

班汝波,杨婕琳,王晓媛,等. RANBP9 调控 TGF- β 诱导结肠癌 Colo320 细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(7): 39-47.

Ban RB, Yang JL, Wang XY, et al. Ran-binding protein 9 targets transforming growth factor- β 1 expression and induces cell apoptosis in colorectal cancer Colo320 cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 39-47.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.005

RANBP9 调控 TGF- β 诱导结肠癌 Colo320 细胞凋亡的机制研究

班汝波¹, 杨婕琳², 王晓媛², 武雪亮^{1*}, 路永刚³

(1.普通外科,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000;2.消化内科,河北北方学院附属第一医院,河北 张家口 075000;3.实验室,河北省人民医院,河北 石家庄 050000)

【摘要】 目的 探讨 Ran 蛋白微管组织中心结合蛋白(RANBP9)靶向调控转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 的表达,及其对结直肠癌 Colo320 细胞凋亡的影响。**方法** 分析 TCGA 数据库中 625 例结肠癌组织以及 20 例正常结肠组织中 RANBP9 的表达数据, KMPLLOT 分析 RANBP9 的表达与结肠癌患者生存期的关系。人类蛋白免疫组化数据库分析 TGF- β 1 在正常结肠组织和结肠癌组织中的表达情况,使用 UALCAN 数据库分析 TGF- β 1 的表达与结肠癌患者生存期的关系。双荧光素酶实验分析 RANBP9 和 TGF- β 1 的关系。将 pcDNA3.1-GFP-RANBP9 和 pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC 分别转染至实验组和对照组细胞中,转染完成后细胞常规培养,另设立正常组细胞,不经过转染操作,常规培养;噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法检测各组细胞的生长活力,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率, JC-1 染色检测各组细胞的线粒体膜电位, Western blot 检测各组细胞中 RANBP9 和 TGF- β 1 的表达。**结果** RANBP9 在结肠癌组织中的表达明显降低,与 RANBP9 表达低的患者相比, RANBP9 高表达的结肠癌患者具有较高的生存期曲线, TGF- β 1 在结肠癌组织的表达明显升高,与 TGF- β 1 表达高的患者相比, TGF- β 1 低表达的患者具有较高的生存期曲线,差异均具有统计意义($P < 0.05$)。在结肠癌中, RANBP9 能靶向调控 TGF- β 1 的表达。与正常组细胞相比,实验组细胞的生长活力、线粒体的膜电位、TGF- β 1 的表达明显下调,细胞的凋亡率和 RANBP9 的表达明显升高,差异均具有统计意义($P < 0.05$)。**结论** RANBP9 能靶向调控 TGF- β 1 的表达,促使结肠癌细胞 Colo320 的生长活力和线粒体膜电位下降,诱导其凋亡。

【关键词】 Ran 蛋白微管组织中心结合蛋白;转化生长因子 β 1;结直肠癌;细胞凋亡

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 07-0039-09

Ran-binding protein 9 targets transforming growth factor- β 1 expression and induces cell apoptosis in colorectal cancer Colo320 cells

BAN Rubo¹, YANG Jielin², WANG Xiaoyuan², WU Xueliang^{1*}, LU Yonggang³

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China.

2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000.

3. Laboratory, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050000)

【基金项目】 河北省科技厅重点研发计划项目(2237784D);2020 张家口市级科技计划自筹经费项目(2021050D)。

【作者简介】 班汝波(1994—),男,硕士,住院医师,研究方向:消化道肿瘤的基础与临床研究。E-mail:15369305892@163.com

【通信作者】 武雪亮(1984—),男,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,研究方向:消化道肿瘤的基础研究与临床诊疗。

E-mail:wxlwk@163.com

[Abstract] Objective To investigate the targeting of transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) expression by Ran-binding protein 9 (RANBP9) and its effect on colorectal cancer Colo320 cell apoptosis. **Methods** Gene expression levels of *RANBP9* were analyzed in 625 colon cancer tissues and 20 normal colon tissues in The Cancer Genome Atlas database. The relationship between *RANBP9* expression and survival time of patients with colon cancer was analyzed using KMPLLOT. The expression of TGF- $\beta 1$ in normal colon tissues and colon cancer tissues was analyzed using the human protein immunohistochemistry database and the relationship between *TGF- $\beta 1$* expression and the survival of patients with colon cancer was analyzed using the UALCAN database. The relationship between *RANBP9* and *TGF- $\beta 1$* was analyzed by dual luciferase experiments. Colo320 cells were transfected with pcDNA3.1-GFP-RANBP9 and control pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC plasmids, respectively, and normal control cells were established without transfection. The cells were cultured and the growth viability of each group of cells was detected by the iazolyl blue tetrazolium bromide method, apoptosis was detected by flow cytometry, the mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining, and RANBP9 and TGF- $\beta 1$ protein expression were detected by Western blot. **Results** *RANBP9* expression was significantly reduced in colon cancer tissues. Compared with patients with low *RANBP9* expression, patients with high *RANBP9* expression had a higher survival curve and significantly higher expression of *TGF- $\beta 1$* in colon cancer tissue. Compared with patients with high *TGF- $\beta 1$* expression, patients with low *TGF- $\beta 1$* expression had a significantly higher survival curve ($P < 0.05$). *RANBP9* targeted the expression of *TGF- $\beta 1$* in colon cancer. Compared with the normal group, cell growth, mitochondrial membrane potential, and TGF- $\beta 1$ expression were all significantly down-regulated and the apoptosis rate and RANBP9 expression were significantly increased in the experiment group ($P < 0.05$). **Conclusions** RANBP9 can target the expression of TGF- $\beta 1$, promote the growth of Colo320 colon cancer cells, decrease the mitochondrial membrane potential, and induce apoptosis.

