

Rab40b在非小细胞肺癌中的表达及临床意义

梁亦贤 姜燕 陈秋强 章喜林

[摘要] 目的 探讨Rab40b在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达及临床意义。方法 收集NSCLC患者61例,采用实时荧光定量PCR技术(qRT-PCR)检测患者肿瘤组织和癌旁组织及NSCLC细胞中Rab40b的表达水平,并分析其表达与NSCLC患者临床病理特征间的关系;采用Transwell实验研究Rab40b对NSCLC细胞侵袭的影响;采用qRT-PCR检测上皮间质转化(EMT)相关基因的mRNA表达水平;应用数据库Kaplan-Meier Plot分析Rab40b表达水平与肺腺癌和肺鳞癌患者预后的关系。结果 Rab40b mRNA在NSCLC肿瘤组织中低表达,明显低于癌旁组织($t=4.60, P<0.05$),且其低表达与患者淋巴结转移、癌栓形成、肺膜侵袭、TNM分期密切相关(t 分别=2.07、2.04、1.98、2.87, P 均 <0.05);相比于正常肺上皮细胞BEAS-2B组,NSCLC细胞A549组和H1299组中Rab40b低表达(t 分别=4.42、4.77, P 均 <0.05),且过表达Rab40b可显著升高E-cadherin mRNA表达水平(t 分别=3.24、5.00, P 均 <0.05),抑制细胞侵袭,降低N-cadherin、Snail1和MMP2的mRNA表达水平(t 分别=2.56、7.46、3.81、4.33、4.02、4.69, P 均 <0.05)。结论 Rab40b作为抑癌基因,影响EMT过程,促进NSCLC恶性进展,为NSCLC的诊治提供新的策略和靶点。

[关键词] Ras家族成员40b; 非小细胞肺癌; 表皮间质转化; 临床意义

Expression and clinical significance of Rab40b in non-small cell lung cancer LIANG Yixian, JIANG Yan, CHEN Qiuqiang, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Huzhou University, Huzhou 313000, China.

[Abstract] **Objective** To explore the expression and clinical significance of Rab40b in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** A total of 61 NSCLC tumor tissues and matched paracancerous lung tissues were obtained. The mRNA level of Rab40b were detected using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The effects of Rab40b on cell invasive abilities were measured using the Transwell assays. The E-cadherin, N-cadherin, Snail1 and MMP2 levels were detected by qRT-PCR. The relationship between Rab40b expression and prognosis of lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma were analyzed using the Kaplan-Meier Plot databases. **Results** The mRNA level of Rab40b was lowly expressed in NSCLC tumor tissues compared with their matched paracancerous lung tissues ($t=4.60, P<0.05$). The low Rab40b mRNA expression was correlated with lymph node metastasis, cancer thrombus, pulmonary invasion, and TNM stages ($t=2.07, 2.04, 1.98, 2.87, P<0.05$). The expression of Rab40b was reduced in A549 and H1299 cells compared with in BEAS-2B cells ($t=4.42, 4.77, P<0.05$). In addition, overexpression of Rab40b significantly increased E-cadherin mRNA expression, suppressed cell invasion in vitro, and reduced N-cadherin, Snail1 and MMP2 mRNA expressions ($t=3.24, 5.00, 2.56, 7.46, 3.81, 4.33, 4.02, 4.69, P<0.05$). **Conclusion** Rab40b is a suppressor gene and promotes NSCLC progression via EMT, which providing a novel potential strategy and target for the diagnosis and treatment of NSCLC.

[Key words] Rab40b; non-small cell lung cancer; epithelial-mesenchymal transition; clinical significance

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2025.001.004

基金项目:湖州市基础公益应用研究项目(2021GZB03)

作者单位:313000 浙江湖州,湖州师范学院附属第一医院胸外科(梁亦贤、姜燕、陈秋强),中心实验室(章喜林)

通讯作者:章喜林,Email:zhangxilin16@126.com

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率居所有肿瘤第一位^[1]。根据病理类型,肺癌可分为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,

