文章编号：1005-6947(2013)05-0624-05

· 基础研究 ·

Rab25 基因对人乳腺癌细胞的生物学行为的影响及其与 Her-2/neu 基因的关系

李杰华，吴非，陆云飞

（广西医科大学第一附属医院 胃肠腺体外科，广西 南宁 530021）

摘　要

目的：探讨 Rab25 基因表达水平对乳腺癌细胞生物学活性的影响以及其作用与 Her-2/neu 基因的关系。

方法：通过质粒转染和 RNA 干扰采用，升高或降低不同的乳腺癌细胞株 Rab25 基因表达，以及升高或降低稳定表达 Rab25 基因的不同乳腺癌细胞株 Her-2/neu 基因表达。检测各组细胞的增殖活性、克隆形成率和转移侵袭力。

结果：不同细胞株 Rab25 转染组的增殖活性、克隆形成率、转移侵袭力均较其 Rab25 干扰组、原株细胞组及阴性对照组有明显增强（均 $P<0.05$）。在稳定表达 Rab25 基因的不同乳腺癌细胞系中无论升高或降低 Her-2/neu 基因表达，其增殖活性、克隆形成率、转移侵袭力均无明显改变（均 $P>0.05$）。

结论：Rab25 基因在乳腺癌细胞中发挥着促进癌细胞生长、增强其增殖及侵袭的作用，且 Her-2/neu 基因的表达水平不能影响其发挥作用。

关键词　乳腺肿瘤；Rab25；基因，erbB-2；细胞增殖；肿瘤侵润

中图分类号：R737.9　　**文献标志码：**A

DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.019
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3501.shtml

Effects of Rab25 gene on biological behaviors in human breast cancer cells and its relation with Her-2/neu gene

LI Jiehua, WU Fei, LU Yunfei

(Department of Gastrointestinal and Gland Surgery, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Corresponding author: *LI Jiehua, Email: lijiehua01@sina.com*

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of the expression level of Rab25 gene on the biological behaviors of breast cancer cells and the relation of its action with Her-2/neu.

Methods: The Rab25 gene in different breast cancer cell lines and Her-2/neu gene in different breast cancer cell lines with stable Rab25 gene expression were increased or decreased by using plasmid transfection and RNA interference techniques. The proliferative activity, colony formation and invasive ability in each group of cells were determined.

收稿日期：2012-12-06；**修订日期：**2013-04-22。

作者简介：李杰华，广西医科大学第一附属医院主治医师，主要从事乳腺甲状腺外科临床及基础方面的研究。

通信作者：李杰华，Email: lijiehua01@sina.com

© 版权归中国普通外科杂志所有

Results: The proliferation activity, colony formation rate, and invasion ability were all significantly increased in groups of cells transfected with Rab25 gene compared with their corresponding groups of cells with Rab25 gene interference, ogrinal cell lines and negative control group of cells (all $P<0.05$). The proliferation activity, colony formation rate, and invasion ability in different breast cell lines stably expressing Rab25 gene showed no significant alteration regardless of the Her-2/neu gene expression increase or decrease (all $P>0.05$).

Conclusion: Rab25 gene exerts a promoting effect on growth, proliferation and invasiveness in breast cancer cells, and the expression level of Her-2/neu gene can not influence its action.

KEY WORDS Breast Neoplasms; Rab25; Genes, erbB-2; Cell Proliferation; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R737.9　**Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.019