[Keywords] Ran-binding protein 9; transforming growth factor- $\beta 1$; colorectal cancer; apoptosis
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,是全球癌症死亡的第四大主要原因,其发病率随着社会经济 的进展、饮食结构的调整而逐年升高,并且其发病年龄趋于年轻。由于起病隐匿,早期尚无特异性的临床症状,大多数患者确诊时已错过最佳手术切除治疗时机,加上该病极易复发,诊断以及治疗费用高^[1],给患者的家庭带来沉重的负担,不利于社会公共健康卫生事业的可持续发展。研究显示下调肿瘤细胞的无限恶性增殖活性是结肠癌干预治疗的关键事件^[2]。如何降低癌细胞的增殖活力,诱导其凋亡成为众多学者研究的重点。已有的研究显示血管紧张素转化酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)、内质网活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)、神经纤毛蛋白 2 (neuropilin-2, NRP-2) 等众多基因参与调控结肠癌细胞的凋亡过程^[3]。但是由于结肠癌细胞凋亡的分子机制尚未完全阐明,仍需更为深入、系统的研究。Ran 蛋白微管组织中心结合蛋白 (Ran-binding protein in microtubule-organization center, RanBPM) 是新近发现的在多种组织和细胞中都有表达的由脯氨酸和谷氨酰胺构成的小分子蛋白质,研究显示 RanBPM 与不同基因的蛋白相结合,具有调控细胞

增殖、分化、粘附、运动、凋亡、衰老等生物活性的效用,存在与转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 等多种基因发生特异性结合的结构域,又被称为 RANBP9^[4]。郭栢枫等^[5] 研究显示 RANBP9 在骨肉瘤组织中的表达降低,增强 RANBP9 的表达后,骨肉瘤细胞 SaOS2 的凋亡率明显升高。但是有关 RANBP9 在结肠癌中的作用的报道较少。国内外众多研究数据显示 TGF- $\beta 1$ 信号参与结肠癌细胞的增殖与凋亡等生理过程^[6]。本研究通过研究 RANBP9 和 TGF- $\beta 1$ 在结肠癌组织的表达,从 TGF- $\beta 1$ 信号入手,探讨 RANBP9 对结肠癌细胞 Colo320 凋亡的机制,以期 为结肠癌的临床治疗拓展新的方向。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

BALB/c 裸鼠,4~5 周龄,SPF 级,(20±2)g,雄性,30 只,由中国科学院上海药物研究所提供 [SCXK(沪)2020-0005],饲养在河北北方学院动物房中 [SYXK(冀)2019-004],温度保持在 22℃左右,湿度(40±10)%,进行适应性喂养后用于实验,

实验动物的操作经河北北方学院附属第一医院动物伦理委员会批准(IACUC-2020-05073BN-001),在实验操作过程中,遵循 3R 原则,给与动物人道关怀,尽量减轻动物的痛苦。

1.1.2 细胞

封存在标准液氮中的结直肠癌 Colo320 细胞株由北纳创联生物(北京)技术研究院提供。pcDNA3.1-GFP-RANBP9 和 pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC 由上海吉玛生物制药有限公司提供。

1.2 主要试剂与仪器

兔抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 批号 GJH-LR01)、RANBP9(批号 GJH-YB98)和 TGF- β 1(批号 GJH-HC37)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)试剂盒(批号 62574)、二甲苯(批号 37256)、中性树脂(批号 27539)、Western blot 试剂盒(批号 73691)(武汉聚合美生物科技有限公司);双荧光素酶试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 85-EV-96);线粒体膜电位分析试剂盒 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物(1,1',3,3'-tetraethyl-5,5',6,6'-tetrachloroimidacarbocyanin iodide, JC-1)染色试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号 37-AF-83);转染试剂 Lipofectamine™ 2000(美国 CST 公司,批号 8763-4MT-001)。台式离心机(浙江研特科学仪器有限公司,型号 YT-LX2800);恒温 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司,型号 1501 型);全自动凝胶成像系统(上海巴玖实业有限公司,型号 JS-2000);垂直电泳槽(上海达洛科学仪器有限公司,型号 JY-SCZ2)。

1.3 实验方法

1.3.1 RANBP9 和 TGF- β 1 在结肠癌中的表达

提取癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)中 625 例结肠癌组织以及 20 例正常结肠组织差异表达的基因的表达数据,利用 R 软件对其进行 MicroRNA 阵列分析,绘制基因热图;同时使用 KMPlot (<https://kmplot.com/analysis/>)分析 RANBP9(基因)的表达与结肠癌患者生存期的关系。在人类蛋白免疫组化(the human protein atlas, HPA)数据库(<https://www.proteinatlas.org>)检索 TGF- β 1 蛋白在正常结肠组织和结肠癌组织中的表达情况,使用 UALCAN 数据库(<http://ualcan.path>

[uab.edu/index.html](http://ualcan.path))分析 TGF- β 1 的表达与结肠癌患者生存期的关系^[7]。同时运用 ENCORI 数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn>)统计分析在结肠癌中 RANBP9 和 TGF- β 1 的表达的关系。

