

RANBP9调控结直肠癌细胞凋亡的信号通路分析

秦春枝* 武广彬 李吉

(复旦大学附属金山医院, 上海 201508)

摘要 RANBP9是RAS超家族成员RAN的一种结合蛋白,参与多种肿瘤的发生发展。为探索它对结直肠癌细胞凋亡的调控作用,该研究利用慢病毒感染结直肠癌HCT116、HT29细胞的方法,建立RANBP9-shRNA稳转细胞系,经氟尿嘧啶诱导凋亡后利用流式细胞仪和caspase-2酶活力实验检测细胞凋亡;抽提实验组和对照组HCT116细胞总RNA,经质检合格后进行基因表达谱芯片实验,筛选出RANBP9敲减前后结直肠癌细胞的差异表达基因并进行定量PCR验证,基于Gene Ontology数据库进行分子功能注释,基于Ingenuity Pathway Analysis数据库进行通路分析。流式细胞分析显示,在HCT116和HT29细胞中RANBP9-shRNA均促进氟尿嘧啶诱导的细胞凋亡;基因芯片数据分析得到差异表达mRNAs 857个(|Fold Change|>1.5且FDR<0.05),其中上调表达677个,下调表达180个,涉及的分子功能主要包括 γ -谷氨酰转移酶活性、钙离子结合、胰岛素受体结合、病毒受体活性、GTP酶活性、细胞外基质结合、 β -连环蛋白结合、SMAD结合、转录调节、AMP活化蛋白激酶活性、蛋白质转运蛋白活性、细胞骨架结合等,其显著参与的信号通路主要涉及癌症的TGF- β 、BMP、IL-8和RhoA等。实时定量PCR证实上述通路中的SMAD3、SMAD7、BMP6、BMP7、CXCL8、RANGEF6的mRNA表达水平在RANBP9-shRNA组中显著高于对照组。综上,RANBP9可能通过多个信号通路来调控结直肠癌细胞的凋亡,该研究为阐明其中的分子机制提供了新的思路。

关键词 RANBP9; 凋亡; 基因芯片; 结直肠癌

Signaling Pathway Analysis of RANBP9 in Regulating Apoptosis of Colorectal Cancer Cells

QIN Chunzhi*, WU Guangbin, LI Ji

(Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China)

Abstract RANBP9 is a binding protein of RAN, a member of RAS superfamily. It is involved in the development of various tumors. To explore its effect on the apoptosis of colorectal cancer cells, RANBP9-shRNA and control cell lines were established by infection with lentivirus in HCT116 and HT29 cells. Flow cytometry and caspase-2 activity assay were used to detect the apoptotic cells treated with fluorouracil. Total RNAs of RANBP9-shRNA and Control cells were extracted. Microarray hybridization was performed after quality evaluation. Differentially expressed genes before and after knockdown of RANBP9 were screened and some of them were verified by real-time quantitative PCR. Molecular function annotation of the differentially expressed genes was performed based on Gene Ontology database, and pathway analysis was performed based on Ingenuity Pathway Analysis database. In HCT116 and HT29 cells, RANBP9-shRNA promotes apoptosis induced by fluorouracil. Eight hundred and

收稿日期: 2019-12-17 接受日期: 2020-05-25

上海市金山区卫生健康委基金(批准号: JSKJ-KTMS-2017-01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18930819064, E-mail: 18930819064@189.cn

Received: December 17, 2019 Accepted: May 25, 2020

This work was supported by the Health Commission of Jinshan District, Shanghai, China (Grant No. JSKJ-KTMS-2017-01)

