

Rab8a在结直肠癌中的表达及其对癌细胞增殖、迁移的影响

王永霞^{1,2} 王贝玺^{1,2,3} 王建强² 千新来^{1,2*}

(¹新乡医学院基础医学院病理学系, 新乡 453003; ²新乡医学院第三附属医院病理科, 新乡 453000; ³新乡医学院第四临床学院病理科, 新乡 453099)

摘要 Rab8a是Ras小GTPase超家族成员之一, 研究显示其在子宫内膜癌及肝细胞癌中发挥重要作用。而关于Rab8a在结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中的表达及功能目前尚不清楚。该研究首先利用GEPIA数据库分析Rab8a在包括结、直肠腺癌在内的多种临床常见恶性肿瘤中的表达情况, 发现Rab8a在包括结、直肠腺癌在内的多种肿瘤组织中表达上调; 实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)、Western blot及免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)检测结果显示: Rab8a在结直肠癌细胞和组织中高表达, 且其表达与肿瘤分化等相关临床病理参数相关; 一系列的体外功能实验结果显示, Rab8a的外源性过表达可以促进结直肠癌细胞的增殖和迁移, 而干扰其表达可以抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移; 荧光显微镜观察、Western blot及TOP/FOP-Flash报告基因实验结果显示, Rab8a的过表达可以诱导结直肠癌细胞的上皮-间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)并增强细胞内Wnt/ β -catenin信号通路活性。总之, 该研究证实了Rab8a在结直肠癌中表达上调, 并可能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路诱导肿瘤细胞发生EMT进而促进其增殖和迁移。

关键词 结直肠癌; Rab8a; 增殖; 迁移; 上皮-间质细胞转化

Expression of Rab8a in Colorectal Cancer and Its Effect on the Proliferation and Migration of Cancer Cells

WANG Yongxia^{1,2}, WANG Beixi^{1,2,3}, WANG Jianqiang², QIAN Xinlai^{1,2*}

(¹Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University; Xinxiang 453003, China;

²Department of Pathology, Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University; Xinxiang 453000, China;

³Department of Pathology, Fourth Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University; Xinxiang 453099, China)

Abstract Rab8a is one of the members of Ras small GTPase superfamily and studies have shown it is the contributing element in the development of endometrial cancer and hepatocellular carcinoma. However, the expression and biological function of Rab8a in CRC (colorectal cancer) remain unclear. The expression of Rab8a was firstly analyzed in some malignant tumors including colon and rectal adenocarcinoma by GEPIA (gene expression profiling interactive analysis) in this study and it was found that the expression of Rab8a in the malignant tumors

收稿日期: 2022-02-10 接受日期: 2022-03-28

国家自然科学基金(批准号: 81702850)、河南省科技攻关项目(批准号: 212102310145)、河南省卫生健康委员会联合共建项目(批准号: LHGJ20190494)和新乡医学院第三附属医院开放课题(批准号: KFKTYB202113)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13839073820, E-mail: qxfssws@163.com

Received: February 10, 2022 Accepted: March 28, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81702850), the Science and Technology Project of Henan Province (Grant No.212102310145), the Joint Construction Project of Henan Provincial Health Commission (Grant No.LHGJ20190494), and the Open Project of Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University (Grant No.KFKTYB202113)

*Corresponding author. Tel: +86-13839073820, E-mail: qxfssws@163.com

including colon and rectal adenocarcinoma were significantly higher than those in normal tissues; the results of qPCR (quantitative real-time PCR), Western blot and IHC (immunohistochemistry) showed that Rab8a expression was up-regulated in CRC cells and tissues; *in vitro* functional assays verified that ectopic overexpression of Rab8a promoted the proliferation and migration of CRC cells, while the inhibition of Rab8a repressed the proliferation and migration of CRC cells; fluorescence microscope, Western blot and TOP/FOP-Flash reporter assays demonstrated that the overexpression of Rab8a could induce the EMT (epithelial-mesenchymal transition) of CRC cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. Thus, this study revealed that Rab8a was up-regulated in CRC and promoted the proliferation and migration by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and, furthermore, inducing the EMT of CRC cells.

Keywords CRC; Rab8a; proliferation; migration; EMT

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球范围内常见消化系统恶性肿瘤,其发病率居所有恶性肿瘤第三位,肿瘤相关死亡率居第四位^[1]。近年来,随着我国经济发展和居民饮食结构的改变,结直肠癌在我国的发病率及死亡率均呈逐年上升趋势,严重威胁国人健康^[2-3]。目前临床对于结直肠癌的整体治疗效果并不十分理想^[4-5]。因此,加强结直肠癌发生、发展相关分子机制研究,发现有效的肿瘤标志物,对结直肠癌的临床诊断和治疗具有重要意义。

Rab8a基因编码的蛋白属于Ras超家族成员,主要参与调节胞吐、胞吞过程中的膜转运和溶酶体囊泡运输^[6-9]。有关Rab8a在恶性肿瘤中的表达及相关功能研究报道较少,目前仅见其在子宫内膜癌及肝细胞癌中的报道: Rab8a在子宫内膜癌及肝细胞癌中均表达上调,提示其可能为一个新的有效肿瘤标志物^[10-11]。而关于其在结直肠癌中的表达情况及相关生物学功能目前尚不清楚。

本研究通过一系列分子生物学技术及体外功能实验明确Rab8a在结直肠癌中的表达情况及生物学功能,并对其相关分子机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 GEPIA 数据库分析

GEPIA(gene expression profiling interactive analysis)是一个将TCGA(the cancer genome atlas)癌症大数据与GTEx(the genotype tissue expression)正常组织大数据整合在一起的数据库。使用已设标准分析来自这两个数据库中肿瘤和正常组织样本中相关基因表达数据。本研究中我们利用GEPIA分析了Rab8a在一些临床常见恶性肿瘤及其相应正常组织中的表达情况,并进一步分析了其表达与结直肠癌

