DOI:10.16016/j.1000-5404.202003269

Rab18 作为胶质瘤诊断和进展分子标志物的研究

罗绮莉[1,2],刘跃平[2],袁紫林[2],王 刚[2],莫 琼[2],刁 波[1,2] 510515 广州,南方医科大学第一临床医学院[1];430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院医学实验科[2]

[摘要] **目的** 通过沉默 Rab18 的方法探讨 Rab18 对人胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响机制,进而初步验证 Rab18 表达水平在人胶质瘤诊断和进展的价值。**方法** 将不转染的 U87 细胞作为空白对照组,转染 NC siRNA 和 Rab18 siRNA 的 U87 细胞分别作为阴性对照组和实验组;经手术切除获取瘤旁正常脑组织 15 例($n=15$)和人胶质瘤组织 33 例($n=33$),所有患者术前未曾接受放化疗。分别采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Rab18 和凋亡相关蛋白 mRNA 及蛋白的表达;CCK-8 实验检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞周期和凋亡;HE 染色后观察组织形态学。**结果** ①沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞 Rab18 mRNA 和蛋白表达显著下调($P<0.01$),不仅能使 G_0/G_1 期细胞显著增加伴随 S 期细胞显著减少($P<0.01$),还能显著上调凋亡相关蛋白 P53、Caspase 7、Bax 及 Bim mRNA 和蛋白表达水平($P<0.01$);②Rab18 在人胶质瘤组织中 mRNA 和蛋白的表达水平显著高于瘤旁正常脑组织($P<0.01$),且高级别胶质瘤(WHO Ⅲ~Ⅳ, $n=19$)Rab18 mRNA 和蛋白的表达水平显著高于低级别胶质瘤(WHO Ⅰ~Ⅱ, $n=14$)($P<0.01$)。**结论** 沉默 Rab18 不仅能抑制人胶质瘤细胞增殖,还能诱导其凋亡。且 Rab18 的表达水平与恶性程度有关。Rab18 可作为人胶质瘤一个潜在的临床诊断和进展的分子标志物。

[关键词] Rab18;胶质瘤;凋亡;增殖; 诊断;进展

[中图法分类号] R341;R394.3;R730.264 [文献标志码] A

Rab18 is a potential molecular biomarker for diagnosis and assessing the progression of human gliomas

LUO Qili[1,2], LIU Yueping[2], YUAN Zilin[2], WANG Gang[2], MO Qiong[2], DIAO Bo[1,2] [1]First College of Clinical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515; [2]Department of Medical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command of PLA, Wuhan, Hubei Province, 430070, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism by which Rab18 affects proliferation and apoptosis of human glioma cells and assess the value of Rab18 as a biomarker for diagnosis and evaluating the progression of gliomas. **Methods** Human glioma U87 cells were transfected with a small interfering RNA (siRNA) targeting Rab18 or a negative control siRNA. The changes in mRNA and protein expression of Rab18 and apoptosis-related proteins were detected with qRT-PCR and Western blotting, and the cell proliferation was assessed using CCK-8 test; the changes in cell cycle and cell apoptosis were analyzed using flow cytometry. We also collected surgical specimens of human glioma tissues ($n=33$) and adjacent normal brain tissues ($n=15$) from patients who never received chemotherapy or radiotherapy prior to the surgery for histological examination with HE staining and analysis of Rab18 mRNA and protein expression in relation with the pathological grade of the tumors. **Results** The mRNA and protein expression levels of Rab18 were significantly downregulated in U87 cells after Rab18 silencing ($P<0.01$), which induced not only cell cycle arrest in G_0/G_1 phase and reduced percentage of S phase cells ($P<0.01$) but also upregulated the mRNA and protein expression levels of the apoptosis-related proteins P53, caspase7, Bax, and Bim ($P<0.01$). In the surgical specimens, the gliomas expressed significantly higher levels of Rab18 than the adjacent tissues

[基金项目] 湖北省卫生计生委重点支撑项目(WJ2017Z021)

[通信作者] 刁 波,E-mail:dpitao@163.com

($P<0.01$), and the expression levels of Rab18 were significantly higher in high-grade gliomas (WHO Ⅲ~Ⅳ, $n=19$) than in the low-grade gliomas (WHO Ⅰ~Ⅱ, $n=14$; $P<0.01$). **Conclusion** Rab18 silencing not only inhibits cell proliferation but also promotes cell apoptosis in human glioma cells. Its expression level is related with the malignancy of the tumor, suggesting its value as a potential molecular biomarker for diagnosis and evaluating progression of human glioma.

