DOI:10.16016/j.1000-5404.201609065

Rab26 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡并抑制其迁移

陈华萍[1],陈旭昕[2],董伟杰[1],李弘立[1],王关嵩[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院呼吸内科,全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室[1];100037 北京,解放军海军总医院呼吸内科[2])

[摘要] **目的** 研究调控 Rab26 蛋白表达对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及迁移的影响。**方法** 常规培养 HeLa 细胞,分别将含有 Rab26 cDNA 全长的真核表达载体(过表达组)、含有 Rab26 siRNA 序列的真核表达载体(siRNA 组)瞬时转染 HeLa 细胞,同时设立正常细胞组及空载体转染组作为对照。转染 48 h后,分别用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞中 Rab26 的 mRNA 及蛋白表达水平;采用流式细胞仪(FCM)检测各组细胞的凋亡率;同时采用划痕实验检测各组细胞迁移速度。**结果** 与正常细胞组及空载体转染组相比,过表达组 HeLa 细胞中 Rab26 mRNA 及蛋白表达水平显著上调($P<0.05$),而 siRNA 组细胞中 Rab26 mRNA 及蛋白表达水平显著下调($P<0.05$),过表达组 HeLa 细胞凋亡率增高并抑制细胞迁移速度($P<0.01$),siRNA 组则促进细胞迁移($P<0.05$)。**结论** Rab26 与 HeLa 细胞的凋亡及细胞迁移有关,故调控 Rab26 的表达有望成为治疗宫颈癌的新靶点。

[关键词] Rab26;HeLa 细胞;细胞凋亡;细胞迁移
[中图法分类号] R341;R730.23;R737.33 [文献标志码] A

Rab26 induces apoptosis and suppresses migration of HeLa cells

Chen Huaping[1], Chen Xuxin[2], Dong Weijie[1], Li Hongli[1], Wang Guansong[1]([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Respiratory Diseases, Navy General Hospital of PLA, Beijing, 100037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of the regulation of Rab26 expression on the apoptosis and migration of human HeLa cells. **Methods** Eukaryotic expression vectors containing constructs of Rab26 cDNA or Rab26 siRNA were transfected into HeLa cells for overexpression or silencing of Rab26, respectively. Untreated HeLa cells and cells transfected with empty vectors were used as normal control and negative control. At 48 h after transfection, the protein and mRNA levels of Rab26 were determined by Western blotting and RT-PCR analysis. Cell apoptosis was assayed by flow cytometry and migration rate was examined by scratch wound assay. **Results** Compared with the negative control and normal control, Rab26 expression was significantly increased in the Rab26 cDNA-overexpressed group but decreased in the Rab26 siRNA-mediated group ($P<0.05$). Also, Rab26 overexpression significantly enhanced cell apoptosis and inhibited migration rate($P<0.01$), whereas siRNA-mediated downregualtion of Rab26 exerted the adversely effects ($P<0.05$). **Conclusion** Rab26 expression affects the apoptosis and migration of HeLa cells, which supports the notion that regulation of Rab26 expression may be a novel target for treatment of cervical carcinoma.

[**Key words**] Rab26;HeLa cells;apoptosis;migration

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81370168). Corresponding author: Wang Guansong, E-mail: wanggs2003@163.com

宫颈癌是常见妇科恶性肿瘤之一,其发病率仅次于乳腺癌,位居第二。目前,经过手术、放疗、化疗虽能提高患者生存率,但肿瘤的转移和复发仍是导致患者死亡的主要原因。诱导肿瘤细胞凋亡并抑制其迁移是治疗肿瘤复发与转移的主要手段[1]。Rab26 是一种小 G 蛋白,属于 Ras 超家族,共有 60 多种家族成员,目前已知 Ras 家族蛋白中 Rab5、Rab 8、Rab 21、Rab 25 参与了肿瘤的生长和增殖、侵袭和转移、细胞凋亡、肿瘤新生血管的形成[2],目前有关 Rab26 的报道主要集中在肌动蛋白的细胞骨架重组、细胞黏附、细胞运动、细胞

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370168)
[通信作者] 王关嵩,E-mail:wanggs2003@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161108.1447.012.html

