

RLIP76 在子宫内膜癌组织中的表达变化及其对子宫内膜癌细胞凋亡的影响

张正娥

(荆州市中心医院·华中科技大学同济医学院附属荆州医院,湖北荆州 434020)

摘要:目的 观察子宫内膜癌组织中人 RalA 结合蛋白 1(RLIP76)的表达变化,以及沉默 RLIP76 基因表达后对子宫内膜癌细胞凋亡的影响。方法 ①子宫内膜癌组织中 RLIP76 表达观察:采用免疫组化法检测 58 例份子宫内膜癌组织、40 例份子宫内膜不典型增生组织和 40 例份正常子宫组织中的 RLIP76,分析 RLIP76 表达与子宫内膜癌临床病理参数的关系。②RLIP76 对子宫内膜癌细胞凋亡影响观察:培养人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,分为 RLIP76 抑制组、阴性对照组和空白对照组,RLIP76 抑制组转染 RLIP76 siRNA,阴性对照组转染对照 siRNA,空白对照组不做处理、常规培养;凋亡检测试剂盒检测凋亡细胞,Western blotting 法检测细胞中的 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白。结果 子宫内膜癌组织、子宫内膜不典型增生组织和正常子宫内膜组织中 RLIP76 阳性表达率分别为 81.0%(47/58)、52.5%(21/40)、22.5%(9/40),RLIP76 在子宫内膜癌组织中的表达阳性率高于子宫内膜不典型增生组织和正常子宫内膜组织(P 均 <0.05)。RLIP76 表达与子宫内膜癌患者淋巴结转移有关($P<0.05$)。RLIP76 抑制组、阴性对照组、空白对照组细胞凋亡率分别为 $33.72\% \pm 3.25\%$ 、 $14.14\% \pm 3.19\%$ 、 $13.98\% \pm 2.97\%$,RLIP76 抑制组细胞凋亡率高于阴性对照组、空白对照组(P 均 <0.05)。结论 RLIP76 蛋白在子宫内膜癌组织中高表达;沉默 RLIP76 基因表达后,子宫内膜癌细胞凋亡增多,推测 RLIP76 可能通过上调凋亡抑制因子表达、抑制凋亡相关基因表达参与子宫内膜癌的发生发展。

关键词: 子宫内膜癌;人 RalA 结合蛋白 1;基因沉默;细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1002-266X.2016.19.016

中图分类号:R737.33 文献标志码:B 文章编号:1002-266X(2016)19-0047-03

子宫内膜癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病机制尚未完全明确,但具有恶性程度高、侵袭力强等特点,患者预后较差^[1]。人 RalA 结合蛋白 1(RLIP76)是 Ras 超家族成员,定位于人 18 号染色体 p11.3,可作为膜蛋白转运体调控细胞内过氧化脂质体水平,亦可与 Ral、Hsf-1 等结合而活化相应信号通路,调控细胞增殖、分化及凋亡^[2]。有研究^[3]指出,RLIP76 与恶性肿瘤的发生、进展有关,下调 RLIP76 表达可抑制肿瘤细胞侵袭,导致细胞周期阻滞^[4]。本研究观察了子宫内膜癌组织中 RLIP76 的表达变化,并利用 RNA 干扰技术沉默 RLIP76,探讨其在子宫内膜癌细胞凋亡中的作用,以为临床实践提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 子宫内膜癌组织及细胞 2011 年 2 月~2014 年 3 月手术切除的子宫内膜癌标本 58 例份,患者年龄 28~72(48.5±9.3)岁,病理分级 I 级 38 例、II 级 12 例、III 级 8 例,FIGO 分期 I 期 46 例、II 期 8 例、III 期 3 例、IV 期 1 例,患者术前均未行放化疗治疗。选择同期手术切除的子宫内膜不典型增生标本

40 例份和正常子宫组织标本 40 例份。所有留取组织标本均保存于 -70℃ 冰箱备检。人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株由上海美轩生物科技有限公司提供,置于 DMEM/F12 培养液中(含 10% 胎牛血清),在含 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱中培养。

