

学术学位硕士学位论文

分类号: R735.8

单位代码: 10678

密级:

学号: 20180593

昆明医科大学

硕士学位论文



沉默 RhoA 基因对胆囊癌细胞增殖、 迁移和侵袭能力影响的初探

院(系)、所	昆明医科大学第二临床医学院
研究生姓名	向毅
学科专业	外科学(普通外科)
学位类型	学术学位
指导教师	孙敏教授

二〇二一年五月

硕士学位论文扉页

昆明医科大学

硕士学位论文

沉默 RhoA 基因对胆囊癌细胞增殖、 迁移和侵袭能力影响的初探

院（系）、所	昆明医科大学第二临床医学院
研究生姓名	向毅
学科专业	外科学（普通外科）
学位类型	学术学位
指导教师	孙敏 教授
基金项目	2016 年度云南省医疗卫生单位 内设研究机构科研项目（2016NS250）

完 成 日 期 二 〇 二 一 年 五 月

目 录

缩略词表.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要.....	5
正 文.....	8
前 言.....	8
材料与方法	11
结 果	22
讨 论	29
结 论	36
参考文献.....	37
综 述.....	45
攻读学位期间获得的学术成果	52
致 谢.....	53

缩 略 词 表

英文缩写	英文全称	中文全称
CCK-8	Cell Counting Kit-8	细胞计数试剂盒-8
DAB	Diaminobenzidine	二氨基联苯胺
EIF5A2	Eukaryotic Initiation Factor 5A2	真核翻译起始因子 5A2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3 一磷酸脱氢酶
GBC	Gallbladder Cancer	胆囊癌
MOD	Mean optical density	平均光密度值
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
NC	Negative control	阴性对照
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
qPCR	Real-time Quantitative PCR	实时荧光定量核酸扩增 检测 System 系统
RhoA	Ras homolog gene family, member A	Ras 基因家族成员 A
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
ROCK I	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase I	Rho 相关蛋白激酶 I
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
Transwell	Transwell chamber	插入式细胞培养皿
WB	Western Blot	免疫印迹试验

沉默 RhoA 基因对胆囊癌细胞增殖、迁移和侵袭能力影响的初探

研究生：向 毅

导 师：孙 敏 教授

中文摘要

【目 的】

- 1、探讨 RhoA 蛋白在人体胆囊癌组织的表达情况。
- 2、通过体外细胞实验研究 RhoA 基因干扰对胆囊癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。
- 3、通过体外细胞实验明确 EIF5A2 基因干扰对胆囊癌细胞中 RhoA、ROCKI 蛋白表达的影响。

【方 法】

1、本实验用到的 24 对胆囊癌、胆囊炎的石蜡切片，均来源于昆明医科大学第二附属医院肝胆外科，运用免疫组织化学法并通过 DAB 显色，通过平均 MOD 检测 RhoA 蛋白在胆囊癌组织及胆囊炎组织的表达量，两组 MOD 值符合正态分布，运用 SPSS23 软件独立样本 t 检验分析二者是否具有差异。

2、培养胆囊癌细胞系、调整细胞状态，合成 3 条设计的 siRNA-RhoA 并筛选效果优的一条，采用瞬时转染的方法进行实验，分组如下：siRNA-NC 组、siRNA-RhoA 组，采用 qPCR、Western Blot 技术检测细胞处理后 RhoA、ROCK I 的 mRNA 及蛋白表达变化，通过 CCK-8 的方法分别检测 siRNA-NC 组、siRNA-RhoA 组细胞处理后的第 0h、第 12h、第 24h、第 48h 以及 72h 的增殖变化情况，通过细胞划痕方法来分别检测 siRNA-NC 组、siRNA-RhoA 组细胞处理后的迁移能力变化趋势，通过 Transwell 的方法分别检测 siRNA-NC 组、siRNA-RhoA 组细胞处理后的侵袭能力；运用 GraphPad prism8 分析数据并制图。

3、培养胆囊癌细胞系、调整细胞状态，合成设计好的 siRNA-EIF5A2（本研究小组已验证并提供对应序列），采用瞬时转染的方法进行实验，分组如下：

siRNA-NC 组、siRNA- EIF5A2 组,采用 Western Blot 检测细胞处理 48h 的 RhoA、ROCK I 蛋白的表达变化;运用 GraphPad prism 8 分析数据并制图。

【结果】

1、通过显微镜在 $\times 200$ 镜下观察组织切片发现 RhoA 蛋白在人体胆囊癌、胆囊炎组织中均表达,用 Imagepro Plus 软件计算分析 MOD,胆囊癌 MOD 为: 24771 ± 18373 、胆囊炎 MOD 为 7674 ± 4275 ,两者差异有统计学意义($P=0.003$),本次实验证明 RhoA 蛋白在人体胆囊癌组织表达量显著增高。

2、qPCR 检测 RhoA 基因的表达量,以 GAPDH 为内参,结果提示 siRNA-RhoA 组 RhoA 的 mRNA 表达水平(0.067 ± 0.006)显著低于 siRNA-NC 组(1.467 ± 0.428),两组在 RhoA 基因的相对表达量有明显的数理统计差异($P=0.005$),结果表明:本实验中所设计的这一对 siRNA 可以较好的抑制 RhoA 基因在 RNA 水平上的表达。

根据 Western Blot 结果提示: siRNA-RhoA 组 RhoA、ROCK I 蛋白的条带弱于 siRNA-NC 组, siRNA-RhoA 组的 RhoA、ROCKI 蛋白表达水平显著低于 siRNA-NC 组($P<0.001$ 、 $P<0.001$),这说明本实验中设计的这一对 siRNA 在蛋白质水平上同样能够对胆囊癌细胞的 RhoA 基因起到很好的抑制作用,同时降低 ROCK I 编码蛋白。

根据 CCK-8 结果:在转染 24h、48h 以及 72h 后,分析得出 siRNA-NC 组、siRNA-RhoA 组 GBC-SD 细胞的 A450 吸光度值出现了明显的差异($P=0.005$; $P=0.004$; $P=0.001$),其 P 值均小于 0.05,72h 差异最为显著。说明干扰 RhoA 基因可以抑制人体胆囊癌细胞增殖能力。

根据划痕实验的结果:通过划痕面积,计算伤口愈合百分比, siRNA-RhoA 组细胞迁移能力减弱,与 siRNA-NC 组差异具有统计学意义($P=0.007$)。

Transwell 侵袭实验:随机选择三个小室通过显微镜在 $\times 100$ 镜下进行细胞计数, siRNA-RhoA 组(98.667 ± 11.504), siRNA-NC 组(162.333 ± 17.785), siRNA-RhoA 组的 GBC-SD 侵袭能力降低,两组有显著差异($P=0.006$)。

3、Western Blot 结果提示:与对照组相比, siRNA-EIF5A2 组 RhoA 蛋白、ROCK I 蛋白的条带较弱, siRNA-EIF5A2 组的 RhoA 蛋白表达水平显著低于 siRNA-NC 组($P<0.001$), ROCK1 表达也降低($P=0.047$), Western Blot 结果说

明：本实验中运用的 EIF5A2-siRNA 能抑制胆囊癌细胞的 RhoA、ROCK I 蛋白表达。

【结 论】

1、RhoA 蛋白在人体胆囊癌、胆囊炎组织中表达，且在人体胆囊癌组织中呈高表达。

2、本实验用到的 RhoA-siRNA 对体外胆囊癌细胞的 RhoA 基因表达具有一定的抑制作用；沉默 RhoA 基因，能够抑制体外胆囊癌细胞增殖及迁移侵袭能力。

3、降低体外胆囊癌细胞 EIF5A2 基因的表达，可使 RhoA、ROCK I 蛋白表达均下降。

关键词 胆囊癌；RhoA；增殖；迁移；侵袭

Preliminary study on the effect of silencing RhoA gene on proliferation, migration and invasion of gallbladder cancer cells

Postgraduate: XIANG Yi

Supervisor: Prof. SUN Min

ABSTRACT

Objectives:

1. To investigate the expression of RhoA protein in human gallbladder carcinoma.
2. To study the effect of RhoA gene interference on the proliferation, migration and invasion of gallbladder cancer cells in vitro.
3. The effect of EIF5A2 gene interference on the expression of RhoA and ROCKI protein in gallbladder cancer cells was confirmed by cell experiment in vitro.

Methods:

1. 24 pairs of paraffin sections of gallbladder carcinoma and cholecystitis used in this experiment were all from the Department of Hepatobiliary surgery of the second affiliated Hospital of Kunming Medical University. The expression of RhoA protein in gallbladder cancer tissue and cholecystitis tissue was detected by average MOD. The MOD values of the two groups conformed to normal distribution. Independent sample t-test of SPSS23 software was used to analyze whether there was difference between them.

2. Culture gallbladder cancer cell line, adjust the cell state, synthesize three designed siRNA-RhoA and screen one with excellent effect. The experiment was carried out by transient transfection method, which was divided into the following groups: siRNA-NC group and siRNA-RhoA group. The changes of mRNA and protein expression of RhoA and ROCK I were detected by qPCR and Western Blot techniques. The proliferation of cells in siRNA-NC group and siRNA-RhoA group was detected by CCK-8 method at 0 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after treatment. The

migration ability of cells in siRNA-NC group and siRNA-RhoA group was detected by fine cell scratch method, and the invasive ability of cells in siRNA-NC group and siRNA-RhoA group was detected by Transwell method. Use GraphPad prism8 to analyze data and draw drawings.

3. Culture gallbladder cancer cell line, adjust the cell state, synthesize the designed siRNA-EIF5A2 (the corresponding sequence has been verified and provided by our research group), using the method of transient transfection, divided into the following groups: 3 siRNA-NC group, siRNA-EIF5A2 group, Western Blot was used to detect the changes of RhoA and ROCK I protein expression after 48h treatment, and GraphPad prism 8 was used to analyze the data and map.

Results:

1. It was found that RhoA protein was expressed in human gallbladder carcinoma and cholecystitis by microscope. The MOD of MOD, gallbladder carcinoma and cholecystitis were 24771 ± 18373 and 7674 ± 4275 , respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.003$). This experiment proved that the expression of RhoA protein in human gallbladder carcinoma tissue was significantly increased.

2. The expression of RhoA gene was detected by qPCR. With GAPDH as the internal reference, the results showed that the mRNA expression level of RhoA in siRNA- RhoA group (0.067 ± 0.006) was significantly lower than that in siRNA-NC group (1.467 ± 0.428). There was significant difference in the relative expression of RhoA gene between the two groups. The results showed that the pair of siRNA designed in this experiment could inhibit the expression of RhoA gene at RNA level. According to the results of Western Blot, the protein bands of RhoA and ROCKI in siRNA-RhoA group were weaker than those in siRNA-NC group, and the expression levels of RhoA and ROCKI in siRNA-RhoA group were significantly lower than those in siRNA-NC group ($P < 0.001$, $P < 0.001$), which indicated that the pair of siRNA designed in this experiment could also inhibit the RhoA gene of gallbladder cancer cells at the protein level and reduce the protein encoded by ROCKI. According to the results of CCK-8, there were significant differences in A450 absorbance values of GBC-SD cells between siRNA-NC group and siRNA-RhoA group at 24 h, 48 h

and 72 h after transfection ($P = 0.004$; $P = 0.004$; $P = 0.001$), and the difference was the most significant ($P < 0.05$). It is suggested that interfering with RhoA gene can inhibit the proliferation of human gallbladder cancer cells. According to the results of scratch experiment: through the scratch area, the percentage of wound healing was calculated, the ability of cell migration in siRNA-RhoA group was weaker than that in siRNA-NC group, and the difference was statistically significant ($P=0.007$). Transwell invasion experiment: three chambers were randomly selected for cell count under $\times 100$ microscope, and siRNA-RhoA group (98. The invasiveness of GBC-SD was decreased in siRNA-NC group (162.333 ± 17.785), siRNA-RhoA group (667 ± 11.504), and there was significant difference between the two groups ($P = 0.006$).

3.The results of Western Blot showed that the bands of RhoA protein and ROCK I protein in siRNA-EIF5A2 group were weaker than those in control group, and those in siRNA-EIF5A2 group were weaker than those in control group.

Conclusions:

1.RhoA protein is expressed in human gallbladder tissue and highly expressed in human gallbladder carcinoma tissue.

2. RhoA-SiRNA used in this experiment has a certain inhibitory effect on the expression of RhoA gene in gallbladder cancer cells in vitro, and silencing RhoA gene can inhibit the proliferation, migration and invasion of gallbladder cancer cells in vitro.

3.Reducing the expression of EIF5A2 gene in gallbladder cancer cells in vitro can decrease the expression of RhoA and ROCKI proteins.

