

缺氧微环境中 HIP68/RAP1B 信号通路对 乳腺癌侵袭转移的作用^{*}

屈航英^{1,2} 闫鹏云¹ 张佳³ 陈强¹

(1. 西安交通大学第一附属医院心外科, 陕西 西安 710061; 2. 西安市第三医院放疗科, 陕西 西安 710000;

3. 西安交通大学第一附属医院胸外科, 陕西, 西安 710061)

【摘要】 目的 探讨 HIP68/RAP1B 信号通路对乳腺癌侵袭转移的作用机制。方法 选取西安交通大学第一附属医院 2012—2013 年乳腺癌组织样本共 73 例, 通过免疫组化标本及临床资料分析 HIP68/RAP1B 的表达情况及其与病理特征的关系。将体外培养的乳腺癌细胞系(MCF-7 和 MDA-MB-231)构建成缺氧乳腺癌细胞, 分别测定缺氧乳腺癌细胞系(MCF-7 和 MDA-MB-231)及正常乳腺上皮细胞系 SK-BR-3 中 HIP68/RAP1B 蛋白表达情况。构建高/低表达 HIP68 的乳腺癌细胞, 观察其对 RAP1B 蛋白的影响及对乳腺癌细胞生物学行为的影响; 沉默/过表达乳腺癌细胞 RAP1B, 观察其对 HIP68 蛋白的影响及对细胞生物学行为的影响; 免疫共沉淀检测 HIP68/RAP1B 的结合位点。结果 HIP68 和 RAP1B 蛋白在乳腺癌组织中的表达水平高于癌旁组织($P < 0.05$); HIP68 表达与 TNM 分期、淋巴结转移相关($P < 0.05$), RAP1B 的表达与 TNM 分期、淋巴结转移、ER、RR 状态相关($P < 0.05$); HIP68 表达与 RAP1B 表达呈正相关($r = 0.427, P < 0.05$)。HIP68/RAP1B 在缺氧乳腺癌系细胞中高表达; RAP1B 蛋白的表达与 HIP68 表达呈正相关并且高表达 HIP68/RAP1B 促进细胞侵袭转移, 低表达 HIP68/RAP1B 抑制细胞侵袭转移; HIP68 蛋白不因 RAP1B 蛋白的高/低表达而改变, 但是高表达 RAP1B 促进乳腺癌细胞增殖及侵袭转移; 免疫共沉淀结果显示 RAP1B 可能为 HIP68 基因的下游。结论 HIP68/RAP1B 信号通路在缺氧乳腺癌组织中高表达并促进乳腺癌细胞迁移和侵袭。

【关键词】 乳腺癌; HIP68; RAP1B; 侵袭; 转移

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2024.04.003

Role of HIP68/RAP1B signaling pathway on breast cancer invasion and metastasis in anoxic microenvironment

QU Hangying^{1,2}, YAN Pengyun¹, ZHANG Jia³, CHEN Qiang¹

(1. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2. Department of Radiotherapy, Xi'an Third Hospital, Xi'an 710061, China;

3. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanism of HIP68/RAP1B signaling pathway on breast cancer invasion and metastasis. **Methods** A total of 73 breast cancer tissue samples were selected from the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University during 2012—2013. Immunohistochemical samples and clinical data were used to analyze the expression of HIP68/RAP1B and its relationship with pathological features. Anoxic breast cancer cells were constructed from breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 in vitro. The expression of HIP68/RAP1B was determined in hypoxic breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) and normal breast epithelial cell lines SK-BR-3, respectively. Breast cancer cells with high/low expression of HIP68 were constructed to observe their effects on RAP1B protein and biological behavior of breast cancer cells. Breast cancer cells with silenced/overexpression of RAP1B were silenced to observe their effects on HIP68 protein and biological behavior of breast cancer cells. The binding site of HIP68/RAP1B was

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2018SF-244)

通讯作者: 陈强, E-mail: 583239813@qq.com

引用本文: 屈航英, 闫鹏云, 张佳, 等. 缺氧微环境中 HIP68/RAP1B 信号通路对乳腺癌侵袭转移的作用[J]. 西部医学, 2024, 36(4): 480-488.

DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2024.04.003

detected by co-immunoprecipitation. **Results** The expressions of HIP68 and RAP1B proteins in breast cancer tissues were higher than those in paracancer tissues ($P < 0.05$). The expression of HIP68 was correlated with TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). RAP1B was correlated with TNM stage, lymph node metastasis, ER and RR status ($P < 0.05$). There was a positive correlation between HIP68 expression and RAP1B expression ($r = 0.427$, $P < 0.05$). HIP68/RAP1B was highly expressed in hypoxic breast cancer cells. The expression of RAP1B protein was positively correlated with HIP68 expression, and high expression of HIP68/RAP1B promoted cell invasion and metastasis, while low expression of HIP68/RAP1B inhibited cell invasion and metastasis. IP68 protein did not change due to the high/low expression of RAP1B protein, but the high expression of RAP1B protein promoted the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells. The results of co-immunoprecipitation showed that RAP1B may be the downstream of HIP68 gene. **Conclusion** The HIP68/RAP1B signaling pathway is highly expressed in breast cancer tissues and promotes breast cancer cell migration and invasion.

【Key words】 Breast cancer; HIP68; RAP1B; Invasion; Metastasis

在我国,乳腺癌是女性常见的肿瘤之一,其死亡率仅次于肺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌,严重威胁着女性的身心健康及生活质量。近年来我国乳腺癌的发生逐年增加而且更趋于年轻化,而且也是年轻女性的主要死因。缺氧区域的存在为局部进展期乳腺癌的常见特征,而在正常乳腺组织中是不存在的^[1]。缺氧与乳腺癌复发和转移明显相关^[2-3]。前期课题组发现缺氧模型下低氧诱导因子-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)与 HIP68 在乳腺癌组织中表达明显正相关且促进乳腺癌细胞增生及侵袭转移^[4-5]。HIP68 在乳腺癌组织中高表达并促进细胞增殖、侵袭及迁移,本研究我们将进一步探讨 HIP68 通过何种途径参与乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取西安交通大学第一附属医院 2012—2013 年乳腺癌组织标本共 73 例,均经术后病理诊断且临床资料详实。所有标本均选取自女性乳腺癌患者,年龄 37~69 岁,其中 23 例为乳腺小叶癌标本,50 例为乳腺导管癌标本。所有标本在手术前患者均未经过系统治疗。标本使用获我院伦理委员会批准。

