

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.05.003

Rab11a 通过 PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路调节 胰腺癌细胞凋亡和侵袭 *

王 云¹ 朱星枚² 罗玉梅¹ 王小云³ 和水祥^{1Δ}

(1 西安交通大学第一附属医院消化内科 陕西 西安 710061;

2 陕西中医药大学药学院 陕西 咸阳 712046; 3 西安交通大学第一附属医院感染科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探究 Rab11a 在胰腺癌中的表达模式及其对肿瘤生长和转移的影响。**方法:**通过免疫组织化学法、RT-PCR 和 Western blot 检测 60 例胰腺癌患者的癌组织和癌旁组织中 Rab11a 的表达。通过对人胰腺癌细胞系 PANC1 转染靶向 Rab11a 的小干扰 RNA 或过表达 Rab11a 的 pcDNA3.1 质粒考察 Rab11a 对细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。通过 Western blot 检测 PANC1 细胞中 PI3K、AKT、Ras、MEK、ERK1/2 和 GSK3 β 的磷酸化水平。**结果:**胰腺癌组织中 Rab11a 的表达水平平均高于癌旁组织 ($P<0.05$)。Rab11a 的表达水平与 TNM 分期和淋巴结转移有关 ($P<0.05$)。CCK-8 测试和细胞集落形成实验显示,下调 Rab11a 抑制了 PANC1 细胞的增殖 ($P<0.05$)。流式细胞术显示,下调 Rab11a 促进了 PANC1 细胞的凋亡 ($P<0.05$)。细胞划痕实验显示,下调 Rab11a 抑制了 PANC1 细胞的迁移能力 ($P<0.05$)。Matrigel Transwell 实验显示,下调 Rab11a 抑制了 PANC1 细胞的侵袭能力 ($P<0.05$)。然而,上调 Rab11a 则促进了 PANC1 细胞的增殖、迁移和侵袭,并抑制了细胞凋亡 ($P<0.05$)。蛋白质印迹分析显示,下调 Rab11a 抑制了 PANC1 细胞中 PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路的活化 ($P<0.05$)。此外,应用 PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路的选择性抑制剂处理 PANC1 细胞可阻断 Rab11a 对细胞增殖的促进作用 ($P<0.05$)。**结论:**Rab11a 的高表达是胰腺癌预后恶化的潜在生物标志物。靶向抑制 Rab11a 可通过抑制 PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路来降低胰腺癌的生长和转移能力。

关键词:Rab11a;胰腺癌;淋巴结转移;PI3K/AKT 信号通路;Ras/MEK/ERK 信号通路

中图分类号:R-33;R735.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)05-811-08

Rab11a Regulates Apoptosis and Invasion of Pancreatic Cancer Cells via PI3K/AKT and Ras/MEK/ERK Signaling Pathways *

WANG Yun¹, ZHU Xing-mei², LUO Yu-mei¹, WANG Xiao-yun³, HE Shui-xiang^{1Δ}

(1 Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046, China;

3 Department of Infectious, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression pattern of Rab11a in pancreatic cancer and its effect on tumor growth and metastasis. **Methods:** Immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of Rab11a in cancer tissues and adjacent tissues of 60 patients with pancreatic cancer. The human pancreatic cancer cell line PANC1 was transfected with small interfering RNA targeting Rab11a or pcDNA3.1 plasmid overexpressing Rab11a to investigate the effects of Rab11a on cell proliferation, apoptosis, migration and invasion. The phosphorylation levels of PI3K, AKT, Ras, MEK, ERK1/2 and GSK3 β in PANC1 cells were detected by Western blot. **Results:** The expression level of Rab11a in pancreatic cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$). The expression level of Rab11a was related to TNM stage and lymph node metastasis ($P<0.05$). CCK-8 test and cell colony formation experiment showed that down-regulation of Rab11a inhibited the proliferation of PANC1 cells ($P<0.05$). Flow cytometry showed that down-regulation of Rab11a promoted the apoptosis of PANC1 cells ($P<0.05$). The wound healing experiment showed that down-regulation of Rab11a inhibited the migration ability of PANC1 cells ($P<0.05$). Matrigel Transwell experiments showed that down-regulation of Rab11a inhibited the invasion ability of PANC1 cells ($P<0.05$). However, up-regulation of Rab11a promoted the proliferation, migration and invasion and inhibited apoptosis in PANC1 cells ($P<0.05$). Western blot analysis showed that down-regulation of Rab11a inhibited the activation of PI3K/AKT and Ras/MEK/ERK signaling pathways in PANC1 cells ($P<0.05$). In addition, treatment of PANC1 cells with selective inhibitors of PI3K/AKT and Ras/MEK/ERK signaling pathways can block Rab11a's promotion of cell proliferation ($P<0.05$). **Conclusion:** The high expression of Rab11a is a potential biomarker for the worsening prognosis of pancreatic cancer. Targeted inhibition of Rab11a can reduce the growth and metastatic ability of pancreatic cancer by inhibiting

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81402186);陕西省重点研发计划项目(2016SF-183)

作者简介:王云(1981-),女,博士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤发生机制,电话:18681869114,E-mail:Wang7929Yun@163.com

Δ 通讯作者:和水祥,电话:18991232026,E-mail:42696219@qq.com

(收稿日期:2020-06-30 接受日期:2020-07-26)

PI3K/AKT and Ras/MEK/ERK signaling pathways.