NSCLC)和小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC),其中NSCLC占有肺癌病例的75%~85%^[1,2]。由于缺乏早期诊断标志物,绝大多数患者确诊时已处于晚期,失去最佳治疗机会,导致五年生存率仅为15%^[2]。研究表明,肿瘤转移是NSCLC患者预后差的最主要影响因素^[3],而上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是调控NSCLC转移最关键的一环^[4]。前期有研究发现,Rab40b可与侵袭性伪足蛋白Tks5相互作用,调控侵袭性伪足的形成和肿瘤转移^[5]。本次研究通过分析Rab40b在NSCLC中的表达及临床意义,探讨其在NSCLC转移中的分子机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次研究获医院临床伦理委员会批准,所有患者及其家属签署知情同意书。选取2021年10月至2022年12月在湖州师范学院附属第一医院确诊为NSCLC患者的肿瘤组织和癌旁组织样本61例,其中男性33例、女性28例;平均年龄(65.27±11.35)岁;吸烟31例、不吸烟30例;TNM分期:I、II期40例,III、IV期21例;肿瘤大小>3 cm 17例、≤3 cm 44例;淋巴结转移13例、淋巴结未转移48例;分化程度:低分化程度11例、中/高分化程度50例;癌栓形成23例、无癌栓形成38例;侵及肺膜20例、未侵及肺膜41例。

1.2 主要试剂与仪器 限制性内切酶BamH I和Hind III、T4 DNA连接酶、5×PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)(RR036A)、SYBR Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus)(RR420A)由大连宝日生物Takara公司生产;基质胶(Matrigel® Matrix Basement Membrane)由BD公司生产;Transwell小室由Coring公司生产;NanoDrop 2000分光光度计由Thermo Fisher Scientific公司生产;Applied Biosystems 7500 RT-PCR仪由美国ABI公司生产。

1.3 细胞培养 人正常肺上皮细胞(BEAS-2B)和NSCLC细胞(A549、H1299)购自中科院干细胞库,所

有细胞均采用含有10%胎牛血清的高糖DMEM培养,培养条件为37℃、5%CO₂培养,待细胞密度80%以上开始消化、传代待用。

1.4 质粒构建 根据Rab40b基因的编码区序列,选择pXJ40-flag表达载体(以下简称空载组),设计并合成上游引物5'-CGCGGATCCGCCACCATGAGCGCCCTGGG-3',下游引物5'-CCCAAGCTTTTAAGAAATTTTGCAGCTGTT-3',经PCR扩增、DNA胶电泳和杭州有康生物技术有限公司测序鉴定扩增产物的大小和序列。选择序列正确质粒和空载利用双酶切法(BamH I和Hind III)37℃酶切2h,按照T4 DNA连接酶体系配制好反应体系,16℃连接过夜。经质粒转化、单克隆扩增、质粒抽提和测序鉴定,即可获得pXJ40-Rab40b-flag过表达质粒(以下简称过表达组)。

1.5 细胞侵袭检测 转染过表达Rab40b质粒的细胞24h后,采用胰蛋白酶消化细胞以无血清培养基配成500 000个/mL细胞悬液待用。Transwell小室上层铺5%~10%基质胶,再加入细胞悬液100 μL/孔,下层加入600 μL/孔完全培养基;37℃培养箱培养一定时间后,加入4%多聚甲醛室温固定30 min后,1%结晶紫染色液染色,显微镜拍照保存图片。利用30%乙酸溶解结晶紫,采用全波长酶标仪Spectra Max 190 reader检测570 nm处的吸光度值,并统计分析。

1.6 E-cadherin、N-cadherin、MMP2、Snail1和Rab40b mRNA表达水平检测 采用qRT-PCR法进行检测。细胞或组织溶于Trizol试剂裂解,提取细胞和组织中总RNA。取500 ng总RNA经逆转录试剂盒[5×PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)]合成cDNA。采用7500系统和SYBR Green染料检测E-cadherin、N-cadherin、MMP2、Snail1和Rab40b的mRNA水平,其中以18 s RNA为内参,采用2^{-ΔΔCt}计算相对mRNA,每个样本3个复孔。所用引物如表1所示。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
E-cadherin	ATTTTTCCTCGACACCGAT	TCCCAGGCGTAGACCAAGA
N-cadherin	TGCGGTACAGTGAACCTGGG	GAAACCGGGCTATCTGCTCG
Snail1	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	AGATGAGCAATGGCAGCGAG
MMP2	GATACCCCTTTGACGGTAAGGA	CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC
Rab40b	GTCCGGGCCTACGACTTTC	GGCCTGAAGTATCCCAGAGC
18 s RNA	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