1.2 细胞与主要试剂 两种乳腺癌细胞系(MCF-7 和 MDA-MB-231)和人正常乳腺上皮细胞 SK-BR-3 购自中科院上海细胞库。si-HIP68、si-RAP1B 及对照 shRNA(上海吉凯),Lipofectamine2000 (Invitrogen, CA, USA),PVDF 膜(Millipore 公司),HIP68 兔抗人单克隆抗体(Abcam 公司),RAP1B 兔抗人单克隆抗体(Abcam 公司), β -actin 兔抗人单克隆抗体(GAPDH),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(Abcam 公司)。

1.3 细胞培养及分组 用化学药物 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 构建细胞缺氧模型,用 MTT 实验筛选合适的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度,确认最终的药物作用梯度为 0、50、100、

150、200、250 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ 为对照组。缺氧乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MCF-7 用含有 10% FBS (Gibco)的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM, 1640)中培养,乳腺正常上皮细胞系 SK-BR-3 细胞用 DMEM 培养基,含 10% 胎清培养,3 种细胞都在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。培养基每隔一天交换一次,细胞每 3 天传代(1:3)。通过将 HIP68、RAP1B 编码序列克隆到 pIRES/Red 载体中实现过表达,当 80%~90% 汇合时,基于所提供的方向,通过 Lipofectamine 2000 用适当的构建体转染所有细胞。在转染后 6 h 用新鲜的完整环境替换环境,并在转染后 24~48 h 收集细胞用于下一次使用。Control 组不做任何处理,转染不带目的基因的空载体细胞为 NC 组,转染相应的 shRNA 为实验组。

1.4 免疫组化染色 将盖玻片先泡酸处理后洗涤干净、高压灭菌后放入 24 孔培养板中,取对数生长期细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔,待培养的细胞汇合度达到 60%~80%,取出细胞爬片,1 $\times$ PBS 漂洗,3 min $\times$ 3 次;4% 多聚甲醛固定细胞,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min;1 $\times$ PBS 漂洗,3 min $\times$ 3 次;0.5% TritonX-100(1 $\times$ PBS 配制)孵育,室温 10 min;1 $\times$ PBS 漂洗 3 min $\times$ 3 次;3% H_2O_2 室温孵育 10 min;1 $\times$ PBS 漂洗,3 min $\times$ 3 次;封闭血清室温孵育 10 min,倾去不洗;一抗孵育(阴性对照用 1 $\times$ PBS 孵育),于湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;1 $\times$ PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次;生物素标记二抗工作液室温孵育 30 min;1 $\times$ PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次;辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 30 min;1 $\times$ PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次;DAB 显色;自来水充分冲洗;苏木素复染;盐酸酒精分化,淡氨水反蓝;75%、95%、无水乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片;显微镜下观察,采用 DeltaPixViewer 软件对图像进行采集。

1.5 Western blot 检测蛋白表达水平 提取处理后肿瘤细胞蛋白,BCA 法测定样品的蛋白浓度。SDS-

PAGE 对蛋白进行分离,之后转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭,一抗 4℃ 孵育过夜,洗膜,二抗孵育 1~2 h,洗膜,用 ECL 化学发光试剂检测,显影曝光得到目的蛋白表达条带。

1.6 Real-time PCR 检测靶基因 mRNA 表达 应用 Lipid RNeasy Mini Kit RNA(QAIGEN 公司)提取不同细胞中的总 RNA,使用 M-MLV 反转录酶(Invitrogen)进行逆转录,利用 SYBR Green I Master Mix (TAKARA)试剂盒在 BioRad 公司的 iQ5 实时定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,检测 mRNA 的表达。

1.7 MTT 检测细胞的增殖能力 将不同细胞(2×10^3 个/孔)接种至 96 孔板中,37℃ 培养 24 h 后,不同干预后继续孵育 48 h。每孔加入 20 μ L 的 MTT(5 mg/mL),37℃ 孵育 4 h。然后吸去培养基,加入 150 μ L 的 DMSO,振荡 10 min 至甲瓚结晶完全溶解。利用分光光度计测量 572 nm 处吸光度,计算细胞的相对增殖率。

1.8 Transwell 法检测细胞侵袭能力 使用预先铺好 Matrigel 孔隙大小为 8 μ m 的 24 孔 Transwell 板(BD),待细胞消化好后,用无血清培养液重悬细胞,离心去培养液后再使用无血清培养液重悬细胞,对细胞进行计数,调整细胞浓度为 5×10^5 。Transwell 板上室加入 200 μ L 细胞悬液,下室加入 0.6 mL 含 10% FBS 的培养液,置于培养箱中培养 36 h。将上室置于多聚甲醛中固定 15 min,然后用结晶紫染色 5 min,用棉签擦去上室室内未穿过膜的细胞,在高倍显微镜下观察、拍照并计数。每个样本取 5 个高倍视野进行计数最后取均值。

1.9 统计学分析 采用 SPSS22.0 和 Graphpad5.0 软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析进行统计分析,采用 Spearman's 进行相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HIP68、RAP1B 在乳腺癌组织中的表达情况 免疫组化染色结果显示,HIP68 蛋白和 RAP1B 蛋白表达均位于细胞核或细胞核和细胞质,见图 1、2。HIP68 和 RAP1B 蛋白在乳腺癌组织中的表达水平高于癌旁组织($P < 0.001$),见表 1。

2.2 HIP68、RAP1B 在乳腺癌中的表达与临床病理特征的关系 73 例乳腺癌患者组织中 HIP68 表达与 TNM 分期、淋巴结转移相关($P < 0.05$),与患者的肿瘤类型、年龄、肿瘤位置等无关($P > 0.05$);RAP1B 表达与 TNM 分期、淋巴结转移、ER、PR 状态相关($P < 0.05$),与患者的肿瘤类型、年龄、肿瘤位置等无关

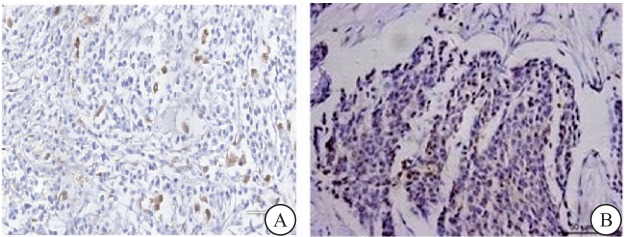


图 1 HIP68 在乳腺癌组织中的表达 (40 $\times$)
Figure 1 Expression of HIP68 in breast cancer tissues
注:A. 癌旁组织;B. 乳腺癌组织。

