

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.11.004  
文章编号: 1005-8982 (2021) 11-0019-06

结直肠癌专题·论著

## RNF2在结直肠癌中的表达及其对结直肠癌细胞生物学行为的影响\*

贾楠<sup>1</sup>, 宋哲<sup>1</sup>, 陈宝胜<sup>1</sup>, 程进生<sup>2</sup>

(1.沧州市中心医院 普外二科,河北 沧州 061001; 2.献县人民医院,河北 沧州 062250)

**摘要:目的** 探讨环指蛋白2 (RNF2) 在结直肠癌中的表达及其对结直肠癌细胞生物学行为的影响。**方法** 采用免疫组织化学法检测RNF2在结直肠癌组织和癌旁正常组织中的表达,并利用过表达的慢病毒转染HCT116细胞构建过表达RNF2的HCT116细胞系,通过CCK-8法、划痕实验、Transwell实验检测过表达RNF2对结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭等生物学行为的影响。**结果** 结直肠癌组织中RNF2阳性表达率高于癌旁正常组织( $P < 0.05$ );不同年龄、组织学类型、分化程度、Dukes分期、淋巴结转移的结直肠癌患者的RNF2表达阳性率比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );HCT116组、HCT116-control组、HCT116-RNF2组HCT116细胞增殖、迁移能力及侵袭能力比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );HCT116-RNF2组细胞增殖速度、迁移能力及侵袭能力均高于HCT116-control组和HCT116组( $P < 0.05$ )。**结论** RNF2在结直肠癌中呈高表达,且过表达RNF2可促进结直肠癌细胞迁移、增殖、侵袭能力,可为结直肠癌治疗提供新的治疗靶点。

**关键词:** 结直肠肿瘤;环指蛋白2 (RNF2);HCT116细胞;生物学行为

**中图分类号:** R735.34

**文献标识码:** A

## Expression of RNF2 in colorectal cancer tissues and its effect on biological behavior of colorectal cancer cells\*

Nan Jia<sup>1</sup>, Zhe Song<sup>1</sup>, Bao-sheng Chen<sup>1</sup>, Jin-sheng Cheng<sup>2</sup>

(1. Department of General, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou, Hebei 061001, China;

2. Xianxian People's Hospital, Cangzhou, Hebei 062250, China)

**Abstract: Objective** To investigate Expression of ring finger protein 2 (RNF2) in colorectal cancer (CRC) tissues and its relationship with biological characteristics. **Methods** The expression of RNF2 in CRC tissues and adjacent normal tissues was detected by immunohistochemistry. RNF2-overexpressing HCT-116 colorectal cancer cell lines were constructed, then the effects of overexpression of RNF2 on proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer cells were studied by CCK-8, scratch test and Transwell chamber. **Results** The positive expression rate of RNF2 in CRC tissues was higher than that in adjacent normal tissues ( $P < 0.05$ ). The expression of RNF2 showed significant difference in CRC patients with different age, histological types, differentiation degree, Dukes stage, and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). HCT-116 cell proliferation rate, migration ability and invasive ability in HCT-116 group, HCT-116-control group, and HCT-116-RNF2 group respectively showed statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). The proliferation rate, migration ability, and invasion ability of HCT-116-RNF2 cells were higher than those of HCT-116-control and HCT-116 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RNF2 is highly expressed in CRC, and the overexpression of RNF2 can promote the migration, proliferation, and invasion of CRC cells, which

收稿日期: 2020-10-15

\* 基金项目: 河北省卫计委重点科技研究计划课题 (No: 20191268)

can be a new therapeutic target for CRC treatment.