Keywords:Gallbladder carcinoma;RhoA;Proliferation;Migration;Invasion

沉默 RhoA 基因对胆囊癌细胞增殖、迁移和侵袭能力影响的初探

前言

胆囊癌（Gallbladder Cancer, GBC）是以高度侵袭高转移率为特点的一类恶性肿瘤，手术切除是其唯一有效的治疗方法，少数早期患者有机会通过手术得以根治，但绝大多数患者由于没有及时诊治而失去了根治性手术的机会，从而被迫选择姑息性的治疗。对胆囊癌进展的分子机制的更深入的了解将有利于治疗方案的发展，因此，进一步探索 GBC 的病理发展和有效的早期预后生物标志物的鉴定对于 GBC 的治疗很重要。

本研究小组已发现干扰真核翻译起始因子 5A2（Eukaryotic Initiation Factor 5A2, EIF5A2）基因影响体外人胆囊癌细胞系（GBC-SD）增殖侵袭迁移能力，但该过程具体作用机制尚不清楚。Rho GTP 酶作用于细胞之间的骨架连接或其下游的靶蛋白，从而产生一系列生物学效应。Ras 基因家族成员 A（Ras homolog gene family, member A, RhoA）是 Rho GTP 酶众多成员中目前研究最广泛的一员，RhoA 的表达与肝癌、宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌有密切的关系，且 RhoA/ROCK 信号通路在细胞增殖和迁移过程中发挥关键作用。但是 RhoA 基因是否在人体胆囊癌组织中表达以及对体外 GBC-SD 细胞影响的研究鲜有报道。

GBC 源于胆囊上皮细胞^[1,2]，与其它消化道肿瘤相比，其发病率位列第 7^[3,4]。胆囊癌恶性程度极高^[5-7]，不但发病隐匿、发展迅速而且切除率低。这都归结于其早期症状较隐蔽，常出现的症状和慢性胆囊炎、胆囊结石极其相似，临床工作中准确诊断出胆囊癌较为困难^[8-11]。往往当患者出现很严重的腹痛腹胀的症状及出现皮肤巩膜黄染、短期内异常消瘦、腹部包块等体征时，肿瘤已经为中、晚期，完全切除已非常困难。胆囊癌对于放化疗不敏感，手术切除是其根治的唯一方法。行胆囊癌根治术后预后极差，其相关报道切除率低于 30%^[12]。然而多数患者就诊时已发生远处转移，失去了手术切除机会。

胆囊癌可以转移至肝脏，也能通过侵袭淋巴、血管、神经、胆管向远处器官弥漫性转移^[13]。诱发胆囊癌的原因有很多，包括胆囊结石、胆囊息肉等后天因素，而基因中遗传物质突变是胆囊癌发生的一个重要原因，因此，从基因水平深入研究胆囊癌发生发展的过程，将有利于预防其发生及更早的诊断，这将有助于

精准靶向治疗的实现^[14]。我们知道，早期诊断胆囊癌非常困难，这使得胆囊癌基因层面的研究变得尤为迫切，就像 AFP 对于肝癌的意义一样，或许可以发现一种新的早期胆囊癌诊断标志物，能否寻找出有效的靶向分子决定着未来诊断治疗胆囊癌的水平^[15-18]。

Rho 家族蛋白主要由 RhoA、Cdc4 以及 Rac1 等亚家族，这些蛋白与细胞内信号转导有密切的关系，也在细胞增殖、运动、粘附等方面起着关键作用，并能影响细胞骨架连接和吞噬功能^[19]。近年来的研究成果，RhoA、Cdc4 等亚家族蛋白参与肿瘤进程的调控。相关研究^[20-23]已经证实了，RhoA 在卵巢癌、前列腺癌、结直肠癌、胃癌组织中高表达，它与癌细胞的生长、凋亡、转移和恶性进展密切相关。有文献报道：肝癌浸润及转移程度与 RhoA 的表达存在相关性，并指出 RhoA 可能是肝癌重要指标^[24]。而且，EIF5A2 基因可能通过激活 RhoA/ROCK 信号通路从而参与调控宫颈癌的发生发展过程^[25]。同时，EIF5A2 通过诱导上皮-间充质转化，通过激活 Rho 亚家族蛋白使细胞骨架发生改变，这可促使肝肿瘤细胞向远处侵袭及转移^[26]。RhoA 亦是关键的细胞周期调节剂，RhoA 干扰可通过阻断有丝分裂干扰癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡，其下游效应靶蛋白 ROCK1 也受到抑制^[27]。EIF5A2 参与 RhoA/ROCK 信号通路从而导致胰腺癌侵袭转移^[28]。综合以上，可以认为 EIF5A2 在调控肿瘤发生发展过程中起着重要的作用，同时与 RhoA/ROCK 这一信号通路的激活有着千丝万缕的联系。

RhoA 的下游效应器介导其多种生物学特性^[29]。ROCK 蛋白是 RhoA 下游靶分子中最经典的，它包括 ROCK1 及 ROCK2 两种同分异构体^[30]。它们对肿瘤有着各自的意义，如 ROCK1 的表达可用作乳腺癌预后不良的标志物^[31]。两种蛋白的全长氨基酸同源性较高^[32]。这两种效应靶分子在一些功能上可能有所重合。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种基因技术，系指人为的将小片段 RNA 转染导入细胞内或通过载体诱导所致的转录后基因沉默现象，随着科技的发展，该技术被广泛运用于基因相关的功能研究。一些调控肿瘤发生发展过程中的基因通过人类基因组的识别以及进行测序鉴定，以这些基因为靶点，利用 RNAi 可创造出治疗肿瘤患者的一种新的基因工程治疗方式，这是医学史上质的飞跃，RNAi 及有可能特异性地高稳定的降低靶向分子的表达，即可抑制肿瘤细胞的增殖与生长，是攻克肿瘤这一世界性难题的里程碑。

目前 RhoA 在胆囊癌中的具体作用机制尚不明确, RhoA 对胆囊癌细胞增殖、迁移和侵袭方面的影响仍不清楚, 探究其在胆囊癌中可能的分子层面机制和发现新的分子靶标来辅助胆囊癌的诊治显得极为迫切。

本研究先探讨 RhoA 蛋白在人体胆囊癌组织表达情况, 然后通过 RNAi 技术在细胞层面进行 RhoA 基因干扰观察对 GBC-SD 增殖、迁移和侵袭的影响; 基于本研究小组前期结论: EIF5A2 基因干扰可降低 GBC-SD 增殖、迁移和侵袭能力, 本次实验最后进行 EIF5A2 基因干扰观察对 GBC-SD 中 RhoA、ROCK1 蛋白表达的影响。

材料与方法

1 实验材料

1.1实验对象

(1)查询2017年12月至2019年12月期间于昆明医科大学第二附属医院肝胆外科确诊为胆囊癌并接受胆囊癌根治术及胆囊炎接受胆囊切除术的患者石蜡标本信息，最后随机取24对胆囊癌、胆囊炎石蜡组织切片（经过伦理审核通过）。

(2) 本实验所用的GBC-SD购自于富衡生物科技有限公司； siRNA-Rho A小干扰片段由锐博生物科技有限公司设计合成， siRNA-EIF5 A2序列由本研究小组提供，由锐博生物科技有限公司合成。

1.2实验仪器

仪器名称	生产厂家
PCR扩增仪	ABI公司
Q3实时荧光定量仪	ABI公司
离心机	博士德生物科技公司
切片机	莱卡公司
包埋机	莱卡公司
微量移液枪	大龙兴创实验仪器有限公司
-20℃低温冰箱	海尔公司
-80℃超低温冰箱	海尔公司
4℃冰箱	海尔公司
全自动正置显微镜	奥林巴斯公司
微量移液器	德国Eppendorf公司
二氧化碳培养箱	Thermo
生物安全柜	苏净安泰公司
倒置荧光显微镜	OLYMPUS
电热恒温鼓风干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
实时荧光定量	illumina eco
荧光定量PCR管	EXTRAGENE/ illumina
分光光度计	上海舜宇恒科学仪器有限公司

电热恒温水浴锅	北京市长风仪器仪表有限公司
微波炉	LG
Aquapro超级纯水仪	艾科浦公司
PH计	德国Metter-Toledo GmbH公司
电子天平	北京赛多利斯仪器系统有限公司
紫外分析仪	北京君意东方电泳设备有限公司
水平摇床	江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司
磁力搅拌器	江苏省金坛市中大仪器厂
酶标仪	Biotek
离心机	Thermo
旋涡震荡仪	其林贝尔公司
Barnstead Smart2 Pure(纯水仪)	Thermo
真空抽液器	鱼跃公司

1.3实验试剂及耗材

试剂名称	生产厂家
RhoA兔多克隆抗体	ABclonal
Anti-EIF5A2抗体	Abcam
Anti—RhoA抗体	Abcam
Anti-ROCK1抗体	Abcam
无水乙醇	天津天船化工试剂有限公司
二甲苯	天津市优普化学试剂有限公司
4%多甲固定液	塞维尔公司
石蜡	莱卡公司
75%酒精	天津天船化工试剂有限公司
Eastep RT Master Mix kit	Vazyme Biotech
SYBR® Premix Ex Taq™ II	Vazyme Biotech
免疫组化试剂盒	迈新生物科技有限公司
DAB显色试剂盒	中杉生物科技有限公司
中性树胶	索莱宝科技有限公司

200ul EP管	Exygen公司
24孔板	NEST公司
15ml离心管	NEST公司
50ml离心管	NEST公司
1.5mlRNase free EP管	Exygen公司
Trizol	Invitrogen
异丙醇	生工生物公司
氯仿	国药公司
DEPC水	生工生物公司
RNA cDNA第一链合成试剂盒	全式金公司
SG Fast qPCR Master Mix	生工生物公司
Ex Taq	TAKARA
PMSF	Sigma
BCA蛋白浓度测定试剂盒	碧云天公司
磷酸酶抑制剂	碧云天公司
RIPA裂解液	碧云天公司
BCA蛋白浓度测定试剂盒	碧云天公司
二硫叔糖醇 (DTT)	Biosharp
SDS	国药集团化学试剂有限公司
溴酚蓝	Amresco
甘油	国药集团化学试剂有限公司
PBS Nacl	国药集团化学试剂有限公司
PBS Kcl	国药集团化学试剂有限公司
PBS HpO4	国药集团化学试剂有限公司
KCell Counting Kit-8	BBI Life Sciences
96孔板	Corning
1640培养基	Gibco
胰酶	Gibco
磷酸盐缓冲液	Gibco

侵袭小室	CORNING
DMEM 培养基	Gibco
细胞固定液4%甲醛	BBI Life Sciences
结晶紫染色液	BBI Life Sciences
侵袭小室	CORNING
细胞固定液4%甲醛	BBI Life Sciences
RNAzol RT RNA Isolation Reagent	Therom

1. 4人体胆囊癌及胆囊炎组织石蜡切片实验分组

胆囊癌与胆囊炎石蜡切片分组	
病理切片类型	病理切片编号
胆囊癌	20B00062-3、20B00044-4、20B00120-4、20B00255-1
	20B00533-3、20B00308-1、20B00308-1、F2005741-3
	20F01295-1、20F01331-1、B1900032-2、F1900550-1
	F1900727-1、B1900711-6、F1923031-3、F1800151-1
	F1806231-4、F1701217-4、F1701231-3、F1708767-3
胆囊炎	F1716024-5、B1700373-2、B1700867-3、B1702019-5
	F1900015-1、F1900019-1、F1900026-1、F1900027-1
	F1900029-1、F1900030-1、F1900031-1、F1900033-1
	F1900070-1、F1900076-1、F1900088-1、F1900096-1
	F1900157-1、F1900158-1、F1900162-1、F1900171-1
	F1900229-1、F1900243-1、F1900265-1、F1900266-1
	F1900360-1、F1900379-1、F1900447-1、F1900493-1

2 实验方法

2. 1 人体胆囊癌、胆囊炎组织石蜡切片及免疫组化

（1）于昆医附二院查询并筛选出胆囊癌及胆囊炎蜡块标本。通过 4um 连续切片并 60℃烘烤 2 小时，而后放入二甲苯 I、II（每级浸泡 15 min），放入无水乙醇 I、II（每级浸泡 5 min）及 95%、85%、75%乙醇（每种 2min），蒸馏水中浸泡（2min），最后放入 PBS 中浸泡（5min）。

(2) 通过抗原修复(将切片架放入用微波炉加热至沸腾的抗原修复液中, 低火持续加热 10min 后自然冷却; 用 PBS 中浸泡 5min, 重复 3 次)、过氧化氢孵育(0 擦干切片, 用免疫组化笔在组织周围画圈; 用 3%H₂O₂ 室温孵育 15min; 而后置于 PBS 中浸泡 5 min, 重复 3 次)、山羊血清封闭(加正常山羊(与二抗同一种属)血清, 室温孵育 15 min, 倾去血清)。

(3) 一抗孵育(将 PBS 按 1:200 稀释的一抗滴加至完全覆盖, 湿盒内 4℃ 过夜, 而后浸泡在 PBS 中 5 min, 重复 3 次)、二抗孵育(稀释比同前, 37℃ 孵育 30 min; 浸泡方法同前)、辣根过氧化物酶标记(滴加辣根过氧化物酶(HRP), 37℃ 孵育 30 min; 浸泡方法同前)。

(4) DAB 显色: 将 DAB 显色试剂 A、B 等量混合, 滴加 110 μL 上述显色试剂, 待颜色刚刚变深时迅速置于水中终止反应。

(5) 通过苏木素复染后, 脱水、透明、封片。

(6) 镜检: 于显微镜下观察染色效果; 于 200× 镜下拍照。

(7) 结果判读: DAB 染色法也叫二氨基联苯胺法, 用于检测细胞中过氧化物酶的活性部位, 石蜡切片经过一抗处理, 二抗与一抗结合后, 二抗的过氧化物酶能氧化过氧化氢, 释放氧从而氧化二氨基联苯胺, 形成金黄色沉淀, 并位于过氧化物酶活性的位点。在 200× 镜下显色为淡黄色(+)、棕黄色(++)、棕黑色(+++)。

2.2 体外人胆囊癌细胞系(GBC-SD)的相关实验

2.2.1 GBC-SD 细胞复苏与细胞培养、传代及活细胞计数

把冻存的 GBC-SD 取出, 立刻置 37 摄氏度水浴箱中, 而后将冻存管置于 1500rpm 的离心机中 3 分钟。将上述细胞悬浮液转移至 10cm 培养皿中, 而后置于恒温培养箱中 6 小时。

用传代下来的胆囊癌细胞, 使其长成单层细胞, 备用; 用胰酶消化, 用 PBS 洗涤后加入适量培养液吹打制成胆囊癌细胞悬液。再加入适量的台盼蓝染液, 随即在显微镜下观察细胞是否为存活状态, 计算原细胞悬液的细胞数。

2.2.2 siRNA 合成、细胞分组与转染

由锐博生物科技有限公司设计共三对 RhoA-siRNA 序列, 分别转染 GBC-SD 细胞中, 并设置对照组(NC 组), 结果提示: 转染 siRNA1 的 GBC-SD 胆囊癌细胞 RHOA 的 mRNA 表达与对照组差异无统计学意义($P=0.07$), 转染 siRNA2、

siRNA3 的胆囊癌细胞 RHOA 的 mRNA 表达收到明显抑制($P=0.006$; $P=0.005$); 选取 siRNA3 (st-h-RHOA_003) 用于下游检测 (图 1), 正义链为: 5'-GGAAAG CAGGTAGAGTTGGCT-3', 反义链为: 5'-GGCTGTCGA TGGAAAAACACAT-3'。本实验小组前期已设计一对 siRNA 序列并表明该序列在 RNA 水平和蛋白质水平对胆囊癌细胞的 EIFSA2 基因表达具有抑制作用, siRNA 序列 (NM 020390 siRNA112) 的正义链为: 5'-GCUUCCAGC ACUUACCC UATT-3', 反义链为: 5'-UAGGGUAAUG GAAGCTT-3'^[33]。

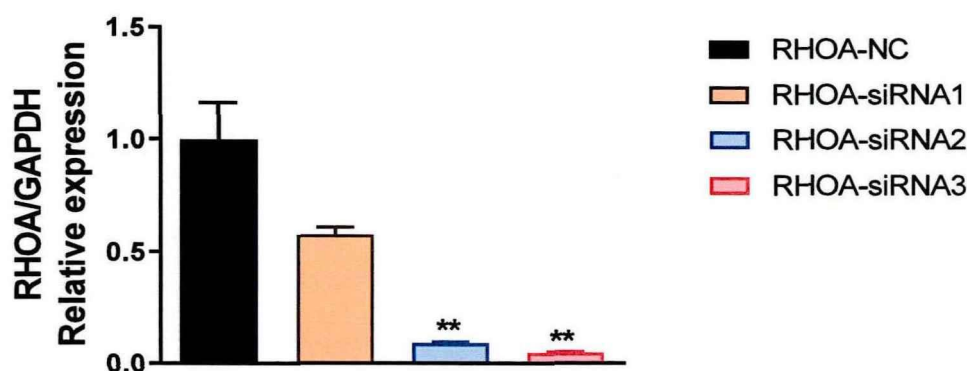


图1 RhoA的相对表达量
(** $P<0.01$)