[**Key words**] Rab18; glioma; apoptosis; proliferation; diagnosis; progression

Supported by Key Supporting Project of Health and Family Planning Commission of Hubei Province (WJ2017Z021). Corresponding author: DIAO Bo, E-mail: dpitao@163.com

胶质瘤主要来源于脑胶质细胞区,是中枢神经系统恶性程度最高的原发性肿瘤。现阶段,治疗胶质瘤的主要手段是通过手术及联合放化疗,但胶质瘤细胞容易对周围正常组织浸润性侵袭,所以难以根治,容易复发。这直接影响人脑正常的神经功能。患者会产生较大的心理负担,严重降低了他们的生活质量[1-2]。早期诊断是任何肿瘤防治的有力措施之一,但迄今为止人胶质瘤仍较为缺乏诊断和进展的标志物。

作为 Rab 蛋白家族的成员之一,近些年国内外有研究表明,Rab18 表达与多种恶性肿瘤有着密切的关系[3]。Rab18 能造成肝癌细胞增殖,引起上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),使肝癌细胞摆脱细胞间粘附,获得浸润侵袭能力[4]。过表达 Rab18 能促进胃癌细胞凋亡[5]。Rab18 在非小细胞肺癌组织的表达显著高于癌旁正常肺组织[6]。Rab18 可作为乳腺癌早期诊断和判断预后的理想型分子标志物[7]。但 Rab18 对人类胶质瘤的作用并不明确,本研究通过沉默 Rab18 的方法探讨 Rab18 对 U87 胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响机制,进而初步验证 Rab18 表达水平在人胶质瘤诊断和进展的价值,为胶质瘤诊断和进展提供一个理想的生物分子标志物。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人胶质瘤 U87 细胞购自江苏泽雨;胎牛血清、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝;DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基均购自美国 HyClone;siRNA 质粒购自上海维三;Lipofactamine™ 2000、TRIzol 均购自美国 Invitrogen;兔抗人 Rab18、兔抗人 P53、兔抗人 Caspase 7、鼠抗人 GAPDH 均购自武汉三鹰;兔抗人 Bim、兔抗人 Bax 均购自美国 CST;PCR 引物均购自北京擎科;细胞计数-8(Cell Counting Kit-8, CCK-8)购自日本 Dojindo;细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD;细胞周期检测试剂盒购自杭州联科。

1.2 细胞培养及转染

将人胶质瘤 U87 细胞接种于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,并在 5% CO_2,95%湿度,37 ℃的恒温培养箱中培养。使用含 25% EDTA 胰蛋白酶消化,以 1∶3比例进行传代培养。待人胶质瘤 U87 细胞贴壁生长至 90%融合度时,收集细胞,将细胞浓度调整至 1×10^9/L 接种于 6 孔板,每孔 2 mL。培养 24 h 后,U87 细胞分成 3 组,即空白对照组(WT)、阴性对照组(siNC)和 Rab18 沉默组(siRab18, 5′-CCAGAAUAAA-GGAGUCAAATT-3′),将 siNC 组和 siRab18 组分别转染 NC siRNA 和 Rab18 siRNA,WT 组不转染。

1.3 qRT-PCR 检测 mRNA 表达、Western blot 检测蛋白表达

转染 48 h 后收集各组细胞,根据逆转录试剂盒说明书,将 mRNA 逆转录成 cDNA 后,使用实时荧光 PCR 仪 LightCycle96 进行 qRT-PCR,靶基因包括 Rab18、内参基因 GAPDH 及凋亡相关蛋白 P53、Caspase 7、Bim 和 Bax。反应条件如下:95 ℃预变性 3 min,两步法:在 95 ℃ 3 s,在 60 ℃ 30 s,共 40 个循环。内参采用 GAPDH,相对定量的表达的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$。

