



·论 著·

# 过表达 Ras 和 Rab 相互作用蛋白 1 对胃癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

董雪冰 通讯作者: 谷小虎

(辽宁中医药大学 110847)

**摘要:**目的:通过研究过表达 Ras 和 Rab 相互作用蛋白 1(RIN1)对胃癌细胞 MKN28 增殖、侵袭和迁移的影响,来阐述癌症发病和发展的机理,进而增加癌症治疗的手段。**方法:**设置空白组,空载体组,阳性克隆组。通过 Western blot 法检测蛋白表达情况;采用 BrdU 法检测细胞增殖、Transwell 小室和细胞划痕实验检测癌细胞的侵袭和迁移能力。**结果:**Western blot 法显示阳性克隆株的蛋白表达荧光条带强度明显增加。BrdU 法显示,与空载体比较,克隆细胞株的 BrdU 阳性率显著升高。Transwell 小室和细胞划痕实验结果显示阳性克隆株的侵袭和迁移能力显著提高。**结论:**通过研究 RIN1 蛋白过表达对胃癌细胞的影响,得出过表达的 RIN1 对胃癌细胞在增殖,侵袭,迁移方面均有促进作用。

**关键词:** RIN1、胃腺癌、增殖、侵袭、迁移

基金项目: 国家青年科学基金(81201968); 辽宁省科学技术计划项目(2012225016)

Effects of Overexpression of Ras and Rab Interactor 1 on Proliferation, Invasion and Migration of Human Gastric Adenocarcinoma Cell

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Ras and Rab Interaction Protein 1 (RIN1) on the proliferation, invasion and migration of gastric cancer cell line MKN28 to elucidate the mechanism of cancer development and progression, and then to increase the means of cancer treatment. Methods: Set blank group, empty vector group, positive clone group. The protein expression was detected by Western blot. BrdU assay was used to detect cell proliferation. Transwell chamber and cell scratch assay were used to detect the invasion and migration of cancer cells. Results: The result of Western blot show that fluorescence band intensity of positive clone group increased significantly. BrdU show that The positive rate of BrdU in cloned cells was significantly increased, compare with the blank load. cell scratch assay results show that the positive clone significantly increased the ability of invasion and migration. Conclusion: RIN overexpressed in MKN28 cells promote proliferation, invasion and migration.

[Keywords] RIN1, gastric adenocarcinoma, proliferation, invasion and migration

中图分类号: R256.12 文献标识码: A 文章编号: 1009-5187(2018)03-094-02

胃癌是我国肿瘤发病率较高的一种恶性肿瘤疾病,患病人数约占全球确诊病例的 40% 以上,大约 60% 的患者出现早期侵袭和转移[1]。RIN1 是一种 Ras 效应蛋白,被认为与多种肿瘤的发生和发展有关[2]。文献报道中显示,胃腺癌的分期、癌细胞转移、预后与 RIN1 在胃腺癌组织中高度表达具有密切的关联[2]。本研究通过观察过表达 RIN1 蛋白对人胃癌 MKN28 细胞在不同指标的作用,体现对胃癌细胞的影响,进而阐述对胃癌发病,发展的机理。

## 1 试验方法

### 1.1 Western blot 法检测 MKN28 细胞中 RIN1 的表达

取对数生长期细胞,将细胞裂解取蛋白,10000 r/min 离心 10 min,取上清液置于 -20℃ 备用。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书的方法对蛋白浓度进行定量。制备上样缓冲液,分离胶和浓缩胶。取 50 μg 蛋白为每孔上样量,分别采用 80 V 浓缩胶和 120 V 分离胶进行电泳。后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 I 抗,4℃ 孵育过夜,后使用 TBST 缓冲液冲洗 3 次,加入特异性 II 抗(β-actin 抗体),TBST 缓冲液冲洗 3 次, TCL 显影液显影,拍照记录,分析计算灰度值。

### 1.2 免疫荧光法检测 MKN 28 细胞中 RIN1 的表达

将细胞在载玻片上培育 48 h 后,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,后使用 0.5% Triton X-100 对细胞进行破膜处理,滴加 10% 兔血清对细胞封闭后,加入 RIN1 抗体,4℃ 孵育过夜。次日加入荧光 II 抗,温室中避光孵育 1 h。加入 DAPI 染液,侵染细胞核,在载玻片上滴加抗荧光猝灭剂。荧光显微镜下观察细胞显色效果并拍照记录。

