

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.06.008
文章编号: 1005-8982 (2022) 06-0044-05

实验研究·论著

RasGRF1在结直肠癌细胞中的表达及其对癌细胞生物学行为的影响*

王硕¹, 杨其贤², 殷旭薇², 孙颖昕²

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 南京医科大学附属常州市第二人民医院 检验科, 江苏 常州 213004)

摘要: **目的** 探究RasGRF1在结直肠癌细胞中的表达及对癌细胞生物学功能的影响。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测不同结直肠癌细胞系DiFi、SNU175、HT-29、HCT-15细胞中RasGRF1 mRNA;体外培养人结肠癌细胞,随机分为si-RasGRF1-NC组(阴性对照)、si-RasGRF1组(沉默RasGRF1表达)、NG组(空白对照)。采用qRT-PCR检测各组RasGRF1 mRNA,CCK-8法检测细胞存活情况,AnnexinV/PITC双染法检测细胞凋亡,Western blotting检测细胞PI3K/Akt通路蛋白。**结果** DiFi细胞中RasGRF1 mRNA相对表达量最高($P < 0.05$),选择DiFi细胞进行后续实验。si-RasGRF1组光密度值低于NG组、si-RasGRF1-NC组($P < 0.05$)。si-RasGRF1组细胞凋亡率高于NG组和si-RasGRF1-NC组($P < 0.05$)。si-RasGRF1组p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白相对表达量低于NG组和si-RasGRF1-NC组($P < 0.05$),Caspase-3蛋白相对表达量高于NG组和si-RasGRF1-NC组($P < 0.05$)。**结论** RasGRF1在结直肠癌细胞中异常高表达,抑制RasGRF1表达可抑制DiFi细胞增殖并诱导细胞凋亡,且该作用是通过抑制DiFi细胞PI3K/Akt通路活化来实现的。

关键词: 结直肠癌; RasGRF1; 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Expression of RasGRF1 in colorectal cancer cells and its effect on the cancer cell biological behavior*

Shuo Wang¹, Qi-xian Yang², Xu-wei Yin², Ying-xin Sun²

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Department of Clinical Laboratory Changzhou Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Changzhou, Jiangsu 213004, China)

Abstract: Objective To determine the expression of RasGRF1 in colorectal cancer cells and to investigate its effect on the cancer cell biological behavior. **Methods** The mRNA expressions of RasGRF1 in different colorectal cancer cell lines including DiFi, SNU175, HT-29 and HCT-15 were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Human colorectal cancer cells were cultured in vitro and randomly divided into si-RasGRF1-NC group, si-RasGRF1 group and NG group. The expression level of RasGRF1 mRNA in different groups was detected by qRT-PCR. The cell survival was detected by CCK-8 assay and cell apoptosis was detected by Annexin V/PITC. The protein expression levels of molecules associated with PI3K/Akt pathway were detected by Western blotting. **Results** The mRNA expression level of RasGRF1 was highest in the DiFi cells ($P < 0.05$), which were selected for subsequent experiments. The OD value in the si-RasGRF1 group was lower than that in the NG

收稿日期: 2021-10-20

* 基金项目: 江苏省自然科学基金(No: BK20171235)

[通信作者] 孙颖昕, E-mail: czey_syx@163.com; Tel: 0519-81087710

group and the si-RasGRF1-NC group ($P < 0.05$). The apoptosis rate in the si-RasGRF1 group was higher than that in the NG group and the si-RasGRF1-NC group ($P < 0.05$). Compared with the NG group and the si-RasGRF1-NC group, the protein expression levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt were lower, while the protein expression level of Caspase-3 was higher in the si-RasGRF1 group ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of RasGRF1 is abnormally high in colorectal cancer cells, and the inhibition of the expression of RasGRF1 could suppress the proliferation of DiFi cells and induce apoptosis, possibly by restricting the activation of PI3K/Akt pathway in DiFi cells.