**Keywords:** colorectal neoplasms; RNF2; expression; biological characteristics

结直肠癌已成为我国第3大常见恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。年龄>50岁、有结直肠癌家族史、相关消化系统病史及不健康的生活饮食习惯均是结直肠癌发生的高危因素。近年对结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭等生物学行为研究较多,大量报道显示结直肠癌生物学行为可能影响患者抑癌基因、癌基因、血清肿瘤相关标志物及细胞因子,从而加重疾病发展<sup>[2-3]</sup>。研究表明<sup>[4]</sup>,环指蛋白2(cyclic finger protein 2, RNF2)具有E3连接酶活性,对血管正常发育、生长、重塑及细胞增殖、迁移、侵袭有显著影响。另RNF2还可负反馈影响血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达,对内皮细胞增殖及血管生成产生抑制作用。国内已有研究证实RNF2在食管癌、乳腺癌等肿瘤中均呈异常表达,且与多种疾病发生、发展密切相关<sup>[5-6]</sup>。同时,也有多项研究对结直肠癌组织中相关因子表达进行报道,并指出其可能参与癌细胞生物学过程<sup>[7-8]</sup>。以上均提示RNF2在癌细胞侵袭、迁移、血管生成等方面具有显著影响。但结直肠癌组织中RNF2的表达及其临床意义尚无相关报道,因此本研究就此展开讨论,以期对结直肠癌治疗提供新思路和方法。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集2017年6月—2019年6月沧州市中心医院收治并确诊的62例结直肠癌患者的癌组织及距癌旁>2 cm正常黏膜组织。其中,男性40例,女性22例;年龄40~79岁,中位年龄65岁,≥65岁38例,<65岁24例;发病部位左39例,右23例;乳头状腺癌8例,管状腺癌40例,其他腺癌14例;高分化11例,中分化35例,低分化16例;Dukes分期A、B期39例,C、D期23例;无淋巴结转移38例,有淋巴结转移24例。纳入标准:①经病理学检查确诊为结直肠癌且均为腺癌;②入院前未接受放、化疗;③临床资料完整,相关检查完善;④入院前无重大出血史;⑤肝、肾、心功能均正常。排除标准:①预计生存期<2个月;②对治疗不耐受;③血标本采集

困难或标本不正确;④过敏体质;⑤合并精神疾病或语言功能障碍。本研究经医院医学伦理委员会审核批准,患者签署知情同意书。

### 1.2 免疫组织化学染色

取结直肠癌组织及癌旁正常组织,10%甲醛溶液(上海远慕生物科技有限公司)固定,经梯度浓度酒精(上海谱振生物科技有限公司)脱水,二甲苯(北京三药科技开发公司)透明;采用Arcadia组织包埋机(浙江徕卡生物科技有限公司)将组织用石蜡(上海依赫生物科技有限公司)包埋成块,连续切成4 μm厚切片,依次采用二甲苯、沸腾的柠檬酸钠缓冲液(长沙达尔锋生物科技有限公司)、3%过氧化氢(上海泽叶生物科技有限公司)进行脱蜡、抗原修复、梯度酒精水化、PBS漂洗、内源性过氧化物酶活性消除;滴加小鼠抗人RNF2多克隆抗体(Sino Biological,浓度1:100)4℃孵育过夜,PBS漂洗3次后滴加通用型二抗(厦门研科生物技术有限公司)37℃孵育30 min;再次漂洗,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(武汉纯度生物科技有限公司),37℃孵育20 min;PBS漂洗,经DAB(上海恒斐生物科技有限公司)显色、苏木精(上海源叶生物科技有限公司)复染,脱水,透明,封片,Olympus CX31光学显微镜(广州科适特科学仪器有限公司)下观察结直肠癌组织和癌旁正常组织中RNF2表达。由5年以上临床经验的专科医师在不清楚患者资料情况下观察和判定结果:着色细胞染色强弱:0分无色,1分黄色,2分棕黄色,3分棕褐色;阳性细胞所占视野百分比:0分为阳性细胞率≤5%,1分为阳性细胞率>5%~25%,2分为阳性细胞率>25%~50%,3分为阳性细胞率>50%。两项评分之积为最终得分:阴性0~1分,弱阳性2分,阳性3~4分,强阳性5~6分。最终得分≤2分阴性表达;最终得分>2分阳性表达。