*Corresponding author. Tel: +86-18930819064, E-mail: 18930819064@189.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5286>

fifty-seven differentially expressed genes ($|\text{Fold Change}| > 1.5$ and $\text{FDR} < 0.05$) were obtained by microarray analysis, of which 677 were up-regulated and 180 were down-regulated. The molecular functions mainly included gamma-glutamyltransferase activity, calcium binding, insulin receptor binding, viral receptor activity, GTPase activity, extracellular matrix binding, β -catenin binding, SMAD binding, transcriptional regulation, AMP-activated protein kinase activity, protein transporter activity, cytoskeleton binding and so on. The signaling pathways involved in cancer included TGF- β , BMP, IL-8, RhoA and so on. Real-time quantitative PCR confirmed that the mRNA levels of *SMAD3*, *SMAD7*, *BMP6*, *BMP7*, *CXCL8* and *RAPGEF6* in the above pathways were significantly higher in RANBP9-shRNA group than in Control group. Altogether, RANBP9 may regulate the apoptosis of colorectal cancer cells through multiple signaling pathways. This study provides new sights to elucidate the molecular mechanism of RANBP9 in CRC.

Keywords RANBP9; apoptosis; microarray; colorectal cancer

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是目前全世界发病率排名第三的恶性肿瘤,其治疗和预后并不乐观,5年的相对生存率仅为65%^[1]。结直肠癌最常见的基因组不稳定形式为染色体不稳定,进而导致肿瘤抑制基因杂合性丢失或者癌基因突变,比如常见的*APC*、*TP53*、*KRAS*和*MMR*基因等^[2]。以此类分子特征进行肿瘤分型并进行靶向治疗是肿瘤研究的重要方向。

我们前期的研究发现, RANBP9在CRC组织和正常肠上皮组织中存在差异表达,进一步的细胞增殖和动物实验发现,该分子起着抑癌的作用^[3]。据报道,在胃癌中, RANBP9低表达与化疗耐药有关^[4];而在肺癌中, RANBP9的表达水平却与DNA损伤剂的疗效呈负相关^[5]。因此,本研究进一步探索了RANBP9对药物诱导CRC细胞凋亡的调控作用,并进行基因芯片实验,比较*RANBP9*敲减前后的差异表达基因,通过生物信息学的方法分析RANBP9调控CRC细胞凋亡的可能途径。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人结直肠癌细胞株HCT116和HT29、PBS、细胞培养基McCoy's 5A(含青霉素80 U/mL、链霉素0.08 mg/mL)、caspase-2分光光度法检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; Gibco胎牛血清和TRIzol试剂购自美国Thermo Fisher Scientific公司; 氟尿嘧啶(flourouracil)购自上海旭东海普药业有限公司; Annexin V-APC和PI购自美国BD Biosciences公司。

Gallios流式细胞仪购自美国GE公司; 多功能酶标仪购自美国BioTek公司; NanoDrop 2000购自美国

Thermo Fisher Scientific公司; Bioanalyze 2100购自美国Agilent Technologies公司。

1.2 质粒设计、稳转细胞的建立及RT-qPCR

靶向*RANBP9*(NM_005493.2)基因的shRNA质粒序列(5'-GGA ATT GGA TCC TGC GCA T-3')和对照shRNA序列(5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3')均购自上海吉凯基因化学技术有限公司。质粒经慢病毒包装后感染HCT116、HT29细胞,经过嘌呤霉素筛选,建立RANBP9干扰的稳转细胞系,并用含10%胎牛血清的完全培养基培养和传代。*RANBP9*敲减的效率经RT-qPCR实验验证, RT反应条件为37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 然后降至4 °C; PCR反应为95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 40个循环。*GAPDH*内参引物: 上游5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3', 下游5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'; *RANBP9*引物: 上游5'-CTG GAA CAG CCC AGT TGG AA-3', 下游5'-GGA GGT TGC TTT GGC AGA TT-3'; *SMAD3*引物: 上游5'-TTG CAC TTA ATG ATC GGA TGG TT-3', 下游5'-TTT GGG GTT TTC TGG GGA CTT-3'; *SMAD7*引物: 上游5'-GGA CGC TGT TGG TAC ACA AG-3', 下游5'-GCT GCA TAA ACT CGT GGT CAT TG-3'; *BMP6*引物: 上游5'-CCG ACA ACA GAG TCG TAA TCG C-3', 下游5'-CTG CCA TCC CAG GTC TTG GAA A-3'; *BMP7*引物: 上游5'-GAG TGT GCC TTC CCT CTG AAC T-3', 下游5'-AGG ACG GAG ATG GCA TTG AGC T-3'; *CXCL8*引物: 上游5'-GAG AGT GAT TGA GAG TGG ACC AC-3', 下游5'-CAC AAC CCT CTG CAC CCA GTT T-3'; *RAPGEF6*引物: 上游5'-AGA CAG ATG AGG AGA AGT TCC AG-3', 下游5'-GAC CTC ATA GGC ACT GGA GAC A-3'。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡实验

