

抑制 RAB27a 能够抑制三阴乳腺癌细胞的增殖、侵袭和粘附

王丽, 严志锐, 夏耀雄

云南省肿瘤医院//昆明医科大学第三附属医院放射治疗科, 云南 昆明 650118

摘要:目的 抑制在外泌体分泌过程中发挥核心作用的RAB27蛋白家族的表达,以探究其对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞生物学功能的影响。方法 利用荧光定量PCR和蛋白印迹法对比3株三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MDA-MB-468、Hs578T和正常乳腺上皮细胞系MCF10A的RAB27家族基因和蛋白表达以及外泌体的分泌情况;使用siRNA干扰技术分别抑制3株三阴性乳腺癌细胞中RAB27a和RAB27b的表达,并采用荧光定量PCR和蛋白印迹法检测抑制效率,随后使用蛋白印迹法检测这3株三阴性乳腺癌细胞RAB27a和RAB27b分别被抑制后外泌体的分泌情况。用细胞增殖、细胞侵袭和细胞粘附实验评价RAB27a和RAB27b分别被抑制后对这3株三阴性乳腺癌细胞生物学功能造成的影响。结果 三阴性乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞相比外泌体分泌更加旺盛($P<0.001$),并且RAB27a和RAB27b的表达在基因和蛋白水平上均显著上升($P<0.01$)。分别抑制3株三阴性乳腺癌细胞RAB27a的表达后,外泌体分泌显著下调($P<0.001$),抑制RAB27b的表达对外泌体分泌无显著影响。并且外泌体分泌显著下调后,与外泌体分泌未受到显著影响的三阴性乳腺癌细胞相比,癌细胞增殖能力、细胞侵袭能力和细胞粘附能力均显著下调($P<0.01$)。结论 在三阴性乳腺癌细胞外泌体分泌过程中起核心作用的是RAB27a,抑制RAB27a能够抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖、侵袭和粘附。

关键词:RAB27a;RAB27b;外泌体;三阴性乳腺癌;细胞生物学功能

Silencing RAB27a inhibits proliferation, invasion and adhesion of triple-negative breast cancer cells

WANG Li, YAN Zhirui, XIA Yaoyong

Department of Radiation Oncology, Yunnan Provincial Cancer Hospital (Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University), Kunming 650118, China

Abstract: Objective To investigate the effect of inhibition of RAB27 protein family, which plays a pivotal role in exosome secretion, on biological behaviors of triple-negative breast cancer cells. **Methods** Quantitative real-time PCR and Western blotting were used to examine the expressions of RAB27 family and exosome secretion in 3 triple-negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-468, and Hs578T) and a normal breast epithelial cell line (MCF10A). The effect of small interfering RNA (siRNA)-mediated silencing of RAB27a and RAB27b on exosome secretion in the 3 breast cancer cell lines was detected using Western blotting, and the changes in cell proliferation, invasion and adhesion were evaluated. **Results** Compared with normal breast epithelial cells, the 3 triple-negative breast cancer cell lines exhibited more active exosome secretion ($P<0.001$) and showed significantly higher expressions of RAB27a and RAB27b at both the mRNA and protein levels ($P<0.01$). Silencing of RAB27a in the breast cancer cells significantly down-regulated exosome secretion ($P<0.001$), while silencing of RAB27b did not significantly affect exosome secretion. The 3 breast cancer cell lines with RAB27a silencing-induced down-regulation of exosome secretion showed obvious inhibition of proliferation, invasion and adhesion ($P<0.01$) as compared with the cell lines with RAB27b silencing. **Conclusion** RAB27a plays central role in the exosome secretion in triple-negative breast cancer cells, and inhibiting RAB27a can inhibit the proliferation, invasion and adhesion of the cells.

Keywords: RAB27a; RAB27b; exosomes; triple-negative breast cancer; cell biological behaviors

三阴性乳腺癌(TNBC)是指雌激素受体、孕激素受体、人类表皮生长因子受体2均为阴性的一类乳腺癌^[1],目前在世界范围内,TNBC呈逐年上升趋势,在所有乳腺癌亚型中占比仅为20%,但占乳腺癌死亡总人数的83%^[2]。目前化疗是TNBC患者唯一的选择,不过由于肿瘤异质性和药物耐药性的发展使得TNBC的化疗效果有限^[3]。尽管目前在基于肿瘤微环境的靶向治疗上

取得许多新的进展^[4-7],但由于肺/骨和脑转移的发生,TNBC仍然具有比较高的发病率和死亡率,更深入地了解肿瘤微环境及其调节因子将有助于设计针对TNBC的免疫靶向治疗方案。已有大量研究证实^[8-10]肿瘤微环境的外泌体可以通过将其内容物(如蛋白质、microRNA和长非编码RNA等)在肿瘤细胞之间以及肿瘤细胞和正常细胞之间进行传递,从而对乳腺癌的生长、侵袭及转移进行调控。RAB家族控制了几乎所有的膜转运过程,包括囊泡出芽、外泌体释放以及与受体膜的对接和融合^[11]。RAB27家族是RAB家族中的一个亚群,包括RAB27a和RAB27b^[12]。之前有研究^[13]发现RAB27b能

收稿日期:2022-09-20

基金项目:云南省科技厅基金(202201AY070001-142)