Key words: Rab11a; Pancreatic cancer; Lymph node metastasis; PI3K/AKT signaling pathway; Ras/MEK/ERK signaling pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2021)05-811-08

前言

胰腺癌患者的预后仍然很差^[1-3],有必要寻找胰腺癌相关的新致癌基因并探索新分子靶标。Rab家族的GTPases在肿瘤进展过程中调节许多主要的生物学过程,例如细胞增殖、细胞骨架组成、细胞运动等。Rab11a属于小G蛋白的Ras超家族成员,参与调节膜小泡的运输^[4]。另外,Rab11a参与有丝分裂纺锤体的形成和定向^[5]。活化的Rab11a有助于上皮形态发生过程中E-cadherin的运输和管腔形成^[6]。目前,其他学者发现Rab11a在乳腺癌和食道癌中高表达,活化的Rab11a可诱导结直肠细胞转化和迁移,上述研究提示Rab11a可能是一种潜在的癌基因^[7-9]。然而,Rab11a在人类胰腺癌中的表达模式和生物学功能尚待揭示。因此,本研究旨在考察Rab11a在胰腺癌组织中的表达模式,及其对胰腺癌细胞生物学行为的影响机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Rab11a、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT一抗均购自英国Abcam公司;苏木精、膜联蛋白V(Annexin V)/碘化丙啶(PI)染色液、生物素化的山羊抗兔IgG二抗均购自北京百奥莱博科技有限公司;3,3'-二氨基联苯胺(DAB)购自上海源叶生物科技有限公司;1640培养基购自美国Invitrogen公司;Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司;PI3K/AKT选择性抑制剂LY294002购自上海碧云天生物技术有限公司;MEK/ERK选择性抑制剂U0126购自美国Calbiochem公司;RIPA裂解缓冲液购自北京普利莱基因技术有限公司;结晶紫、BCA试剂盒购自北京凯瑞基生物科技有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国Millipore公司;p-Ras、Ras、p-MEK、MEK、p-ERK1/2、ERK1/2、p-GSK3 β 、GSK3 β 、GAPDH和HRP标记的IgG二抗均购自美国Cell Signaling Technology公司;Pierce ECL试剂盒购自美国BIO-RAD公司;TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司;SYBR Green master mix试剂盒购自美国Applied Biosystems公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自日本Dojindo公司;Transwell购自美国Corning公司。

1.1.2 临床样本数据 收集2015年3月至2019年6月我院收治的60例胰腺癌患者的临床样本,根据WHO分类指南对组织学诊断和肿瘤分级进行评估。将患者的肿瘤组织和正常癌旁组织保存在-70℃。本研究方案已获得本单位伦理审查委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学分析 使用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物法对Rab11a进行免疫组织化学染色。肿瘤组织及正常癌旁组织用10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,并制成4 μ m厚的切片。将脱蜡和水化的组织在高压灭菌器中用柠檬酸盐缓冲液于105℃加热10 min进行抗原热修复,然后用3%

过氧化氢消除内源性过氧化物酶,在25℃用山羊血清封闭20 min。随后,将切片与Rab11a兔多克隆抗体在4℃下过夜孵育(1:200)。24 h后,将切片与生物素化的山羊抗兔IgG二抗在室温下孵育30 min。切片用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色10 min,用10%的苏木精复染,脱水并固定。根据染色强度和阳性细胞数的乘积进行染色评分:(1)染色强度:0分,未染色;1分,浅棕色染色;2分,棕色或深棕色染色;3分,黑褐色染色。(2)阳性细胞数:0分,<5%的阳性细胞;1分,5~25%的阳性细胞;2分,25~50%的阳性细胞;3分,>50%的阳性细胞。结果评价如下:0分为"-";1-2分为"+";3-4分为"++";6-9分为"+++"。"-和+"为低表达;"++和+++"为高表达。

1.2.2 细胞培养及处理 人正常胰腺导管上皮细胞系HPDE6-C7和人胰腺癌细胞系PANC1购自美国ATCC,将细胞在含10% FBS的1640培养基中于37℃培养,培养条件为5% CO₂和95%空气的潮湿环境,每两天用胰蛋白酶传代。将PANC1细胞分别用PI3K/AKT选择性抑制剂LY294002(20 μ M)或MEK/ERK选择性抑制剂U0126(20 μ M)处理48 h,用于考察Rab11a对PI3K/AKT和Ras/MEK/ERK信号通路的调节作用。

1.2.3 细胞转染 靶向Rab11a的小干扰RNA(siRNA)(Rab11a-siRNA)及阴性对照siRNA(NC-siRNA)由上海吉玛制药技术有限公司合成。Rab11a-siRNA序列为:正向:5'-ACAC-GAAUUUCGACACUGAdTdT-3';反向:5'-UAUGGCGACUCAAUGUUUGdTdT-3'。NC-siRNA序列为:正向:5'-UUCG-AUACGUCUGACGUGdTdT-3';反向:5'-ACGACGGUACUGAGUCGAAdTdT-3'。按照试剂使用说明书,使用Lipofectamine 2000对PANC1细胞进行siRNA转染,48 h后收集细胞用于后续实验。另外,使用过表达Rab11a的pcDNA3.1质粒(Rab11a-pcDNA3.1)以及阴性对照质粒(NC-pcDNA3.1)转染细胞。过表达Rab11a的pcDNA3.1质粒委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 蛋白质印迹分析 用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取组织和细胞总蛋白,在冰上孵育30 min,然后以12000 rpm离心30 min获得总蛋白。使用BCA法检测蛋白质浓度。将50 μ g样品蛋白添加到10%~12% SDS-PAGE中,然后将其转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。在Tris-Buffered Saline Tween-20(TBST)中,用5%脱脂牛奶将膜封闭1 h,并与相应的一抗在4℃孵育过夜,抗体如下:Rab11a(1:1000)、p-PI3K(1:500)、PI3K(1:500)、p-AKT(1:1000)、AKT(1:1000)、p-Ras(1:3000)、Ras(1:3000)、p-MEK(1:800)、MEK(1:800)、p-ERK1/2(1:1500)、ERK1/2(1:1500)、p-GSK3 β (1:1000)、GSK3 β (1:1000)和GAPDH(1:2000)。然后在37℃下与HRP标记的IgG二抗(1:1000)孵育2 h。使用Pierce ECL试剂盒进行显影,并用ImageJ软件定量条带强度,GAPDH作为内部对照。

1.2.5 RT-PCR 分析 根据试剂盒说明书操作,采用 TRIzol 法提取样本组织和细胞中的总 RNA。使用 SYBR Green master mix 试剂盒在美国 Applied Biosystems 公司 7500 Real-Time PCR System 上进行 PCR。将 β -actin 用作内部参考基因。反应程序为:95℃ 60 s,95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 10 s,共 40 个循环。引物序列如下:Rab11a,正向:5'-ACCCCCCA-GAATTCGTTGTGA-3',反向:5'-GACTCTAAACATCTCAC-CCCAGG-3'; β -actin 正向:5'-AGGAGTCTTGTGTCAGGCC-GACAG-3',反向:5'-TCCTGTCTAGGACAGCAGATCG-3'。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.6 细胞活力测定 使用 Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒分析细胞活力。在 siRNA 转染细胞 48 h 后,将细胞以 6×10^3 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中,每孔含有 100 μ L 培养基,并向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。孵育 24、48 和 72 h 后,使用酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值。