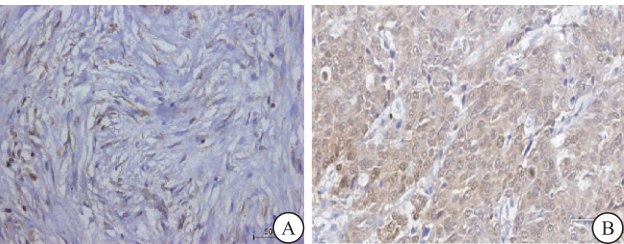


图 2 RAP1B 在乳腺癌组织中的表达 (40 $\times$)
Figure 2 Expression of RAP1B in breast cancer tissues
注:A. 癌旁组织;B. 乳腺癌组织。

表 1 HIP68 和 RAP1B 在乳腺癌组织和癌旁组织中的表达差异
Table 1 Differences expression between HIP68 and RAP1B in breast and paracancer tissues

标本	HIP68		<i>P</i>	RAP1B		<i>P</i>
	+	-		+	-	
癌组织	48	25	<0.001	49	24	<0.001
癌旁组织	14	59		16	57	

($P > 0.05$),见表 2。Spearman's 相关性分析结果显示,HIP68 表达与 RAP1B 表达呈正相关($r = 0.427$, $P < 0.001$),见表 3。

2.3 细胞水平检测 HIP68 和 RAP1B 表达情况 用不同浓度的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 作用乳腺癌细胞系 24 h 后,采用 Western blot 及 qRT-PCR 检测各组 HIP68、RAP1B 表达情况显示,随着 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 药物浓度的增高,RAP1B 的表达在 3 种乳腺癌细胞系中也在逐渐增加,同时 HIP68 表达水平随着缺氧程度的增加而逐渐增高($P < 0.05$);HIP68 在 MCF-7、MDA-MB-231 的表达水平高于 SK-BR-3 细胞($P < 0.05$),见图 3。

2.4 沉默 HIP68 对 RAP1B 蛋白的影响及对细胞生物学行为的影响 缺氧环境下应用 si-HIP68 转染 MDA-MB-231 和 MCF-7 24 h 后进行 RAP1B 测定蛋白表达情况和肿瘤细胞迁移、侵袭能力的测定,未转染的细胞为 Control 组,转染不带目的基因的空载体为 NC 组,转染 si-HIP68 为 si-HIP68 组。结果显示沉默 HIP68 蛋白后可以显著的抑制 RAP1B 蛋白的表达($P < 0.05$),见图 4。细胞增殖和侵袭实验结果表

表 2 HIP68 和 RAP1B 与乳腺癌临床病理数据相关性分析

Table 2 Correlation analysis of HIP68 and RAP1B with clinicopathological data of breast cancer						
变量	n	HIP68		P	RAP1B	
		高	低		高	低
类型				0.793		0.681
导管癌	50	40	10		25	25
小叶原位癌	23	19	4		12	11
年龄(岁)				0.700		0.261
≤50	45	37	8		23	22
>50	28	22	6		13	15
绝经状态				0.200		0.347
绝经前	41	31	10		23	18
绝经后	32	28	4		18	14
位置				0.649		0.281
左乳	43	34	9		21	22
右乳	30	25	5		16	14
大小(cm)				0.660		0.389
≤2	24	18	6		13	11
>2≤5	44	37	7		24	20
>5	5	4	1		4	1
TNM				0.001		<0.001
I	17	8	9		7	10
II	32	28	4		11	21
III	18	17	1		16	2
IV	6	6	0		6	0
淋巴结转移				<0.001		<0.001
是	37	24	13		11	26
否	36	35	1		28	8
远处转移				0.213		0.483
是	67	53	14		37	30
否	6	6	0		4	2
受体						
ER(-)	52	44	8	0.195	35	17
ER(+)	21	15	6		6	15
PR(-)	58	46	12	0.519	37	21
PR(+)	15	13	2		2	13
HER-2(-)	59	48	11	0.812	35	24
HER-2(+)	14	11	3		6	8

表 3 HIP68 和 RAP1B 表达相关性分析

Table 3 Correlation analysis of HIP68 and RAP1B expression				
RAP1B	HIP68		r	P
	高	低		
高低	39	16	0.427	<0.001
	12	11		

明, si-HIP68 转染的乳腺癌细胞后, 肿瘤细胞增殖及侵袭能力较 Control 组明显降低, 低表达 HIP68 可以显著抑制 MDA-MB-231 和 MCF-7 的增殖及侵袭能力($P<0.001$), 见图 5。

2.5 过表达 HIP68 对 RAP1B 蛋白的影响及对细胞生物学行为的影响 缺氧环境下应用 pIRES/Red-HIP68 转染 MDA-MB-231 和 MCF-7 24 h 后进行 RAP1B 测定蛋白表达情况和肿瘤细胞增殖、侵袭能力的测定, 未转染的细胞为 Control 组, 转染不带目的基因的空载体为 NC 组, 转染 pIRES/Red-HIP68 为 pIRES/Red-HIP68 组。结果显示过表达 HIP68 蛋白后 RAP1B 蛋白也明显高表达($P<0.05$), 见图 6。细胞增殖和细胞侵袭实验结果表明, pIRES/Red-HIP68 转染的乳腺癌细胞后, 肿瘤细胞的增殖和侵袭能力较 Control 组明显增强, 过表达 HIP68 可以显著增强 MDA-MB-231 和 MCF-7 的增殖和侵袭能力($P<0.05$), 见图 7。

2.6 沉默 RAP1B 对 HIP68 蛋白的影响及对生物学行为的影响 缺氧环境下应用 si-RAP1B 转染 MDA-MB-231 和 MCF-7 24 h 后进行 HIP68 测定蛋白表达

