

ARHGAP21 通过失活 WNT 信号通路抑制非小细胞肺癌中的上皮间质转化

谢紫平¹, 刘立威², 房锦存², 钟星怡¹, 林俊豪¹, 陈逢生¹

¹南方医科大学中西医结合医院, 广东 广州 510315; ²南方医科大学附属何贤纪念医院, 广东 广州 511400

摘要:目的 探究 Rho GTPase 激活蛋白 21 (ARHGAP21) 对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞迁移、转移的影响并探讨其作用机制。方法 通过 TCGA、CPTAC 数据库和临床资料确定 ARHGAP21 在 NSCLC 中的表达与患者预后的关系; 通过免疫印迹 (Western blot) 和免疫组化验证 ARHGAP21 在 NSCLC 的基础表达; 通过慢病毒稳转构建敲低 ARHGAP21 的 NSCLC 细胞系; 通过 Transwell 实验和划痕愈合实验检测敲低 ARHGAP21 对肺癌细胞体外迁移能力的影响; 通过裸鼠肺转移肿瘤模型的构建检测敲低 ARHGAP21 对肿瘤细胞体内转移能力的影响; 通过生物信息学分析预测 ARHGAP21 的可能作用机制; 通过 Western blot 实验验证其相关机制。结果 ARHGAP21 的低表达与不良预后相关 ($P < 0.05$); 与正常组织相比, ARHGAP21 在肺癌组织中表达下调 ($P < 0.001$); Transwell 和划痕愈合实验结果显示敲低 ARHGAP21 促进了肺癌细胞迁移能力 ($P < 0.001$)。裸鼠尾静脉肺转移模型结果显示与阴性对照组相比, 敲低 ARHGAP21 组肺部肿瘤转移结节数量更多 ($P < 0.05$) 且具有更高表达水平的 N-钙粘蛋白和波形蛋白。生物信息学分析表明, APC、GSK3 β 、Axin 和 ARHGAP21 之间存在高度相关性 ($P < 0.001$)。Western blot 结果显示敲低 ARHGAP21 能够降低 β -catenin 的泛素化, 上调 N-钙黏蛋白并激活 WNT 信号通路。结论 ARHGAP21 的下调能够显著促进 NSCLC 的迁移、转移能力, 这可能与 ARHGAP21 基因下调后激活 WNT 信号通路, 影响 APC、GSK3 β 、Axin 的表达从而降低 β -catenin 的泛素化有关。

关键词: ARHGAP21 基因; 上皮间质转化; WNT 信号通路; 非小细胞肺癌

ARHGAP21 inhibits epithelial-mesenchymal transition by inactivating the WNT signaling pathway in non-small cell lung cancer

XIE Ziping¹, LIU Liwei², FANG Jincun², ZHONG Xingyi¹, LIN Junhao¹, CHEN Fengsheng¹

¹Cancer Center, Integrated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510315, China; ²Hexian Memorial Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 511400, China

Abstract: Objective To investigate the role of Rho GTPase-activating protein 21 (ARHGAP21) in regulating the migration and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods** TCGA, CPTAC database were used to analyze the correlation of ARHGAP21 expression level in NSCLC and the patients' prognosis. The expression of ARHGAP21 in clinical specimens of NSCLC tissues was examined using Western blotting and immunohistochemistry. The effect of ARHGAP21 knockdown on migration ability of lung cancer cell lines was examined using Transwell assay and wound healing assay. A nude mouse model with injection of lung cancer H1299 cells *via* the tail vein was used to examine the effect of ARHGAP21 knockdown on the metastatic ability of the tumor cells. The possible mechanism of ARHGAP21 was predicted by bioinformatics analysis and verified using Western blotting. **Results** A low ARHGAP21 expression was associated with poor prognosis of patients with NSCLC ($P < 0.05$). ARHGAP21 expression was significantly downregulated in lung cancer tissues as compared with the adjacent tissues ($P < 0.001$). In cultured lung cancer cells, ARHGAP21 knockdown obviously promoted the migration ability of the cells ($P < 0.001$). In the nude mouse models, injection of H1299 cells with ARHGAP21 knockdown, as compared with the negative control cells, resulted in a greater number of metastatic lung cancer nodules ($P < 0.05$), which expressed higher levels of N-cadherin and vimentin. Bioinformatic analysis showed a close correlation of ARHGAP21 with APC, GSK3 β , and Axin ($P < 0.001$). Western blotting showed that ARHGAP21 knockdown significantly decreased ubiquitination of β -catenin, upregulated N-cadherin and activated the WNT signaling pathway in the lung cancer cells. **Conclusion** ARHGAP21 downregulation can significantly promote the migration and metastatic ability of NSCLC possibly as a result of WNT signaling pathway activation, which reduces the ubiquitination of β -catenin by affecting the expressions of APC, GSK3 β , and Axin.

Keywords: Rho GTPase-activating protein 21; epithelial-mesenchymal transition; WNT signaling pathway; non-small cell lung cancer

收稿日期: 2023-05-7

基金项目: 国家自然科学基金 (81872251); 广东省自然科学基金 (2020A1515010093, 2021A1515012104); 南方医科大学中西医结合医院院长基金 (1202102002)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81872251).

作者简介: 谢紫平, 在读硕士研究生, E-mail: xzp-1996@foxmail.com; 刘立威, 主治医师, E-mail: gzpyllw@163.com。谢紫平、刘立威共同为第一作者

通信作者: 陈逢生, 副主任医师, 硕士生导师, E-mail: fsc0126@163.com; 林俊豪, 医师, E-mail: l_j_n@163.com

肺癌是全球公共卫生领域面临的一项严重挑战。它在肿瘤发病率排名第二, 死亡率位居第一^[1]。其中非小细胞肺癌 (NSCLC) 是最常见的肺癌类型, 占有病例的 80%~85%^[2,3]。近年来肺癌在分子生物学领域的重要突破, 尤其是在基因和表观遗传学的研究中, 为我们理解它的发生机制、改善诊断手段和研发新型靶向、免疫治疗策略提供了新的可能。此外, 还可能通过寻找新的肿瘤标志物, 帮助我们提高肺癌的早期诊断能力^[4-6]。

这种现代化精准医学的治疗方式,正在改变我们对肺癌的认识和治疗策略,也能为患者带来更大的希望。

RhoGTPases是Ras超家族的一个亚家族,它们在细胞骨架、细胞黏附和迁移等多种生物学过程中发挥至关重要的作用^[7-9]。ARHGAP21是一种RhoGTPase激活蛋白,它通过加速RhoGTPase的GTP水解,负性调节RhoGTPase的活性^[10]。ARHGAP21被报道参与调控多种肿瘤。Carles等^[11]研究表明,ARHGAP21在头颈鳞癌中高表达。Bigarella等^[12]发现在胶质母细胞瘤中,ARHGAP21与FAK相互作用以抑制细胞迁移和侵袭。Lazarini等^[13]发现,缺乏ARHGAP21可以促进前列腺癌细胞迁移并减少细胞增殖。现有关于ARHGAP21的研究主要集中在细胞骨架重组和内质网动态性方面的作用。然而,这些研究并未全面揭示ARHGAP21在生物体内的具体功能。尤其是在肺癌中,尚未有人深入研究。因此,ARHGAP21在肺癌中发挥的生物功能仍需进一步探索。另一方面,尽管有研究报道ARHGAP21在一些肿瘤中可能起抑癌因子的作用,但其在肺癌迁移和转移的确切机制尚不清楚。我们通过生物信息学分析首次关注到ARHGAP21与破坏复合物之间的关系。这一发现为我们提供了一种全新的角度,有助于更深入地理解ARHGAP21,特别是其在NSCLC的作用机制,也可能为肺癌的治疗提供新的靶点,具有重要的研究意义。