患者总体生存率间的关系。

1.2 组织样本收集及细胞培养

收集新乡医学院第三附属医院2010年1月至2020年12月手术切除的180例有完整临床资料信息的结、直肠癌,癌旁正常组织样本和新鲜配对结直肠癌和癌旁正常黏膜组织样本36例。所有样本均被2位以上有经验的病理医师确诊其为结、直肠腺癌样本。患者术前均未接受过放疗、化疗或免疫治疗。组织样本的使用已经过患者知情同意并通过了医院的伦理委员会审批(K2022-009-01)。

实验所用6株结直肠癌细胞SW480、SW620、DLD-1、HCT116、RKO、LOVO和1株正常结肠上皮细胞NCM460为实验室储备细胞株。利用DMEM或RPMI 1640培养基加1%双抗(青霉素+链霉素)和10% FBS,在37 °C、5% CO₂细胞培养箱内常规培养细胞。

1.3 细胞转染及TOP/FOP-Flash报告基因实验

首先将结直肠癌细胞接种于6孔板中,常规培养至70%融合度时,更换为Opti-MEM培养基。利用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen公司)分别转染Rab8a过表达、干扰及其相应空载质粒(PPL质粒与蛋白共享库)至相应细胞中,继续培养6 h后换常规培养基培养。

接种SW480及RKO细胞于24孔板中,常规培养至60%融合度时,换Opti-MEM培养基;利用Lipofectamine 2000分别转染PRL-SV40、TOP-Flash、FOP-Flash、Rab8a过表达及空载质粒至相应细胞株中,细胞培养箱内培养6 h后换常规培养基继续培养24 h; 24 h后去培养基, PBS清洗后裂解细胞并按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司)要求检测并记录加入LARII及1× Stop&Glo Reagent

后的相应荧光素酶光子值,并以TOP/FOP的值分析Wnt/ β -catenin信号通路活性变化情况。

1.4 RNA提取与实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)

RNA提取主要试剂TRIzol购自Invitrogen公司,用于从新鲜组织和培养细胞中提取总RNA进行逆转录。利用TaKaRa公司的逆转录试剂盒并参照其说明书将RNA逆转录为cDNA,所得cDNA于 -20°C 贮存备用。qPCR按照SYBR Green试剂说明书进行。每个样本设3个复孔。qPCR反应结果利用公式 $\text{Folds}=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。qPCR反应引物5'→3'序列如下: GAPDH(F: ACA GTC AGC CGC ATC TTC TT; R: GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG), Rab8a(F: ACG CCT TCA ACT CCA CTT; R: ACC AGC ATG ATG CCC ATT)。

1.5 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色

石蜡包埋组织标本以3~4 μm 切片, 60°C 烤箱烘烤2 h后取出,并将其置于 4°C 冰箱保存备用。SP-9000试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,相关操作步骤参照试剂说明书。多克隆兔抗Rab8a一抗(1:100)为Proteintech公司产品, 4°C 孵育过夜。PBS代替一抗作阴性对照。DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒和柠檬酸钠抗原修复液为上海碧云天生物技术有限公司产品。切片DAB显色后苏木素复染,梯度乙醇、二甲苯脱水,中性树胶封片。最后由2名病理医师采用免疫反应积分法(immunoreactive score, IRS)分析结果^[12]。染色强度(staining intensity, SI)计分:无着色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;阳性细胞百分比(percentage of positive cell, PP)计分:5%以下为0分,5%~25%为1分,25%~50%为2分,50%~75%为3分,75%以上为4分。将染色强度和着色比例分值相乘,乘积大于3分时记为高表达,小于等于3分记为低表达。

1.6 Western blot检测

收集相应细胞,利用 $1\times$ sample buffer裂解液充分抽吸裂解细胞,BCA法蛋白定量后加 β 巯基乙醇/溴酚蓝, 98°C 水浴锅中煮10 min,冰上冷却后 -20°C 保存备用。配制SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白后转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封膜后一抗(多克隆兔抗Rab8a、Vimentin、E-Ca及单克隆鼠抗GAPDH均为Proteintech公司产品,1:500) 4°C 孵育过夜。次日,

HRP标记羊抗兔或抗鼠二抗(Proteintech公司产品,1:1 000)室温孵育1 h后曝光显影。

1.7 体外功能试验

1.7.1 CCK-8检测 将转染后的各组结直肠癌细胞计数后接种于96孔板中(2×10^3 个/孔), 37°C 、5% CO_2 培养。分别培养24 h、48 h和72 h后利用CCK-8检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司产品)检测细胞增殖能力。检测前2 h换培养基(100 μL /孔)并加入CCK-8试剂(10 μL /孔)。2 h后检测其在450 nm波长处的D值并记录。每组设3个复孔,最终数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验。

1.7.2 平板克隆形成实验 将转染后的各组结直肠癌细胞计数后接种于6孔板中(200个/孔),将6孔板置于 37°C 细胞培养箱中培养2周,利用4%多聚甲醛固定细胞30 min,结晶紫染色后观察、计数并摄影留存。每个克隆内细胞数大于50个的纳入计数范围。每一组设置3个复孔,最终数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

1.7.3 Transwell实验 实验前首先将Transwell小室放入洁净的24孔板内,在Transwell小室聚碳酸微孔膜(孔径为8 μm)的上方加入适量无血清的培养基水化聚碳酸微孔膜。胰蛋白酶消化处理转染后的各组结直肠癌细胞并制成单细胞悬液(1×10^5 个/mL),弃去Transwell小室上室内的无血清培养基,每孔内加入细胞悬液200 μL ,再在Transwell小室下室内加入300 μL 含20%胎牛血清的完全培养基。将24孔板放入 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养。36 h后取出小室,PBS清洗、4%多聚甲醛室温固定30 min,结晶紫染色后光镜观察计数。

1.7.4 划痕愈合实验 将转染后的各组结直肠癌细胞接种于6孔板中, 37°C 、5% CO_2 培养。待细胞生长融合至6孔板底部面积的80%以上时用枪头沿着直尺在细胞上划直线,PBS清洗后加入无血清培养基,然后将6孔板放在倒置显微镜下拍照,并记录拍照位置。以后每隔12 h在相同位置拍照记录划痕内细胞的迁移情况。