同时选取封存在河北北方学院附属第一医院病理研究室的 102 例结肠癌组织和对应的癌旁组织,样本时限与本研究同步,年龄 28~73(42.38±9.56)岁,男 65 例,女 37 例,所有样本均为原发性结肠癌,并经病理检测确诊。经统计分析样本在年龄、性别方面的差异不具有统计学意义($P>0.05$)。本研究已获得患者或其直系家属的知情同意书,且经河北北方学院附属第一医院伦理委员会批准(2020-003-THB-01)。将样本经 PCR 分析检测临床样本中 RANBP9 和 TGF- β 1 的表达。

1.3.2 双荧光素酶实验

从 GENEMANIA 数据库(<http://genemania.org/>)查询 RANBP9 和 TGF- β 1 的相互作用关系;然后按双荧光素酶试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司)要求构建 TGF- β 1 突变型(pGL3-TGF- β 1-3-UTR-MUT)和 TGF- β 1 野生型(pGL3-TGF- β 1-3-UTR-WT)两种质粒,在 Lipofectamine™ 2000 的辅助下,pGL3-TGF- β 1-3-UTR-MUT 和 pGL3-TGF- β 1-3-UTR-WT 分别与 RANBP9 mimic、RANBP9 mimic-NC 进行共转染操作,待细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48 h 后,以双荧光素酶报告试剂盒检测荧光素酶强度。

1.3.3 细胞转染和分组

将封存的 Colo320 细胞复苏后接种在 RPMI 1640 培养基上,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养,取对数生长期的细胞进行转染,根据转染试剂 Lipofectamine™ 2000(美国 CST 公司)的说明书要求将 pcDNA3.1-GFP-RANBP9 和 pcDNA3.1-GFP-RANBP9-NC 分别转染至实验组和对照组细胞中,转染完成后细胞常规培养,另设立正常组细胞,不经过转染操作,常规培养。

1.3.4 MTT 法检测各组的细胞生长活力

调整 Colo320 细胞的浓度至 1×10^5 /孔,并接种在 96 孔板中,分组处理同上,每组设 8 个复孔,1501 型恒温 CO₂ 细胞培养箱中设定(37℃、5% CO₂)培养 24 h,每孔加入 20 μ L 的 0.5% MTT 反应液,室温下孵育 6 h、12 h、18 h、24 h,弃掉上清液,检测各组细胞在 450 nm 处的吸光光度值 A;按照 $A_{\text{实验孔}}/A_{\text{对照孔}} \times 100\%$ 计算各组细胞的生长活力。

1.3.5 电镜观察各组细胞的超微结构改变

调整 Colo320 细胞的浓度至 5×10^5 /孔,并接种在 24 孔培养板中,分组处理同上,每组设定 8 个复孔,在 37°C ,5% CO_2 条件下培养 24 h,培养基清洗细胞 2 次,每次 3 min,离心后,依次以戊二醛、锇酸固定,磷酸盐缓冲液清洗后,脱水,中性树脂包埋,切片,铀-铅双染色,镜检。

1.3.6 流式细胞术检测各组细胞凋亡率的变化

调整 Colo320 细胞的浓度至 1×10^6 /孔,并接种在 6 孔培养板中,分组处理同上,每组设定 8 个复孔,在 37°C ,5% CO_2 条件下培养 24 h,以 5 μL Annexin V-FITC 重悬细胞,加入 5 μL 碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液,室温下,避光孵育 15 min,流式细胞仪检测。晚期凋亡细胞和死亡细胞在流式细胞分析图上为右上区位置,早期凋亡细胞在流式细胞分析图上为右下区位置。

1.3.7 JC-1 染色检测各组细胞的线粒体膜电位

调整 Colo320 细胞的浓度至 6×10^5 /孔,并接种于 6 孔培养板中,分组处理同上,每组设定 8 个复孔,1501 型恒温 CO_2 细胞培养箱中设定(37°C ,5% CO_2)培养 24 h 后,弃去培养液,每孔加入 JC-1 工作液,孵育 2 h,封片,镜检,细胞线粒体膜电位的变化通过红色荧光和绿色荧光的比值来表示。

1.3.8 裸鼠模型检测各组细胞的体内生长

调整 Colo320 细胞的浓度至 1×10^6 /孔,并接种于 6 孔培养板中,分组处理同 1.3.5,置于 37°C ,5% CO_2 的细胞培养箱 24 h 后,将 30 只 BALB/c 裸鼠随机分为正常组、对照组、实验组,每组 10 只,以微量上样器将各组细胞分别注射到 BALB/c 裸鼠体内,3 天后可观察到原位肿瘤,2 周后处死裸鼠,收集各组小鼠的肿瘤组织,称重。

1.3.9 蛋白质免疫印迹检测各组细胞中 RANBP9、TGF- β 1 的表达

调整 Colo320 细胞的浓度至 3×10^5 /孔接种在 6 孔培养板中,分组处理同 1.3.5,每组设定 8 个复孔,置于 37°C ,5% CO_2 的细胞培养箱 24 h 后,按试剂盒要求进行洗涤、提取总蛋白,上样,电泳,转膜,封闭,加入一抗(RANBP9,TGF- β 1,GAPDH)(1:500),孕育 1 h,以 1:1500 的二抗稀释,3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)显色,复染,水洗,梯度乙醇脱水,透明,封片,将目的蛋白与 GAPDH 的灰度进行比较。

1.4 统计学方法

统计分析通过 SPSS 19.0 软件进行,所有数据

符合正态分布检验,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示,采用 LSD- t 检验进行分析,当 $P < 0.05$,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RANBP9 和 TGF- β 1 在结肠癌中的表达