作者简介:王丽,博士,主治医师,E-mail: kyw12000@163.com

通信作者:夏耀雄,教授,硕士生导师,E-mail: 415933939@qq.com

够调节ER阳性乳腺癌细胞系的侵袭、生长和转移,该研究认为通过药理或遗传干预调控RAB27b水平可能对乳腺癌治疗具有巨大的潜力,但该研究并未同时关注与RAB27b具有极高序列相似度的RAB27a是否同样具有巨大的潜力,并且没有仔细探究这种对乳腺癌具有的巨大治疗潜力是否与RAB27家族调控外泌体分泌的能力相关。还有研究^[14]分别敲低小鼠乳腺癌细胞中的RAB27a和RAB27b,发现RAB27a才是导致转移性癌(4T1)原发性肿瘤生长和肺扩散的关键,而RAB27b在外泌体的分泌过程中没有起作用,该研究跟ER阳性乳腺癌细胞系的研究并不一致。鉴于在乳腺癌细胞中关于RAB27家族的研究目前刚刚起步,并且其可能是一个具极大潜力的治疗靶点,因此本研究首次使用3株不同的三阴性乳腺癌细胞株作为研究对象,分别抑制这3株不同三阴性乳腺癌细胞株RAB27a和RAB27b的表达,从与RAB27家族密切相关的肿瘤微环境外泌体角度出发,探究RAB27家族的2个成员是否对三阴性乳腺癌细胞的外泌体分泌具有调控作用,并且是否对其生长、侵袭及转移具有重大影响,以期对三阴性乳腺癌的治疗方案提供一个新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MDA-MB-468、Hs578T以及正常乳腺上皮细胞系MCF10A均购自中国科学院昆明动物所细胞库;DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)及无外泌体血清(Gibco);脂质体转染试剂、Opti-MEM培养基、

Transwell小室及本研究中用到的siRNA(Thermo Fisher),哺乳动物活性蛋白抽提试剂、CCK-8试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天生物技术有限公司),荧光定量分析试剂盒(ABI),RIPA裂解液和吉姆萨染液(北京索莱宝生物科技有限公司),RAB27A、RAB27B、GAPDH蛋白抗体(Abcam),多聚-L-赖氨酸(Merck)。

1.1.2 主要仪器 荧光定量PCR仪(ABI);化学发光成像仪(Cytiva);电泳仪(Bio-Rad);半干转印槽(Bio-Rad);全自动酶标仪(TECAN);光学显微镜(奥林巴斯);二氧化碳细胞培养箱(Thermo);NanoDrop 2000超微量分光光度计(Thermo)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231、MDA-MB-468、Hs578T和MCF10A细胞均使用含10% FBS、1%双抗的DMEM高糖培养基置于37℃、5% CO₂条件的恒温培养箱中培养,2 d次换液。进行正式实验前,培养基中的FBS全部更换为无外泌体血清。

1.2.2 qPCR检测细胞中相关基因的表达 提取细胞中的总RNA,参照ABI High capacity cDNA reverse transcription反转录试剂盒进行cDNA的合成。以反转录得到的cDNA为模板,按照ABI公司的荧光定量分析试剂盒(SYBR Select Master Mix)进行实时荧光定量PCR反应。反应体系为:SYBR Premix Ex Taq™ II (2x) 10 μL,上、下游引物各1 μL,cDNA模板2 μL,RNase-free water 6 μL,总体积20 μL。反应结束后,以GAPDH为内参使用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因mRNA相对表达量。内参基因GAPDH和目的基因的引物序列见表1。

表1 实时荧光定量PCR所用引物
Tab.1 Real-time quantitative PCR primers

Gene	Primer sequence (5'-3')	Melting temperature (°C)
Rab27A	AGTTGATGGAGCGAACTGCT	59
	CCCTACACCAGAGTCTCCCA	
Rab27B	GACACTGCGGGACAAGAGC	55
	CTTGCCGTTTCATTGACTTCC	
GAPDH	GCAAATTTCCATGGCACCCT	60
	GCCCCACTTGATTTTGGAGG	

1.2.3 Western blot检测细胞中相关蛋白的表达 使用RIPA裂解液提取细胞和组织中的总蛋白,用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测所得总蛋白浓度后,取等量总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳分离不同大小蛋白,随后把目的蛋白采用半干转膜法转移到PVDF膜上,一抗标记目的蛋白,二抗与一抗结合显色,洗干净后用化学发光成像仪检测蛋白条带,最后用图像分析软件ImageJ对目

的蛋白及内参蛋白(GAPDH)条带进行灰度值测试,以目的/内参灰度值比值表示蛋白相对表达量。

外泌体的相对定量测定:收取对数生长期细胞生长状态良好、汇合程度达到70%~80%时的细胞上清液,哺乳动物活性蛋白抽提试剂提取总蛋白,采用上面描述的Western blot方法检测外泌体标志物蛋白含量,内参蛋白(GAPDH)的测定使用培养的细胞按上述检测方法测

定,最终以蛋白相对表达量表示各组细胞外泌体的分泌情况。

1.2.4 siRNA 转染 按照 Lipofectamine RNAi-MAX 转染试剂盒说明书的步骤,添加 10 nM siRNA 转染细胞,24 h 后收集细胞检测干扰效率。RAB27A siRNA 的 ID 号为 HSS108985, RAB27B siRNA 的 ID 号为 HSS184177, 阴性对照 NC siRNA 的 ID 号为 D-001810-10。关于 siRNA 的详细信息可通过 ID 号登陆 <https://www.thermofisher.cn/cn/zh/home.html> 官方网站搜索查询。

1.2.5 细胞增殖、侵袭及粘附实验 待各组细胞生长到对数期后,消化重悬细胞并进行细胞计数。

细胞按 10^4 孔重新铺板于 96 孔板内,随后每天每孔按 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,酶标仪检测 $A_{490\text{nm}}$,持续测定 7 d 后,以 $A_{490\text{nm}}$ 作图表示各组细胞的增殖情况。

细胞按 10^5 孔重新铺板于提前用 Matrigel 包被好的 Transwell 六孔板小室的上室,上室细胞培养基不含血清,下室全部加入含血清培养基,培养 24 h 后取出上室,用棉签擦拭干净小室内侧所有细胞,并用 PBS 清洗 2~3 次。4% 多聚甲醛固定小室外侧细胞,吉姆萨染色,200 \times 下拍照并随机计数 5 个视野内的侵袭细胞,统计各组细胞侵袭能力。

