书。所有 Western blot 实验结果采用 NIH Image J 量化统计。

1.2.5 细胞增殖和平板克隆实验

CCK8 (Cell Counting Kit-8, 细胞计数试剂盒)和 EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷)细胞增殖实验评价细胞增殖功能。96 孔板接种细胞 2 000 个/孔培养 0、24、48、72、96 h 后加入 CCK8

试剂(南京碧云天公司)于37℃培养箱中培养2h,测定吸光度值(450nm)。EdU实验:将约 1×10^6 万个细胞种入6孔板中孵育24h。参照EdU试剂盒(广州锐博生物)说明书加入EdU试剂检测细胞增殖功能,通过荧光显微镜来计数细胞数。通过平板克隆实验来评价细胞集落能力,将1000个细胞种入小细胞培养皿中,培养10d后,用甲醛固定结晶紫染色后计数进行评价。

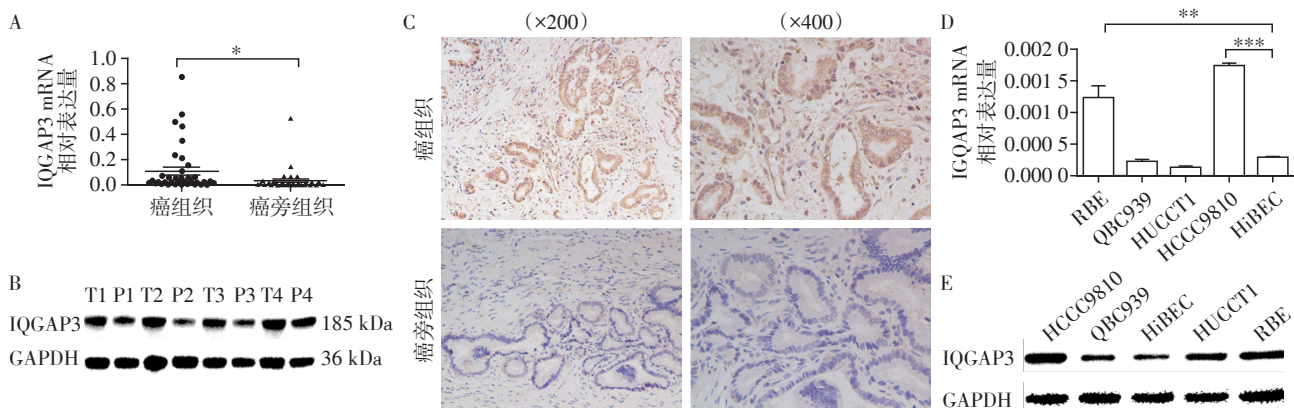
1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0软件对数据进行相关统计学分析,组间差异采用 t 检验,计数资料比较采用卡方检验,生存时间和生存率采用Kaplan-Meier法。结果中计量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IQGAP3在胆管癌组织和细胞系中高表达

RT-PCR和Western blot分别检测胆管癌肿瘤组织和癌旁组织中IQGAP3的表达情况,结果显示IQGAP3在肿瘤组织中的表达高于癌旁组织(图1A、B);免疫组化结果也显示IQGAP3在肿瘤组织中的表达高于癌旁组织(图1C);RT-PCR和Western blot分别检测IQGAP3在胆管癌细胞系(HUCCT1、QBC939、RBE、HCCC9810)和正常胆管细胞HiBEC中的表达情况,结果发现IQGAP3在RBE和HCCC9810细胞系中表达水平明显高于HiBEC(图1D、E),因此采用RBE和HCCC9810两个细胞株进行细胞功能实验。



A: RT-PCR检测47对胆管癌组织和癌旁组织中IQGAP3 mRNA表达情况;B: Western blot检测4对胆管癌组织和其癌旁组织中IQGAP3蛋白表达情况;C:免疫组化结果显示胆管癌组织和癌旁组织中IQGAP3的表达情况;D、E:分别从RT-PCR和Western blot角度验证了IQGAP3在胆管癌细胞系(HCCC9810、QBC939、HUCCT1、RBE)和正常胆管细胞(HiBEC)表达情况。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图1 IQGAP3在胆管癌组织和细胞系中的相对表达量