采用 R 软件将 TCGA 数据库中差异表达的基因绘制成热图,结果显示,RANBP9 在结肠癌组织中的表达明显降低,见图 1A;KMPLLOT 生存分析显示,与 RANBP9 表达低的患者相比,RANBP9 高表达的结肠癌患者具有较高的生存期曲线,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1B;从人类蛋白质组化数据库进行分析结果显示,TGF- β 1 在结肠癌组织的表达明显升高,见图 1C;UALCAN 生存分析显示,与 TGF- β 1 表达高的患者相比,TGF- β 1 低表达的患者具有较高的生存期曲线,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1D;使用 ENCORI 数据库对 RANBP9 和 TGF- β 1 在结肠癌组织进行共表达分析,结果显示,在结肠癌中 RANBP9 和 TGF- β 1 表达呈现明显的负相关($r = -0.752$, $P < 0.05$),见图 1E。

经 PCR 分析结果显示,在临床组织样本中,与癌旁正常组织相比,RANBP9 的 mRNA 在结肠癌组织中的表达明显降低,TGF- β 1 的 mRNA 在结肠癌组织的表达明显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1F。

2.2 双荧光素酶实验

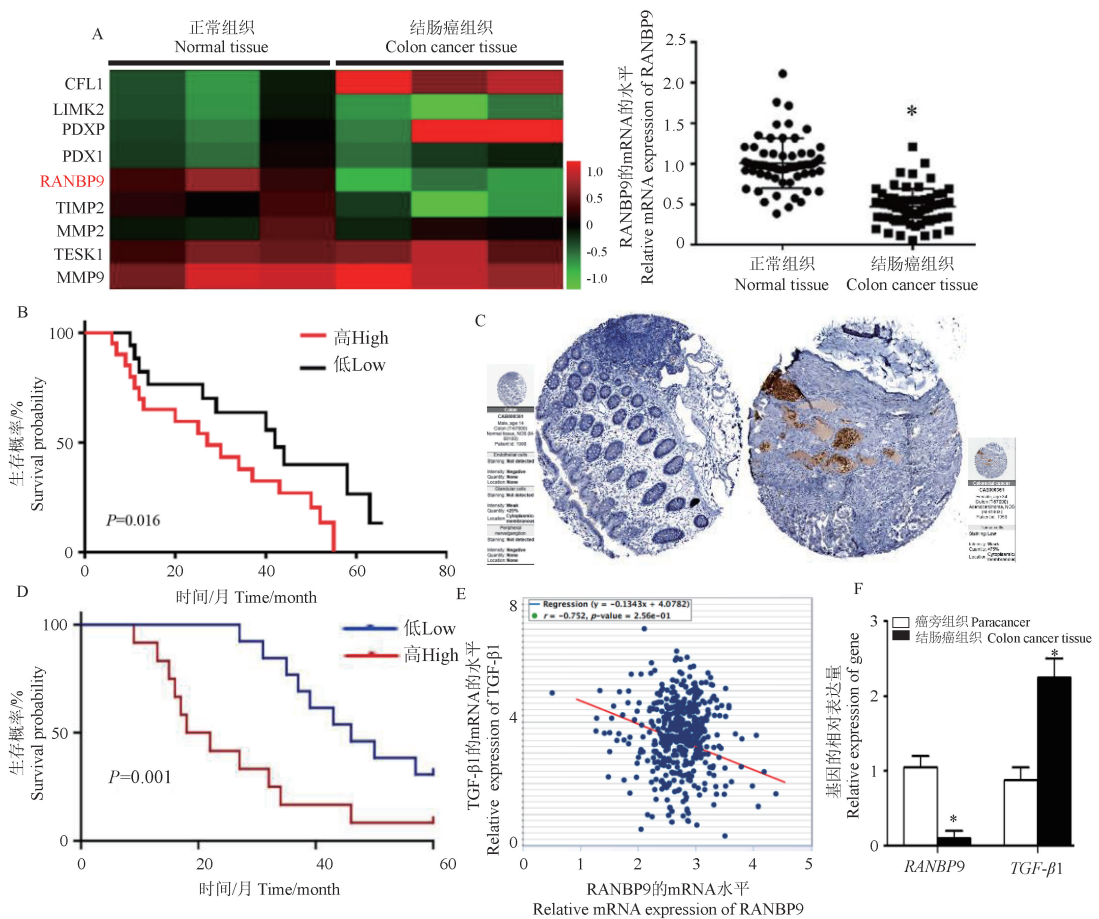
从 GENEMANIA 数据库中研究发现 RANBP9 与 TGF- β 1 存在特异性的调控关系,见图 2A。推测 RANBP9 的作用位点可能为 TGF- β 1。进行双荧光素酶实验,结果显示,过表达 RANBP9 后,TGF- β 1 野生型的荧光素酶活性呈现出明显下降的趋势($P < 0.05$),TGF- β 1 突变型的荧光素酶活性却无明显变化($P > 0.05$),说明 RANBP9 能靶向调控 TGF- β 1 的表达,见图 2B。

2.3 MTT 法检测各组的细胞生长活力

经 MTT 试剂盒检测后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞的生长活力出现了明显下降的趋势($P < 0.05$),对照组与正常组相比,差异不具有统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

