



过表达 Ras 和 Rab 相互作用蛋白 1 对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

董雪冰

(辽宁中医药大学 110847)

摘要:目的:研究过表达 Ras 和 Rab 相互作用蛋白 1(RIN1)对胃癌细胞 MKN28 增殖和凋亡的影响。方法:构建重组质粒,建立稳定细胞系,采用 Western blot,平板克隆实验、CCK-8 法和 Hoechst 染色法,检测阳性克隆株对细胞增殖和凋亡的影响。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。CCK-8 法显示阳性克隆组的紫外吸收 OD 值显著增高。平板克隆实验后,与空载体比较,阳性克隆株的克隆形成率显著增加。Hoechst 染色法显示,凋亡数量明显减少。结论:过表达 RIN1 蛋白可加速 MKN28 细胞增殖,抑制其凋亡,从而进一步促进肿瘤的发展。

关键词: RIN1; 胃癌; 增殖; 凋亡

Effects of Overexpression of Ras and Rab interactor 1 on Proliferation and Apoptosis of Human Gastric Adenocarcinoma Cell

[Abstract] Objective: To investigate the effects of overexpression of Ras and Rab interactor 1 (RIN1) on proliferation and apoptosis of human gastric cell line MKN28. Methods: The recombinant plasmids were constructed and stable cell lines were established. The effects of positive clones on cell proliferation and apoptosis were detected by Western blot, plate clone assay, CCK-8 assay and Hoechst staining. Results: The result of Western blot show that fluorescence band intensity of positive clone group increased significantly. The result of CCK-8 show that UV absorbance OD value of positive clone group was significantly higher. After Colony-forming assay, The clonogenic rate of positive clones increased significantly, compare with the blank load. The result of Hoechst show that The number of apoptotic cells decreased significantly. Conclusions: RIN1 overexpressed in MKN28 cells promote cell proliferation possibly and inhibit apoptosis.

[Key words] RIN1, gastric cancer, proliferation, apoptosis

中图分类号: R256.12

文献标识码: A

文章编号: 1009-5187 (2017) 21-307-02

Ras 和 Rab 相互作用蛋白 1 (RIN1) 是一种 Ras 效应蛋白, 通过与下游的 Rab5 GTPase 和 Abl 酪氨酸激酶相互作用, 造成肿瘤的形成和发展。本研究通过重组质粒的构建, 建立稳定高表达的阳性克隆株, 观察过表达 RIN1 基因对胃癌细胞增殖和凋亡的影响。

1. 试验方法

1.1 质粒构建

将提取后的胃癌细胞总 RNA 合成, 进而得到总 cDNA。RIN1 基因的 PCR 扩增通过该总 cDNA 的模板完成。将 RIN1 的 PCR 产物以及 pcDNA3.1, 分别进行 DNA 剪切酶反应。通过琼脂糖凝胶电泳后回收目的基因片段, 使用 T4 DNA 连接酶反应 2h, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 培养箱中孵育 24h, 通过菌落鉴定后筛选出阳性克隆菌株, 提取质粒。将质粒进行双切酶鉴定, 送至生物公司进行测序鉴定。并命名为 pcDNA3.1(+)-RIN1。

1.2 建立过表达 RIN1 的稳定细胞系

使用具有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在培养箱中对 MKN28 细胞进行培养。细胞转染前, 使用胰蛋白酶消化细胞, 并接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁生长后, 将转染组按照试剂盒要求进行转染: 取 4 μ g pcDNA3.1(+)-RIN1 质粒溶于 250 μ L 培养液中, 后将 10 μ L 转染试剂与培养液混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 后将上述质粒混合液与转染试剂混合液混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 将每孔加入 2 mL 上述培养液配平。设置空载体相同方法转染至细胞中。将两组细胞于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。加入 G418 筛选剂进行筛选, 观察细胞生长情况, 10 天后对照组细胞死亡。挑取转染组中的单克隆进行连续培养 14 d, 得到阳性克隆株。

1.3 Western blot 法检测 MKN28 细胞中 RIN1 的表达

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

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)

将细胞裂解取蛋白, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液置于 -20 $^{\circ}$ C 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 μ g 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 $^{\circ}$ C 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, ECL 显影液显影, 拍照记录, 分析计算灰度值。