细胞按 10^5 孔重新铺板于用多聚-L-赖氨酸包被好

的 96 孔板内,培养 4 h 后,分成 2 组,总细胞组和粘附细胞组,总细胞组直接每孔按 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8 溶液,粘附细胞组吸弃含未粘附细胞的原培养基后,用 PBS 轻柔洗 1 次,再加入培养基,随后按 100 μ L 培养基加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后,酶标仪检测 $A_{490\text{nm}}$,以粘附细胞组 $A_{490\text{nm}}$ 值/总细胞组 $A_{490\text{nm}}$ 值比值表示细胞粘附率。另外,在各组细胞加入 CCK-8 前进行拍照,以粘附在板底的细胞量表示各组细胞的粘附情况。

1.3 统计学处理

数据用统计软件 SPSS11.5 进行分析,两组间差异比较全部采用 Student's *t* 检验,所有数据均以均数 \pm 标准差表示,结果用软件 GraphpadPrism6 作图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAB27a 和 RAB27b 表达水平以及外泌体鉴定及定量检测

分别对恶性和非恶性乳腺癌细胞株从基因表达水平(图 1A)和蛋白表达水平(图 1B)进行了检测,发现三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 Hs578T 中的 RAB27a 和 RAB27b 在 mRNA 和蛋白表达水平均显著高于正常乳腺上皮细胞株 MCF10A ($P < 0.01$)。

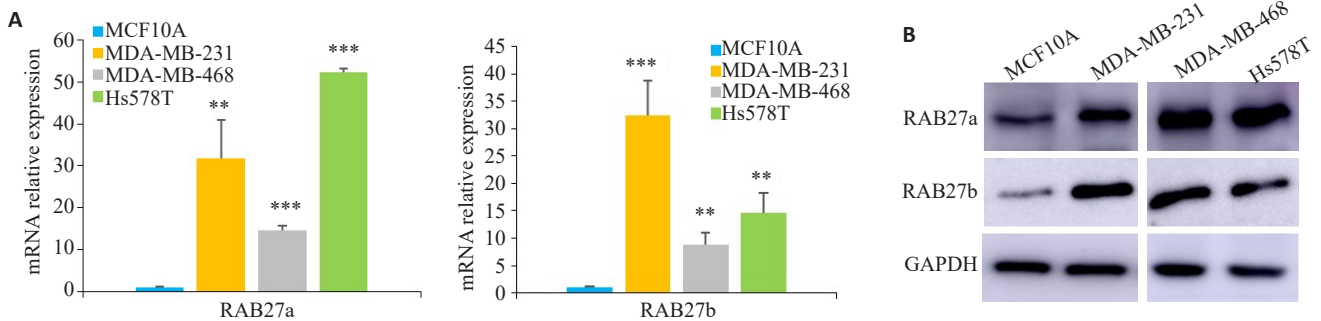


图1 恶性和非恶性乳腺细胞株中的RAB27a和RAB27b表达水平

Fig.1 Expression levels of RAB27a and RAB27b in 3 triple-negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-468, and Hs578T) and a normal breast epithelial cell line (MCF10A). A: mRNA expression levels of RAB27a and RAB27b detected by RT-PCR. B: Protein expression levels of RAB27a and RAB27b detected by Western blotting. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs MCF10A group.

收集恶性和非恶性乳腺细胞在条件培养基中培养的上清液,以 CD9 和 MHCII 作为外泌体标记,使用 Western blot 检测并评估外泌体含量。MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 Hs578T 细胞分泌的外泌体含量显著高于 MCF10A 细胞 ($P < 0.001$, 图 2)。

2.2 抑制 RAB27 家族对三阴性乳腺癌细胞外泌体分泌的影响

荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 siRNA 干预 3

株恶性乳腺癌细胞株细胞 24 h 后 RAB27a 和 RAB27b 的表达情况,结果显示,我们设计的 siRNA-RAB27a 和 siRNA-RAB27b 序列在基因(图 3A、B)和蛋白(图 3C)表达水平上均能够有效的抑制 RAB27a 和 RAB27b 表达。

对外泌体含量进行分析(图 4),发现抑制 RAB27a 表达后,MDA-MB-231 细胞的外泌体分泌量不论与对照组比还是与 siRNA-RAB27b 组比都是显著降低 ($P < 0.001$),但抑制 RAB27b 表达后,MDA-MB-231 细胞的

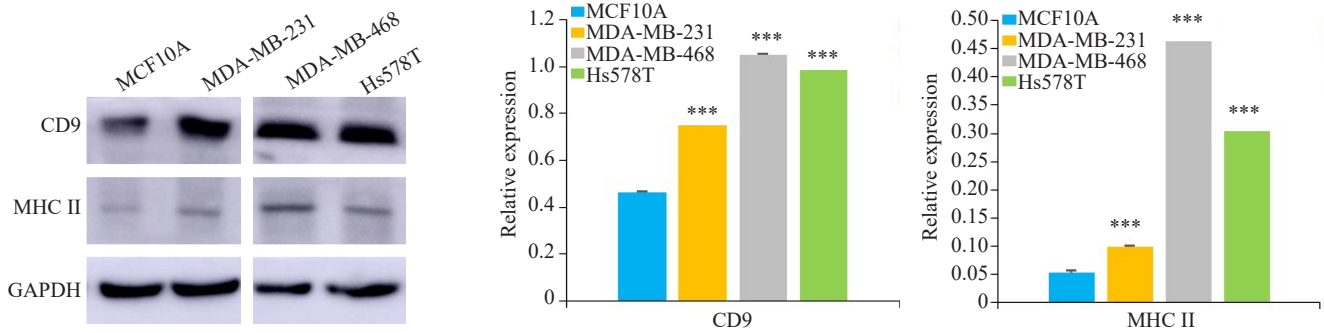


图2 恶性和非恶性乳腺细胞株的外泌体鉴定及相对定量分析

Fig.2 Identification and quantitative analysis of exosomes in MDA-MB-231, MDA-MB-468, Hs578T and MCF10A cells. *** $P < 0.001$ vs MCF10A group.