2.4 各组细胞超微结构变化

电镜下观察各组细胞的超微结果显示,正常组细胞的胞膜清晰,结构完整,未见扩张、凹陷等异常

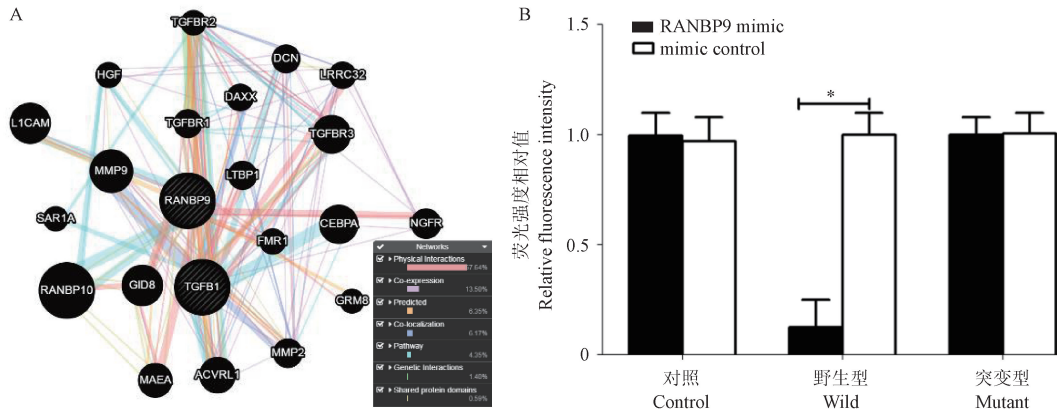


注:A:TCCA 中结肠癌差异表达基因的热图以及 *RANBP9* 的表达,与正常结肠组织相比, * $P<0.05$;B:*RANBP9* 的表达对结肠癌患者生存期的影响;C:HPA 中 *TGF-β1* 在结肠癌组织中的表达;D:*TGF-β1* 的表达对结肠癌患者生存期的影响;E:结肠癌组织中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 的共表达分析;F:临床样本中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 的表达。

图 1 结肠癌中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 的表达

Note. A, Heatmap of differentially expressed genes in colon cancer and the expression of *RANBP9* in TCCA, compared with normal colon tissue, * $P<0.05$. B, Impact of *RANBP9* expression on the survival of colon cancer patients. C, Expression of *TGF-β1* in colon cancer in HPA. D, Impact of the expression of *TGF-β1* on the survival of colon cancer patients. E, Co-expression analysis of *RANBP9* and *TGF-β1* in colon cancer tissue. F, Expression of *RANBP9* and *TGF-β1* in clinical samples.

Figure 1 Expression of *RANBP9* and *TGF-β1* in colon cancer



注:A:*RANBP9* 和 *TGF-β1* 的作用网络;B:双荧光素酶实验结果。与 mimic control 相比, * $P<0.05$ 。

图 2 *RANBP9* 靶向调控 *TGF-β1* 的表达

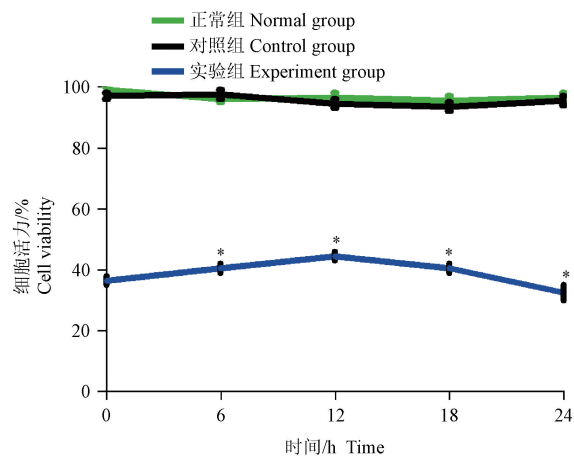
Note. A, Action network of *RANBP9* and *TGF-β1*. B, Experimental results of double luciferase. Compared with mimic control, * $P<0.05$.

Figure 2 *RANBP9* regulated the expression of *TGF-β1*

现象,胞浆中的线粒体数量丰富,线粒体双侧膜结构性态无明显病变,嵴结构完整,核膜完整,染色质性态未见异常;对照组细胞与正常组细胞的超微结构未见明显差异,线粒体以及其他细胞器的结构清晰可辨,无肿胀、断裂现象;实验组细胞的胞膜凹陷、缺失明显,线粒体肿胀明显,双层膜结构明显扩张,空泡样变性严重,嵴结构或变形,或缺失,或断裂,线粒体的基膜已失去清晰的界限,数量明显减少,见图 4。

2.5 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率

经流式细胞仪检测后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞的凋亡率出现了明显升高的趋势($P<0.05$),对照组 Colo320 细胞与正常组 Colo320 细胞的凋亡率相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 5。



注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。
图 3 各组细胞的生长活力
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 3 Growth activity of cells in each group