转染 48 h 后收集各组细胞,用细胞蛋白裂解液提取总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒定量蛋白浓度,以 15% SDS-PAGE,转至硝酸纤维素(NC)膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入一抗(Rab18、P53、Caspase 7、Bax 和 Bim,均为 1∶1 000),4 ℃孵育过夜后,加入二抗(1∶3 000)室温孵育 90 min,ECL 反应 2 min,暗室曝光,显影、定影处理,采用 Image J 软件进行灰度分析。

1.4 CCK-8 检测细胞增殖

转染后分别以浓度为 2×10^4/孔接种在 96 孔板中,置于 37 ℃,5% CO_2 的培养箱中培养。分别在转染第 0、24、48 h 和 72 h,向每个孔加入 10 μL CCK-8 溶液,再放回培养箱内孵育 2 h,使用酶标分析仪(RT-6500)测量每孔波长 450 nm 处的光密度值[D(450)]。

1.5 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡

转染 48 h 后收集各组细胞,用含 25% ETDA 胰蛋白酶消化成悬浮细胞,预冷的 PBS 漂洗,收集大约 1×10^6 个细胞/mL,分别进行细胞周期和细胞凋亡检测。

细胞周期检测:用 70%乙醇在 4 ℃下固定过夜。

次日 1 000 r/min 离心 10 min,弃乙醇,加入 5 mL 室温的 PBS 静置 15 min。弃上清,加入碘化丙啶(PI)染色,室温避光孵育 30 min 后,上流式细胞仪检测,采用 Novoexpress 软件分析 G_0/G_1 期、S 期和 G_2/M 期细胞所占的百分比。

细胞凋亡检测:每管加入 500 μL Binding Buffer 重悬。设置阴性对照:不加染料;单阳对照 1∶10 μL Annexin V-FITC;单阳对照 2∶5 μL PI,样本管:10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,混匀后室温避光孵育 30 min,上流式细胞仪检测,采用 Novoexpress 软件分析细胞早期凋亡(Annexin V^+, PI^-)和晚期凋亡(Annexin V^+, PI^+)细胞所占的百分比。

1.6　HE 染色观察组织形态学

脑组织用甲醛固定后,依次按脱水、包埋、切片、脱蜡、染色、分化、再染色、封片的步骤制作病理切片,然后置于光学显微镜下观察瘤旁正常脑组织与不同级别胶质瘤组织的组织学形态变化。

1.7　临床标本来源

选取 2018 年 1 月至 2019 年 1 月在中国人民解放军中部战区总医院留存的胶质瘤手术患者瘤组织标本 33 例(Glioma 组)及瘤旁组织标本 15 例(Normal 组),所有患者术前未接受放化疗。基于 2016 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)中枢神经系统肿瘤分类将胶质瘤组织标本分为低级别组 14 例(WHO Ⅰ~Ⅱ, $n=14$)和高级别组 19 例(WHO Ⅲ~Ⅳ, $n=19$),切除后立即编号登记入库,置于-80 ℃保存。均获得患者书面知情同意,并得到中国人民解放军中部战区总医院伦理委员会的批准([2018]010-1)。