Rab 蛋白家族是 Ras 超家族中最大的亚家族，参与细胞内囊泡的形成，转运及黏附，囊泡运输的障碍导致蛋白质无法到达目的地，从而促使多种疾病的发生，包括癌症[1-2]。Rab25 基因是 Rab 基因亚家族中的一个成员，它可能与乳腺癌的多种生物学行为有关[3]。Her-2/neu 基因是表皮生长因子受体家族的成员，与细胞的生长和发育有密切关系[4]。目前研究一致认为 Her-2/neu 癌基因蛋白的高表达与乳腺癌发生的进程和转移的潜能呈正相关[5]。Rab25 基因作为近年发现的与上皮组织来源性的肿瘤相关的癌基因，与其他乳腺癌癌基因的关系未见文献报道。本实验将 Her-2/neu 基因与 Rab25 基因进行联合研究，探讨两者在乳腺癌细胞中的生物学行为及相互关系。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　主要试剂　TrizolRNA 提取试剂盒及脂质体 lipofectamin™2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司；Her-2/neu 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG，增强化学发光剂（ECL）膜，聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）及细胞培养试剂均购自福州迈新公司。肌动蛋白（actin）单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.1.2　细胞、菌株和载体　人乳腺癌细胞株 MCF-7，MM231，SK-BR-3 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库，简便的构建重组表达载体的基因克隆方法（in-fusion PCR cloning kit）试剂盒和感受态大肠杆菌 DH-5α 均购自 Clontech 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　使用含 10% 小牛血清的低限基本培养基（MEM）及胰岛素作为人乳腺癌细胞 MCF-7 培养基，使用含 10% 小牛血清的 MEM 作为 SK-BR-3 培养基，使用含 10% 小牛血清的 L-15 作为 MM231 培养基，进行培养。

1.2.2　逆转录－多聚酶链反应（RT-PCR）　用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测逆转录－多聚酶链反应（RT-PCR）试剂盒扩增 Rab25 基因目的片段（152 bp）。

1.2.3　建立 Rab25 表达水平不同的乳腺癌细胞株　将 MCF-7 细胞中的 Rab25 总 RNA 作为模板，扩增 Rab25 cDNA 全长（649 bp），行 RT-PCR 反应。利用 in-fusion PCR cloning kit，按说明书操作，将 PCR 产物片段连接到 pDNR-Dual 载体上，转化感受态大肠杆菌 DH-5α，抽提质粒。研究系列的细胞株经培养传代后，建立稳定转染 RAB25 基因的细胞株。再利用 RNAi 人 / 鼠对照试剂盒（human/mouse control kit）将 Rab25 特定的 siRNA 转染至上述所有系列的乳腺癌细胞株中，得到 Rab25 低表达的细胞株。

1.2.4　建立 Her-2/neu 表达水平不同的乳腺癌细胞株　同上法将 SK-BR-3 细胞中的 Her-2/neu 总 RNA 作为模板，扩增 Her-2/neu cDNA 全长（3 856 bp），行 RT-PCR 反应。利用 in-fusion PCR cloning kit，按说明书操作，将 PCR 产物片段连接到 pDNR-Dual 载体上，转化感受态大肠杆菌 DH-5α，抽提质粒。在已转染 Rab25 基因的细胞中，通过脂质体 lipofectamin™2000 进行质粒 pDNR-Dual-Her-2/neu 的转染，同时转染 pDNR-Dual 空白对照质粒。建立稳定转染 Her-2/neu 基因的 MCF-7 细胞株并扩大培养备用。同时培养转染空质粒的乳腺癌细胞作为阴性对照。利用 QIAGEN 公司 RNAi human/mouse control kit

© 版权归中国普通外科杂志所有

将 Her-2/neu 特定的 siRNA，通过脂质体 lipofectamin™2000 转染至所有研究系列的乳腺癌细胞株 MCF-7，MDA-MB-231 和 SK-BR-3 中，得到 Her-2/neu 低表达的细胞株，扩大培养备用。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖活性 取对数生长期细胞，用含 10% 小牛血清的培养液配制成单细胞悬液，接种于 96 孔培养板，继续培养 4 h 后，每孔加 DMSO 150 μL，用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度值（*A* 值）。以时间为横轴，*A* 值为纵轴，绘制细胞生长曲线。实验重复 3 次，设 3 个复孔，取平均值为最终结果。

