

文章编号 1006-8147(2020)03-0238-06

论著

# ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达及临床意义

彭华红,肖龙飞,王林,陈赛鹏,王嘉南,杨阔

(天津医科大学第二医院泌尿外科,天津 300211)

**摘要** 目的:探讨 ADP-核糖基化因子-4C(ARL4C)在睾丸生殖细胞肿瘤(TGCT)中的表达及其临床意义。方法:收集 GEPIA 数据库及天津医科大学第二医院 2015-2019 年睾丸生殖细胞肿瘤病人临床及病理信息,探索 ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达情况及其对预后的影响,免疫组化、RT-qPCR 及 Western 验证,通过 STRING 数据库寻找其可能的作用机制。结果:与正常组织相比,ARL4C 在胆管癌、多形性胶质母细胞瘤、肾透明细胞癌、急性髓系白血病、肺鳞状细胞癌、卵巢浆液性囊腺癌、胰腺癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、胃腺癌、睾丸生殖细胞肿瘤、胸腺瘤、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤中均呈现高表达状态(均  $P < 0.05$ ),在睾丸生殖细胞肿瘤中生存分析显示高表达 ARL4C 的患者生存时间减少( $P < 0.05$ ),GEPIA 数据库提示 ARL4C 与 DIRAS1 有相互作用,相关系数为 0.45( $P < 0.05$ )。免疫组化验证 DIRAS1 在睾丸生殖细胞肿瘤中呈现低表达状态。结论:ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中高表达,且其高表达与预后不良相关。

**关键词** 睾丸生殖细胞肿瘤;ARL4C;DIRAS1;GEPIA 数据库

中图分类号 R697+.22

文献标志码 A

## Expression and clinical significance of ARL4C in testicular germ cell tumors

PENG Hua-hong, XIAO Long-fei, WANG Lin, CHEN Sai-peng, WANG Jia-nan, YANG Kuo

(Department of Tianjin Institute of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinical significance of ADP-ribosylation factor-4C (ARL4C) in testicular germ cell tumors (TGCT). **Methods:** The clinical and pathological information of patients with testicular germ cell tumors in GEPIA database and Tianjin Medical University Second Hospital from 2015 to 2019 were collected to explore the expression of ARL4C in testicular germ cell tumors and its impact on prognosis. The expression was validated by immunohistochemistry, RT-qPCR and Western blot. The possible mechanism was found by STRING database. **Results:** Compared with normal tissues, ARL4C showed high expression status in cholangiocarcinoma, glioblastoma multiforme, renal clear cell carcinoma, acute myeloid leukemia, lung squamous cell carcinoma, ovarian serous cystadenocarcinoma, pancreatic cancer, chromaffin cellular and paraganglioma, gastric adenocarcinoma, testicular germ cell tumor, thymoma, endometrial cancer and other malignant tumors(all  $P < 0.05$ ). Survival analysis in testicular germ cell tumors showed that patients with high expression of ARL4C had decreased survival time ( $P < 0.05$ ). The GEPIA database suggested that ARL4C interacted with DIRAS1 and correlation coefficient was 0.45( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry confirmed that DIRAS1 showed a low expression status in testicular germ cell tumors. **Conclusion:** ARL4C is highly expressed in testicular germ cell tumors, and its high expression is associated with poor prognosis.

**Key words** testicular germ cell tumor; ARL4C; DIRAS1; GEPIA database

睾丸生殖细胞肿瘤占全世界男性新诊断癌症的 1.0%~1.5%, 其发病率在过去 20 年中呈上升趋势,是 14~44 岁男性最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。睾丸生殖细胞肿瘤约占睾丸原发性恶性肿瘤的 90%~95%, 约有 50% 睾丸生殖细胞肿瘤患者的组织学类型为精原细胞瘤,另外约 50% 的患者被诊断为有各种类型的非精原细胞瘤或混合型睾丸生殖细胞肿瘤,在初次诊断时大约 30% 的患者已经发生了转移性病变<sup>[2]</sup>。尽管手术和顺铂化疗的结合使睾丸生殖细胞肿瘤患者的治愈率大大增加,但耐药及肿瘤的复发依然对患者的生命造成了威胁,所以需要更好的了