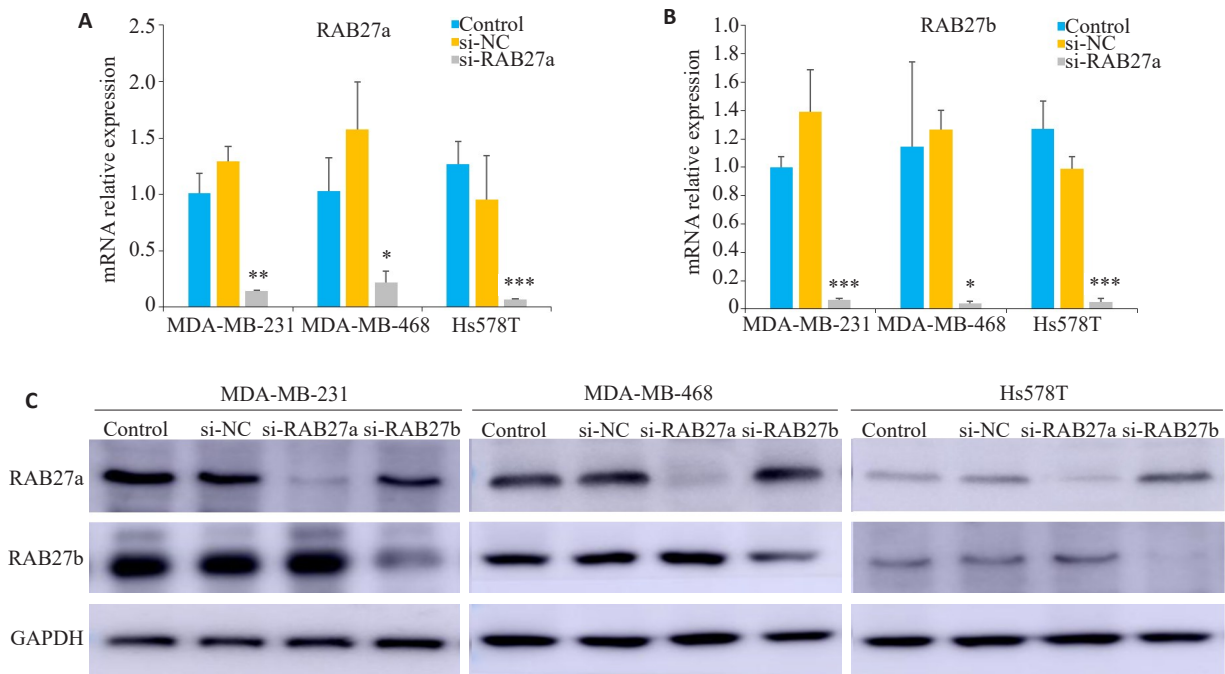


图3 siRNA的有效性验证

Fig.3 Verification of siRNA-mediated RAB27a and RAB27b silencing in the 3 triple-negative breast cancer cell lines. A: Inhibitory effect of siRNA-RAB27a on RAB27a mRNA expression of in the 3 cell lines. B: Inhibitory effect of siRNA-RAB27b on RAB27b mRNA expression of in the 3 cell lines. C: Inhibitory effect of siRNA-RAB27a and siRNA-RAB27b on RAB27a and RAB27b protein expressions detected by Western blotting. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group.

外泌体分泌量跟对照组相比没有明显变化。MDA-MB-468细胞抑制RAB27a表达后的情况跟MDA-MB-231细胞类似,但抑制RAB27b表达后,MDA-MB-468细胞的外泌体分泌量显著降低($P < 0.05$),不过仍然比siRNA-RAB27a组外泌体分泌量高($P < 0.05$)。Hs578T细胞抑制RAB27a和RAB27b的表达后,对外泌体分泌的影响跟MDA-MB-231细胞基本一致。

2.3 抑制RAB27家族对三阴性乳腺癌细胞增殖的影响

CCK-8法检测MDA-MB-231、MDA-MB-468和Hs578T细胞在RAB27a和RAB27b被抑制后的细胞增殖情况(图5)发现,si-NC组的细胞增殖能力无影响,但抑制RAB27a后其细胞增殖能力严重受影响,而抑制

RAB27b后的细胞增殖能力虽然比si-NC组和正常组弱,但仍然强于抑制RAB27a组。该生长曲线图未做统计学比较。

2.4 抑制RAB27家族对三阴性乳腺癌细胞侵袭能力的影响

检测MDA-MB-231、MDA-MB-468和Hs578T细胞在RAB27a和RAB27b被抑制后的细胞侵袭情况发现,si-NC组的细胞侵袭数与对照组比均无统计学差异,si-RAB27a组的细胞侵袭数与对照组比均显著降低($P < 0.001$,图6),si-RAB27b组的细胞侵袭数与对照组比只有MDA-MB-231($P < 0.05$)和Hs578T细胞($P < 0.001$)显著降低,MDA-MB-468细胞与对照组比无统