1.7 Kaplan-Meier Plot 数据库 输入网址(<http://kmpplot.com/analysis/>), 进入 Kaplan-Meier Plot 数据库, 选择 mRNA (RNA-seq) 中 Start KM Plotter for pan-cancer 按钮, 在 Gene symbol 中输入 Rab40b 基因, 在 Survival 中选择 OS 或 RFS, 肿瘤类型选择 Lung adenocarcinoma 和 Lung squamous cell carcinoma (因 TCGA 数据库中肺癌数据集太大, 且肺腺癌和肺鳞癌患者预后差异较大, 故将肺腺癌和肺鳞癌数据集分开处理), 其它不做改变, 即可获得 Rab40b 表达水平与肺腺癌和肺鳞癌患者的总体生存期 (overall survival, OS) 和无复发进展期 (recurrence-free survival, RFS) 的关系图。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件分析。计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间采用独立样本 *t* 检验, 多组样本采用单因素方差分析, 生存数据分析采用 *log-rank* 检验, 相关性分析采用 *Pearson* 分析。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 癌组织及癌旁组织 Rab40b mRNA 水平比较 NSCLC 癌组织 Rab40b mRNA 水平为 (0.99±0.02), 明显低于癌旁组织 Rab40b mRNA 水平 (2.40±0.31), 差异有统计学意义 ($t=4.60, P < 0.05$)。

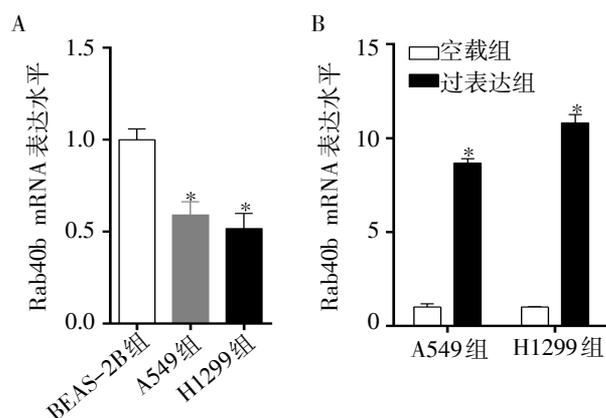
2.2 Rab40b mRNA 表达水平与 NSCLC 患者临床病理特征的相关性分析见表 2

表 2 Rab40b mRNA 表达水平与患者病理特征的相关性分析

特征		Rab40b mRNA 表达水平	<i>t</i>	<i>P</i>
性别	女	0.96±0.04	0.45	>0.05
	男	1.02±0.03		
年龄	>65 岁	1.00±0.03	0.97	>0.05
	≤65 岁	0.98±0.04		
吸烟史	有	1.01±0.03	0.40	>0.05
	无	0.97±0.05		
肿瘤大小	>3.0 cm	0.98±0.03	0.84	>0.05
	≤3.0 cm	1.00±0.04		
肿瘤分化程度	高/中	1.02±0.03	0.57	>0.05
	低	0.96±0.02		
淋巴结转移	有	0.94±0.03	2.07	<0.05
	无	1.05±0.04		
TNM 分期	I、II 期	1.07±0.02	2.87	<0.05
	III、IV 期	0.92±0.04		
癌栓形成	有	0.95±0.03	2.04	<0.05
	无	1.04±0.04		
肺膜侵袭	有	0.96±0.03	1.98	<0.05
	无	1.03±0.03		

由表 2 可见, Rab40b mRNA 表达水平与 NSCLC 患者淋巴结转移、TNM 分期、癌栓形成和肺膜侵袭密切相关, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 而与性别、年龄、吸烟史、肿瘤大小和肿瘤分化程度无关 (P 均 > 0.05)。

2.3 正常肺上皮细胞组、A549 组和 H1299 组细胞 Rab40b mRNA 表达水平比较见图 1



注: A: qRT-PCR 检测 BEAS-2B、A549 和 H1299 中 Rab40b mRNA 水平; B: qRT-PCR 检测 A549-空载组、A549-过表达组、H1299-空载组和 H1299-过表达组中 Rab40b mRNA 水平。

图 1 正常肺上皮细胞组、A549 组和 H1299 组细胞 Rab40b mRNA 表达水平比较

由图 1 可见, 相比于正常肺上皮细胞 (BEAS-2B) 组, A549 组和 H1299 组细胞 Rab40b mRNA 水平显著降低, 差异均有统计学意义 (t 分别=4.42、4.77, P 均 < 0.05)。相比于 A549-空载组和 H1299-空载组, A549-过表达组和 H1299-过表达组可显著升高 Rab40b mRNA 水平, 差异均有统计学意义 (t 分别=26.21、21.66, P 均 < 0.05)。

