

RAB26通过激活 β -catenin信号促进鼻咽癌细胞增殖

陈柳洁¹ 陈俊^{1,2} 谭凤华^{1,2} 李佳^{1,2} 段丽丽^{1,2} 胡政^{1,2*}

(¹南华大学衡阳医学院, 郴州市第一人民医院, 南华大学转化医学研究所, 郴州 423000;

²湘南学院第一临床学院, 湘南学院附属郴州市第一人民医院, 转化医学研究所, 郴州 423000)

摘要 该文探讨了RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响及其机制。采用实时荧光定量PCR和免疫组织化学实验检测鼻咽癌组织及正常鼻咽上皮组织RAB26 mRNA和蛋白表达水平, 并将免疫组织化学方法检测的RAB26表达水平与患者临床病理特征进行统计分析。在鼻咽癌CNE-2细胞过表达RAB26、在HNE1细胞敲降RAB26, 分别建立过表达以及敲降细胞系。利用CCK-8增殖实验、细胞克隆形成实验及EdU增殖实验检测过表达和敲降RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响; Western blot检测过表达和敲降RAB26的鼻咽癌细胞RAB26, Wnt/ β -catenin信号中的 β -catenin、cyclin D1、c-Myc、survivin的蛋白水平及MAPK/ERK信号中的p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK/ERK的蛋白水平。细胞克隆形成实验检测CNE-2过表达RAB26细胞经不同照射剂量(0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy及8 Gy) X射线照射后的细胞活力。结果显示, RAB26在鼻咽癌中高表达; RAB26在鼻咽癌中的表达水平与肿瘤类型($r=0.294$, $P<0.05$)和转移/复发($r=0.290$, $P<0.05$)呈正相关; 过表达RAB26后, CNE-2鼻咽癌细胞增殖加快, β -catenin、cyclin D1、c-Myc、survivin蛋白表达水平增加, p-p38 MAPK、p-ERK蛋白表达水平明显增高; 敲低RAB26后则相反; 过表达RAB26会降低鼻咽癌细胞的放射敏感性。综上, RAB26在鼻咽癌中高表达, 并通过激活Wnt/ β -catenin信号通路和MAPK/ERK信号通路促进鼻咽癌细胞增殖。

关键词 RAB26; 鼻咽癌; β -catenin; MAPK/ERK; 细胞增殖

RAB26 Promotes Nasopharyngeal Carcinoma Cell Proliferation through Activation of β -catenin Signaling

CHEN Liujie¹, CHEN Jun^{1,2}, TAN Fenghua^{1,2}, LI Jia^{1,2}, DUAN Lili^{1,2}, HU Zheng^{1,2*}

(¹Translational Medicine Institute, the First People's Hospital of Chenzhou, Hengyang Medical School, University of South China, Chenzhou 423000, China; ²the First Clinical College of Xiangnan University, the First People's Hospital of Chenzhou Affiliated to Xiangnan University, Chenzhou 423000, China)

Abstract This study explored the effect of RAB26 on nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and its underlying mechanism. The RAB26 mRNA and protein expression levels in nasopharyngeal cancer tissues and normal nasopharyngeal epithelial tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and immunohistochemistry experiments, and statistical analyses of RAB26 expression levels evaluated by immunohistochemistry with the clinicopathological characteristics of patients. RAB26 was overexpressed in nasopharyngeal carcinoma cell lines. We established overexpression and knockdown cell lines in CNE-2 and HNE1 cells, respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay, cell clone formation assay, and EdU proliferation assay. Western blot detected RAB26, β -catenin, cyclin D1, c-Myc, survivin, p-p38 MAPK, and p-ERK protein levels in nasopharyngeal carcinoma cells overexpressing or knocking down RAB26. Cell clone formation assay detected the cell vitality of CNE-2 cells overexpressing RAB26 after different irradiation doses (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, and 8 Gy). The results showed that RAB26 was highly expressed in nasopharyngeal carcinoma; the expression level of RAB26 in nasopharyngeal carcinoma was positively correlated with tumor type ($r=0.294$, $P<0.05$) and metastasis/recurrence ($r=0.290$, $P<0.05$); after overexpression of RAB26, CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cell proliferation accelerated, β -catenin, cyclin D1, c-Myc, and survivin protein expression levels increased, p-p38 MAPK and p-ERK protein expression levels increased significantly; after knocking down RAB26, the opposite was observed; overexpression of RAB26 reduced the radio-sensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells. In conclusion, RAB26 was highly expressed in nasopharyngeal carcinoma and promoted nasopharyngeal carcinoma cell proliferation through activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and MAPK/ERK signaling pathway.

收稿日期: 2023-12-14

接受日期: 2024-02-19

湖南省自然科学基金(批准号: 2021JJ30050、2023JJ50368)、湖南省临床医疗技术创新引导项目(批准号: 2021SK50313)和湖南省卫健委研究项目(批准号: 202203102912)资助的课题

*通信作者。Tel: 18229336273, E-mail: hu48005@163.com

Received: December 14, 2023

Accepted: February 19, 2024

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (Grant No.2021JJ30050, 2023JJ50368), the Science and Technology Program of Hunan Province (Grant No.2021SK50313), and the Health Department Project of Hunan Province (Grant No.202203102912)

*Corresponding author. Tel: +86-18229336273, E-mail: hu48005@163.com

noma CNE-2 cells and knocked down in HNE1 cells, and overexpressed and knocked down cell lines were established respectively. The impact of RAB26 on the proliferation of the NPC cells was detected by CCK-8 proliferation assay, cell clone formation assay and EdU proliferation assay. Western blot assay was used to detect the protein expression levels of RAB26, β -catenin, cyclinD1, c-Myc and survivin in Wnt/ β -catenin signaling and p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-ERK/ERK in MAPK/ERK signaling in nasopharyngeal carcinoma cells with overexpression and knockdown of RAB26. The CNE-2 overexpressed RAB26 cell viability after X-ray irradiation with different irradiation doses (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy and 8 Gy) was detected in the cell clone formation assay. The results showed that RAB26 was highly expressed in nasopharyngeal carcinoma. The expression level of RAB26 in nasopharyngeal carcinoma was positively correlated with the tumor type ($r=0.294$, $P<0.05$) and metastasis/recurrence ($r=0.290$, $P<0.05$). After overexpression of RAB26, CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cells showed accelerated proliferation, increased expression of β -catenin, cyclin D1, c-Myc, and survivin proteins, and increased expression of p-p38 MAPK, p-ERK proteins, while the opposite was observed after knockdown of RAB26. Reduced radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by overexpression of RAB26. In conclusion, RAB26 showed high expression in nasopharyngeal carcinoma and promoted the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway and the MAPK/ERK signaling pathway.