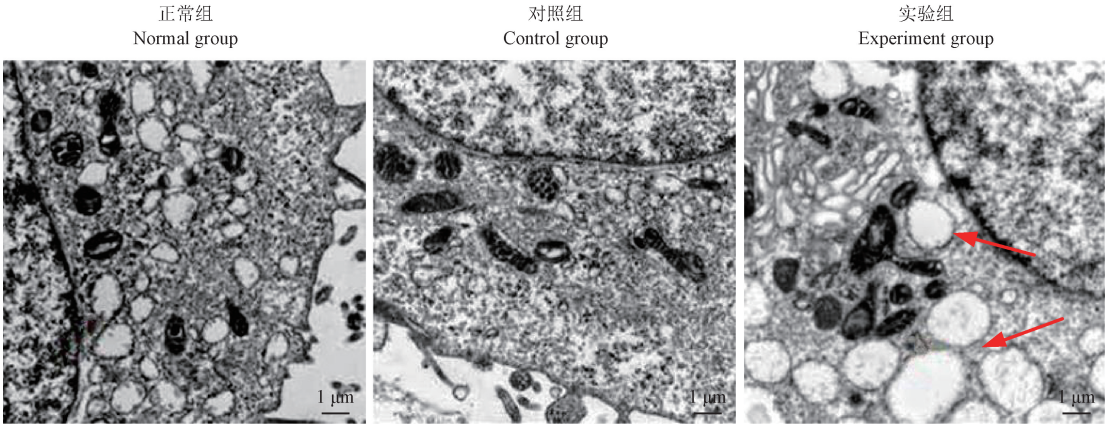
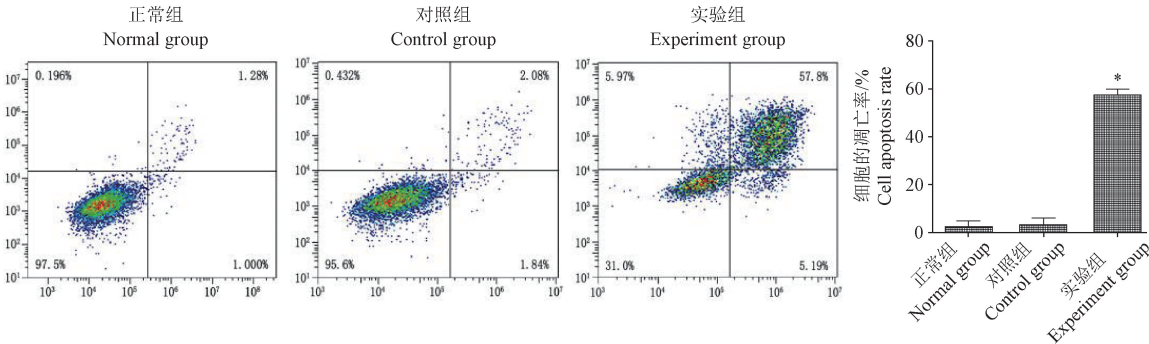


图 4 各组细胞的超微结构(红色箭头即为肿胀的线粒体)
Figure 4 Ultrastructure of cells in each group (the red arrow was the swollen mitochondria)



注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

图 5 各组细胞的凋亡率
Figure 5 Cell apoptosis rate of cells in each group

2.6 JC-1 染色检测各组细胞的线粒体膜电位

经 JC-1 染色试剂盒后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞中红色荧光与绿色荧光的比值出现了明显下降的趋势,Colo320 细胞的线粒体膜电位明显下降($P<0.05$)。对照组 Colo320 细胞与正常组 Colo320 细胞的线粒体膜电位相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 6。

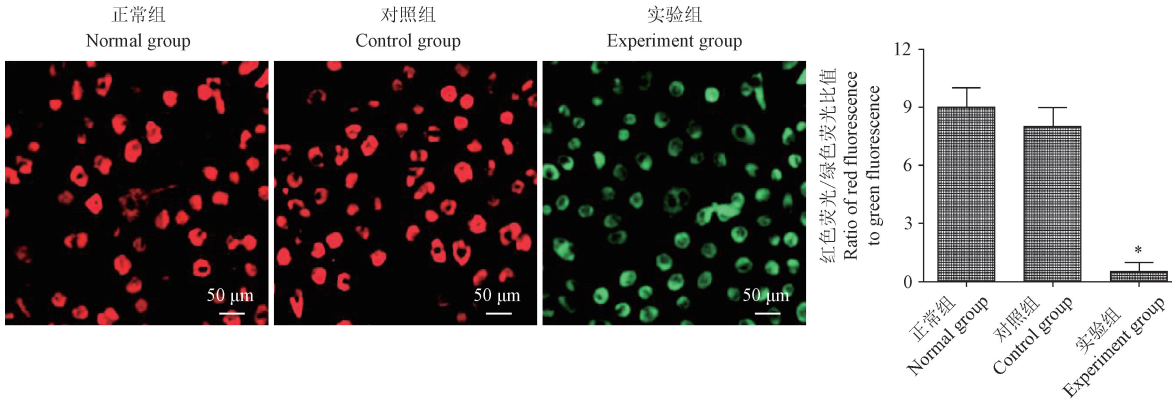
2.7 裸鼠实验模型

Colo320 细胞在动物体内生长后,与正常组 Colo320 细胞的瘤体组织相比,实验组 Colo320 细胞的瘤体质量出现了明显下降的趋势,Colo320 细胞体内生长的能力明显下降,差异具有统计学意义($P<$

0.05);正常组实验动物与对照组实验动物的肿瘤组织的质量相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 7。

2.8 各组细胞中 RANBP9、TGF- β 1 的表达

各组细胞经 Western blot 实验后,与正常组 Colo320 细胞相比,实验组 Colo320 细胞中 RANBP9 的表达呈现明显升高的趋势,TGF- β 1 的表达呈现明显下降的趋势,差异均具有统计学意义($P<0.05$),正常组 Colo320 细胞与对照组 Colo320 细胞中 RANBP9、TGF- β 1 的表达相比,差异不具有统计学意义($P>0.05$),见图 8。