Keywords: colorectal cancer; RasGRF1; cell; proliferation; apoptosis

结直肠癌是我国常见的恶性肿瘤之一,发病率及病死率呈逐年上升趋势,其发生、发展机制复杂,尚未明确。目前临床治疗结直肠癌主要通过手术及放化疗,由于其恶性程度高,患者5年生存率仅为50%左右^[1-2]。从基因层面探寻结直肠癌分子生物学治疗靶标以改善患者预后成为研究热点。*RasGRF1*是一种父系印记基因,位于人染色体25q15上,能够调控基因表达,参与肿瘤进展^[3]。何新等^[4]研究显示,抑制RasGRF1表达能够抑制人结直肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。目前RasGRF1对结直肠癌细胞生物学功能影响的具体机制尚未明确。隋华等^[5]研究显示,抑制PI3K/Akt通路活化,能够抑制结直肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,提高化疗敏感性。目前RasGRF1对结直肠癌细胞生物学功能的影响是否与调控PI3K/Akt通路有关少见报道,故本研究探究RasGRF1在结直肠癌细胞中的表达及对癌细胞生物学行为的影响,并分析其对PI3K/Akt通路的影响,以期为临床治疗结直肠癌提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 细胞

人结直肠癌细胞系DiFi、SNU175、HT-29、HCT-15细胞均由广东药学院实验室保存,购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM-H培养基(北京伊塔生物科技有限公司),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(广州蕊特生物科技有限公司),Lipo-fectamine™ 3000转染试剂盒(美国Invitrogen公司),si-RasGRF1、si-RasGRF1-NC序列均由上海生工生物工程股份有限公司合成,CCK-8试剂盒(深圳市纽邦生物技术有限公司),Annexin V/PITC双染试剂盒(上海复申生物科技有限公司),兔抗人Caspase-3、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt

及 β -actin多克隆抗体、山羊抗兔HRP二抗(武汉亚科因生物技术有限公司)。

二氧化碳细胞培养箱(美国Thermo公司),C1000型实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(美国Bio-Rad公司),CytoFLEX SRT型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 复苏并解冻DiFi、SNU175、HT-29、HCT-15细胞,置于含10%灭活FBS+DMEM-H的培养液,在37℃、5%二氧化碳、95%氧培养箱中培养,每2~3天换1次培养液,传代培养。

1.3.2 根据RasGRF1 mRNA相对表达量筛选细胞系 分别取1.3.1中对数生长期的各细胞,并提取总RNA、测浓度,逆转录为cDNA,进行qRT-PCR反应。总反应体系20 μ L: Ultra SYBR mixture 10 μ L、模板cDNA 2.0 μ L、正反向引物各2.0 μ L、去离子纯化水4.0 μ L。反应条件:95℃变性15 s,60℃退火60 s,共40个循环。溶解曲线:60℃至95℃,每15秒升温0.3℃。以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各细胞RasGRF1 mRNA相对表达量。qRT-PCR引物序列见表1。

表1 引物设计

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>RasGRF1</i>	正向: 5'-GTTTCAGGAAGACTGACACCA-3'	27
	反向: 5'-TTCTCCGCATCTCCATTCT-3'	
β -actin	正向: 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'	161
	反向: 5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'	

1.3.3 细胞分组及处理 1.3.2结果显示DiFi细胞RasGRF1 mRNA相对表达量最高,选其为研究对象。取对数生长期的DiFi细胞,按 2.5×10^4 个/孔的密度

接种于 24 孔板,待细胞融合至 70%~80%,更换无 FBS 培养液,将细胞随机分为 3 组。用无 FBS 的培养液将 Lipofectamine™ 3000 稀释并分别配制浓度为 10 mmol/L 的 si-RasGRF1-NC、si-RasGRF1,然后将等体积 Lipofectamine™ 3000 分别与 si-RasGRF1-NC、si-RasGRF1 混匀、静置,加入 DiFi 细胞中,分别作为 si-RasGRF1-NC 组(阴性对照)、si-RasGRF1 组(沉默 RasGRF1 表达)。同时将未经转染的细胞设置为 NG 组(空白对照)。各组细胞继续培养 24 h,倒置荧光显微镜下观察细胞荧光强度,每组设置 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.3.4 qRT-PCR 检测 RasGRF1 mRNA 的表达 分别取各组 DiFi 细胞并提取总 RNA、测浓度,参照 1.3.2 的方法,计算各组 DiFi 细胞 RasGRF1 mRNA 相对表达量。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞存活情况 分别取各组 DiFi 细胞,胰蛋白酶消化处理,将细胞按 2.5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板,培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂,继续培养 2 h,检测 490 nm 波长处各孔细胞光密度(optic density, OD)值,重复 3 次,严格按照 CCK-8 试剂盒说明书进行操作。统计各组细胞 OD 值,每组设置 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.3.6 AnnexinV/PITC 双染法检测 DiFi 细胞凋亡 分别取各组 DiFi 细胞,PBS 溶液洗涤,弃上清液,调整密度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,取 100 μ L 加入 AnnexinV/PITC (5 μ L)+PI (10 μ L, 20 μ g/mL)混匀,孵育 30 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。每组 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.3.7 Western blotting 检测细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt 通路蛋白的表达 分别取各组 DiFi 细胞,以 RIPA 裂解并提取总蛋白,电泳、转膜,放入 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h,分别加入 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Caspase-3 及内参 β -actin 作为一抗(1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育 1 h,显影、定影,计算目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进一步两两比较用 SNK-*q* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同结直肠癌细胞系中 RasGRF1 mRNA 的表达