Figure 1 Relative expression of IQGAP3 in CCA tissues and cell lines

2.2 IQGAP3表达水平与胆管癌患者肿瘤进展、长期生存相关

分析IQGAP3表达水平和胆管癌患者临床病理特征之间的关系来进一步确认IQGAP3在胆管癌中的作用。根据RT-PCR结果按照肿瘤和所对应癌旁表达水平比值是否 >2 ,将47对肿瘤标本分成IQGAP3高表达组($n=34$)、IQGAP3低表达组($n=13$)(表1)。结果表明IQGAP3表达和胆管肿瘤大小($P < 0.01$)、病理分级($P < 0.05$)、AJCC TNM分期($P < 0.05$)呈正相关,与其他临床病理特征如年龄、性别、肿瘤数量、血管浸润、淋巴结转移、脉管癌栓等无明显相关性($P > 0.05$)。此外,还通过Kaplan-Meier法分析了IQGAP3表达对随访3年内的胆管癌患者总体生存时间的影响,结果表明

IQGAP3高表达组患者的总体生存率(overall survival, OS)低于IQGAP3低表达组,且差异有统计学意义(图2)。

2.3 敲低IQGAP3表达对胆管癌细胞增殖功能的影响

分别将慢病毒感染HCCC9810和RBE细胞株,通过RT-PCR来验证感染效率,发现shIQGAP3组IQGAP3表达明显低于对照组(图3A)。通过平板克隆实验检测敲低IQGAP3(shIQGAP3)表达后细胞的集落形成能力。与对照组(negative control, NC)相比,敲低IQGAP3表达后细胞的集落形成能力明显下降(图3B);CCK8及EdU实验结果表明敲低IQGAP3表达后,细胞增殖能力较对照组明显下降(图3C、D)。

表1 47例胆管癌患者IQGAP3表达的临床病理相关性分析
Table 1 The clinicopathological relevance analysis of IQGAP3 expression in 47 patients with cholangiocarcinoma

临床特征	n	IQGAP3[(n%)]		P值
		低	高	
性别				0.621
男	28	7(53.8)	21(61.8)	
女	19	6(46.2)	13(38.2)	
年龄				0.865
≤60	28	8(61.5)	20(58.8)	
>60	19	5(38.5)	14(41.2)	
肿瘤数目				0.832
1个	37	10(76.9)	27(79.4)	
>1个	10	3(23.1)	7(20.6)	
肿瘤大小				0.002
≤5 cm	24	12(92.3)	12(35.3)	
>5 cm	23	1(7.7)	22(64.7)	
病理分级				0.025
I+II	14	7(53.8)	7(20.6)	
III+IV	33	6(46.2)	27(79.4)	
血管侵犯				0.564
有	4	0(0)	4(11.8)	
无	43	13(100)	30(88.2)	
淋巴结转移				0.130
有	21	3(23.1)	18(52.9)	
无	26	10(76.9)	16(47.1)	
脉管癌栓				0.150
有	21	8(61.5)	13(38.2)	
无	26	5(38.5)	21(61.8)	
TNM分期				0.031
I+II	19	9(69.2)	10(29.4)	
III+IV	28	4(30.8)	24(70.6)	

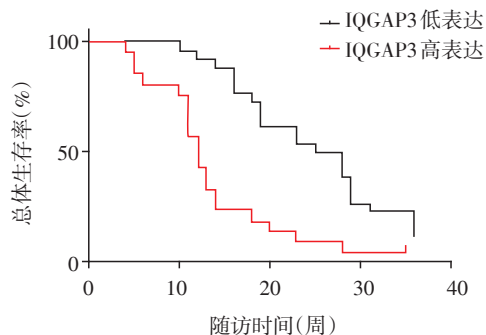


图2 Kaplan-Meier生存分析随访3年内的胆管癌患者总体生存时间和生存率情况

Figure 2 The overall survival time and survival rate of patients with bile duct cancer were followed up for 3 years