1.8　统计学分析

使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

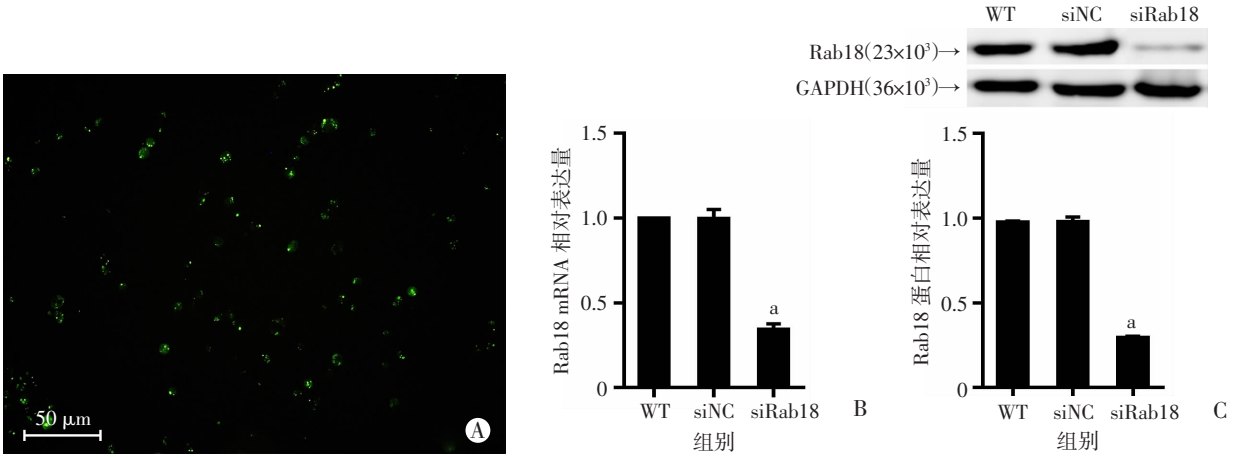
2.1　转染后人胶质瘤 U87 细胞 Rab18 mRNA 和蛋白的表达

成功转染合成 siRNA 的人胶质瘤 U87 细胞呈亮绿色荧光(图 1A)。转染成功的人胶质瘤 U87 细胞分为 3 组:siRab18 组(转染 Rab18 siRNA),siNC 组(转染 NC siRNA)和 WT 组(不转染,作为空白对照)。siRab18 组细胞 Rab18 mRNA 和蛋白的表达显著低于 WT 组和 siNC 组($P<0.01$),WT 与 siNC 组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 1B、C)。

2.2　沉默 Rab18 可抑制人胶质瘤 U87 细胞增殖

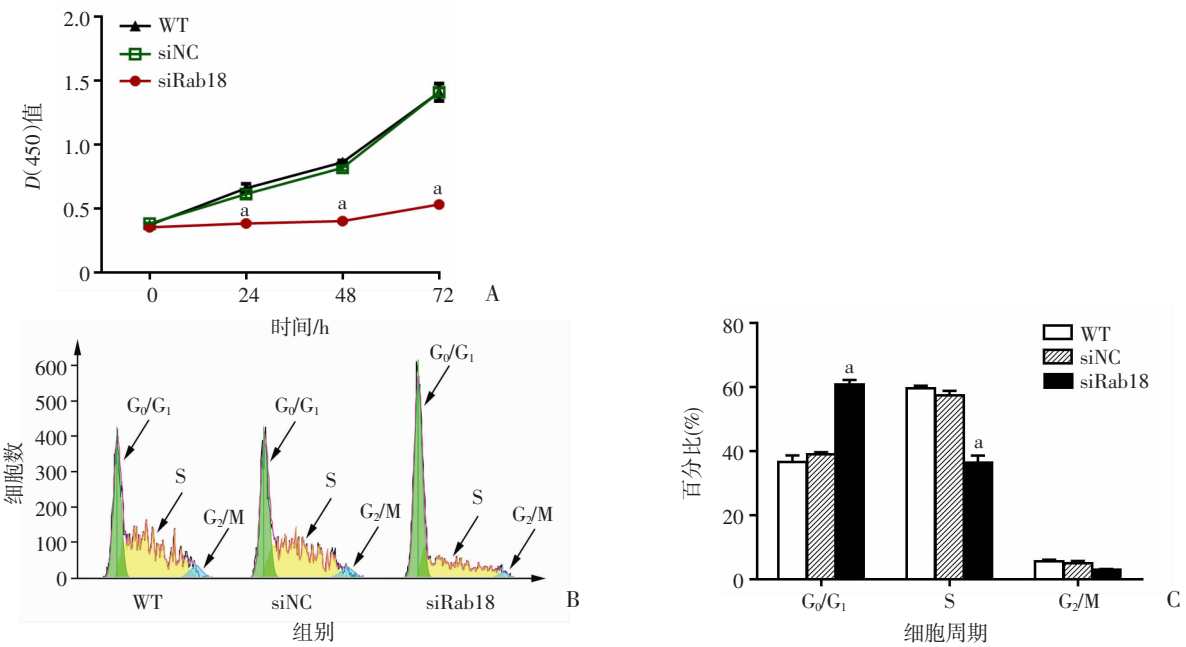
为了观察沉默 Rab18 对人胶质瘤 U87 细胞增殖的影响,进行了 CCK-8 实验。实验结果显示,siRab18 组细胞增殖水平显著低于 WT 组和 siNC 组($P<0.01$),WT 与 siNC 组间差异无统计学意义($P>0.05$,图 2A)。

siRab18 组 G_0/G_1 期细胞所占百分比显著高于 WT 组和 siNC 组,伴随 S 期细胞所占百分比显著低于 WT 组和 siNC 组($P<0.01$),而 siNC 组和 WT 组间各期细胞所占百分比差异并无统计学意义($P>0.05$,图 2B、C)。说明沉默 Rab18 后,人胶质瘤 U87 细胞增殖受到抑制与周期停滞于 G_0/G_1 期有关。