DiFi、SNU175、HT-29、HCT-15 细胞 RasGRF1 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.15) 、 (0.69 ± 0.11) 、 (0.73 ± 0.12) 、 (0.45 ± 0.07) ,经方差分析,差异有统计学意义($F = 222.059, P = 0.005$),DiFi 细胞 RasGRF1 mRNA 相对表达量最高($P < 0.05$),选择 DiFi 细胞进行后续实验。

2.2 各组 DiFi 细胞 RasGRF1 mRNA 相对表达量比较

NG 组、si-RasGRF1-NC 组、si-RasGRF1 组 RasGRF1 mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.15) 、 (0.99 ± 0.16) 和 (0.71 ± 0.11) ,经方差分析,差异有统计学意义($F = 324.568, P = 0.000$),si-RasGRF1 组低于 NG 组和 si-RasGRF1-NC 组($P < 0.05$),说明 DiFi 细胞转染成功。

2.3 抑制 RasGRF1 表达对 DiFi 细胞存活能力的影响

NG 组、si-RasGRF1-NC 组、si-RasGRF1 组 DiFi 细胞 OD 值分别为 (0.87 ± 0.15) 、 (0.85 ± 0.13) 和 (0.37 ± 0.06) ,经方差分析,差异有统计学意义($F = 2 883.063, P = 0.000$),si-RasGRF1 组低于 NG 组和 si-RasGRF1-NC 组($P < 0.05$)。

2.4 抑制 RasGRF1 表达对 DiFi 细胞凋亡的影响

NG 组、si-RasGRF1-NC 组、si-RasGRF1 组 DiFi 细胞凋亡率分别为 $(9.15 \pm 1.38)\%$ 、 $(9.03 \pm 1.36)\%$ 和 $(25.78 \pm 3.87)\%$,经方差分析,差异有统计学意义($F = 396.215, P = 0.000$),si-RasGRF1 组高于 NG 组和 si-RasGRF1-NC 组($P < 0.05$)。见图 1。

2.5 抑制 RasGRF1 表达对 DiFi 细胞 PI3K/Akt 通路蛋白的影响

NG 组、si-RasGRF1-NC 组、si-RasGRF1 组 DiFi 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Caspase-3 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较结果:si-RasGRF1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量低于 NG 组和 si-RasGRF1-NC 组($P < 0.05$),Caspase-3 蛋白相对表达量高于 NG 组和 si-RasGRF1-NC 组($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