解睾丸生殖细胞肿瘤发生的分子机制以及寻找新的治疗靶点。

ADP-核糖基化因子-4(ARL4)家族蛋白,包括 ARL4A、ARL4C 和 ARL4D,均涉及一些基本的细胞功能,如迁移和传播等<sup>[3]</sup>。其中 ARL4C 已被发现在结直肠癌、肺癌和平滑肌肉瘤等均呈现高表达,且对肿瘤有不同程度的促进作用<sup>[4]</sup>,但其在睾丸生殖细胞肿瘤发生过程中扮演的作用依然未知,本实验重点探索 ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达情况及其发展的影响。

### 1 材料与方法

1.1 材料 通过 GEPIA(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)数据库收集 137 例睾丸生殖细胞肿瘤患者及 165 例

作者简介 彭华红(1993-),女,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:杨阔,E-mail:ykuoster@126.com。

非睾丸生殖细胞肿瘤患者 ARL4C 的表达情况,以及 ARL4C 对 68 例睾丸生殖细胞肿瘤患者和 68 例非睾丸生殖细胞肿瘤患者预后的影响。另外,收集 2015-2018 年天津医科大学第二医院 40 例睾丸生殖细胞肿瘤患者的基本住院信息、临床病理资料以及石蜡包埋的组织蜡块,每例患者都经过了 2 位以上的病理医生确诊。实验中所用的正常睾丸细胞系 HT,睾丸生殖细胞肿瘤细胞系 NT2,Team-2 由天津泌尿外科研究所提供并保存。本研究已经天津医科大学第二医院伦理委员会批准。

**1.2 免疫组化** 患者的石蜡包埋切片通过免疫组织化学测定蛋白质表达。首先使用二甲苯脱蜡,然后将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐抗原修复液中 (pH6.0~6.5) 放入微波炉加热共 15 min 进行抗原修复,室温冷却,3% $H_2O_2$  去离子水避光孵育 15 min 阻断内源性过氧化物酶。PBS 缓冲液清洗 10 min,滴加山羊血清封闭液孵育 15 min,然后滴加 ARL4C 一抗(1:200)于 4℃过夜。第 2 天 PBS 清洗 10 min 后依次滴加生物素标记的山羊抗兔二抗及辣根过氧化物酶各孵育 15 min (中间用 PBS 清洗 10 min)。之后每张切片滴加 DAB 工作液,自来水冲洗 3 min,滴加苏木素工作液复染,冲洗同前,最后经过脱水处理之后常规中性树胶封片。免疫组化结果用 Mattern 积分法判定,依照细胞阳性着色程度分为:1(弱阳性);2(中等阳性);3(强阳性)。依照阳性细胞数量可分为:0(0),1(1%~25%),2(26%~50%),3(51%~100%)。二者相乘,小于或等于 3 分为阴性,大于 3 分为阳性,大于 6 分为强阳性。400×显微镜下随机观察 5 个视野,取其平均值。

**1.3 细胞培养** 细胞用 RPMI-1640 培养基加入胎牛血清使终浓度为 10% (Gibco, Australia), 加入青霉素和链霉素使终浓度为 1% (Solarbio, China), 在 37℃, 5% $CO_2$  的加湿培养箱中培养,隔天换液,常规传代。

**1.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR)** 取对数生长期细胞,根据试剂说明书,使用 TRIzol™ 试剂 (Life Technologies, USA) 获得细胞总 RNA。通过 HiFiScript cDNA 合成试剂盒 (Cwbiotech, China) 将总 RNA 合成互补 DNA (cDNA), 使用 EcoTMReal-Time PCR System (Illumina, USA) 进行聚合酶链反应,反应参数如下:95℃ 10 min,之后 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 15 s, 持续 42 个循环。最终 95℃ 持续 15 s, 60℃ 持续 15 s, 95℃ 持续 15 s。在 qRT-PCR 中使用引物如下:ARL4C: 正向:5'-AGGTGACCAAGTTCGC CGAG-3', 反向:5'-GACGTGATAGGTGCTGCCCC-3'。

GAPDH: 正向:5'-TGCCAAATATGATGACATCAA-GAA-3', 反向:5'-GGAGTGGGTGTCGCTGTTG-3'。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算相对基因表达水平。实验重复 3 次。

**1.5 Western blot** 取对数生长期细胞,使用细胞总蛋白提取试剂盒与 PMSF (100:1) 提取细胞蛋白,BCA 法测量蛋白浓度,按 3:1 添加蛋白上样缓冲液后于 95℃ 加热 5 min 使蛋白变性。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 用于蛋白分离,制备浓度为 10% 的分离胶,按上述测量浓度添加一定体积蛋白,初始电压 80 V 进行电泳。40 min 后转为 120 V 直至电泳结束。将分离的蛋白质转移至 PVDF 膜并用 5% BSA 封闭 1 h,在 4℃ 下与 ARL4C 一抗孵育过夜。第 2 天用 TBST 洗涤 15 min×3 次,并在 20℃ 下与二抗孵育 1 h。通过增强化学发光法 (ECL) 显影,GAPDH 用于对照。实验重复 3 次。