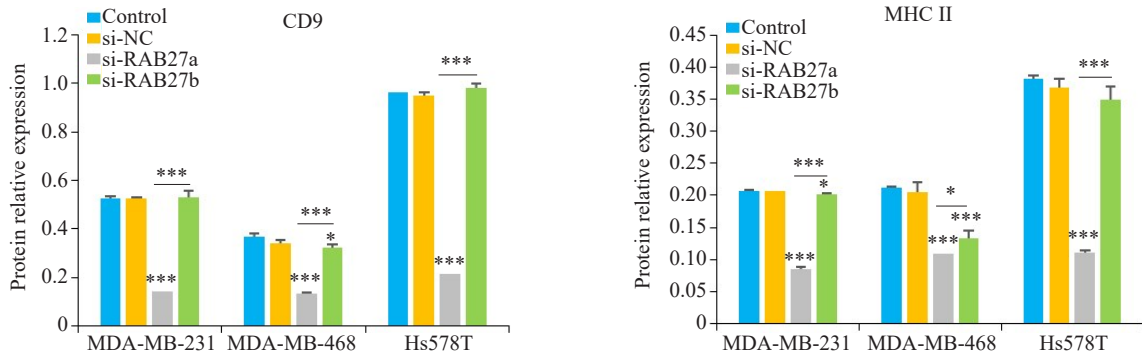
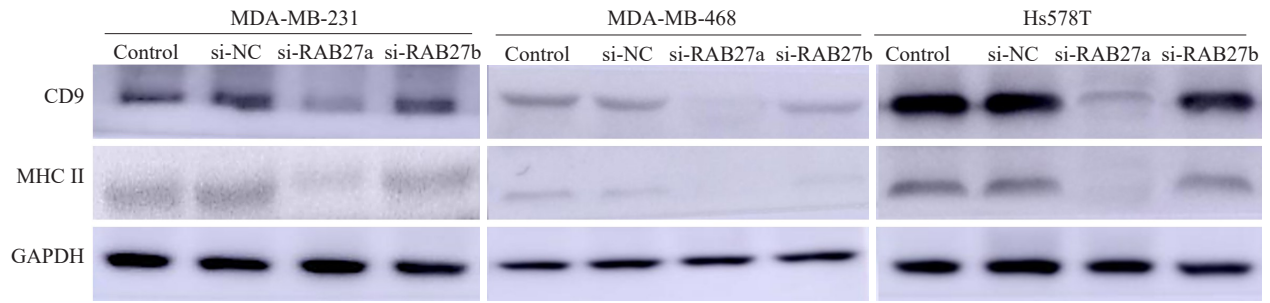


图4 抑制RAB27a和RAB27b表达后对三阴性乳腺癌细胞外泌体分泌量的影响

Fig.4 Effect of RAB27a and RAB27b silencing on exosome secretion in the 3 triple-negative breast cancer cells. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs control group.

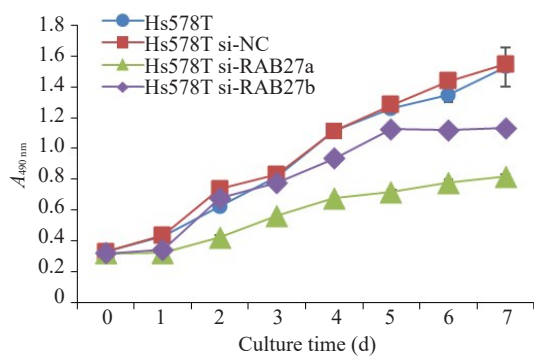
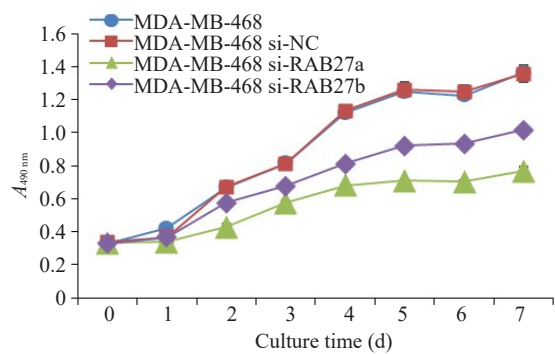
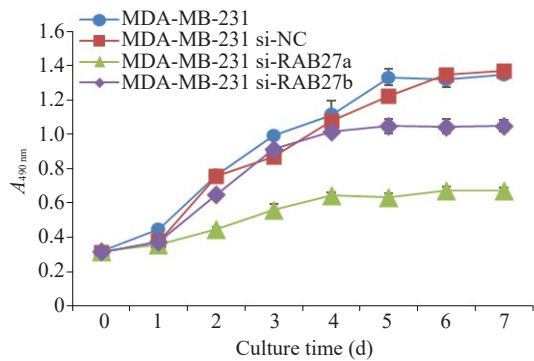


图5 抑制RAB27家族表达对三阴性乳腺癌细胞增殖的影响

Fig.5 Inhibition of RAB27 family suppresses proliferation of triple-negative breast cancer cells.

计学差异。对比si-RAB27a组与si-RAB27b组发现,三株三阴性乳腺癌细胞的si-RAB27a组细胞侵袭数均显著低于si-RAB27b组($P < 0.05$)。

2.5 抑制RAB27家族对三阴性乳腺癌细胞粘附能力的影响

检测MDA-MB-231、MDA-MB-468和Hs578T细

胞在RAB27a和RAB27b被抑制后的细胞粘附能力发现,si-NC组的细胞粘附率与对照组比均无统计学差异,三株三阴性乳腺癌细胞si-RAB27a组的细胞粘附率与对照组比均显著降低($P < 0.001$,图7),si-RAB27b组的细胞粘附率与对照组比只有MDA-MB-231和MDA-MB-468细胞显著降低($P < 0.001$),Hs578T细胞与对照