GBC-SD 在后续实验中均分为阴性对照组 (siRNA-NC 组) 和细胞转染组 (siRNA-RhoA 组或 siRNA-EIF5A2 组)。细胞转染前 24 小时, 将处于对数生长期并且状态佳的 GBC-SD 接种到 6 孔培养板中, 每孔中的细胞数为 15.0×10^5 个; 按照每孔的剂量将 5ml 的 RhoA-siRNA 和 10 μ L 的 **RFect 小核酸转染试剂** 分别加入 100 μ L 的 GBC-SD 完全培养基中混匀后静置 5 分钟, 然后将两者混匀静置 20 分钟, 再加入 800 μ L 的 GBC-SD 完全培养基, 将此 1mL 混合物置于孔内等待细胞转染。恒温箱培养 6 小时后, 吸弃混合物, 更换为新的完全培养基继续培养。此时胆囊癌细胞以完成转染, 可用于后续实验, 之后用到转染后的胆囊癌细胞, 均以此种方法而来。

2.2.3 荧光定量 PCR 检测 RhoA 基因的 mRNA 水平表达

2.2.3.1 RNA 提取

胆囊癌细胞中加入 1mlTrizol 用以裂解细胞，随即将裂解的细胞吸到一个 1.5ml 的 EP 管中，加 205ul 氯仿，4℃条件下以 12000rpm/min 速度离心 16min；吸取 410μl 上层清夜于新 EP 管中，加入异丙醇并混匀，同理，离心后弃上清，沉淀用 70%无水乙醇洗后 20ulDEPC 水中；分光光度计测定 RNA 浓度。

2. 2. 3. 2 RNA cDNA 第一链合成

准备好相关物品，RNA 浓度计算好，tube 准备并标记上；在冰浴的 nuclease-free PCR 管中加入以下试剂：

试剂	体积
total RNA	X ul
5xTransScript All-in-One SuperMix for qPCR	4μl
gDNA Remover	1μl
Rnase-free ddH ₂ O	to20ul

轻轻混匀，42 度孵育 15 分钟；85℃加热 5 秒失活 TransScript RT/RI 和 gDNA Remover；将上述溶液-20℃ 保存。

2. 2. 3. 3 荧光定量 PCR 检测

- (1) 将 cDNA 样品稀释 10 倍作为模板上机检测。
- (2) 配制反应混合液

Reaction Component	Concentration	Volume(μl)
SybrGreen qPCR Master Mix	2X	10
引物 F (10uM)	10μM	0.4
引物 R (10uM)	10μM	0.4
ddH ₂ O		7.2
Template (cDNA)		2
Total		20μl

(3) PCR 循环条件

Thermal Cycler	Times and Temperatures			
	Initial Steps	Each of 45 cycles		
		Melt	Anneal	Extend
ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪	HOLD	CYCLE		
	3 min 95°C	7s 95°C	10s 57°C	15s 72°C

(4) 仪器的操作

完成所有步骤以后，把待检测样品加入 96 孔板中，并放在 PCR 仪中进行 PCR 反应；均重复 3 遍。内参为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)，通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因相对表达量。

2.2.4 Western blot检测siRNA-RhoA体外GBC-SD中RhoA基因的蛋白水平表达

2.2.4.1 蛋白样品制备.

(1)总蛋白的提取:

选择处于对数生长时期、状态佳的胆囊癌细胞，转染处理 48 小时后，并分组为 siRNA-RhoA 组与 siRNA-NC 组，培养 49h；加入裂解缓冲液并转移至 1.5ml 管；超声波碎仪裂解完的细胞；离心沉降后提取上清。

(2)蛋白浓度的测定:

将蛋白样品进行适当稀释；将 BSA 标准品进行稀释，制成不同蛋白浓度的标准蛋白；按 50:1 比例将 BCA 试剂盒中 A 液和 B 液进行混合；37°C 避光孵育 31min；用酶标仪测定 OD568；计算出样品蛋白浓度。

(3)蛋白变性。

2.2.4.2 电泳

(1) SDS-PAGE 胶的制备:

把干燥的玻璃板固定于制胶器上，将分离胶灌入玻璃板空隙内到适当的高度，用无水乙醇覆盖分离胶，当胶完全聚合时倒出。而后加入浓缩胶到一定的位置时放入梳齿。分离胶的配制：

12 %分离胶（总体系 15ml） （单位 ml）	
水	4.9
30%丙烯酰胺	6.0
1.5M tris-Hcl（PH8.8）	3.8
10%SDS	0.15
APS	0.15
TEMED	0.006
10 %分离胶（总体系 15ml） （单位 ml）	
水	5.9
30%丙烯酰胺	5
1.5M tris-Hcl（PH8.8）	3.8
10%SDS	0.15
APS	0.15
TEMED	0.006
浓缩胶 5%（总体系 6ml） （单位 ml）	
水	4.1
30%丙烯酰胺	1.0
1.0M tris-Hcl（PH6.8）	0.75
10%SDS	0.06
APS	0.06
EMED	0.006

(2)电泳分离:

把做好的胶固定好,用微量加样器将制备好的蛋白样品和 MAKER 加入上样孔(各样品总蛋白量为 41ug);加样后先恒压 80V/100v 电泳。

2.2.4.3 电转移及 ECL 显色系统

取出凝胶后剪与 PAGE 凝胶相同大小的 PVDF 膜和滤纸,先放黑色板,再放纤维垫、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、纤维垫、白色板,夹紧板后放入转膜仪内,黑色为负极;开始转膜(100V 恒压冰浴 65min)。封闭后经过一抗、二抗孵育来进行显色曝光:X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影。冲洗胶片。该条带通过凝胶成像系统显影,并使用 Imagepro Plus 软件进行蛋白质表达的灰度值分析。

2.2.5 CCK-8 检测 siRNA-RhoA 体外 GBC-SD 的细胞增殖

以一个孔中 1.0×10^3 个细胞的数量接种到 96 孔培养板中,置于培养箱中 0-4 天,然后每天检测胆囊癌细胞 GBC-SD si-NC 组, si-RhoA 转染组。遵循 CCK-8 试剂盒的说明进行检测。在避光条件下,在覆盖有相应细胞的 96 孔板中加入 CCK-8 (每 100 μ L 完整培养基中 10 μ L 的 CCK-8);使用酶标仪在 450nm 处检测每个孔的 OD 值,并记录结果以指示细胞的增殖能力,每组设置有 3 个副孔,同时增设仅加入培养液的空白孔用于调零。

2.2.6 Transwell 细胞侵袭实验

其原理为:上室为胆囊癌细胞,下室加入 FBS,肿瘤细胞会向营养成分高的下室跑,但是,上下室之间有基质胶(模仿体内细胞外基质),细胞欲进入下室,先要分泌基质金属蛋白酶(MMPs)将基质胶降解。计数进入下室的细胞量可反映肿瘤细胞的侵袭能力;通过 0.1%结晶紫染色 31 分钟,用棉签轻轻擦拭上层未迁移细胞,用 PBS 洗 3 遍;100 倍显微镜下随机选取 3 个视野观察细胞,计数取其均值,一组设置 3 个小室;数据分析。

2.2.7 划痕实验

备好胆囊癌细胞,以进行常规消化,离心,重悬和细胞转染,用完全培养基培养细胞,转染处理 48 小时后,收集每个实验组中的细胞,并计数细胞后加入 6 孔板;采用蓝色枪头机械力划痕,更换培养基继续培养;采用显微镜拍照。通过测划痕面积,计算伤口愈合百分比,评价细胞迁移率。

2.2.8 Western blot检测siRNA-EIF5A2的GBC-SD细胞中RhoA、ROCK1蛋白的表达

参照2.2.4同样的办法处理胆囊癌细胞并转染，分组为siRNA-NC组及siRNA-EIF5A2组；同样按照2.2.6检测siRNA-EIF5A2胆囊癌细胞的RhoA、ROCK1蛋白的表达，使用Image pro Plus软件进行蛋白质表达的灰度值分析。

3 数据统计

体外GBC-SD的各个实验分别独立重复3次，使用SPSS 23进行统计分析，两组数据比较采用独立样本t检验，多组间数据比较采用单因素方差分析，实验数据表示为均数±标准差，当 $P < 0.05$ 时，实验结果的差异具有统计学意义；采用Graphad Prism 8.0制作统计图。

结果

1 RhoA蛋白在人体胆囊癌及胆囊炎组织中表达情况

本次免疫组化实验DAB显色的目标蛋白质为棕黄色，用Imagepro Plus软件分析得出平均光密度，然后使用SPSS 23进行统计学差异性分析， $P < 0.05$ 认为有统计学差异。分析RhoA在24对人体胆囊癌及胆囊炎组织中的表达情况如图2所示

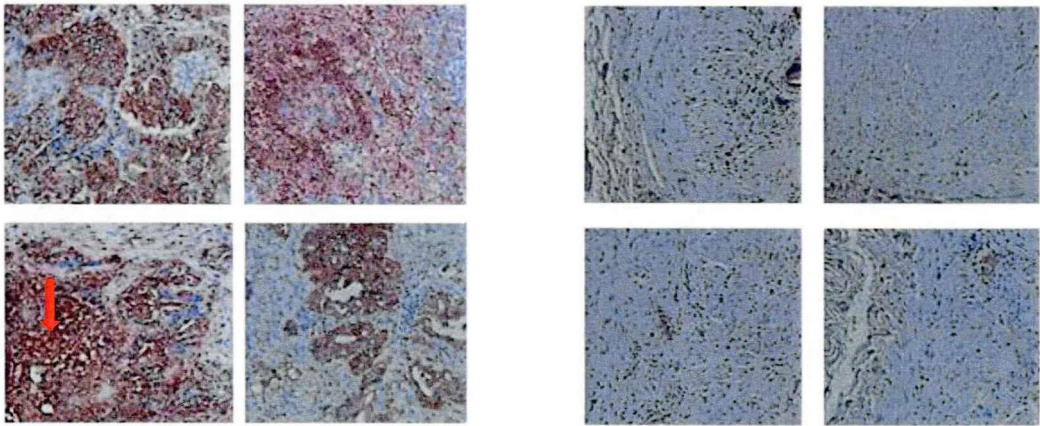


图 2A 人胆囊癌组织

图 2B 人胆囊炎组织

代表性图片：胆囊癌与胆囊炎 DAB 显色后的 RhoA 蛋白为棕黄色(10×20)，如图中红色箭头所示。

表1.人体胆囊癌组、胆囊炎组RhoA表达情况

组别	MOD值	P值
胆囊癌组	24771.42±8373.32	$P=0.003$
胆囊炎组	7674.79±2275.48	

注： $P < 0.05$ ，差异具有统计学意义。

2 siRNA沉默RhoA基因的效果评价

本实验中RhoA-siRNA3成功转染进GBC-SD细胞内，通过qPCR分别检测胆囊癌细胞siRNA-NC转染组和siRNA-RhoA转染组中RhoA的mRNA表达量，以GAPDH作为内参，同时siRNA-NC转染组细胞也做相同处理并检测RhoA的mRNA表达量。二者比对，表达结果如图1所示（改图位于方法中2.2.2部分），siRNA-RhoA转染组的GBC-SD细胞在转染48h后，其RhoA基因的相对表达量的平均 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.067 ± 0.006 ，而siRNA-NC组的GBC-SD细胞在培养48h后RhoA基因的相对表达量的平均 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 1.467 ± 0.428 。siRNA-RhoA组的GBC-SD细胞与siRNA-NC

的GBC-SD细胞在RhoA基因的相对表达量有明显的数理统计差异($P=0.005$), 见表2。

表2.siRNA-RhoA组、siRNA-NC组对RhoA基因在mRNA水平上的表达情况

组别	$2^{-\Delta\Delta CT}$ 值	P值
siRNA-RhoA组	0.067 ± 0.006	$P=0.005$
siRNA-NC组	1.467 ± 0.428	

注: $P<0.05$, 差异具有统计学意义。

蛋白质印迹法检测结果(图3)显示, 以GAPDH为内参, siRNA-RhoA组的GBC-SD在转染48h后, 其RhoA基因编码蛋白的能力明显受到了抑制, Western blot的条带较弱, 而siRNA-NC的GBC-SD细胞在培养48h后RhoA编码蛋白相对正常。Imagepro Plus软件对WB结果作灰度分析, 并用Graphpad prism 8制做的直方图, 从图中可以明显看出, 转染RhoA-siRNA的GBC-SD细胞相较于转染RhoA -NC的GBC-SD细胞, 其RhoA基因表达蛋白的水平明显降低 ($P<0.001$), 且RhoA下游靶分子ROCK I的表达也显著降低 ($P<0.001$), 见表3。

表3.siRNA-NC组、siRNA-RhoA组RhoA、ROCK I蛋白相对表达情况

目标蛋白	siRNA-RhoA组	siRNA-NC组	P值
RhoA	0.205 ± 0.038	1 ± 0.315	<0.001
ROCK I	0.293 ± 0.135	1 ± 0.453	<0.001

注: $P<0.05$, 差异具有统计学意义。

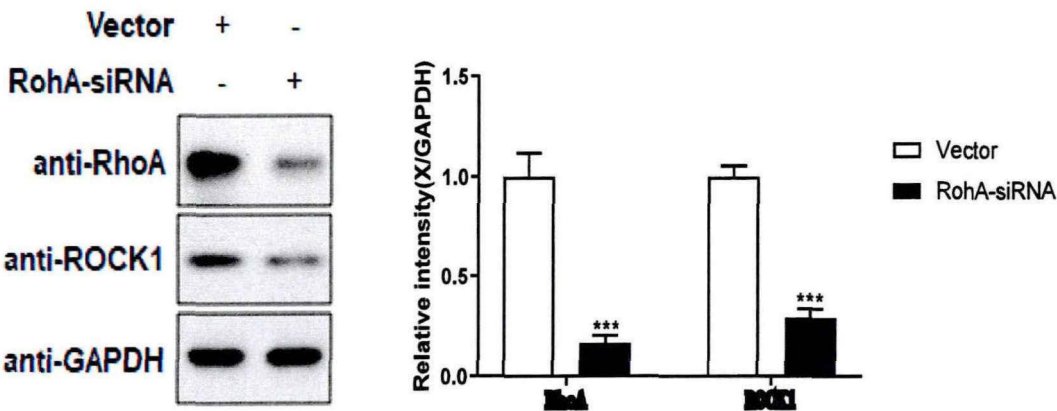


图3 RhoA-siRNA对RhoA、ROCK I的蛋白表达的影响

(*** $P<0.001$)