**1.6 统计学分析** 采用 SPSS13.0 及 GraphPad Prism7.0 软件进行统计分析, $\chi^2$  检验分析 ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤及癌旁组织中的表达情况,Kaplan-Meier 生存曲线分析患者预后情况,Spearman 相关性分析 ARL4C 与 DIRAS1 之间的关系,独立样本 *t* 检验分析 ARL4C 在正常睾丸细胞与睾丸肿瘤细胞之间的差异表达, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 ARL4C 在多种癌症中呈现高表达趋势** 在 GEPIA 数据库中搜索 ARL4C 基因,发现其在多种癌症中呈现高表达趋势,结果如图 1A 所示。其中,在胆管癌 (CHOL)、多形性胶质母细胞瘤 (GBM)、肾透明细胞癌 (KIRC)、肾乳头状细胞癌 (KIRP)、急性髓系白血病 (LAML)、肺鳞状细胞癌 (LUSC)、卵巢浆液性囊腺癌 (OV)、胰腺癌 (PAAD)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤 (PCPG)、胃腺癌 (STAD)、睾丸生殖细胞肿瘤 (TGCT)、胸腺瘤 (THYM)、子宫内膜癌 (UCEC)、子宫癌肉瘤 (UCS) 中的差异表达具有显著统计学意义 (均  $P < 0.05$ ),结果如图 1B,笔者选取睾丸生殖细胞肿瘤作为研究对象。

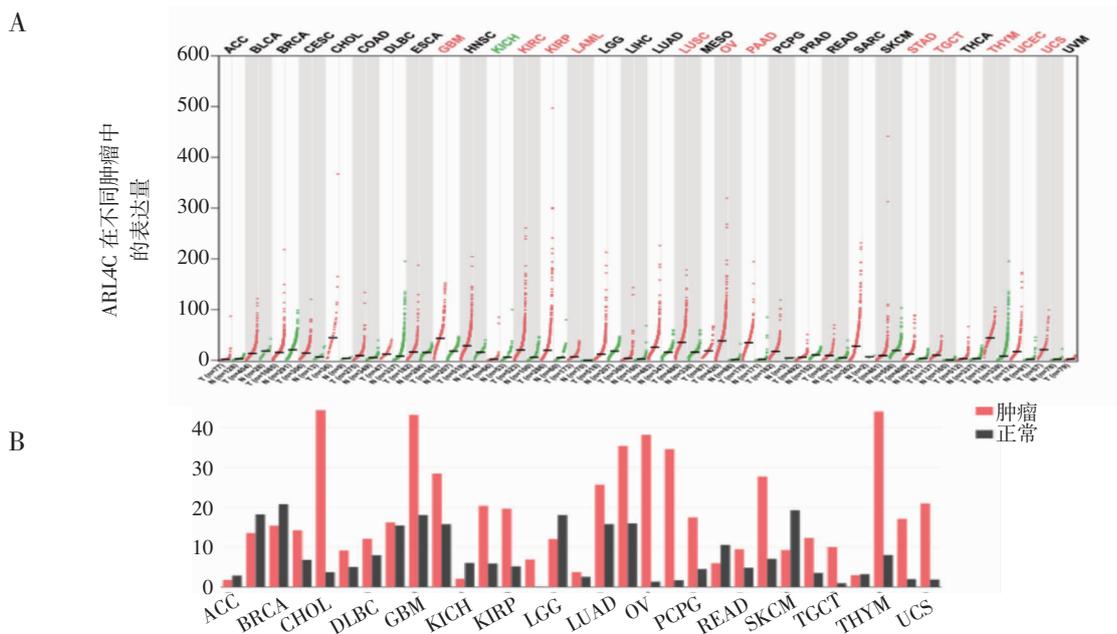
**2.2 ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达及其对预后的影响** 在 GEPIA 中收集了 137 例睾丸生殖细胞肿瘤患者及 165 例非睾丸生殖细胞肿瘤患者的 ARL4C 表达情况,发现在非睾丸生殖细胞肿瘤患者中 ARL4C 基因平均表达量处于极弱的水平,而睾丸生殖细胞肿瘤患者中 ARL4C 基因表达量显著升高,与非肿瘤患者差异具有显著统计学意义 (图 2A),继续深入探讨 ARL4C 与肿瘤的关系,笔者