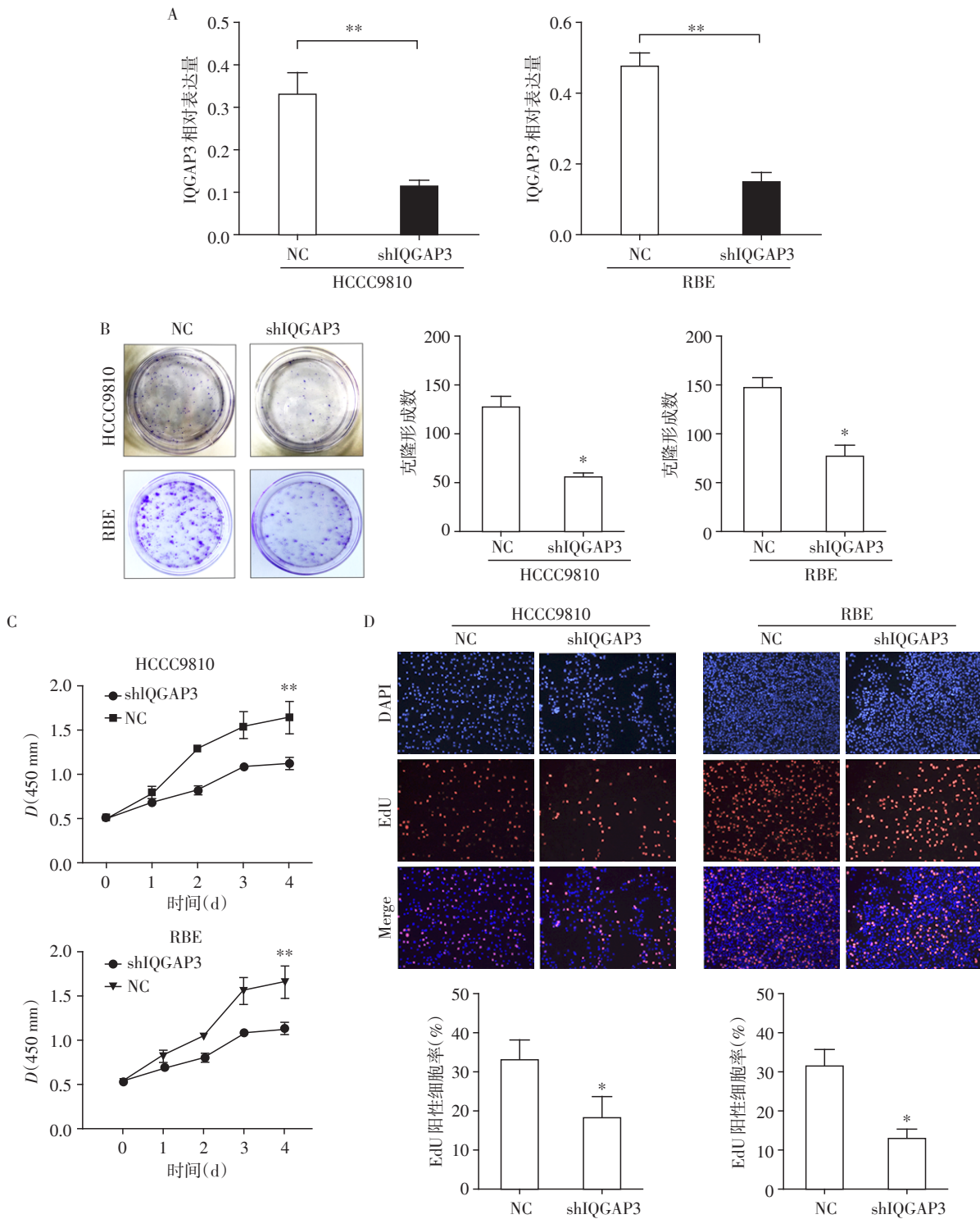
2.4 IQGAP3可能通过上调WNK1促进胆管癌细胞增殖

为研究IQGAP3影响胆管癌细胞增殖的作用机制,NC组蛋白样本作为对照,利用磷酸化蛋白芯片检测敲低IQGAP3组相关下游蛋白磷酸化水平改变,如图4A所示,WNK1、HSP60、STAT3、ERK1/2、STAT2、P53等蛋白磷酸化水平发生明显变化,通过Western blot实验验证敲低IQGAP3后,WNK1表达减少,提示IQGAP3可能通过上调WNK1促进胆管癌细胞增殖(图4B)。