1.8 统计学分析

利用Windows SPSS 20.0软件对实验数据进行统计学分析。计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间差异采用 t 检验或单因素方差分析;Rab8a表达水平与结直肠癌各临床病理参数间的关系利用卡

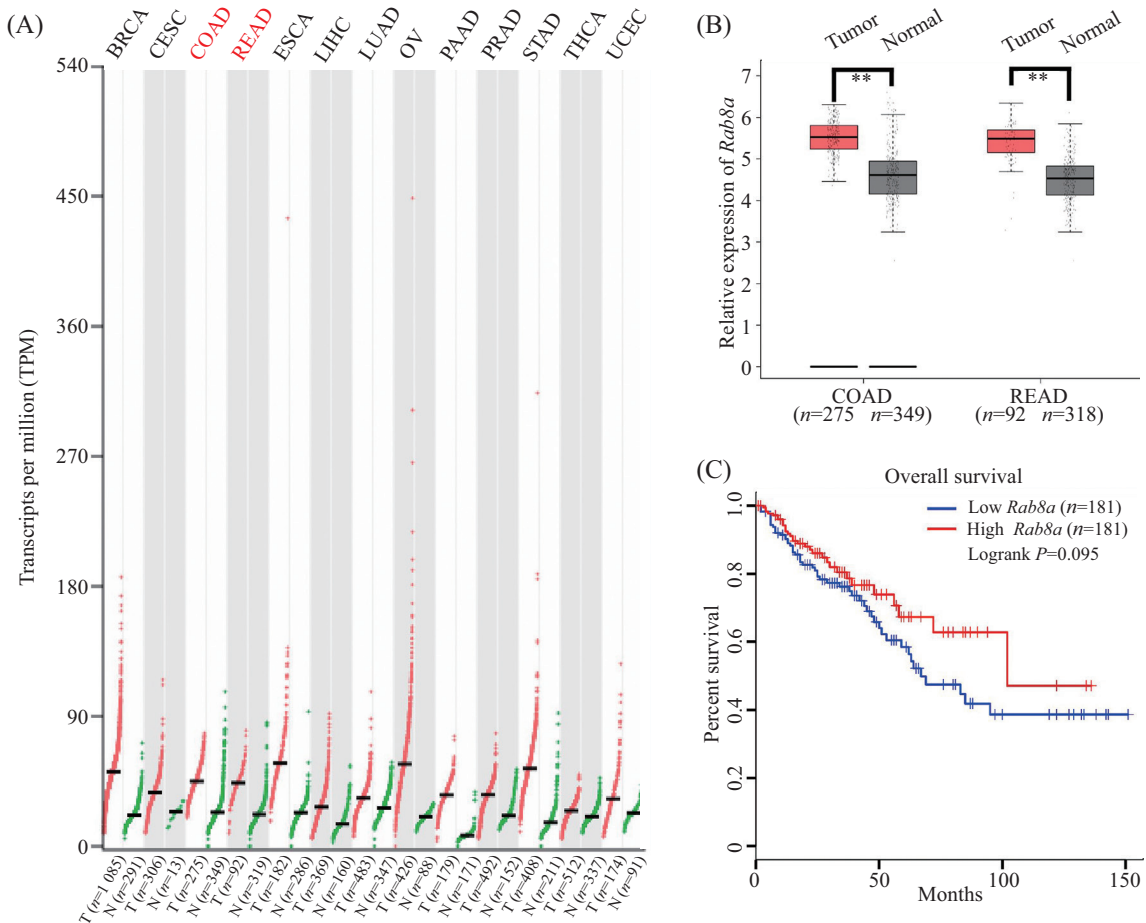
方检验处理分析。 $P < 0.05$ ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) 具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rab8a在结直肠癌中表达上调

GEPIA分析结果显示, *Rab8a*在包括结、直肠癌在内的多种临床常见恶性肿瘤组织中表达明显上调(图1A和图1B)。但其表达水平与患者总体生存率间并无显著相关性($P > 0.05$, 图1C)。接下来我们利用qPCR技术检测了*Rab8a* mRNA在36例新鲜结直肠癌及其配对癌旁正常组织中的表达情况, 结果显示: *Rab8a* mRNA在83.3%(30/36)的肿瘤组织中表

达高于相应正常组织中的表达, 其中差异在2倍以上者占75.0%(27/36)(图2A)。为了进一步明确*Rab8a*蛋白在结直肠癌组织中的表达情况, 我们又运用IHC技术检测了其在180例结直肠癌和其配对癌旁正常石蜡组织样本中的表达情况。研究表明, *Rab8a*蛋白阳性着色主要定位在细胞质, IRS半定量分析结果显示: *Rab8a*蛋白在肿瘤组织中的表达高于癌旁正常组织中的表达, 且其表达与肿瘤分化程度和浸润深度有关(图2B、图2C和表1)。同时, 我们利用qPCR及Western blot技术检测了*Rab8a* mRNA和蛋白在6株结直肠癌细胞及1株正常结肠上皮细胞中的表达情况, 发现其在结直肠癌细胞中的表达要高于正常结



A: 多种肿瘤中*Rab8a*的表达情况(BRCA: 乳腺浸润性癌; CESC: 宫颈鳞状细胞癌和宫颈腺癌; COAD: 结肠腺癌; READ: 直肠腺癌; ESCA: 食管癌; LIHC: 肝细胞癌; LUAD: 肺腺癌; OV: 卵巢浆液性囊腺癌; PAAD: 胰腺腺癌; PRAD: 前列腺腺癌; STAD: 胃腺癌; THCA: 甲状腺癌; UCEC: 子宫内膜癌); B: 结、直肠癌中*Rab8a*的表达情况(箱线图, $**P < 0.01$)。C: *Rab8a*表达与结直肠癌患者总体生存率间的关系。

A: expression of *Rab8a* in some malignant tumors (BRCA: breast invasive carcinoma; CESC: cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; COAD: colon adenocarcinoma; READ: rectum adenocarcinoma; ESCA: esophageal carcinoma; LIHC: liver hepatocellular carcinoma; LUAD: lung adenocarcinoma; OV: ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD: pancreatic adenocarcinoma; PRAD: prostate adenocarcinoma; STAD: stomach adenocarcinoma; THCA: thyroid carcinoma; UCEC: uterine corpus endometrial carcinoma); B: expression of *Rab8a* in colon and rectum adenocarcinoma (boxplots, $**P < 0.01$). C: relationship between *Rab8a* expression and the overall survival of CRC patients.