将 137 例肿瘤患者按临床分期标准分为 I 期、II 期和 III 期, 经过统计分析发现各期之间 ARL4C 表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。分别统计 GEPIA 数据库中 68 例高表达 ARL4C 患者与 68 例低表达 ARL4C 患者的生存时间, *Kaplan-Meier* 生存分析显示高表达患者生存时间显著缩短( $P<0.05$ , 图 2C), ARL4C 在体内的高表达水平对患者的生存具有不利影响。

**2.3 免疫组化验证 ARL4C 在睾丸组织的表达情况** 收集了天津医科大学附属第二医院 2015-2019 年 40 例不同临床分期的睾丸生殖细胞肿瘤患

者临床信息以及病理组织(包括癌组织与癌旁组织)。对病理组织进行 ARL4C 特异性免疫组织化学染色(免疫组化)实验后发现, 与 GEPIA 数据库中收集的信息相一致, ARL4C 在肿瘤组织中的表达明显高于癌旁组织( $P<0.05$ , 表 1), 免疫组化评分(染色强度 $\times$ 着色细胞比例)如图 3A 所示, 图 3B 为选取的典型图像。对所有患者的临床信息进行统计分析, 结果如表 2 所示, ARL4C 的阳性表达与肿瘤大小、分化程度、是否伴随转移显著相关, 与患者年龄、临床分期的关系则无统计学意义。

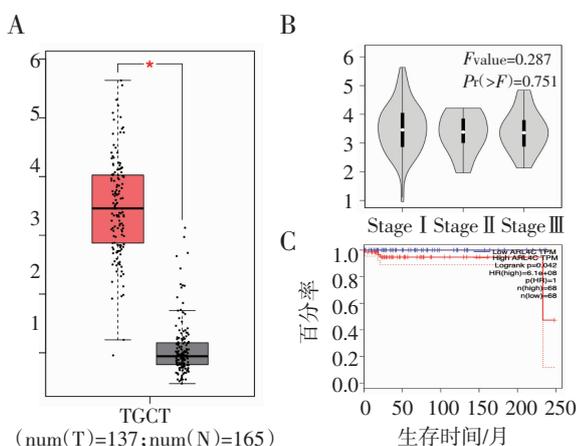
**2.4 RT-qPCR 和 Western blot 验证 ARL4C 在不同**



注:A. ARL4C 在不同恶性肿瘤中的表达, 图上方红色字体为高表达, 绿色字体为低表达; B. ARL4C 在不同恶性肿瘤中的表达柱状图

图 1 ARL4C 在多种癌症中呈现高表达趋势

Fig 1 ARL4C shows high expression in a variety of cancers



注:A. ARL4C 在睾丸癌与正常睾丸组织中的表达; B. ARL4C 在不同临床分期睾丸癌中的表达; C. ARL4C 表达与患者生存时间的关系

图 2 ARL4C 在睾丸癌中的表达及其对其预后的影响

Fig 2 Expression of ARL4C in testicular cancer and its effect on prognosis

表 1 睾丸肿瘤组织与癌旁组织 ARL4C 表达情况

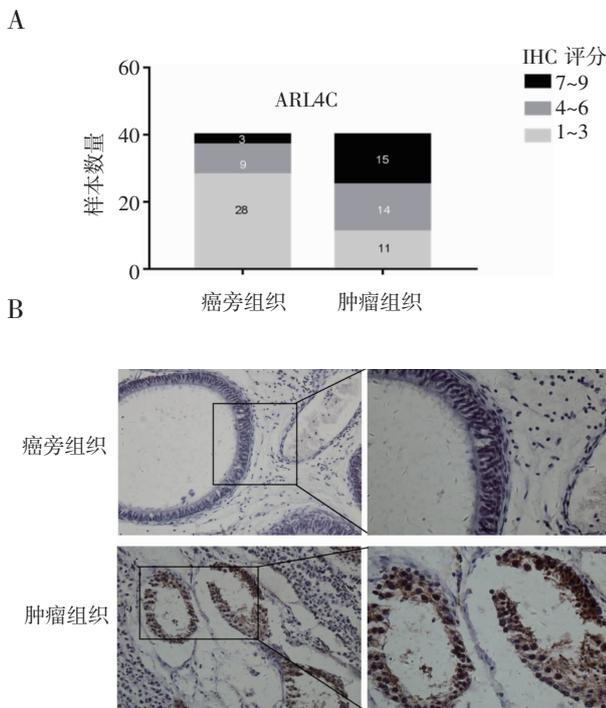
Tab 1 Expression of ARL4C in testicular tumor tissues and adjacent tissues