周期进展、细胞分裂以及基因转录中[3-5],有关 Rab26 在宫颈癌中的作用尚不清楚。因此,本研究拟以含 Rab26 cDNA 全长或 Rab26 siRNA 序列的真核表达载体为介导,调控 Rab26 在 HeLa 细胞中的表达,观察 Rab26 对细胞凋亡及细胞迁移的影响,以期为宫颈癌的防治提供更多的实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Rab26 质粒由美国摄政大学吴光玉教授赠送(带红色荧光),1640 完全培养基(美国 HyClone 公司),胰蛋白酶(美国 HyClone 公司),Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司),转染试剂(罗氏公司),TRIzol 总 RNA 提取试剂(北京天根生物技术公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),Rab26、GAPDH 抗体(艾博抗贸易有限公司),质粒提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 Rab26 过表达质粒和 siRNA 真核表达载体构建 Rab26 cDNA 全长的真核表达载体和 Rab26 siRNA 序列的真核表达载体由美国摄政大学吴光玉教授赠送,过表达组(Rab26-QL-DsRed,GTP 活性,激活 Rab26 表达)质粒载体为 pDsRed-monomer-C1 载体(红色荧光)。Rab26 siRNA 载体为 pRNATU6.2,siRNA 序列:GUGUUACCCAUGCCUACUATT/UAGUAGGCAUGGGUAACACTT。

1.2.2 HeLa 细胞的培养 HeLa 细胞培养于含 10% 标准胎牛血清的 1640 完全培养基中,培养条件为 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱,实验选用对数生长期细胞。

1.2.3 细胞转染 分为正常细胞组、空载体转染组、过表达组、siRNA 组。转染前 1 d 将对数生长期的 HeLa 细胞分别接种于 6 孔板,每孔 1×10^5 个细胞。倒置显微镜下观察细胞生长情况,待培养板中细胞约 60% 融合时行细胞转染,转染前用 PBS 洗板1 次,提前 4 h 更换为 Opti-MEM 培养基,用 Opti-MEM 稀释质粒、siRNA 以及转染试剂,正常细胞组只加入等量培养液。转染 6 h 后换用含有 10% 标准胎牛血清的培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 48 h。

1.2.4 RT-PCR 检测 Rab26 mRNA 的表达 采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂一步法进行细胞总 RNA 的提取,1% 琼脂糖凝胶电泳检测证实无降解,核酸蛋白检测仪测定纯度并定量,光密度 $D(260)/D(280)$ 比值均在 1.80~2.00 之间。根据 RT-PCR 试剂盒进行逆转录以及扩增,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,2 对引物同时扩增。总反应体系为 50 μL,Premix *Taq* 酶 25 μL,模板 RNA 3 μL,上下游引物各 2 μL,灭菌 DEPC 水 18 μL。Rab26 上游引物:5′-TCAAGGGCGGCAGCAGGA-3′,下游引物:5′-GAGTACGCCCAGCACGAC-3′,扩增产物片段长度为 298 bp。GAPDH 上游引物:5′-GCAAATTCCACGGCACAGTCA-3′,下游引物:5′-TCACGCCACAGTTTCCCAGAG-3′,扩增产物片段长度为 450 bp。扩增条件为:94 ℃ 4 min 预变性;94 ℃ 变性 30 s,62 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 60 s,30 个循环;72 ℃后延伸 5 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,并采用自动电泳凝胶成像分析仪进行图像扫描和分析。计算目的基因与正常细胞组相对表达量(以百分率表示)。

1.2.5 Western blot 检测 Rab26 蛋白的表达 4 组细胞处理 48 h 后,收集各组细胞,加细胞蛋白提取液提取总蛋白,于 4 ℃裂解 20 min 后,用细胞刮收集细胞于 EP 管中,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清用于核酸蛋白检测仪测蛋白浓度,将蛋白浓度调成一致,加入 5×Loading buffer 后在沸水中煮 8 min 变性。配制 15% 分离胶、4% 浓缩胶后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,80 V 30 min,120 V 1.5 h 后,300 mA 湿转 50 min,将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗稀释液稀释的 Rab26 一抗(1∶500),GAPDH 一抗(1∶1 000)中 4 ℃孵育过夜,次日用 TBST 漂洗 5 次,每次 10 min,放入 5% 脱脂奶粉稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1∶5 000)抗体,室温孵育 1 h,TBST 漂洗 5 次,每次 10 min,ECL 化学发光法显色。计算目的蛋白相对表达量,方法同 1.2.4。

1.2.6 流式细胞仪检测 HeLa 细胞的凋亡率 0.25% 的胰酶消化收集细胞后,室温 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用预冷的 PBS 重悬细胞,2 000 r/min 离心 10 min 洗涤细胞 1 次,加 300 μL 的 1×Binding Buffer 悬浮细胞,再加 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后室温避光孵育 15 min,上机前加入 5 μL 的 PI 染色,室温避光孵育 10 min,使用流式细胞仪检测。