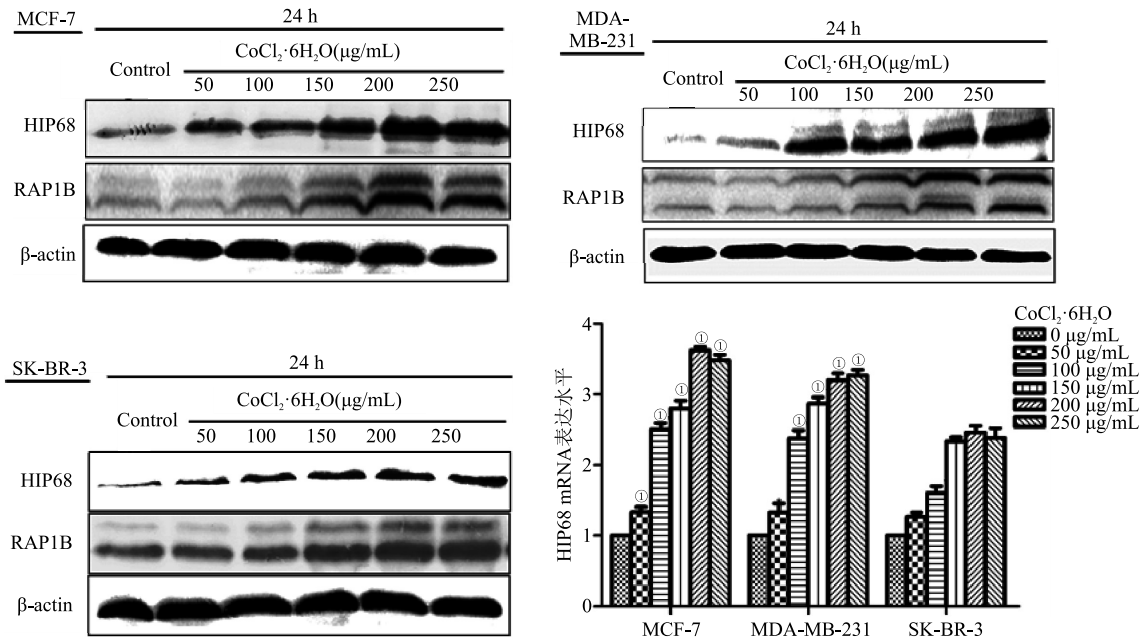


图 3 缺氧模型中 HIP68/RAP1B 蛋白和 mRNA 在 3 种乳腺癌细胞中的表达情况

Figure 3 Expression of HIP68/RAP1B protein and mRNA in three kinds of breast cancer cells in hypoxia model

注: 与 SK-BR-3 细胞比较, ① $P<0.05$ 。

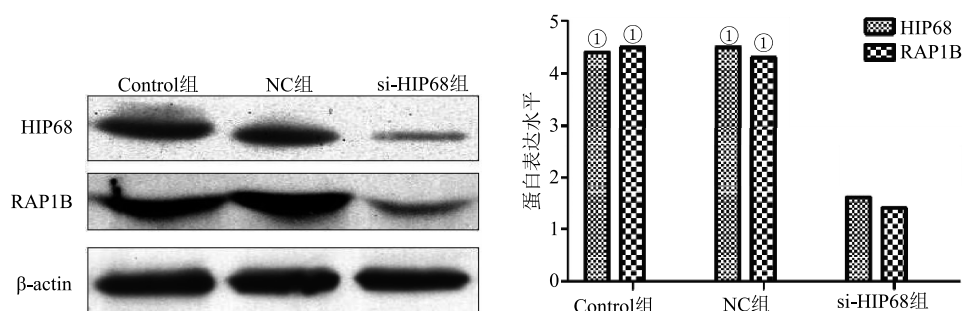


图 4 沉默 HIP68 抑制 RAP1B 蛋白表达

Figure 4 Silencing HIP68 inhibited the expression of RAP1B protein

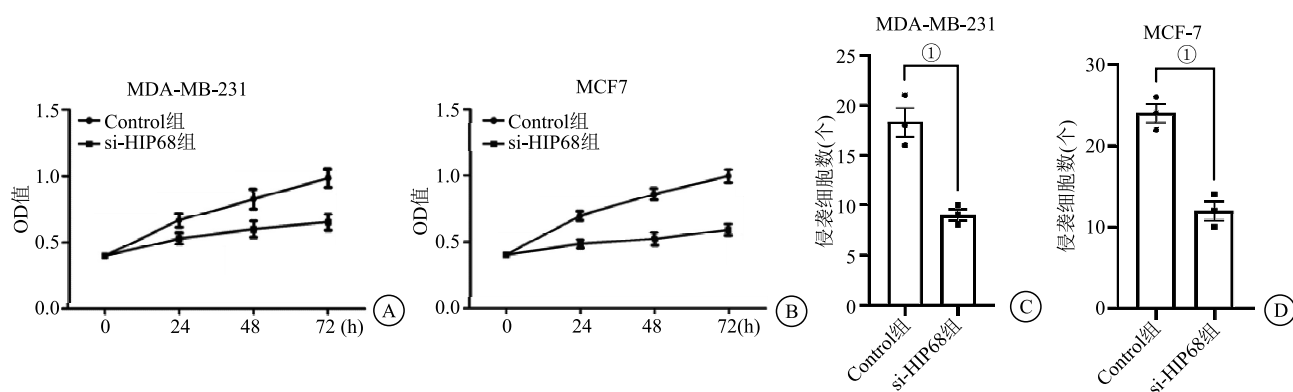
注:与 si-HIP68 组比较,① $P < 0.05$ 。

图 5 沉默 HIP68 抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭转移

Figure 5 Silencing HIP68 inhibited the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells

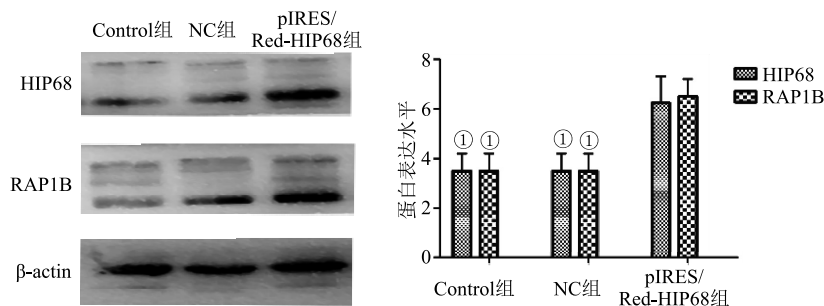
注:A. MDA-MB-231 细胞增殖能力;B. MCF-7 细胞增殖能力;C. MDA-MB-231 细胞侵袭力;D. MCF-7 细胞侵袭力。两组比较,① $P < 0.05$ 。

图 6 过表达 HIP68 促进 RAP1B 蛋白表达

Figure 6 Overexpressed HIP68 promotes RAP1B protein expression

注:与 pIRES/Red-HIP68 组比较,① $P < 0.05$ 。

情况和肿瘤细胞迁移、侵袭能力的测定,未转染的细胞为 Control 组,转染不带目的基因的空载体为 NC 组,转染 si-RAP1B 为 si-RAP1B 组。结果显示沉默 RAP1B 蛋白后对 HIP68 蛋白影响不大($P = 0.13$),见图 8。细胞增殖、侵袭实验结果表明,si-RAP1B 转染的乳腺癌细胞后,肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭能力较 Control 组明显降低,低表达 RAP1B 可以显著抑制 MDA-MB-231 和 MCF-7 增殖及侵袭能力($P < 0.05$),见图 9。