1.2.6 克隆形成实验 取各组处于对数生长期的细胞接种于培养皿中，至肉眼观可见克隆集落时终止培养。显微镜下计数细胞数大于 50 的克隆集落的个数，计算克隆形成率：克隆数 / 接种细胞数 ×100%。每组细胞计数 3 次取平均值。

1.2.7 细胞侵袭力检测 采用基质凝胶(matrigel) 侵袭力检测法检测细胞侵袭力。0.25% 胰蛋白酶消化各研究系列的细胞株。Boyden 小室上下室之间用聚碳酸酯微孔膜分开，膜上铺稀释的基质胶，上室加无血清培养基稀释的细胞悬液。显微镜下计数穿过基质胶的细胞数。计数在 200 倍视野下，将膜分成 9 格，仅计数最中间一格的细胞数量。每个标本均进行 3 次检测后取平均值。

1.3 统计处理

采用 SPSS13.0 软件处理数据，计量资料以均数 ± 标准（$\bar{x} \pm s$）差表示，采用方差分析和 *t* 检验，$P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结 果

2.1 细胞增殖活力

连续 7 d 检测各样本细胞的吸光度值（A_{490}）根据测得的 *A* 值绘制各株细胞的生长曲线图（图 1）。从第 2 天开始转染后各转染组细胞增殖活性明显增强（$P<0.05$）；干扰后各干扰组细胞较转染组细胞的增殖活性明显下降（$P<0.05$）；空质粒对照组细胞增殖力与原株细胞及干扰组细胞无统计学差异（$P>0.05$）。

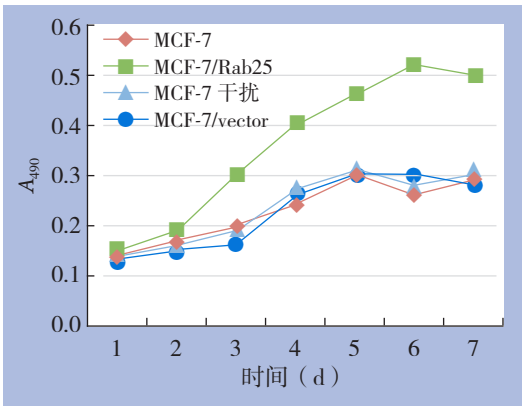

图 1 Rab25 对 MCF-7 细胞株增殖的影响

Figure 1 The effect of Rab25 gene on MCF-7 cell proliferation

2.2 各组细胞克隆计数和侵袭力比较

在各株细胞中，转染组细胞的克隆数均高于其他组细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$）。干扰组与原株组及对照组间无统计学差异($P>0.05$)；转染组细胞穿过 matrigel 的细胞数均高于其他组细胞，差异有统计学意义（$P<0.05$）。干扰组与原株组及对照组间无统计学差别($P>0.05$)(表 1)。

表 1 Rab25 对不同乳腺癌细胞株克隆能力和侵袭力的影响（$x \pm s$）

Table 1 The effect of Rab25 gene on colony formation rate and invasion ability in different breast cancer cells ($x \pm s$)

组别	克隆数			迁移数		
	MCF-7	SK-BR-3	MM231	MCF-7	SK-BR-3	MM231
原株组	43.88 ± 2.27	63.54 ± 4.00	49.40 ± 3.28	36.04 ± 4.43	45.39 ± 2.98	44.27 ± 4.65
转染组	73.66 ± 3.38[1)]	93.91 ± 3.19[1)]	71.19 ± 2.63[1)]	78.37 ± 5.22[1)]	80.47 ± 5.62[1)]	82.31 ± 3.39[1)]
干扰组	39.73 ± 2.15	63.66 ± 2.77	45.49 ± 1.75	40.35 ± 2.68	43.34 ± 5.31	41.22 ± 5.55
对照组	42.50 ± 1.52	64.23 ± 3.29	48.52 ± 3.69	38.83 ± 4.27	44.49 ± 4.11	40.64 ± 4.11