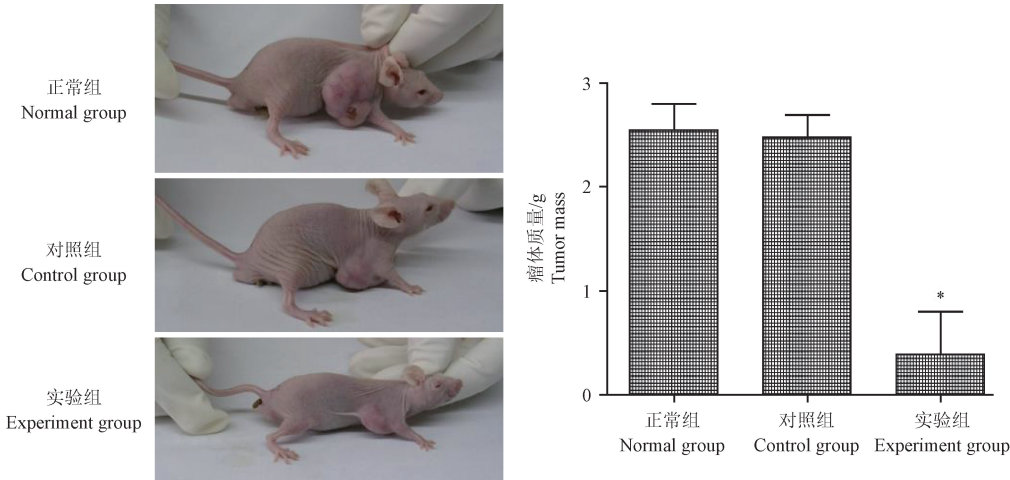


注:与正常组相比,* $P<0.05$ 。

图 6 各组细胞的线粒体膜电位(JC-1 染色)

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 6 Mitochondrial membrane potential of cells in each group (JC-1 staining)

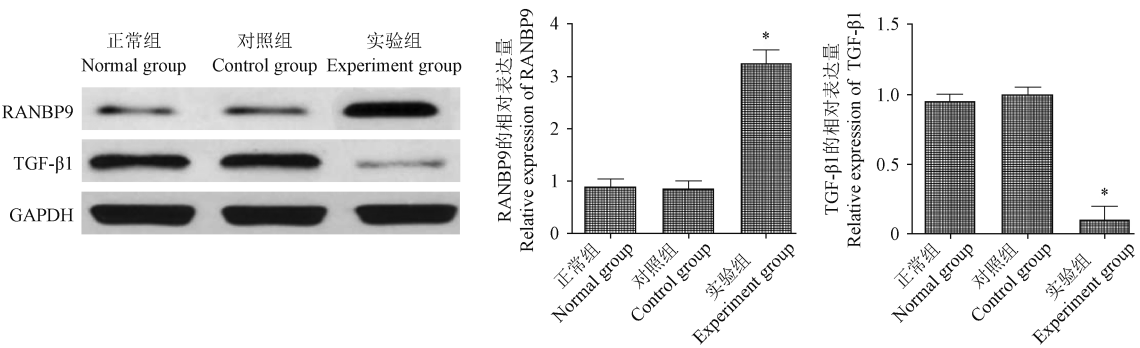


注:与正常组相比,* $P<0.05$ 。

图 7 裸鼠成瘤以及瘤体质量的比较

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 7 Comparison of tumor formation and tumor quality in nude mice



注:与正常组相比, * $P<0.05$ 。

图 8 各组细胞中 RANBP9 和 TGF-β1 的表达

Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$.

Figure 8 Expression of RANBP9 and TGF-β1 in each group of cells

3 讨论

据相关数据统计,至 2030 年将全球将有 220 万确诊结肠癌病例,因缺乏可靠而有效的治疗措施,并且肿瘤细胞对放化疗耐药机制的增强,将有近一半的患者会失去生命,在一些不发达的国家或者地区,结肠癌的形势更为严峻^[8]。因此,抗结肠癌药物的研发刻不容缓。但是由于结肠癌的分子机制尚未完全阐明,抗肿瘤药物的靶点以及安全性均在新药开发的研究日程上。因此深入探索结肠癌的分子起病机制,寻找肿瘤病情进展可靠的分子标记物,不仅有助于新的筛查方式的建立,帮助临床医师及时地诊断出潜在的高风险患者,更有助于结肠癌抗肿瘤药物的研发,有助于改善患者预后。

细胞的凋亡是一个与肿瘤起病、进展以及预后均相关的病理过程,越来越多的学者将研究侧重揭示肿瘤细胞凋亡的分子机制方面^[9]。Zhang 等^[10]研究报道从结肠癌细胞的细胞形态入手,下调某些特异性的分子表达,促使细胞结构或功能发生改变,进而诱导细胞凋亡是目前结肠癌靶向治疗的一个重要方向。线粒体是肿瘤细胞胞浆中重要的细胞器,为细胞的增殖提供坚实的能量。线粒体膜电位是维系结构稳定和功能的因子。RANBP9 是一种机体内广泛存在的核质支架蛋白,在胃癌和肺癌等恶性肿瘤中显示了良好的抑癌作用^[11]。Das 等^[12]研究报道在肺癌中,RANBP9 特异性结合线粒体膜的泛素蛋白酶,致使线粒体结构失衡,膜电位下降,促使细胞趋于凋亡。Wei 等^[13]研究显示 RANBP9 负向调控白三烯 B4 受体 2 (leukotriene B4 receptor 2, BLT2) 的表达,抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-435 的生长活性以及侵袭能力。本研究通过对

TCGA 数据库中 *RANBP9* 在结肠癌中的表达结果显示,*RANBP9* 在结肠癌组织中的表达明显下降,并且直接影响患者的生存期。细胞实验结果显示,上调 *RANBP9* 的表达后,实验组细胞的生长活力明显受限,超微结构损伤明显,线粒体的膜电位明显下降,细胞的凋亡率明显升高,肿瘤细胞体内生长的能力随之下降。