图1 GEPIA分析*Rab8a*的表达情况

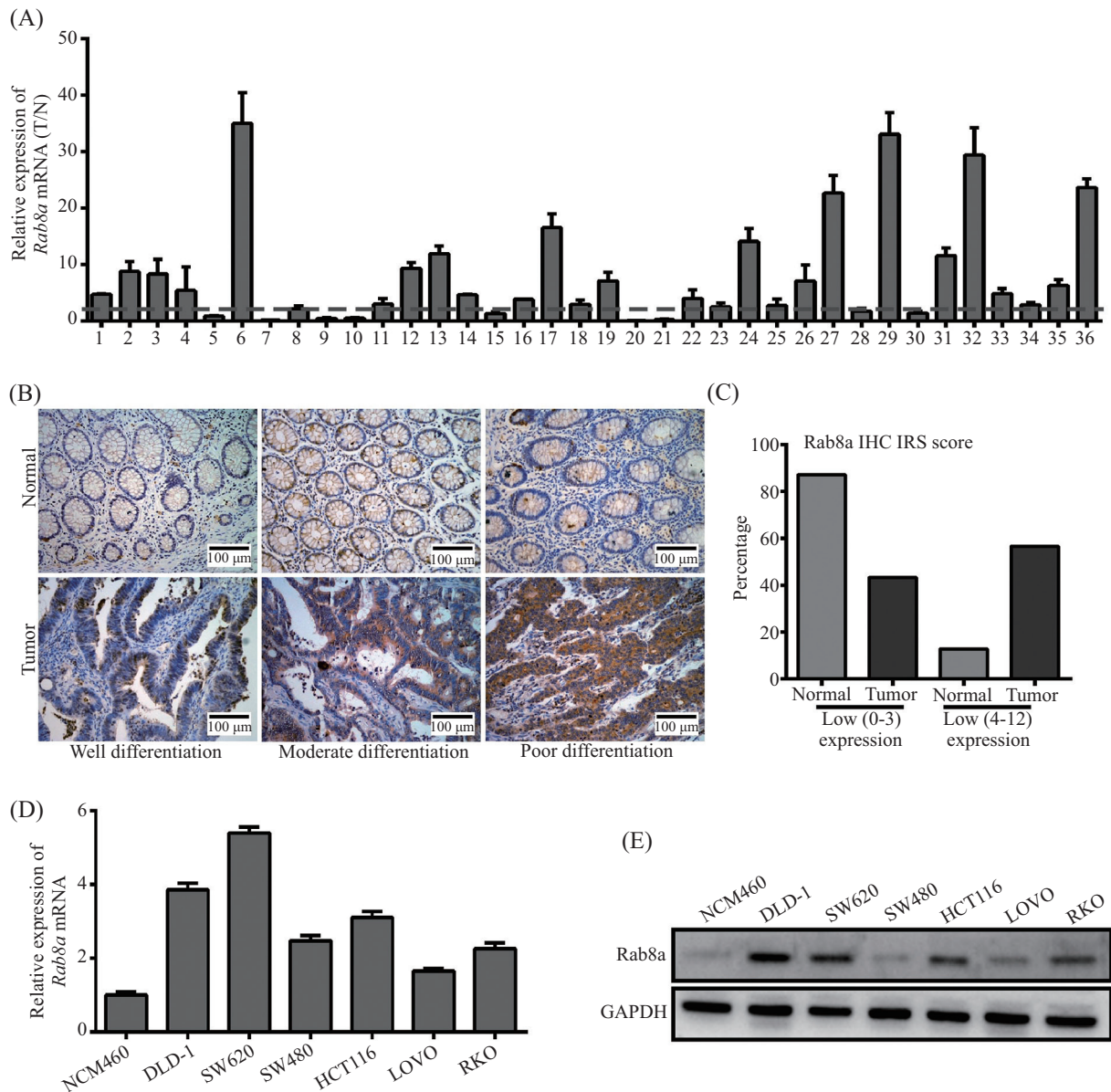
Fig.1 *Rab8a* expression in GEPIA

肠上皮细胞中的表达(图2D和图2E)。以上研究结果表明, Rab8a在结直肠癌中高表达, 且可以影响其相关恶性生物学行为。

2.2 过表达Rab8a增强结直肠癌细胞的体外增殖、迁移能力

为了明确Rab8a在结直肠癌增殖、迁移中的作用, 我们利用内源性表达水平较低的SW480和RKO构建过表达Rab8a的结直肠癌细胞株, 并将其分别

命名为SW480-Rab8a和RKO-Rab8a, 其相应对照空载体细胞株被命名为SW480-Vector和RKO-Vector(图3A和图3B)。利用以上细胞株进行体外功能实验: CCK-8及平板克隆形成实验结果显示, Rab8a的过表达可以促进结直肠癌细胞的体外增殖能力; Transwell及划痕愈合实验结果显示, 过表达Rab8a后, 结直肠癌细胞的体外迁移能力较对照组细胞明显增强(图3C~图3K)。



A: qPCR检测36例新鲜结直肠癌(T)及其配对癌旁正常(N)组织中Rab8a mRNA的表达情况($2^{-\Delta\Delta Ct}$, T/N, 虚线代表差异2倍处)。B、C: IHC检测180例结直肠癌及其癌旁正常石蜡包埋组织中Rab8a蛋白的表达情况。D: qPCR检测Rab8a mRNA在6株结直肠癌细胞及1株正常结肠上皮细胞中的表达情况。E: Western blot技术检测Rab8a蛋白在6株结直肠癌细胞及1株正常结肠上皮细胞中的表达情况。

A: qPCR of Rab8a in 36 cases of fresh human CRC and normal tissues ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, T/N, dotted line represents two-fold difference). B,C: IHC of Rab8a in CRC and normal tissues. D: qPCR of Rab8a in FHC and CRC cells. E: Western blot of Rab8a in NCM460 and CRC cells.