注：1）与其他组比较，$P<0.05$

Note：1) $P<0.05$ *vs*. other groups

2.3 各组细胞增殖活力比较

根据测得的 *A* 值绘制各株细胞的生长曲线。各株细胞转染 Rab25 基因后，从第 3 天开始其增殖活性较原株组及对照组明显增强（$P<0.05$），转染 Her-2/neu 基因后，其增殖活性较单转染 Rab25 基因的细胞组无明显改变（$P>0.05$），将 Her-2/neu 基因干扰后，增殖活性较干扰前无明显变化（图 2）。

2.4 各组细胞克隆计数比较

转染入 Rab25 基因的 MCF-7 细胞的克隆数较原株及对照组明显增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）。表达 Rab25 基因的 MCF-7 细胞中

© 版权归中国普通外科杂志所有

Her-2/neu 基因转染组与干扰 Her-2/neu 基因组细胞的克隆数无统计学差异（$P>0.05$），与原株及对照组有统计学差异（$P<0.05$）（表 2）。乳腺癌细胞 MM231 和 SK-BR-3 中转染入 Rab25 后的细胞克隆数较原株组及对照组明显上升（$P<0.05$）。而 Rab25 稳定表达的细胞中干扰 Her-2/neu 基因后，细胞的克隆数与干扰前无统计学差异（$P>0.05$），且干扰后的克隆能力与原株组及对照组的克隆数有统计学差异（$P<0.05$）（表 3）。

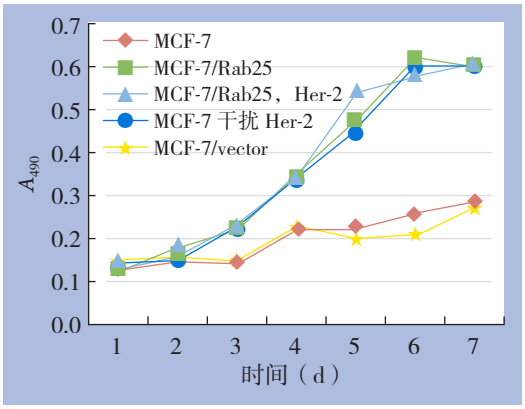

图 2　Rab25 和 Her-2/neu 基因对 MCF-7 细胞增殖的影响

Figure 2　The effects of Rab25 and Her-2/neu on MCF-7 cell proliferation

表 2　Rab25 和 Her-2/neu 基因转染对 MCF-7 细胞克隆能力和侵袭力的影响（$x \pm s$）

Table 2　The effect of Rab25 and Her-2/neu gene transfection on colony formation and invasion ability in MCF-7 cells($x \pm s$)

组别	克隆形成数	细胞迁移数
MCF-7（原株组）	46.22 ± 6.12	40.25 ± 5.57
MCF-7/Rab25	83.56 ± 4.34[1)]	77.62 ± 4.26[1)]
MCF-7/Rab25，Her-2/neu	85.92 ± 2.63[1)]	81.14 ± 3.91[1)]
MCF-7/ 干扰 Her-2/neu	83.19 ± 4.47[1)]	79.64 ± 5.84[1)]
MCF-7/vector（对照组）	44.39 ± 4.76	38.79 ± 3.42

注：1）与原株组和对照组比较，$P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ *vs*. original cell line group or control group

表 3　Rab25 和 Her-2/neu 基因转染对 MM231，SK-BR-3 细胞克隆能力和侵袭力的影响（$x \pm s$）

Table 3　The effect of Rab25 and Her-2/neu gene transfection on colony formation and invasion ability in MM231 and SK-BR-3($x \pm s$)

组别	克隆数		迁移数	
	SK-BR-3	MM231	SK-BR-3	MM231
原株组	52.59 ± 3.13	38.37 ± 4.12	55.46 ± 2.67	42.29 ± 5.5
转染组	86.67 ± 5.22[1)]	79.32 ± 3.99[1)]	81.22 ± 5.44[1)]	75.54 ± 2.23[1)]
干扰组	76.68 ± 4.26[1)]	76.52 ± 5.45[1)]	79.59 ± 5.02[1)]	71.77 ± 4.55[1)]
对照组	50.25 ± 5.24	39.61 ± 4.64	49.63 ± 4.37	40.18 ± 4.69