3 沉默RhoA表达抑制胆囊癌细胞GBC-SD的增殖能力

在转染RhoA-siRNA0h、12h后，siRNA-NC组GBC-SD与siRNA-RhoA组GBC-SD的A450吸光度值无明显统计学差异($P>0.05$)。而在转染24h、48h后两组A450吸光度值出现了明显的差异 ($P=0.005$; $P=0.004$)， P 值均小于0.05。在72h siRNA-RhoA组胆囊癌细胞与对照组相比细胞增殖能力明显减弱，其差异具有统计学意义 ($P=0.001$)。用Graphpad prism 8制图如下所示(图4):

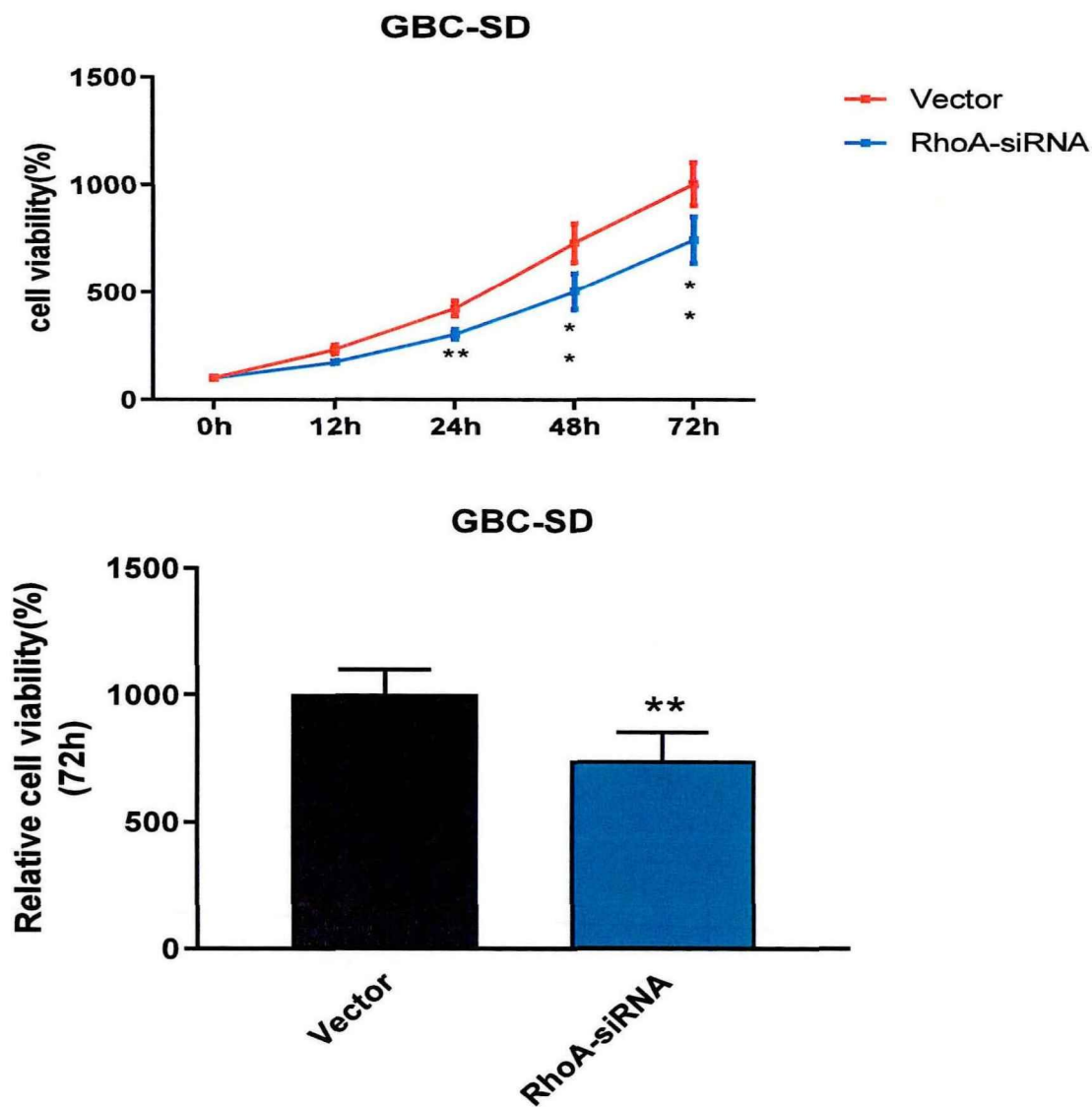


图 4 siRNA-NC 组与 siRNA-RhoA 组 GBC-SD 细胞增殖能力

(** $P<0.01$)

4 沉默 RhoA 表达抑制体外 GBC-SD 的迁移和侵袭能力

4.1 划痕实验

为了探究沉默 RhoA 表达对 GBC-SD 迁移的影响，运用细胞划痕实验观察 GBC-SD 在干扰 RhoA 表达后细胞迁移的变化，如图 5A 所示。以 0h 为起点，培养 48h 后的划痕愈合情况作为观察终点，结果显示，与 NC 组相比，siRNA-RhoA 组中 GBC-SD 的划痕愈合明显减慢，即 RhoA-siRNA 处理后的胆囊癌细胞迁移能力明显下降，差异具有统计学意义 ($P=0.007$)，如图 5B 所示。

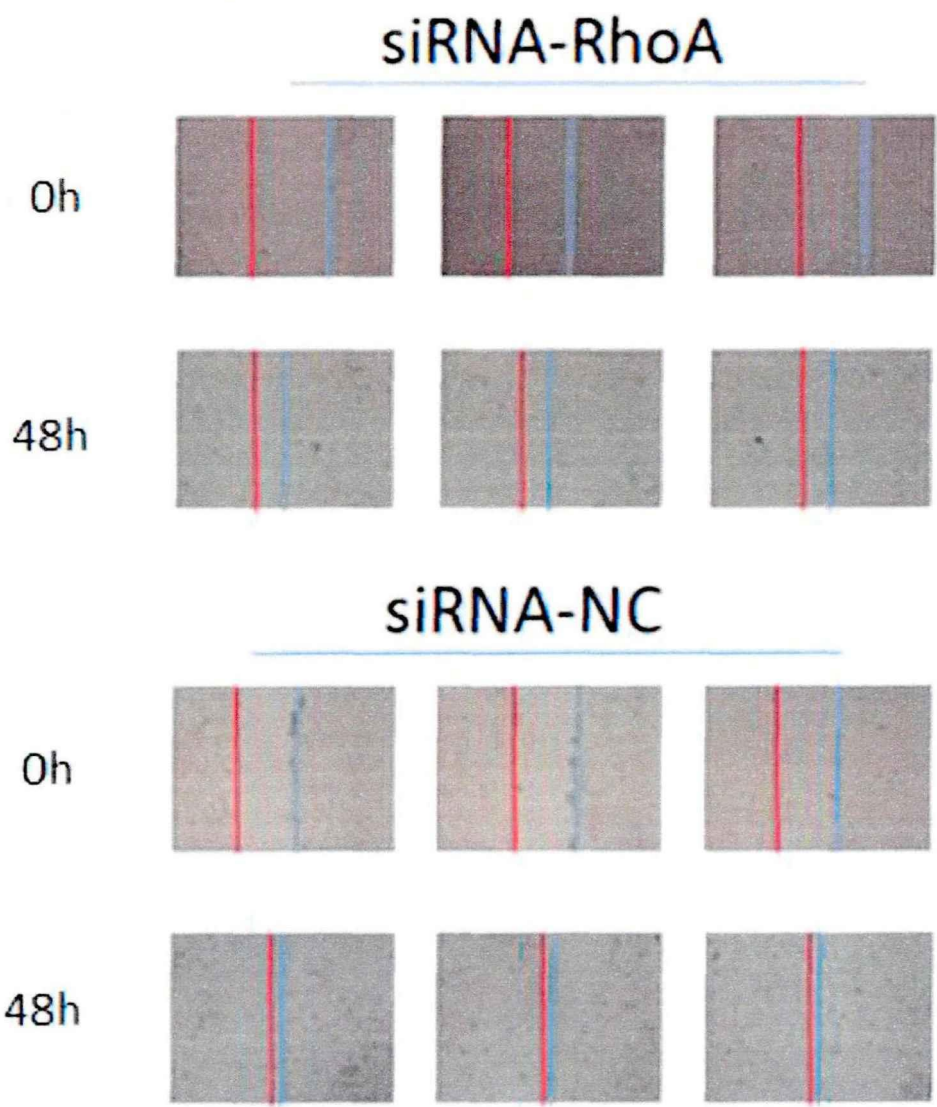


图 5A GBC-CD 的细胞划痕实验图

代表性图片：siRNA-RhoA组、siRNA-NC组划痕0、48h后光镜下拍摄(10×20)。

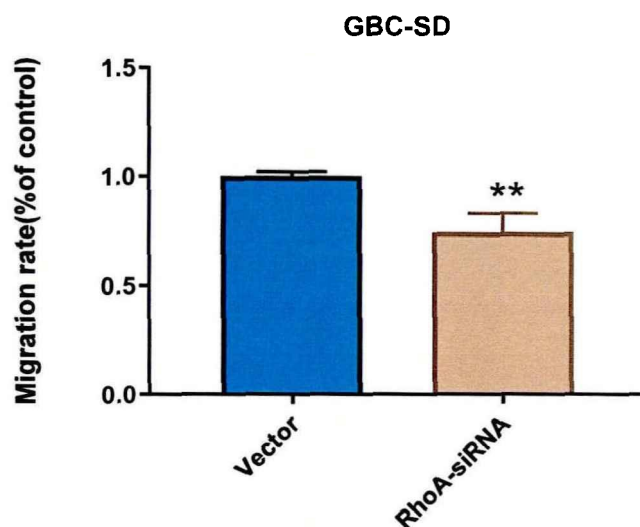


图 5B 细胞划痕实验验证 RhoA-siRNA 抑制胆囊癌细胞迁移能力
(** $P<0.01$)

4.2 Transwell 实验

Transwell 实验如图 6A、6B 所示。分组为 siRNA -RhoA 组与 siRNA-NC 组。转染 48h 结束后，重新计数。siRNA-NC 组、siRNA-RhoA 组使用结晶紫染色后，随机选择三个小室进行计数。siRNA-RhoA 组 98.667 ± 11.504 ，siRNA-NC 组 162.333 ± 17.785 。将数据标准化处理后，用 Graphpad prism 8 制做直方图。由上说明 siRNA -RhoA 组的细胞侵袭能力明显减弱，差异有统计学意义 ($P=0.006$)，见表 4。

表 4.siRNA-RhoA 组、siRNA-NC 组小室 GBC 细胞计数结果

组别	小室 GBC 细胞计数	<i>P</i> 值
siRNA-RhoA 组	98.667 ± 11.504	$P=0.006$
siRNA-NC 组	162.333 ± 17.785	

注： $P<0.05$ ，差异具有统计学意义。

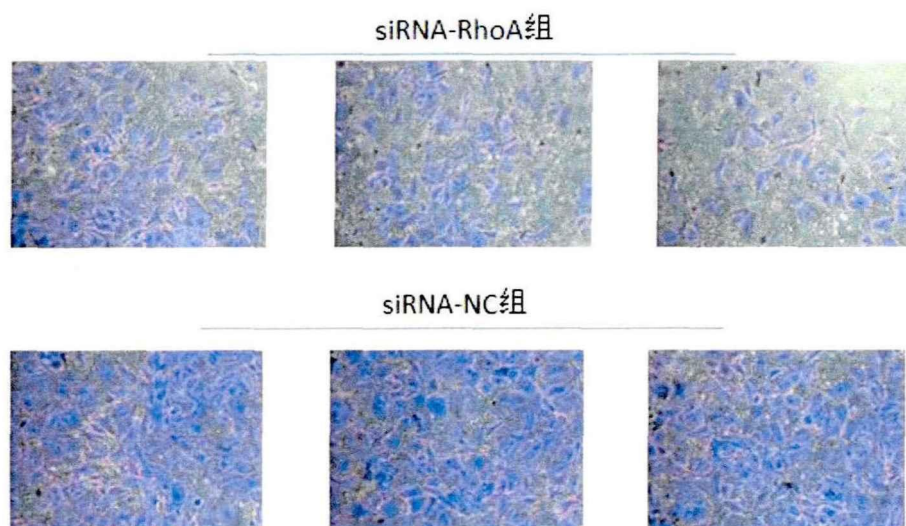


图 6A GBC-CD 的 Transwell 实验图

代表性图片：siRNA-RhoA 组、siRNA-NC 组结晶紫染色均在光学显微镜下拍摄（10×10）。

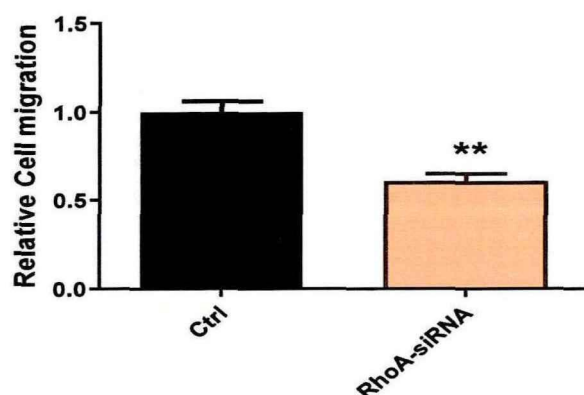


图 6B siRNA-RhoA 组与 siRNA-NC 组 GBC-SD 细胞侵袭能力

($** P < 0.01$)

5 沉默 EIF5A2 对 RhoA、ROCK I 蛋白质表达的影响

蛋白质印迹法检测结果(图7)显示，以GAPDH为内参，GBC-SD的 siRNA-EIF5A 2转染组在转染48h后，EIF5A2、RhoA、ROCKI编码蛋白的能力受到了抑制，Western blot的条带较弱，而siRNA-NC的GBC-SD细胞在培养48h后 EIF5A2、RhoA、ROCK 1蛋白编码蛋白相对正常。将WB结果以Imagepro Plus软件对作灰度分析得如下表数据，并用Graphpad prism 8制做直方图，从图中可以看出，转染EIF5A2 -siRNA的GBC-SD细胞相较于未处理的GBC-SD细胞，其

EIF5A2基因表达蛋白的水平明显降低 ($P<0.001$), 同时RhoA蛋白水平明显降低 ($P<0.001$), RhoA蛋白下游靶分子ROCK I表达也降低 ($P=0.047$), 见表5。