1 材料和方法

1.1 材料

肺癌细胞系A549、H1299、PC-9、H1975、H322、H460和人支气管上皮细胞系(16HBE)均来自南方医科大学。肺癌组织芯片(HLugA180Su04,上海芯超),并得到伦理审查委员会的批准(YB M-05-02)。3~5周龄的BALB/c裸鼠(雌性,谨为生物)。动物研究由南方医科大学中西医结合医院伦理委员会审查和批准(伦理审批号:2022-070)。DMEM、RPMI 1640培养基、胎牛血清(Gibco);Lipofectamine 3000(赛默飞);细胞总RNA提取试剂盒(福际生物);TB Green Premix Ex Taq II试剂盒、Prime Script RT试剂盒(宝日医生生物);10%凝胶试剂盒(雅酶);免疫组化检测试剂盒(PV9000,中杉金桥);肺癌组织芯片(HLugA180Su04,芯超生物)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺癌细胞系A549、H1299、PC-9、H1975、H322、H460和人支气管上皮细胞系(16HBE)均在含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养,所有细胞均在37℃和5%CO₂的恒温培养箱中培养。定期观察细胞状态、更换新鲜培养基、当细胞融合度达到80%左右,对细胞进行传代操作。

1.2.2 细胞转染 接种合适数量的细胞,使用Lipofectamine 3000进行细胞转染,转染24 h后使用实时定量PCR检测ARHGAP21的表达水平。

1.2.3 ARHGAP21敲低表达细胞株的构建 使用上海和元生物科技有限公司设计包装的敲低ARHGAP21慢病毒和空载体慢病毒,进行细胞转染。使用含有2 mg/mL嘌呤霉素的培养基筛选稳转细胞。病毒含有荧光素酶和绿色荧光蛋白,可用于观察动物实验中肺转移瘤的情况。

1.2.4 RT-qPCR 使用细胞总RNA提取试剂盒提取总RNA,随后使用Prime Script RT试剂盒对RNA样本进行逆转录。最后使用TB Green Premix Ex Taq II试剂盒在Light Cycler 480 II系统上进行实时定量PCR。使用2^{-ΔΔCt}方法计算相对表达水平。引物序列如表1所示。

表1 本研究所使用的引物序列

Tab.1 Primer sequences used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
F: β-actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
R: β-actin	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
F: ARHGAP21	CATGGCACAGCCAGTTGAAAT
R: ARHGAP21	CCCTACCAGGTTGTGTGTCAGTA
F: Gsk3β	GGCAGCATGAAAGTTAGCAGA
R: Gsk3β	GGCGACCAGTTCTCCTGAATC
F: Axin	GACCTGGGGTATGAGCCTGA
R: Axin	GGCTTATCCCATCTTGGTCATC
F: APC	AAAATGTCCCTCCGTTCTTATGG
R: APC	CTGAAGTTGAGCGTAATACCAGT
F: β-catenin	AAAGCGGCTGTTAGTCACTGG
R: β-catenin	CGAGTCATTGCATACTGTCCAT
F: GAPDH	CAATGACCCCTTCATTGACC
R: GAPDH	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

1.2.5 Western blotting检测 蛋白质样本用十二烷基硫酸钠(SDS)处理后存储在-80℃冰箱中。使用10%凝胶试剂盒进行电泳,并使用BIO-RAD转膜机将样品转移到聚偏氟乙烯膜上。使用5%脱脂奶粉封闭膜,并根据分子大小裁成适当的条带。在4℃的环境下,将条带置于摇床振荡过夜孵育12 h。随后使用相应的二抗孵育条带。最后向条带中加入增强型化学发光试剂,并使用MiniChemi化学发光成像与分析系统显影条带。本文使用的抗体包括anti-ARHGAP21(22183-1-AP)、anti-N-cadherin(66219-1-Ig)、anti-GAPDH(10494-1-AP)、Anti-Ubiquitin(10201-2-AP)和anti-β-Catenin(51067-2-AP)(武汉三鹰);anti-GSK3β(A6164)、anti-AXIN1(A16019)抗体(爱博泰克生物);Anti-APC(2504S,CST)。

1.2.6 Transwell实验检测细胞迁移 取1×10⁵个细胞,接种在上室中,上室底部为8 μm孔径的膜。往上室加入

适量无血清培养基,往下室加入适量含10%胎牛血清的RPMI 1640。于37℃、5% CO₂的条件下孵育8 h,等待细胞通过上室的孔隙迁移至下室。使用4%的多聚甲醛对细胞进行固定。使用结晶紫对细胞染色,最后通过显微镜观察迁移的细胞数量。

1.2.7 划痕实验检测细胞迁移 首先在六孔板中接种适当数量的细胞,等待细胞生长覆盖整个培养皿,然后使用无酶的移液枪头在细胞皿上水平竖直划若干条直线,最后观察和分别拍摄0、24、48和72 h后划痕处的缺口愈合情况。

1.2.8 裸鼠模型构建 选择3~5周龄的BALB/c裸鼠(雌性)。将H1299-shNC、H1299-shARHGAP21细胞通过尾静脉分别注射到对照组与实验组的裸鼠体内,构建体内异种移植转移模型(6只/组,注射细胞 2.5×10^6 /只)。在肿瘤细胞注射后的第5周,通过腹腔注射荧光素钠盐(150 mg/kg)在活体成像仪中检测裸鼠肿瘤的生长情况。随后,将裸鼠处死,收集肺组织并在荧光镜下拍照。最后,将裸鼠肺组织固定在4%的多聚甲醛中,进行石蜡包埋,并切成3 μm厚的切片。

1.2.9 免疫共沉淀和蛋白泛素水平检测 取 1×10^7 细胞并用含磷酸酶和蛋白酶抑制剂的IP裂解缓冲液裂解。收集细胞裂解物的上清液并与抗β-catenin抗体或正常兔IgG抗体在摇床上于4℃下孵育24 h。磁珠用洗涤缓冲液洗涤两次,随后与蛋白质抗体混合物一同置于室温条件下的摇床上孵育30 min。将混合物用磁珠分离并用洗涤缓冲液清洗4次。将清洗后的磁珠沉淀物加入30 μL SDS,并在95℃下变性10 min。收集磁珠分离后的上清液。待后续进行Western blot检测,使用抗泛素抗体来检测IP样品的泛素化水平。