注：1）与原株组和对照组比较，$P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ *vs*. original cell line group or control group

2.5　各组细胞侵袭力的比较

转染入 Rab25 基因的 MCF-7 细胞穿过基质胶的细胞数较原株及对照组明显增加（$P<0.05$）。稳定表达 Rab25 基因的 MCF-7 细胞中 Her-2/neu 基因转染组与干扰组穿过基质胶的细胞数无统计学差异（$P>0.05$），与原株及对照组有统计学差异（$P<0.05$）（表 2）。乳腺癌细胞 MM231 和 SK-BR-3 中转染入 Rab25 后的细胞株穿过基质胶的细胞数较原株组及对照组明显上升（$P<0.05$）。而 Rab25 稳定表达的细胞中干扰 Her-2/neu 基因后，穿过基质胶的细胞数与干扰前无统计学差异（$P>0.05$），且干扰后穿过基质胶的细胞数与原株组及对照组有统计学差异（$P<0.05$）（表 3）。

3　讨　论

目前国外多项研究[6]表明，Rab25 基因可能与乳腺癌的多种生物学行为有关，Rab25 在多种上皮源性恶性肿瘤中均出现表达上调现象[7]。本研究结果显示，乳腺癌细胞株 MCF-7，SK-BR-3 和 MM231 在转染 Rab25 基因后，增殖活性、克隆形成能力和侵袭力均有显著增强，说明 Rab25 基因表达的上调能增强乳腺癌细胞的增殖及侵袭能力。相反，经过干扰 Rab25 基因的表达，Rab25 基因表达的下调能减弱乳腺癌细胞的增殖及侵袭能力。这种生物学特性的改变提示 Rab25 基因表达异常直接导致乳腺癌细胞生物学行为的紊乱，即细胞胞浆内囊泡运输障碍，使细胞正常的增殖、分化及代谢发生紊乱[8-9]，最终导致细胞的恶性改变，表现出典型的肿瘤细胞恶性侵袭的特点。同时本实验在众多乳腺癌细胞株中选取了分化程度不同的 3 株乳腺癌细胞进行上述研究，均得出无差异性的结论；即 Rab25 的高表达对乳腺癌细胞起到促进其生长及增加其恶性程度的作用，提示 Rab25 对乳腺癌细胞的生物学行为具有相对独立的作用，与细胞分化程度无关。

Her-2/neu（又称 c-erbB-2 基因）是目前研究较为透彻的乳腺癌癌基因之一，表现为编码受体蛋白的过度表达[10-11]，主要参与调控生长，促进肿瘤增殖及分化，与肿瘤的病理机制和发展密切相关[12-13]。由于 Her-2/neu 在乳腺癌细胞中过度表达，常提示恶性程度高，预后差[14-15]，与乳腺癌关系密切，因此被公认为最具有代表性的乳腺癌标志物[16]。作为乳腺癌独立预后因素的 Her2/

© 版权归中国普通外科杂志所有

neu基因与Rab25基因的相互关系在国内外均未见相关报道。本研究结果显示，Rab25转染入Her-2/neu表达水平不同的乳腺癌细胞株后，细胞株的增殖，侵袭能力明显增强。关于Her-2/neu转染对Rab25高表达的乳腺癌细胞株生物活性的影响，本实验表明，Rab25高表达的乳腺癌细胞株增殖侵袭能力不受Her-2/neu表达水平的影响，提示Rab25与Her-2/neu在对乳腺癌细胞的生物学行为的调控上没有协同作用。由于Her-2/neu基因编码的蛋白具有酪氨酸激酶活性，当其活性强化后，信息通道活性提高，促进Her-2/neu在细胞膜过度表达，加速了细胞的增殖，细胞过度增殖导致肿瘤形成和增长加快[17-18]。而Rab25基因编码的蛋白是调控细胞内囊泡运输的，通过黏附因子和其他效应因子促使囊泡与靶膜融合，从而达到信息传递正确的目的，当其强化表达后，囊泡运输发生紊乱，使胞内信息无法正常沿细胞骨架运输，导致细胞增殖能力及侵袭力发生改变，最终肿瘤发生。