### 1.3 细胞增殖、迁移及侵袭实验

**1.3.1 CCK-8法** 依次准备结直肠癌细胞系HCT116(上海酶研生物科技有限公司),阴性对照组病毒原液(HCT116-control)与RNF2过表达的病毒原液(HCT116-RNF2)作为3个组,传代培养各组细胞,取生长状态良好的对数生长期细胞制备成单细

胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板中(2 × 10<sup>3</sup> 个/孔);待细胞贴壁后,每孔加入 10 μl CCK-8 试剂(上海炎熙生物科技有限公司),37℃ 孵育 0 h、12 h、14 h、36 h、48 h 后在 HBS-1096A 酶标仪(美国 Bio Tek 公司)540 nm 处检测各孔光密度(OD)值。

**1.3.2 Transwell 细胞迁移、侵袭实验** 细胞划痕实验:取转染后细胞使各组细胞密度约为 90%,用 200 μl 无菌枪头对孔板培养细胞进行划痕处理,PBS 缓冲液洗涤 3 次,加入无血清培养基,于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养箱中培养 24 h,Image J 软件计算每个视野的划痕面积,细胞迁移率=(T<sub>0</sub>时面积-T<sub>24</sub>时面积)/T<sub>0</sub>时面积\*100%。Transwell:调整细胞浓度为 5 × 10<sup>5</sup> 个/ml,向上室加入细胞悬液 200 μl,向下室加入 700 μl 培养基(含有 20% FBS),48 h 后将 Transwell 小室进行 PBS 清洗,置于甲醛中固定 15 min,0.2% 结晶紫(北京百奥莱博科技有限公司)染色 20 min,随机选取 5 个视野拍照并进行技术统计;将 Transwell 小室上表面铺适量厚度的基质胶,按上述步骤操作,显微镜下观察小室下表面附着的侵袭细胞。

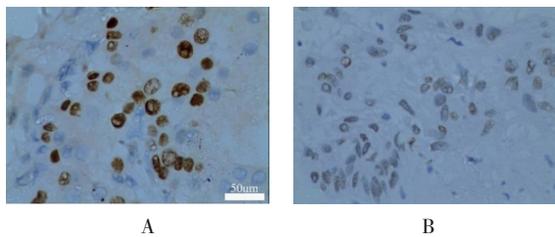
**1.4 统计学方法**

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用方差分析或重复测量设计的方差分析,两两比较用 SNK-q 检验;计数资料以构成比(%)表示,比较用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 结直肠癌组织和癌旁正常组织中 RNF2 的表达**

RNF2 主要定位于细胞浆,呈棕黄色颗粒(见图 1);结直肠癌组织中 RNF2 阳性表达率高于癌旁正常组织( $P < 0.05$ )。见表 1。



A: RNF2 在癌旁正常组织中阴性表达; B: RNF2 在结直肠癌组织中阳性表达

图 1 免疫组织化学染色切片图 (SP × 200)

表 1 结直肠癌组织和癌旁正常组织 RNF2 阳性表达率比较 (n=62)

组别	RNF2 阳性表达		
	阳性 例	阴性 例	阳性率/%
结直肠癌组织	41	21	66.13
癌旁正常组织	24	38	38.71
$\chi^2$ 值			9.345
P 值			0.000

**2.2 RNF2 表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系**

不同性别、部位的直肠癌患者的 RNF2 表达阳性率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );不同年龄、组织学类型、分化程度、Dukes 分期、淋巴结转移的结直肠癌患者的 RNF2 表达阳性率比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 结直肠癌患者不同因素间 RNF2 表达阳性率的比较例(%)