1.2.10 免疫组织化学染色 使用免疫组化检测试剂盒进行肺癌组织芯片的染色,经过脱蜡、抗原修复的操作随后阻断内源性过氧化物酶、孵育一抗、孵育反应增强液、孵育酶标二抗,最后使用DAB显色。芯片染色结果评分<4和≥4分别定义为阴性和阳性。此外,对于癌组织,0-6分和>6分的评分分别表示低表达和高表达。

1.3 统计学分析

每个体外实验至少进行了3次独立的重复试验。结果均以均数±标准差表示。使用独立样本*t*检验进行组间分析。采用Kaplan-Meier生存分析以OS、PFS和DFS为观测指标。使用Fisher精确检验评估ARHGAP21表达与临床病理特征之间的关系。所有统计分析均使用GraphPad Prism6软件进行,检验均为双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ARHGAP21在非小细胞肺癌中表达下调

TCGA数据库结果显示,肺癌组织中ARHGAP21的

mRNA表达水平降低($P < 0.001$,图1A~F),ARHGAP21的蛋白质水平也有所下降($P < 0.001$,图1G)。肺癌组织芯片免疫组化染色(图1H)结果显示在非配对样本($P < 0.01$,图1I)和配对样本($P < 0.05$,图1J)中ARHGAP21在肺癌组织中表达水平降低。Western-blot蛋白检测结果显示在大多数NSCLC细胞系(A549、PC-9、H1975、H460)中ARHGAP21的表达较正常人支气管上皮细胞低(图1K)。

2.2 ARHGAP21的下调与NSCLC的不良预后相关

KM-plotter数据库分析表明,ARHGAP21的下调与更短的总生存时间有关($P < 0.01$,图2A)^[14]。组织芯片预后信息分析结果显示,ARHGAP21的表达与年龄、性别、T分期、N分期、病理分期、组织学分级和淋巴结转移状态之间没有显著相关性(表2)。然而,高表达ARHGAP21的患者具有更长的总生存期($P < 0.05$,图2B)。单因素COX回归分析表明,ARHGAP21的下调是患者的独立不良因素(图2C),尽管多因素COX回归分析中ARHGAP21下调没有统计学意义,但尚不能排除混杂因素的影响(图2D)。

2.3 ARHGAP21表达下调促进了NSCLC细胞在体内的迁移和转移

通过Western blot鉴定了其敲低效率(图3A、B)。Transwell实验结果显示,与对照组相比,ARHGAP21表达下调可促进肿瘤细胞的迁移($P < 0.001$,图3C、D)。划痕愈合实验结果显示,与对照组相比,ARHGAP21表达下调可加速边缘细胞向中心的愈合,促进肿瘤细胞的迁移能力($P < 0.001$,图3E、F)。在裸鼠肺转移肿瘤模型中,相比对照组,敲低ARHGAP21的细胞株在裸鼠肺部显示出较高的信号区域,且有较多数目的转移肿瘤灶($P < 0.05$,图4A、B)。同时,免疫组化显示ARHGAP21表达下调促进了肿瘤转移部位肿瘤细胞的N-钙黏蛋白和波形蛋白的表达(图4C)。

2.4 ARHGAP21的生物信息学分析及预测其可能的作用机制

从GEPIA数据库中筛选并展示了前十个与ARHGAP21表达具有高相关性的基因($P < 0.001$,图5A~J)。特别注意的是其中APC基因作为WNT信号通路的关键负调节因子(图5J)。随后,通过GO注释对前100个与ARHGAP21存在相关性的基因进行富集分析(图5K)。分析结果表明,这些基因在细胞骨架和细胞粘附中有着显著的富集。蛋白质互作网络分析结果显示了与ARHGAP21有潜在相互作用的蛋白质^[15],例如CCDC85B、CCDC85C和ARRB1(图5L)。值得注意的是,CCDC85B、CCDC85C和ARRB1都与WNT通路或β-catenin有关。此外,我们还在TCGA数据库中分析了ARHGAP21与破坏体复合物组分(APC、Axin1、GSK3β和CK1)以及β-catenin的表达关系(图5M~P)。分析结