1.2 子宫内膜癌组织中 RLIP76 表达观察 取组织标本石蜡固定后切片,常规脱蜡水化,高温高压下抗原修复,用 3% H₂O₂ 室温下处理 15 min,加入封闭液。加入兔抗人 RLIP76 单克隆抗体(购自上海麦仓生物科技有限公司),室温孵育 60 min。DAB 显色,中性树脂封片,用兔抗 IgG 替代一抗作为阴性对照,显微镜下观察。结合阳性细胞百分比和染色强度判定结果:阳性细胞百分比为 0 计 0 分,≤10% 计 1 分,>10%~25% 计 2 分,>25%~50% 计 3 分,>50% 计 4 分;细胞质无染色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,棕褐色计 3 分;两项评分之和 ≤2 分为阴性,≥3 分为阳性。

1.3 RLIP76 对子宫内膜癌细胞凋亡影响观察

1.3.1 子宫内膜癌细胞分组及 RLIP76 siRNA 转染 RLIP76 siRNA 和阴性对照 siRNA 序列由上海生

工公司设计,序列分别为 5'-GACUCCAGUGGUAUU-CUACTT-3'、5'-GUAGAUUACCACUGGAGUCTT-3',分别合成重组质粒 pRNAT-RLIP76、pRNAT-neg。转染前 24 h 将细胞按 5×10^5 /mL 接种于 6 孔板,待细胞融合度达 80% 用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 pRNAT-RLIP76(RLIP76 抑制组) 和 pRNAT-neg(阴性对照组) ,以不做处理、常规培养的细胞作为空白对照组。将细胞板置于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 下培养,每 5 h 更换 1 次培养基。采用 real-time PCR 法检测 RLIP76 mRNA,RLIP76 抑制组细胞中 RLIP76 mRNA 相对表达量低于阴性对照组及空白对照组,说明 RLIP76 siRNA 转染成功。

1.3.2 凋亡细胞检测 各组细胞转染 48 h 后,加入胰酶消化、离心,取 1×10^6 /mL 细胞重悬于缓冲液中,取 100 μL 细胞悬液,加入 Annexin V-FITC 5 μL 和碘化丙啶 10 μL,摇匀后室温下暗室培养 20 min,取出即刻用流式细胞仪检测凋亡细胞。

1.3.3 细胞中 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白检测 转染 48 h 后取各组细胞,用细胞裂解液裂解后提取总蛋白进行 Western blotting 检测。取 50 μg 蛋白行 SDS-PAGE 电泳并电转至 PVDF 膜上,室温封闭 60 min,分别将不同一抗[兔抗人 Survivin 单克隆抗体(1:200)、兔抗 Caspase-3 单克隆抗体(1:500)、小鼠抗 Caspase-9 单克隆抗体(1:500)]加入 4 °C 过夜孵育,加入二抗,37 °C 下反应 120 min, ECL 试剂盒显色,用双色红外荧光扫描系统分析,获得目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS21.0 软件进行统计处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

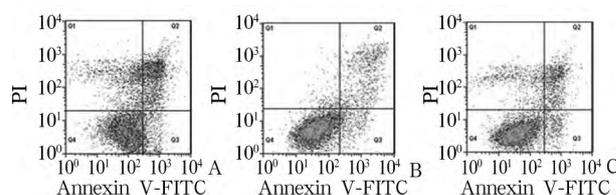
2.1 子宫内膜癌组织中 RLIP76 表达及其与肿瘤临床病理参数的关系 子宫内膜癌组织、子宫内膜不典型增生组织和正常子宫内膜组织中 RLIP76 阳性表达率分别为 81.0% (47/58)、52.5% (21/40)、22.5% (9/40),RLIP76 在子宫内膜癌组织中的阳性表达率高于子宫内膜不典型增生组织和正常子宫内膜组织(P 均 < 0.05)。RLIP76 表达与子宫内膜癌患者淋巴结转移有关($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组子宫内膜癌细胞凋亡情况 RLIP76 抑制组、阴性对照组、空白对照组细胞凋亡率分别为 $33.72\% \pm 3.25\%$ 、 $14.14\% \pm 3.19\%$ 、 $13.98\% \pm 2.97\%$,RLIP76 抑制组细胞凋亡率高于阴性对照组、空白对照组(P 均 < 0.05)。详见图 1。