3 讨论

IQGAP3是IQGAP蛋白家族中的一员,IQGAP蛋白家族是一类分子量为175~180 kDa的细胞骨架结合蛋白,其命名主要来源于这些蛋白所共有的IQ花环和Ras-GAP结构。在人体中,IQGAP家族一共有IQGAP1、IQGAP2、IQGAP3 3位成员,其主要组成结构包括:Calponin同源结构域(CHD)、多聚脯氨酸结合结构域(WW)、钙调蛋白结合花样(IQ)、GTPase激活蛋白相关结构域(RGD)等,CHD结构域可以与F-actin相结合,WW结构域可以与ERK1/2相互作用,IQ能与MEK1/2、Raf、EGFR以及钙调蛋白相互作用,GTPase激活蛋白相关结构域可以与Cdc42、Rac1等相互作用^[16]。作为细胞骨架蛋白,IQGAPs蛋白家族在细胞黏附、细胞迁移、细胞外信号转导及细胞分裂等多种功能活动中起着重要调控作用^[17-18]。在肿瘤研究中,IQGAP1起到促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭作用。IQGAP2主要在肝脏、肺、乳腺等组织中高表达,作用与IQGAP1相反,主要起抑癌作用。IQGAP3目前已知在肝癌、肠癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌等肿瘤中高表达,可促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。

本研究证实了IQGAP3在胆管癌中高表达,且发现IQGAP3表达和胆管癌肿瘤大小、病理分级、TNM分期相关,此外,还发现了IQGAP3高表达的胆管癌患者术后预后更差。这些发现也证实IQGAP3参与了肿瘤的发生发展。为了进一步验证IQGAP3在胆管癌中的作用,通过慢病毒敲低IQGAP3在HCCC9810和RBE细胞株中的表达。通过平板克隆、CCK8、EdU等细胞增殖实验,发现敲低IQGAP3表达后,细胞增殖能力明显下降,这表明了IQGAP3能够促进胆管癌细胞增殖。通过利用蛋白芯片实验进一步验证IQGAP3在胆管癌中的作用机制,结果发现IQGAP3在胆管癌中可能与WNK1、HSP60、



A:通过RT-PCR来验证病毒转染效率,构建IQGAP3低表达体系;B:平板克隆实验检测shIQGAP3组和对照组细胞集落形成能力;C:通过CCK8实验检测敲低IQGAP3表达后细胞的增殖能力;D:通过EdU实验检测敲低IQGAP3表达后细胞的增殖能力($\times 100$)。两组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。

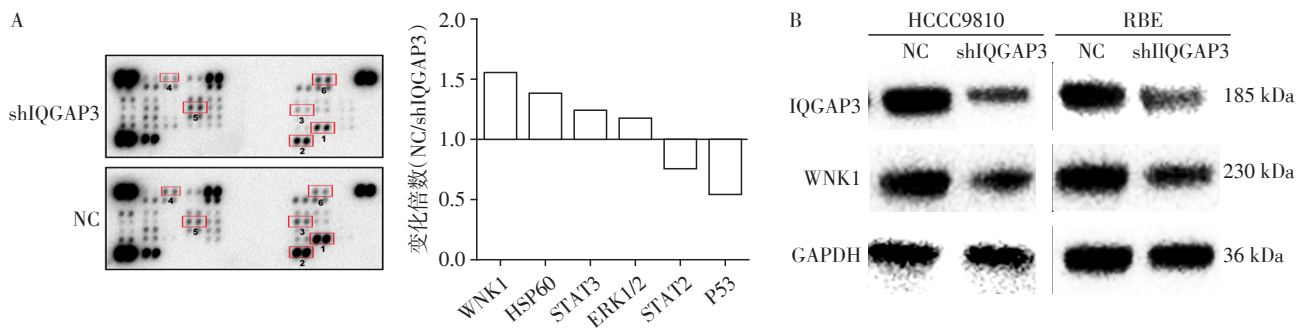
图3 IQGAP3表达对胆管癌细胞增殖能力的影响

Figure 3 Effect of IQGAP3 expression on proliferation of CCA cells

STAT3、ERK1/2、STAT2、P53等相关。通过Western blot实验发现IQGAP3表达水平与WNK1表达水平呈正相关,因此认为IQGAP3可能通过上调WNK1促进