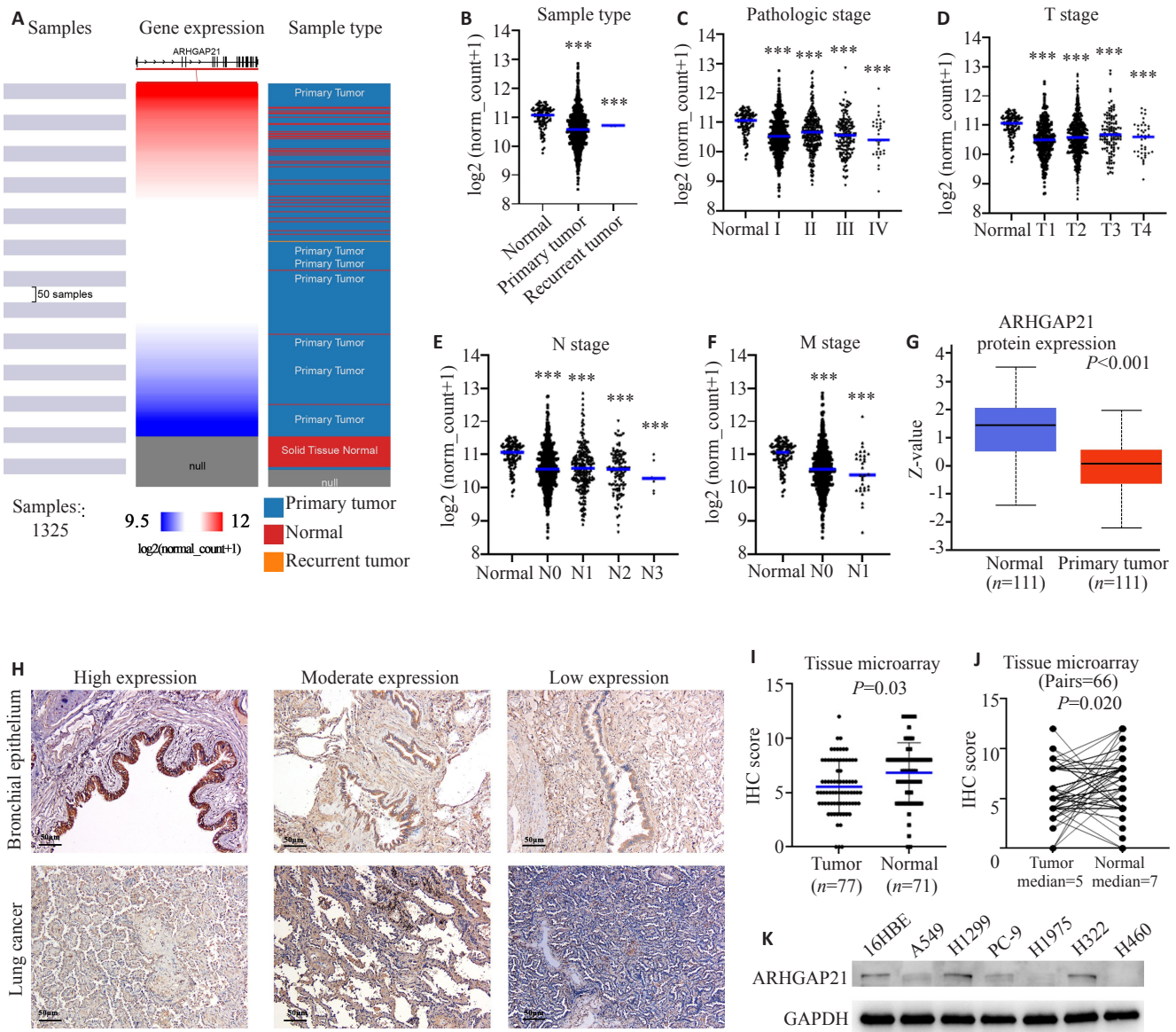


图1 ARHGAP21在非小细胞癌中被下调

Fig.1 ARHGAP21 is downregulated in NSCLC. A: Heat map of tissue type and ARHGAP21 expression. B-F: Analysis of the correlation of ARHGAP21 mRNA expression with tissue type, pathologic stage, T stage, N stage, M stage based on data from the TCGA database. G: Analysis of correlation between ARHGAP21 protein expression and tissue type based on data from the CPTAC database. H-J: Immunohistochemical (IHC) staining of tissue microarrays and statistical analysis of corresponding immunohistochemical staining scores. The tissue microarray included 77 tumor tissues and 71 normal tissues, 66 of which were paired (scale bar: 50 μm). K: Western blotting of ARHGAP21 expression in normal bronchial epithelial cell line (16HBE) and NSCLC cell lines (A549, H1299, PC-9, H1975, H322, and H460). *** $P < 0.001$ vs Normal.

果显示,ARHGAP21与APC、Axin1和GSK3β表达呈正相关($P < 0.001$),但与CK1和β-catenin无相关性。

2.5 ARHGAP21下调促进WNT信号通路的激活,从而促进上皮-间充质转化

qPCR结果显示,ARHGAP21敲低下调了APC、GSK3β、Axin和β-catenin的mRNA表达水平($P < 0.001$,图6A~E)。Western blot结果显示与对照组相比,ARHGAP21敲低细胞系中APC、GSK3β、Axin的蛋白水平下调,而β-catenin及其下游EMT相关蛋白N-钙黏蛋白表达上调(图6F)。此外,通过检测ARHGAP21敲

低后β-catenin泛素化水平的变化结果显示ARHGAP21敲低会降低β-catenin的泛素化水平,从而进一步上调β-catenin的蛋白水平(图6G)。

3 讨论

非小细胞肺癌是一种具有高发病率和高死亡率的恶性肿瘤^[16]。早期肺癌主要通过手术治疗。然而,由于其发病隐匿,被诊断出时,病情往往已经发展到中晚期,需要综合治疗。分子靶向治疗和免疫治疗是改善患者预后的有效方法之一,为部分患者带来了前所未有的生

表2 肺腺癌临床病理特征与 ARHGAP21 表达的相关性

Tab.2 Correlation between clinicopathological features of lung adenocarcinoma and ARHGAP21 expression

Characteristics		Low expression	High expression	Chi-square value	P
Gender	Male	12	11	0.216	0.642
	Female	25	18		
Age (year)	>55	25	21	0.181	0.671
	≤55	12	8		
Pathology grade	II	24	16	0.692	0.406
	III	13	13		
Lymphatic metastasis	Positive	17	8	0.579	0.447
	Negative	15	11		
T stage	1-2	27	23	1.362	0.243
	3-4	10	4		
N stage	0-1	21	16	3.226	0.072
	2-3	3	0		
Clinical stage	1-2	20	13	1.15	0.283
	3-4	15	5		

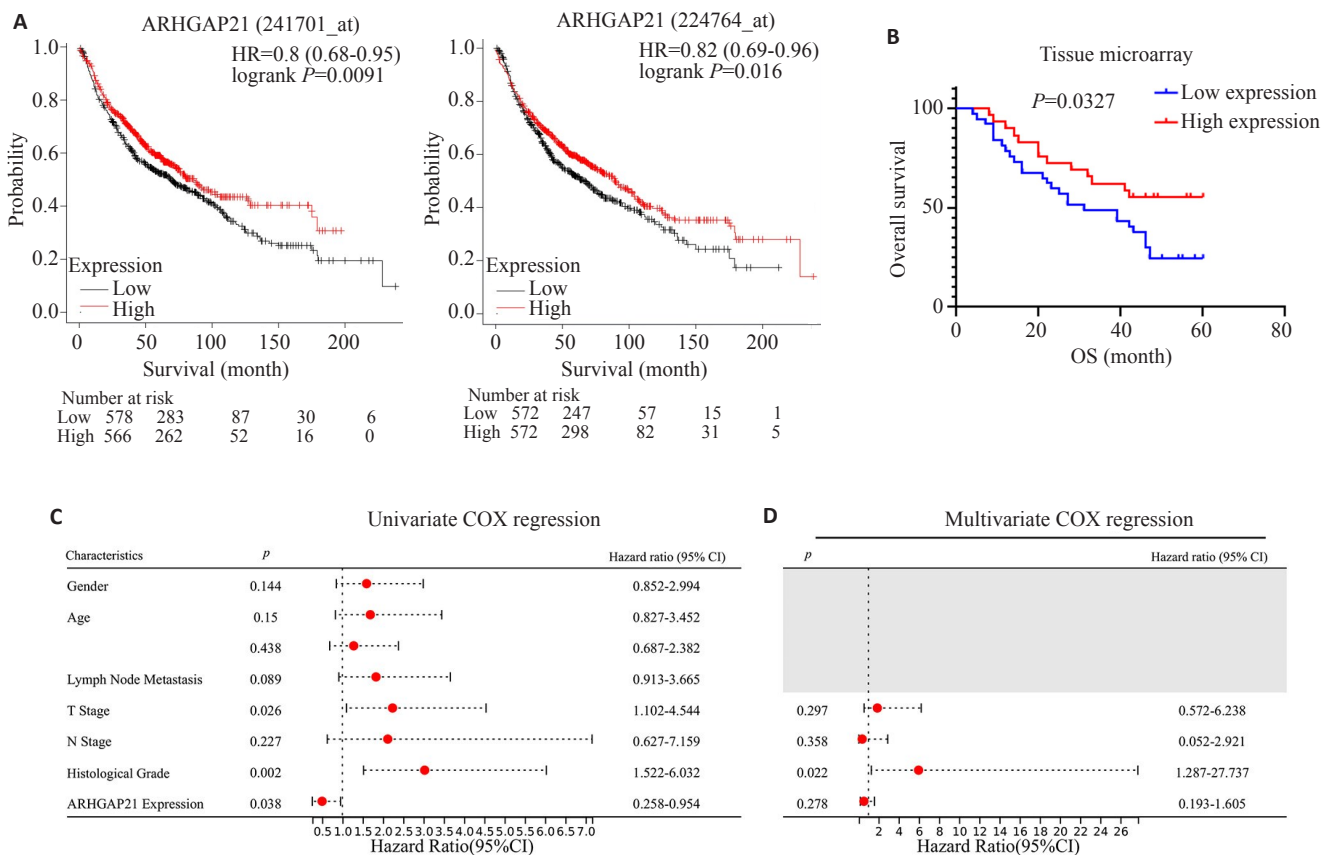


图2 ARHGAP21的下调与预后不良有关

Fig.2 ARHGAP21 downregulation of was associated with poor prognosis of NSCLC. **A**: Overall survival of NSCLC patients with different ARHGAP21 expression levels based on the Km-plotter database. **B**: Tissue microarray IHC scores. **C**, **D**: Univariate and multivariate Cox regression of overall survival.