组别	n	ARL4C(+)	ARL4C(-)	P
肿瘤组织	40	29	11	<0.01
癌旁组织	40	8	32	

**睾丸细胞系中的差异表达** 为了进一步验证 ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达情况, 选用正常睾丸细胞系 HT、睾丸生殖细胞肿瘤细胞系 NT2 及 TCam-2 进行实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 及 Western blot 实验, 结果如图 4 所示, 与正常细胞 HT 相比, NT2 和 TCam-2 的 mRNA 表达水平明显升高 ( $P<0.05$ , 图 4A)。Western blot 结果与 qPCR 相似, 肿瘤细胞系 ARL4C 蛋白表达水平明显高于正常细胞系(图 4B)。

表 2 ARL4C 表达与患者临床病理信息的关系  
Tab 2 Relationship between ARL4C expression and clinical pathological information of patients

项目	n	ARL4C(+)	ARL4C(-)
年龄/岁			
<60	17	13	4
≥60	23	16	7
肿瘤大小			
<2 cm	11	5	6
2~5 cm	17	13	4
>5 cm	12	11	1
分化程度			
高分化	18	10	8
中分化	13	10	3
低分化	9	9	0
临床分期			
I 期	8	5	3
II 期	16	11	5
III 期	16	13	3
转移			
有转移	14	13	1
无转移	26	16	10



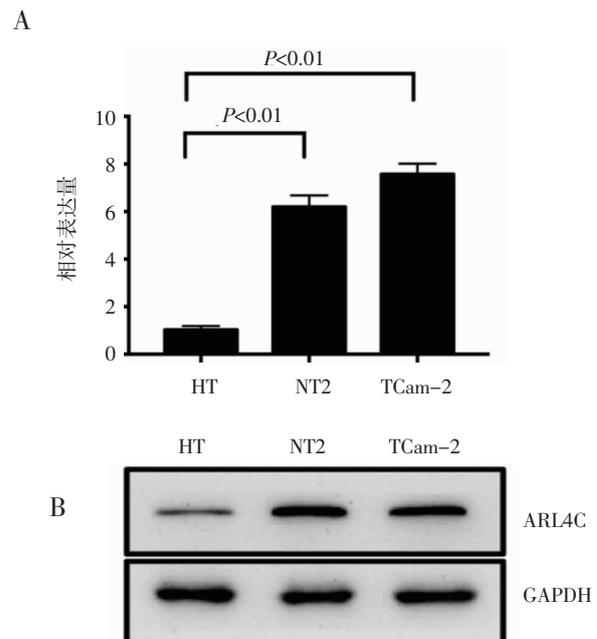
注:A.肿瘤组织与癌旁组织免疫组化评分;B.免疫组化典型图像(放大倍数:左 200x,右 400x)

图 3 免疫组化验证 ARL4C 在睾丸组织的表达情况

Fig 3 Immunohistochemistry confirmed the expression of ARL4C in testis tissue

2.5 DIRAS1 下调促进 ARL4C 表达,从而导致睾丸生殖细胞肿瘤的发展 为了探寻 ARL4C 过度表达在睾丸生殖细胞肿瘤患者中发挥的作用,利用 STRING 数据库寻找其作用靶点,结果如图 5A 所示,ARL4C 与 DIRAS1、GMPS、CHST10、JDP2 等基因均有相互