2.4 A549-空载组、A549-过表达组、H1299-空载组和 H1299-过表达组细胞侵袭比较见图 3

由封三图 1 可见, 相比于 A549-空载组和 H1299-空载组, A549-过表达组和 H1299-过表达组结晶紫染色细胞数量明显减少。

2.5 A549-空载组、A549-过表达组、H1299-空载组和 H1299-过表达组细胞中 EMT 相关基因 mRNA 表达水平比较见图 2

由图 2 可见, 相比于 A549-空载组和 H1299-空载组, A549-过表达组和 H1299-过表达组细胞中 E-cadherin mRNA 显著升高, 差异均有统计学意义 (t 分别=3.24、5.00, P 均 < 0.05), 而 A549-过表达组和 H1299-过表达组细胞中 N-cadherin、Snail1 和 MMP2 mRNA 显著降低, 差异均有统计学意义 (t 分别=2.56、7.46、3.81、4.33、4.02、4.69, P 均 < 0.05)。

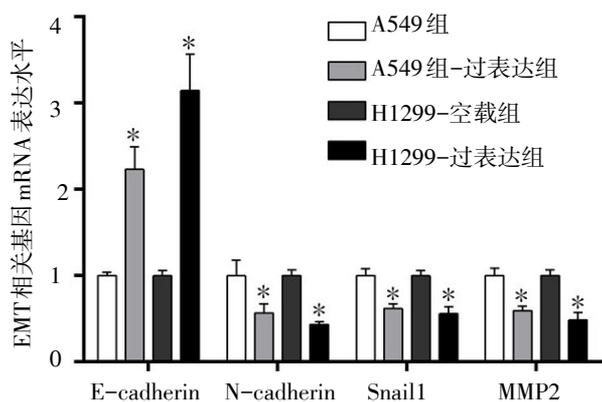


图2 四组细胞EMT相关基因水平比较

2.6 Rab40b低表达肺腺癌组、Rab40b高表达肺腺癌组、Rab40b低表达肺鳞癌组和Rab40b高表达肺鳞癌组患者的OS和RFS比较见封三图2

由封三图2可见,相比于Rab40b高表达组,Rab40b低表达肺腺癌和肺鳞癌组患者的OS短,差异均有统计学意义($P < 0.05$);且Rab40b低表达肺腺癌组患者的RFS短于Rab40b高表达组患者,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而Rab40b低表达肺鳞癌组患者的RFS与Rab40b高表达组患者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

NSCLC是我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率已升至所有肿瘤的第一位。由于缺少灵敏度高、特异性强的诊断标志物,大多数患者一经确诊已处于晚期,失去最佳的手术治疗机会,且晚期患者易发生转移,严重影响患者生存质量和预后,给社会和家庭带来了沉重负担。研究表明,肿瘤转移是影响NSCLC患者预后差的最主要因素。因此,深入研究NSCLC转移关键调控蛋白的分子机制,并推动新药物靶点的发现具有迫切的临床需求。

Rab蛋白属于Ras超家族最主要的一员,主要在囊泡的内吞、运输等方面发挥重要调控作用。大量研究表明,Rab蛋白在NSCLC中异常表达,参与了NSCLC的发生发展,可作为NSCLC患者预后的评估指标,如Rab11^[6]、Rab27a^[7]、Rab27b^[7]、Rab25^[8]、Rab13^[9]、Rab38^[10]、Rab26^[11]、Rab17^[12]、Rab11a^[13]、Rab35^[14]、Rab11a^[15]、Rab32^[16]等。本次研究发现Rab40b在NSCLC中低表达,且其低表达与患者淋巴结转移、癌栓形成、肺膜侵袭和TNM分期密切相关,表明Rab40b可作为抑癌基因,在NSCLC发生发展中扮演着保护作用。进一步的生存分析结果表明,

Rab40b低表达患者的OS和RFS短,可作为NSCLC患者预后诊断的潜在标志物。这些结果揭示了Rab40b在NSCLC发生发展及预后中发挥重要调控作用,但其分子机制还不清楚。

前期有研究发现,Rab40b可与侵袭性伪足蛋白Tks5相互作用,调控侵袭性伪足的形成和肿瘤转移^[5];Prekeris等^[17]团队发现在细胞迁移过程中,Rab40b可介导Cullin5相互作用,调控Eplln的表达水平,促进细胞骨架改变,从而导致细胞迁移和肿瘤转移;或者调控Rap2的定位,影响其活性,从而导致细胞迁移和肿瘤转移^[18]。本研究发现过表达Rab40b可显著抑制细胞侵袭,且显著升高E-cadherin mRNA的表达水平,抑制N-cadherin、Snail1和MMP2 mRNA的表达水平,表明EMT过程被抑制。这些结果表明Rab40b可通过影响EMT过程,促进细胞迁移和侵袭,进而导致NSCLC恶性进展。