存益处^[3,17,18]。然而,NSCLC的总治愈率和生存率仍然非常低。因此,寻找更多的分子靶点对于NSCLC的诊断和治疗具有重要意义。

RhoGTPases是属于Ras超家族的小型核苷酸依赖

性GTP结合蛋白,它们参与了细胞信号传导,调控细胞迁移、黏附和增殖等多种生物学过程^[19]。恶性肿瘤的转移会显著降低肿瘤患者的生存率。RhoGTPases的紊乱可能促进癌症的转移^[20]。ARHGAP21是RhoGTPases

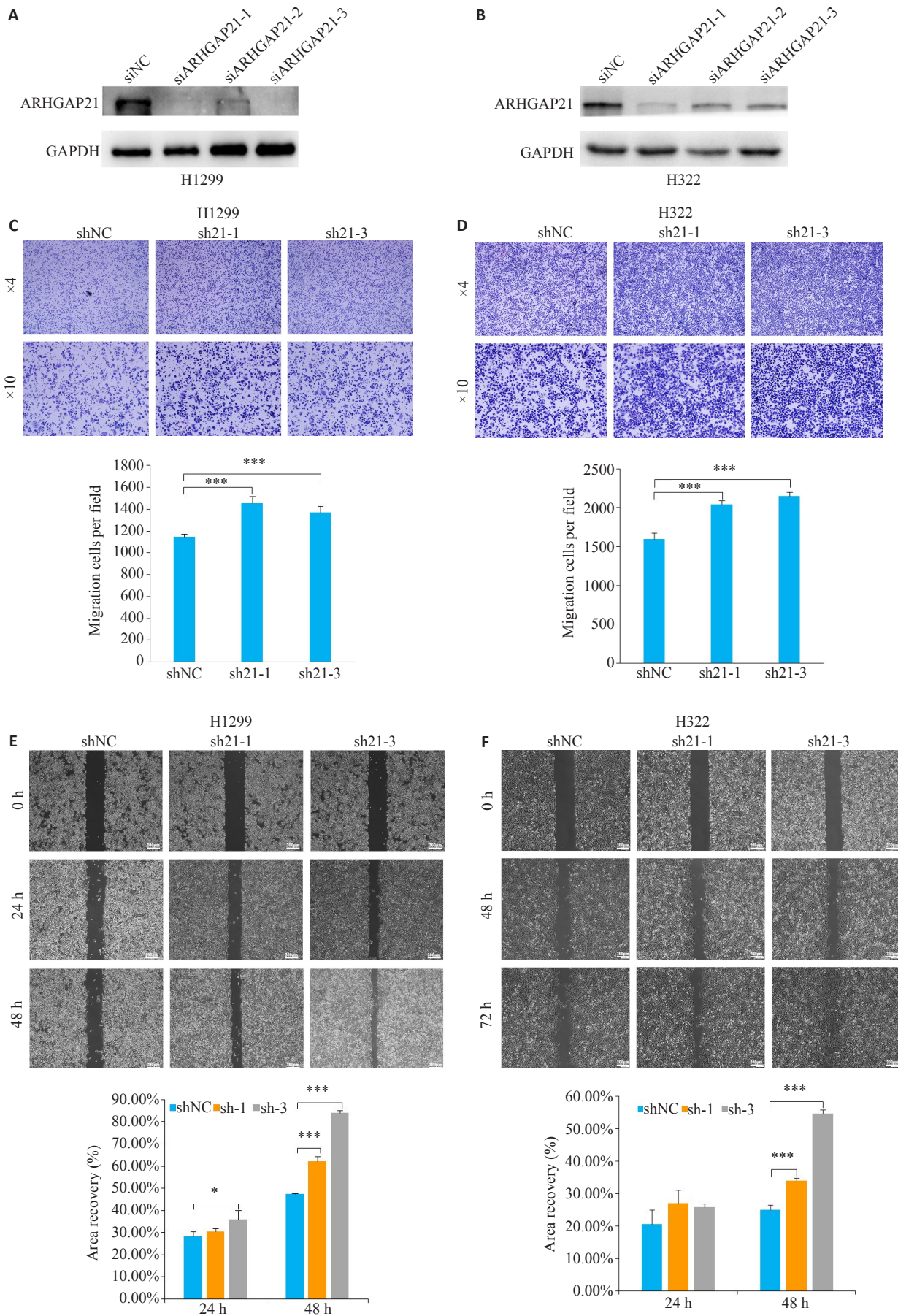


图3 ARHGAP21的敲低促进了非小细胞肺癌细胞在体外的迁移

Fig.3 ARHGAP21 knockdown promotes migration of NSCLC cells *in vitro*. **A, B**: Western blotting for verifying ARHGAP21 knockdown efficiency. **C-F**: Cell migration detected by Transwell assay and wound healing assay in ARHGAP21 knockdown and control cell lines (scale bar: 200 μ m). * P <0.05; *** P <0.001 vs NC group.