1.2.7 细胞集落形成测定 将细胞以每孔 2000 个细胞的密度接种到 6 孔板中,在半固定培养基中于 37℃、5%CO₂ 调节下培养。在此期间,每 2 d 更换一次培养基。14 d 后,将板用 PBS 洗涤 3 次,并在室温下用甲醇固定 15 min,然后用 1%结晶紫染色 5 min。用 ImageJ 软件计数集落数量。

1.2.8 细胞凋亡测定 使用膜联蛋白 V (Annexin V)/碘化丙啶(PI)双重染色进行细胞凋亡测定。转染 48 h 后,收获细胞用预冷的 PBS 洗涤。然后将细胞重悬于 250 μ L 结合缓冲液中。在细胞悬液中加入 Annexin V/FITC 溶液和 PI 溶液。孵育 30 min 后,用 BD FACSCalibur 流式细胞仪分析细胞。

1.2.9 细胞划痕实验 通过细胞划痕实验评估细胞的迁移能力。

将细胞以每孔 5×10^5 个细胞的密度在 6 孔板中孵育。当细胞达到 90%融合时,用微量移液枪头(20 μ L)刮擦细胞表面。使用 PBS 洗去不贴壁的细胞,更换新鲜无血清培养基,并在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。在培养 0 h 和 48 h 后,从每组细胞中随机选择 10 个视野进行拍照。使用 ImageJ 软件测量划痕宽度(mm)。

1.2.10 侵袭测定 使用孔径为 8 μ m 的 24 孔 Transwell 培养板测定细胞侵袭能力。上室中预先用 Matrigel 涂覆,将总共 1×10^5 个细胞铺板到上室中,下室中加入 10% FBS 的培养基。24 h 后,将侵袭的细胞用 PBS 洗涤并用 0.5%结晶紫染色。随机选择十个视野进行拍照并计数细胞数量。

1.3 统计分析

使用 SPSS 软件进行数据统计分析, χ^2 检验用于检查临床病理数据,t 检验用于比较光密度测定数据。 $P < 0.05$ 被认为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rab11a 在胰腺癌组织中的表达及与临床参数的关系

胰腺癌组织中 Rab11a 的 mRNA(图 1A 左)和蛋白(图 1A 右)表达水平均显著高于癌旁组织($P < 0.05$)。此外,人胰腺癌细胞系 PANC1 中的 Rab11a 的 mRNA(图 1B 左)和蛋白(图 1B 右)表达水平显著高于人正常胰腺导管上皮细胞系 HPDE6-C7 ($P < 0.05$)。免疫组织化学染色显示,Rab11a 蛋白主要表达于胰腺癌细胞质和细胞膜区(图 1C)。

结果显示,Rab11a 的表达水平与胰腺癌患者的性别、年龄和肿瘤大小无关 ($P > 0.05$),然而,Rab11a 的表达水平在不同

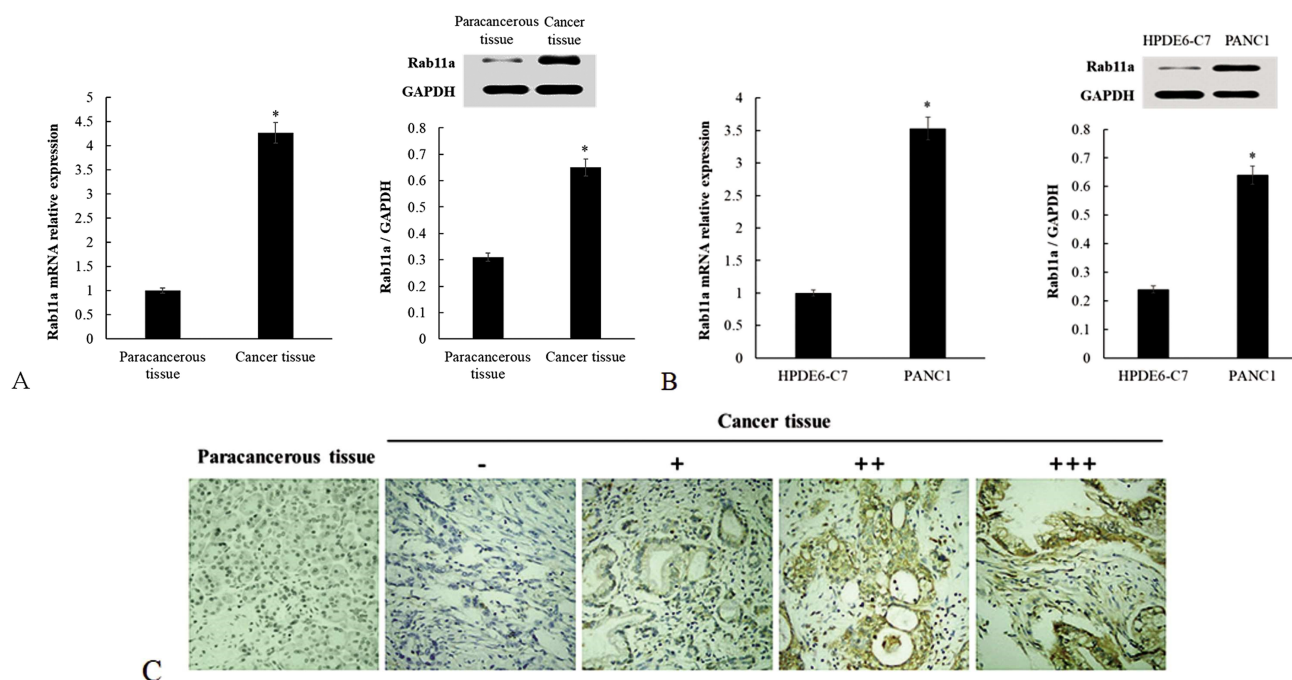


图 1 Rab11a 在胰腺癌组织和细胞系中的表达

Fig.1 Rab11a expression in pancreatic cancer tissues and cell lines

Note: A: Rab11a mRNA and protein expression in cancer tissue and adjacent tissue, RT-PCR was used to detect the mRNA level (left), and Western blot was used to detect the protein level (right); B: Rab11a mRNA and protein expression in HPDE6-C7 and PANC1 cells, RT-PCR was used to detect the mRNA level (left), and Western blot was used to detect the protein level (right); C: Immunohistochemical staining of Rab11a ($\times 400$), "-" and "+" were low expression; "++ and +++" were high expression; Compared with adjacent tissues or HPDE6-C7 cells, $*P < 0.05$.