因素	n	RNF2		$\chi^2$ 值	P 值
		阳性表达 (n=41)	阴性表达 (n=21)		
<b>年龄</b>					
<65 岁	24	10(41.67)	14(58.33)	10.462	0.001
≥65 岁	38	31(81.58)	7(18.42)		
<b>性别</b>					
男	40	24(60.00)	16(40.00)	1.891	0.169
女	22	17(77.27)	5(22.73)		
<b>部位</b>					
左	39	26(66.67)	13(33.33)	0.014	0.907
右	23	15(65.22)	8(34.78)		
<b>组织学类型</b>					
乳头状腺癌	8	2(25.00)	6(75.00)	34.469	0.000
管状腺癌	40	26(65.00)	14(35.00)		
其他腺癌	14	13(92.86)	1(7.14)		
<b>分化程度</b>					
低	16	5(31.25)	11(68.75)	11.713	0.001
高、中	46	36(78.26)	10(21.74)		
<b>Dukes 分期</b>					
A、B 期	39	21(53.85)	18(46.15)	7.081	0.008
C、D 期	23	20(86.96)	3(13.04)		
<b>淋巴结转移</b>					
无	38	19(50.00)	19(50.00)	11.402	0.001
有	24	22(91.67)	2(8.33)		

### 2.3 过表达RNF2对HCT-116增殖的影响

各组过表达RNF2后12 h、24 h、36 h、48 h后HCT-116细胞OD值比较,采用重复测量设计的方

差分析,结果:①不同时间点的OD值有差异( $F=3\ 203.034, P=0.000$ );②各组OD值有差异( $F=476.864, P=0.000$ );③各组OD值变化趋势有差异( $F=4\ 247.089, P=0.000$ )。见表3。

表 3 不同组别与不同时间的细胞OD值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
HCT116组	0.33 ± 0.04	0.49 ± 0.06	0.48 ± 0.14	0.77 ± 0.12	0.96 ± 0.13
HCT116-control组	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.06	0.32 ± 0.05	0.34 ± 0.04
HCT116-RNF2组	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.05

### 2.4 过表达RNF2对HCT-116迁移的影响

HCT116、HCT116-control、HCT116-RNF2组HCT116细胞划痕面积,经单因素方差分析,差异

有统计学意义( $F=35.400, P=0.000$ );两两比较,HCT116-RNF2组细胞划痕面积大于HCT116-control组、HCT116组( $P<0.05$ )。见图2和表4。

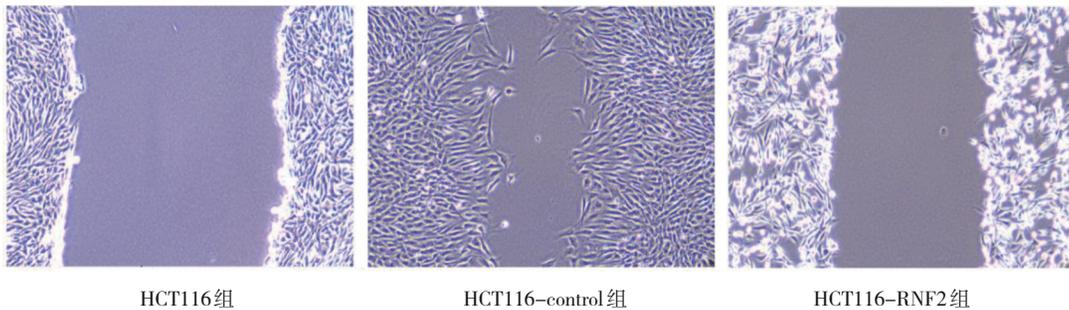


图 2 细胞划痕实验

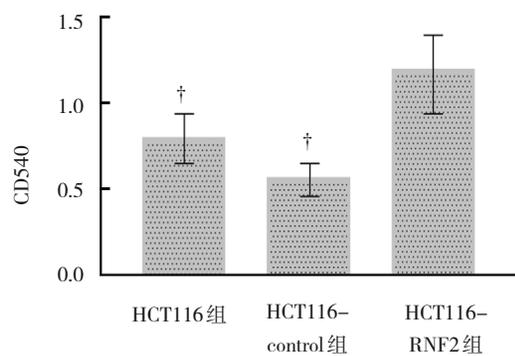
表 4 各组HCT116细胞迁移率比较 ( $n=10, \text{个}, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞迁移率
HCT116组	6.65 ± 3.77
HCT116-control组	45.32 ± 4.05
HCT116-RNF2组	61.17 ± 4.22 <sup>①②</sup>