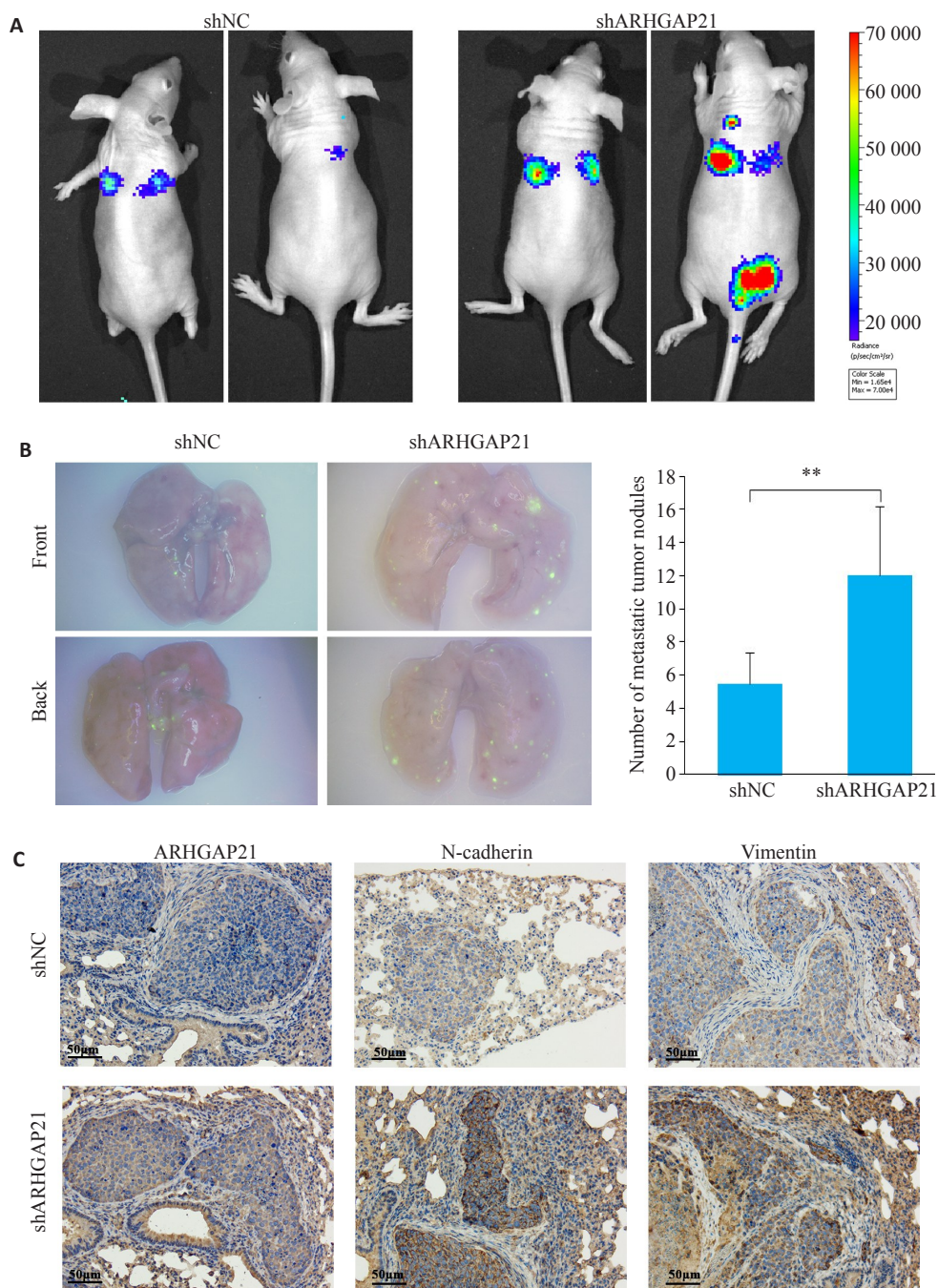


图4 敲低 ARHGAP21 促进非小细胞肺癌细胞在体内迁移

Fig.4 ARHGAP21 knockdown promotes migration of NSCLC cells *in vivo*. **A:** *In vivo* imaging for detecting metastasis ability of ARHGAP21 knockdown cells and control cells in mice. **B:** Representative image of a lung metastatic tumor and the statistical analysis of the fluorescence area. **C:** IHC staining of lung metastatic tumor (scale bar: 50 µm). **P*<0.05 vs NC group.

的负性调节因子之一,在多种肿瘤中被报道,是潜在的肿瘤抑制因子。Bigarella等^[12]发现 ARHGAP21 与 FAK 相互作用,进一步失活 FAK 和 CDC42 以抑制胶质母细胞瘤迁移。Lazarini 等^[13]揭示 ARHGAP21 抑制 RhoC 的活性以抑制细胞迁移。他们也发现 ARHGAP21 可能扰乱内皮素-1 通路以促进前列腺癌细胞增殖。有研究证明 ARHGAP21 和 PK1 是两个关键的细胞极性蛋白,它们通过调节 RhoA 来控制细胞运动^[21]。有研究提出

ARHGAP21 通过帮助稳定 α -微管蛋白来调节 EMT 特性^[22]。总体而言,先前的研究表明 ARHGAP21 通过调节细胞黏附、细胞极性和细胞骨架等影响细胞转移能力。然而,ARHGAP21 在肺癌中发挥的具体作用及其机制尚未有学者深入报道。