1.4 免疫荧光法检测 MKN28 细胞中 RIN1 的表达

将细胞在载玻片上培育 48 h 后, 依次使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 0.5% Triton X-100 破膜处理, 10% 兔血清封闭后, 加入 RIN1 抗体, 4 $^{\circ}$ C 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并做封片处理。拍照记录荧光显色效果。平行实验重复 3 次。

1.5 CCK-8 法检测 RIN1 过表达对 MKN28 细胞增殖的影响

将细胞传代培养, 取细胞并置于培养基中制成细胞混悬液进行计数, 并接种到 96 孔板中, 设置正常细胞组, pcDNA3.1(+)-RIN1 组, pcDNA3.1(+)-RIN1-1 组。将每孔的细胞数量控制在每 100 μ L 中含有 1×10^4 个细胞, 同时设置平行对照组。观察细胞生长情况, 当细胞贴壁生长后继续置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24h、48h、72h、96h 后取出培养板, 并加入 10 μ L CCK-8 试剂后孵育 4h, 使用酶标仪记录吸光值。

1.6 平板克隆形成实验检测 RIN1 过表达对 MKN28 细胞克隆形成的影响

设置正常细胞组, 空载体组, 阳性克隆组。将对数生长期细胞进行消化后加入 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 制成细胞混悬液。将细胞悬液按梯度稀释, 并使用细胞计数板进行计数, 控制每个培养皿中的每组的细胞数量分别为 100 和 200 个, 并加入 3mL 培养基。使用摇晃轻轻摇动培养皿 2min, 使细胞均匀分散。将培养皿置于培养箱中培养, 观察克隆生长状况, 每 3d 换液一次。在 14d 后培养皿中生成肉眼可见克隆。PBS 缓冲液冲洗 3 次, 多聚甲醛固定 15min, 洗去固定液, 使用瑞姬氏复合染料染色 30min, 洗去染色液, 室温空气中干燥。拍照记录并分析各组中克隆数量情况。

1.7 Hoechst 染色法检测细胞凋亡



•综合医学•

设置正常细胞组,空载体组,阳性克隆组,将对数生长期细胞进行消化后加入 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,制成细胞混悬液。分别接种于放有无菌盖玻片的 6 孔板中,置于培养箱中 37℃ 恒温培养 24 h,观察细胞生长情况,当达到 60%—80% 时除去培养液。加入 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,洗去固定液。加入 Hoechst 33258 染料溶液,每孔 200 μL,染色 10 min,使用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,滴加 5 滴抗荧光淬灭剂进行封片处理,在荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.8 统计学分析

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 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 3.21 倍。

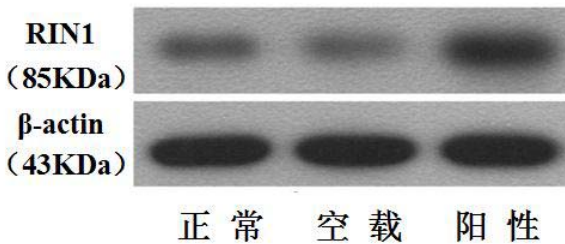


图 1. Western blot 法检测 RIN1 表达情况

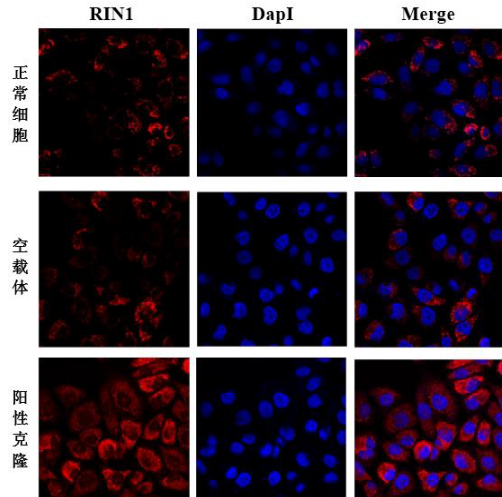


图 2. 免疫荧光法检测 RIN1 表达情况

2.2 MKN28 过表达 RIN1 后细胞生长的变化

过表达 RIN1 的 MKN28 细胞增殖速度明显高于对照细胞,24h 即具有显著性差异,48h 差异达到最大,随后细胞增殖进入平台期,72h 差异开始缩小,96h 时差异已没有显著性(如图 3)。整个过程中,三组细胞的细胞形态均无明显变化。