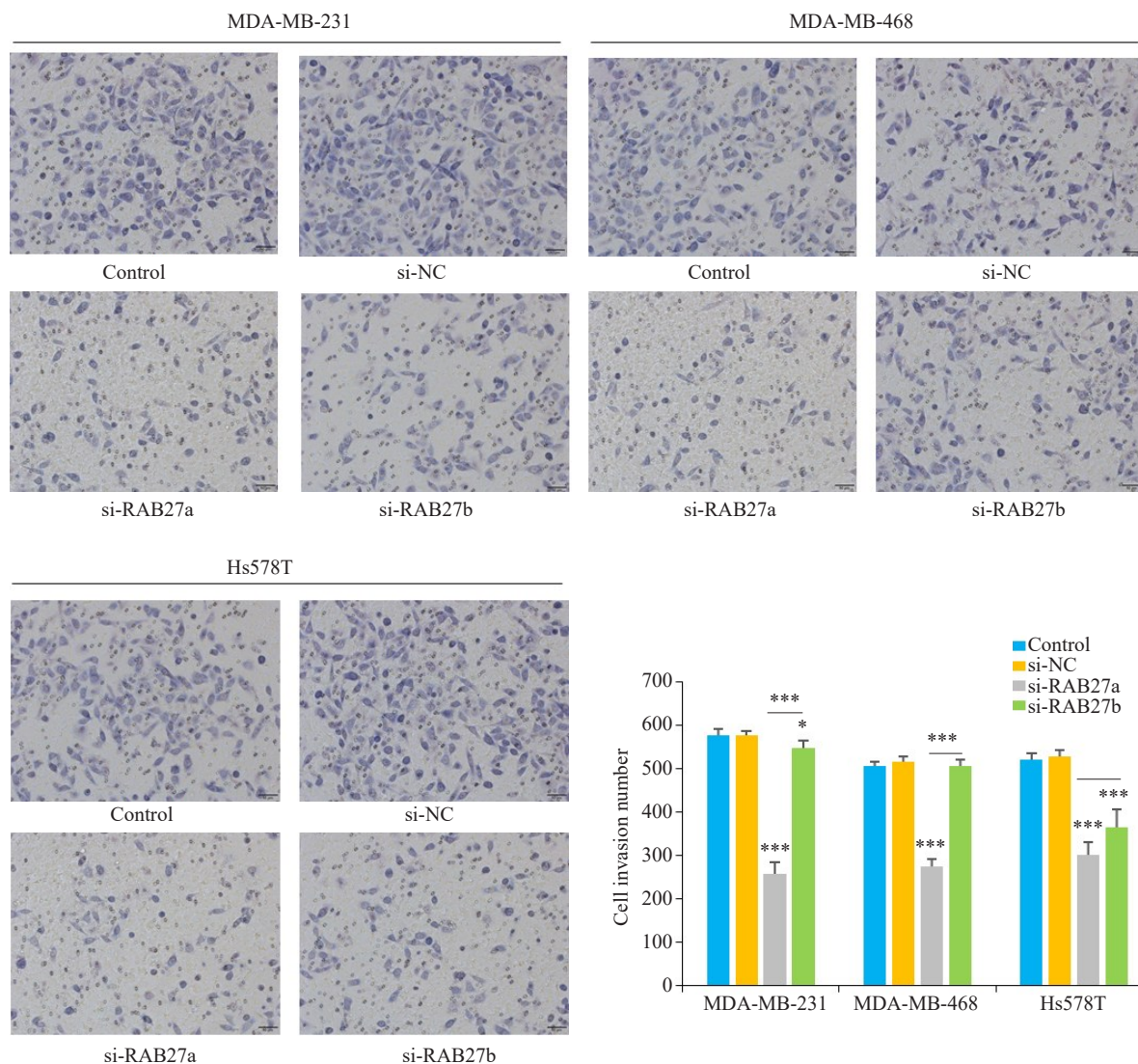


图6 抑制RAB27家族表达对三阴性乳腺癌细胞侵袭的影响

Fig.6 Inhibition of RAB27 family suppresses invasion of triple-negative breast cancer cells (Original magnification: $\times 200$). $*P < 0.05$; $***P < 0.001$ vs control group.

组比无统计学差异。对比 si-RAB27a 组与 si-RAB27b 组发现,3 株三阴性乳腺癌细胞的 si-RAB27a 组细胞粘附率均显著低于 si-RAB27b 组 ($P < 0.001$)。

3 讨论

乳腺癌是一种临床异质性疾病,经乳腺切除术、放疗、化疗等治疗后仍然转移能力极强^[8]。TNBC 具有独特的生物学和临床特征,比其他亚型乳腺癌侵袭性更强、无病生存期更短,同时伴有较高的软组织和内脏转移^[15],并且其 5 年死亡率高于非 TNBC 患者^[16]。外泌体是 40~100 nm 大小的细胞外囊泡,它们从多种细胞类型中释放出来,进入细胞外空间,从而将其成分转移到受体细胞中^[17,18],其作为肿瘤微环境的非细胞因素与肿瘤细胞相互作用从而对肿瘤的进一步生长和转移起重要作用^[19]。Rab GTPase 蛋白家族和 Rab 效应分子在促进

多囊泡胞内体向细胞膜融合和外泌体向细胞外空间释放方面发挥核心作用,其中 Rab27a 和 Rab27b 与外泌体的释放密切相关。最初关于 Rab27a 的研究比较广泛, Rab27b 的研究相对较少^[20],因为它们在氨基酸序列上具有高达 71% 的同源性^[21],不仅如此,它们还有许多共同的效应因子,被认为在分泌通路中的调节作用是一致的^[22]。然而,最近的证据表明 Rab27a 和 Rab27b 也通过与不同的 Rab27 效应因子相互作用发挥不同的作用, Rab27a 可能是多囊泡胞内体与质膜对接和融合所必需的,而 Rab27b 可能连接多囊泡胞内体与向外定向的马达蛋白^[23]。目前已有部分研究试图通过靶向 RAB27 家族抑制肿瘤的生长、侵袭及转移^[24,25],但 RAB27a 和 RAB27b 在不同癌症中起到的具体作用尚不清楚。