表5.siRNA-NC组、siRNA-EIF5A2组各蛋白相对表达情况

目标蛋白	siRNA-EIF5A2组	siRNA-NC组	P值
RhoA	0.227±0.074	1±0.187	<0.001
ROCK I	0.877±0.090	1±0.086	0.047
EIF5A2	0.170±0.056	1±0.062	<0.001

注: $P<0.05$, 差异具有统计学意义。

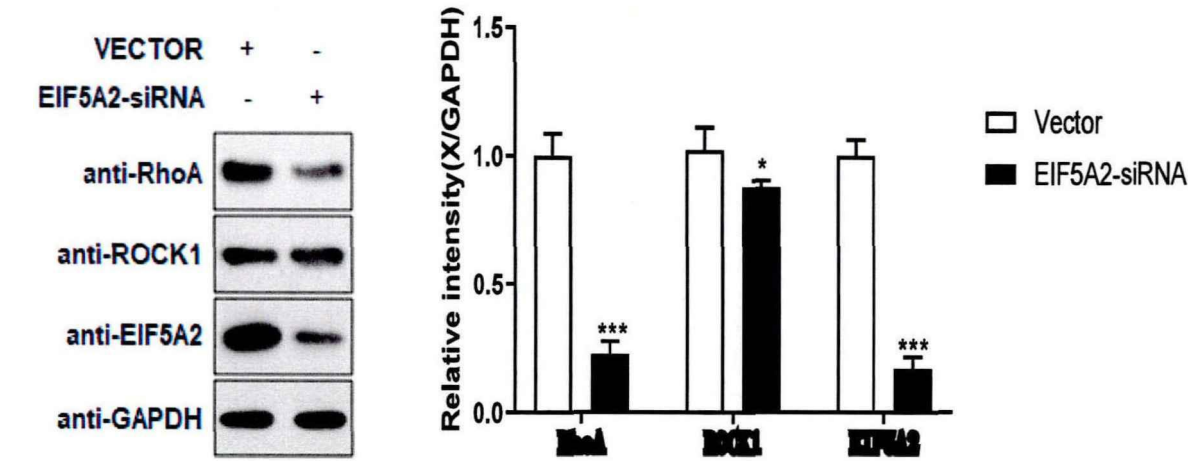


图7 EIF5A2-siRNA对EIF5A2、RhoA、ROCK I的蛋白表达的影响

($*P<0.05$, $***P<0.001$)

讨 论

1 胆囊癌的流行病学及病因

胆囊癌源于上皮组织,据统计患者5年总生存率仅5%^[1,9,11]。1777年,胆囊癌就已经由奥地利学者 Stop 发现并报道,时至今日,胆囊癌的早期诊断、预后仍面临种种困境。有关研究人员^[34]对全球范围内的 GBC 患者进行了调查,并收集其具体的临床资料,进行分析得出:患有 GBC 的这部分病人中位生存期仅仅有13周左右的时间,即一部分患者在发现确诊为胆囊后存活时间大大减少。当今医疗资源对 GBC 进行早期诊断的能力还远远不够,因此,研究 GBC 可能的病因和致病过程中的各个危险因素已成为人类接下来需要攻破的挑战。

胆囊癌发病平均年龄为59岁,我国 GBC 发病率是全部胆道癌的1/4。流行病学研究指出,GBC 的病理过程与胆囊结石密切相关。大部分胆囊癌患者均提示有胆囊结石^[1],与结石的大小有一定的关系,这部分患者发展为胆囊癌的可能性约是普通人群的13倍^[11]。其过程可能是:长期异物刺激胆囊上皮从而发生炎症反应,引起细胞发生改变,久而久之导致细胞基因突变。同样,约1~6%胆囊结石患者的胆囊发生病变进而癌变^[35],国外研究生人员分析了胆囊癌的高危因素,发现其均为胆石发病的高危因素^[36]。印度是 GBC 的高发地区,约占全球 GBC 负担的10%,该地区 GBC 患者中80%存在胆结石,胆结石的存在增加了 GB 对粘膜损伤的易感性^[37]。通过上述表明,胆囊结石引起胆囊上皮癌变是漫长的过程,是环境与遗传共同作用的结果。

另外胆囊癌的癌前病变包括:胆囊黏膜内伴有各种钙化同时合并胆囊炎症,约1/4的瓷性胆囊极有可能发展为胆囊癌^[1,38,39]。这说明胆囊癌的发生是外界刺激与自身病变共同作用的结果。

相关学者深入至细胞、分子、基因等微观层面,更清晰的阐明其发生发展机制,为临床治疗胆囊癌提供研究基础。有报道胆囊癌中存在 KRAS、CDKN2A/B、TP53、p16、MUC1、VEGF、COX-2、HMGA2 等基因突变,且与胆囊癌侵袭转移密切相关^[5,40,41]。由此可见,人体细胞基因突变导致的基因水平的各种变化是胆囊癌发生重要环节,通过基因突变导致遗传信息发生变化,从而翻译产物也有所不同,继而细胞的生物学特性发生了变化,运用现代生物学技术筛查胆囊癌细胞突变的序列片段为发现胆囊癌致病基因奠定了基础。DNA 甲基化可以导致基

基因组部分片段作用下降^[42]。有研究表示胆囊癌的抑癌基因甲基化异常增高，并且与病人生存与否密切相关^[43]。有研究团队发现，沉默 PKM2 的表达后 miR-122 可以抑制胆囊癌细胞增殖，而 MALAT 1 激活 ERK/MAPK 通路后促进胆囊癌的增殖和转移^[40, 44]。

由上可知，除了关注基因的结构改变，还应关注基因的修饰、转录过程的调节以及蛋白质的翻译。目前人们对 EIF5A2 基因在各类恶性肿瘤组织中的研究越来越深入，目前已知 EIF5A2 基因与肝癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、结直肠癌、肺非小细胞癌有着密切的联系，EIF5A2 基因极有可能促进肿瘤细胞浸润生长及转移。

本研究小组早期研究成果表明 EIF5A2 蛋白在人体胆囊癌组织中高度表达，且与肿瘤的浸润程度及恶性程度成正比。本研究小组近期发现沉默 EIF5A2 基因可影响体外胆囊癌细胞，但机制不明确，很有必要进行深入探究。RhoA 基因与乳腺癌、肝癌、宫颈癌、前列腺癌有着千丝万缕的联系，本研究得出的结论：RhoA 蛋白在人体胆囊癌及胆囊炎组织中均表达，且在人体胆囊癌组织中高表达，沉默 RhoA 基因会降低胆囊癌细胞增殖、侵袭、迁移能力，综上所述，这提示胆囊癌与 RhoA 蛋白有着密切的联系，而沉默 EIF5A2 基因后，胆囊癌细胞中 RhoA、ROCK1 蛋白表达均下降，说明 RhoA/ROCK 通路可能参与 EIF5A2 基因引起胆囊癌细胞增殖、侵袭的过程，即 RhoA/ROCK 通路可能在胆囊癌病理过程中起着一定的促癌作用，这为胆囊癌发生发展及侵袭转移的分子机制研究提供了新的思路。

2 胆囊癌的诊断

胆囊癌缺乏特异性的临床表现和实验室检查，早期多无症状，或表现为右季肋区疼痛，晚期则表现为右上腹包块、黄疸、腹水、全身衰竭等。胆囊癌标志物主要为 CEA、CA19-9，但特异性不高，同时结合其他影像学检查能提高对 GBC 的诊断准确性，彩色多普勒超声检查是筛查胆囊病变最常用且简便经济的方法，此外超声造影、内镜下超声、CT、MRCP 对于胆囊癌的诊断也是不可或缺的，超声介入行细针穿刺活检可有一定的诊断价值。

由于缺乏特异性的诊断标志物，对于胆囊癌的早期筛查及预后的评价显得非常困难，本实验结论，可以得出 RhoA 具有促癌作用，今后可能将 RhoA 作为胆

囊癌标志物，为胆囊癌的诊断提供了一个思路，这需要未来进行多维度的有力的论证。

3 胆囊癌的治疗现状

胆囊癌是一种罕见的并且高度恶性的肿瘤，疾病的早期诊断较为困难，且恶性的程度很高，发病进展快，侵袭转移能力强，预后差，缺乏针对性治疗^[45]。GBC 常常以局部浸润为主，包括肝脏、胃十二指肠以及肝门部各组织，同时伴有多处区域淋巴结转移，终末期发生血管侵犯以及远处转移。根据疾病不同的发展程度选择适宜的治疗方式，将最大程度的控制肿瘤的进展。

3.1 外科手术仍是原发性胆囊癌最优选的治疗方式，GBC 早期患者行手术治疗能够取得较为满意的疗效，与晚手术患者相比，其预后较好，进展期胆囊癌行根治性手术可提高患者生存率，以达到最大程度切除肿瘤的目的。现阶段手术治疗依然是有望治愈胆囊癌的不二之选，但只有 20%-30%^[46]的患者有条件行根治性切除。

3.2 化学疗法、放射疗法同样对治疗胆囊癌起着不可或缺的作用，在不同程度上延长患者生存时间，对晚期胆囊癌患者来说，化学疗法是相对较好的选择，此类治疗方法已应用相当成熟。美国国立综合癌症网络已经为 GBC 的治疗提供了两种选择：单药疗法，即以氟嘧啶或吉西他滨为基础的疗法，以及多药疗法，包括奥沙利铂、顺铂和卡培他滨^[47-49]。虽然确定标准方案或确定疗效的数据有限，但 FOLFOX(5-氟尿嘧啶和奥沙利铂)^[50]、CAPOX(卡培他滨和奥沙利铂)^[51, 52]、GC(吉西他滨和顺铂)^[53]和 Gemox(吉西他滨和奥沙利铂)^[54]联合治疗仍然是目前临床治疗中的主流化疗方案。

3.3 近年来，胆囊癌的靶向治疗取得了进展^[55]。基因靶向治疗手段的副作用较小，针对性强，是一种治疗效果理想的治疗手段，同时也是一种新的治疗选择。胆囊癌机制的研究将发现相关作用蛋白，也可以为更精准的靶向治疗找出有效的“靶标”分子。这将是肿瘤治疗史上革命性时刻，肿瘤的靶向治疗最初是在 1988 年基于特定化学物质的概念而发展起来的，这种化学物质在 1900^[56]年初能够消除一些微生物。此后，靶向治疗被列入到治疗各类癌症的研究项目中，其原理为：通过靶向阻断特定分子蛋白，从而影响肿瘤细胞的生物学特性^[57, 58]。大量的靶向治疗药物已经被创造出来，其中某些小分子药物通过细胞膜结构运送至细胞内，

而使其下游靶蛋白或酶结构发生改变,最终达到抑制肿瘤的作用^[59],而一部分抗体通过靶向与细胞膜表面上的蛋白结合,进而影响肿瘤细胞的凋亡、增殖等生物学活动^[60]。

鉴于最近对干预 GBC 细胞内信号通路功能障碍的各种特异性药物的临床研究, song 等^[40]更新了这些针对个体信号通路的靶向治疗,这些靶标有生长因子受体酪氨酸激酶、血管内皮生长因子受体、程序性死亡受体 1、程序性死亡配体 1、TP53、KIT 及 CDKN2A/B 等等。

RhoA / ROCK 及其下游效应蛋白,通过细胞骨架介导肿瘤细胞的恶性生物学功能。据报道, RhoA 调节其主要靶标 ROCK I^[61],而 ROCK I 激活的净作用是增强肌动蛋白细胞骨架并增加肌动蛋白-肌球蛋白依赖性力的产生。我们发现沉默 RhoA 可抑制体外胆囊癌细胞增殖能力,且 RhoA 及期下游 ROCK1 蛋白的表达均下降,可以说明 RhoA / ROCK I 通路可能存在于胆囊癌进展过程中,本实验证明了胆囊癌与 RhoA、ROCK I 有着紧密的联系,未能对该通路进行科学严谨的论证,可以提出 RhoA / ROCK I 通路促进胆囊癌发生发展的思路,旨在为今后胆囊癌的治疗提供理论基础。

4 RhoA 与肿瘤细胞的关系

Rho 家族蛋白又叫“Rho GTP 酶”,系小 G 蛋白家族中的成员,由于其可参与细胞骨架或调控靶蛋白的表达进而产生了一系列的生物学效应, Bryce W Duncan 等人^[62]发现 Semaphorin3F 通过 Rho-GTPase 信号传导驱动树突棘修剪。因 Rho GTP 酶具有细胞信号“转换器”的作用,其在肿瘤细胞各个恶性功能中起着至关重要的作用^[19, 63]。

截至到目前,越来越多的 Rho 家族蛋白分子被研究人员发现并进行相关研究,根据序列和功能的不同被分类为 RhoA、Rac1 和 Cdc4 三个亚族,其中 RhoA 是研究最为成熟的。近年众多相关研究均指出^[64-67], Rho GTP 酶作为致癌基因介导多种肿瘤细胞的侵袭转移。我们可以提出假设,其可能参与到肿瘤的病变过程中,随着越来越多的研究,其亚家族重要成员 RhoA 已经被证实报道,分别在前列腺癌、乳腺癌^[68]、结直肠癌、胃癌和卵巢癌等多种肿瘤组织中异常高表达,且与肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移及恶性进展程度密切相关。因胆囊癌的起病机制尚不明确,结合本研究小组的实验目的,提出 RhoA 是否在人体胆囊癌中有所

表达,通过后续实验初步验证了其表达于胆囊癌及胆囊炎组织中,且在胆囊癌中为高表达,这提示着,RhoA 可能参与胆囊癌的致病机制,为后续的体外 GBC-SD 相关实验提供了可行性的理论基础。

Xu 等研究人员的表明^[27],RhoA 干扰不仅诱导细胞凋亡,且抑制胃癌细胞 AGS 生存,同时降低其下游效应靶点 ROCK1 的表达,从而增加促凋亡蛋白 caspase-3、cleaved caspase-8 的表达,而 ROCK 抑制剂能够阻断 RhoA 对胃癌细胞的调控作用。结合本研究结果,沉默 RhoA 的表达,ROCK1 亦受到了抑制,最终降低 GBC-SD 的增殖、迁移和侵袭能力,可以初步认为 RhoA/ROCK1 信号通路 with GBC 有着一定的联系,其可能是 GBC 病理机制中的信号蛋白,值得进一步探究。

同时,有研究证实^[69],姜黄素通过抑制 RhoA/ROCK/MMPs 信号通路活性从而减轻由磷脂酸(LPA)诱导的乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖与迁移。即抑制 RhoA/ROCK 信号通路,可减缓肿瘤的进展,从而达到治疗的作用,这与本研究的目的也是吻合的。