1.2.7 划痕实验检测 HeLa 细胞迁移 6 孔板铺板,每孔 3×10^5 个细胞,待细胞融合率达 100% 后,用 200 μL tip 头沿 6 孔板画直线。画好后用 PBS 洗涤 1 次,加入 2 mL 10% FBS 的 1640 完全培养基,倒置相差显微镜下照相;24 h 后,更换培养基后照相,至 48 h。

1.3 统计学处理

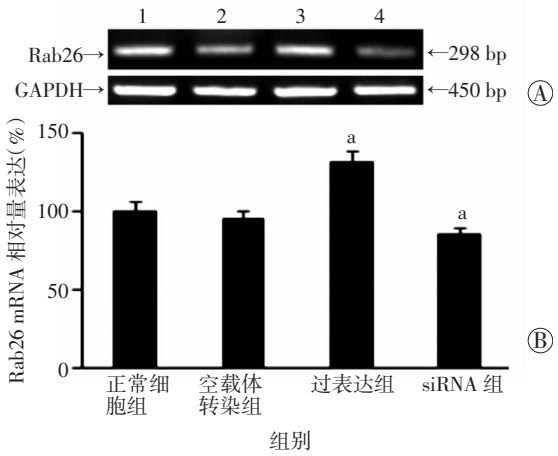
使用 Image-Pro Plus 10.0 对图像进行分析;使用 SPSS 13.0 统计软件和单因素方差分析对数据进行分析。$\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 RT-PCR、Western blot 分别检测 Rab26 mRNA 和蛋白的表达

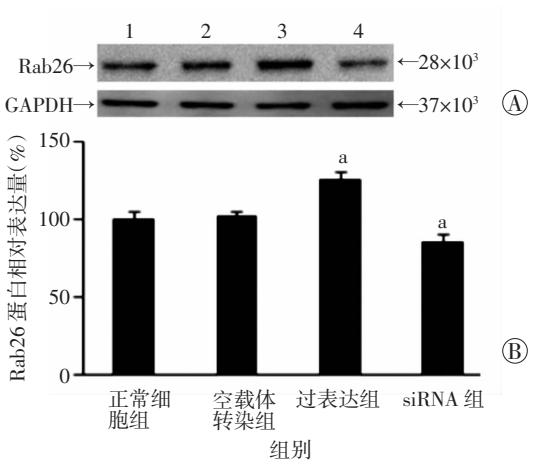
各组转染 48 h 后,检测各组 Rab26 mRNA 和蛋白

表达情况,发现过表达组 Rab26 mRNA 和蛋白表达水平较正常细胞组和空载体转染组显著升高($P<0.05$);siRNA 组 Rab26 mRNA 和蛋白表达水平较正常细胞组和空载体转染组明显降低($P<0.05$),而正常细胞组与空载体转染组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 1、2)。



A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与正常细胞组比较

图 1 RT-PCR 检测各组 Rab26 mRNA 的表达变化



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与正常细胞组比较

图 2 Western blot 检测各组 Rab26 蛋白的表达变化

2.2 Rab26 对 HeLa 细胞凋亡的影响

各组处理 48 h 后,过表达组凋亡率为(43.29±3.59)%,siRNA 组凋亡率为(0.95±1.63)%,空载体转染组凋亡率为(1.21±1.08)%,正常细胞组凋亡率为(0.14±0.07)%。可见过表达组凋亡率显著高于正常细胞组和空载体转染组($P<0.01$),siRNA 组与正常细胞组和空载体转染组凋亡率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 Rab26 对 HeLa 细胞迁移的影响

在正常细胞组、空载体转染组、过表达组、siRNA 组处理 24 h 后,迁移速度分别为(0.43±0.02)、(0.39±0.02)、(0.31±0.02)、(0.59±0.03)μm/min;处理 48 h后各组迁移速度分别为(0.27±0.01)、(0.25±0.03)、(0.19±0.04)、(0.26±0.02)μm/min,过表达组细胞迁移速度显著低于正常细胞组和空载体转染组($P<0.01$);siRNA 组在 24 h 时迁移速度显著高于正常细胞组和空载体转染组($P<0.05$),而正常细胞组和空载体转染比较,差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。