上述稳转细胞(HCT116、HT29)分别建立实验组(RANBP9-shRNA)、对照组(Control)和阴性对照组;取 10^5 个对数生长期的细胞接种到6孔板中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 含 5% CO_2 的培养箱中培养。次日每孔更换为含有Fluorouracil(终浓度为 20 mg/L)的完全培养基,阴性对照组更换为不含Fluorouracil的完全培养基,继续培养 24 h 。收集细胞培养上清液和贴壁细胞,用PBS以 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心洗涤,以结合缓冲液重悬至每毫升 10^6 个细胞;吸取 $100\ \mu\text{L}$ 细胞溶液,用Annexin V-APC和PI各 $5\ \mu\text{L}$ 染色,暗室孵育 15 min 后再加入结合缓冲液 $400\ \mu\text{L}$,然后进行流式细胞分析,检测过程进行了荧光补偿以排除发射光谱的重叠。

1.4 caspase-2酶活力实验

取 10^4 个细胞接种到96孔板中,过夜培养。诱导细胞凋亡后收集细胞,在细胞沉淀中加入 $100\ \mu\text{L}$ 裂解缓冲液,吹打均匀,冰上裂解 60 min , $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心($10\ 000\text{ r/min}$) 5 min ;吸取 $50\ \mu\text{L}$ 上清至96孔板,加入 $50\ \mu\text{L}$ 含DTT的反应缓冲液,每孔再加入 $5\ \mu\text{L}$ caspase-2底物并混匀; $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 4 h 后,用多功能酶标仪在 $\lambda=405\text{ nm}$ 处测定 D 值, $D_{\text{Fluorouracil}}/D_{\text{none}}$ (阴性对照)的倍数定义为诱导凋亡后的caspase-2活化程度。

1.5 RNA抽提和基因芯片检测

采用TRIzol试剂进行样本总RNA抽提,然后总RNA经NanoDrop 2000检测,需满足 $1.7 < D_{260}/D_{280} < 2.2$,并经Bioanalyze 2100电泳质检 $\text{RIN} \geq 7.0$ 和 $28\text{S}/18\text{S} > 0.7$ 。质检合格的RNA样本由上海吉凯基因化学技术有限公司使用Affymetrix公司提供的芯片进行分析;使用Benjamini-Hochberg法对显著差异水平进行校正(false discovery rate, FDR),显

著性差异基因的筛选标准为: $|\text{Fold Change}| > 1.5$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 。

1.6 生物信息学分析

(1)功能分析:将上述差异表达基因基于Gene Ontology数据库进行分子功能注释^[6],并采用基于超几何分布的Fisher exact test计算 P 值,显著性筛选的标准为 $P < 0.05$ 。(2)通路分析:将差异表达基因列表与IPA(Ingenuity Pathway Analysis, <http://www.ingenuity.com>)数据库中各个基因集合之间进行富集分析,得到差异基因所参与的所有基因集,利用Fisher精确检验计算每个基因集的 P 值,显著性筛选的标准为 $P < 0.05$;基因的上下调信息与文献记载的上下调信息比较,给出 z -score来显示通路是被激活或者抑制的,Ratio值显示差异基因数与该基因集中包含的所有基因数的比值。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0软件,基因mRNA表达量的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 RANBP9-shRNA促进氟尿嘧啶诱导的CRC细胞凋亡