TNM 分期和淋巴结转移的患者之间存在显著差异($P<0.05$)。见表 1。

表 1 Rab11a 与胰腺癌患者临床参数的关系
Table 1 Relationship between Rab11a and clinical parameters of patients with pancreatic cancer

Clinical parameter	No.	Rab11a high expression (n=41)	Rab11a low expression (n=19)	χ^2	P
Age (year)				1.472	0.225
≤ 60	44	32	12		
>60	16	9	7		
Sex				0.002	0.963
Male	35	24	11		
Female	25	17	8		
Tumor diamete (cm)				0.629	0.428
≤ 5	36	26	10		
>5	24	15	9		
TNM staging				7.329	0.007
I ~ II	32	17	15		
III~IV	28	24	4		
Lymphatic metastasis				8.182	0.004
Yes	22	20	2		
No	38	21	17		

2.2 Rab11a 对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响

转染靶向 Rab11a 的 siRNA 下调了 PANC1 细胞中 Rab11a 的 mRNA(图 2 左)和蛋白(图 2 右)表达,而转染过表达 Rab11a 的 pcDNA3.1 质粒则上调了 Rab11a 的表达(图 2, $P<0.05$)。CCK-8 测试(图 3A)和细胞集落形成实验(图 3B)显示,下调 Rab11a 表达抑制了 PANC1 细胞的增殖,而上调 Rab11a 表达促进了细胞增殖($P<0.05$)。流式细胞术显示(图 3C),下调 Rab11a 表达促进了 PANC1 细胞的凋亡,但上调

Rab11a 表达抑制了细胞凋亡($P<0.05$)。

2.3 Rab11a 对胰腺癌细胞迁移和侵袭的影响

细胞划痕实验显示,下调 Rab11a 表达抑制了 PANC1 细胞的迁移能力,而上调 Rab11a 表达促进了细胞迁移(图 4A, $P<0.05$)。Matrigel Transwell 实验显示,下调 Rab11a 表达抑制了 PANC1 细胞的侵袭能力,而上调 Rab11a 表达促进了细胞侵袭(图 4B, $P<0.05$)。

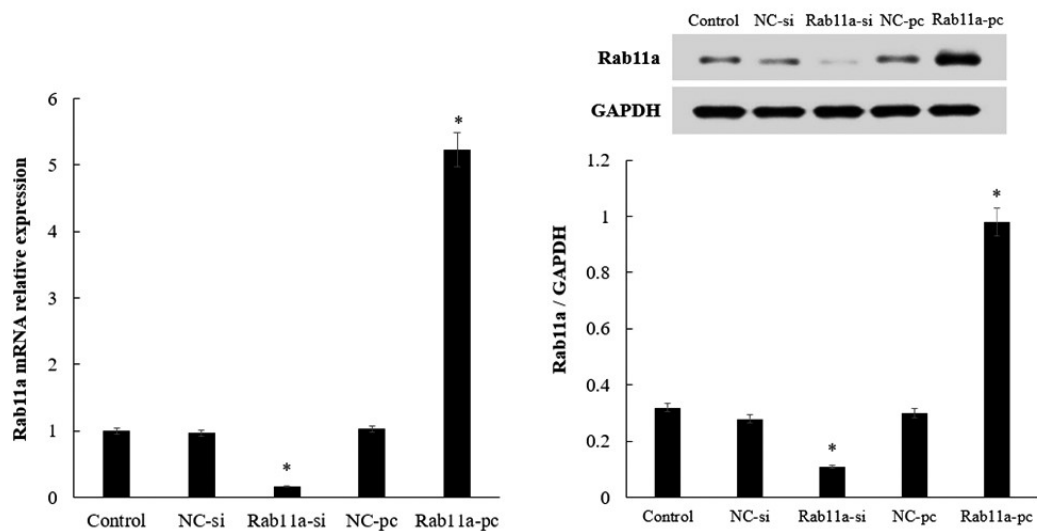


图 2 转染 Rab11a-siRNA 或过表达 Rab11a 的 pcDNA3.1 质粒调控 PANC1 细胞中 Rab11a 的 mRNA 和蛋白表达

Fig.2 Transfection of Rab11a-siRNA or overexpression of Rab11a pcDNA3.1 plasmid regulates Rab11a mRNA and protein expression in PANC1 cells

Note: RT-PCR was used to detect the mRNA level (left), and Western blot was used to detect the protein level (right); NC-si: NC-siRNA group;

Rab11a-si: Rab11a-siRNA group; NC-pc: NC-pcDNA3.1 group; Rab11a-pcDNA3.1 group; Compared with the control group, $*P<0.05$.