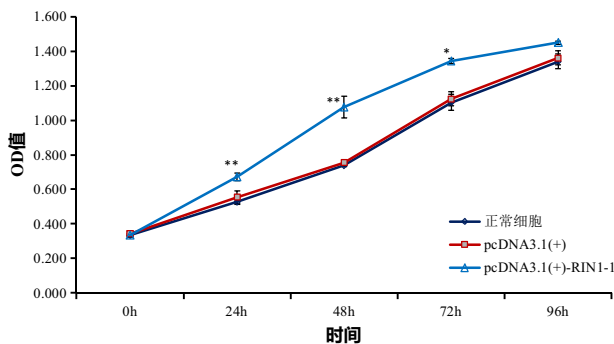


图 3. CCK-8 法检测不同组别的细胞生长情况 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 MKN28 过表达 RIN1 后细胞克隆形成能力的变化

如图 4 所示,三组克隆形成情况,RIN1 过表达影响克隆形成数量。在图中,与其他两组相比,过表达 RIN1 的阳性克隆株的克隆形成数量增多,克隆形成率升高。有统计学意义。

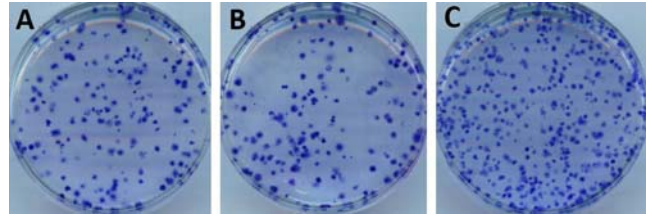


图 4. MKN28 过表达 RIN1 后对细胞克隆形成能力的变化

A: MKN28 细胞株, B: 转染空载体的细胞株, C: 稳定过表达 RIN1 的阳性细胞株

2.4 MKN28 细胞过表达 RIN1 对凋亡的影响

如图 5 所示, MKN28 细胞过表达 RIN1 后,细胞核高度皱缩,凋亡受到明显抑制。

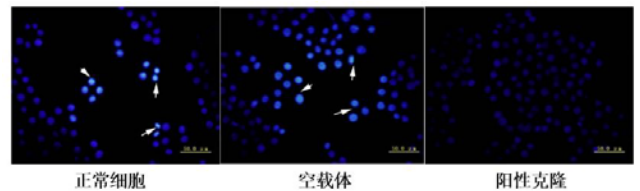


图 5. RIN1 过表达对 MKN28 细胞凋亡的影响

3 讨论

Ras 基因是一种原癌基因,并且相对保守;在正常细胞中稳定表达。但在异常刺激下会被激活过量表达,造成细胞增殖和分化的不可控,进而形成肿瘤。相关研究发现,RIN1 在癌细胞中的表达量与癌症的恶化程度有密切的相关性;表达量越多,恶性肿瘤的形成等级逐渐增高[1]。在黑色素瘤 A375 细胞中,下调 RIN1 蛋白表达可抑制癌细胞增殖、促进细胞凋亡。临床数据也证实,在黑色素瘤组织中,RIN1 蛋白的高表达与肿瘤的发展具有相关性。在非小细胞肺癌中,RIN1 的高表达与癌细胞分化、肿瘤分期、以及淋巴结转移均具有相关性,且表现为 RIN1 表达量越高,生存率越低;耗竭 A549 癌细胞内的 RIN1 后,细胞增殖速率明显降低。在结肠癌 LoVo 细胞中,RIN1 的过表达,能显著增强 ERK1/2 蛋白磷酸化水平,进而增强细胞增殖,抑制细胞凋亡。

本研究证实 RIN1 在人胃癌 MKN28 细胞中的异常高表达,使癌细胞增殖能力显著增强,凋亡受到明显抑制。同时根据文献中的报道[2],RIN1 表达水平可能作为检查胃癌疾病的指标,从而更早,更快,更准的用于诊断胃癌疾病。同时也为胃癌疾病的发病机制做进一步阐述,提供实验数据进行支持,进而为进一步攻克胃癌疾病打下基础。

参考文献:

- [1]Chen W, Zheng R, Zhang S, Zhao P, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010. *Ann Transl Med.* 2014;2:61.
- [2]Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho (tPases: a family reunion. *Cell*, 2000; 103: 227-238