

RTN4 在胃癌发病机制中的作用

张超^{1,2}, 周业¹, 谢黎明³, 贺修胜¹, 张志伟¹

(1. 南华大学医学院肿瘤研究所肿瘤细胞与分子病理学湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学附属南华医院皮肤科, 湖南 衡阳 421001;

3. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 了解 RTN4 蛋白在胃癌发病过程中的作用, 为揭示胃癌发病的分子机制提供实验资料。方法 将 pIRESneo3-RTN4 真核表达载体转染胃粘膜上皮 GES1 细胞, 建立 RTN4 高表达的 GES1-RTN4 细胞系; 通过细胞生长曲线、平皿克隆与软琼脂集落形成实验、流式细胞仪, 观察 RTN4 高表达对 GES1 细胞生长与增殖、周期与凋亡的影响; 利用 Western-blot 检测 GES1-RTN4 细胞中 I κ B α 蛋白的表达。结果 GES1-RTN4 细胞的生长速度较 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞加快, 统计学意义显著 ($P < 0.01$); GES1-RTN4 细胞较 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞克隆体积大、数目多, 统计学意义显著 ($P < 0.01$); GES1-RTN4 细胞中 S 期细胞比例较 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞增加, 细胞增殖指数增加, 细胞凋亡率降低, 统计学意义显著 ($P < 0.01$); GES1-RTN4 细胞中 I κ B α 蛋白表达较 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞减少, 统计学意义显著 ($P < 0.01$)。结论 RTN4 通过活化 NF- κ B 信号通路, 提高细胞增殖指数, 抑制细胞凋亡, 促进 GES1 细胞的增殖。

关键词: GES1 细胞; RTN4 蛋白; 细胞增殖; NF- κ B 信号通路

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2018.22.016

文章编号: 1006-1959(2018)22-0055-05

The Role of RTN4 in the Pathogenesis of Gastric Carcinoma

ZHANG Chao^{1,2}, ZHOU Ye¹, XIE Li-min³, HE Xiu-sheng¹, ZHANG Zhi-wei¹

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Tumor Cell and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan, China;

2. Department of Dermatology, Nanhua Hospital, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan, China;

3. the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: Objective To investigate the role of RTN4 protein in the pathogenesis of gastric carcinoma and to provide experimental data for revealing the molecular mechanism of gastric carcinoma. Methods The pIRESneo3-RTN4 eukaryotic expression vector was transfected into gastric mucosal epithelial GES1 cells to establish a high expression of GES1-RTN4 cell line. The cell growth curve, plate clone and soft agar colony formation assay, flow cytometry, high RTN4 expression were observed. The effects of GES1 cell growth and proliferation, cycle and apoptosis were detected by Western-blot. The expression of I κ B α protein in GES1-RTN4 cells was detected by Western-blot. Results The growth rate of GES1-RTN4 cells was faster than that of GES1 and GES1-pIRESneo3 cells, which was statistically significant ($P < 0.01$). The GES1-RTN4 cells were larger and more numerous than GES1 and GES1-pIRESneo3 cells, the statistical significance was significant ($P < 0.01$); the proportion of S phase cells in GES1-RTN4 cells was higher than that of GES1 and GES1-pIRESneo3 cells, the cell proliferation index increased, and the apoptosis rate decreased, statistically significant ($P < 0.01$); The expression of I κ B α protein in GES1-RTN4 cells was significantly lower than that in GES1 and GES1-pIRESneo3 cells, statistically significant ($P < 0.01$). Conclusion RTN4 can increase the cell proliferation index, inhibit cell apoptosis and promote the proliferation of GES1 cells by activating NF- κ B signaling pathway.

Key words: GES1 cells; RTN4 protein; Cell proliferation; NF- κ B signaling pathway

胃癌(gastric carcinoma, GC)是我国常见的十大恶性肿瘤之一,其发病率与死亡率居第2位,消化道肿瘤的第1位^[1,2]。现今,胃癌在我国的发病率呈现逐年下降与年轻化的趋势,但仍然严重危害人们健康与生命^[3],其发病的分子机制仍不清楚。本课题组前期采用定量蛋白质组学技术鉴定了243个胃癌相关蛋白质,发现RTN4蛋白在胃粘膜癌变过程中表达上调^[4],但其在胃癌发病过程中的具体作用及机制仍不清楚,深入了解其在胃癌发病中的作用,将为阐明胃癌发病的分子机制提供理论依据。

基金项目:1.湖南省科技厅项目(编号:2015SK20203);2.湖南省研究生创新项目(编号: CX2016B478);3.南华大学博士科研启动基金(编号:2016XQD21)

