

结直肠癌中 RIP2 的表达与侵袭性相关性研究

敬国敏¹, 吴立然¹, 樊坤¹, 裴志刚^{2△}

(重庆医科大学附属一院綦江医院: 1. 胃肠外科; 2. 病理科, 重庆 401420)

摘要:目的 通过检测结直肠癌(CRC)组织中受体相互作用蛋白 2(RIP2)的表达水平,并观察调高 RIP2 水平后肿瘤细胞的侵袭迁移能力,以探讨 RIP2 在肿瘤细胞侵袭与迁移中的作用。方法 采用免疫组织化学法检测 CRC 组织(48 份)及癌旁黏膜组织(56 份)中 RIP2 的表达水平,并应用 JetPRIME 试剂将 pEGFP-RIP2 质粒转染入 SW480 结肠癌细胞株,上调其 RIP2 表达水平后,观察肿瘤细胞侵袭迁移能力的变化。结果 CRC 组织中 RIP2 表达显著低于癌旁黏膜组织,且差异具有统计意义($P < 0.05$);上调 RIP2 后,SW480 细胞迁移能力减弱,且差异具有统计意义($P < 0.05$)。结论 RIP2 在 CRC 组织中表达下降,并与肿瘤细胞侵袭转移相关。

关键词:结直肠癌; 受体相互作用蛋白 2; 基因干扰; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.020

中图分类号:R361/R446.8

文章编号:1673-4130(2018)07-0834-03

文献标识码:A

Analysis of relationships between expression of RIP2 and invasion in colorectal cancer

JING Guomin¹, WU Liran¹, FAN Kun¹, PEI Zhigang^{2△}

(the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Qijiang Hospital: 1. Department of Gastrointestinal Surgery; 2. Department of Pathology, Chongqing 401420, China)

Abstract: Objective To explore the expression of RIP2 in colorectal cancer(CRC) tissues, and the invasion and migration was observed after RIP2 was increased in CRC cell line. **Methods** 48 cases of CRC paraffin-embedded specimens and 56 cases of tumor-adjacent tissues were collected, and expressions of RIP2 was tested by immunohistochemistry(IHC). pEGFP-RIP2 plasmid and JetPRIME were employed to increase the RIP2 in SW480 cells, and variety of invasion and migration was tested in SW480 cells. **Results** It was showed that expressions of RIP2 was lower in CRC tumors than in tumor-adjacent tissues($P < 0.05$). After RIP2 increased, migration ability of SW480 cells weakened. **Conclusion** The expression of RIP2 was decreased in CRC tissues, and it was closely related to tumor cell's invasion and metastasis.

Key words: colorectal cancer; receptor interacting protein 2; gene interference; invasion

近年的综合治疗措施使结直肠癌(CRC)患者的 5 年生存率有所提高,但总体治疗效果仍不理想^[1-2]。CRC 细胞有较强的侵袭迁移能力,且 CRC 术后复发转移是结直肠癌患者死亡的主要原因^[3]。因此,研究 CRC 细胞侵袭迁移的机制,寻找相应靶点基因,有效抑制肿瘤转移以提高 CRC 的治疗效果成为业界关注焦点。受体相互作用蛋白 2(RIP2)是一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于 RIP 激酶家族。有研究发现,该蛋白在乳腺癌、膀胱癌等恶性肿瘤细胞中表达异常,与肿瘤的侵袭转移有关^[4-5]。本研究通过检测 CRC 癌组织及癌旁组织 RIP2 蛋白的表达水平,应用 pEGFP-RIP2 质粒转染入 CRC SW480 细胞株上调内源性 RIP2 表达水平,检测肿瘤细胞侵袭迁移能力,探讨 RIP2 在 CRC 中异常表达与肿瘤细胞侵袭转移的相关性,为诊断及治疗提供新的线索与靶点,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2016 年 7 月在本院住院并确诊的 CRC 患者的癌组织石蜡组织标本 48 份为研究组,患者均经手术切除肿瘤;并取同一病例 CRC 癌旁组织石蜡标本 48 份及其他 CRC 病例癌旁组织 8 份为对照组,所取组织距肿瘤边缘 ≥ 3 cm,镜检无癌组织。CRC 患者中男 28 例,女 20 例,年龄 31~75 岁,平均(52.63±8.72)岁;CRC 癌旁组织中男 32 例,女 24 例,年龄 33~74 岁,平均(50.28±8.69)岁。入选标准:所有入选患者术前均未经任何化疗和放疗。该研究得到本院伦理委员会批准。