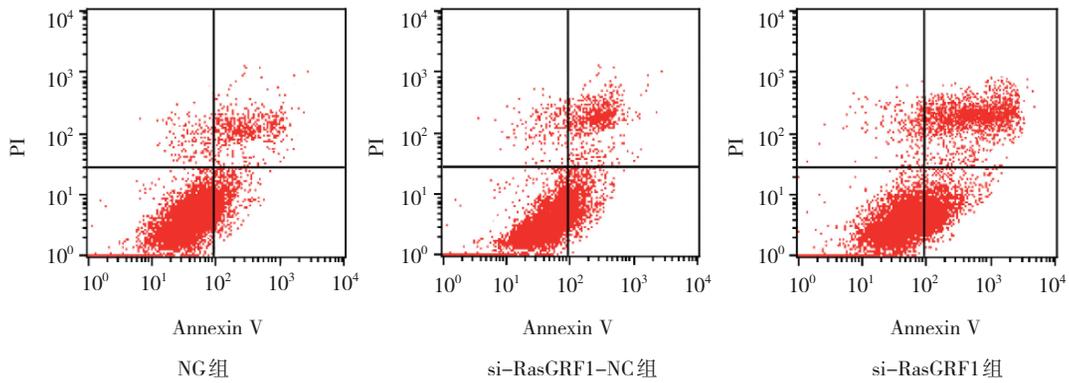


图 1 各组 DiFi 细胞流式细胞图

表 2 各组 DiFi 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Caspase-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	Caspase-3
NG 组	1.08 ± 0.17	1.15 ± 0.18	0.36 ± 0.06
si-RasGRF1-NC 组	1.06 ± 0.16	1.17 ± 0.18	0.40 ± 0.08
si-RasGRF1 组	0.45 ± 0.08 [†]	0.51 ± 0.08 [†]	0.97 ± 0.16 [†]
F 值	324.015	331.5241	261.329
P 值	0.000	0.000	0.000

注: †与 NG 组、si-RasGRF1-NC 组比较, P < 0.05。

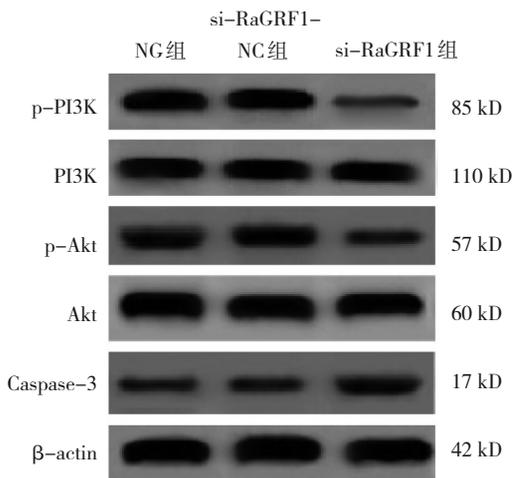


图 2 各组 DiFi 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Caspase-3 蛋白的表达

3 讨论

结直肠癌是恶性程度较高的消化道肿瘤之一, 发病率居全球恶性肿瘤的第三位, 目前临床治疗仍以手术辅以放化疗为主, 但未能取得较理想的疗效^[6]。RasGRF1 是一种多结构域蛋白, 能够调节肿瘤细胞生物学行为, 参与肿瘤进展^[7]。聂文静等^[8]研究显示, *RasGRF1* 在结直肠癌组织中异常高

表达, 作为促癌基因参与结直肠癌进展。文献报道, 下调 *RasGRF1* 表达能对人结直肠癌细胞增殖发挥抑制作用, 对细胞凋亡发挥促进作用^[4]。

肿瘤细胞增殖及凋亡失衡是肿瘤发生、发展的关键, 其中 Caspase-3 是凋亡过程的关键执行者^[9-10]。本研究选择 DiFi 细胞进行研究, 成功转染 DiFi 细胞, 且结果显示, 与 NG 组、si-RasGRF1-NC 组比较, si-RasGRF1 组 DiFi 细胞存活率降低, 凋亡率升高。与既往研究结果一致, 说明抑制 *RasGRF1* 表达能够抑制 DiFi 细胞增殖并诱导细胞凋亡。PI3K 是 PI3K/Akt 信号通路的起始因子, 其活化产生第二信使 PIP3, 进而磷酸化 Akt 蛋白的 Thr308 位点, 促使 Akt 活化; 而活化的 Akt 发生磷酸化, 最终抑制下游靶基因 Caspase-3 的表达, 从而抑制细胞凋亡^[11-13]。马家驰等^[14]研究显示, 抑制 PI3K/Akt 通路活化能抑制结肠癌细胞增殖及转移。既往研究显示, 上调 *RasGRF1* 表达能促进 Ras-PI3K-Akt 通路活化, 参与肿瘤成纤维细胞增殖及分化^[15]。本研究结果显示, 与 NG 组、si-RasGRF1-NC 组比较, si-RasGRF1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量降低, Caspase-3 蛋白相对表达量升高, 说明抑制 *RasGRF1* 表达能抑制 DiFi 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 其作用可能是通过抑制 PI3K/Akt 通路活化来实现的。

综上所述, *RasGRF1* 在人结直肠癌 DiFi 细胞中异常高表达。抑制 *RasGRF1* 表达可能抑制 PI3K/Akt 通路活化, 从而抑制 DiFi 细胞增殖并诱导细胞凋亡。然而本实验未能明确 *RasGRF1* 对 PI3K/Akt 通路的具体调控作用, 后期应进行深入研究。

参考文献:

[1] SHAUKAT A, KALTENBACH T, DOMINITZ J A, et al.