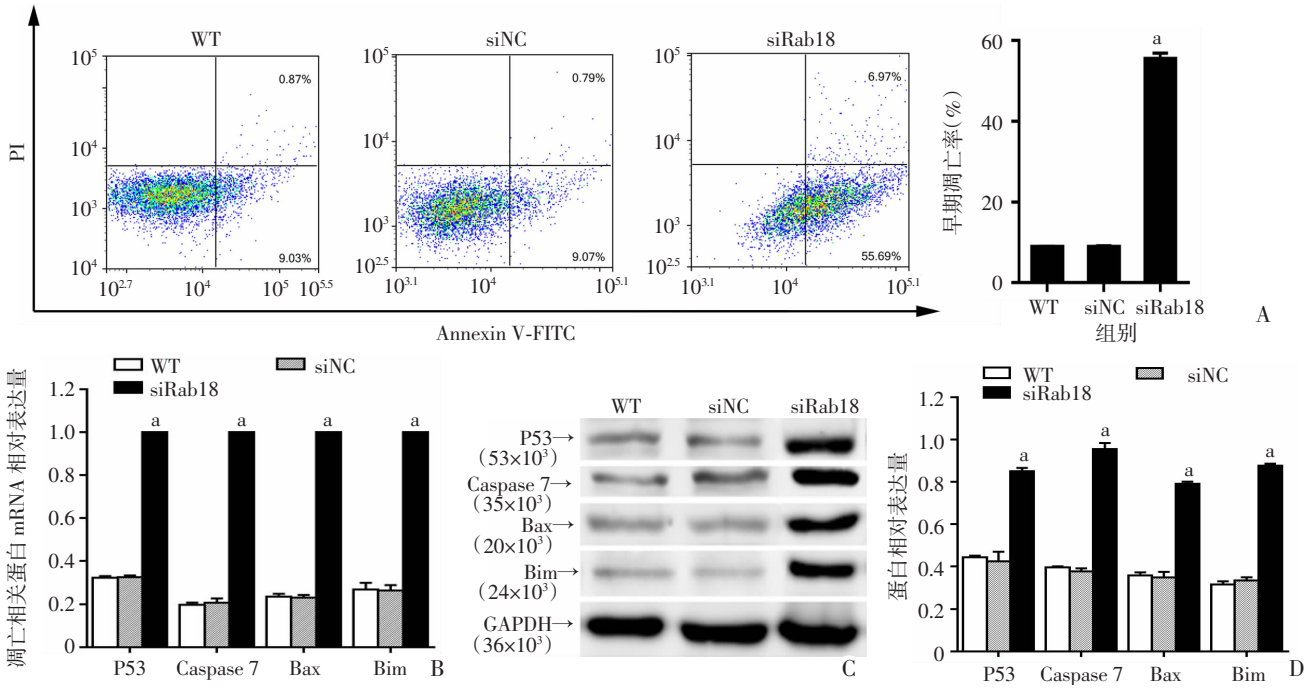
A:人胶质瘤 U87 细胞 siRNA 荧光转染结果;B:沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞中 Rab18 mRNA 表达水平;C:沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞中 Rab18 蛋白表达水平　WT:空白对照组;siNC:阴性对照组;siRab18:Rab18 沉默组;a:$P<0.01$,与 WT 组和 siNC 组比较

图 1　沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞 Rab18 mRNA 和蛋白的表达



A:沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞增殖情况;B、C:沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 各周期细胞分布变化与所占百分比
a:$P<0.01$,与 WT 组和 siNC 组比较

图 2 沉默 Rab18 对人胶质瘤 U87 细胞增殖的影响



A:沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞凋亡率;B:沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞凋亡相关蛋白 P53、Caspase 7、Bax 和 Bim mRNA 表达水平;C,D:Westerm blot 检测沉默 Rab18 后人胶质瘤 U87 细胞凋亡相关蛋白 P53、Caspase 7、Bax 和 Bim 蛋白表达水平
a:$P<0.01$,与 WT 组和 siNC 组比较