图2 结直肠癌中Rab8a的表达

Fig.2 Expression of Rab8a in colorectal cancer

表1 Rab8a蛋白的表达水平与结直肠癌各临床病理参数间的关系

病理参数 Characteristics	Rab8a低表达 Low expression of Rab8a	Rab8a高表达 High expression of Rab8a	χ^2 value	<i>P</i> value
Age				
<60	34	35	1.609	0.205
≥60	44	67		
Gender				
Male	45	53	0.585	0.444
Female	33	49		
Differentiation				
Well	50	43	8.548	0.014
moderate	19	39		
Poor	9	20		
T classification				
T1	8	3	9.854	0.020
T2	24	18		
T3	21	39		
T4	25	42		
N classification				
No	65	77	1.633	0.201
Yes	13	25		

2.3 干扰Rab8a表达抑制结直肠癌细胞的体外增殖、迁移能力

为了进一步明确 Rab8a 在结直肠癌细胞增殖、迁移中的生物学功能, 我们利用内源性表达水平较高的 HCT116 和 SW620 构建了干扰 Rab8a 表达的结直肠癌细胞株 HCT116-shRab8a1、HCT116-shRab8a2 和 SW620-shRab8a1、SW620-shRab8a2, 其相应对照空载细胞株被命名为 HCT116-Control 和 SW620-Control (图 4A 和图 4B)。分别利用以上细胞株进行 CCK-8、平板克隆形成实验、Transwell 及划痕愈合实验, 结果显示, 干扰 Rab8a 的表达后, HCT116 及 SW620 细胞的体外增殖及迁移能力均较其对照组细胞明显降低 (图 4C~图 4K)。以上研究结果表明, Rab8a 在结直肠癌细胞的增殖、迁移过程中发挥重要作用。

2.4 Rab8a 诱导结直肠癌细胞发生 EMT

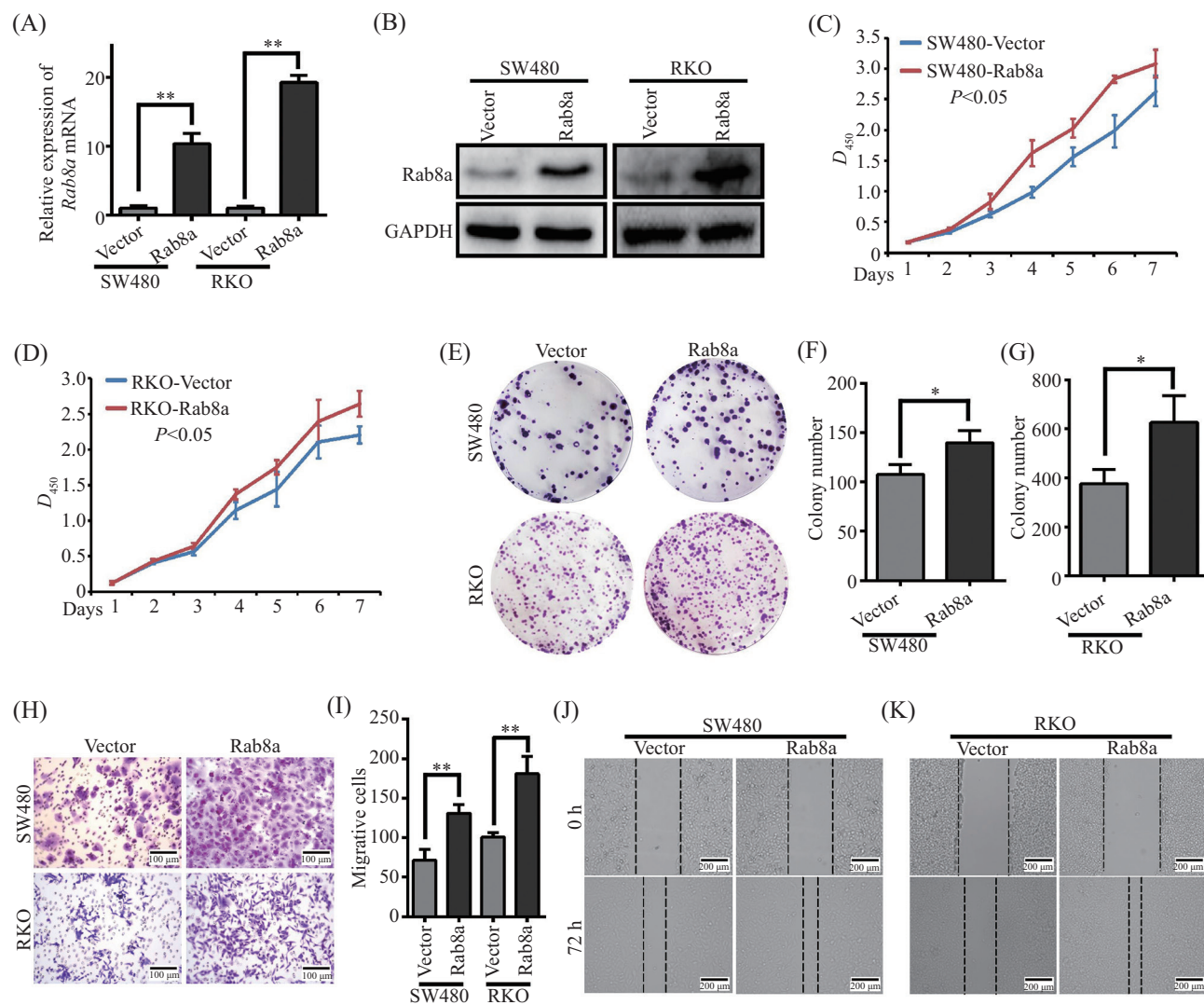
研究过程中我们发现过表达了 Rab8a 的结直肠癌细胞较其对照组细胞呈现更为明显的成纤维细胞样改变 (图 5A)。因此我们推测 Rab8a 的过表达可能诱导了结直肠细胞的 EMT。Western blot 实验结果显示, 过表达 Rab8a 后, EMT 的主要分子标志物 E-Ca 表达下调, Vimentin 表达上调; 干扰 Rab8a 后 E-Ca 表达水平升高, Vimentin 表达水平降低 (图 5B)。这说明 Rab8a 可以诱导结直肠癌细胞 EMT 的发生。TOP/FOP 荧光