### 1.3 BrdU 标记法检测细胞增殖

将细胞铺于 24 孔板中,对目标基因进行干扰表达,37℃ 培育 48 h。加入 10 μmol/L BrdU 后孵育 2 h, PBS 缓冲液冲洗 3 次,甲醇固定 20 min,加入甲酰胺处理 10 min,使核酸变性,10% 兔血清封闭 1 h。PBS 缓冲液冲洗 3 次,加入 BrdU 单抗,4℃ 孵育过夜。第二天加入 PE 标记抗体,37℃ 孵育 1 h。加入 DAPI 染液,载玻片上滴加抗荧光猝灭剂,在荧光显微镜下观察细胞染色情况,拍照记录,分析细胞增殖情况。

### 1.4 Transwell 法检测细胞侵袭能力

取细胞进行常规消化,加入具有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中制备成混悬液。调整细胞浓度,将 Transwell 小室每孔平铺  $5 \times 10^4$  个细胞,将 Matrigel 胶铺在 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上层,在下室加入相同培养基作为趋化剂。37℃ 培养箱中孵育 24h。擦去上室细胞,加入 4% 多聚甲醛固定 30min, PBS 缓冲液冲洗 3 次,苏木素-伊红(HE)染色,观察穿过 Matrigel 胶细胞数目为侵袭细胞数量。实验重复 3 次。

### 1.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

将空白组,空载体组,阳性克隆组细胞分别接种于 6 孔细胞培养板中,控制细胞浓度为  $5 \times 10^5$  个细胞/mL,各组同时设计 2 个平行孔,作为平行重复实验。将培养板放置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,观察细胞生长。待细胞全部汇合,进行细胞伤口模型的建立。用灭菌后的移液枪头在各孔的单层细胞中采用“一”字型进行划痕,使用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,将细胞置于培养基中培养 6 h,观察细胞生长情况。全部实验重复 3 次,得出结论,拍照记录,计算迁移距离。

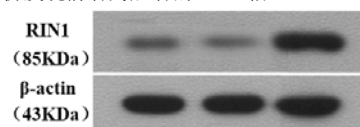
### 1.6 实验数据统计

使用 SPSS 13.0 统计软件分析,采用 t 检验方式对组间均值进行比较, P < 0.01 为差异有显著性统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RIN1 在人胃腺癌 MKN28 细胞中过表达

Western blot(图 1)和免疫荧光(图 2)结果均证实阳性克隆中 RIN1 表达量明显高于对照组细胞,而且主要分布在细胞质中。RIN1 表达量灰度分析发现前者为后者的 3.33 倍。



正常 空载 阳性

图 1. Western blot 法检测 RIN1 表达情况

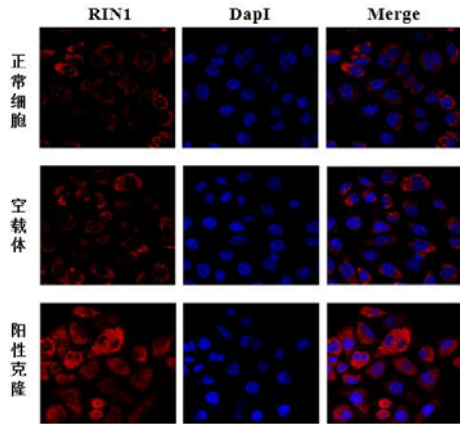


图 2. 免疫荧光法检测 RIN1 表达情况

2.2 过表达 RIN1 对 MKN28 细胞增殖的影响

过表达 RIN1 的 MKN28 细胞形态与对照细胞相比, 没有明显差别。与空载对照相比, 阳性克隆细胞株的 BrdU 阳性率显著升高(图 3), 具有有统计学意义( $P < 0.01$ )。

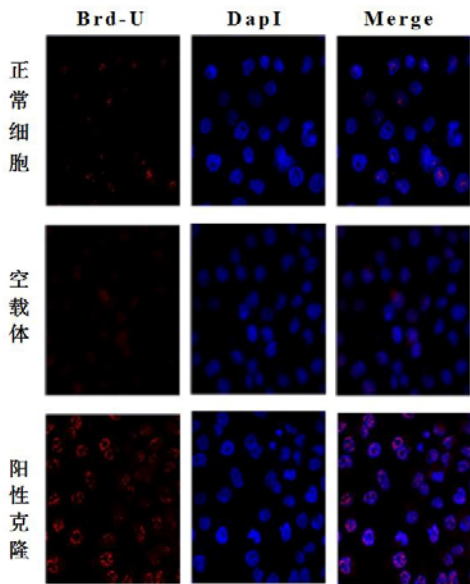


图 3. RIN1 过表达对细胞增殖的影响

1. 2RIN1 过表达对 MKN28 细胞侵袭和迁移的影响

采用 Transwell(图 4)和细胞划痕实验(图 5)检测过表达 RIN1 后 MKN28 细胞侵袭和迁移能力的变化, 与空载对照相比, 阳性克隆细胞透过率和迁移率显著升高, 均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