Keywords RAB26; nasopharyngeal carcinoma; β -catenin; MAPK/ERK; cell proliferation

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种常见的头颈癌,多见于中国南部、东南亚和北非地区^[1]。近年来,鼻咽癌患者总体预后的显著改善主要归功于更精确的放疗技术^[2]。然而由于肿瘤的转移、复发及其耐药性,容易导致患者预后不良,治疗效果不佳^[3]。因此探寻鼻咽癌发生发展的分子机制,寻找有效的治疗靶点与标志物有着重要意义。

RAB26是Ras超家族的一员,是一种小分子GTP结合相关蛋白^[4]。Ras超家族共包含70多种家族成员^[5],其在大分子物质进入细胞的过程中发挥着重要的作用,并与许多疾病都有相关性^[6]。目前越来越多RAB蛋白,如RAB5、RAB8、RAB21都被证明具有影响肿瘤细胞生长增殖、侵袭转移及细胞凋亡的能力^[7]。早期研究发现,RAB26可调控淀粉酶的释放及分泌型囊泡的成熟与释放^[8],同时发现其在自噬的过程中也扮演着重要的角色^[9-10]。近些年的研究提示,RAB26在肿瘤细胞的凋亡、侵袭、转移的过程中也有一定的调控作用^[11],目前有关RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响及确切的分子机制研究尚不清楚,深入了解RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响及其调控机制,对鼻咽癌的精准治疗及今后小分子药物的发现都具有重要意义。

Wnt/ β -catenin信号通路,也称典型的Wnt信号通路,是一个保守的信号轴,参与多种生理过程,包括细胞增殖、分化、迁移、侵袭和维持组织稳态^[12-13]。研

究发现,Wnt/ β -catenin信号是控制鼻咽癌细胞增殖和迁移^[14]以及肿瘤进展^[15]的重要途径。Wnt/ β -catenin相关蛋白是鼻咽癌预后的重要生物标志物^[16]。Wnt/ β -catenin信号失活可抑制鼻咽癌细胞的侵袭和肿瘤发生^[17]。

目前关于鼻咽癌细胞中RAB26是否参与Wnt/ β -catenin通路的调控而影响其增殖能力的研究尚未报道。基于此,本研究主要检测鼻咽癌组织和正常鼻咽上皮组织中RAB26 mRNA和蛋白的表达情况,以及在鼻咽癌细胞中过表达或敲降RAB26对鼻咽癌细胞增殖和相关通路蛋白的影响。这将有助于深入研究RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响及分子机制,为临床选择RAB26为靶点防治鼻咽癌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人鼻咽癌细胞系HNE1、HNE2、CNE-2细胞,人胚肾HEK293T细胞和人鼻咽上皮细胞NP69细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 组织 鼻咽癌及正常鼻咽上皮组织样本来自南华大学转化医学研究所的临床样本库,经病理学确认,且被置于液氮保存。该研究符合《赫尔辛基宣言》道德标准,并获得郴州市第一人民医院伦理委员会批准[批准号为第(科研)2019028号],所有参与者均已签署书面知情同意书。

1.1.3 主要试剂 RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司;兔抗RAB26抗体购自美国Proteintech公司;山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术公司; β -catenin、c-Myc、cyclin D1抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;survivin、p-ERK/ERK、p-p38 MAPK/p38 MAPK、H3抗体及CCK-8试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; β -actin和GAPDH抗体购自美国Sigma公司;Lipofectamine 2000、反转录试剂、荧光定量PCR试剂购自美国Invitrogen公司;EdU试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;引物由北京睿博兴科生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞系HNE1、HNE2、CNE-2细胞,人胚肾HEK293T细胞及鼻咽上皮细胞NP69细胞均在含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640培养基中,并于37 °C、5% CO₂培养箱孵育,常规传代培养。

1.2.2 过表达RAB26细胞的构建 过表达质粒构建:设计扩增RAB26 CDS全长引物,以CNE-2细胞cDNA为模板,切胶回收,亚克隆入pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-T2A-Puro重组质粒中,质粒经过酶切和测序鉴定后用于后续实验。敲降质粒购自HonorGene公司,敲降质粒shRNA使用空载体为pHGLVsh。质粒pHG-LVsh-Rab26-sh1的引物为5'-CCG GCT GCA TGA TTA CGT TAA-3'^[18]。

将空载体/慢病毒载体与辅助质粒pSPAX2和pMD2.G一起转染到HEK293T细胞中,收集上清为对照病毒/慢病毒。慢病毒感染后,使用嘌呤霉素筛选得到稳定细胞克隆,经过DNA测序验证用于后续实验。

1.2.3 CCK-8细胞增殖实验 采用CCK-8细胞增殖检测试剂盒进行检测,取对数生长期的CNE-2/RAB26组、CNE-2/Vector组、HNE1/shRAB26组和HNE1/shSCR组细胞,以每孔100 μ L、2 000个细胞接种于96孔板中。在培养0、24、48和72 h时加入10 μ L CCK-8溶液。用酶标仪在波长为450 nm处检测细胞的吸光度(*D*)值,绘制增殖曲线,计算细胞增殖率。

1.2.4 EdU细胞增殖实验 采用EdU细胞增殖检测试剂盒进行检测,取对数生长期的CNE-2/RAB26组、CNE-2/Vector组、HNE1/shRAB26组和HNE1/shSCR组细胞,接种1 $\times$ 10⁵个细胞到96孔板每个孔中,进行

EdU标记后,去除培养液并加入4%多聚甲醛进行固定,室温孵育30 min。洗涤细胞后用渗透剂(含0.5% Triton X-100的PBS)通透细胞。之后使用Apollo进行染色,室温避光孵育30 min。洗涤细胞后使用Hoechst进行细胞核染色,室温避光孵育30 min,随后使用荧光显微镜进行荧光检测。

1.2.5 细胞克隆形成实验 取对数生长期的CNE-2/RAB26组、CNE-2/Vector组、HNE1/shRAB26组和HNE1/shSCR组细胞,1 500个/孔接种在6孔板上,放入37 °C、5% CO₂培养箱培养,培养细胞至合适密度,收取细胞克隆。使用PBS进行洗涤,然后在室温下用4%多聚甲醛固定15 min。接着用PBS洗涤3次,随后使用结晶紫溶液染色15 min,最后在显微镜下观察细胞,用Image-Pro Plus 6.0软件计数细胞克隆数。

1.2.6 实时荧光定量PCR 取鼻咽癌组织及正常鼻咽上皮组织,在冰上剪碎组织,使用TRIzol试剂按说明书提取总RNA并将其逆转录为cDNA。通过实时荧光定量PCR进行检测,反应条件为预变性95 °C/30 s,循环反应:变性95 °C/10 s,退火、延伸60 °C/30 s,40个循环,熔解曲线95 °C/15 s,60 °C/60 s,95 °C/15 s。引物序列:RAB26上游引物为5'-GTC TGC TGG TGC GAT TCA AG-3',下游引物为5'-GCA TGG GTA ACA CTG CGG A-3';GAPDH上游引物为5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3',下游引物为5'-TCC ACC CTG TTG CTG TA-3'。以GAPDH为内参,采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算组织中RAB26 mRNA的相对表达量。