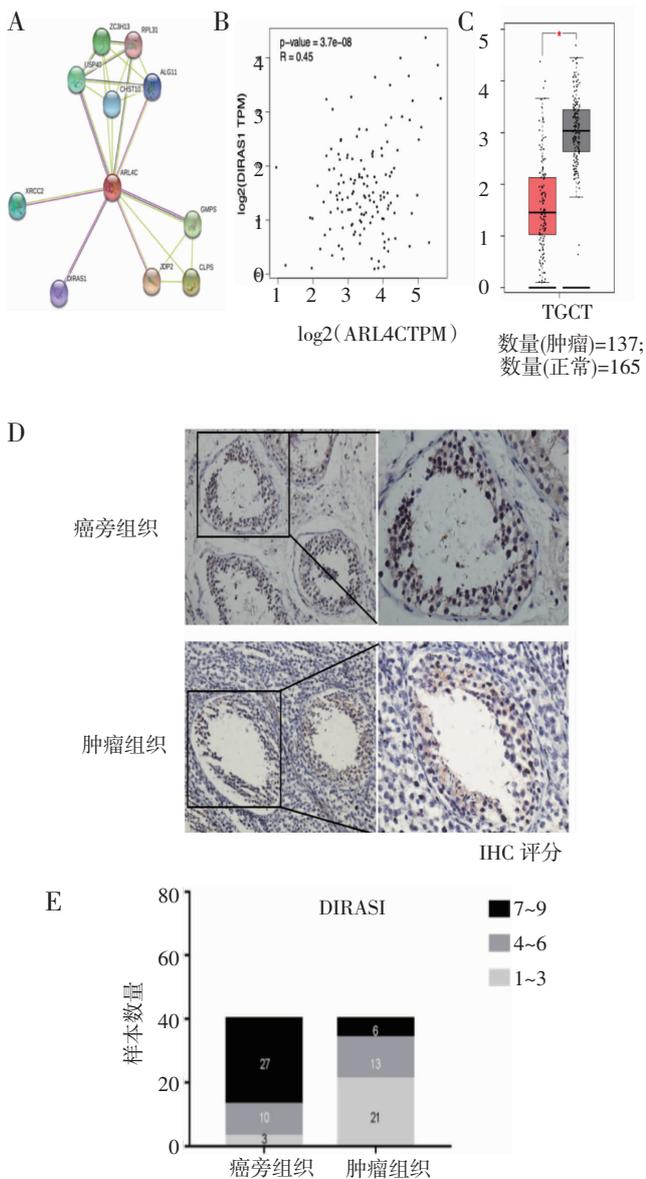
作用。DIRAS1 属于肿瘤抑制性小 GTP 酶,定位于 19p13.3。它的表达可竞争性与 SmgGDS(促进几种致癌 GTP 酶活化的蛋白质)结合并抑制 SmgGDS 与其他促进恶性肿瘤的小 GTP 酶的结合,包括 K-Ras4B、RhoA 和 Rap1A<sup>[6]</sup>,DIRAS1 的异位表达可通过阻断 Ras 介导的转化来抑制神经肿瘤细胞的生长<sup>[6]</sup>。另外,DIRAS1 是胶质瘤和食管鳞状细胞癌的肿瘤抑制因子,DIRAS1 的下调发生在约 50%的原发性食管鳞状细胞癌中,其与晚期临床分期,淋巴结转移和较差的总体存活率显著相关。在原发性食管鳞状细胞癌细胞中的异位重新表达 DIRAS1 可抑制细胞增殖、克隆形成、细胞运动和肿瘤形成<sup>[7]</sup>。Spearman 相关性分析显示 ARL4C 与 DIRAS1 显著相关( $P<0.05$ ,图 5B)。通过 GEPIA 数据库收集 137 例睾丸生殖细胞肿瘤患者与 166 例非睾丸生殖细胞肿瘤患者 DIRAS1 的表达情况,发现 DIRAS1 在睾丸生殖细胞肿瘤患者中的表达显著降低(图 5C),为了验证这一结论,对 40 例肿瘤组织和癌旁组织进行了免疫组化染色,结果如图 5D 显示,DIRAS1 在肿瘤组织中的染色强度明显低于癌旁组织,在睾丸癌中呈现低表达状态。图 E 为免疫组化评分。猜测 DIRAS1 的下调减弱了对 ARL4C 的抑制,从而导致睾丸生殖细胞肿瘤的生长及发展。



注:A.ARL4C 在不同睾丸细胞系中 mRNA 的表达水平;B. ARL4C 在不同睾丸细胞系中蛋白质的表达水平

图 4 RT-qPCR 和 Western blot 验证 ARL4C 在不同睾丸细胞系中的差异表达

Fig 4 Differential expression of ARL4C in diverse testicular cell lines by RT-qPCR and Western blot



注:A.通过 STRING 寻找于 ARL4C 相互作用的基因;B.ARL4C 与 DIRAS1 相关性分析;C.DIRAS1 在 TGCT 与正常睾丸组织中的表达情况;D.DIRAS1 免疫组化典型图像(放大倍数:左 200 $\times$ ,右 400 $\times$ );E.DIRAS1 免疫组化评分