我们发现 ARHGAP21 在肺癌组织和大部分 NSCLC 细胞系中均表达下调,并且 ARHGAP21 的低表达是一个不良预后因素。这个证据与既往的研究一致,

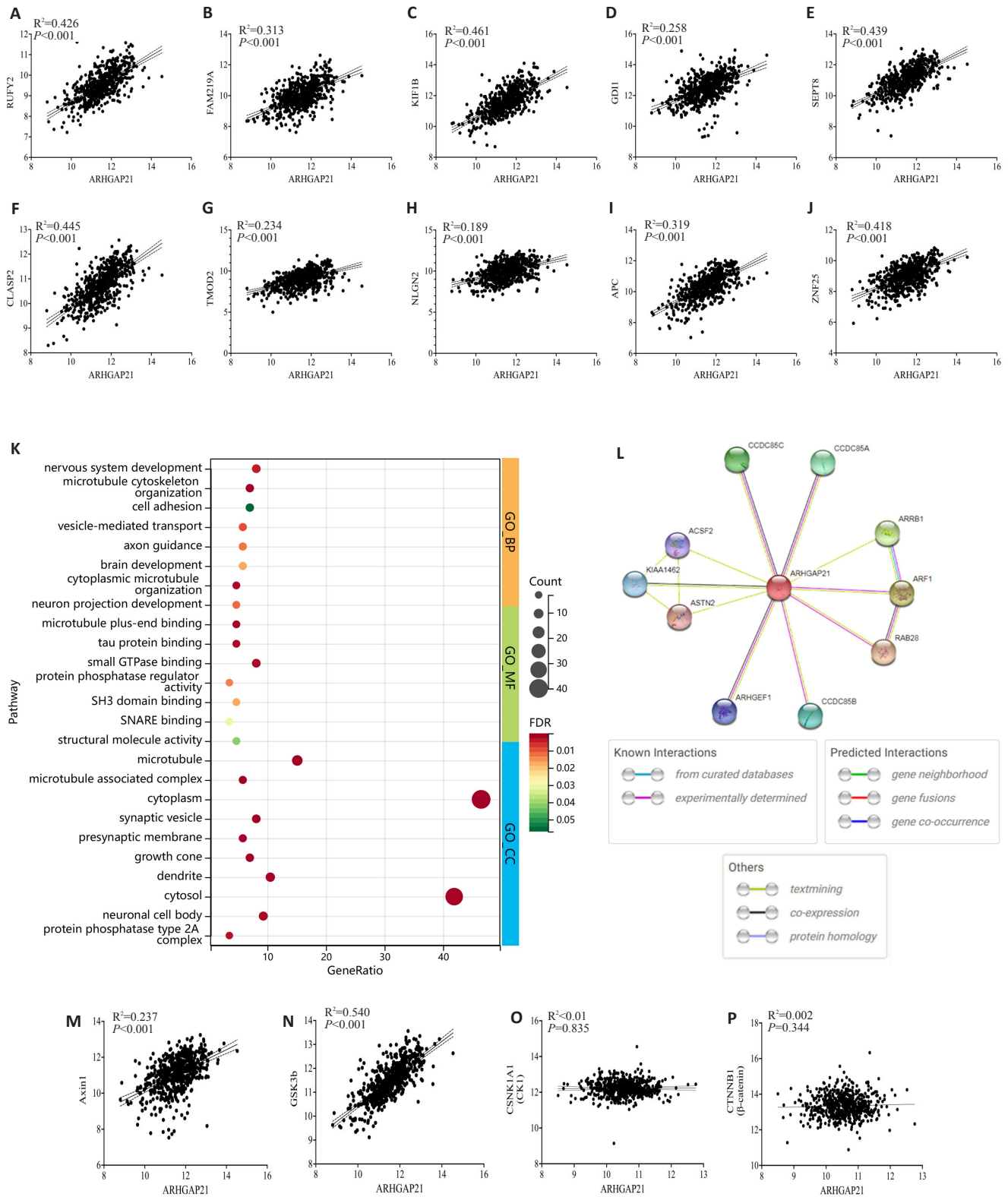


图5 生物信息学预测ARHGAP21的可能作用机制

Fig.5 Bioinformatic analysis for predicting possible mechanism of action of ARHGAP21. A- J: Correlation analysis between ARHGAP21 and the top 10 most similar genes based on data from the TCGA database and GEPIA database. K: GO annotation enrichment of the top 100 most similar genes of ARHGAP21. BP: Biological Process; MF: Molecular Function; CC: Cellular Component. L: PPI network analysis of ARHGAP21. M-P: Correlation analysis of ARHGAP21 with the Axin1, GSK3b, CK1 and β -catenin.

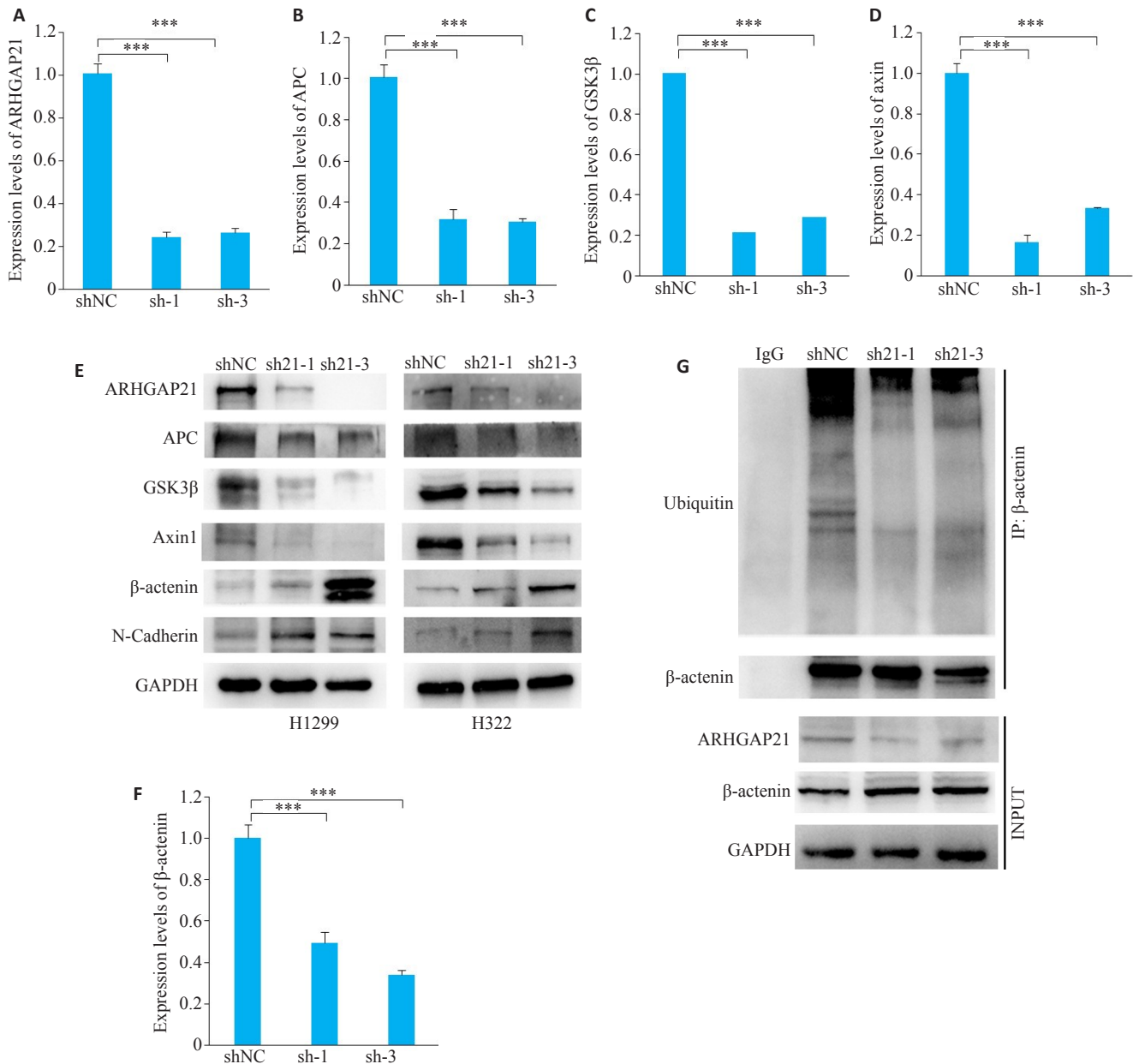


图6 敲低 ARHGAP21 通过激活 WNT 信号促进上皮—间质转化

Fig.6 ARHGAP21 knockdown promotes epithelial-mesenchymal transition by activating WNT signaling. A-D: qPCR analysis of ARHGAP21, APC, GSK3β and Axin1 mRNA expression after ARHGAP21 knockdown in lung cancer cells compared with the control cells. E: Western blotting for ARHGAP21, APC, GSK3β, Axin1, β-actinin and N-cadherin protein expressions in lung cancer cells after ARHGAP21 knockdown. F: qPCR analysis of ARHGAP21 and β-actinin mRNA expression in lung cancer cells after ARHGAP21 knockdown. G: Effect of ARHGAP21 knockdown on ubiquitination of β-actinin. *** $P < 0.001$.