作者简介:张超(1977.8-),男,江苏溧水人,硕士研究生,副主任医师,研究方向:恶性肿瘤发病机制及防治

通讯作者:张志伟(1973.12-),男,湖南安化人,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:恶性肿瘤发病机制及防治

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和质粒 永生化的胃粘膜上皮 GES1 细胞购自上海中国医学科学院细胞生物研究所,用 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基常规培养。pIRES-neo3-RTN4 真核表达载体购自长沙佳和生物科技有限公司。

1.1.2 引物 根据 RTN4 基因序列,采用 Premier 6.0 软件设计重组 RTN4 和 β -actin 内对照引物,由上海英骏生物技术有限公司合成 RTN4 引物 (5'-AAA-GATATCAAATATGGACTTGAA-3'; 5-AAAGGATC-CCTGACCCTCCC CCGTA-3', 大小 2961 bp) 与 β -actin 引物 (5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3'; 5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-3', 大小 498 bp)

1.1.3 主要试剂 高保真酶、T4 DNA Ligand merase、Reverse transcription system 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,限制性内切酶 HindIII 和 XhoI 购自 Fermentas 公司,一抗与二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞免疫荧光 将细胞以每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中,制作细胞爬片,固定、PBS 洗涤,1:1000 鼠抗人 RTN4 单抗 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤,1:2000 FITC 标记羊抗鼠二抗 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤,封片后荧光显微镜下观察。

1.2.2 Western-blot 检测 收集细胞,提取总蛋白质测定浓度,10%不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温孵育封闭,1:1000 鼠抗人 RTN4 或 I κ B α 单抗与 1:2000 抗 β -actin 单抗,4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜,1:1000 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗膜,发光、曝光、显影与定影。扫描蛋白质条带灰度分析,细胞中 RTN4 或 I κ B α 蛋白的表达。

1.2.3 MTT 比色法 将细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板中,每组设 3 个平行孔,培养 24 h,每孔加入 5 mg/ μ l MTT 20 μ l,培养 4 h,每孔加入 150 μ l DMSO,

溶解后置于酶标仪中,测定每孔的吸光度值(OD 值),重复检测细胞 1 次/d,每次重复 3 次,取平均值,将每次测量值与第 1 的测量值之商进行校正,代表检测细胞生长的测量值,连续重复 7 d,将校正测量值绘制于坐标纸上,绘制细胞的生长曲线。

1.2.4 平皿克隆形成实验 将细胞以每孔 1000 个细胞接种于 6 孔板中,每组设 3 个平行孔,静置培养 1 周后,固定、结晶紫染色,肉眼计数细胞形成的克隆数,或显微镜下计数 >50 个细胞的克隆数,计算克隆形成率:克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%。

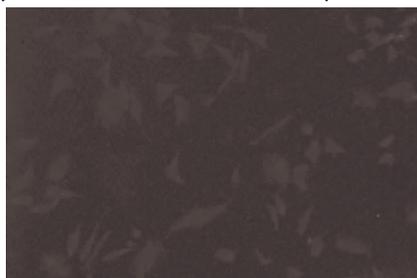
1.2.5 软琼脂集落形成实验 制备终浓度 0.6% 底层琼脂,冷却后;制备终浓度 0.3% 顶层琼脂(含细胞 1×10^4 个/孔),铺于底层琼脂上,每组细胞设 3 个平行孔,连续培养 2 周后。显微镜下观察集落(≥ 50 个细胞为一个集落)的数目和大小,每组随机选择 10 个不同的低倍视野,计数集落数,重复计数 3 次,取平均值,计算细胞集落形成率=集落数/接种细胞数×100%。

1.2.6 流式细胞仪(FCM)检测 收集细胞,调整密度为 1×10^6 个/ μ l,4 °C,70%乙醇固定,PBS 洗涤,含 RNA 酶 Tris-HCl 液 37 °C 孵育 30 min,加入 50 mg/L 碘化丙啶染色,送公司进行流式细胞仪检测,分析细胞周期与细胞的凋亡率,计算细胞增殖指数(PI)=(S+G₂)/(G₀/G₁+S+G₂)。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 *t* 检验,组间比较采用 *q* 检验,三组以上比较采用单因素方差分析(One way ANOVA),以 *P*<0.01 表示统计学意义显著。

2 结果

2.1 建立 RTN4 高表达的 GES1 细胞系 将 pIRES-neo3-RTN4 质粒(pIRESneo3 为对照载体)转染 GES1 细胞,G418 筛选后,建立 RTN4 稳定高表达 GES1 细胞(GES1-RTN4),免疫荧光与 Western-blot 检测 RTN4 表达,结果显示 GES1-RTN4 细胞中 RTN4 蛋白表达水平升高,见图 1、图 2。