图 5 DIRAS1 下调促进 ARL4C 表达从而导致睾丸生殖细胞肿瘤的发展

Fig 5 Down-regulation of DIRAS1 promotes ARL4C expression leading to the development of testicular germ cell tumors

### 3 讨论

睾丸生殖细胞肿瘤占男性肿瘤的 1.0%~1.5%，占泌尿科肿瘤的 5%<sup>[8]</sup>，是年轻男性中最常见的肿瘤，最近 10 年发病率不断上升。睾丸生殖细胞肿瘤分为精原细胞瘤和非精原细胞瘤或混合型睾丸生殖细胞肿瘤，它们均起源于生殖细胞原位增生(原始生殖细胞发育不良的结果)<sup>[9-10]</sup>。

ADP-核糖基化因子(ARF)是 Ras 相关 GTP 酶的亚家族,ARF 样蛋白(ARL 蛋白)在进化上是保守

的,与 ARF 蛋白具有 40%~60%的氨基酸同一性<sup>[11]</sup>。由 ARL 蛋白调节的细胞过程包括  $\beta$ -微管蛋白折叠,囊泡转运,胚胎发育期间的神经发生和体节发生,以及成人精子发生的早期阶段<sup>[12-14]</sup>。ARL4C 作为一种小 GTP 酶在体内参与了多种生理功能,有报道它参与了 AI 依赖性胆固醇分泌过程,Wei 等<sup>[15]</sup>在人肾癌细胞中鉴定了 ARL4C 与  $\alpha$ -微管蛋白之间的相互作用并且其可能参与调节微管依赖性细胞内囊泡运输过程,Matsumoto 等<sup>[16]</sup>发现 Wnt- $\beta$ -连环蛋白和表皮生长因子-丝裂原活化蛋白激酶途径协同作用可诱导 ARL4C 表达,ARL4C 通过 YAP/TAZ 的核定位促进细胞增殖,细胞形态变化,形成上皮细胞管以及胚胎肾脏中的尿道芽。ARL4C 已被发现在结肠癌和肺腺癌的肿瘤病变中呈现高表达状态,并且 ARL4C 表达在体外和体内均促进癌细胞的迁移、侵袭和增殖<sup>[4]</sup>。ARL4C 也被证实与胃癌的腹膜传播相关并且它的阳性表达是胃癌的不良预后因素<sup>[17]</sup>。

在本研究中,通过对 GEPIA 数据库的挖掘,笔者发现 ARL4C 在多种肿瘤中呈现高表达趋势,之后通过收集患者临床和病理信息以及免疫组化验证了 ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达明显升高,并且其升高能显著影响睾丸生殖细胞肿瘤患者总的生存时间,进一步分析患者临床资料发现,ARL4C 的表达与肿瘤大小、分化程度、是否伴随转移显著相关,与患者年龄及临床分期的关系则无统计学意义。其次笔者对正常睾丸细胞系 HT、睾丸生殖细胞肿瘤细胞系 NT2 及 Tcam-2 的 mRNA 和蛋白质进行提取和分析,结果与免疫组化相一致,肿瘤细胞系 ARL4C 的 mRNA 和蛋白质表达显著高于正常细胞系。利用 STRING 数据库发现 DIRAS1 与 ARL4C 具有相互作用,并且二者显著相关,对 DIRAS1 进行免疫组化分析,结果显示它在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达明显低于癌旁组织。研究报道,DIRAS1 属于肿瘤抑制性小 GTP 酶,在多种恶性肿瘤中呈现下调趋势,DIRAS1 通过细胞外信号调节激酶(ERK1/2;MAPK3/1)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK;MAPK14)发挥信号作用,触发基质金属蛋白酶(MMP)2/9 转录失活从而抑制细胞转移。另外其表达可竞争性与 SmgGDS 结合并抑制 SmgGDS 与其他促进恶性肿瘤的小 GTP 酶的结合,从而抑制促恶性肿瘤小 GTP 酶的活化。笔者猜测 DIRAS1 可能为 ARL4C 上游作用靶点,DIRAS1 的下调导致对 ARL4C 的抑制作用减弱,从而促进睾丸生殖细胞肿瘤的发展。以上结果提示小 GTP 酶 ARL4C 可能是