本研究证明Rab25与Her-2/neu通过不同途径影响乳腺癌细胞的生物学活性，同时也证实两者在对癌细胞的恶性改变上并无联系，而以不同途径增强乳腺癌细胞的增殖及侵袭能力，说明两者在癌细胞内的基因调节也无直接联系。本文结论为乳腺癌的基础研究提供了新的理论依据。

参考文献

[1] Dozynkiewicz MA, Jamieson NB, Macpherson I, et al. Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression[J]. Dev Cell, 2012, 22(1):131–145.

[2] Agarwal R, Jurisica I, Mills GB, et al. The emerging role of the RAB25 small GTPase in cancer[J]. Traffic, 2009, 10(11):1561–1568.

[3] Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, et al. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers[J]. Nat Med, 2004, 10(11):1251–1256.

[4] Cha YJ, Jung WH, Koo JS. The clinicopathologic features of molecular apocrine breast cancer[J]. Korean J Pathol, 2012, 46(2):169–176.

[5] Robertson KW, Reeves JR, Smith G, et al. Quantitative estimation of epidermal growth factor receptor and C-erbB-2 in human breast cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56(16):3823–3830.

[6] Pereira-Leal JB, Strom M, Godfrey RF, et al. Structural determinants of Rab and Rab Escort Protein interaction: Rab family motifs define a conserved binding surface[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(1):92–97.

[7] Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins[J]. J Mol Biol, 2001, 313(4):889–901.

[8] Senga K, Mostov KE, Mitaka T, et al. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25[J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(15):2845–2855.

[9] Cheng KW, Agarwal R, Mitra S, et al. Rab25 increases cellular ATP and glycogen stores protecting cancer cells from bioenergetic stress[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(2):125–141.

[10] Quénel N, Wafflart J, Bonichon F, et al. The prognostic value of cerbB-2 in primary breast carcinoma: A study on 942 cases[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 35(3):283–291.

[11] 张兴义，韩渊，房新志. 乳腺癌中c-erbB-2和nm23蛋白的表达及其临床病理意义[J]. 中国普通外科杂志，2010, 19(9):1037–1040.

[12] Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/Her2 action in breast cancer[J]. Oncogene, 2000, 19(53):6102–6114.

[13] Savage A, Katz E, Eberst A, et al. Characterising the tumour morphological response to therapeutic intervention: an ex vivo model[J]. Dis Model Mech. 2013, 6(1):252–260.

[14] Arranz EE, Vara JÁ, Gámez-Pozo A, et al. Gene signatures in breast cancer: current and future uses[J]. Transl Oncol, 2012, 5(6):398–403.

[15] 纪小龙. 诊断免疫组织化学[M]. 北京：人民军医出版社，2011:75.

[16] Yamauchi H,Stearns V,Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(8):2334–2356.

[17] Ungermann C, Price A, Wickner W. A new role for a SNARE protein as a regulator of the Ypt7/Rab-dependent stage of docking[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16):8889–8891.

[18] Cao X, Barlowe C. Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes[J]. J Cell Biol, 2000, 149(1):55–66.

（本文编辑　姜晖）

本文引用格式：李杰华，吴非，陆云飞. Rab25基因对人乳腺癌细胞的生物学行为的影响及其与Her-2/neu基因的关系[J]. 中国普通外科杂志，2013, 22(5):624–628. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013. 05.019

Cite this article as: LI JH, WU F, LU YF. Effects of Rab25 gene on biological behaviors in human breast cancer cells and its relation with Her-2/neu gene[J]. Chin J Gen Surg, 2013,22(5):624-628. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.05.019