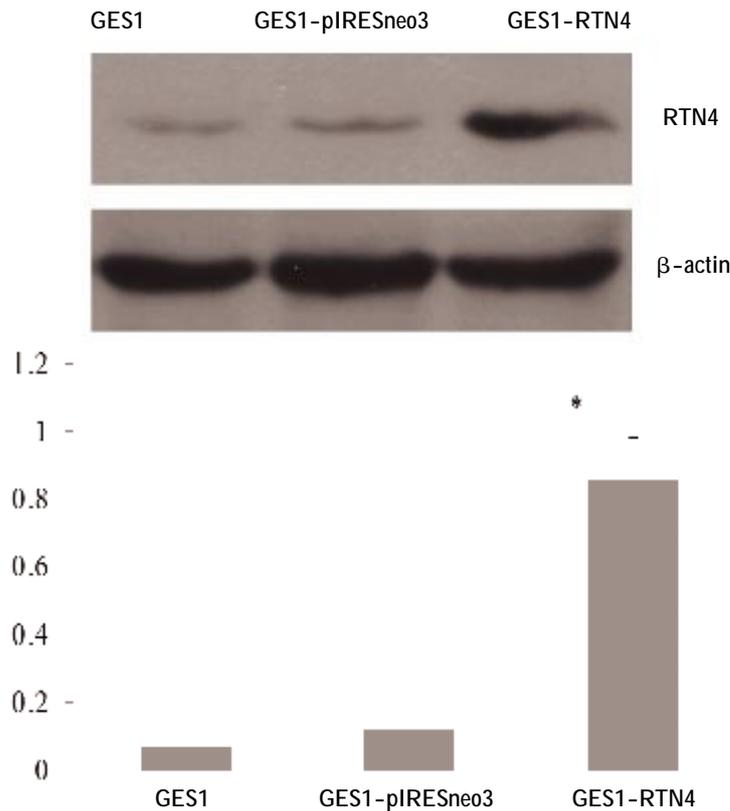


GES1-pIRESneo3 细胞



GES1-RTN4 细胞

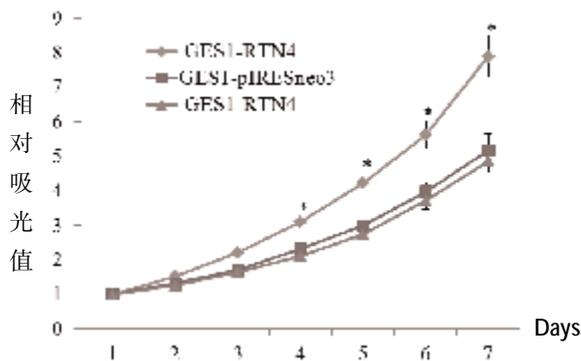
图 1 细胞免疫荧光观察 GES1-RTN4 细胞中 RTN4 蛋白的表达



注:与 GES1、GES1- pIRESneo3 细胞比较, * $P < 0.01$

图 2 Western-blot 检测 GES1-RTN4 细胞中 RTN4 蛋白的表达

2.2 RTN4 高表达对 GES1 细胞生长的影响 采用 MTT 法检测 GES1-RTN4 细胞的生长情况。结果显示, GES1-RTN4 细胞的生长速度显著快于 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞, 见图 3。提示 RTN4 高表达后 GES1 细胞生长加快, 增殖能力增强。



注:与 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞比较, * $P < 0.01$

图 3 GES1-RTN4 细胞的生长曲线

2.3 RTN4 高表达对 GES1 细胞克隆形成的影响 平皿克隆实验结果显示, GES1-RTN4 细胞形成的克隆数多, 克隆形成率明显高于 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞($P < 0.01$), 见表 1。提示 RTN4 高表达后, GES1 细胞增殖能力增强。

2.4 RTN4 高表达对 GES1 细胞集落形成的影响 软琼脂形成集落实验结果显示, GES1-RTN4 细胞形成

的集落较 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞大, 数目多, 集落形成率高($P < 0.01$), 见表 2。说明 RTN4 高表达后, GES1 细胞增殖能力增强。

表 1 RTN4 高表达对 GES1 细胞克隆形成的统计分析 ($\bar{x} \pm s, \%$)

细胞名称	克隆数	克隆形成率
GES1	56±8	5.60
GES1-pIRESneo3	65±12	65.00
GES1-RTN4	128±21	12.80*

注:与 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞比较, * $P < 0.01$

表 2 RTN4 高表达对 GES1 细胞集落形成的统计分析 ($\bar{x} \pm s, \%$)