1.2 细胞及主要试剂 高侵袭性结肠癌细胞株 SW480(中国科学院上海细胞研究所)。兔抗人 RIP2 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),免疫组织化学(IHC)试剂盒(福建迈新生物公司);RPMI1640 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);

作者简介:敬国敏,男,副主任医师,主要从事胃肠肿瘤外科研究。△ 通信作者,E-mail:77534615@qq.com。

本文引用格式:敬国敏,吴立然,樊坤,等.结直肠癌中 RIP2 的表达与侵袭性相关性研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(7):834-836.

JetPRIME 转染试剂(德国 Polyplus Transfection 公司);Lipofectamine™ 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司);针对 RIP2 的 siRNA 由上海生工生物公司合成。

1.3 IHC 检测 CRC 癌组织及癌旁组织 RIP2 蛋白 CRC 癌组织及癌旁组织的石蜡标本连续 4 μm 切片后脱蜡水化,3%过氧化氢(H₂O₂)孵育后蒸馏水冲洗、磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡,然后抗原修复。工作液封闭切片、加入蛋白 I 抗(RIP2,1:100)、根据使用说明和预实验效果确定孵育时间,冲洗后依次加相应 II 抗(1:200)、辣根酶标记链酶卵白素工作液、DAB 显色液显色,最后脱水、封片。

1.4 IHC 结果判定标准 切片的染色结果由两位病理医师双盲阅片。每张切片均随机取 6 个 400 倍视野,在每视野中计数 100 个细胞,计数阳性细胞数及阳性率。根据免疫组织化学试剂产品操作手册提供的评分标准,RIP2 以细胞质内出现黄色或棕黄色颗粒为染色阳性。按阳性细胞数及染色强度进行记分:细胞内阳性细胞数<25%为 0 分,25%~50%记为 1 分,>50%~75%记为 2 分,>75%记为 3 分;细胞无阳性染色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。2 种计分法之和为结果,0 分为(-),1~2 分为(+),3~4 分为(++),5~6 分为(+++)。

1.5 细胞培养及质粒转染 结肠癌细胞株 SW480 以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养,5%CO₂、37℃条件下恒温孵育,2~3 d 传代 1 次。取处于对数生长期的细胞进行后续转染试验。转染分为两个部分:(1)将 JetPRIME 转染试剂与 pEGFP-RIP2 质粒加入培养板,摇匀后置于培养箱中,6~8 h 后更换培养基继续培养 48 h;(2)使用 Lipofectamine™ 2000 采用脂质体介导法,将 20 nmol/L 的 RIP2-siRNA 或阴性对照 siRNA 转染 SW480 细胞株,RIP2-siRNA 序列为:5'-GCA AAG ACC UUA CGA GAA UTT-3';阴性对照 siRNA 序列为 5'-CCC UUC UCU GUU UGU AAA GAG ACA U-3'。转染 48 h 后进行后续试验。细胞分为 RIP2-siRNA 组、阴性对照组(转染阴性对照 siRNA)及空白对照组(仅加入 Lipofectamine™ 2000 试剂)。

1.6 细胞迁移能力(划痕实验) 将 SW480 细胞浓度调整至(4~5)×10⁴ 个/mL,接种于 24 孔板,待细胞附壁生长后按分组要求处理;继续培养 48 h,吸去培养液后用 200 μL 枪头进行划痕。加入无血清培养液继续培养 24 h。用 PBS 冲洗 3 次,洗去划下的细胞,镜下观察细胞划痕愈合情况。计算细胞迁移的距离和细胞迁移率。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 使用 SPSS20.0 统计分析软件对数据进行分析,对 IHC 检测 RIP2 蛋白表达水平的等级资料用秩和检验,率的比较用 χ² 检验,符合正态分布且方差齐性的多组计量资料采用方差分析,进一步