- Endoscopic recognition and management strategies for malignant colorectal polyps: recommendations of the US multi-society task force on colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(5): 1916-1934.
- [2] LUO P, LIN A Q, ZHANG J, . Crosstalk between the MSI status and tumor microenvironment in colorectal cancer[J]. *Front Immunol*, 2020, 38(15): 2039-2045.
- [3] CHENG Y Y, AN Q, WANG J, et al. RasGRF1 participates in the protective effect of tanshinone IIA on depressive like behaviors of a chronic unpredictable mild stress induced mouse model[J]. *Gene*, 2020, 754(96): 144817-144822.
- [4] 何新, 胡晓梅, 黄文峰, 等. Ras 鸟嘌呤核苷酸交换因子 1 对人结直肠癌细胞增殖, 凋亡和细胞周期的影响[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(1): 30-34.
- [5] 隋华, 卫真真, 王子元, 等. 左金丸调控 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路对人大肠癌干细胞细胞耐药性的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2020, 54(S1): 137-141.
- [6] LIZARDO D Y, KUANG C, HAO S, et al. Immunotherapy efficacy on mismatch repair-deficient colorectal cancer: from bench to bedside[J]. *Bio Bio Acta Rev Cancer*, 2020, 1874(2): 188447-188452.
- [7] MEGURO A, YAMANE T, TAKEUCHI M, et al. Genome-wide association study in asians identifies novel loci for high myopia and highlights a nervous system role in its pathogenesis[J]. *Ophthalmology*, 2020, 127(12): 1612-1624.
- [8] 聂文静, 刘超, 李东风, 等. 在结直肠癌组织中高表达对肿瘤转移和不良预后的影响[J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2015, 36(2): 195-201.
- [9] LI Y L, WANG Y X, YU X, et al. Radix tetrastrigma inhibits the non-small cell lung cancer via Bax/Bcl-2/Caspase-9/Caspase-3 pathway[J]. *Nutr Cancer*, 2021, 14(16): 1-13.
- [10] VELU P, VIJAYALAKSHMI A, VINOTHKUMAR V. Syringic acid suppresses oral squamous cell carcinoma SCC131 cell proliferation via modulation of mitochondria-mediated apoptosis signaling pathways[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(12): e22586-e22592.
- [11] CHEN L, PEI H, LU S J, et al. SPOP suppresses osteosarcoma invasion via PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(3): 609-615.
- [12] HE M, ZHANG Y, XIE F, et al. Role of PI3K/Akt/NF- κ B and GSK-3 β pathways in the rat model of cardiopulmonary bypass-related lung injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(77): 747-754.
- [13] ZHANG B, ZHANG Y F, LI R, et al. miR-217 inhibits apoptosis of atherosclerotic endothelial cells via the TLR4/PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(24): 12867-12877.
- [14] 马家驰, 李渊, 李一平, 等. CXCL8 siRNA 通过 PI3K/Akt/NF- κ B 信号途径抑制结肠癌细胞的增殖和侵袭[J]. *肿瘤*, 2015, 35(6): 604-612.
- [15] LEANER V D, DONNINGER H, ELLIS C A, et al. p75-RasGRF1 is a c-Jun/AP-1 target protein: its up regulation results in increased Ras activity and is necessary for c-Jun-induced nonadherent growth of Rat1a cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(8): 3324-3331.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 王硕, 杨其贤, 殷旭薇, 等. RasGRF1 在结直肠癌细胞中的表达及其对癌细胞生物学行为的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(6): 44-48.

Cite this article as: WANG S, YANG Q X, YIN X W, et al. Expression of RasGRF1 in colorectal cancer cells and its effect on the cancer cell biological behavior[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(6): 44-48.