更有研究表明^[70],慢病毒介导的 RhoA-shRNA 在体外细胞实验中显著抑制宫颈癌细胞增殖和迁移,且在体内有效的抑制了裸鼠成瘤并诱导了肿瘤细胞的凋亡。由此可以认为,RhoA/ROCK 通路参与并调控多种肿瘤的发生、恶性进展过程,RhoA 抑制剂可影响动物肿瘤的进展,以后有望在人体进行 RhoA 靶向药物临床试验。

目前国内外有关 RhoA 在胆囊癌的作用研究不多。Hang 等的研究发现^[71],抗癌药物 JOT01007 通过降低 RhoA、ROCK I 和 FAK 等的表达,从而抑制宫颈癌细胞 CaSki 侵袭转移。结合本研究初期已经验证 RhoA 表达于人胆囊癌组织,本研究小组提出,降低 RhoA 的表达能否对 GBC-SD 各方面生物学特性有所影响。

血管内皮生长因子 C 通过调控 RhoA/ROCK II 信号通路增加 moesin 的表达并将其激活,进而促进宫颈癌细胞迁移^[72]。相关研究发现^[73-76],ROCK 在非小细胞肺癌、肝细胞癌、乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤中呈高表达。我们选择 RhoA 的下游蛋白 ROCK1,进行一系列检测,首先通过沉默 RhoA 基因来检测 ROCK1 蛋白的表达,而后沉默 EIF5A2 基因检测 RhoA、ROCK1 蛋白表达量,从而明确三者之间的因果关系,为 GBC 的发病机制提出理论上的依据。

神经肽 Bombesin 可以通过激活 RhoA 从而调控 ROCK 促进前列腺癌的迁移, 而 ROCK 抑制剂可抑制肿瘤细胞迁移^[77]。ROCK 抑制剂对肿瘤可起到一定的抑制减缓效果, 本研究小组下一步欲探讨 ROCK 抑制剂对 GBC-SD 增殖侵袭能力的影响。

Kamai 等的研究指出^[78], RhoA、ROCK 在膀胱癌中呈高表达, 且与肿瘤的分化、肌层浸润程度及淋巴结转移程度密切相关, RhoA/ROCK 信号通路在膀胱癌的发生发展过程中起着相应的作用, 并提出 RhoA、ROCK 极有可能作为膀胱癌重要预后标志物。结合本研究实验结论: 干扰 EIF5A2 的表达导致 RhoA、ROCKI 的表达下降, 我们得出结论, RhoA/ROCKI 信号通路可能参与胆囊癌病理机制中。同时, 本研究小组提出, RhoA、ROCKI 与胆囊癌预后的是否有密切的关联, 这将是未来研究的方向所在。

5 RhoA 基因促进胆囊癌细胞的增殖、迁移与侵袭

因 RhoA 在许多肿瘤组织中异常高表达, 这与本实验结果相吻合。且相关文献提出 RhoA 与肿瘤细胞的侵袭特性密切相关, 所以预示着 RhoA 在胆囊癌发病及侵袭转移过程中起重要作用。

本研究初步探讨沉默 RhoA 基因后对于胆囊癌细胞的的影响。我们首先构建 RhoA 干扰片段(RhoA-siRNA)及空载组(NC-siRNA), 然后进行肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的相关实验研究。通过 CCK-8 法分析细胞的增殖能力, 结果显示沉默 RhoA 基因后抑制 GBC 细胞增殖。划痕实验和 Transwell 实验结果显示沉默 RhoA 基因后能有效抑制 GBC-SD 划痕愈合, 同时, GBC-SD 的侵袭能力也受到了抑制, 这提示可能通过降低 RhoA 基因的表达而抑制肿瘤恶性进展。

此外, 基于本研究小组前期成果: 通过靶向干扰胆囊癌细胞 EIF5A2 基因的表达, 能够抑制胆囊癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。此次研究通过 Western blot 检测转染 siRNA-EIF5A2 的 GBC-SD, 其 EIF5A2 蛋白、RhoA 蛋白、ROCK I 蛋白的条带较弱, 分析得出 EIF5A2 干扰后 EIF5A2 基因表达蛋白的水平及 RhoA 蛋白水平明显降低, ROCK I 蛋白表达量也受到了抑制。这提示着干扰体外胆囊癌细胞 EIF5A2 基因的表达后, RhoA/ROCK I 通路可能参与胆囊癌细胞增殖及迁移侵袭过程。Eunsun Ko 等^[79]研究表明 Nrf2 通过 RhoA/ROCK1 途径调节非小细

胞肺癌细胞的运动，这与本次实验结论也是吻合的，即降低 RhoA/ROCK1 的表达，抑制胆囊癌细胞的增殖、侵袭与迁移能力。

6 研究不足与展望

本研究也存在一些不足之处，未能成功用石蜡切片组织做 Western blot、PCR 检测 RhoA 基因，其原因可能与胆囊癌石蜡组织提取不满意有关。本实验运用的瞬时转染 siRNA 技术，其稳定性欠佳，未通过慢病毒稳转技术获得抑制 RhoA 基因表达的稳定细胞系。

值得注意的是，本实验结果表明，人体胆囊癌组织及体外胆囊癌细胞均验证了 RhoA 在胆囊癌的表达，RhoA 降低体外胆囊癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力，且沉默胆囊癌细胞 EIF5A2 基因后，RhoA 蛋白水平明显降低，RhoA 下游效应靶点 ROCK I 的表达亦降低，结合本研究小组之前实验结果：干扰胆囊癌细胞 EIF5A2 基因的表达后胆囊癌细胞增殖、迁移、侵袭能力均降低，由此可见，EIF5A2 基因促进胆囊癌细胞增殖迁移侵袭能力的可能与 RhoA/ROCK I 信号通路相关，本次未设置更多实验从多方面多层次验证 EIF5A2 基因介导的胆囊癌发生发展中 RhoA/ROCK I 信号通路的具体活动，同时胆囊癌细胞系在裸鼠体内的成瘤能力以及 RhoA-siRNA、EIF5A2-siRNA 能否抑制裸鼠体内胆囊癌瘤体的生长尚未进行验证，目前实验仍然欠全面完整，为了加以更深刻具体的探讨，以上不足之处即是今后实验研究开展的方向。

结 论

1、RhoA 蛋白在人体胆囊癌及胆囊炎组织中均呈表达状态，且在人体胆囊癌组织中呈高表达。

2、本实验用到的 siRNA-RhoA 对体外胆囊癌细胞的 RhoA 基因表达具有一定的抑制作用；通过靶向沉默胆囊癌细胞的 RhoA 基因，能够抑制体外胆囊癌细胞的增殖，同时其迁移能力和侵袭能力也受到了抑制。

3、降低体外胆囊癌细胞 EIF5A2 基因的表达，可使 RhoA、ROCK I 蛋白表达均下降。

参考文献

- [1] Hundal R, Shaffer E A. Gallbladder cancer: epidemiology and outcome. Clin Epidemiol, 2014, 6:99-109.
- [2] Shu Y J, Bao R F, Jiang L, Wang Z, Wang X A, Zhang F, Liang H B, Li H F, Ye Y Y, Xiang S S, Weng H, Wu X S, Li M L, Hu Y P, Lu W, Zhang Y J, Zhu J, Dong P, Liu Y B. MicroRNA-29c-5p suppresses gallbladder carcinoma progression by directly targeting CPEB4 and inhibiting the MAPK pathway . Cell Death Differ, 2017, 24(3): 445-457.
- [3] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 . CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [4] Torre L A, Bray F, Siegel R L, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012 . CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [5] Li M, Zhang Z, Li X, Ye J, Wu X, Tan Z, Li U C, Shen B, Wang X A, Wu W, Zhou D, Zhang D, Wang T, Liu B, Qu K, Ding Q, Weng H, Ding Q, Mu J, Shu Y, Bao R, Cao Y, Chen P, Liu T, Jiang L, Hu Y, Dong P, Gu J, Lu W, Shi W, Lu J, Gong W, Tang Z, Zhang Y, Wang X, Chin y E, Weng X, Zhang H, Tang W, Zheng Y, He L, Wang H, Liu Y, Liu Y. Whole-exome and targeted gene sequencing of gallbladder carcinoma identifies recurrent mutations in the ErbB pathway. Nat Genet, 2014, 46(8): 872-876.
- [6] Shu Y J, Weng H, Ye Y Y, Hu Y P, Bao R F, Cao Y, Wang X A, Zhang F, Xiang S S, Li H F, Wu X S, Li M L, Jiang L, Lu W, Han B S, Jie Z G, Liu Y B. SPOCK1 as a potential cancer prognostic marker promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the PI3K/AKT pathway . Mol Cancer, 2015, 14(1): 12.
- [7] Zhang Y, Liu S, Wang L, Wu Y, Hao J, Wang Z, Lu W, Wang X A, Zhang F, Cao Y, Liang H, Li H, Ye Y, Ma Q, Zhao S, Shu Y, Bao R, Jiang L, Hu Y, Zhou J, Chen L, Liu Y. A novel PI3K/AKT signaling axis mediates Nectin-4-induced gallbladder cancer cell proliferation, metastasis and tumor growth . Cancer Lett, 2016, 375(1): 179-189.
- [8] Gourgiotis S, Kocher H M, Solaini L, Yarollahi A, Tsiambas E, Salemis N S. Gallbladder cancer . Am J Surg, 2008, 196(2): 252-264.
- [9] Hueman M T, Vollmer C M, JR., Pawlik T M. Evolving treatment strategies for gallbladder cancer . Ann Surg Oncol, 2009, 16(8): 2101-2115.
- [10] Li Z, Chen Y, Wang X, Zhang H, Zhang Y, Gao Y, Weng M, Wang L, Liang H, Li M, Zhang F, Zhao S, Liu S, Cao Y, Shu Y, Bao R, Zhou J, Liu X, Yan Y, Zhen L, Dong Q, Liu Y. LASP-1

- induces proliferation, metastasis and cell cycle arrest at the G2/M phase in gallbladder cancer by down-regulating S100P via the PI3K/AKT pathway . *Cancer Lett*, 2016, 372(2): 239-50.
- [11] 邹声泉, 张林. 全国胆囊癌临床流行病学调查报告. *中国实用外科杂志*, 2000, (01): 43-46.
- [12] Foster J M, Hoshi H, Gibbs J F, Iyer R, Javle M, Chu Q, Kuvshinov B. Gallbladder cancer: Defining the indications for primary radical resection and radical re-resection. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(2): 833-840.
- [13] 陈亚进. 胆囊的解剖学特点及胆囊癌浸润转移途径. *中国实用外科杂志*, 2011, 31 (03): 207-209.
- [14] 靳云鹏, 包润发, 胡云平, 刘颖斌. 胰岛素样生长因子 II mRNA 结合蛋白 3 对胆囊癌迁移侵袭的影响. *腹部外科*, 2017, 30 (05): 338-342.
- [15] Cao Y, Liu X, Lu W, Chen Y, Wu X, Li M, Wang X A, Zhang F, Jiang L, Zhang Y, Hu Y, Xiang S, Shu Y, Bao R, Li H, Wu W, Weng H, Yen Y, Liu Y. Fibronectin promotes cell proliferation and invasion through mTOR signaling pathway activation in gallbladder cancer . *Cancer Lett*, 2015, 360(2): 141-150.
- [16] Shu Y J, Weng H, Bao R F, Wu X S, Ding Q, Cao Y, Wang X A, Zhang F, Xiang S S, Li H F, Li M L, Mu J S, Wu W G, Liu Y B. Clinical and prognostic significance of preoperative plasma hyperfibrinogenemia in gallbladder cancer patients following surgical resection: a retrospective and in vitro study . *BMC cancer*, 2014, 14:566.
- [17] Wu X S, Shi L B, Li M L, Ding Q, Weng H, Wu W G, Cao Y, Bao R F, Shu Y J, Ding Q C, Mu J S, Gu J, Dong P, Liu Y B. Evaluation of two inflammation-based prognostic scores in patients with resectable gallbladder carcinoma . *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(2): 449-457.
- [18] 董家鸿, 王剑明, 曾建平. 胆囊癌诊断和治疗指南(2015版). *临床肝胆病杂志*, 2016, 32 (03): 411-409.
- [19] Manickam N, Patel M, Griendling K K, Gorin Y, Barnes J L. RhoA/Rho kinase mediates TGF- β 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species . *American journal of physiology Renal physiology*, 2014, 307(2): F159-171.
- [20] Nithipatikom K, Gomez-granados A D, Tang A T, Pfeiffer A W, Williams C L, Campbell W B. Cannabinoid receptor type 1 (CB1) activation inhibits small GTPase RhoA activity and regulates motility of prostate carcinoma cells . *Endocrinology*, 2012, 153(1): 29-41.

- [21] Liu J, Zhang Y, Xu R, Du J, Hu Z, Yang L, Chen Y, Zhu Y, Gu L. PI3K/Akt-dependent phosphorylation of GSK3 β and activation of RhoA regulate Wnt5a-induced gastric cancer cell migration . *Cellular signalling*, 2013, 25(2): 447-456.
- [22] Jeong D, Park S, Kim H, Kim C J, Ahn T S, Bae S B, Kim H J, Kim T H, Im J, Lee M S, Kwon H Y, Baek M J. RhoA is associated with invasion and poor prognosis in colorectal cancer . *International journal of oncology*, 2016, 48(2): 714-722.
- [23] Hwang H, Kim E K, Park J, Suh P G, Cho Y K. RhoA and Rac1 play independent roles in lysophosphatidic acid-induced ovarian cancer chemotaxis. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 2014, 6(3): 267-276.
- [24] 姬宏娟, 王梅, 姬宏利. 肝癌组织 RhoA 表达及与浸润转移的关系. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(01): 51-54.
- [25] 刘晓军. eIF5A2 基因沉默对宫颈癌细胞增殖、迁移的影响及机制初探; 吉林大学, 2016.
- [26] Tang D J, Dong S S, Ma N F, Xie D, Chen L, Fu L, Lau S H, li Y, Li Y, Guan X Y. Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A2 enhances cell motility and promotes tumor metastasis in hepatocellular carcinoma . *Hepatology*, 2010, 51(4): 1255-1263.
- [27] Xu X T, Song Q B, Yao Y, Ruan P, Tao Z Z. Inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway promotes the apoptosis of gastric cancer cells. *Hepato-gastroenterology*, 2012, 59(120): 2523-2526.
- [28] Fujimura K, Choi S, Wyse M, Strnadel J, Wright T, Klemke R. Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. *The Journal of biological chemistry*, 2015, 290(50): 29907-29919.
- [29] Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annual review of biochemistry*, 1999, 68: 459-486.
- [30] Julian L, Olson M F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions . *Small GTPases*, 2014, 5:e29846.
- [31] Tawab osman N, Khalaf M, Ibraheem S. Assessment of CIP2A and ROCK-I expression and their prognostic value in breast cancer. *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, 2020, 71(2): 87-98.