建立RANBP9-shRNA稳转细胞后,我们验证了RANBP9表达的敲减效率在HCT116和HT29细胞中分别为 0.691 和 0.593 (图1),与蛋白水平的检测结果相符^[3]。流式细胞凋亡检测显示,RANBP9-shRNA组在氟尿嘧啶处理 24 h 后的凋亡细胞数明显高于control组,其中在HCT116细胞实验中 $P < 0.01$,在HT29细胞实验中 $P < 0.05$ (图2A和图2B)。Caspase-2酶活力实验显示,无论是HCT116细胞还是HT29细胞,在氟尿嘧啶诱导后RANBP9-shRNA组的cas-

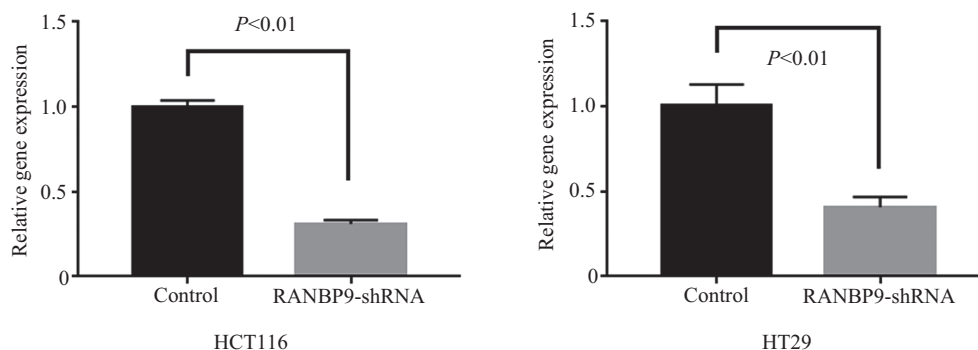


图1 RT-qPCR检测实验组(RANBP9-shRNA)和对照组(Control)的RANBP9 mRNA的表达

Fig. 1 RT-qPCR was used to detect the mRNA levels of RANBP9 in RANBP9-shRNA group and Control group

pase-2酶活力($D_{\text{Fluorouracil}}/D_{\text{none}}$)明显高于Control组(图2C)。这些数据提示, RANBP9可以调控CRC细胞的凋亡。