素酶实验结果显示: 结直肠癌细胞中过表达 Rab8a 后 Wnt/ β -catenin 信号通路活性显著升高 (图 5C)。

3 讨论

Ras 相关蛋白 Rab 是 Ras 超家族 G 单体蛋白成员, 也是细胞内囊泡转运的关键调控因子。Rab8 是 Rab 分子开关小 GTPase 家族成员, 以多种方式调控细胞运输, 包括上皮细胞的顶端膜形态发生和纤毛发生, 以促进细胞迁移、细胞极化和细胞内信号转导等过程^[13]。Rab8 有 Rab8a 和 Rab8b 两个亚型, 二者具有 83% 的同源性序列, 而有关其表达、功能的重叠或差异情况目前尚不清楚^[14-15]。课题组前期研究发现, 在结直肠癌中可能存在着 Rab8a 的异常表达^[16]。Rab8a 位于 19 号染色体短臂 1 区 3 带 1 亚带 1 次亚带 (19p13.11), 是一个蛋白编码基因。

有关 Rab8a 在恶性肿瘤中的研究较少, 目前仅见其在子宫内膜癌及肝细胞癌中高表达的研究报道。BIE 等^[10]利用液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 技术对经子宫内膜癌细胞裂解物处理后的树突状细胞和未经处理的树突状细胞进行蛋白质组学分析发现了差异表达蛋白 Rab8a, 并进一步通过 Western blot 技术证实了 Rab8a 在子宫内膜癌组织中的表达要明显高于正常子宫内膜。LIU 等^[11]利用肝细胞



A、B: 过表达Rab8a结直肠癌细胞株的建立。C、D: CCK-8实验检测过表达Rab8a对结直肠癌细胞体外增殖能力的影响。E~G: 平板克隆形成实验检测过表达Rab8a对结直肠癌细胞体外增殖能力的影响。H、I: Transwell实验检测过表达Rab8a对结直肠癌细胞体外迁移能力的影响。J、K: 划痕愈合实验检测过表达Rab8a对结直肠癌细胞体外迁移能力的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A,B: confirmation of construction of CRC cells with Rab8a overexpression. C,D: proliferative ability of the indicated cells detected by CCK-8 assays. E-G: proliferative ability of the indicated cells detected by colony formation assays. E,G: migrated ability of the indicated cells detected by Transwell assays. J,K: migrated ability of the indicated cells detected by wound healing assays. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

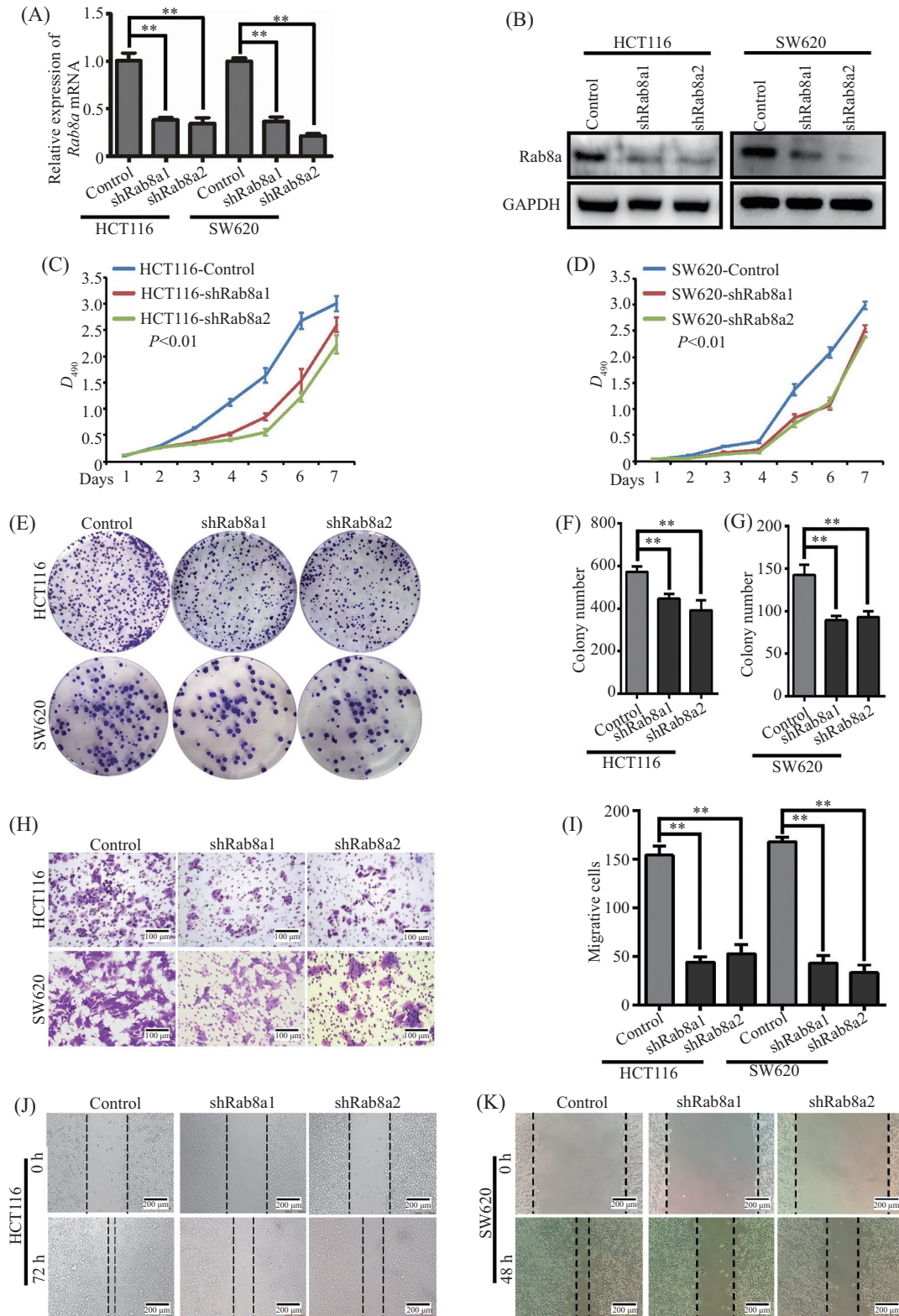
图3 过表达Rab8a促进结直肠癌细胞的体外增殖和迁移

Fig.3 Overexpression of Rab8a promoted the *in vitro* proliferation and migration of CRC cells