- [32] Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS letters*, 1996, 392(2): 189-193.
- [33] 李佼佼. siRNA 干扰体外胆囊癌细胞 EIF5A2 的表达及对胆囊癌细胞侵袭的影响; 昆明医科大学, 2020.
- [34] Cubertaond P, Mathonnet M, Gainant A, Launois B. Radical surgery for gallbladder cancer. Results of the French Surgical Association Survey .*Hepato-gastroenterology*, 1999, 46(27): 1567-1571.
- [35] 石景森. 我国胆囊癌的发病情况及外科处理. *肝胆胰外科杂志*, 1999, 01: 53-54.
- [36] Zatonski W A, Lowenfels A B, Boyle P, Maisonneuve P, Bueno DE, Mesquita H B, Ghadirian P, Jain M, Przewozniak K, Baghurst P, Moerman C J, Simard A, Howe G R, McMichael A J, Hsieh C C, Walker A M. Epidemiologic aspects of gallbladder cancer: a case-control study of the SEARCH Program of the International Agency for Research on Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1997, 89(15): 1132-1138.
- [37] Dutta U, Bush N, Kalsi D, Popli P, Kapoor V K. Epidemiology of gallbladder cancer in India . *Chinese clinical oncology*, 2019, 8(4): 33.
- [38] Schnellendorfer T. Porcelain gallbladder: a benign process or concern for malignancy? . *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 2013, 17(6): 1161-1168.
- [39] Cunningham S C, Alexander H R. Porcelain gallbladder and cancer: ethnicity explains a discrepant literature?. *The American journal of medicine*, 2007, 120(4): e17-18.
- [40] Song X, Hu Y, Li Y, Shao R, Liu F, Liu Y. Overview of current targeted therapy in gallbladder cancer . *Signal transduction and targeted therapy*, 2020, 5(1): 230.
- [41] 包润发, 束翌俊, 刘颖斌. 人类表皮生长因子受体 2/neu 基因在胆道系统恶性肿瘤中的研究进展. *中华消化外科杂志*, 2015, 14(05): 434-437.
- [42] Li M, Liu F, Zhang F, Zhou W, Jiang X, Yang Y, Qu K, Wang Y, Ma Q, Wang T, Bai L, Wang Z, Song X, Zhu Y, Yuan R, Gao Y, Liu Y, Jin Y, Li H, Xiang S, Ye Y, Zhang Y, Jiang L, Hu Y, Hao Y, Lu W, Chen S, Gu J, Zhou J, Gong W, Zhang Y, Wang X, Liu X, Liu C, Liu H, Liu Y, Liu Y. Genomic ERBB2/ERBB3 mutations promote PD-L1-mediated immune escape in gallbladder cancer: a whole-exome sequencing analysis . *Gut*, 2019, 68(6): 1024-1033.

- [43] House M G, Wistuba, II, Argani P, Guo M, Schulick R D, Hruban R H, Herman J G, Maitra A. Progression of gene hypermethylation in gallstone disease leading to gallbladder cancer . *Ann Surg Oncol*, 2003, 10(8): 882-889.
- [44] Hu Y P, Jin Y P, Wu X S, Yang Y, Li Y S, Li H F, Xiang S S, Song X L, Jiang L, Zhang Y J, Huang W, Chen S L, Liu F T, Chen C, Zhu Q, Chen H Z, Shao R, Liu Y B. LncRNA-HGBC stabilized by HuR promotes gallbladder cancer progression by regulating miR-502-3p /SET/AKT axis . *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 167.
- [45] Subbiah I M, Subbiah V, Tsimberidou A M, Naing A, Kaseb A O, Javle m, Fu S, Hong D S, Piha-paul S, Wheler J J, Hess K R, Janku F, Falchook G S, Wolff R A, Kurzrock R. Targeted therapy of advanced gallbladder cancer and cholangiocarcinoma with aggressive biology: eliciting early response signals from phase 1 trials. *Oncotarget*, 2013, 4(1): 156-165.
- [46] 刘颖斌, 吴文广. 胆囊癌综合治疗进展 . *上海医药*, 2014, 35(14): 6-8.
- [47] Primrose J N, Fox R P, Palmer D H, Malik H Z, Prasad R, Mirza D, Anthony A, Corrie P, Falk S, Finch-jones M, Wasan H, Ross P, Wall L, Wadsley J, Evans J T R, Stocken D, Praseedom R, Ma Y T, Davidson B, Neoptolemos J P, Iveson T, Raftery J, Zhu S, Cunningham D, Garden O J, Stubbs C, Valle J W, Bridgewater J. Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 2019, 20(5): 663-673.
- [48] Ben-josef E, Guthrie K A, El-khoueiry A B, Corless C L, Zalupski M M, Lowy A M, Thomas C R, Jr., Alberts S R, Dawson L A, Micetich K C, Thomas M B, Siegel A B, Blanke C D. Swog S: A Phase II Intergroup Trial of Adjuvant Capecitabine and Gemcitabine Followed by Radiotherapy and Concurrent Capecitabine in Extrahepatic Cholangiocarcinoma and Gallbladder Carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2015, 33(24): 2617-2622.
- [49] Valle J, Wasan H, Palmer D H, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira S P, Roughton M, Bridgewater J. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *The New England journal of medicine*, 2010, 362(14): 1273-1281.
- [50] Sinn M, Wege H, Stein A. Biliary tract cancer: on the way to a personalized therapy. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 2020, 145(7): 442-446.

- [51] Graham J S, Boyd K, Coxon F Y, Wall L R, Eatock m m, Maughan T S, Highley M, Soulis E, Harden S, Bützberger-zimmerli P, Evans T R. A phase II study of capecitabine and oxaliplatin combination chemotherapy in patients with inoperable adenocarcinoma of the gall bladder or biliary tract. *BMC research notes*, 2016, 9:161.
- [52] Gunnlaugsson A, Anderson H, Lind P, Glimelius B, Johnsson A. Multicentre phase I-II trial of capecitabine and oxaliplatin in combination with radiotherapy for unresectable pancreatic and biliary tract cancer: The CORGI-U study. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 2010, 95(3): 292-297.
- [53] Sharma A, Kalyan mohanti B, Pal chaudhary S, Sreenivas V, Kumar sahu R, Kumar shukla N, Thulkar S, Pal S, Deo S V, Pathy S, Ranjan dash N, Kumar S, Bhatnagar S, Kumar R, Mishra S, Sahni P, Iyer V K, Raina V. Modified gemcitabine and oxaliplatin or gemcitabine + cisplatin in unresectable gallbladder cancer: Results of a phase III randomised controlled trial . *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2019, 123:162-170.
- [54] Qin T J, Zhao X H, Yun J, Zhang L X, Ruan Z P, Pan B R. Efficacy and safety of gemcitabine-oxaliplatin combined with huachansu in patients with advanced gallbladder carcinoma . *World journal of gastroenterology*, 2008, 14(33): 5210-5216.
- [55] Cai Q, Wang S, Jin L, Weng M, Zhou D, Wang J, Tang Z, Quan Z. Long non-coding RNA GBCDRlnc1 induces chemoresistance of gallbladder cancer cells by activating autophagy. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 82.
- [56] Brodsky F M. Monoclonal antibodies as magic bullets. *Pharmaceutical research*, 1988, 5(1): 1-9.
- [57] Lee Y T, Tan Y J, Oon C E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European journal of pharmacology*, 2018, 834:188-196.
- [58] Gasser M, Waaga-gasser A M. Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy. *Advances in experimental medicine and biology*, 2016, 917:95-120.
- [59] Wen Y M, Shi Y. Immune Complex Vaccination . *Current topics in microbiology and immunology*, 2019, 423:95-118.
- [60] Seebacher N A, Stacy A E, Porter G M, Merlot A M. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 2019, 38(1): 156.

- [61] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity . Cytoskeleton (Hoboken, NJ), 2010, 67(9): 545-554.
- [62] Duncan B W, Mohan V, Wade S D, Truong Y, Kampov-polevoi A, Temple B R, Maness P F. Semaphorin3F Drives Dendritic Spine Pruning Through Rho-GTPase Signaling. Molecular neurobiology, 2021,
- [63] Heasman S J, Ridley A J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies . Nature reviews Molecular cell biology, 2008, 9(9): 690-701.
- [64] Aronheim A, Broder Y C, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, ABO A. Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton . Current biology : CB, 1998, 8(20): 1125-1128.
- [65] Gouw L G, Reading N S, Jenson S D, Lim M S, Elenitoba-johnson K S. Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas . British journal of haematology, 2005, 129(4): 531-533.
- [66] Benitah S A, Valerón P F, Van aelst L, Marshall C J, Lacal J C. Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. Biochimica et biophysica acta, 2004, 1705(2): 121-132.
- [67] Senapati S, Rachagani S, Chaudhary K, Johansson S L, Singh R K, Batra S K. Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway . Oncogene, 2010, 29(9): 1293-1302.
- [68] Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, Douchi D, Oikawa M, Rikiyama T, Fukase K, Katayose Y, Egawa S, Unno M. GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation . Cancer Lett, 2012, 325(1): 99-107.
- [69] Sun K, Duan X, Cai H, Liu X, YanG Y, li M, Zhang X, Wang J. Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells . Clinical and experimental medicine, 2016, 16(1): 37-47.
- [70] Wang X, Jiang W, Kang J, Liu Q, Nie M. Knockdown of RhoA expression alters ovarian cancer biological behavior in vitro and in nude mice . Oncology reports, 2015, 34(2): 891-899.
- [71] Huang A C, Hsu S C, Kuo C L, Liao C L, Lai K C, Lin T P, Wu S H, Lu H F, Tang N Y, Yang J S, Chung J G. Involvement of matrix metalloproteinases in the inhibition of cell invasion

- and migration through the inhibition of NF-[kappa]B by the new synthesized ethyl 2-[N-(4-chlorobenzyl)-(2'-methyl)anilino]-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate (JOTO1007) in human cervical cancer Ca ski cells. *In vivo* (Athens, Greece), 2009, 23(4): 613-619.
- [72] He M, Cheng Y, Li W, Liu Q, Liu J, Huang J, Fu X. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. *BMC cancer*, 2010, 10:170.
- [73] Wong C M, Wei L, Au S L, Fan D N, Zhou Y, Tsang F H, Law C T, Lee J M, He X, Shi J, Wong C C, Ng I O. MiR-200b/200c/429 subfamily negatively regulates Rho/ROCK signaling pathway to suppress hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 13658-13670.
- [74] Zheng M, Sun X, Li Y, Zuo W. MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2016, 37(6): 8189-8196.
- [75] McGrail D J, Kieu Q M, Dawson M R. The malignancy of metastatic ovarian cancer cells is increased on soft matrices through a mechanosensitive Rho-ROCK pathway. *Journal of cell science*, 2014, 127(Pt 12): 2621-2626.
- [76] KÜMPER S, Mardakheh F K, McCarthy A, Yeo M, Stamp G W, Paul A, Worboys J, Sadok A, Jørgensen C, Guichard S, Marshall C J. Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. *eLife*, 2016, 5:e12994.
- [77] Zheng R, Iwase A, Shen R, Goodman O B, JR., Sugimoto N, Takuwa Y, Lerner D J, Nanus D M. Neuropeptide-stimulated cell migration in prostate cancer cells is mediated by RhoA kinase signaling and inhibited by neutral endopeptidase. *Oncogene*, 2006, 25(44): 5942-5952.
- [78] Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2003, 9(7): 2632-2641.
- [79] Eunsun K, Dasom K, Wha M D, Hae K S, Yun L J. Nrf2 regulates cell motility through RhoA-ROCK1 signalling in non-small-cell lung cancer cells. *Scientific reports*, 2021, 11(1).

综 述

RhoA 基因在肿瘤方面的研究现状

向毅 综述, 孙敏 审校

摘要:

20 世纪 80 年代中期至 90 年代生物学的主要研究领域之一是阐明控制细胞反应的信号通路。其中关于 RhoGTP 酶等小分子做了大量研究。目前 Rho 信号研究已经扩展到生物学和医学的所有领域。Rho 信号在很多方面有了一定的研究进展, 目前主流研究观点认为, RhoA 作为 Rho 蛋白家族成员中研究较为成熟, 其被认为具有促进肿瘤进展的作用, 干扰 RhoA 基因可影响肿瘤细胞的生长增殖。RhoA/ROCK 通路在许多生物学效应中起着枢纽的作用, 最终产生抑制或促进效应。本文就 RhoA 的来源和其结构功能以及在各类肿瘤的研究进展进行了综述。

关键词: RhoA; RhoGTP 酶; RhoA/ROCK; 肿瘤

1 Rho 亚家族的发现与功能

在 1980 年代中期, 信号转导研究发生了转变。虽然已经鉴定并克隆了跨膜信号转导的原型, 但人们对细胞内传递的信号如何引起细胞反应(例如增殖、胞吐、黏附作用)知之甚少。尽管有报道称 GTP 参与了其中的一些反应, 但具有这种 GTP 依赖功能的分子还远未被识别。一个例外是 RAS, 它被鉴定为逆转录病毒编码的癌基因, 编码一个 21 kDa 的 GTP 结合蛋白。在这种情况下, Madaule 和 Axel 偶然发现了海兔中的第一个 RAS 同源物, 并将其命名为 Rho^[1]。他们进一步在人和大鼠中发现了 Rho 基因, 并认为人类的 Rho 基因可能由三个成员组成, 后来被命名为 RhoA、B 和 C。然而, 在没有任何生物学发现的情况下, 人们对 Rho 基因的关注很少。由于人们对 Rho 亚型之间的差异知之甚少, 该领域的早期研究大多集中在 RhoA 上。

Rho 家族包括 Rho(RhoA, RhoB, RhoC), Rac, Cdc42 等 3 个亚家族蛋白。Rho 家族蛋白促使细胞癌变。随着生物科学的发展, 学者们发现 Rho 家族成员在多种肿瘤组织表达增加, 同时指出, 与肿瘤的侵袭转移程度保持紧密的联系。

2 RhoA 的结构及生物学功能

RhoA 通过在 GDP 和 GTP 之间的转换,从而发挥其生物学效应。RhoA 的活化可以启动下游的信号转导通路。而失活状态下,RhoA 释放出 GTP,与 GDP 结合,该过程发生于细胞浆中,从而失去其启动功能^[2]。

RhoA 与细胞骨架的功能密切相关,主要包括:激活下游的 ROCK 等效应分子实现^[3]。ROCK 主要有两种亚型(ROCK1 和 ROCK2)。ROCK 活化后可对下游肌球蛋白轻链进行磷酸化^[4],进而促进细胞的迁移能力。