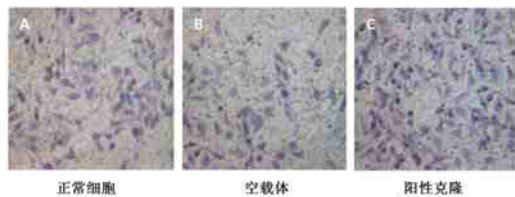


图 4. RIN1 过表达对细胞侵袭能力的影响

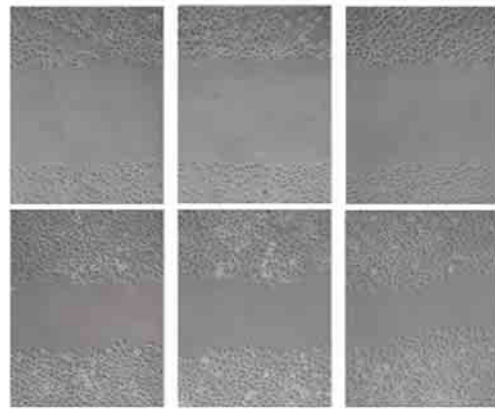


图 5. RIN1 过表达对细胞迁移能力的影响

3 讨论

癌基因的异常表达与肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移密切相关。在肿瘤的发生发展过程中, RAS 效应蛋白 RIN1 发挥了重要作用。在统计中, 具有高表达 RIN1 的患者, 发病 5 年后的生存率明显降低, 表达量可作为判断不良预后及疾病进展的独立指标, 但其与癌症复发无明显相关。

RIN1 发挥生物学作用主要有两条途径。一是作为鸟嘌呤核苷酸交换因子, 加速 EGFR 内陷降解, 抑制 ERK 活化[3]。另一条是通过与 ABL 酪氨酸激酶结合, 抑制细胞侵袭和转移。RIN1 还可以正向调节 ABL 介导的细胞骨架重组, 稳固细胞表面的 EGFR。抑制 A549 肺癌细胞内的 RIN1 表达后, 其细胞表面的 EGFR 处于低水平状态, 细胞增殖速率明显降低。在结肠癌 LoVo 细胞中, RIN1 的过表达加速 ERK1/2 蛋白磷酸化, 促进细胞增殖[4]。在黑色素瘤 A375 细胞中, 下调 RIN1 表达水平, 进而抑制细胞增殖、促进凋亡。

在肿瘤的发生发展过程中, RIN1 作用机制复杂, 本研究发现, 过表达 RIN1 蛋白对 MKN28 细胞增殖、侵袭和转移能力明显增强, 这与临床研究结果一致[7]。提示 RIN1 的高表达可能是胃癌发生、发展的前提条件; RIN1 有望成为一个新的胃癌标记物应用于胃癌的早期诊断与治疗过程中。

参考文献:

[1]Chen W, Zheng R, Zhang S, Zhao P, Zeng H, Zou X. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010. *Ann Transl Med.* 2014;2:61.  
 [3]Hopkins S, Yang GY. FDG PET imaging in the staging and management of gastric cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2011;2:39 - 44.  
 [10]Xu L, Lubkov V, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Feedback regulation of Ras signaling by Rabex-5-mediated ubiquitination. *Curr Biol.* 2010;20(15):1372-7. PMID: 3436604.  
 [11]Inoue T, Goi T, Hirano Y, Katayama K, et al. RIN1-Ras-ERK pathway plays an important role in carcinogenesis in colon cancer cell line LoVo. *Oncol Res.* 2011;19(12):527-534.

作者: 董雪冰, 药师, 硕士; 辽宁中医药大学, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号 (110847)

通讯作者: 谷小虎, 主任医师, 博士; 辽宁省肿瘤医院胃外科, 辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号 (110042); E-mail: gxh@163.com