TGF-β1 信号是细胞内具有多种功能的调控因子。研究显示 TGF-β1 信号在乳腺癌、胃癌、肝癌等恶性肿瘤中表达升高,能明显推动癌细胞的恶性进展^[14]。Hu 等^[15]研究显示在前列腺癌中沉默 TGF-β1 的表达,能明显抑制阳性调控域锌指蛋白 1 (positive regulatory domain zinc finger protein 1, PRDM1) 的表达,下调癌细胞增殖和侵袭的能力。Tan 等^[16]研究显示增强 TGF-β1 的表达后,正常人口腔成纤维细胞自噬失控,增强其向癌细胞的成纤维细胞的表型转换,同时推动线粒体能量代谢相关蛋白的表达,该表型转换过程提供足够的能量基础。本研究从人类蛋白质免疫组化数据库中研究发现,TGF-β1 在结肠癌组织的表达明显升高,TGF-β1 高表达的患者预后明显不佳。ENCORI 数据库显示,在结肠癌中 *RANBP9* 和 *TGF-β1* 表达呈现明显的负相关。双荧光素酶结果显示 *RANBP9* 能靶向调控 *TGF-β1* 的表达。细胞实验结果显示,升高 RANBP9 的表达后,TGF-β1 的表达明显降低。

综上,RANBP9 能靶向调控 TGF-β1 的表达,促使结肠癌细胞 Colo320 的生长活力和线粒体膜电位下降,诱导其凋亡。但是在结肠癌中,该信号轴完整的调控机制仍需要更为深入的探索。

参考文献:

- [1] RENZI G D, GABALLO G, GAZZANIGA P, et al. Molecular biomarkers according to primary tumor location in colorectal cancer: current standard and new insights [J]. *Oncology*, 2021, 99(3): 135–143.
- [2] BIAN Y, YANG L, SHENG W, et al. Ligustrazine induces the colorectal cancer cells apoptosis via p53-dependent mitochondrial pathway and cell cycle arrest at the G0/G1 phase [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(2): 1578–1588.
- [3] 康清杰, 向征. 沉默胶质瘤相关癌基因同源物 2 基因对结肠癌细胞系 SW620 增殖和凋亡的影响 [J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30(10): 785–790.
- KANG Q J, XIANG Z. Effect of glioma-associated oncogene homolog 2 silencing on proliferation and apoptosis of colon cancer cell line SW620 [J]. *China Oncol*, 2020, 30(10): 785–790.
- [4] SOLIMAN S H A, STARK A E, GARDNER M L, et al. Tagging enhances histochemical and biochemical detection of Ran Binding Protein 9 *in vivo* and reveals its interaction with Nucleolin [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 7138.
- [5] 郭栎枫, 吕杨帆, 曹亚, 等. RanBP9 激活线粒体途径诱导骨肉瘤细胞凋亡 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(12): 1174–1181.
- GUO L F, LYU Y F, CAO Y, et al. Ran-binding protein 9 overexpression induces apoptosis in osteosarcoma cells by activating endogenous mitochondrial pathway [J]. *J Third Mil Med Univ*, 2020, 42(12): 1174–1181.
- [6] YANG T, WANG H, LI M, et al. CD151 promotes Colorectal Cancer progression by a crosstalk involving CEACAM6, LGR5 and Wnt signaling via TGF β 1 [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(3): 848–860.
- [7] 颜彦, 吴琳, 林道锐. 花青素协同奥沙利铂对人结肠癌 HCT116 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(4): 472–476.
- YAN Y, WU L, LIN D R. Effects of anthocyanin combined with oxaliplatin on proliferation and apoptosis of human colon cancer HCT116 cells [J]. *Mod Dig Interv*, 2020, 25(4): 472–476.
- [8] PERVAIZ A, ZEPP M, GEORGES R, et al. Antineoplastic effects of targeting CCR5 and its therapeutic potential for colorectal cancer liver metastasis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(1): 73–91.
- [9] SHANG P, GAO R, ZHU Y, et al. VEGFR2-targeted antibody fused with IFN α mut regulates the tumor microenvironment of colorectal cancer and exhibits potent anti-tumor and anti-metastasis activity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(2): 420–433.
- [10] ZHANG Y, LI Z, LAN Z. Silencing UNC5B antisense lncRNA 1 represses growth and metastasis of human Colon cancer cells via raising miR-622 [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 60–67.
- [11] MCTAVISH C J, BÉRUBÉ-JANZEN W, WANG X, et al. Regulation of c-raf stability through the CTLH complex [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 934.
- [12] DAS S, HAQ S, RAMAKRISHNA S. Scaffolding protein RanBPM and its interactions in diverse signaling pathways in health and disease [J]. *Discov Med*, 2018, 25(138): 177–194.
- [13] WEI J D, JANG J H, KIM J H. RanBPM inhibits BLT2-mediated IL-8 production and invasiveness in aggressive breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 305–311.
- [14] LI D D, DENG L, HU S Y, et al. SH3BGRL2 exerts a dual function in breast cancer growth and metastasis and is regulated by TGF- β 1 [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(4): 1238–1254.
- [15] HU Y M, LOU X L, LIU B Z, et al. TGF- β 1-regulated miR-3691-3p targets *E2F3* and *PRDM1* to inhibit prostate cancer progression [J]. *Asian J Androl*, 2021, 23(2): 188–196.
- [16] TAN M L, PARKINSON E K, YAP L F, et al. Autophagy is deregulated in cancer-associated fibroblasts from oral cancer and is stimulated during the induction of fibroblast senescence by TGF- β 1 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 584.

[收稿日期] 2024-01-16