1.2.7 免疫组织化学染色 鼻咽组织活检标本石蜡包埋、切片,使用松节油、不同浓度梯度的乙醇溶液进行脱蜡和水化,消除内源性过氧化物酶,进行抗原修复后,封闭非特异性抗原。洗涤后分别加入兔抗人RAB26抗体(1:200),4 °C孵育过夜,次日洗涤后加入山羊抗兔IgG抗体(1:1 000),37 °C孵育30 min,进行DAB显色,苏木精复染、脱水风干,封片后,显微镜下观察,拍照并进行评分。

RAB26的表达强度评分标准,根据表达强度分成四个等级:阴性表达,评为0分;表达很弱即淡黄色,评为1分;表达中等即棕黄色,评为2分;表达很强即棕褐色,评为3分。同时根据阳性染色细胞的比例分成五个等级:0分,无阳性细胞;1分,阳性细胞数 $\leq$ 25%;2分,阳性细胞数介于25%~50%;3分,阳性细胞数介于50%~75%;4分,阳性细胞数 $\geq$ 75%。每个样本的得分为表达强度与阳性比例的积分的乘积,

并归为三类: 阴性(0分)、阳性(1~6分)和强阳性(7~12分)。

1.2.8 Western blot实验 细胞经处理后提取蛋白, 使用BCA检测蛋白浓度并进行煮沸变性处理。接着进行电泳(恒压120 V), 然后进行转膜(100 V、90 min)和室温封闭1 h(5%脱脂牛奶)。随后进行一抗[RAB26(1:1 000)、H3(1:1 000)、 β -catenin(1:1 000)、ERK(1:1 000)、p-ERK(1:1 000)、p38-MAPK(1:1 000)、p-p38 MAPK(1:1 000)、cyclin D(1:1 000)、survivin(1:1 000)、c-Myc(1:1 000)、 β -actin(1:5 000)、GAPDH(1:5 000)] 4 °C孵育过夜, 使用 β -actin、GAPDH或H3作为内参。第二天进行膜洗涤, 然后进行二抗(1:4 000)室温孵育1 h。最后使用超敏发光显色液A、B液按1:1比例进行显色, 然后使用显影仪(FluorChem Q, 普诺森生物科技有限公司)获取条带图片。

1.2.9 检测经辐射照射后的细胞敏感性 取CNE-2/RAB26细胞, 2 000个/孔接种在6孔板上, 用6 MV的X射线(Synergy, 医科达医疗器械有限公司)照射不同剂

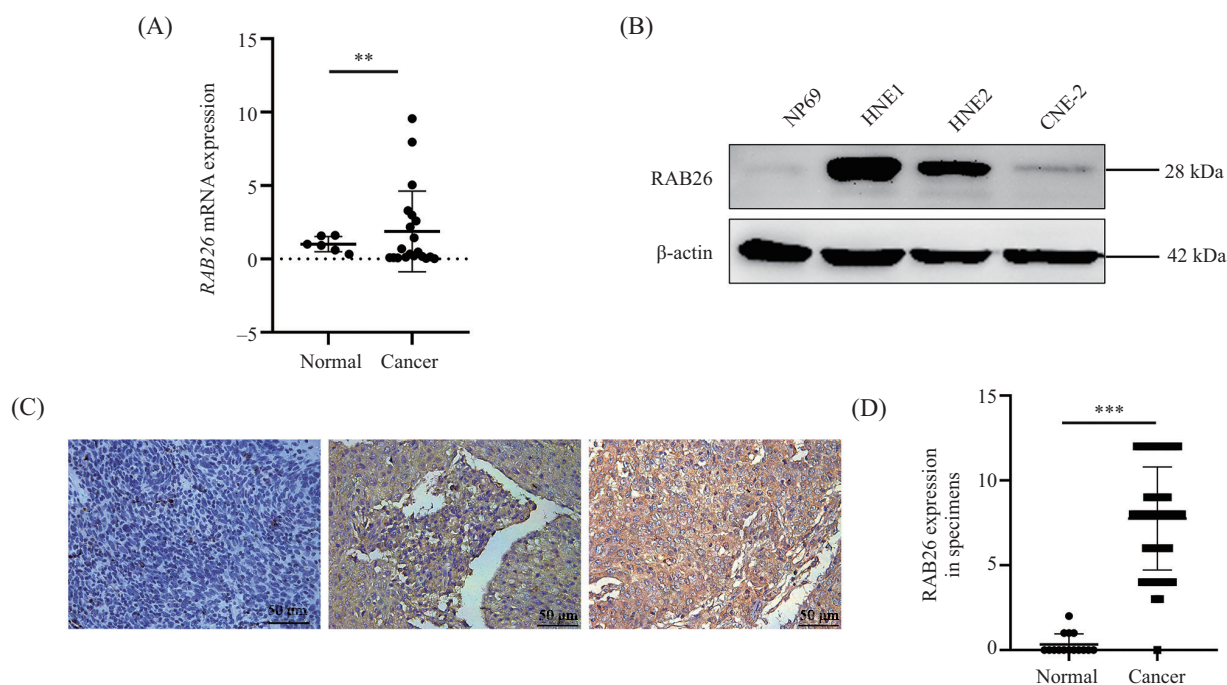
量(0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy及8 Gy)后, 放入37 °C、5% CO₂培养箱培养, 培养细胞至合适密度, 收取细胞克隆。存活分数(survival fraction, SF)=细胞克隆数_{n Gy}/细胞克隆数_{0 Gy}。

1.2.10 统计学分析 所有实验均重复3次, 数据使用SPSS 26.0软件进行统计分析, 对于符合正态分布的计量资料, 两样本的比较采用两独立样本 t 检验, 多组间的比较采用方差分析, 计数资料以百分率(%)表示, 计数资料组间差异采用 χ^2 检验或Fisher精确 χ^2 检验进行比较, 相关分析采用Spearman秩相关进行检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAB26在鼻咽癌中高表达

为了确定RAB26在鼻咽癌组织的表达情况, 我们收集了20例鼻咽癌和6例正常鼻咽上皮组织样本, 通过实时定量PCR检测发现, 鼻咽癌组织的RAB26 mRNA水平高于正常鼻咽上皮组织($P<0.01$)(图1A)。同时我们通过Western blot检测发现, RAB26蛋白在