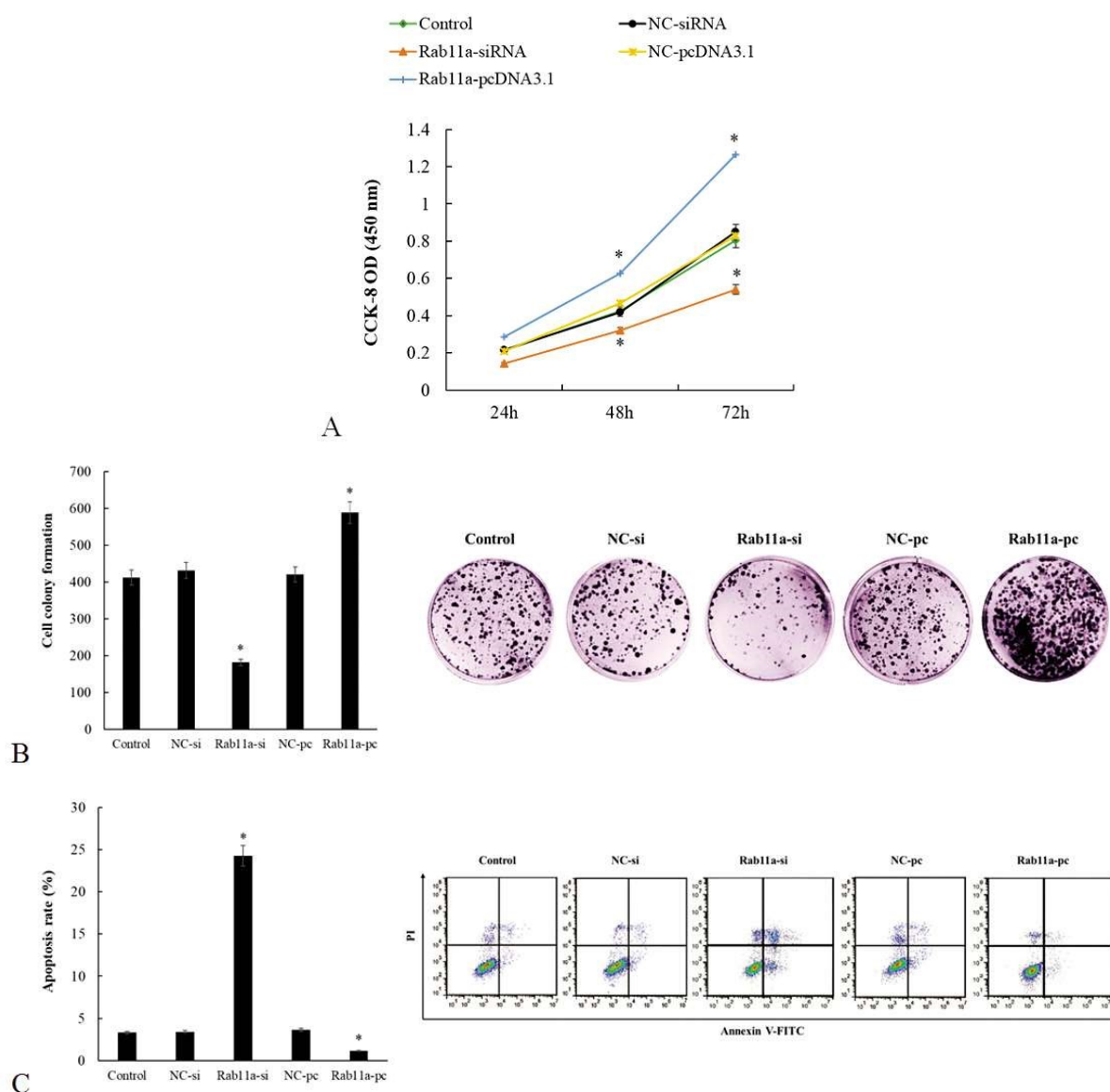


图3 Rab11a 对 PANC1 细胞增殖和凋亡的影响

Fig.3 The effect of Rab11a on PANC1 cell proliferation and apoptosis

Note: A: CCK-8 method experiment to detect cell viability; B: Colony formation experiment to detect cell proliferation;

C: Flow cytometry test (Annexin V-FITC / PI double staining) to detect cell apoptosis; NC-si: NC-siRNA group; Rab11a-si: Rab11a-siRNA group; NC-pc: NC-pcDNA3.1 group; Rab11a-pcDNA3.1 group; Compared with the control group, $*P<0.05$.

2.4 Rab11a 对胰腺癌细胞中 PI3K/AKT 信号通路的影响

Western blot 显示, 下调 Rab11a 表达抑制了 PANC1 细胞中 PI3K、AKT 和 GSK3 β 的磷酸化水平, 而上调 Rab11a 表达促进了 PI3K/AKT 信号通路及下游分子 GSK3 β 的磷酸化 (图 5A, $P<0.05$)。将 PANC1 细胞用 PI3K/AKT 选择性抑制剂 LY294002 (20 μ M) 处理 48 h, 发现 LY294002 可抵消 Rab11a 对 PANC1 细胞增殖的促进作用 (图 5B, $P<0.05$)。

2.5 Rab11a 对胰腺癌细胞中 Ras/MEK/ERK 信号通路的影响

结果显示, 下调 Rab11a 表达抑制了 PANC1 细胞中 Ras、MEK 和 ERK1/2 的磷酸化, 而上调 Rab11a 表达促进了 Ras/MEK/ERK 信号通路的活化 (图 6A, $P<0.05$)。将 PANC1 细胞用 MEK/ERK 选择性抑制剂 U0126 (20 μ M) 处理 48h, 发现 U0126 可抵消 Rab11a 对 PANC1 细胞增殖的促进作用 (图 6B, $P<0.05$)。

3 讨论

Rab11a 已被证明参与人类癌症的发生发展, 例如 Rab11a 在大肠癌和结肠癌中异常表达, 并且 Rab11a 调节癌细胞骨架形成和细胞迁移^[7-10]。因此, Rab11a 是人类癌症发展中潜在的癌基因。但是, Rab11a 在胰腺癌中的表达方式、生物学功能和分子机制尚不清楚。本研究发现胰腺癌组织中 Rab11a 表达被上调, 并且 Rab11a 的高表达与 TNM 分期和淋巴结转移有关, Rab11a 在高 TNM 分期和发生淋巴结转移的患者中的表达率明显升高, 上述结果表明 Rab11a 可能是胰腺癌进展中的潜在生物标志物。

为了进一步考察 Rab11a 在胰腺癌发生发展中的生物学作用, 本研究通过转染靶向 Rab11a 的 siRNA 下调了胰腺癌细胞系 PANC1 中的 Rab11a 表达, 并通过对 PANC1 细胞转染过表