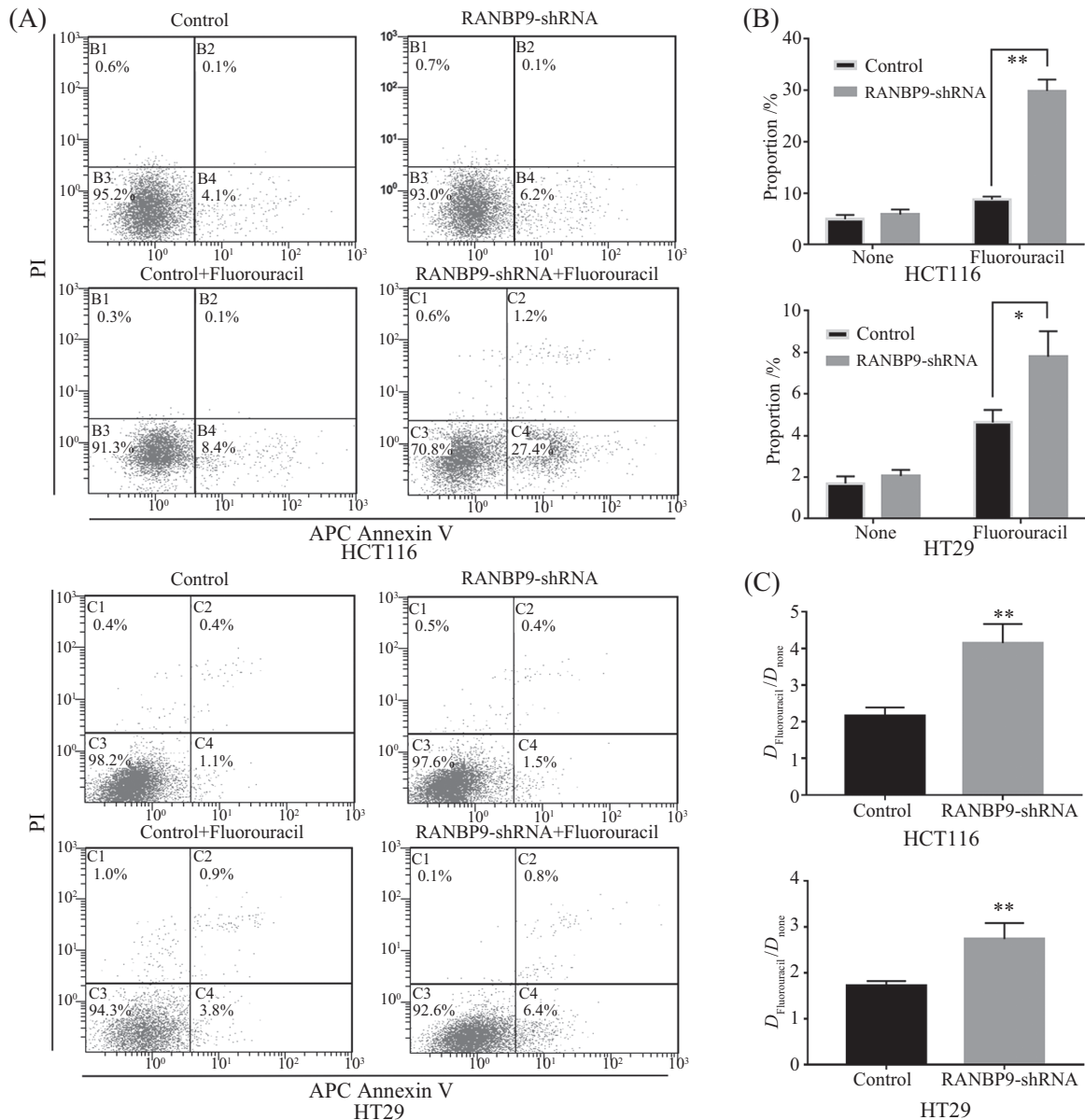
2.2 基因芯片样品总RNA的质量

经检测 D_{260}/D_{280} 比值介于 2.00~2.05, 电泳条带清晰、无明显降解; RNA样品平均浓度为 (975.5 ± 61.8) ng/ μL , 总RNA质量完好, 结果合格, 可

以进行芯片实验(表1)。

2.3 芯片数据的质量评估

(1)本实验不同样本的信号强度分布曲线重合度好, 表示芯片实验的可靠性高(图3A)。(2)本实验所有样本的相对对数信号强度箱线图的分布相近, 表示数据的重复性好(图3B)。(3)主成分分析: 实验组和对照组内样本聚集趋势明显, 组间分离



A: 氟尿嘧啶处理前和处理24 h后的结直肠癌HCT116、HT29细胞经APC/PI双染色后的流式细胞分析图; B: 流式细胞仪检测的凋亡细胞定量分析统计图; C: 多功能酶标仪检测HCT116、HT29细胞的caspase-2活性, $D_{\text{氟尿嘧啶}}/D_{\text{阴性对照}}$ 的倍数表示caspase-2活化程度。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: flow cytometric analysis of HCT116 and HT29 cells in RANBP9-shRNA group and Control group by APC/PI double staining before and after 24 h treatment of fluorouracil; B: quantitative analysis of apoptotic cells by flow cytometry; C: the caspase-2 activities of HCT116 and HT29 cells in RANBP9-shRNA group and Control group were detected by a multimode reader. $D_{\text{fluorouracil}}/D_{\text{none}}$ indicates the activation of caspase-2; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