两两比较采用 SNK-q 检验。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CRC 癌组织和癌旁组织 RIP2 蛋白的表达情况 IHC 结果显示,CRC 组织 RIP2 蛋白阳性率为 29.17%(14/48),在癌旁组织 RIP2 阳性率为 67.86%(38/56)。经秩和检验,CRC 组织 RIP2 蛋白的表达较癌旁组织显著下降,且差异均有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

表 1 CRC 癌组织和癌旁组织 RIP2 蛋白的表达情况

组别	n	RIP2		
		-	+	++
研究组	48	34	9	5
对照组	56	18	15	23

2.2 转染 pEGFP-RIP2 质粒作用后 SW480 细胞中 RIP2 的表达情况 RIP2-siRNA 转染 SW480 细胞 48 h 后,Western blot 检测各组细胞中 RIP2 蛋白表达水平显示,各组间差异有统计学意义(F=16.18,P=0.000)。进一步两两比较显示,RIP2-siRNA 组 RIP2 蛋白表达水平显著高于阴性对照组和空白对照组,且差异具有统计学意义(P=0.000),而阴性对照组和空白对照组 RIP2 蛋白表达水平差异则无统计学意义(P=0.177)。见图 1 和表 2。

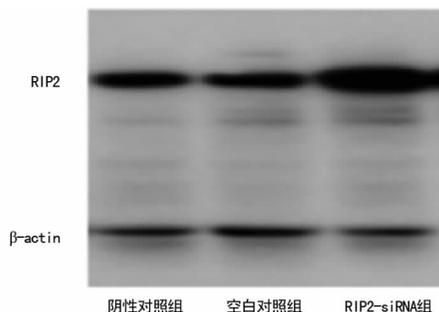


图 1 RIP2-siRNA 作用后各组 SW480 细胞中 RIP2 蛋白的表达(Western blot 结果)

表 2 RIP2-siRNA 作用后各组 SW480 细胞中 RIP2 蛋白的表达比较(̄x±s)

组别	n	RIP2/β-actin(OD 值)
阴性对照组	6	3.060±0.283*
空白对照组	6	2.990±0.218*
RIP2-siRNA 组	6	5.620±0.428

注:与 RIP2-siRNA 组比较,*P<0.05

2.3 转染 pEGFP-RIP2 质粒上调 RIP2 表达后 SW480 细胞侵袭迁移能力的改变 划痕实验结果显示:质粒转染后 SW480 细胞迁移率为(35.62±6.28)%,显著低于阴性对照组的(68.12±5.66)%,差异有统计学意义(χ²=4.89,P=0.026)和空白对照组的(65.83±4.89)%,差异有统计学意义(χ²=5.16,P=0.018),而阴性对照组和空白对照组比较,差异无统计学意义(χ²=1.06,P=0.753)。见图 2 和

表 3。

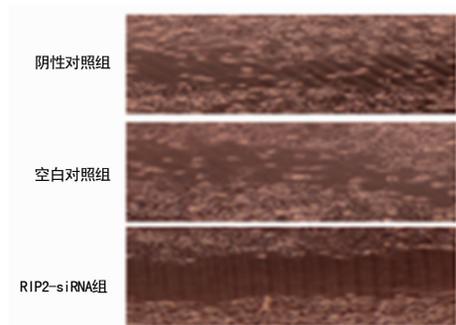


图 2 pEGFP-RIP2 质粒转染作用后各组 SW480 细胞迁移能力的情况

表 3 pEGFP-RIP2 质粒转染作用后各组 SW480 细胞迁移能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	迁移率(%)
阴性对照组	6	68.12±5.66*
空白对照组	6	65.83±4.89*
RIP2-siRNA 组	6	35.62±6.28

注:与 RIP2-siRNA 组比较,* P<0.05

2.4 RIP2-siRNA 敲低作用后 SW480 细胞中 RIP2 表达与侵袭转移能力的改变 RIP2-siRNA 转染 SW480 细胞 48 h 后,Western blot 检测各组细胞中 RIP2 蛋白表达结果,行单因素方差分析显示,组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。划痕实验结果显示,RIP2-siRNA 转染后 SW480 细胞迁移率与阴性对照组和空白对照组,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.03, P = 0.785$)。