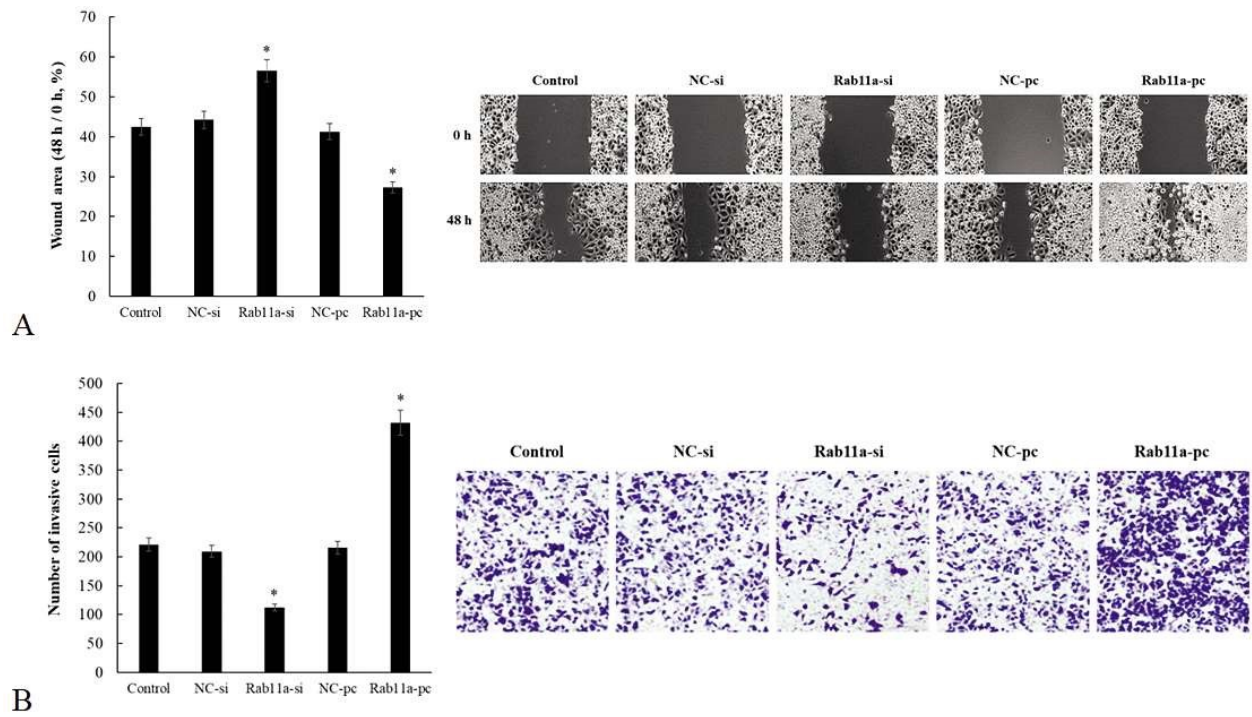


图 4 Rab11a 对 PANC1 细胞迁移和侵袭的影响

Fig.4 The effect of Rab11a on migration and invasion of PANC1 cells

Note: A: Wound healing experiment ($\times 100$) to detect cell migration ability; B: Matrigel Transwell experiment ($\times 200$) to detect cell invasion ability; NC-si: NC-siRNA group; Rab11a-si: Rab11a-siRNA group; NC-pc: NC-pcDNA3.1 group; Rab11a-pcDNA3.1 group; Compared with the control group, $*P < 0.05$.

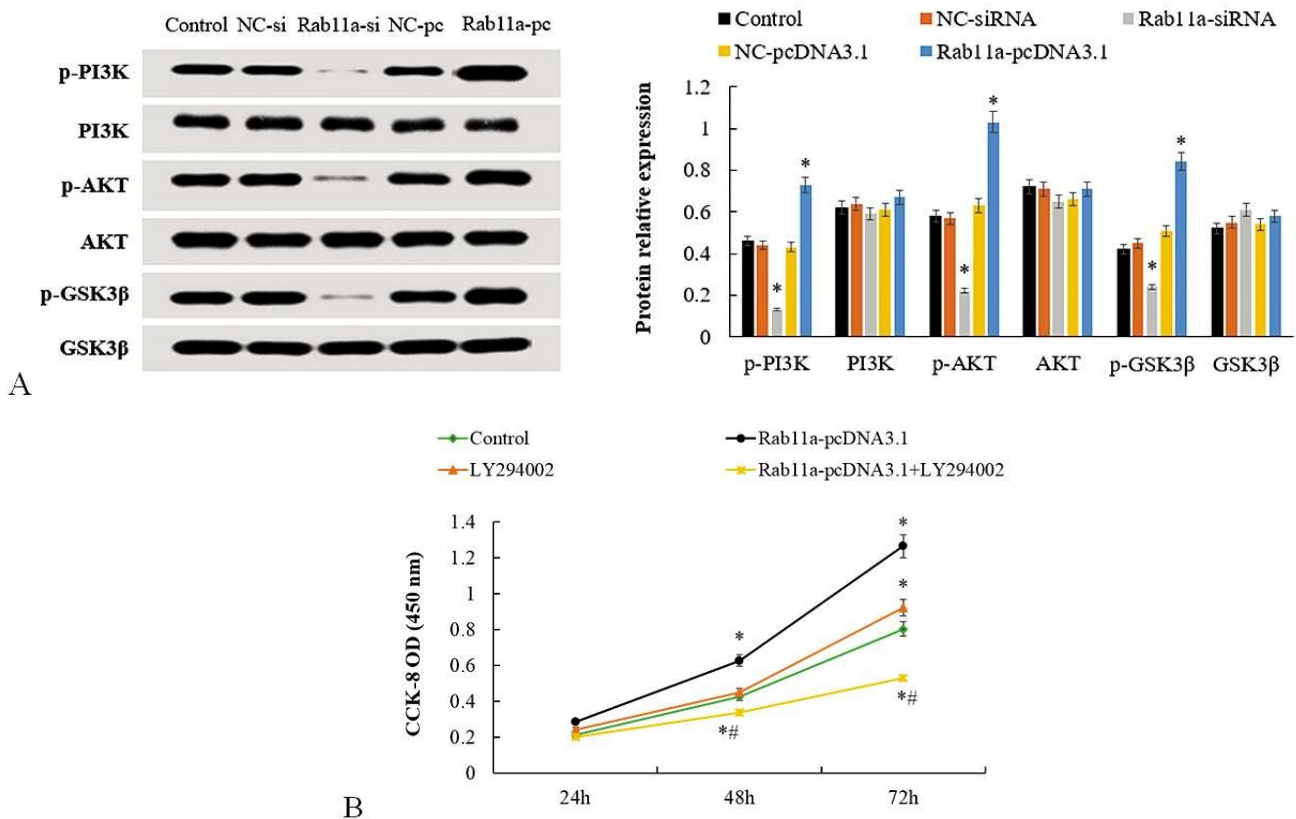


图 5 Rab11a 对胰腺癌细胞中 PI3K/AKT 信号通路的影响

Fig.5 The effect of Rab11a on PI3K/AKT signaling pathway in pancreatic cancer cells

Note: A: Determination of phosphorylation of PI3K, AKT and GSK3β by Western blot; B: Determination of cell viability at 24 h, 48 h and 72 h by CCK-8; Compared with the control group, $*P < 0.05$; Compared with the LY294002 group, $**P < 0.05$.