综上所述,本研究中发现Rab40b在NSCLC中低表达,且其低表达与患者淋巴结转移、癌栓形成、肺膜侵袭、TNM分期和预后密切相关。机制表明其介导EMT过程影响NSCLC恶性进展,可作为NSCLC患者的预后和转移诊断提供潜在标志物。但本研究也存在不足,未能提供更多的实验去探索Rab40b如何激活EMT促进NSCLC发生发展的分子机制,以及建立动物模型在体内探索Rab40b在NSCLC中的功能和机制。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- 2 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- 3 Baydoun A, Lee VL, Biswas T. Oligometastatic non-small cell lung cancer: A practical review of prospective trials [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(21): 5339.
- 4 Xie S, Wu Z, Qi Y, et al. The metastasizing mechanisms of lung cancer: Recent advances and therapeutic challenges[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138: 111450.
- 5 Zacharias M, Brcic L, Eidenhammer S, et al. Bulk tumour cell migration in lung carcinomas might be more common than epithelial-mesenchymal transition and be differently regulated[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 717.
- 6 Dong W, Li H, Wu X. Rab11-FIP2 suppressed tumor growth via regulation of PGK1 ubiquitination in non-

- small cell lung cancer[J].Biochem Biophys Res Commun, 2019,508(1):60-65.
- 7 Koh HM, Song DH. Prognostic role of Rab27A and Rab27B expression in patients with non-small cell lung carcinoma[J].Thorac Cancer, 2019, 10(2):143-149.
 - 8 Wang J, Zhou P, Wang X, et al. Rab25 promotes erlotinib resistance by activating the beta1 integrin / AKT / beta-catenin pathway in NSCLC[J]. Cell Prolif, 2019, 52(3): e12592.
 - 9 Ge T, Wu HC, Zhou YY, et al. MiR-296-3p may affect the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells via regulating RABL3[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(13):5823-5830.
 - 10 Hsieh JJ, Hou MM, Chang JW, et al. RAB38 is a potential prognostic factor for tumor recurrence in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Lett, 2019, 18(3):2598-2604.
 - 11 Liu N, Wu Z, Chen A, et al. SNRPB promotes the tumorigenic potential of NSCLC in part by regulating RAB26[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(9):667.
 - 12 Wang M, Wang W, Ding J, et al. Downregulation of Rab17 promotes cell proliferation and invasion in non-small cell lung cancer through STAT3 / HIF-1alpha / VEGF signaling[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(2):379-388.
 - 13 Zhang Y, Su H, Wudu M, et al. TBC1 domain family member 23 interacts with Ras-related protein Rab-11A to promote poor prognosis of non-small-cell lung cancer via beta1-integrin[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(18): 8821-8835.
 - 14 Wen H, Liu Z, Tang J, et al. MiR-185-5p targets RAB35 gene to regulate tumor cell-derived exosomes-mediated proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(17): 21435-21450.
 - 15 Gombodorj N, Azuma Y, Yokobori T, et al. RAB11A expression is associated with cancer aggressiveness through regulation of FGFR-signaling in lung squamous cell carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2022, 29(11):7149-7162.
 - 16 Kosibaty Z, Brustugun OT, Zwicky Eide IJ, et al. Ras-related protein rab-32 and thrombospondin 1 confer resistance to the EGFR tyrosine kinase inhibitor osimertinib by activating focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(14):3430.
 - 17 Linklater ES, Duncan ED, Han KJ, et al. Rab40-Cullin5 complex regulates EPLIN and actin cytoskeleton dynamics during cell migration[J]. J Cell Biol, 2021, 220(7): e202008060.
 - 18 Duncan ED, Han KJ, Trout MA, et al. Ubiquitylation by Rab40b / Cul5 regulates Rap2 localization and activity during cell migration[J]. J Cell Biol, 2022, 221(4): e202107114.

(收稿日期 2024-03-15)

(本文编辑 葛芳君)

· 消 息 ·

本刊已加入中国期刊全文数据库、万方数据—数字化期刊刊群、维普资讯—中文科技期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊(光盘版)全文的声明

为了实现期刊编辑、出版工作的网络化,我刊现已入网中国期刊全文数据库、万方数据—数字化期刊群、维普资讯—中文科技期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊(光盘版)全文。所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入以上数据库,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊或特别声明需另作处理。不再另付稿酬。

《全科医学临床与教育》编辑部