本研究先检测了正常乳腺上皮细胞株和 3 株三阴性乳腺癌细胞株发现,3 株三阴性乳腺癌细胞株的外泌

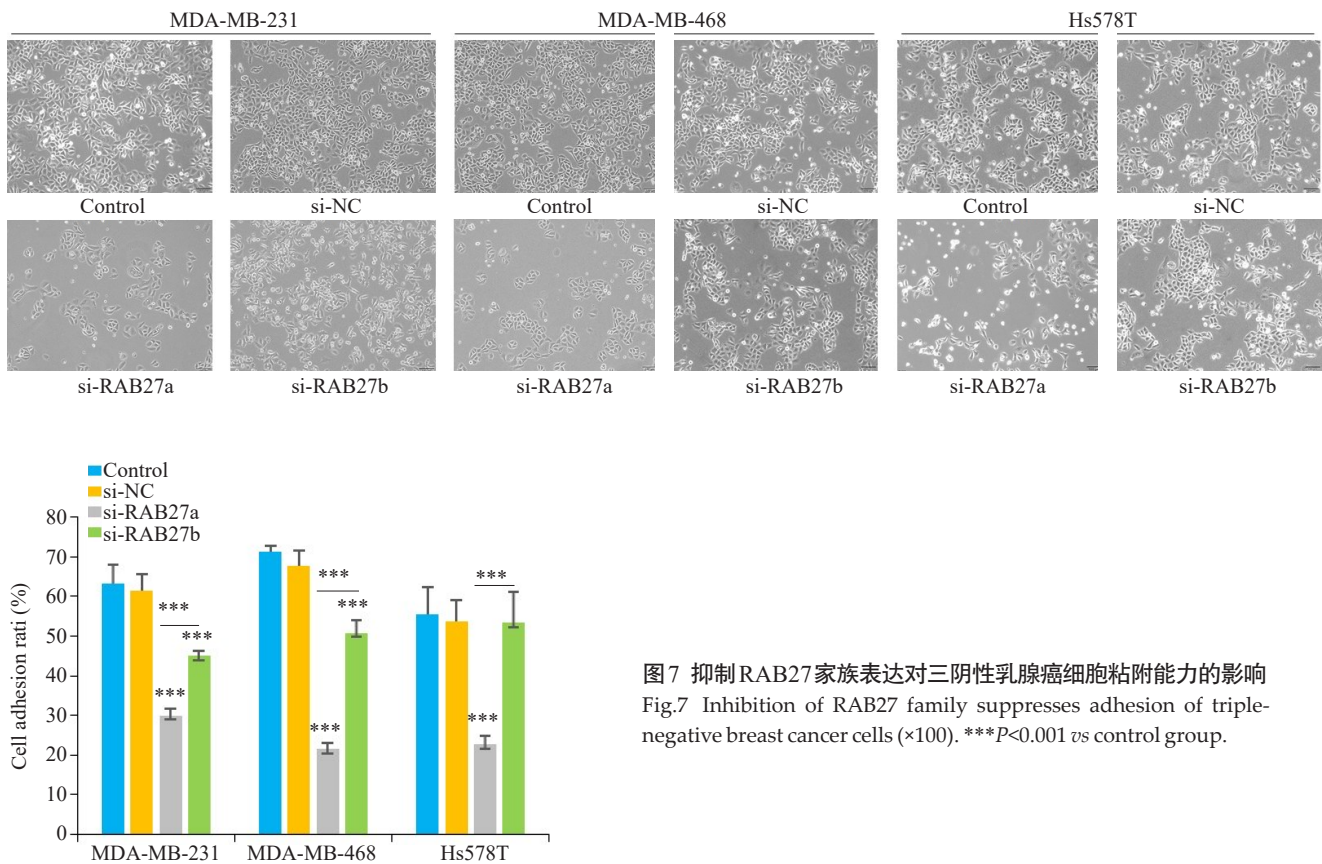


图7 抑制RAB27家族表达对三阴性乳腺癌细胞粘附能力的影响
Fig.7 Inhibition of RAB27 family suppresses adhesion of triple-negative breast cancer cells (×100). ***P<0.001 vs control group.

体分泌量显著高于正常乳腺上皮,且Rab27a和Rab27b的表达也显著高于正常乳腺上皮。随后通过采用siRNA分别干扰Rab27a和Rab27b在三阴性乳腺癌细胞株中的表达发现,抑制Rab27a表达后显著的降低了三阴性乳腺癌细胞的外泌体分泌。与文献报道的敲低Rab27a后恶性乳腺癌细胞中外泌体分泌量降低的结果一致^[24]。但是,抑制Rab27b表达后三阴性乳腺癌细胞外泌体的分泌量没有受到太大的影响,虽然跟我们的预期不一致,但也有对人肾癌细胞株A498的研究发现采用si-RNA抑制Rab27b表达后其外泌体数量与对照组相比无统计学差异^[26],因此我们推测Rab27b在三阴性乳腺癌中可能与外泌体的分泌无关。随后进一步检测Rab27a和Rab27b被抑制后三阴性乳腺癌细胞的一些细胞生物学功能的变化发现,Rab27a被抑制后能够显著的影响三阴性乳腺癌细胞的增殖能力、侵袭能力以及粘附能力,结合本研究中发现的抑制Rab27a后对三阴性乳腺癌细胞外泌体释放的抑制作用,以及其他研究对肿瘤外泌体的发现,即肿瘤外泌体中包含致癌蛋白^[27]、RNA片段^[28]、突变的DNA片段^[29]和信号分子^[30]等,它们不仅可在肿瘤微环境中发生各类信号交流并可在功能上转移到肿瘤微环境内的非癌细胞中从而支持肿瘤的生长、侵袭和转移^[31],本研究认为Rab27a在TNBC中所发挥的作用可能是依靠促进癌细胞外泌体分泌而造成

的。而Rab27b被抑制后虽然能够影响三阴性乳腺癌细胞的增殖能力、侵袭能力以及粘附能力,但显然不及抑制Rab27a对三阴性乳腺癌细胞生物学功能造成的影响。所以,我们认为Rab27b被抑制后对癌细胞的影响并不是通过外泌体造成,有对肾癌细胞的RNA序列和信号通路分析提示RAB27b在癌症中的促进作用可能与MAPK和VEGF信号通路有关^[26],还有研究指出Rab27b可能通过刺激HSP90α蛋白的分泌从而促进肿瘤的侵袭^[13],甚至有研究提出Rab27b能够与耐药蛋白相互作用从而提高肿瘤细胞的耐药性^[32],因此,关于Rab27b在TNBC中的作用和具体的分子机制可能还需要进一步的研究来阐明。另外,就像Rab27b暗示的,Rab27家族在未来的研究中除了关注其对外泌体分泌的重要作用外,可能还有其他影响的信号通路或分子。