3 RhoA 在肿瘤中研究进展

临床人类肿瘤的高通量测序发现了 *rac1* 的快周期 P29S、P29L 和 P29Q 突变^[5-7],在 T 细胞淋巴瘤中常见的 G17V RhoA 突变^[8,9]。由于这些 RhoA 突变的生化特性尚不清楚,这些 RhoA 突变如何诱导肿瘤发生是一个需要解决的问题。大量研究显示 RhoA 对于恶性肿瘤的发生发展起着不可或缺的作用。人体组织及细胞受到致癌因素作用时,这些致癌物质可激活与 RhoA 蛋白相关的信号通路,进而诱导正常细胞的恶变,其原因很可能是因为细胞骨架发生了改变。RhoA 在肿瘤细胞的其他生物学行为的调控上也发挥重要作用。

3.1 RhoA 与宫颈癌

在 miRNA-200b 作用下,可靶向调节 RhoA 基因抑制宫颈癌的部分恶性功能^[10]。Xiaojun Liu 等^[11]使用蛋白质印迹法在宫颈癌标本中鉴定了 RhoA 及其下游效应物 ROCK-1 和 ROCK-II 的过表达并且通过上调或下调 HeLa 细胞中 RhoA 的表达来确定 RhoA 对 CC 细胞系之一的 HeLa 细胞的增殖和迁移的影响。

3.2 RhoA 与睾丸精元细胞瘤

睾丸生殖细胞肿瘤的发病率高,高峰在 20-40 岁。超过 90% 诊断为睾丸 GCT 的患者通过手术、放疗和含顺铂化疗的有效组合得以治愈^[12]。然而,晚期和复发肿瘤患者的预后比预期的要差。Kamai 等^[13]在睾丸精元细胞瘤和未受影响的组织中都检测到 RhoA 的基因,RhoA 的基因水平在肿瘤组织中明显高于未受影响的部分,而 RhoB 和 RhoC 的基因水平要么低于检测极限,要么检测不到。这表明,肿瘤组织中 RhoA 的基因水平明显高于未受影响的部分,并且肿瘤组织中的水平与较高的肿瘤分期相关。

3.3 RhoA 与胆管癌

胆管癌的病因与胆结石、硬化性胆管炎等疾病有关^[14]。虽然手术、放疗和化疗已被广泛应用,但 CCA 的预后仍然很差^[15, 16]。

Jianfei Tu 等^[17]研究表明,长非编码 RNA PCAT6 通过调节 miR-326 和 RhoA/ROCK 信号通路诱导胆管癌巨噬细胞 M2 极化,由于 miR-326 被预测并证明为 PCAT6 的靶标,他们预测并证明 RhoA 作为 miR-326 的下游靶标。这说明,PCAT6 通过激活 miR-326 和激活 RhoA 信号调节巨噬细胞的活性氧生成、线粒体应激反应和 M2 极化,参与了 CCA 的免疫应答。

3.4 RhoA 与肝癌

Anne Blangy^[18]研究发现肌腱蛋白在控制细胞粘附中起着至关重要的作用。肌腱蛋白可以通过其磷酸酪氨酸结合结构域结合 β 整联蛋白的尾部,肌腱蛋白已经成为细胞粘附和迁移的重要调节剂,特别是通过参与 Rho GTP 酶信号传导途径。肌腱蛋白可通过调节肝癌中缺失的 Rho GTP 酶活化蛋白来影响 GTP 酶 RhoA 的活性。Sharda Yadav 等^[19]阐明了机械刺激在肝癌细胞力学生物学中的作用,即拉伸肝癌细胞会显著提高 HCC 和胆管癌细胞系中 RhoA 和 Rac1 的表达水平。

3.5 RhoA 与乳腺癌

van Vuuren 等^[20]发现 2-甲氧雌二醇可通过改变 RhoA 的活性而影响微管网络,发挥抗乳腺癌细胞迁移的作用。Meng Pan 等^[21]发现 BNIP-2 是一种含有 BCH 结构域的蛋白质,既可以结合 RhoA 和 GEF-H1,又可以通过微管上的 kinesin-1 转运,对 GEF-H1 驱动的 RhoA 激活在微管拆卸中很重要。MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 BNIP-2 的耗尽会降低 RhoA 活性并促进细胞迁移。诺可达唑诱导的微管拆卸后,BNIP-2 和 GEF-H1 之间的相互作用增加,而敲除 BNIP-2 通过减少 RhoA-GEF-H1 相互作用降低 RhoA 激活和细胞舍入。这些发现表明 BNIP-2 通过脚手架 GEF-H1 和 RhoA,微调 RhoA 活性和细胞迁移,使微管和粘着斑耦合。

3.6 RhoA 与前列腺癌

Bueno De Paiva 等^[22]发现沉默 RhoA 可抑制前列腺癌增殖,这可为临床治疗前列腺癌提供了理论基础。也有学者发现在前列腺癌细胞中,RhoA 可作为相关信号通路中的一种下游分子在肿瘤细胞的胞质分裂早期发挥作用,从而调节其细

胞周期的进展，因此若能阻断 RhoA 可能抑制细胞的有丝分裂，最终肿瘤细胞走向凋亡^[23]。

3.7 RhoA 与卵巢癌

环状 RNA (circRNA) 在癌症的肿瘤发生和发展中起着重要作用，代表了预后生物标志物和治疗靶标。Shuo Chen 等^[24]证明了 circ-NOLC1 在上皮性卵巢癌 (EOC) 中的作用，即 Circ-NOLC1 在 EOC 组织中的表达高于正常组织，并且与 FIGO 阶段，分化呈正相关，此外，circ-NOLC1 的过表达显著增加了 ESRP1，RhoA 和 CDK1 蛋白和 mRNA 的表达水平，circ-NOLC1 下调具有相反的效果，敲除 circ-NOLC1 的细胞中 ESRP1，CDK1 或 RhoA 的表达会抑制 circ-NOLC1 的促肿瘤作用，这可能通过调节 RhoA 和 CDK1 的表达来发挥作用。由此可知，Circ-NOLC1 可能通过结合 ESRP1 并调节 CDK1 和 RhoA 表达来促进 EOC 的肿瘤发生和发展。亦有多项研究表明 RhoA 与卵巢癌的进展有关，强调了 RhoA 依赖性细胞运动在肿瘤恶性行为中的作用。

4 结语

一系列研究表明 RhoA 及其上下游通路中的分子对于许多种类肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭等行为具有重要作用。RhoA 所涉及的细胞功能改变包括肌动蛋白聚合、肌球蛋白环收缩以及应力纤维形成等作用，通过改变微丝、微管等细胞骨架结构从而促进 EMT、细胞极性转换以及伪足生成等过程。在许多肿瘤中 RhoA 表达异常，大多数肿瘤的恶性程度与 RhoA 活性呈正比，拮抗细胞内 RhoA 的过度表达和活化可直接影响细胞侵袭迁移的过程。可通过多方面多层次的研究论证 RhoA 是否为抗肿瘤的有效靶点，这使得抑制肿瘤的靶向药物早日出现变得可行，这一治疗恶性肿瘤的新临床治疗方法将造福于全人类。

参考文献

- [1] Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family . *Cell*, 1985, 41(1): 31-40.
- [2] Kawano Y, Kaneko-kawano T, Shimamoto K. Rho family GTPase-dependent immunity in plants and animals . *Frontiers in plant science*, 2014, 5:522.
- [3] Bhadriraju K, Yang M, Alom ruiz S, Pirone D, Tan J, Chen C S. Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension . *Experimental cell research*, 2007, 313(16): 3616-3623.
- [4] Kale V P, Hengst J A, Desai D H, Amin S G, Yun J K. The regulatory roles of ROCK and MRCK kinases in the plasticity of cancer cell migration . *Cancer Lett*, 2015, 361(2): 185-196.
- [5] Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi Y L, Mano H. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(8): 3029-3034.
- [6] Krauthammer M, Kong Y, Ha B H, Evans P, Bacchiocchi A, Mccusker J P, Cheng E, Davis m J, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-regester K, Capatana A, Holman E C, Bosenberg m, Sznol M, Kluger H M, Brash D E, Stern D F, Materin M A, Lo R S, Mane S, Ma S, Kidd K K, Hayward N K, Lifton R P, Schlessinger J, Boggon T J, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma . *Nat Genet*, 2012, 44(9): 1006-1014.
- [7] Hodis E, Watson I R, Kryukov G V, Arold S T, Imielinski M, Theurillat J P, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos A H, Lawrence M S, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio R C, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton D L, STemke-hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury J E, Davies M A, Gershenwald J E, Wagner S N, Hoon D S, Schadendorf D, Lander E S, Gabriel S B, Getz G, Garraway L A, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 2012, 150(2): 251-263.
- [8] Sakata-yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-matsubara R, Tran N B, Izutsu

- K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma . *Nat Genet*, 2014, 46(2): 171-175.
- [9] Yoo H Y, Sung M K, Lee S H, Kim S, Lee H, Park S, Kim S C, Lee B, Rho K, Lee J E, Cho K H, Kim W, Ju H, Kim J, Kim S J, Kim W S, Lee S, Ko Y H. A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma . *Nat Genet*, 2014, 46(4): 371-375.
- [10] He L, Wang J, Chang D, Lv D, Li H, Feng H. Effect of miRNA-200b on the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by targeting RhoA . *Open medicine (Warsaw, Poland)*, 2020, 15(1): 1019-1027.
- [11] Liu X, Chen D, Liu G. Overexpression of RhoA promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells . *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2014, 78(11): 1895-1901.
- [12] Bosl G J, Motzer R J. Testicular germ-cell cancer. *The New England journal of medicine*, 1997, 337(4): 242-253.
- [13] Kamai T, Arai K, Tsujii T, Honda M, Yoshida K. Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour . *BJU international*, 2001, 87(3): 227-231.
- [14] Sha M, Jeong S, Xia Q. Antiviral therapy improves survival in patients with HBV infection and intrahepatic cholangiocarcinoma undergoing liver resection: Novel concerns . *Journal of hepatology*, 2018, 68(6): 1315-1316.
- [15] Blechacz B. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut and liver*, 2017, 11(1): 13-26.
- [16] Laurent S, Verhelst X, Geerts A, Geboes K, De man M, Troisi R, Vanlander A, Rogiers X, Berrevoet F, Van vlierberghe H. Update on liver transplantation for cholangiocarcinoma : a review of the recent literature . *Acta gastro-enterologica Belgica*, 2019, 82(3): 417-420.
- [17] Tu J, Wu F, Chen L, Zheng L, Yang Y, Ying X, Song J, Chen C, Hu X, Zhao Z, Ji J. Long Non-Coding RNA PCAT6 Induces M2 Polarization of Macrophages in Cholangiocarcinoma via Modulating miR-326 and RhoA-ROCK Signaling Pathway . *Frontiers in oncology*, 2020, 10:605877.

- [18] Blangy A. Tensins are versatile regulators of Rho GTPase signalling and cell adhesion. *Biology of the cell*, 2017, 109(3): 115-126.
- [19] Yadav S, Kashaninejad N, Nguyen N T. RhoA and Rac1 in Liver Cancer Cells: Induction of Overexpression Using Mechanical Stimulation . *Micromachines*, 2020, 11(8): 729.
- [20] Van vuuren R J, Botes M, Jurgens T, Joubert A M, Van Den Bout i. Novel sulphamoylated 2-methoxy estradiol derivatives inhibit breast cancer migration by disrupting microtubule turnover and organization . *Cancer cell international*, 2019, 19(1): 1.
- [21] Pan M, Chew T W, Wong D C P, Xiao J, Ong H T, Chin J F L, Low B C. BNIP-2 retards breast cancer cell migration by coupling microtubule-mediated GEF-H1 and RhoA activation . *Science advances*, 2020, 6(31): eaaz1534.
- [22] Bueno de paiva L, Aline bernusso V, Machado-neto J A, Traina F, Ridley A J, Olalla-saad S T, Lazarini M. Effects of RhoA and RhoC upon the sensitivity of prostate cancer cells to glutamine deprivation . *Small GTPases*, 2021, 12(1): 20-26.
- [23] JANSEN S, GOSENS R, WIELAND T, SCHMIDT M. Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond . *Pharmacology & therapeutics*, 2018, 183:1-21.
- [24] Chen S, Wu W, Li Q H, Xie B M, Shen F, Du Y P, Zong Z H, Wang L L, Wei X Q, Zhao Y. Circ-NOLC1 promotes epithelial ovarian cancer tumorigenesis and progression by binding ESRP1 and modulating CDK1 and RhoA expression . *Cell death discovery*, 2021, 7(1): 22.

攻读学位期间获得的学术成果

向毅, 孙敏. 超声引导下射频消融术在肝癌患者的应用分析. 医药卫生. 2020, 9: 118-119.

致 谢

三年的研究生生活早已从入学时的欣喜与期盼演变成如今的感恩与不舍。读研道路上我满载收获和成长。回首自己的求学生涯，经历过留级、复读、预科、大学医学的5年以及后来的3年住院医师规范化培训，再到目前即将结束的硕士研究生阶段，时光总是在不经意间就匆匆逝去，同龄人已经进入职场步入婚姻，而我仍未上岸，面对慢慢老去的父母，以及未来我的婚姻，唯有努力工作才能给予家人幸福的生活，研究生期间想过放弃，可是我想到留级时那种内心对知识的渴望、复读时内心的不甘、为了上临床医学而多花一年读了预科以及学医路上的各种心酸与不易，其实除了自己内心的妥协之外，没有任何东西可以打败自己，这一路上跌跌撞撞，从希望变成现实，从一无所获到满载而归，此刻终于给了自己一个交代，正是因为我的良师益友给予了我足够的帮助与关心。

首先，感谢我的导师孙敏教授对我的教诲和关怀，孙老师渊博的学识、敏锐的思维、严谨的作风和不断开拓进取的精神让我受益匪浅，也是我终身学习的榜样。从实验的设计、实施和论文的撰写，不仅承载着这三年的学习时光，更多的是各位老师、师兄师姐及师弟的帮助和奉献，在此对他们表示我最诚挚的感谢！

感谢昆医附二院肝胆三病区的老师们在科室学习工作中给予我的帮助和指导。感谢滕毅山教授、莫小华教授、黄洁老师、许丁伟师兄在实验设计和实验操作及论文撰写方面给予的热情帮助。

感谢进行论文评阅的各位教授的辛勤工作和参加评审答辩委员会的各位专家的悉心指导。

感谢李佼佼、唐志华、赵海泉、沈辉、孙翊程、周啸阳、吉吉伍迁、马江云、张威在学习和生活中给予的帮助和支持。

感谢我的老乡谭千林、王旻述、王兰林、杨帆、连照安、卢亚凤以及我的室友陈振杰、栾涛、汤龙一路以来的鼓励与帮助。

最后，特别感谢我的父母和家人，这么多年来给予我无私的奉献和支持，才让我可以安心的完成学业。

生命的意义在于，人与人之间的互相照亮，感恩有你。