2.7 过表达 RAP1B 对 HIP68 蛋白的影响及对生物学行为的影响 缺氧环境下应用 pIRES/Red-RAP1B

转染 MDA-MB-231 和 MCF-7 24 h 后进行 HIP68 测定蛋白表达情况和肿瘤细胞增殖、侵袭能力的测定,未转染的细胞为 Control 组,转染不带目的基因的空载体为 NC 组,转染 pIRES/Red-RAP1B 为 pIRES/Red-RAP1B 组。结果显示过表达 RAP1B 蛋白后对 HIP68 蛋白影响不大($P = 0.13$),见图 10。细胞增殖和细胞侵袭实验结果表明,pIRES/Red-RAP1B 转染的乳腺癌细胞后,肿瘤细胞的增殖和侵袭能力较 Control 组明显增强,过表达 RAP1B 可以显著促进 MDA-MB-231 和 MCF-7 的增殖和侵袭能力($P < 0.05$),见图 11。

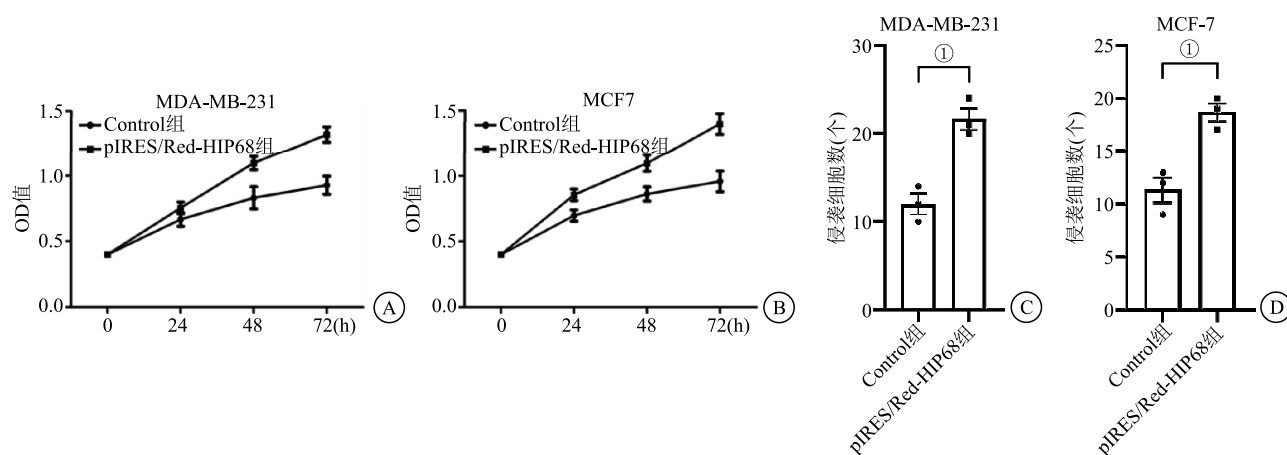


图 7 过表达 HIP68 促进乳腺癌细胞增殖与侵袭转移

Figure 7 Overexpressed HIP68 promotes proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells

注: A. MDA-MB-231 细胞增殖能力; B. MCF-7 细胞增殖能力; C. MDA-MB-231 细胞侵袭力; D. MCF-7 细胞侵袭力。两组比较, ① $P < 0.05$ 。

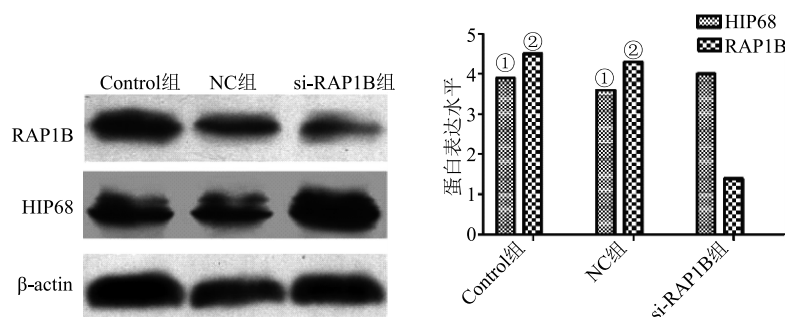


图 8 沉默 RAP1B 蛋白表达情况

Figure 8 Silence of RAP1B protein expression

注: 与 si-RAP1B 组比较, ① $P > 0.05$; 与 si-RAP1B 组比较, ② $P < 0.05$ 。

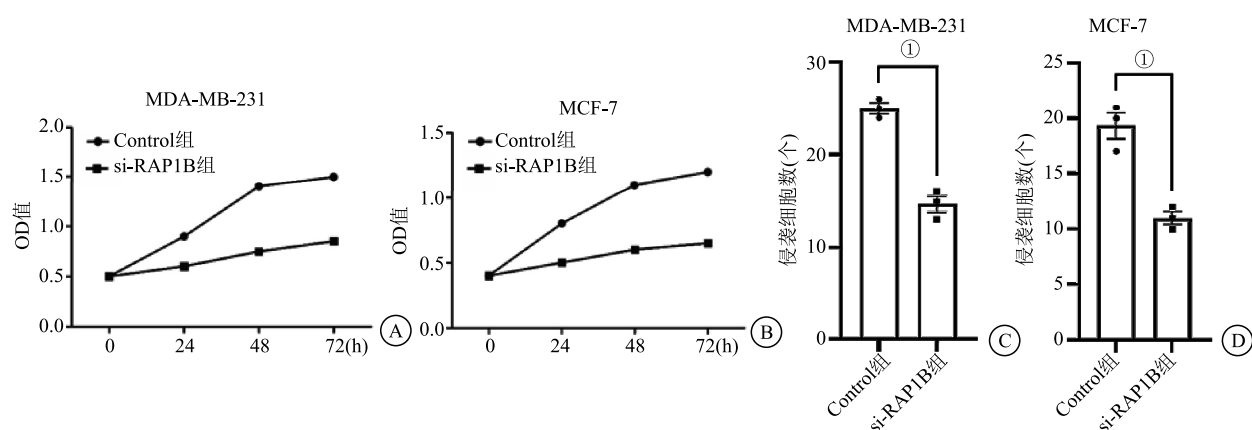


图 9 沉默 RAP1B 抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭转移

Figure 9 Silencing RAP1B inhibits the proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells

注: A. MDA-MB-231 细胞增殖能力; B. MCF-7 细胞增殖能力; C. MDA-MB-231 细胞侵袭力; D. MCF-7 细胞侵袭力。两组比较, ① $P < 0.05$ 。

2.8 HIP68/RAP1B 免疫共沉淀结果 进一步免疫共沉淀结果提示 HIP68 与 RAP1B 可特异性结合, 乳腺癌组织中研究发现 HIP68 与 RAP1B 表达呈正相关, 且沉默 RAP1B 对 HIP68 无影响, 低表达或高表达 HIP68 相应地会引起 RAP1B 低表达或高表达, 见图 12。提示 RAP1B 可能为 HIP68 基因的下游。

3 讨论

乳腺癌作为全球女性发病率最高的恶性肿瘤, 具有增长快、易转移等特点, 其病死率约占全球恶性肿瘤的 25%, 严重威胁着女性健康^[6]。目前乳腺癌的治疗逐步形成个体化的综合治疗, 积极寻找分子靶向治疗提高无病生存期和乳腺癌的总生存期至关重要。

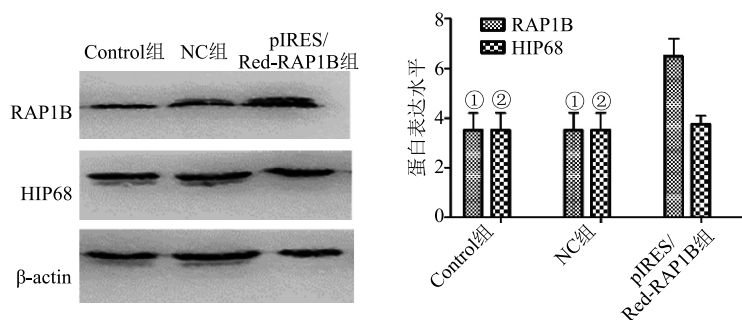


图 10 过表达 RAP1B 蛋白表达情况

Figure 10 Overexpression of RAP1B protein expression

注:与 pIRES/Red-RAP1B 组比较,① $P < 0.05$;与 pIRES/Red-RAP1B 组比较,② $P > 0.05$ 。

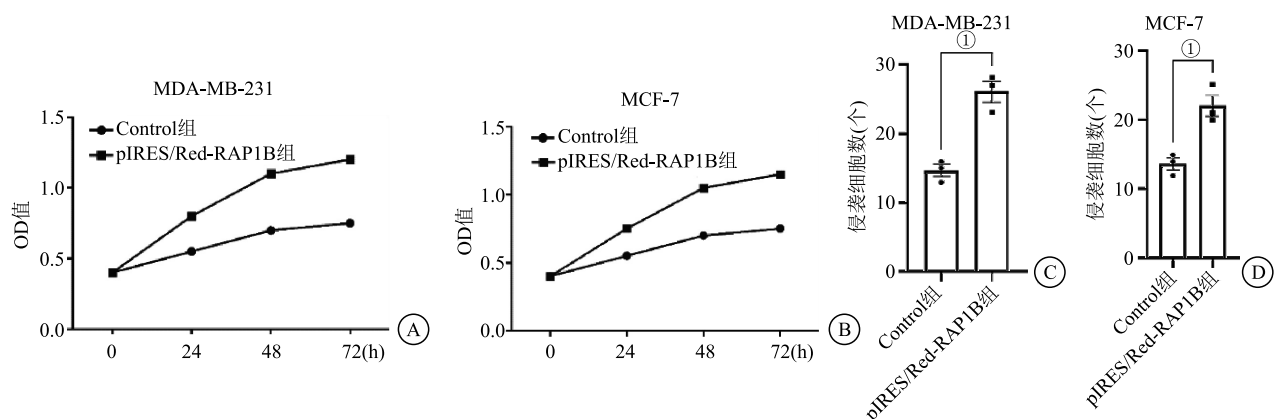


图 11 过表达 RAP1B 促进乳腺癌细胞增殖及侵袭转移

Figure 11 Overexpression of RAP1B promotes proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells

注:A. MDA-MB-231 细胞增殖能力;B. MCF-7 细胞增殖能力;C. MDA-MB-231 细胞侵袭力;D. MCF-7 细胞侵袭力。

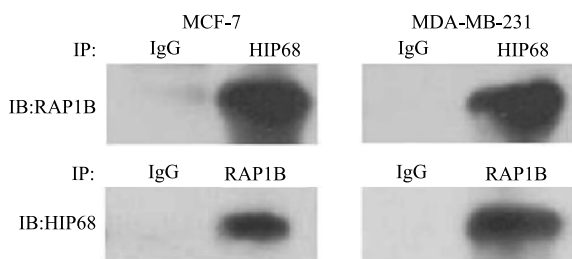


图 12 HIP68/RAP1B 免疫共沉淀结果

Figure 12 Immunoprecipitation of HIP68/RAP1B

课题组一直致力于乳腺癌的研究,前期也已证实 HIP68 在乳腺癌组织中高表达, HIP68 高表达可促进乳腺癌细胞生长增殖、迁移和侵袭。

1999 年,我们课题组开始用 cDNA microarrays 技术研究缺氧对基因表达的影响,发现缺氧能强烈诱导 EST 表达序列 EST 188825 (GenBank Accession Number: AA799328, 基因名称为 FAM111A)。这项研究结果与 2002 年 Bernaudin 等^[7]的研究结果一致,同样显示在缺氧再氧合时通过基因芯片筛查技术发现 EST 188825 基因在新生鼠的各个组织(脑组织、心脏组织、肾脏组织、肺组织、肝组织等)中均呈现不同程度(数倍到几十倍不等)的高表达状态。随后课题