细胞名称	集落数	集落形成率
GES1	64±12	0.64
GES1-pIRESneo3	72±16	0.72
GES1-RTN4	146±28	1.46*

注:与 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞比较, * $P < 0.01$

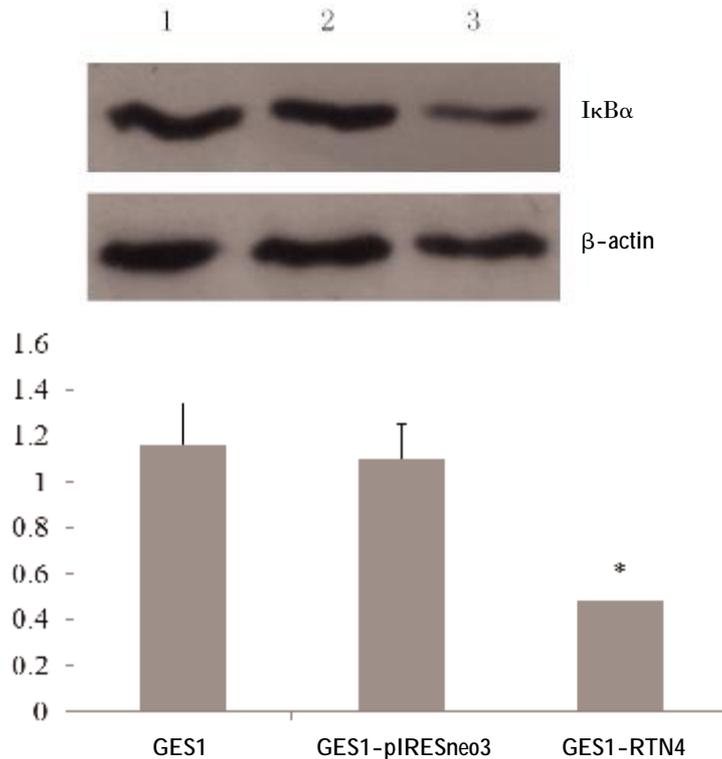
2.5 RTN4 高表达对 GES1 细胞周期分布的影响 流式细胞仪检测结果显示, GES1-RTN4 细胞群中 G_0/G_1 期较 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞减少, 而 S 期则增加, 细胞增殖指数增高($P < 0.01$), 见表 3。说明 RTN4 高表达后, 提高 GES1 细胞增殖指数而促进细胞的增殖。

2.6 RTN4 高表达对 GES1 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果显示, GES1-RTN4 细胞的凋亡率 (17.52 ± 1.23) 低于 GES1 (24.65 ± 4.58) 和 GES1-pIRESneo3 (24.43 ± 3.36) 细胞 ($P < 0.01$)。说明 RTN4 高表达后抑制 GES1 细胞的凋亡。

表 3 流式细胞仪检测 RTN4 高表达对 GES1 细胞周期分布的统计分析 ($\bar{x} \pm s, \%$)

细胞名称	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	增殖指数 (PI)
GES1	49.57±8.49	4.80±1.28	45.63±4.62	50.43
GES1-pIRESneo3	48.75±7.86	21.15±4.84	30.10±6.28	51.25
GES1-RTN4	26.88±3.42	17.85±4.16	55.28±9.15	73.13*

注:与 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞比较, * $P < 0.01$



注:与 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞比较, * $P < 0.01$

图 4 Western blot 检测 RTN4 高表达对 NF-κB 信号通路的影响

3 讨论

胃癌的发生与遗传因素密不可分, 涉及癌基因的激活与抑癌基因的失活^[9], 如 C-met 基因、K-sam 基因、C-erbB2 基因、K-ras 基因、C-myc 基因、p53 基因、p27 基因和 p16 基因等。分子遗传学变化与病理学特征、胃癌生物学行为及患者预后间关系十分密切。了解相关基因调节分子的机制, 可为阐明胃癌的发病机理, 临床诊断与治疗等提供十分有利证据。

RTN4 蛋白在中枢神经系统、胰腺、肾脏、骨骼肌、肺、肝与胃肠道等组织广泛表达。有研究证实在肝癌组织中, 低氧可诱导 RTN4 高表达, 促进血管生成, 加速瘤体生长^[6]。缺氧微环境能够促进缺氧诱导