表 1 RLIP76 表达与子宫内膜癌临床病理参数的关系

临床病理参数	n	RLIP76 阳性	
		例	%
年龄(岁)			
≥50	37	31	83.8
<50	21	16	76.2
病理分级			
I 级	38	30	78.9
II、III 级	20	17	85.0
FIGO 分期			
I 期	46	37	80.4
II~IV 期	12	10	83.3
组织学分级			
G ₁	16	13	81.2
G ₂	28	24	85.7
G ₃	14	10	71.4
淋巴结转移			
有	41	36	87.8
无	17	11*	64.7

注:与有淋巴结转移者相比,* $P < 0.05$ 。



注:A 为 RLIP76 抑制组,B 为阴性对照组,C 为空白对照组。

图 1 各组子宫内膜癌细胞凋亡情况

2.3 各组子宫内膜癌细胞中 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达比较 RLIP76 抑制组 Survivin 蛋白相对表达量低于阴性对照组和空白对照组,Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达量高于阴性对照组和空白对照组(P 均 < 0.05)。详见表 2。

表 2 各组子宫内膜癌细胞中 Survivin、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Survivin 蛋白	Caspase-3 蛋白	Caspase-9 蛋白
RLIP76 抑制组	0.51 ± 0.13	0.91 ± 0.35	0.95 ± 0.27
阴性对照组	0.87 ± 0.21*	0.63 ± 0.16*	0.74 ± 0.11*
空白对照组	0.81 ± 0.19*	0.65 ± 0.14*	0.72 ± 0.09*

注:与 RLIP76 抑制组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年来,子宫内膜癌发病率不断升高且呈低龄化趋势^[5],虽然诊疗手段得到进步和发展,但患者 5 年生存率仍处于较低水平^[6]。研究^[7]表明,肿瘤细胞侵袭、转移是子宫内膜癌患者预后较差的主要原因。RLIP76 是 Ral 结合蛋白,在调控细胞生长、迁移、分裂和凋亡中发挥重要作用,主要表达于乳腺、心脏、肝脏和红细胞中,在脑组织及结肠组织中表达较少^[8]。RLIP76 在肿瘤组织中表达异常增高,是 PI3K/Akt、Rac1-JNK 等多种信号通路的关键性调控因子,而这些信号通路在肿瘤细胞增殖、迁移中发挥

重要作用^[9]。研究^[10,11]表明,RLIP76 在卵巢癌、肺癌等恶性肿瘤组织中高表达。潘海霞等^[12]抑制小细胞肺癌 H69 细胞株中 RLIP76 表达后,发现细胞对化疗药物敏感性增强,认为 RLIP76 可能参与了小细胞肺癌多药耐药的产生,可作为小细胞肺癌化疗敏感性和临床预后的参考指标。

本研究观察了子宫内膜癌组织中 RLIP76 的表达变化,发现 RLIP76 在子宫内膜癌组织中的阳性表达率高于子宫内膜不典型增生组织和正常子宫内膜组织,且 RLIP76 表达与子宫内膜癌患者淋巴结转移有关,提示 RLIP76 的异常表达可能参与了子宫内膜癌的发病和侵袭。推测机制:RLIP76 作为 GTP 酶激活蛋白家族成员,在细胞形态发生及细胞迁移中发挥重要作用,RLIP76 过表达可能通过影响细胞生长、迁移、分裂和凋亡而参与子宫内膜癌的发病。