组根据 EST 188825 的核苷酸序列设计了引物,用 RACE 技术克隆了 EST 188825 的全长 cDNA 序列,用体外蛋白翻译技术证实该基因表达分子量为 68 kDa 的蛋白。该 cDNA 是在缺氧环境中高表达被发现的,且编码的蛋白分子量为 68 kDa,因此把其命名为 HIP68。到目前为止, HIP68 (FAM111A) 基因的功能是未知的,国内外对该基因的研究也很少,大多是近几年研究报道的。HIP68 位于常染色体 11q12 附近 16kb 处,编码含有 611 个氨基酸的核表达蛋白^[8-10]。2012 年有报道称 SV40 病毒的 LT 抗原可以与 HIP68 特异性的相互作用, LT 抗原通过损耗 HIP68 来稳固和重建病毒在宿主中的表型,提示 HIP68 可能具有抗病毒的特性;该研究还发现 HIP68 的表达具有细胞周期依赖性^[11]。2012 年 Nature Genetics 报道称 HIP68 基因的突变可能与日本男性前列腺癌易感性有关^[8];随后在 2014 年有学者发现这可能是由于 HIP68 基因可以调控雄激素受体有关^[12]。2013 年有研究发现 HIP68 的高表达与糖尿病的发病有关,可能是由于 HIP68 的高表达影响了胰岛 B 细胞的存活^[13]。Kenny-Caffey 氏综合症是一种相当罕见的遗传性骨骼疾病,一般表现为出生后生长迟滞,身

材短小,大头,脸部有轻微的畸形,前额微凸,高的发际线,眉毛与睫毛较不明显;且骨质较硬,长骨的骨干较为狭窄,皮层较厚而髓腔狭窄,常伴有低钙血症^[10,14]。2013 年之后有报道称 Kenny-Caffey 氏综合症可能是因为 *HIP68* 基因的突变引起的^[9-10,15],*HIP68* 基因的突变可导致骨骼系统发育异常^[16]。从这些文献报道来看,*HIP68* 可能与基因的转录有关^[11],对调控骨骼的生长增殖、甲状旁腺激素分泌、体内钙水平稳定、男性生殖系统发育等起重要作用^[10,14]。

RAP1B 是 *RAP1* 的异构体,是一种小的 Ras 样 GTP 酶,在调控多种信号通路如增殖、分化、形态形成以及凋亡中起分子开关的作用^[17]。*RAP1B* 在内皮迁移与血管生成的作用相对明确。在 *RAP1B* 基因敲除的裸鼠动物模型研究证实,*RAP1B* 缺失可以导致血管生成、内皮细胞迁移及增殖的功能受损以及 MAPK 信号通路的受阻,无论是血管发生、内皮迁移以及 MAPK 通路都在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[18]。虽然 *RAP1B* 在很多肿瘤中的突变不多,但其癌基因的功能已在多种肿瘤中被证实,也是肿瘤治疗的潜在位点^[19-21]。Infante 等^[22] 研究发现 *RAP1B* 可以作为预防急性淋巴细胞白血病组织侵袭的有效手段,与本实验结果一致。以往报道在结肠癌肝转移瘤、黑色素瘤、甲状腺乳头状癌、胶质瘤等的研究中也发现 *RAP1B* 参与了肿瘤的增殖与远处转移^[23-26]。课题组前期研究也发现,*RAP1B* 与食管癌增殖和侵袭相关,且为 miR-518b 的下游^[27];在胃癌中 *RAP1B* 高表达,且与胃癌患者预后相关,缺氧可诱导 *RAP1B* 在胃癌细胞中高表达,且与胃癌侵袭明显相关^[28]。

本研究中乳腺癌缺氧组织 IHC 结果显示,*HIP68*、*RAP1B* 蛋白高表达于乳腺癌细胞,而前期已经证实 *HIP68* 高表达于乳腺癌,*RAP1B* 参与肿瘤的发生,且有报道高表达 *RAP1B* 促进乳腺癌转移,但具体机制尚未报道。本研究我们设想 *HIP68* 与 *RAP1B* 可能共同参与乳腺癌的恶性生物学行为,且证实 *RAP1B* 为 *HIP68* 的下游作用靶点,促进乳腺癌的生物学行为,通过免疫共沉淀实验表明 *HIP68* 与 *RAP1B* 结合并作为下游靶点促进乳腺癌侵袭转移及细胞增殖,这与 Bischoff 等^[29] 报道的结果一致,高表达 *RAP1B* 可以促进乳腺癌远处转移及定植,*RAP1B* 通过上游分子激活形成活性形式促进肿瘤细胞群体性的聚集及延伸促进癌细胞远处转移,*RAP1B* 通过促进细胞外张力作用参与肿瘤的进一步发展。本研究未在动物水平验证 *HIP68*/*RAP1B* 促进乳腺癌恶性生物学行为的机制,接下来我们将进一步在体内及动物实验中验证 *HIP68*/*RAP1B* 在乳腺癌侵袭转移中

的机制,为乳腺癌的防治提供新的依据。

4 结论

HIP68/*RAP1B* 信号通路在缺氧乳腺癌组织中高表达并促进乳腺癌细胞迁移和侵袭。

【参考文献】

- [1] VAUPEL P, HÖCKEL M, MAYER A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(8):1221-1235.
- [2] DALES J P, GARCIA S, MEUNIER-CARPENTIER S, *et al*. Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *International journal of cancer*[J]. 2005, 116(5): 734-739.
- [3] YAMAMOTO Y, IBUSUKI M, OKUMURA Y, *et al*. Hypoxia-inducible factor 1 α is closely linked to an aggressive phenotype in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* [J]. 2008, 110(3): 465-475.
- [4] LI M, XIAO D, ZHANG J, *et al*. Expression of LPA2 is associated with poor prognosis in human breast cancer and regulates HIF-1 α expression and breast cancer cell growth [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6):3479-3487.
- [5] 荀雪琼,胡会永,曹钦光,等. 乳腺癌组织中 FGF-1、TIP30、TLR4、HIF-1 α 的表达及其与微血管密度的关系[J]. *西部医学*, 2019, 31(7):1034-1037.
- [6] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87-108.
- [7] BERNAUDIN M, TANG Y, REILLY M, *et al*. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(42): 39728-39738.
- [8] AKAMATSU S, TAKATA R, HAIMAN CA, *et al*. Common variants at 11q12, 10q26 and 3p11.2 are associated with prostate cancer susceptibility in Japanese[J]. *Nature Genetics*, 44(4):426-429, S1.
- [9] ISOJIMA T, DOI K, MITSUI J, *et al*. A Recurrent De Novo FAM111A Mutation Causes Kenny-Caffey Syndrome Type 2 [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(4):992-998.
- [10] UNGER S, GÓRNA M W, LE BÉCHEC A, *et al*. FAM111A Mutations Result in Hypoparathyroidism and Impaired Skeletal Development[J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(6):990-995.
- [11] FINE D A, ROZENBLATT-ROSEN O, PADI M, *et al*. Identification of FAM111A as an SV40 host range restriction and adenovirus helper factor[J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(10):e1002949. doi: 10.1371/journal.ppat.
- [12] MUDRYJ M, LIBERTINI S J, LOMBARD A P, *et al*. Abstract 2124: Analysis of FAM111A, a newly identified AR regulated gene, in prostate cancer[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(19 Supplement):2124-2124.
- [13] SINGH H, FAROUK M, BOSE B B, *et al*. Novel genes un-