胆管癌细胞增殖,但具体作用机制目前并不明确,需要后续实验进一步探讨。

当然本实验尚有许多不足之处,比如样本量



A: 磷酸化蛋白芯片验证敲低 IQGAP3 后胆管癌细胞中相关下游蛋白磷酸化水平变化; B: Western blot 实验验证 HCC9810 和 RBE 细胞中敲低 IQGAP3 后 WNK1 表达水平变化。

图4 胆管癌可能通过上调 WNK1 促进胆管癌细胞增殖

Figure 4 IQGAP3 could promote the proliferation of CCA cells by up-regulating WNK1

不足、随访时间过短、细胞功能实验不全以及通路机制研究尚不明确等,后续将完善实验,扩大样本量,进一步探讨 IQGAP3 在胆管肿瘤中的作用机制。

综上所述,本研究首次表明了 IQGAP3 在胆管癌中高表达。此外,还表明 IQGAP3 可能通过上调 WNK1 促进胆管癌细胞增殖。IQGAP3 能否可作为胆管癌的治疗靶点,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Goral V. Cholangiocarcinoma: New insights [J]. APJCP, 2017, 18(6): 1469-1473
- [2] Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma [J]. Gastroenterology, 2013, 145(6): 1215-1229
- [3] Squadroni M, Tondulli L, Gatta G, et al. Cholangiocarcinoma [J]. Crit Rev Oncol Hemat, 2017, 116(1): 11-31
- [4] Skipworth JR, Keane MG, Pereira SP. Update on the management of cholangiocarcinoma [J]. Digest Dis, 2014, 32(5): 570-578
- [5] Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D. Surgical strategy for bile duct cancer: Advances and current limitations [J]. WJCO, 2011, 2(2): 94-107
- [6] Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, et al. Cholangiocarcinoma-evolving concepts and therapeutic strategies [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(2): 95-111
- [7] Fang X, Zhang B, Thisse B, et al. IQGAP3 is essential for cell proliferation and motility during zebrafish embryonic development [J]. Cytoskeleton, 2015, 72(8): 422-433
- [8] Jin X, Liu Y, Liu J, et al. The overexpression of IQGAP1 and beta-catenin is associated with tumor progression in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0133770
- [9] Kumar D, Hassan MK, Pattnaik N, et al. Reduced expres-
- [10] Wang S, Watanabe T, Noritake J, et al. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth [J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 4): 567-577
- [11] Hu G, Xu Y, Chen W, et al. RNA interference of IQ motif containing GTPase-activating protein 3 (IQGAP3) inhibits cell proliferation and invasion in breast carcinoma cell [J]. Oncol Res, 2016, 24(6): 455-461
- [12] Yang Y, Zhao W, Xu QW, et al. IQGAP3 promotes EGFR-ERK signaling and the growth and metastasis of lung cancer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97578
- [13] Xu W, Xu B, Yao Y, et al. Overexpression and biological function of IQGAP3 in human pancreatic cancer [J]. Am J Trans Res, 2016, 8(12): 5421-5432
- [14] Qian EN, Han SY, Ding SZ, et al. Expression and diagnostic value of CCT3 and IQGAP3 in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell Int, 2016, 6(7): 55
- [15] Oue N, Yamamoto Y, Oshima T, et al. Overexpression of the transmembrane protein IQGAP3 is associated with poor survival of patients with gastric cancer [J]. Pathobiology, 2018, 85(3): 192-200
- [16] Monteleon CL, McNeal A, Duperret EK, et al. IQGAP1 and IQGAP3 serve individually essential roles in normal epidermal homeostasis and tumor progression [J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(9): 2258-2265
- [17] Briggs MW, Sacks DB. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation [J]. EMBO Rep, 2003, 4(6): 571-574
- [18] Pathmanathan S, Hamilton E, Atcheson E, et al. The interaction of IQGAPs with calmodulin-like proteins [J]. Biochem Soc T, 2011, 39(2): 694-699

[收稿日期] 2017-12-27