A: 实时定量PCR检测鼻咽癌(20例)及正常鼻咽上皮(6例)组织RAB26 mRNA的相对表达量; B: Western blot法检测鼻咽癌细胞和正常鼻咽细胞RAB26蛋白水平; C: 免疫组织化学实验代表图(左图为阴性, 中间图为阳性, 右图为强阳性); D: 统计定量分析RAB26表达水平免疫组化评分。 $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: Real-time quantitative PCR to test the relatively expression of RAB26 mRNA in nasopharyngeal carcinoma ($n=20$) and normal nasopharyngeal epithelial ($n=6$) tissues; B: Western blot to test the protein level of RAB26 in nasopharyngeal carcinoma cells and normal nasopharyngeal cells; C: representative images of immunohistochemistry experiments (negative on the left, positive in the middle and strongly positive on the right); D: statistical quantitative analysis of immunohistochemistry scores for the expression level of RAB26. $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图1 RAB26在鼻咽癌中高表达

Fig.1 High expression of RAB26 in nasopharyngeal carcinoma

鼻咽癌细胞系(HNE1、HNE2及CNE-2)中的表达水平明显高于正常鼻咽上皮细胞(NP69)(图1B)。接着,我们将收集的70例鼻咽癌和15例正常鼻咽上皮组织切片进行了免疫组织化学分析,结果发现,鼻咽癌组织中RAB26蛋白的表达水平明显高于对照组($P<0.001$)(图1C和图1D)。在鼻咽癌组织中,RAB26阳性样本的比例为98.57%(69/70),而在正常鼻咽上皮组织中为26.67%(4/15)($P<0.001$)(表1)。以上结果均提示了RAB26在鼻咽癌中高表达。

2.2 RAB26表达水平与鼻咽癌患者临床病理特征的相关性

我们随后对70例鼻咽癌组织样本进行了分析,免疫组织化学结果显示,RAB26表达水平强阳性44例(评分为7~12分),阳性25例(评分为1~6分),阴性1例(评分为0分);我们对免疫组织化学方法评价的RAB26表达水平与患者年龄、性别、肿瘤类型(分

化/未分化)以及有无转移/复发等临床病理特征的相关性进行统计学分析(表2)。结果发现,未分化的鼻咽癌患者RAB26阳性频率显著高于分化的鼻咽癌患者($P<0.05$);有转移/复发的鼻咽癌患者RAB26阳性频率显著高于无转移/复发的鼻咽癌患者($P<0.05$)。此外,RAB26在鼻咽癌中的表达水平与肿瘤类型($r=0.294, P<0.05$)和转移/复发($r=0.290, P<0.05$)呈正相关。

2.3 RAB26过表达促进鼻咽癌CNE-2细胞增殖

为了进一步研究RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响,我们选用低表达RAB26的CNE-2细胞,利用慢病毒感染构建过表达RAB26的鼻咽癌细胞株CNE-2/RAB26和对照细胞CNE-2/Vector(图2A)。在CCK-8细胞增殖实验中,过表达RAB26促进鼻咽癌CNE-2细胞的增殖(图2B),通过细胞克隆形成实验发现,过表达RAB26的细胞克隆形成能力明显升高,

表1 RAB26在正常鼻咽上皮和鼻咽癌组织中的表达

Table 1 Expression of RAB26 in normal nasopharyngeal epithelium and nasopharyngeal carcinoma tissues

组别 Group	RAB26表达水平 RAB26 expression level		合计 Total	χ^2	P
	阳性 Positive	阴性 Negative			
Normal nasopharyngeal epithelial tissue	4 (26.67%)	11 (73.33%)	15		
Nasopharyngeal carcinoma tissue	69 (98.57%)	1 (1.43%)	70	46.913	<0.001
Sub-total	73	12	85		

表2 RAB26表达水平与鼻咽癌患者临床病理特征的相关性

Table 2 Correlation between RAB26 expression level and clinicopathological characteristics of nasopharyngeal carcinoma patients

临床特征 Clinical features	RAB26表达水平 RAB26 expression level			合计 Total	Fisher确切概率法 Fisher's exact tests		相关分析 Correlation analysis	
	强阳性 Strong positive	阳性 Positive	阴性 Negative		χ^2	P	r	P
Age/year								
>45	33	17	1	51	0.881	0.695	0.055	0.652
≤45	11	8	0	19				
Gender								
Male	35	17	1	53	1.616	0.534	0.108	0.374
Female	9	8	0	17				
Tumor type								
Undifferentiation	9	0	0	9	6.985	0.035	0.294	0.013
Differentiation	35	25	1	61				
Metastasis/recurrence								
Yes	23	6	0	29	5.868	0.024	0.290	0.015
No	21	19	1	41				
Sub-total	44	25	1	70				

克隆数目增加,说明RAB26可增强鼻咽癌CNE-2细胞的克隆形成能力(图2C和图2D)。同时,通过EdU实验发现,与对照组相比,过表达RAB26鼻咽癌细胞中EdU阳性细胞数增多,表现出明显的细胞增殖(图2E和图2F)。这些实验结果均说明RAB26高表达可促进鼻咽癌CNE-2细胞的增殖。