注:①与HCT116组比较, $P<0.05$ ;②与HCT116-control组比较, $P<0.05$ 。

### 2.5 过表达RNF2对HCT116侵袭的影响

HCT116组、HCT116-control组、HCT116-RNF2组穿过小室膜的细胞数分别为( $0.84 \pm 0.32$ )、( $0.71 \pm 0.27$ )和( $1.32 \pm 0.39$ ),经单因素方差分析,差异有统计学意义( $F=9.462, P=0.001$ );两两比较,HCT116-RNF2组穿过小室膜的细胞数多于HCT116-control组、HCT116组( $P<0.05$ )。见图3。



†与HCT116-RNF2组比较, $P<0.05$ 。

图 3 过表达RNF2对HCT116侵袭的影响

## 3 讨论

近年对肿瘤细胞侵袭、转移等生物学行为的报道较多,在结直肠癌组织中癌细胞的侵袭可经病灶部位蔓延至淋巴管,快速扩散、增殖至全身<sup>[9]</sup>。既往多认为胚胎发育及干细胞自我更新与该病理特性有关<sup>[10]</sup>,而目前关于RNF2与肿瘤间的关

系报道较多, 学者提出 RNF2 与肿瘤相关标志物、血管纤维化及基因转录、逆转录过程密切相关<sup>[11-12]</sup>。

刘建敏等<sup>[13]</sup>早已指出 RNF2 为肿瘤相关敏感因子, 通过下调 RNF2 表达, 发现喉癌细胞生长受到显著抑制。该实验结果对本研究有一定参考价值, 考虑可通过敲除或下调 *RNF2* 基因判断其对生物特性的影响。本文探究结直肠癌组织 RNF2 表达与其生物学特性的相关性, 目前尚未见此类相关报道, 具有一定创新性。本研究显示结直肠癌组织中 RNF2 表达水平高于癌旁正常组织, 且年龄  $\geq 65$  岁、高、中分化程度, Dulces 分期 C、D 期、有淋巴结转移的结直肠癌患者 RNF2 表达阳性率高, 符合既往研究中指出的 RNF2 在肿瘤组织中呈高表达特点。结直肠上皮正常细胞发生突变后, 可通过刺激肽类血管生成因子表达而产生大量 RNF2 蛋白抑制血管形成、重塑及机体正常组织器官功能维护。目前已发现的 18 个多梳蛋白家族 (PcGs) 成员中 RNF2 为其核心成员之一, 与 PcGs 一样可通过表观遗传学事件抑制靶基因活性而参与肿瘤发生与发展。RNF2 通过催化组蛋白赖氨酸单泛素化造成基因沉默和抑制转录过程, 从而发挥促癌作用<sup>[14]</sup>。另 GERGELY 等<sup>[15]</sup>上调大鼠 RNF2 基因后其内皮细胞形态异常, 血管稳定性遭到破坏, 且癌细胞增殖和侵袭能力加强。YANG 等<sup>[16]</sup>的动物模型实验显示, 食管癌鼠敲除 *RNF2* 基因后小鼠血管、血管腔变小, 毛细血管减少, 内皮细胞与成纤维细胞的联系异常。以上实验均说明 RNF2 对血管生成、干细胞增殖分化和干细胞自我更新有抑制作用, 且可促进癌细胞发生和发展。同时考虑 RNF2 过表达可导致细胞对细胞外基质的黏附减弱, 从而提高肿瘤增殖、侵袭能力。为进一步探究 RNF2 过表达对结直肠癌细胞迁移、增殖、侵袭等生物学行为的影响, 本研究利用过表达慢病毒转染 HCT-116 细胞构建过表达 RNF2 的 HCT-116 细胞系并进行细胞增殖、迁移及侵袭实验, 结果发现过表达 RNF2 后, 结直肠癌细胞体外迁移、增殖、侵袭能力明显提高。有研究认为 RNF2 可能通过 *FBXW7* 基因位点促进结直肠癌细胞生物学行为的发生<sup>[17]</sup>。