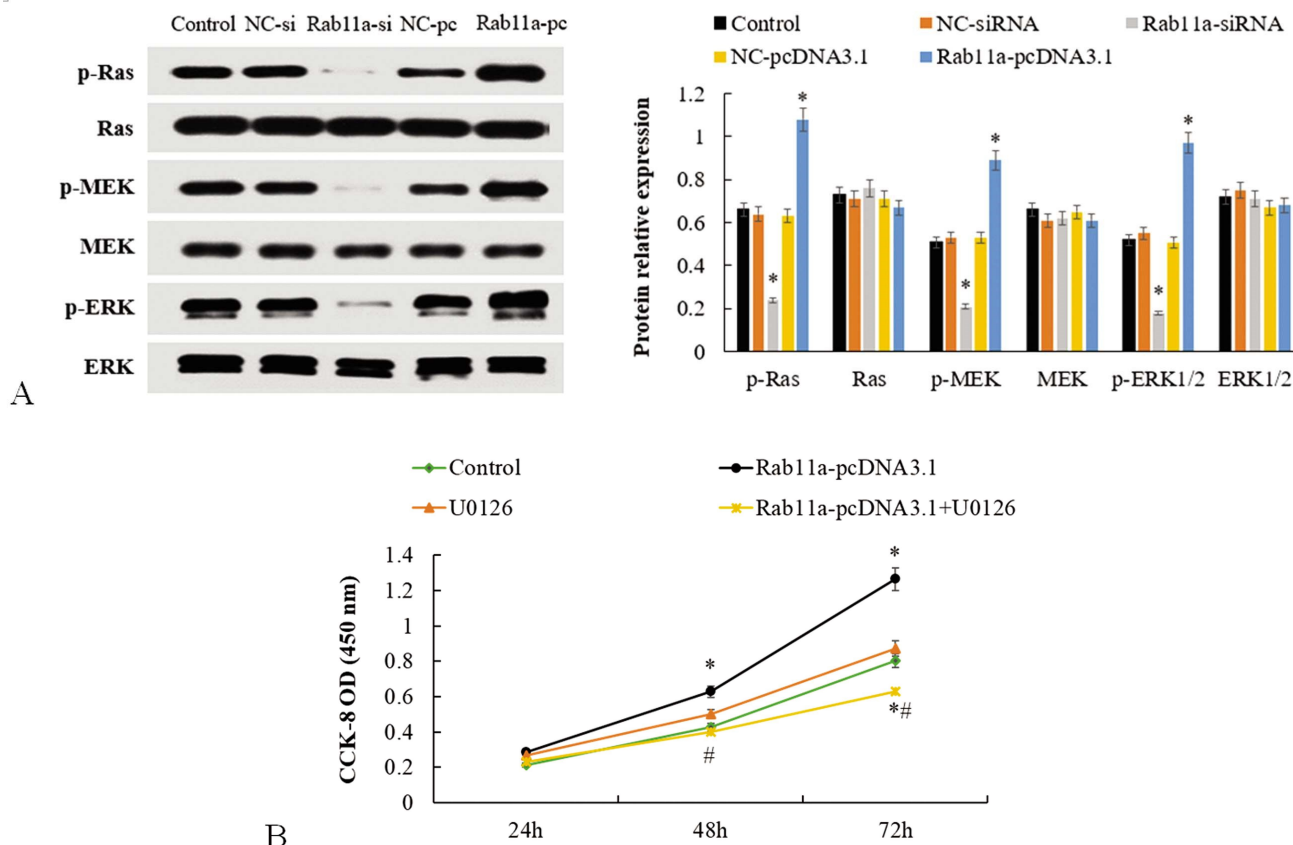


图 6 Rab11a 对胰腺癌细胞中 Ras/MEK/ERK 信号通路的影响

Fig.6 The effect of Rab11a on Ras/MEK/ERK signaling pathway in pancreatic cancer cells

Note: A: Determination of Phosphorylation of Ras, MEK and ERK1/2 by Western blot; B: Determination of cell viability at 24 h, 48 h and 72 h by CCK-8; Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with U0126 group, # $P < 0.05$.

达 Rab11a 的 pcDNA3.1 质粒上调了 Rab11a 的表达,研究发现靶向沉默 Rab11a 可抑制胰腺癌细胞增殖并诱导凋亡,同时也下调了癌细胞的运动性。然而, Rab11a 的过表达则促进了胰腺癌细胞的生长和转移能力。上述结果提示靶向 Rab11a 的分子疗法可能是治疗胰腺癌的新策略。

蛋白质激酶通过磷酸化过程调节细胞的转录、翻译、增殖、生长和存活等功能^[11-13]。据报道, PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路的激活可促进癌细胞的生长、存活和代谢^[14,15]。PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路的异常激活在人类多种癌细胞中均有发生^[1-18]。并且现已开发了针对该信号通路的几种药物^[11]。

PI3K/AKT 信号通路受肿瘤抑制基因 PTEN 的调控, PTEN 在大多数癌症中均发生突变并且负调节 AKT 的活性^[19]。相反, 当 AKT 通过抑制 PTEN 而激活时, 包括 mTOR、IKK、Bad、caspase 9 和 GSK3 β 在内的许多细胞蛋白就会被磷酸化, 从而调控细胞生长和凋亡。此外, 胶质母细胞瘤、子宫内膜癌和前列腺癌等多种癌症中 PI3K/AKT 信号通路的活化可促进癌细胞的侵袭、转移和耐药性^[20,21]。本研究发现, 上调 Rab11a 激活了 PANC1 细胞中的 PI3K/AKT 信号通路, 而这种激活作用可被 PI3K/AKT 选择性抑制剂 LY294002 所阻断, 进而抑制胰腺癌细胞增殖。