3 讨论

目前临床上对晚期宫颈癌仍缺乏有效的治疗方法。Rab26 是近年来新发现的 Ras 家族成员,表达具有组织特异性,在胰腺、腮腺等腺体组织有高表达,在海马组织、肾、肝等上皮细胞中均有表达,而在肝癌、结肠癌和淋巴瘤组织中几乎不表达。研究表明 Rab26 在宫颈癌 HeLa 细胞中亦有表达[6],但目前有关 Rab26 对宫颈癌细胞凋亡及迁移能力的调控作用尚不清楚[7]。本实验通过转染 Rab26 过表达质粒和 siRNA 到 HeLa 细胞中,发现过表达组 Rab26 mRNA 和蛋白表达增加,而 siRNA 组则降低,提示 Rab26 质粒和 siRNA 在 mRNA 和蛋白水平均发挥了作用。

肿瘤的发生、发展是由于细胞增殖和凋亡失衡而导致细胞无限增殖所致,因此促进其凋亡以及抑制迁移成为评估抗癌药物作用能力的重要指标。近年来研究证明,Rab 超家族与肿瘤细胞的迁移和侵袭有密切关系。目前已有研究报道,Rab 家族中 Rab5 和 Rab21 参与肿瘤细胞内涵体的转运及胞内定位,并促使肿瘤的黏附和侵袭[8-10],而 Rab25 和 Rab8 与肿瘤细胞的迁移、侵袭有关[10-12]。本实验通过调控 Rab26 表达,发现 Rab26 过表达可有效促进 HeLa 细胞的凋亡,并抑制 HeLa 细胞迁移;siRNA 沉默后促进细胞的迁移,而与正常细胞组、空载体转染组比较,差异无统计学意义。这表明 Rab26 作为 Ras 家族成员,可能通过促进 HeLa 细胞的凋亡,并抑制其迁移来调控肿瘤的发展。

本研究表明,Rab26 可能通过调控 HeLa 细胞凋亡及迁移从而参与了宫颈癌的发生、发展,但是其具体的信号通路尚不清楚。文献[13]报道 Rab26 具有协调质膜转运功能,可通过物理作用调节 α2 肾上腺素受体从高尔基体到细胞膜的转运,进而调控细胞的生物学功能[14-15]。因此 Rab26 是否亦通过肾上腺素受体途径参与调控 HeLa 细胞凋亡及迁移,需要进一步研究。