图 3 沉默 Rab18 对人胶质瘤 U87 细胞凋亡的影响

2.3 沉默 Rab18 可诱导人胶质瘤 U87 细胞凋亡

siRab18 组细胞凋亡率显著高于 WT 组和 siNC 组($P<0.01$,图 3A),WT 组与 siNC 组间差异无统计学意义($P>0.05$),表明沉默 Rab18 对人胶质瘤细胞有促凋亡的作用。另外,siRab18 组细胞凋亡相关蛋白 P53、Caspase 7、Bax 及 Bim mRNA 和蛋白表达显著高于 WT 组和 siNC 组($P<0.01$,图 3B~D),而 WT 组和 siNC 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。这可能是促进胶质

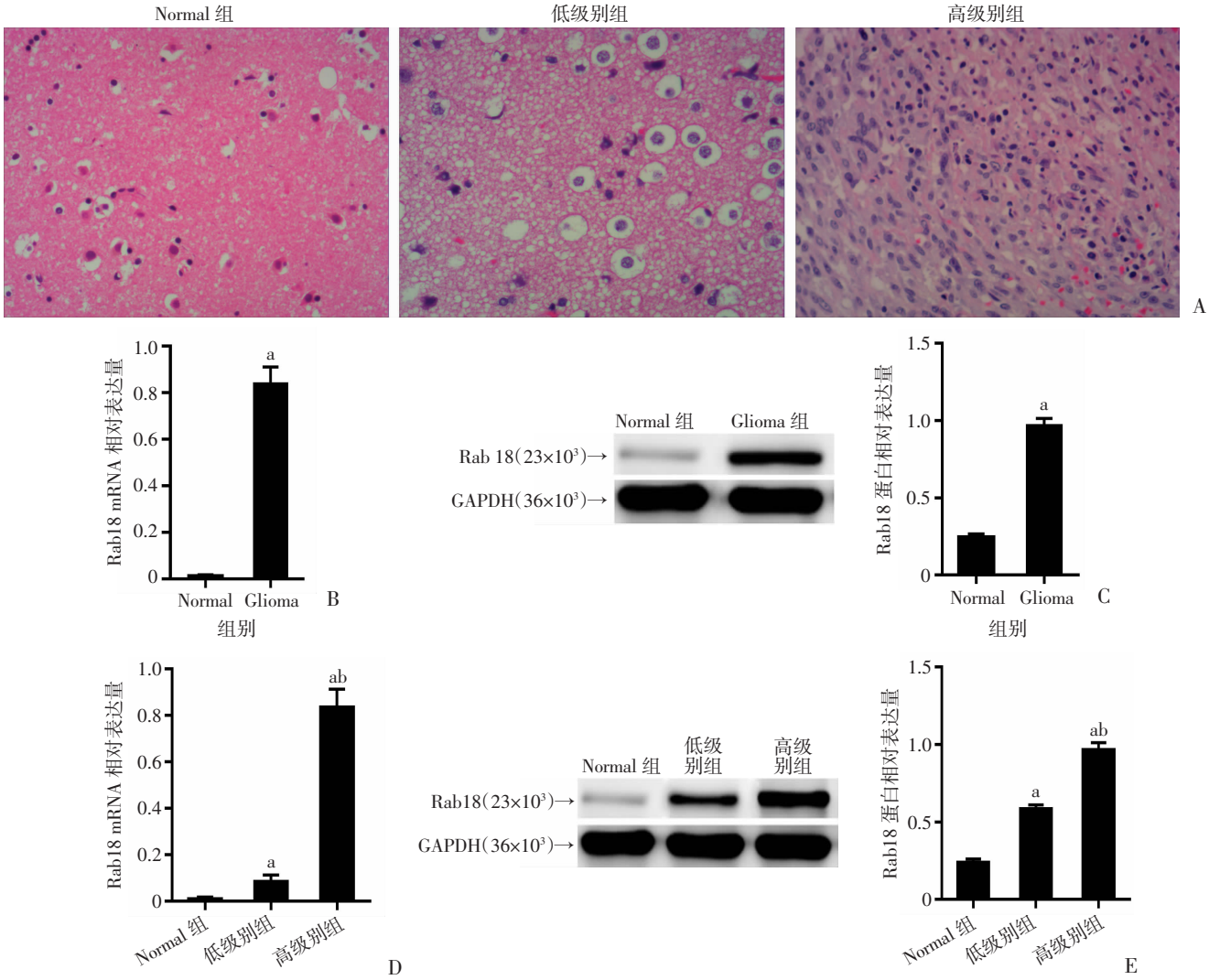
瘤细胞凋亡的重要作用机制。

2.4　Rab18 在人胶质瘤组织的表达

共纳入 33 例胶质瘤组织和 15 例瘤旁正常脑组织其中将 14 例 WHO Ⅰ~Ⅱ级胶质瘤组织作为低级别组,19 例 WHO Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤组织作为高级别组,患者基本信息如表 1 所示。HE 染色结果显示,瘤旁正常脑组织结构清晰,形态未见明显异常;低级别胶质瘤中,细胞排列稍密集,核大,核仁明显发育不良,轻度异型改变;高级别胶质瘤组织中,细胞密度高,分化差,形态呈梭形,核分裂象多见,可见大片肿瘤性坏死,瘤周细胞呈栅栏状排列(图 4A)。qRT-PCR 和 Western blot 实验结果显示,Rab18 mRNA 和蛋白均表达于人胶质瘤组织(n=33)和瘤旁正常脑组织(n=15)中,但在人胶质瘤组织中高表达(P<0.01,图 4B、C)。并且高级别胶质瘤(WHO Ⅲ~Ⅳ, n=19)比低级别胶质瘤(WHO Ⅰ~Ⅱ, n=14)Rab18 的高表达更为显著(P<0.01,图 4D、E)。

表 1　纳入的不同分级的 33 例患者基本信息

级别	例数	年龄/岁	女性比例	诊断
WHO Ⅰ~Ⅱ级	14	31~67	35.70%	节细胞胶质瘤、星形胶质细胞瘤、少突胶质细胞瘤
WHO Ⅲ~Ⅳ级	19	31~72	47.40%	间变性少突胶质细胞瘤、间变性星形细胞瘤、胶质母细胞瘤