综上所述, 过表达的 RNF2 可影响结直肠癌细

胞生物学行为, 可为结直肠癌治疗提供新的治疗靶点。但由于本研究样本量少、随访时间短, 关于 RNF2 是否可能成为结直肠癌治疗靶点需在临床研究中进一步探讨。

#### 参 考 文 献 :

- [1] WILSON C. Web-based communication strategies designed to improve intention to minimize risk for colorectal cancer: randomized controlled trial[J]. *Jmir Cancer*, 2018, 4(1): e2-e9.
- [2] 李恒爱, 卢建军, 谭进富, 等. 622 例结直肠癌患者术后生存分析[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2017, 20(4): 459-461.
- [3] 陈文彬, 钟文洲. GPX1 在结直肠癌组织中的表达及其对癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(9): 995-1001.
- [4] WEI M, JIAO D, HAN D H, et al. Knockdown of RNF2 induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells through the upregulation of TXNIP[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 5323-5338.
- [5] 杨兴肖, 邹乃祎, 李巧芳, 等. RNF2 和 PCNA 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. *癌变·畸变·突变*, 2018, 30(4): 8-11.
- [6] 李庆, 吴正升, 沈玉君, 等. 乳腺癌中 RNF2 的表达及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017(3): 4-7.
- [7] 敬国敏, 吴立然, 樊坤, 等. 结直肠癌中 RIP2 的表达与侵袭性相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(7): 834-836.
- [8] WALASA W M, CAREY R N, SI S, et al. Association between shiftwork and the risk of colorectal cancer in females: a population-based case-control study[J]. *Occup Environ Med*, 2018, 75(5): 344-350.
- [9] 邹超世, 林英, 刘康海. 多种肿瘤标志物联合检测诊断结直肠癌的临床价值及预后监测研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(23): 118-121.
- [10] 白驹, 杨力芳. 结直肠癌患者血浆中可溶性血栓调节蛋白的水平及其临床意义[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2018, 10(1): 38-42.
- [11] ZHANG J F, SUN Z N, HAN Y F, et al. Rnf2 knockdown reduces cell viability and promotes cell cycle arrest in gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3817-3822.
- [12] 刘志坤, 王璇, 张魏丽, 等. 慢病毒介导 RNF2 基因表达对食管癌细胞 X 线照射后增殖与迁移等影响[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2017, 26(7): 810-815.
- [13] 刘建敏, 曹蜀炜, 张萌, 等. RNF2 基因在喉癌组织及细胞中的表达情况研究[J]. *医学综述*, 2018, 24(1): 2886-2889.
- [14] YING C, XIAO Y C, YING N L, et al. Reversal of cisplatin resistance by microRNA-139-5p-independent RNF2 downregulation and MAPK inhibition in ovarian cancer[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(2): C225-C235.
- [15] GERGELY R, DOMENICO R, YANDONG Y, et al. PARP1-dependent recruitment of the FBXL10-RNF68-RNF2 ubiquitin ligase to sites of DNA damage controls H2A.Z loading[J]. *eLife*, 2018, 22(7): e38771-e38775.

- [16] YANG X X, MA M, SANG M X, et al. Radiosensitization of esophageal carcinoma cells by knockdown of RNF2 expression[J]. International Journal of Oncology, 2016, 48(5): 1985-1991.
- [17] 张百川, 程勇, 王祥峰, 等. FBXW7 基因点突变对结直肠癌 HCT-116 细胞的增殖、迁移、侵袭和抗凋亡能力的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(3): 263-269.

(张西倩 编辑)

**本文引用格式:** 贾楠, 宋哲, 陈宝胜, 等. RNF2 在结直肠癌中的表达及其对结直肠癌细胞生物学行为的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(11): 19-24.

**Cite this article as:** JIA N, SONG Z, CHEN B S, et al. Expression of RNF2 in colorectal cancer tissues and its relationship with biological characteristics[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(11): 19-24.