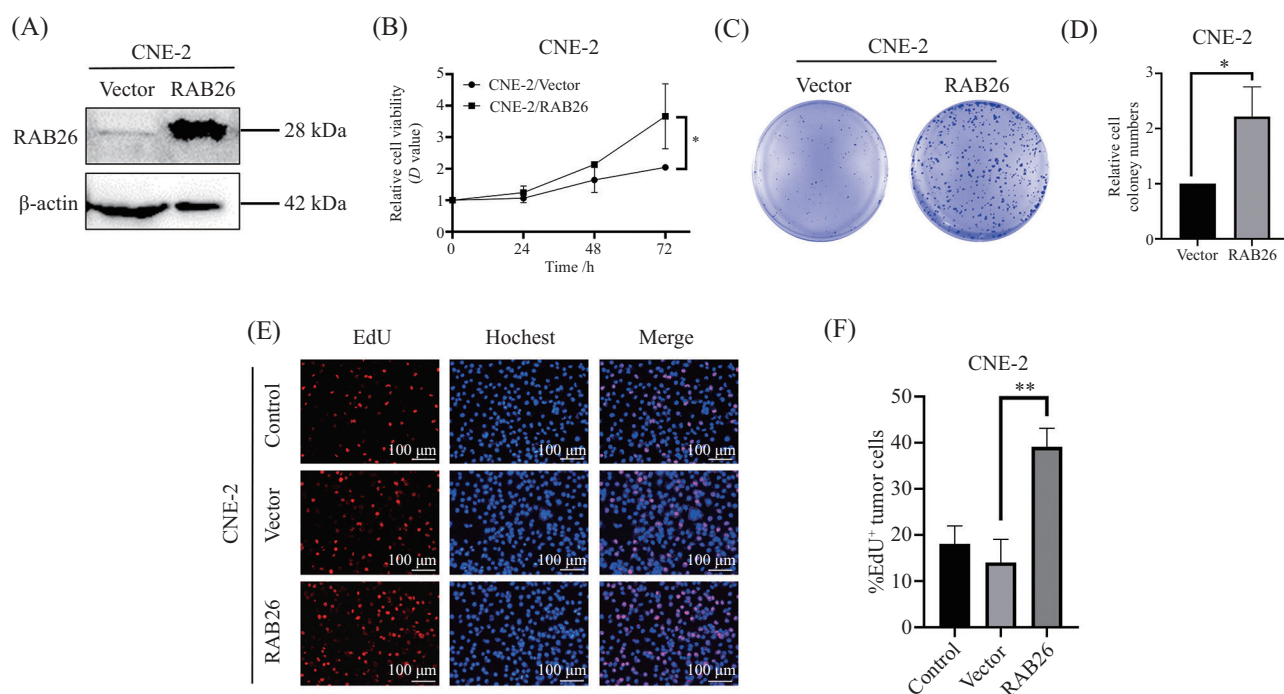
2.4 RAB26敲降后抑制鼻咽癌HNE1细胞增殖

为了进一步研究敲降RAB26细胞株的增殖情况,我们选用高表达RAB26的HNE1细胞,利用慢病毒感染构建了敲降RAB26的鼻咽癌细胞株HNE1/shRAB26和对照细胞HNE1/shSCR(图3A)。在CCK-8细胞增殖实验中,敲降RAB26抑制鼻咽癌HNE1细胞的生长(图3B),通过细胞克隆形成实验发现,敲降RAB26可抑制鼻咽癌HNE1细胞的克隆形成(图3C和图3D)。同时,通过EdU实验发现,敲降RAB26鼻咽癌细胞中EdU阳性细胞数减少,表现出明显的细胞抑制(图3E和图3F)。这些实验结果均可说明RAB26敲降可抑

制鼻咽癌HNE1细胞的增殖。

2.5 RAB26过表达和敲降影响鼻咽癌细胞增殖信号通路

为了研究RAB26通过何种途径影响鼻咽癌细胞增殖,我们检测了跟细胞增殖相关的常见信号通路,发现 β -catenin蛋白出现较明显的变化。免疫印迹实验结果表明,与对照组相比,过表达RAB26后,CNE-2细胞 β -catenin蛋白表达水平明显增加,而敲降则效果相反(图4A)。这提示RAB26可能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路促进鼻咽癌细胞的增殖。 β -catenin在细胞核内的累积是Wnt信号通路的关键事件之一,其需要进入核内才能发挥转录活性。因此,我们对过表达和敲降鼻咽癌细胞进行了核蛋白和细胞质蛋白的提取,并检测了 β -catenin的含量。结果显示,在过表达RAB26后,细胞核内 β -catenin的含量上调;而与之相反,敲降RAB26后,细胞核内的 β -catenin含量下调(图4B)。其结果进一步证实

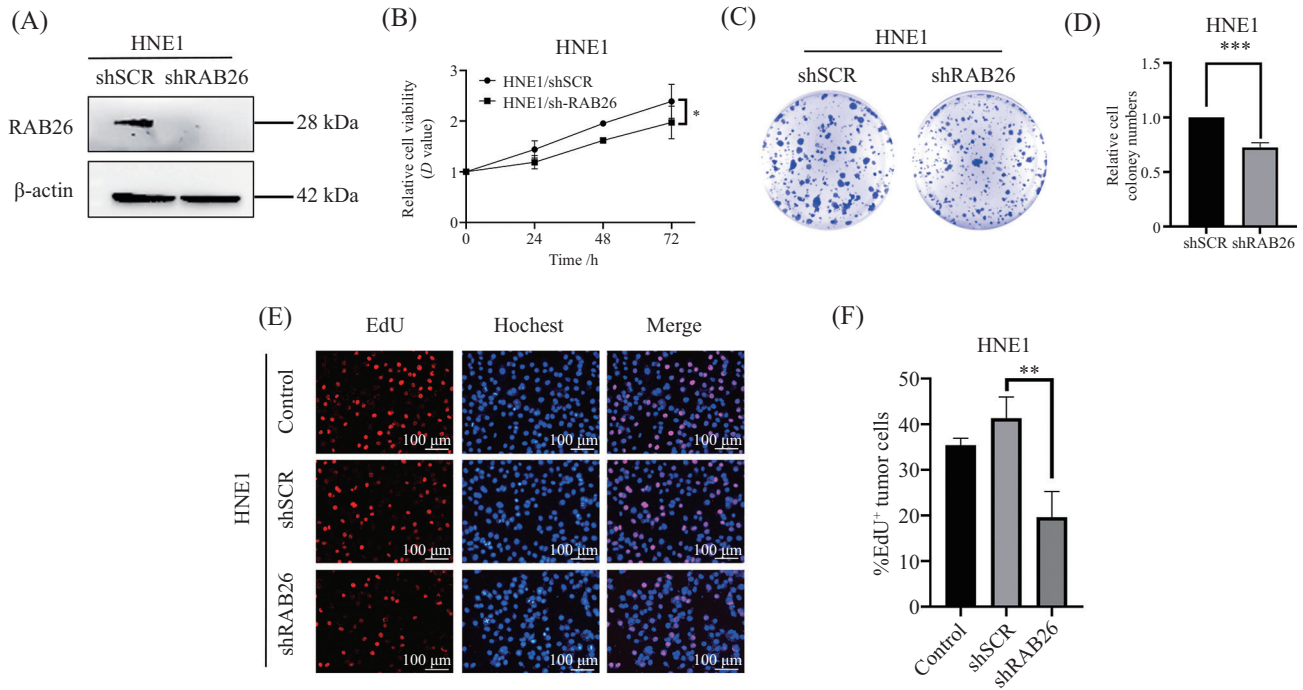


A: Western blot法检测鼻咽癌CNE-2细胞过表达RAB26的效率。Vector组为对照; B: CCK-8法检测过表达RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响; C: 过表达RAB26细胞克隆形成实验的代表图; D: 统计定量分析过表达RAB26中克隆形成数目; E: EdU实验的代表图, CNE-2细胞(Control)、对照组(Vector)、过表达RAB26组(RAB26); F: 统计定量各组中EdU阳性细胞率。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

A: Western blot assay to detect the efficiency of overexpression of RAB26 in nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. the Vector group was the control; B: CCK-8 assay detects the impact of overexpression of RAB26 on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells; C: representative graphs of overexpression of RAB26 cells for clone formation experiments; D: statistical quantification to analyze the number of clone formation in the overexpression of RAB26. E: representative graphs of EdU experiments with CNE-2 cells (Control), empty vector group (Vector), and overexpression of RAB26 group (RAB26); F: statistical quantification of EdU-positive cell rate in each group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图2 RAB26过表达促进鼻咽癌CNE-2细胞增殖

Fig.2 Overexpression of RAB26 promotes the proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells



A: Western blot法检测鼻咽癌HNE1细胞敲降RAB26的效率, shSCR组为对照; B: CCK-8法检测敲降RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响; C: 敲降RAB26细胞克隆形成实验的代表图; D: 统计定量分析敲降RAB26中克隆形成数目; E: EdU实验的代表图, HNE1细胞(Control)、空载体组(shSCR)、敲降RAB26组(shRAB26); F: 统计定量各组中EdU阳性细胞率。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: Western blot assay to detect the efficiency of knockdown of RAB26 in nasopharyngeal carcinoma HNE1 cells, shSCR group as control; B: CCK-8 assay detects the impact of knockdown of RAB26 on the proliferation of nasopharyngeal carcinoma cells; C: representative graph of knockdown of RAB26 cell clone formation assay; D: statistical quantitative analysis of the number of clone formation in the knockdown of RAB26; E: representative graph of EdU assay graphs, HNE1 cells (Control), empty vector group (shSCR), knockdown RAB26 group (shRAB26); F: statistical quantification of EdU-positive cell rate in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 RAB26敲降抑制鼻咽癌HNE1细胞增殖

Fig.3 RAB26 knockdown inhibits the proliferation of nasopharyngeal carcinoma HNE1 cells

RAB26可以促进 β -catenin核转位。

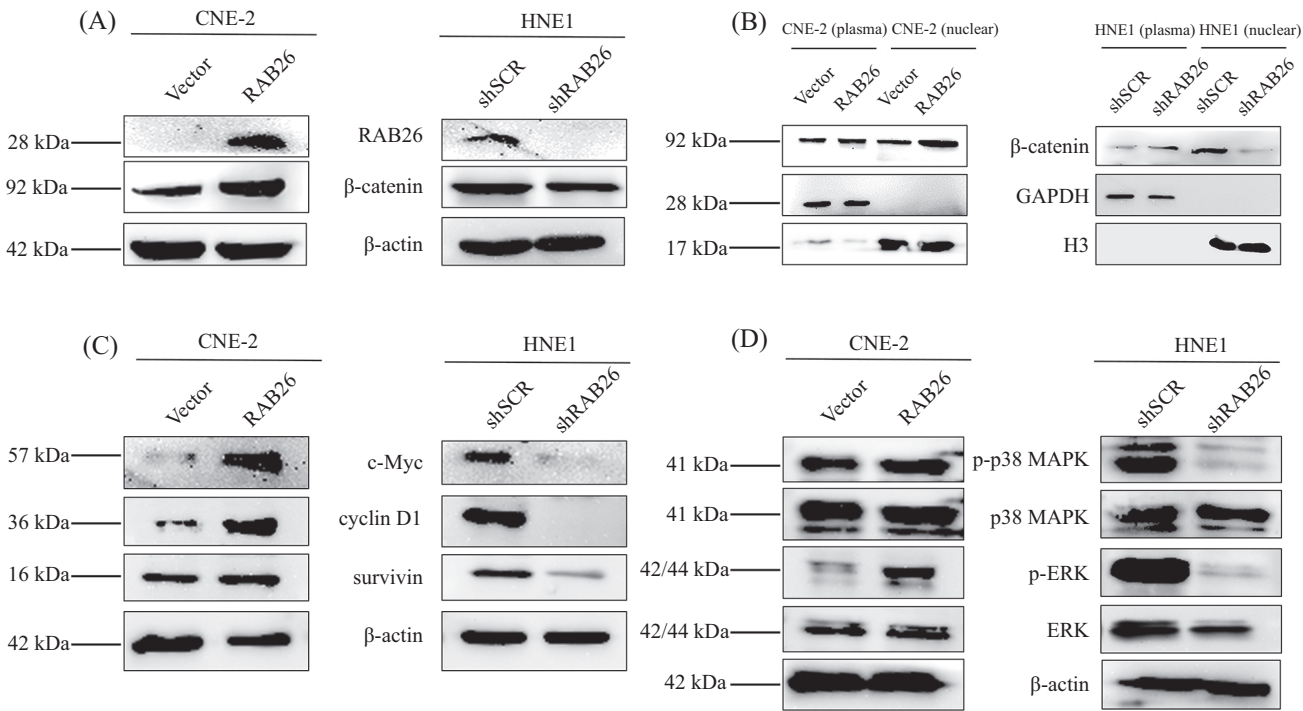
进入核内的 β -catenin与转录因子结合,可促进细胞增殖相关基因的表达。为此,我们检测了RAB26对Wnt/ β -catenin靶基因表达的影响,发现在过表达RAB26的鼻咽癌CNE-2细胞中c-Myc、cyclin D1及survivin的表达水平升高;而在敲降RAB26的鼻咽癌HNE1细胞中其表达下降(图4C)。这些数据提示RAB26可能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路调节下游分子的表达,从而促进鼻咽癌细胞的增殖。

大量研究已经证实了MAPK/ERK信号是调节细胞增殖、存活和分化的关键信号通路。其中,ERK1/2和p38属于MAPK蛋白家族成员,为了进一步了解RAB26调控鼻咽癌细胞增殖的其他下游机制,我们通过Western blot检测了CNE-2细胞和HNE1细胞中p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK/ERK的蛋白表达水平。结果显示,过表达RAB26的鼻咽癌CNE-2细胞中p-p38 MAPK、p-ERK蛋白表达水平

明显增高,而敲降则相反(图4D),提示RAB26也可通过激活MAPK/ERK途径促进鼻咽癌细胞增殖。

2.6 RAB26过表达降低鼻咽癌细胞的放射敏感性

一部分鼻咽癌患者接受放疗后容易导致预后不良,治疗效果不佳,产生放疗抵抗。为探究RAB26对鼻咽癌患者放疗后的影响情况,我们结合了患者临床信息与免疫组织化学实验分析,发现通过放射治疗的患者有37例,其中经放疗后出现转移/复发患者有23例。进一步统计学分析发现,放疗后有转移/复发的鼻咽癌患者RAB26阳性频率显著高于放疗后无转移/复发的鼻咽癌患者($P<0.05$),且RAB26在鼻咽癌中的表达水平和放疗后转移/复发($r=0.486$, $P<0.05$)呈正相关(表3)。其结果提示,RAB26可能会导致鼻咽癌患者放疗抵抗。接着,我们进一步探讨RAB26对鼻咽癌细胞的放射敏感性,我们通过细胞克隆形成实验,检测经不同照射剂量X射线照射后的细胞活力。结果显示,在2 Gy、4 Gy、6 Gy及8 Gy照射剂量的X射线照射下,



A: Western blot法检测细胞中β-catenin 蛋白的表达情况; B: 采用核浆蛋白提取试剂盒提取CNE-2细胞和HNE1细胞的核质蛋白, Western blot法检测细胞中胞质与胞核β-catenin蛋白的表达情况; C: Western blot法检测CNE-2细胞和HNE1细胞c-Myc、cyclin D1及survivin的蛋白表达情况; D: Western blot法检测CNE-2细胞和HNE1细胞中p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK/ERK的蛋白表达情况。

A: Western blot to detect β-catenin protein expression in cells; B: nuclear and plasma protein extraction kit to extract nuclear and plasma proteins from CNE-2 and HNE1 cells; Western blot to detect cytoplasmic and nuclear β-catenin protein expression in cells; C: Western blot assay for detection protein expression of c-Myc, cyclin D1 and survivin in CNE-2 and HNE1 cells; D: Western blot assay for detection protein expression of p-p38 MAPK/p38 MAPK, p-ERK/ERK in CNE-2 cells and HNE1 cells.