- derlying beta cell survival in metabolic stress[J]. *Bioinformatics*, 2013,9(1):37-41.
- [14] NIKKEL S M, AHMED A, SMITH A, *et al.* Mother-to-daughter transmission of Kenny-Caffey syndrome associated with the recurrent, dominant FAM111A mutation p. Arg569His[J]. *Clin Genet*, 2014,86(4):394-395.
- [15] ISOJIMA T, KITANAKA S. Kenny-Caffey syndrome and its related syndromes[J]. *Nihon Rinsho*, 2015,73(11):1959-1964.
- [16] ALABERT C, BUKOWSKI-WILLS J C, LEE S B, *et al.* Nascent chromatin capture proteomics determines chromatin dynamics during DNA replication and identifies unknown fork components[J]. *Nat Cell Biol*, 2014,16(3):281-293.
- [17] WILSON J M, PROKOP J W, LORIMER E, *et al.* Differences in the Phosphorylation-Dependent Regulation of Prenylation of Rap1A and Rap1B[J]. *J Mol Biol*, 2016,428(24 Pt B):4929-4945.
- [18] CHRZANOWSKA-WODNICKA M, KRAUS A E, GALE D, *et al.* Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in RAP1B-deficient mice[J]. *Blood*, 2018,111(5):2647-2656.
- [19] LI Y, LIU Y, SHI F, *et al.* Knockdown of RAP1B Enhances Apoptosis and Autophagy in Gastric Cancer Cells via the PI3K/Akt/mTOR Pathway[J]. *Oncology research*, 2016,24(5):287-293.
- [20] LIN K T, YEH Y M, CHUANG C M, *et al.* Glucocorticoids mediate induction of microRNA-708 to suppress ovarian cancer metastasis through targeting RAP1B[J]. *Nature communications*, 2015,6:5917.
- [21] SHE X, YU Z, CUI Y, *et al.* miR-181 subunits enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeleton remodeling in glioblastoma cells[J]. *Medical Oncology*, 2014,31(4):892. doi: 10.1007/s12032-014-0892-9.
- [22] INFANTE E, HEASMAN S J, RIDLEY A J. Statins inhibit T-acute lymphoblastic leukemia cell adhesion and migration through RAP1B[J]. *J Leukoc Biol*, 2011,89(4):577-586.
- [23] XU J H, ZHAO W Y, FANG Q Q, *et al.* Long Noncoding RNA LUADT1 Is Upregulated in Melanoma and May Sponge miR-28-5p to Upregulate RAP1B[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020,35(4):307-312.
- [24] WANG P, GU J, WANG K, *et al.* miR-206 inhibits thyroid cancer proliferation and invasion by targeting RAP1B[J]. *J Cell Biochem*, 2019,120(11):18927-18936.
- [25] TANG Z, PENG H, CHEN J, *et al.* Rap1b enhances the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by up-regulating Twist 1[J]. *Exp Cell Res*, 2018,367(1):56-64.
- [26] LI Z, XU C, DING B, *et al.* Long non-coding RNA MALAT1 promotes proliferation and suppresses apoptosis of glioma cells through derepressing Rap1B by sponging miR-101[J]. *J Neurooncol*, 2017,134(1):19-28.
- [27] ZHANG M, ZHOU S, ZHANG L, *et al.* miR-518b is down-regulated, and involved in cell proliferation and invasion by targeting RAP1B in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *FEBS letters*, 2012,586(19):3508-3521.
- [28] YANG Y, LI M, YAN Y, *et al.* Expression of RAP1B is associated with poor prognosis and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer[J]. *Oncology reports*, 2015,34(5):2385-2394.
- [29] BISCHOFF A, HUCK B, KELLER B, STROTBEEK M, *et al.* miR149 functions as a tumor suppressor by controlling breast epithelial cell migration and invasion[J]. *Cancer Res*, 2014,74(18):5256-5265.

(收稿日期:2023-02-04;修回日期:2024-03-15;编辑:黎仕娟)

(上接第 479 页)

- [23] SHEN H, YU H, LI Q Y, *et al.* Hepatocyte-derived VEGFA accelerates the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma via activating hepatic stellate cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022,43(11):2917-2928.
- [24] BASU S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients[J]. *Toxicology*, 2003,189(1-2):113-127.
- [25] ZHOU Y, LONG D, ZHAO Y, *et al.* Oxidative stress-mediated mitochondrial fission promotes hepatic stellate cell activation via stimulating oxidative phosphorylation[J]. *Cell Death Dis*, 2022,3(8):689.
- [26] ZHANG L, ZHANG H, GU J, *et al.* Glabridin inhibits liver fibrosis and hepatic stellate cells activation through suppression of inflammation and oxidative stress by activating PPARgamma in carbon tetrachloride-treated mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022,113(Pt B):109433.
- [27] SVEGLIATI-BARONI G, DI SARIO A, CASINI A, *et al.* The Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*, 1999,30(5):868-875.
- [28] LUO L, ZHANG G, MAO L, *et al.* Group II muscarinic acetylcholine receptors attenuate hepatic injury via Nrf2/ARE pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020,395:114978.
- [29] HAN C Y, SUN T T, XV G P, *et al.* Berberine ameliorates CCl4-induced liver injury in rats through regulation of the Nrf2-Keap1-ARE and p53 signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2019,20(4):3095-3102.
- [30] MA J Q, DING J, ZHANG L, *et al.* Protective effects of ursolic acid in an experimental model of liver fibrosis through Nrf2/ARE pathway[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015,39(2):188-197.
- [31] 杨帆,童婧涵,李会,等.还原型谷胱甘肽联合高通量血液透析对急性肾损伤患者血清 CysC、KIM-1 及 Scr 的影响[J]. *西部医学*, 2020,32(6):863-867.
- [32] 郭尹玲,扈晓宇,钟森,等.附子对免疫性肝损伤模型大鼠的影响及代谢组学研究[J]. *西部医学*, 2010,22(5):797-799.

(收稿日期:2023-02-05;修回日期:2024-02-04;编辑:黎仕娟)