为进一步探讨 RLIP76 在子宫内膜癌发生发展中的作用,我们利用 RNA 干扰技术沉默 Ishikawa 细胞株中 RLIP76 基因表达,然后发现,RLIP76 抑制组细胞凋亡率高于阴性对照组和空白对照组,表明特异性沉默 RLIP76 基因可促使子宫内膜癌细胞凋亡。Survivin 是一种凋亡抑制因子,能够抑制多种刺激诱导的细胞凋亡,与多种肿瘤的发病有关^[13]; Caspase-3 和 Caspase-9 是 Caspase 家族重要成员,在细胞凋亡过程中,细胞色素 C 从线粒体中释放,与凋亡蛋白酶活化因子结合,使 Caspase-9 前体活化^[14],进一步使 Caspase-3 蛋白前体活化,从而促使细胞发生凋亡^[15,16]。本研究结果显示,RLIP76 抑制组 Survivin 蛋白相对表达量低于阴性对照组和空白对照组,Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达量高于阴性对照组和空白对照组,提示 RLIP76 可能通过上调凋亡抑制因子表达、抑制凋亡相关基因表达,从而使子宫内膜癌细胞躲避凋亡程序,实现异常增殖。

结合上述研究结果,我们认为,RLIP76 在子宫内膜癌组织中高表达,与肿瘤淋巴结转移有关;沉默 RLIP76 基因表达后子宫内膜癌细胞凋亡增多,推测 RLIP76 可能通过上调凋亡抑制因子表达、抑制凋亡相关基因表达参与子宫内膜癌的发生发展。

参考文献:

[1] Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Hum Reprod Update, 2014,

20(5):748-758.
 [2] Singhal SS, Singhal J, Figarola J, et al. RLIP76 targeted therapy for kidney cancer [J]. Pharm Res, 2015, 32(10):3123-3136.
 [3] Zhang Y, Song X, Gong W, et al. RLIP76 blockade by siRNA inhibits proliferation, enhances apoptosis, and suppresses invasion in HT29 colon cancer cells [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2):579-585.
 [4] Wang Q, Wang JY, Zhang XP, et al. RLIP76 is overexpressed in human glioblastomas and is required for proliferation, tumorigenesis and suppression of apoptosis [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(4):916-926.
 [5] 华腾,吴婷婷,辛晓燕,等.靶向沉默 S100A4 基因对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞体外迁移及侵袭能力的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(5):377-379.
 [6] 张晓勇,魏琳琳.肿瘤转移抑制基因 KAI1/CD82 和整合素 $\beta 1$ 在子宫内膜腺癌中表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(13):3534-3536.
 [7] Heng S, Benjapibal M. Preoperative thrombocytosis and poor prognostic factors in endometrial cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(23):10231-10236.
 [8] Singhal SS, Singhal J, Figarola J, et al. RLIP76 targeted therapy for kidney cancer [J]. Pharm Res, 2015, 32(10):3123-3136.
 [9] Mott HR, Owen D. RLIP76 (RalBP1): The first piece of the structural puzzle [J]. Small GTPases, 2010, 1(3):157-160.
 [10] Awasthi S, Singhal SS, Awasthi YC, et al. RLIP76 and Cancer [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(14):4372-4377.
 [11] Goldfinger LE, Lee S. Emerging treatments in lung cancer -targeting the RLIP76 molecular transporter [J]. Lung Cancer (Auckl), 2013, 2013(4):61-69.
 [12] 潘海霞,白义凤,胡洪林. RLIP76 在调节小细胞肺癌多药耐药中的作用及临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37(4):266-271.
 [13] Soleimanpour E, Babaei E. Survivin as a potential target for cancer therapy [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(15):6187-6191.
 [14] Zhou X, Dotti G, Krance RA, et al. Inducible caspase-9 suicide gene controls adverse effects from alloplete T cells after haploidentical stem cell transplantation [J]. Blood, 2015, 125(26):4103-4113.
 [15] 王新昭,管西运,王蕾蕾,等.腺病毒载体介导的 p53 基因可增强乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 对表皮生长因子受体抑制剂的敏感性 [J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(12):886-891.
 [16] Muniz Lino MA, Palacios-Rodríguez Y, Rodríguez-Cuevas S, et al. Comparative proteomic profiling of triple-negative breast cancer reveals that up-regulation of RhoGDI-2 is associated to the inhibition of caspase 3 and caspase 9 [J]. J Proteomics, 2014, 111(3):198-211.

(收稿日期:2015-12-10)