A:瘤旁正常脑组织与不同级别胶质瘤组织形态学变化(HE×200);B:人胶质瘤组织和瘤旁正常脑组织 Rab18 mRNA 表达水平;C:人胶质瘤组织和瘤旁正常脑组织 Rab18 蛋白表达水平;D:不同级别胶质瘤 Rab18 mRNA 表达水平;E:不同级别胶质瘤 Rab18 蛋白表达水平　a:P<0.01,与 Normal 组比较;b:P<0.01,与低级别组比较

图 4　人胶质瘤和瘤旁正常脑组织形态学变化及 Rab18 的表达水平

3 讨论

根据 WHO 中枢神经系统肿瘤分类,可将胶质瘤分为低级别胶质瘤(WHO Ⅰ~Ⅱ)和高级别胶质瘤(WHO Ⅲ~Ⅳ),其中胶质母细胞瘤恶性程度最高,患者生存率最低[8]。探索出更多的胶质瘤生物学分子标志物,对胶质瘤的诊断和治疗提供更有效的帮助,是目前胶质瘤科学研究领域研究热点。

本研究为了验证 Rab18 与胶质瘤的相关性,通过 siRNA 转染技术特异性沉默人胶质瘤 U87 细胞 Rab18 的表达,发现沉默 Rab18 能显著抑制胶质瘤细胞的增殖,同时诱导细胞凋亡。本研究发现,沉默 Rab18 能使胶质瘤 U87 细胞停滞于 G_0/G_1 期,从而导致细胞的生长增殖受到抑制。有研究表明 Rab18 不仅能促进周期蛋白 D1(cyclin D1)的表达,还能抑制细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor,CKI)的表达[4],证实了本研究观点。另外,了解肿瘤细胞凋亡不仅能深入了解肿瘤的发病机制,还能为肿瘤的治疗提供线索。在此,我们探讨了沉默 Rab18 如何促进胶质瘤 U87 细胞凋亡的潜在机制。Caspase 7 是依赖 P53 的下游关键效应物之一[9],沉默 Rab18 能使 P53 活化,导致下游 Caspase 7 活化引起胶质瘤细胞凋亡。而 Bim 和 Bax 是两种促凋亡蛋白,Bim 通过构象变化激活 Bak 和 Bax,导致细胞线粒体通透性转换孔开放从而诱导细胞凋亡[10]。本研究发现,在沉默了 Rab18 的人胶质瘤细胞中,P53、Caspase 7、Bim 和 Bax mRNA 和蛋白的表达显著增加,说明沉默 Rab18 能通过促进胶质瘤细胞凋亡相关蛋白 P53/Caspase 7 和 Bax/Bim 的表达而发挥抗肿瘤作用。还有部分研究证明,多种 Rab 蛋白的表达与恶性肿瘤有着密切的关系,其中包括调控胶质瘤的发生、发展[11],本研究发现,Rab18 的表达与胶质瘤的分级和进展密切相关,恶性程度越高,Rab18 表达水平越高,说明 Rab18 表达水平对人类胶质瘤的诊断和进展具有重要作用。