细胞外信号调节激酶 (ERK) 属于丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 亚族, ERK 是将胞外信号传导至胞内的传递者, 活化

的 ERK 可调节细胞的增殖和凋亡, 多种细胞因子及生长因子通过 Ras/MEK/ERK 信号通路激活 ERK^[22,23]。大量研究均发现, Ras/MEK/ERK 信号通路的激活通过促进细胞增殖来增加细胞存活。本研究也发现, 下调 Rab11a 可抑制 Ras/MEK/ERK 信号通路, 进而抑制胰腺癌细胞增殖。

GSK-3 β 是一种进化上保守的丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 具有促进线粒体介导的内源性凋亡的作用, 另外, GSK-3 β 也是 PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路的下游分子^[24]。活化的 AKT 可磷酸化 GSK3 β 的 Ser9 并抑制其活性, 从而减少肿瘤抑制因子 P53 与 GSK3 β 在线粒体中的结合。另外, 活化的 ERK 通过磷酸化 GSK-3 β 的 43 苏氨酸位点使其 Ser9 被 p90RSK 磷酸化, 最终导致 GSK-3 β 失活。本研究也发现, 下调 Rab11a 可诱导 GSK-3 β 的磷酸化。

综上所述, 本研究表明 Rab11a 的高表达是胰腺癌预后恶化的潜在生物标志物。靶向抑制 Rab11a 可通过抑制 PI3K/AKT 和 Ras/MEK/ERK 信号通路来降低胰腺癌的生长和转移能力。

参考文献 (References)

- [1] Oettle H. Progress in the knowledge and treatment of advanced pancreatic cancer: From benchside to bedside [J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(9): 1039-1047
- [2] Balmana M, Duran A, Gomes C, et al. Analysis of sialyl-Lewis x on MUC5AC and MUC1 mucins in pancreatic cancer tissues [J]. Int J

- Biol Macromol, 2018, 112: 33-45
- [3] Ding F, Zhang S, Gao S, et al. MiR 137 functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting MRGBP [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6): 4799-4807
- [4] Ramel D, Wang X, Laflamme C, et al. Rab11 regulates cell-cell communication during collective cell movements [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(3): 317-324
- [5] Hehnlly H, Doxsey S J. Rab11 endosomes contribute to mitotic spindle organization and orientation[J]. Dev Cell, 2014, 28(5): 497-507
- [6] Desclozeaux M, Venturato J, Wylie F G, et al. Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295(2): 545-556
- [7] Chung Y, Wei W, Huang S, et al. Rab11 regulates E-cadherin expression and induces cell transformation in colorectal carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 587-587
- [8] Johnson J L, He J, Ramadass M, et al. Munc13-4 is a Rab11-binding protein that regulates Rab11-positive vesicle trafficking and docking at the plasma membrane[J]. J Biol Chem, 2016, 291(7): 3423-3438
- [9] Chung Y, Wei W, Hung C, et al. Rab11 collaborates E cadherin to promote collective cell migration and indicates a poor prognosis in colorectal carcinoma[J]. Eur J Clin Invest, 2016, 46(12): 1002-1011
- [10] Choi J Y, Shin Y C, Yoon J H, et al. Molecular mechanism of constitutively active Rab11A was revealed by crystal structure of Rab11A S20V[J]. FEBS Lett, 2016, 590(6): 819-827
- [11] Chen D, Lin X, Zhang C, et al. Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 as a promising therapeutic strategy against paclitaxel-resistant gastric cancer via targeting PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 123-123
- [12] Ma M, Rodriguez A, Sugimoto K, et al. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition [J]. Curr Genet, 2020, 66(2): 327-333
- [13] Illiano M, Sapio L, Salzillo A, et al. Forskolin improves sensitivity to doxorubicin of triple negative breast cancer cells via Protein Kinase A-mediated ERK1/2 inhibition [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 152: 104-113
- [14] Ma Y, Zhou G, Li M, et al. Long noncoding RNA DANCER mediates cisplatin resistance in glioma cells via activating AXL/PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. Neurochem Int, 2018, 118: 233-241
- [15] Rosenberg L, Yoon CH, Sharma G, et al. Sorafenib inhibits proliferation and invasion in desmoid-derived cells by targeting Ras/MEK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. Carcinogenesis, 2018, 39(5): 681-688
- [16] Gu QZ, Nijati A, Gao X, et al. TROP2 promotes cell proliferation and migration in osteosarcoma through PI3K/AKT signaling [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(2): 1782-1788
- [17] Su C. Tanshinone IIA inhibits gastric carcinoma AGS cells by decreasing the protein expression of VEGFR and blocking Ras/Raf/MEK/ERK pathway[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2018, 41(4): 2389-2396
- [18] Zhang X, Liu G, Ding L, et al. HOXA3 promotes tumor growth of human colon cancer through activating EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(3): 2864-2874
- [19] Zhang S, Cui R. The targeted regulation of miR-26a on PTEN-PI3K/AKT signaling pathway in myocardial fibrosis after myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(2): 523
- [20] Wang Y, Gao C, Zhang Y, et al. Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways [J]. Gynecol Oncol, 2016, 143 (1): 168-178
- [21] Wang G, Fu X, Wang J, et al. Inhibition of glycolytic metabolism in glioblastoma cells by Pt3glc combined with PI3K inhibitor via SIRT3 mediated mitochondrial and PI3K/Akt-MAPK pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5888-5903
- [22] Fan X X, Li F, Lv Y N, et al. An integrated shotgun proteomics and bioinformatics approach for analysis of brain proteins from MCAO model using serial affinity chromatograph with four active ingredients from Shengmai preparations as ligands[J]. Neurochem Int, 2017, 103: 45-56
- [23] Yao W, Lin Z, Shi P, et al. Delicaflavone induces ROS-mediated apoptosis and inhibits PI3K/AKT/mTOR and Ras/MEK/Erk signaling pathways in colorectal cancer cells [J]. Biochemical Pharmacology, 2020, 171: 113680
- [24] Zhang X, Zhong S, Xu Y, et al. MicroRNA-3646 contributes to docetaxel resistance in human breast cancer cells by GSK-3 β / β -catenin signaling pathway[J]. PLOS ONE, 2016, 11(4): e0153194