睾丸生殖细胞肿瘤发生、发展过程中一个重要的靶点。

ARL4C 在睾丸生殖细胞肿瘤中的高表达为分子靶向治疗提供了新的思路,但其在睾丸生殖细胞肿瘤中更多的作用与机制仍旧未知,需要笔者未来进一步的探索和发掘。

#### 参考文献:

- [1] Cheng L, Albers P, Berney D M, et al. Testicular cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4(1):29
- [2] Daugaard G, Gundgaard M G, Mortensen M S, et al. Surveillance for stage I nonseminoma testicular cancer:outcomes and long-term follow-up in a population-based cohort[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(34): 3817
- [3] Hofmann I, Thompson A, Sanderson C M, et al. The Arl4 family of small G proteins can recruit the cytohesin Arf6 exchange factors to the plasma membrane[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(8):711
- [4] Fujii S, Matsumoto S, Nojima S, et al. Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and May represent a novel therapeutic target[J]. *Oncogene*, 2015, 34(37):4834
- [5] Bergom C, Hauser A D, Rymaszewski A, et al. The tumor-suppressive small GTPase DiRas1 binds the noncanonical guanine nucleotide exchange factor SmgGDS and antagonizes SmgGDS interactions with oncogenic small GTPases[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(12): 6534
- [6] Ellis C A, Vos M D, Howell H, et al. Rig is a novel Ras-related protein and potential neural tumor suppressor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002,99(15):9876
- [7] Zhu Y H, Fu L, Chen L L, et al. Downregulation of the novel tumor suppressor DIRAS1 predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7):2298
- [8] Vasdev N, Moon A, Thorpe A C, et al. Classification, epidemiology and therapies for testicular germ cell tumours [J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(2/4):133
- [9] Almstrup K, Nielsen J E, Mlynarska O, et al. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(8):1269
- [10] Berney D M, Looijenga L H, Idrees M, et al. Germ cell neoplasia in situ(GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy[J]. *Histopathology*, 2016, 69(1):7
- [11] Gillingham A K, Munro S.The small G proteins of the Arf family and their regulators[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23(1):579
- [12] Bhamidipati A, Lewis S A, Cowan N J. ADP ribosylation factor-like protein 2 (Arl2)regulates the interaction of tubulin-folding cofactor D with native tubulin[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(5):1087
- [13] Lu L, Tai G, Hong W. Autoantigen Golgin-97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the trans-Golgi network [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(10):4426
- [14] Lin C Y, Huang P H, Liao W L, et al. ARL4,an ARF-like protein that is developmentally regulated and localized to nuclei and nucleoli[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(48):37815
- [15] Wei S M, Xie C G, Abe Y, et al. ADP-ribosylation factor like 7(ARL7) interacts with alpha-tubulin and modulates intracellular vesicular transport[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(3):352
- [16] Matsumoto S, Fujii S, Sato A, et al. A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures[J]. *EMBO J*, 2014, 33(7):702
- [17] Hu Q, Masuda T, Sato K, et al. Identification of ARL4C as a peritoneal dissemination-associated gene and its clinical significance in gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2018, 25(3):745

(2019-08-19 收稿)

(上接第 237 页)

- [11] Bausch D, Pausch T, Krauss T, et al. Neutrophil granulocyte derived MMP-9 is a VEGF independent functional component of the angiogenic Switch in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(3):235
- [12] Gaida M M, Steffen T G, Günther F, et al. Polymorphonuclear neutrophils promote dyshesion of tumor cells and elastase-mediated degradation of E-cadherin in pancreatic tumors[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(12):3369
- [13] Grosse-Steffen T, Giese T, Giese N, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma and pancreatic tumor cell lines: the role of neutrophils and neutrophil-derived elastase[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012:720768
- [14] Coffelt S B, Kersten K, Doornebal C W, et al. IL-17-producing gamma delta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2015, 522(7556):345
- [15] Fogar P, Sperti C, Basso D, et al. Decreased total lymphocyte counts in pancreatic cancer: an index of adverse outcome [J]. *Pancreas*, 2006, 32(1):22
- [16] Chang J H, Jiang Y, Pillarisetty V G. Role of immune cells in pancreatic cancer from bench to clinical application: An updated review[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(49):e5541
- [17] Szkandera J, Stotz M, Eisner F, et al. External validation of the derived neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic marker on a large cohort of pancreatic cancer patients[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78225
- [18] Zhou Y, Wei Q, Fan J, et al. Prognostic role of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in pancreatic cancer: A meta-analysis containing 8252 patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 479:181
- [19] Stotz M, Gerger A, Eisner F, et al. Increased neutrophil-lymphocyte ratio is a poor prognostic factor in patients with primary operable and inoperable pancreatic cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(2):416

(2019-10-30 收稿)