癌小鼠模型研究发现, BET蛋白抑制JQ1可以通过增强Rab8a的表达而上调癌细胞膜上PD-L1的表达, 从而使其有效逃避机体免疫监控。因此, Rab8a有可能成为一个肿瘤诊断、治疗和预后判断的特异性新靶标。而关于Rab8a在结直肠癌中的表达及相关生物学功能目前尚不清楚。

本研究中, 我们首先利用GEPIA分析了Rab8a在多种临床常见恶性肿瘤中的表达情况, 发现其在包括结、直肠癌在内的多种肿瘤组织中表达均明显上调。该分析结果与前期其在子宫内膜癌及肝细胞癌中的

报道一致^[10-11]。这为我们接下来展开的其在结直肠癌中的研究奠定了一定的基础。接下来的qRCR、Western blot及IHC结果进一步证实了Rab8a在人结直肠癌组织及细胞中高表达。IHC结果分析也进一步说明了Rab8a在结直肠分化和浸润中发挥重要作用。肿瘤的演进是指在恶性肿瘤的生长过程中其侵袭性变得越来越强的现象, 包括肿瘤细胞生长速度的加快、向周围组织浸润等^[17]。因此, 肿瘤的增殖和迁移是肿瘤演进过程中的重要生物学行为^[18]。为了进一步验证以上结论, 我们又开展了一系列的体外功能实验, 结果

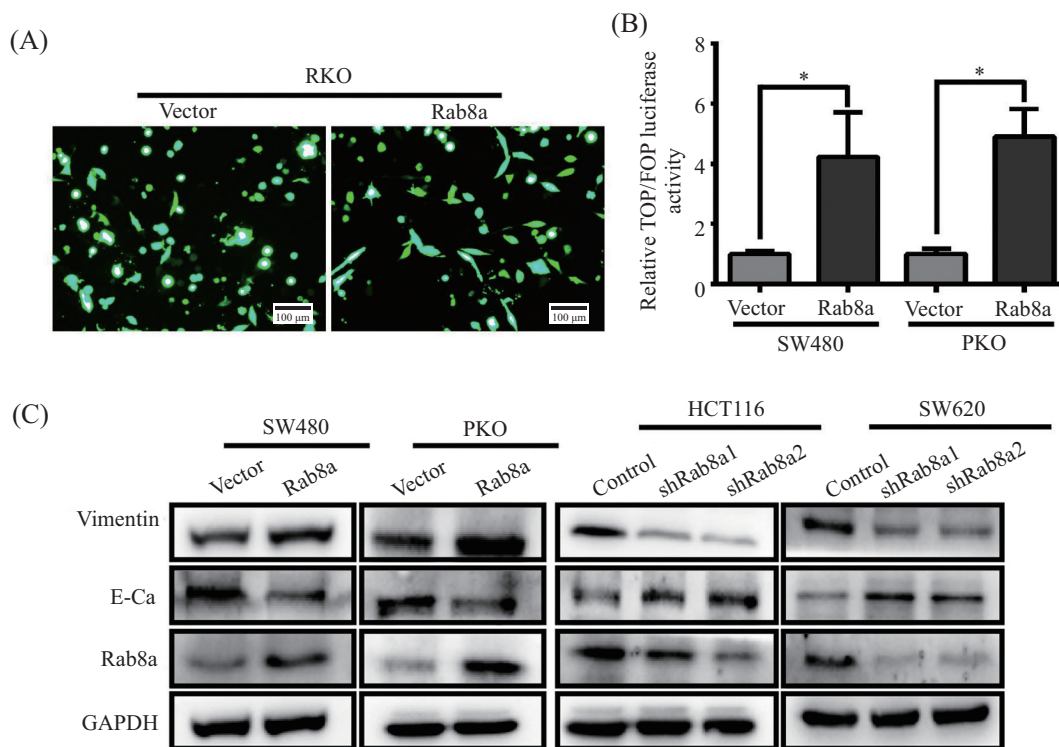


A、B: 干扰Rab8a结直肠癌细胞株的建立。C、D: CCK-8实验检测干扰Rab8a表达对结直肠癌细胞体外增殖能力的影响。P < 0.01, 与Control组比较; E~G: 平板克隆形成实验检测干扰Rab8a表达对结直肠癌细胞体外增殖能力的影响。H、I: Transwell实验检测干扰Rab8a表达对结直肠癌细胞体外迁移能力的影响。J、K: 划痕愈合实验检测干扰Rab8a表达对结直肠癌细胞体外迁移能力的影响。*P < 0.05, **P < 0.01。

A,B: confirmation of construction of CRC cells with knockdown expression of Rab8a. C,D: proliferative ability of the indicated cells detected by CCK-8 assays. P < 0.01 compared with Control group; E-G: proliferative ability of the indicated cells detected by colony formation assays. H,I: migrated ability of the indicated cells detected by Transwell assays. J,K: migrated ability of the indicated cells detected by wound healing assays. *P < 0.05, **P < 0.01.

图4 干扰Rab8a表达抑制结直肠癌细胞的体外增殖和迁移

Fig.4 Downregulation of Rab8a repressed the proliferation and migration of CRC cells



A: 荧光显微镜观察转染24 h后RKO-Vector和RKO-Rab8a细胞形态学表现。B: TOP/FOP荧光素酶实验检测过表达Rab8a后对Wnt/ β -catenin信号通路活性的影响。* $P < 0.05$ 。C: Western blot检测过表达及干扰Rab8a后EMT的主要分子标志物E-Ca和Vimentin的表达情况。

A: morphology manifestations of RKO-Vector and RKO-Rab8a cells under fluorescence microscopy after 24 h transfection. B: activity of Wnt/ β -catenin pathway in Rab8a over-expressed cells by TOP/FOP luciferase assay. * $P < 0.05$. C: expression of E-Ca and Vimentin in Rab8a over-expressed cells by Western blot.