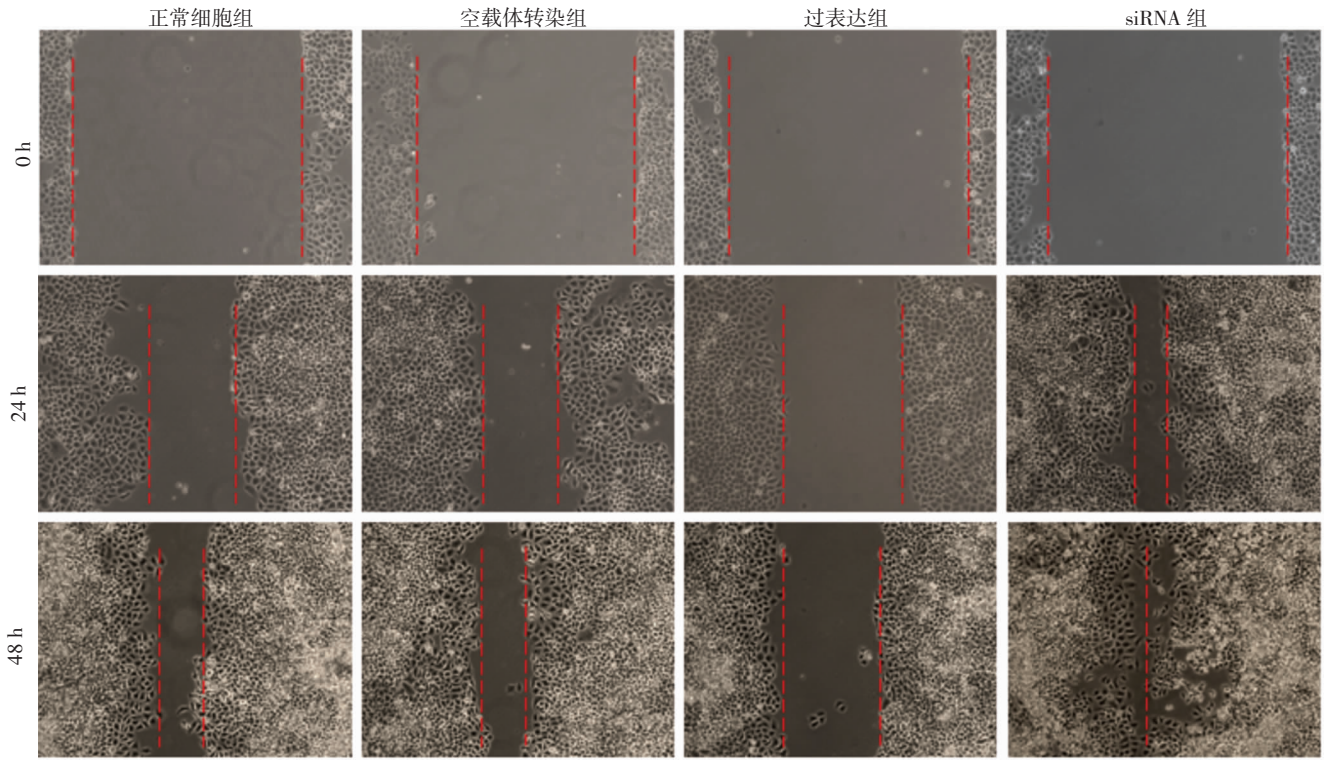


图 3 划痕实验检测各组细胞迁移情况 （倒置相差显微镜 ×100）

参考文献：

[1] Burke A J, Sullivan F J, Giles F J, *et al*. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(3): 503 – 512. DOI:10.1093/carcin/bgt034

[2] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology[J]. J Mol Med, 2002, 80(10): 629 – 638. DOI:10.1007/s00109-002-0370-2

[3] Smits K, Iannucci V, Stove V, *et al*. Rho GTPase Cdc42 is essential for human T-cell development[J]. Haematologica, 2010, 95(3): 367 – 375. DOI:10.3324/haematol.2009.006890

[4] Fernández-Espartero C H, Ramel D, Farago M, *et al*. GTP exchange factor Vav regulates guided cell migration by coupling guidance receptor signalling to local Rac activation[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 10): 2285 – 2293. DOI:10.1242/jcs.124438

[5] Jin R U, Mills J C. RAB26 coordinates lysosome traffic and mitochondrial localization[J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 5): 1018 – 1032. DOI:10.1242/jcs.138776

[6] 王健, 朱嗣博, 李鼎, 等. 一个新的人 Rb26 基因 cDNA 的克隆、表达及其增强细胞吞噬功能研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(6): 719 – 723. DOI:10.3321/j.issn:1000-3282.2008.06.017

[7] Wandinger-Ness, A, Rodman, J S, Romero, E G, *et al*. The Kidney Epithelial Rab26 GTPase Functions in Basolateral Recycling and is Altered in ADPKD[J]. FASEB J, 2004, 18(5): 1027 – 1027.

[8] Chen T, Han Y, Yang M, *et al*. Rab39, a novel Golgi-associated Rab GTPase from human dendritic cells involved in cellular endocytosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(4): 1114 – 1120. DOI:10.1016/s0006-291x(03)00482-0

[9] Binotti B, Pavlos N J, Riedel D, *et al*. The GTPase Rab26 links synaptic vesicles to the autophagy pathway[J]. Elife, 2015, 4: e05597. DOI:10.7554/eLife.05597

[10] Wang J, Zhu S B, Li D, *et al*. A novel human Rab26 cDNA coloning, expression and its endocytosis enhancing function[J]. Progress in Biochemistry & Biophysics, 2008, 35(6): 719 – 723.

[11] Mai A, Veltel S, Pellinen T, *et al*. Competitive binding of Rab21 and p120RasGAP to integrins regulates receptor traffic and migration[J]. J Cell Biol, 2011, 194(2): 291 – 306. DOI:10.1083/jcb.201012126

[12] Cao C, Lu C, Xu J, *et al*. Expression of Rab25 correlates with the invasion and metastasis of gastric cancer[J]. Chung-kuo yen cheng yen chiu, 2013, 25(2): 192 – 199. DOI:10.3978/j.issn.1000-9604.2013.03.01

[13] Zilber Y, Babayeva S, Seo J H, *et al*. The PCP effector Fuzzy controls cilial assembly and signaling by recruiting Rab8 and Dishevelled to the primary cilium[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(5): 555 – 565. DOI:10.1091/mbc.E12-06-0437

[14] Wang G, Wu G. Small GTPase regulation of GPCR anterograde trafficking[J]. Trends Pharmacol Sci, 2012, 33(1): 28 – 34. DOI:10.1016/j.tips.2011.09.002

[15] 甘露, 丁振华. 多沙唑嗪通过转录因子激活蛋白-2α 诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(24): 2414 – 2417. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.2009.24.002

（**收稿**:2016-09-08;**修回**:2016-10-31）

（编辑 邓强庭）