认为 ARHGAP21 可能是一种肿瘤抑制分子。为了探究 ARHGAP21 在 NSCLC 中的生物学功能,我们构建了敲低 ARHGAP21 的肺癌细胞系。基于 ARHGAP21 广泛参与细胞骨架、细胞黏附等过程,我们着重检测了在肺癌细胞中敲低 ARHGAP21 后迁移及转移能力的变化。结果显示,ARHGAP21 的敲低促进了肿瘤细胞在体外和体内的迁移和转移。

基于 GEPIA 数据库^[23],我们筛选了与 ARHGAP21

表达高度相关的基因并对前 100 个相关基因进行 GO 富集分析,富集结果包括细胞骨架、细胞黏附、细胞质微管、微管相关复合物等方面,这提示我们 ARHGAP21 可能在细胞迁移中发挥重要的作用^[13, 21, 22]。此外 APC 与 ARHGAP21 之间的高度相关性引起了我们的注意。APC 是破坏复合物的重要组成部分之一,与 WNT 信号通路相关^[24, 25]。在 WNT/β-catenin 信号通路中,当 WNT 信号失活时,破坏复合物(包括 APC、Axin、CK1 和 GSK3β)

与 β -catenin 相互作用并介导其磷酸化。磷酸化的 β -catenin 被 β -TrCP 识别,在泛素化修饰后被降解^[25]。当 WNT 信号被激活或破坏复合物出现异常时, β -catenin 的降解也随之减弱。上调的 β -catenin 在核周积累并被运输到细胞核。作为转录调节因子, β -catenin 与 LEF/TCF 转录因子家族相互作用,促进多个下游癌基因的表达^[26]。基于 TCGA 数据库分析,我们发现 ARHGAP21 不仅与 APC mRNA 表达相关,还与 Axin1 和 GSK3 β 相关,但与 β -catenin 的 mRNA 表达水平无关。此结果与已有研究相一致,即破坏复合物通过促进其泛素化降解而抑制 β -catenin 的表达,而不是通过抑制转录来实现。

为了进一步阐明 ARHGAP21 对破坏复合物的影响,我们检测了 ARHGAP21 敲低后 APC、GSK3 β 、Axin 和 β -catenin 的 mRNA 和蛋白水平变化。与预测结果相似,敲低 ARHGAP21 抑制了 APC、Axin 和 GSK3 β 的 mRNA 和蛋白水平,并上调了 β -catenin 的蛋白表达。值得注意的是,ARHGAP21 敲低下调了 β -catenin 的 mRNA 水平,这可能与 β -catenin 蛋白水平增加引起的负反馈调节有关。此外,我们分析了 ARHGAP21 敲低后 β -catenin 泛素化水平的变化。与破坏复合物的功能一致,ARHGAP21 减少导致 β -catenin 的泛素化水平降低,从而进一步上调 β -catenin。

上皮-间充质转化(EMT)是一种生物过程,指的是上皮细胞通过特定的程序转化为具有间充质表型的细胞^[27]。EMT 在胚胎发育、慢性炎症、组织重构、癌症转移以及多种纤维化疾病中发挥着重要作用。EMT 是一种重要的生物过程,其中上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞通过 EMT 进程获得了迁移和侵袭能力。近年来,越来越多的研究表明,EMT 对转移的功能影响重大^[28,29]。EMT 由多个信号通路调节,如 TGF- β 信号通路、WNT 信号通路和 Notch 信号通路。WNT 信号介导的异常激活在许多不同类型的癌症中发现^[30-32]。EMT 的共同特点是 E-钙粘蛋白向 N-钙粘蛋白的转化和细胞骨架中细胞角蛋白向波形蛋白的转化。在我们的研究中,我们发现 ARHGAP21 的沉默上调了 β -catenin 和 N-钙粘蛋白,增强了 EMT。先前的研究表明 ARHGAP21 通过稳定 α -微管蛋白来调节 EMT^[22]。我们的研究提示 ARHGAP21 通过失活 WNT 信号通路来抑制 EMT 过程。

因此,本结果表明,作为一种肿瘤抑制因子,ARHGAP21 在非小细胞肺癌中的表达水平降低,其低表达是预后不良的因素。敲低 ARHGAP21 基因后促进了细胞的体外和体内迁移和转移能力。分子机制研究表明,敲低 ARHGAP21 基因抑制了 APC、Axin 和 GSK3 β 的表达,阻止了破坏复合物的形成,降低了 β -catenin 的降解,进而促进了上皮间充质转化。这些发现提示,ARHGAP21 有望成为非小细胞肺癌新的诊断和

治疗靶点。对肺癌的临床诊疗可能具有积极指导意义。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689): 446-54.
- [3] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship [J]. *Mayo Clin Proc*, 2008, 83(5): 584-94.
- [4] Boumahdi S, de Sauvage FJ. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(1): 39-56.
- [5] Kris MG, Johnson BE, Berry LD, et al. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs[J]. *JAMA*, 2014, 311(19): 1998-2006.
- [6] Achim, Rittmeyer, MD, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 255-65.
- [7] Hall A. Rho family GTPases[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(6): 1378-82.
- [8] Maldonado MDM, Medina JI, Velazquez L, et al. Targeting rac and Cdc42 GEFs in metastatic cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 201.
- [9] Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal crosstalk in cell migration[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(9): 720-35.
- [10] Rosa LRO, Soares GM, Silveira LR, et al. ARHGAP21 as a master regulator of multiple cellular processes[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8477-81.
- [11] Carles A, Millon R, Cromer A, et al. Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display[J]. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1821-31.
- [12] Bigarella CL, Borges L, Costa FF, et al. ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res*, 2009, 1793(5): 806-16.
- [13] Lazarini M, Traina F, Machado- Neto JA, et al. ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis*, 2013, 1832(2): 365-74.
- [14] Lanczky A, Gyorffy B. Web-based survival analysis tool tailored for medical research (KMplot): development and implementation [J]. *J Med Internet Res*, 2021, 23(7): e27633.
- [15] Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-12.
- [16] Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer [J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(1): 49-52.
- [17] Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-small cell lung cancer: epidemiology, screening, diagnosis, and treatment [J]. *Mayo Clin*

- Proc, 2019, 94(8): 1623-40.
- [18] Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, et al. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(Suppl 4): S389.
- [19] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology [J]. *Nature*, 2002, 420(6916): 629-35.
- [20] Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 36: 103-12.
- [21] Zhang L, Luga V, Armitage SK, et al. A lateral signalling pathway coordinates shape volatility during cell migration [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11714.
- [22] Barcellos KSA, Bigarella CL, Wagner MV, et al. ARHGAP21 protein, a new partner of α -tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(4): 2179-89.
- [23] Tang ZF, Li CW, Kang BX, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [24] Albrecht LV, Tejada-Muñoz N, De Robertis EM. Cell biology of canonical Wnt signaling [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2021, 37: 369-89.
- [25] Roel, Nusse. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-99.
- [26] Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 165.
- [27] Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395-412.
- [28] Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, et al. EMT, MET, plasticity, and tumor metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 764-76.
- [29] Lin YT, Wu KJ. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition: focusing on hypoxia and TGF- β signaling [J]. *J Biomed Sci*, 2020, 27(1): 39.
- [30] Zhu LZ, Tian Q, Gao H, et al. PROX1 promotes breast cancer invasion and metastasis through WNT/ β -catenin pathway *via* interacting with hnRNP [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(5): 2032-46.
- [31] Yang D, Li Q, Shang R, et al. WNT4 secreted by tumor tissues promotes tumor progression in colorectal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 1-18.
- [32] Cao YY, Geng JX, Wang X, et al. RNA-binding motif protein 10 represses tumor progression through the Wnt/ β -catenin pathway in lung adenocarcinoma [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(1): 124-39.

(编辑:经 媛)