图5 Rab8a诱导结直肠癌细胞发生EMT

Fig.5 Rab8a induced the EMT of CRC cells

显示, Rab8a的过表达可以明显促进结直肠癌细胞的增殖和迁移, 而干扰其表达可以显著抑制结直肠癌细胞的增殖和迁移。同时, 在研究过程中发现过表达Rab8a的结直肠癌细胞较其对照组细胞呈现出了更为明显的成纤维细胞样改变。Western blot实验结果证实过表达Rab8a后, 肿瘤细胞上皮标志物E-Ca表达下调, 而间质分子标志物Vimentin的表达上调, 说明Rab8a的过表达可以诱导结直肠细胞发生EMT。已知EMT可以改变癌细胞间的黏附, 与肿瘤的演进等恶性生物学行为密切相关^[19-21]。因此阐明调控结直肠癌细胞发生EMT的分子机制, 明确EMT在结直肠癌演进中的病理意义, 探索基于EMT关键分子的诊断及靶向EMT关键分子的治疗手段是结直肠癌研究的关键问题, 具有重要研究价值。

已有文献报道显示, 在小鼠中敲除Rab8a基因可以显著降低Wnt/ β -catenin信号通路的活性, 而已知Wnt/ β -catenin信号通路的激活与结直肠癌细胞的EMT密切相关^[22-23]。因此, 我们猜想结直肠癌中Rab8a的表达是否也是通过影响Wnt/ β -catenin信号通

路活性实现的呢? 为了验证这一猜想, 我们接下来利用TOP/FOP双荧光素酶实验检测了过表达Rab8a后SW480及RKO细胞中Wnt/ β -catenin信号通路活性的变化, 结果显示, 结直肠癌细胞中Rab8a的过表达可以明显提升Wnt/ β -catenin信号通路活性。这说明结直肠癌中Rab8a对结直肠癌细胞EMT的诱导作用可能也是通过激活Wnt/ β -catenin信号通路实现的。

综上, 本研究证实了Rab8a在结直肠癌中表达上调, 并可能通过诱导癌细胞发生EMT促进其增殖和迁移。该研究为结直肠癌的临床诊断和治疗新靶标的筛选提供了一定的理论基础。

参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [2] CAO M, LI H, SUN D, et al. Cancer burden of major cancers in China: a need for sustainable actions [J]. Cancer Commun, 2020, 40(5): 205-10.
- [3] WANG Z Q, ZHANG L, GUO W B, et al. Burden of colorectal cancer attributable to diet low in milk in China, 1990-2017: findings from the global burden of disease study 2017 [J]. J Hum

- Nutr Diet, 2021, 34(1): 233-42.
- [4] PIAWAH S, VENOOK A P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: a review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer [J]. *Cancer*, 2019, 125(23): 4139-47.
- [5] ZHANG Y Y, CHEN S W, WANG P Y, et al. Research progress of conversion therapy in colorectal cancer liver metastases [J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2021, 24(1): 85-93.
- [6] BAE J W, KIM S H, KIM D H, et al. Ras-related proteins (Rab) are key proteins related to male fertility following a unique activation mechanism [J]. *Reprod Biol*, 2019, 19(4): 356-62.
- [7] PILAR R R, MARIA R L, JESUS M P, et al. The G2019S variant of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) alters endolysosomal trafficking by impairing the function of the GTPase Rab8a [J]. *Biol Chem*, 2019, 294(13): 4738-58.
- [8] SHIBATA S, TESHIMA Y, NIIMI K, et al. Involvement of ARHGEF10, GEF for RhoA, in Rab6/Rab8-mediating membrane traffic [J]. *Small GTPases*, 2019, 10(3): 169-77.
- [9] WELZ T, KERKHOFF E. Exploring the iceberg: prospects of coordinated myosin V and actin assembly functions in transport processes [J]. *Small GTPases*, 2019, 10(2): 111-21.
- [10] BIE Y C, ZHANG Z Y. Rab8a a new biomarker for endometrial cancer [J]? *World J Surg Oncol*, 2014, 12(1): 371-5.
- [11] LIU C, MIAO X L, WANG Y, et al. Bromo-and extraterminal domain protein inhibition improves immunotherapy efficacy in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(10): 3503-15.
- [12] ZHANG L, ZHANG S, YAO J, et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth [J]. *Nature*, 2015, 527(7576): 100-4.
- [13] HATTULA K, FURUHJELM J, ARFFMAN A, et al. A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(9): 3268-80.
- [14] PERANEN J. Rab8 GTPase as a regulator of cell shape [J]. *Cytoskeleton*, 2011, 68(10): 527-39.
- [15] SAMUELI J T, ADAM A W, YU H, et al. Guanine nucleotide exchange factors activate Rab8a for Toll-like receptor signaling [J]. *Small GTPases*, 2021, 12(1): 27-43.
- [16] WANG Y X, LI Y Z, ZHOU H, et al. Syntaxin 2 promotes colorectal cancer growth by increasing the secretion of exosomes [J]. *J Cancer*, 2021, 12(7): 2050-8.
- [17] 步宏, 李一雷. 病理学, 第9版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 103-4.
- [18] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-74.
- [19] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(3): 212-26.
- [20] BRABELTZ T, KALLURI R, NIETO M A, et al. EMT in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2): 128-34.
- [21] THIERY J P. EMT: an update [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2179: 35-9.
- [22] DAS S, YU S, SAKAMORI R, et al. Rab8a vesicles regulate Wnt ligand delivery and Paneth cell maturation at the intestinal stem cell niche [J]. *Development*, 2015, 142(12): 2147-62.
- [23] JI Y, LÜ J, SUN D, et al. Therapeutic strategies targeting Wnt/ β -catenin signaling for colorectal cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(1): 1-17.