3 讨 论

随着社会进步和人们饮食结构的不断调整,在世界范围内,CRC 每年新发病例超过 100 万,死亡病例超过 50 万,成为发病率与死亡率最高的三大肿瘤之一,严重危害人类的健康^[6]。CRC 的发生及肿瘤细胞的侵袭和迁移,与多种基因调控的恶性增殖有关,且肿瘤细胞凋亡受抑制、凋亡不足,正常细胞周期失去调控和促凋亡基因表达下降亦是其主要机制之一^[7]。诱导肿瘤细胞凋亡的药物成为新近研究的热点,寻找相应的关键基因具有重要意义。杨文欣等^[8]的研究发现,过表达 RIP2 能诱导 Panc-1 细胞凋亡。McCARTHY 等^[5]发现,RIP2 过表达可以通过其 CARD 结构域诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。

RIP2 也称为 RICK、RIPK2 或 CARDIAK,属 RIP 激酶家族成员之一,在脾脏、外周血白细胞、胰腺、心脏、胎盘、睾丸等组织细胞的胞质内,均有广泛的表达。RIP2 是 NOD 样受体(NLRS)信号通路的下游因子,通过激活核转录因子- κ B(NF- κ B),在固有免疫、适应性免疫以及炎症反应中起至关重要的作用,并参与多种疾病的发生^[9]。而大量研究证明,NF- κ B 与 CRC 关系密切,且与肿瘤细胞的侵袭与转移相关^[10]。

本研究选用 CRC 与癌旁组织为对象,通过 IHC

标记证实在结直肠黏膜腺上皮细胞的胞质中,亦有 RIP2 的广泛表达,而 CRC 中 RIP2 的表达明显下降,提示 RIP2 等参与细胞凋亡的因子缺乏与肿瘤的发生相关。为了研究 RIP2 与 CRC 侵袭转移的相关性,本实验应用 JetPRIME 试剂将 pEGFP-RIP2 质粒转染入 SW480 结肠癌细胞株,上调细胞内 RIP2 的表达水平,结果显示 SW480 细胞侵袭转移能力减弱,其机制是否与激活 NF- κ B 相关尚需进一步实验研究证实。本实验采用 RIP2-siRNA 敲低 SW480 细胞株中 RIP2 的表达,未能得到预期的结果,今后将以此为研究方向,观察并探讨下调 RIP2 的表达后是否会增强肿瘤细胞的侵袭转移能力。

综上所述,在本实验条件下,本研究证实了 RIP2 在 CRC 中表达下降,并推测 RIP2 在 CRC 侵袭转移中发挥重要作用,相关机制值得研究,是否可用于 CRC 的治疗还需要大量的基础研究和临床试验。

参考文献

- [1] LIU M X, QU H, BU Z D, et al. Validation of the memorial Sloan-Kettering cancer center nomogram to predict overall survival after curative colectomy in a Chinese colon cancer population [J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22 (12): 3881-3887.
- [2] SUAREZ J. Analysis of clinical and economic implications of esmo 2014 clinical practice guidelines for metastatic colorectal cancer treatment [J]. Value in Health, 2015, 18 (7): A446.
- [3] QUERE P, FACY O, MANFREDI S, et al. Epidemiology, management, and survival of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a Population-Based study [J]. Dis Colon Rectum, 2015, 58(8): 743-752.
- [4] ZHANG H W, CHIN A I. Role of rip2 in development of Tumor-Infiltrating MDSCs and bladder cancer metastasis [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94793.
- [5] MCCARTHY J V, NI J, DIXIT V M. RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase [J]. J Biol Chem, 1998, 273(27): 16968-16975.
- [6] SIEGEL R, DESANTIS C, JEMAL A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64 (2): 104-117.
- [7] HONG S, BI M M, WANG L, et al. CLC-3 channels in cancer [J]. Oncol Rep, 2015, 33(2): 507-514.
- [8] 杨文欣, 周晗, 梁若龙, 等. 过表达 Rip2 对人胰腺癌细胞 Panc-1 凋亡的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(9): 1584-1588.
- [9] 蔡欣, 苏航, 徐东刚. RIP2 的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2012, 41(12): 189-192.
- [10] ENDO H, HOSONO K, UCHIYAMA T, et al. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis [J]. Gut, 2011, 60(10): 1363-1371.