图4 RAB26过表达和敲降影响鼻咽癌细胞增殖信号通路

Fig.4 Overexpression and knockdown of RAB26 affect the proliferation signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells

表3 RAB26表达水平与经放疗后复发/转移患者的相关性

Table 3 Correlation between RAB26 expression level and patients with recurrence/metastasis after radiotherapy								
临床特征 Clinical features	RAB26表达水平 RAB26 expression level			合计 Total	Fisher确切概率法 Fisher's exact tests		相关分析 Correlation analysis	
	强阳性 Strong positive	阳性 Positive	阴性 Negative		χ^2	P	r	P
Metastasis/recurrence								
Yes	19	4	0	23	8.508	0.006	0.486	0.002
No	5	8	1	14				
Sub-total	24	12	1	37				

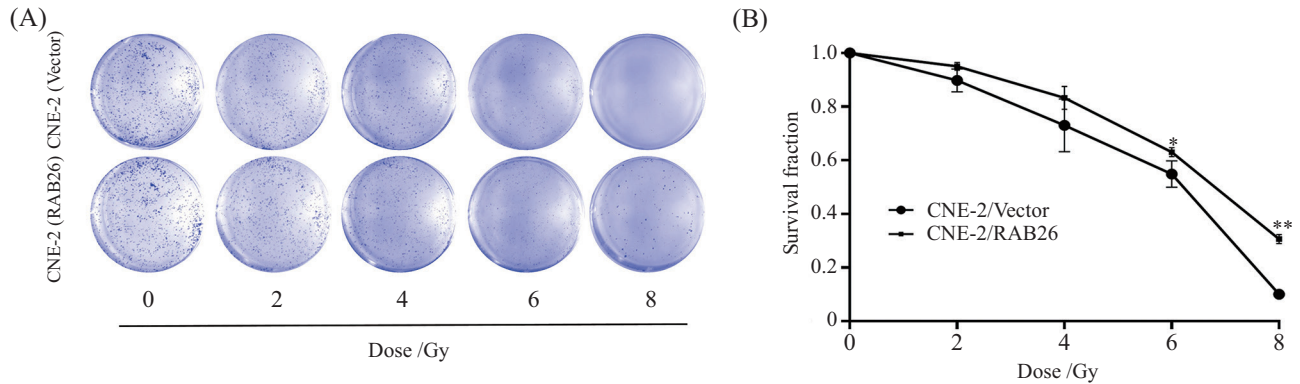
CNE-2/RAB26组克隆形成数均高于对照组(图5A);根据多靶单击模型拟合剂量存活曲线,在使用6 Gy、8 Gy照射剂量的X射线处理后,CNE-2/RAB26组的存活分数显著高于对照组(图5B)。以上结果提示,过表达RAB26降低鼻咽癌细胞的放射敏感性。

3 讨论

鼻咽癌作为常见的头颈部恶性肿瘤,在东南亚

地区较为普遍^[2]。常见的化疗和放疗治疗手段容易使患者产生放疗抵抗,从而导致预后不佳,而鼻咽癌具体发病机制极其复杂^[3]。因此,探索鼻咽癌发生发展的分子机制,并寻找有效的治疗靶点和标志物具有重要意义。

RAB26属于Ras超家族,既往研究显示,RAB26在肿瘤细胞的凋亡、侵袭转移的过程中有一定的调控作用。在乳腺癌的研究中显示,RAB26可以通过与



A: 细胞克隆形成实验检测CNE-2/RAB26和CNE-2/Vector在0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy及8 Gy照射剂量下的细胞活力; B: 多靶单击模型拟合剂量存活曲线分析CNE-2/RAB26和CNE-2/Vector的存活分数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: cell clone formation assay to detect the cell viability of CNE-2/RAB26 and CNE-2/Vector at 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy and 8 Gy irradiation doses; B: multi-targeted single-click model fitted with dose-survival curves to analyze the survival fraction of CNE-2/RAB26 and CNE-2/Vector. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 RAB26过表达降低鼻咽癌细胞的放射敏感性

Fig.5 Overexpression of RAB26 can decrease the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells

ATG16L1相互作用,介导磷酸化Src的自噬降解,抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力^[18]。同时也有研究发现,在低表达RAB26非小细胞肺癌中,异种移植的肿瘤生长明显受到抑制,RAB26通过被SMAD3转录激活后,有助于非小细胞肺癌的进展^[11]。目前关于RAB26对鼻咽癌细胞增殖及其分子机制的研究鲜有报道,进一步探讨RAB26与鼻咽癌增殖的关系及其机制十分必要。在本研究中,我们首先通过检测鼻咽癌组织及正常鼻咽上皮组织的RAB26 mRNA和蛋白表达水平,发现RAB26在鼻咽癌组织表达水平明显增加,同时对RAB26在鼻咽癌中的表达水平与患者临床病理特征进行统计学分析发现,RAB26在鼻咽癌中的表达水平与肿瘤类型和转移/复发呈负相关。这些结果表明RAB26在鼻咽癌中可能起着重要作用。为了验证这一发现,我们在鼻咽癌细胞构建过表达以及敲降RAB26的细胞株,通过一系列增殖实验探究了RAB26对鼻咽癌细胞增殖的影响,发现过表达RAB26促进细胞增殖而敲降RAB26抑制细胞增殖。

为了研究RAB26促进鼻咽癌细胞增殖的潜在分子机制,我们检测了细胞增殖的相关信号通路。Wnt/ β -catenin信号通路作为典型Wnt信号通路,有越来越多的证据表明,Wnt/ β -catenin信号的失调有助于一些实体肿瘤和血液系统恶性肿瘤的发生和进展^[19-20]。在Wnt/ β -catenin通路中,转录因子 β -catenin作为Wnt信号通路的关键组成部分,其异常调控可导致癌变的早期事件^[20-22]。YANG等^[23]的研究发现,RAB1A可