综上所述,本研究通过对三阴性乳腺癌细胞株中外泌体的分泌以及使用siRNA抑制Rab27a和Rab27b后对癌细胞生物学功能的检测发现,三阴性乳腺癌细胞的外泌体分泌量相比正常乳腺上皮细胞显著提升,Rab27家族中在三阴性乳腺癌细胞外泌体分泌过程中起核心作用的是RAB27a,抑制RAB27a能够更加显著的抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖、侵袭和粘附,未来进一步利用Rab27a作为靶标对于TNBC的治疗可能具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Xu C, Feng QS, Yang HC, et al. A light-triggered mesenchymal stem cell delivery system for photoacoustic imaging and chemophotothermal therapy of triple negative breast cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5(10): 1800382.
- [2] Hwang KT, Kim J, Jung J, et al. Impact of breast cancer subtypes on prognosis of women with operable invasive breast cancer: a population-based study using SEER database [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(6): 1970-9.
- [3] Wein L, Loi S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC) [J]. *Breast*, 2017, 34 (Suppl 1): S27-30.
- [4] Hill B, Sarnella A, Capasso D, et al. Therapeutic potential of a novel $\alpha\beta 3$ antagonist to hamper the aggressiveness of mesenchymal triple negative breast cancer sub-type [J]. *Cancers*, 2019, 11(2): 139.
- [5] Jiang F, Li Y, Si L, et al. Interaction of EZH2 and P65 is involved in the arsenic trioxide-induced anti-angiogenesis in human triple-negative breast cancer cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2019, 35(4): 361-71.
- [6] Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, et al. Tumor microenvironment: challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104683.
- [7] Jhan JR, Andrechek ER. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy [J]. *Pharmacogenomics*, 2017, 18(17): 1595-609.
- [8] Yang SS, Ma S, Dou H, et al. Breast cancer-derived exosomes regulate cell invasion and metastasis in breast cancer *via* miR-146a to activate cancer associated fibroblasts in tumor microenvironment [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391(2): 111983.
- [9] Chi M, Shi XD, Huo X, et al. Erratum to dexmedetomidine promotes breast cancer cell migration through Rab11-mediated secretion of exosomal TMPRSS2 [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(16): 1040.
- [10] Piao HY, Guo S, Wang Y, et al. Exosome-transmitted lncRNA PCGEM1 promotes invasive and metastasis in gastric cancer by maintaining the stability of SNAI1 [J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23 (2): 246-56.
- [11] Homma Y, Hiragi S, Fukuda M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions [J]. *FEBS J*, 2021, 288 (1): 36-55.
- [12] Izumi T. *In vivo* roles of Rab27 and its effectors in exocytosis [J]. *Cell Struct Funct*, 2021, 46(2): 79-94.
- [13] Hendrix A, Maynard D, Pauwels P, et al. Effect of the secretory small GTPase Rab27B on breast cancer growth, invasion, and metastasis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(12): 866-80.
- [14] Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, et al. Rab27a supports exosome-dependent and-independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(19): 4920-30.
- [15] Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The landscape of targeted therapies in TNBC [J]. *Cancers*, 2020, 12(4): 916.
- [16] Singh DD, Yadav DK. TNBC: potential targeting of multiple receptors for a therapeutic breakthrough, nanomedicine, and immunotherapy [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(8): 876.
- [17] Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 47.
- [18] Zhang Y, Bi JY, Huang JY, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-34.
- [19] Shao JT, Zaro J, Shen YX. Advances in exosome-based drug delivery and tumor targeting: from tissue distribution to intracellular fate [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 9355-71.
- [20] Kren N, Michaud D, Bagchi S, et al. Rab27a plays a dual role in metastatic propensity of pancreatic cancer [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7390.
- [21] Al-Saad RZ, Kerr I, Hume AN. Determination of the Rab27-effector binding affinity using a high-throughput FRET-based assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2293: 143-62.
- [22] Al-Saad RZ, Kerr I, Hume AN. In vitro fluorescence resonance energy transfer-based assay used to determine the Rab27-effector-binding affinity [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2020, 18(4): 180-94.
- [23] Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 19-30; suppl 1-13.
- [24] Alt EU, Wörner PM, Pfnür A, et al. Targeting TRAF3IP2, compared to Rab27, is more effective in suppressing the development and metastasis of breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8834.
- [25] Tsuruda M, Yoshino H, Okamura S, et al. Oncogenic effects of RAB27B through exosome independent function in renal cell carcinoma including sunitinib-resistant [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232545.
- [26] Tsuruda M, Yoshino H, Okamura S, et al. Oncogenic effects of RAB27B through exosome independent function in renal cell carcinoma including sunitinib-resistant [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232545.
- [27] Olejarz W, Dominiak A, Żolnierzak A, et al. Tumor-derived exosomes in immunosuppression and immunotherapy [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 6272498.
- [28] Jabbari N, Akbariazar E, Feqhhi M, et al. Breast cancer-derived exosomes: Tumor progression and therapeutic agents [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(10): 6345-56.
- [29] Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, et al. High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients [J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(4): 741-7.
- [35] Dai J, Su YZ, Zhong SY, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 145.
- [31] Xu R, Rai A, Chen MS, et al. Extracellular vesicles in cancer-implications for future improvements in cancer care [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(10): 617-38.
- [32] Li R, Dong CY, Jiang KQ, et al. Rab27B enhances drug resistance in hepatocellular carcinoma by promoting exosome-mediated drug efflux [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(11): 1583-91.

(编辑:余诗诗)