2.7 Western blot 检测 RTN4 高表达对 NF-κB 信号通路的影响 GES1-RTN4 细胞中 IκBα 蛋白的表达明显低于 GES1 和 GES1-pIRESneo3 细胞 ($P < 0.01$), 见图 4。说明 RTN4 高表达后可以诱导 GES1 细胞中 NF-κB 信号通路的活化。

因子 HIF-1α 和 AP-1 因子产生, 促血管生成因子 RTN4 表达增加, 导致肿瘤组织血管生成, 加速肿瘤生长^[7]。也有研究证实 RTN4 在胃癌组织中呈现高表达, 其表达较癌旁对照组织明显升高, 结果提示该蛋白在肿瘤中可能发挥促进肿瘤细胞增殖的作用^[8]。本研究发现 RTN4 高表达后, GES1 细胞的增殖能力增加, 增殖指数升高, 细胞凋亡率降低, 提示其可能具有一定的促进细胞恶变的功能。

核因子 κB (NF-κB) 信号通路在细胞中作用重要, 控制调节增殖、细胞凋亡逃避和血管生成等, 其活性受 IκBs 抑制蛋白调节^[9,10]。NF-κB 与 IκBs 蛋白相互结合后遮蔽核转位信号区, NF-κB 位于细胞内

不能入核,抑制其转录活性^[11]。I κ B α 是 I κ BS 中研究最多者,其在细胞内通过快速磷酸化或降解后,使 NF- κ B 分离后入核,发挥转录活性,调节相关基因的表达^[12]。本文发现 RTN4 蛋白在 GES1 细胞中高表达后,细胞增殖能力增强,且 I κ B α 蛋白表达降低,提示 RTN4 在 GES1 细胞内可能通过促进 NF- κ B 信号通路活化,抑制细胞凋亡,提高细胞增殖指数,诱导细胞增殖。因细胞内 NF- κ B 信号通路调节机制复杂,RTN4 如何具体参与 NF- κ B 信号通路的活化仍有待深入研究。

综上所述,本文初步发现 RTN4 高表达后可促进 GES1 细胞增殖,抑制细胞凋亡,其可能启动了 NF- κ B 信号通路的活化,为进一步研究 RTN4 在 GES1 细胞增殖中的作用及机制提供了思路,也为阐明胃癌发病的分子机制提供了理论依据。

参考文献:

- [1]Sitarz R,Skierucha M,Mielko J,et al.Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment[J].Cancer Manag Res,2018(10):239-248.
- [2]Chen W,Zheng R,Baade PD,et al.Cancer statistics in China, 2015[J].CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [3]Wang Y,Zhao X,Song Y,et al.A systematic review and meta-analysis of robot-assisted versus laparoscopically assisted gastrectomy for gastric cancer [J].Medicine (Baltimore). 2017,96(48): e8797.
- [4]张志伟.胃粘膜上皮癌变相关蛋白质分子的筛选与鉴定[D].南华大学,2015.
- [5]Figueiredo C,Camargo MC, Leite M, et al. Pathogenesis of Gastric Cancer: Genetics and Molecular Classification [J]. Curr Top Microbiol Immunol,2017(400):277-304.
- [6]Wang N,Chen K,Xu J,et al.Association of CAA and TATC Insertion/Deletion Genetic Polymorphisms in RTN4 3'-UTR with Hepatocellular Carcinoma Risk [J].Pathol Oncol Res, 2018,24(1):31-34.
- [7]Babur O,Ngo ATP,Rigg RA,et al.Platelet procoagulant phenotype is modulated by a p38 -MK2 axis regulating RTN4/Nogo proximal to the endoplasmic reticulum: utility of pathway analysis[J].Am J Physiol Cell Physiol,2018,314(5):C603-C615.
- [8]Chi C,Liu N,Yue L,et al.RTN4/Nogo is an independent prognostic marker for gastric cancer: preliminary results [J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2015,19(2):241-246.
- [9]Colomer C,Marruecos L,Vert A,et al.NF- κ B Members Left Home: NF- κ B-Independent Roles in Cancer [J].Biomedicines, 2017,5(2):E26.
- [10]Soubannier V,Stifani S.NF- κ B Signalling in Glioblastoma[J]. Biomedicines,2017,5(2):E29.
- [11]Ziembik MA,Bender TP,Larner JM,et al.Functions of protein phosphatase -6 in NF- κ B signaling and in lymphocytes[J]. Biochem Soc Trans,2017,45(3):693-701.
- [12]Yu L,Li L,Medeiros LJ,et al.NF- κ B signaling pathway and its potential as a target for therapy in lymphoid neoplasms[J]. Blood Rev,2017,31(2):77-92.

收稿日期:2018-8-20;修回日期:2018-9-7

编辑/肖婷婷