激活Wnt/ β -catenin信号转导,Wnt/ β -catenin信号通过 β -catenin的核易位和HR通路相关基因的转录上调诱导鼻咽癌细胞的耐辐射和转移。本研究结果显示,过表达RAB26后,细胞核内 β -catenin的含量上调,细胞增殖相关基因(*c-Myc*、*cyclin D1*及*survivin*)的表达升高;相反,敲降RAB26后表达降低。这些结果提示鼻咽癌细胞中RAB26可通过激活Wnt/ β -catenin通路促进下游*cyclin D1*、*c-Myc*、*survivin*的表达从而促进鼻咽癌细胞的增殖,这与WANG等^[24]的研究结果类似。同时,我们也研究了RAB26对MAPK/ERK信号的影响,大量研究已经证实MAPK/ERK是调节细胞增殖、存活和分化的关键信号通路。YUAN等^[25]研究显示,番茄红素通过降低ERK1/2和AKT的磷酸化水平抑制Wnt/ β -catenin、ERK1/2和PI3K/AKT信号通路来抑制骨肉瘤细胞的肿瘤生长。在HU等^[26]的研究中发现,阿帕替尼可能通过降低p-AKT和p-ERK1/2的表达水平来影响PI3K/AKT和ERK1/2/MAPKs信号通路的磷酸化从而抑制胰腺癌细胞的增殖和迁移,阻断移植肿瘤的生长和血管生成。在本研究结果显示,RAB26通过激活MAPK/ERK途径促进鼻咽癌细胞增殖。这与现有研究结果一致。最后,我们探讨了RAB26对鼻咽癌细胞的放射敏感性,放疗作为鼻咽癌主要治疗的手段之一,部分患者在放疗后极易产生抵抗,造成癌症转移和复发^[27]。因此,明确RAB26对鼻咽癌放疗抵抗的作用也十分重要。本研究结果提示,RAB26会降低鼻咽癌细胞的放射敏感性,这为临床的靶向干

预处理奠定了理论基础。

综上所述, 本研究报道了RAB26与促进鼻咽癌细胞增殖的相关通路之间的联系, 我们发现了RAB26在鼻咽癌中高表达, 并可能通过激活Wnt/ β -catenin信号通路和MAPK/ERK信号通路促进鼻咽癌细胞增殖。本研究为阐明鼻咽癌发病的分子机制提供了新视角, 为鼻咽癌分子靶向治疗提供了新的靶点。

参考文献 (References)

- [1] LEE A W, MA B B, NG W T, et al. Management of nasopharyngeal carcinoma: current practice and future perspective [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(29): 3356-64.
- [2] CHUA M L K, WEE J T S, HUI E P, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2016, 387(10022): 1012-24.
- [3] GUAN S, WEI J, HUANG L, et al. Chemotherapy and chemoresistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112758.
- [4] WANG G, WEI Z, WU G. Role of Rab GTPases in the export trafficking of G protein-coupled receptors [J]. *Small GTPases*, 2018, 9(1/2): 130-5.
- [5] SCHWARTZ S L, CAO C, PYLYPENKO O, et al. Rab GTPases at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 22): 3905-10.
- [6] LI C, FAN Y, LAN T H, et al. Rab26 modulates the cell surface transport of α 2-adrenergic receptors from the golgi [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(51): 42784-94.
- [7] WETTSCHURECK N, OFFERMANN S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology [J]. *J Mol Med*, 2002, 80(10): 629-38.
- [8] JIN R U, MILLS J C. Rab26 coordinates lysosome traffic and mitochondrial localization [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 5): 1018-32.
- [9] BINOTTI B, PAVLOS N J, RIEDEL D, et al. The GTPase Rab26 links synaptic vesicles to the autophagy pathway [J]. *eLife*, 2015, doi: 10.7554/eLife.05597.
- [10] DONG W, HE B, QIAN H, et al. Rab26-dependent autophagy protects adherens junctional integrity in acute lung injury [J]. *Autophagy*, 2018, 14(10): 1677-92.
- [11] REN H, YANG B, LI M, et al. Rab26 contributes to the progression of non-small cell lung cancer after being transcriptionally activated by SMAD3 [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 8064-75.
- [12] SALIK B, YI H, HASSAN N, et al. Targeting RSPO3-LGR4 signaling for leukemia stem cell eradication in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(2): 263-78.e6.
- [13] CHOI B R, CAVE C, NA C H, et al. GDE2-dependent activation of canonical wnt signaling in neurons regulates oligodendrocyte maturation [J]. *Cell Rep*, 2020, 31(5): 107540.
- [14] HU H, WANG G, LI C. mir-124 suppresses proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting Capn4 [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, doi: 10.2147/OTT.S135563.
- [15] JIANG R, NIU X, HUANG Y, et al. β -catenin is important for cancer stem cell generation and tumorigenic activity in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48(6): 592.
- [16] PANG Q, HU W, ZHANG X, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway-related proteins (DKK-3, β -catenin, and c-Myc) are involved in prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2019, 34(7): 436-43.
- [17] LIANG T S, ZHENG Y J, WANG J, et al. MicroRNA-506 inhibits tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma through the inactivation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by down-regulating LHX2 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 97.
- [18] LIU H, ZHOU Y, QIU H, et al. Rab26 suppresses migration and invasion of breast cancer cells through mediating autophagic degradation of phosphorylated Src [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 284.
- [19] HE S, TANG S. Wnt/ β -catenin signaling in the development of liver cancers [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110851.
- [20] GAJOS-MICHNIEWICZ A, CZYZ M. Wnt signaling in melanoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, doi: 10.3390/ijms21144852.
- [21] WEI C Y, ZHU M X, YANG Y W, et al. Downregulation of RNF128 activates Wnt/ β -catenin signaling to induce cellular EMT and stemness via CD44 and CTTN ubiquitination in melanoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 21.
- [22] ZHOU J, TOH S H, CHAN Z L, et al. A loss-of-function genetic screening reveals synergistic targeting of AKT/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways for treatment of AML with high PRL-3 phosphatase [J]. *J Hematol Oncol*, 2018, 11(1): 36.
- [23] YANG X Z, CHEN X M, ZENG L S, et al. Rab1a promotes cancer metastasis and radioresistance through activating GSK-3 β /Wnt/ β -catenin signaling in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Aging*, 2020, 12(20): 20380-95.
- [24] LIANG X, WANG S, WANG X, et al. Leptin promotes the growth of breast cancer by upregulating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2): 767-71.
- [25] YUAN X H, ZHANG P, YU T T, et al. Lycorine inhibits tumor growth of human osteosarcoma cells by blocking Wnt/ β -catenin, ERK1/2/MAPK and PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5381-98.
- [26] HU Y, JING J, SHI Y, et al. Apatinib inhibits pancreatic cancer growth, migration and invasion through the PI3K/AKT and ERK1/2/MAPK pathways [J]. *Transl Cancer Res*, 2021, 10(7): 3306-16.
- [27] HAO C Y, HAO S P. The management of rNPC: salvage surgery vs. re-irradiation [J]. *Curr Oncol Rep*, 2020, 22(9): 86.