本研究通过沉默 Rab18 的方法探讨 Rab18 对人类胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡影响机制,结果显示沉默 Rab18 不仅能使细胞周期停滞于 G_0/G_1 期,抑制肿瘤的增殖,还能促进凋亡蛋白的表达诱导细胞凋亡。本研究还发现 Rab18 能高表达于人胶质瘤组织中,且表达水平与恶性程度呈正比。目前的研究发现,Rab18 可作为人类胶质瘤一个潜在的临床诊断和病程进展及预后判断的生物标志物。

参考文献:

[1] BAHADUR S, SAHU A K, BAGHEL P, *et al*. Current promising treatment strategy for glioblastoma multiform: a review[J]. Oncol Rev, 2019, 13(2): 417. DOI: 10.4081/oncol.2019.417.

[2] REARDON D A, WEN P Y. Therapeutic advances in the treatment of glioblastoma: rationale and potential role of targeted agents[J]. Oncologist, 2006, 11(2): 152-164. DOI: 10.1634/theoncologist.11-2-152.

[3] MÜLLER M P, GOODY R S. Molecular control of rab activity by GEFs, GAPs and GDI[J]. Small GTPases, 2018, 9(1/2): 5-21. DOI: 10.1080/21541248.2016.1276999.

[4] GONG T, ZHOU B X, LIU M Y, *et al*. RAB18 promotes proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(2): 1009-1019.

[5] LIU J C, ZHANG J K, LI Y S, *et al*. MiR-455-5p Acts as a novel tumor suppressor in gastric cancer by down-regulating RAB18[J]. Gene, 2016, 592(2): 308-315. DOI: 10.1016/j.gene.2016.07.034.

[6] ZHONG K, CHEN K, HAN L, *et al*. MicroRNA-30b/c inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting Rab18[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 703. DOI: 10.1186/1471-2407-14-703.

[7] YE F, TANG H L, LIU Q, *et al*. MiR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family[J]. J Transl Med, 2014, 12: 17. DOI: 10.1186/1479-5876-12-17.

[8] YAN W, ZHANG W, YOU G, *et al*. Molecular classification of gliomas based on whole genome gene expression: a systematic report of 225 samples from the Chinese Glioma Cooperative Group[J]. Neuro-oncology, 2012, 14(12): 1432-1440. DOI: 10.1093/neuonc/nos263.

[9] YANG S H, WANG S M, SYU J P, *et al*. Andrographolide induces apoptosis of C6 glioma cells via the ERK-p53-caspase 7-PARP pathway[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 312847. DOI: 10.1155/2014/312847. DOI: 10.1155/2014/312847

[10] ZHAO L, FENG Y, SHI A W, *et al*. Apoptosis induced by microbubble-assisted acoustic cavitation in K562 cells: the predominant role of the cyclosporin A-dependent mitochondrial permeability transition pore[J]. Ultrasound Med Biol, 2015, 41(10): 2755-2764. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.05.021.

[11] WU Q W, SUN X Q, YUE W H, *et al*. RAB18, a protein associated with Warburg Micro syndrome, controls neuronal migration in the developing cerebral cortex[J]. Mol Brain, 2016, 9: 19. DOI: 10.1186/s13041-016-0198-2.

(**收稿**:2020-03-21;**修回**:2020-05-31)

(编辑 邓强庭)