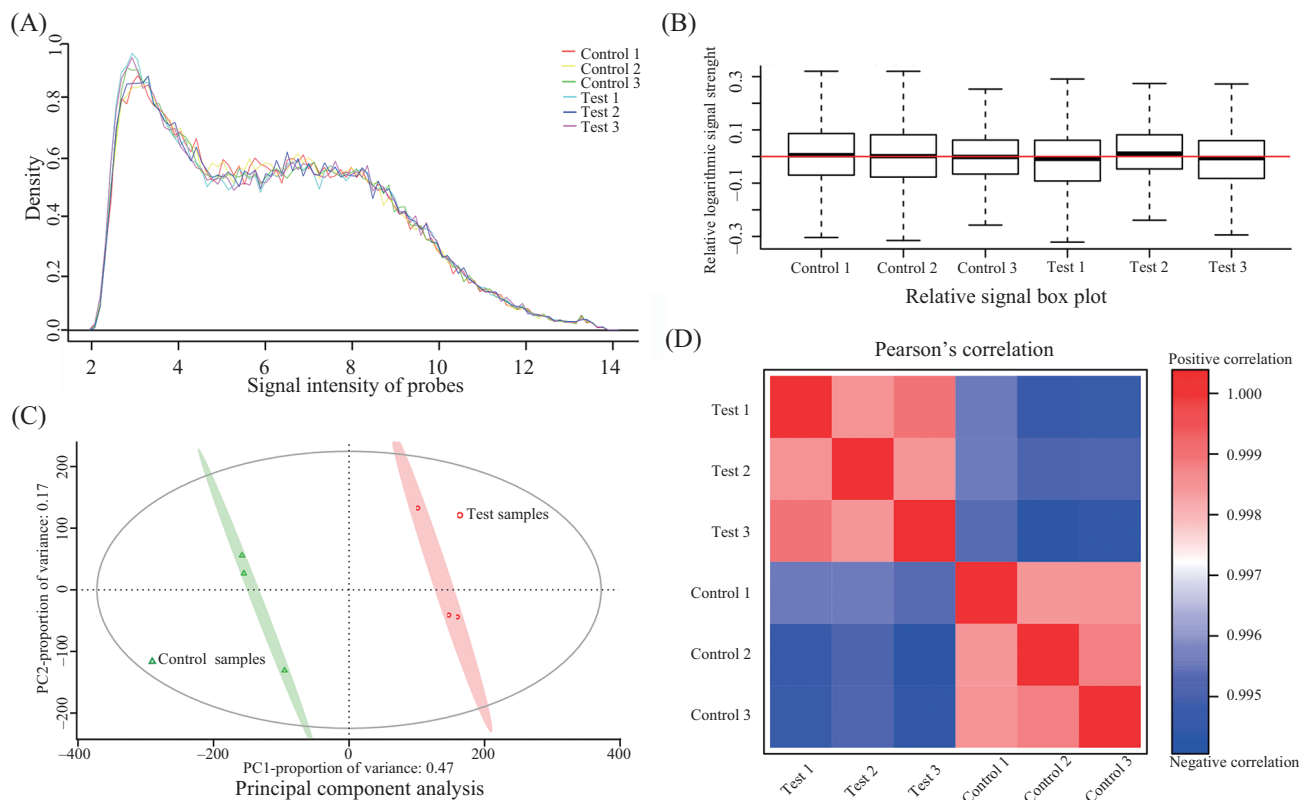
图2 RANBP9-shRNA促进氟尿嘧啶诱导的结直肠癌细胞凋亡

Fig. 2 RANBP9-shRNA promotes apoptosis of colorectal cancer cells induced by fluorouracil

表1 总RNA质检结果

Table 1 Total RNA quality evaluation

样品 Sample	浓度/ng· μL^{-1} Concentration /ng· μL^{-1}	D_{260}/D_{280}	RIN	28S/18S
Control 1	966.7	2.05	10	2.8
Control 2	1057.1	2.03	10	2.8
Control 3	949.3	2.00	10	2.7
Test 1	875.3	2.04	10	2.8
Test 2	1011.7	2.01	10	2.6
Test 3	993.1	2.02	10	2.5



A: 所有芯片探针的信号强度分布曲线图; B: 相对对数信号强度箱线图; C: 主成分分析得分图; D: 样本间皮尔森相关系数分布图。

A: the signal intensity distribution curve of all probes; B: the graph of relative logarithmic signal intensity; C: the graph of principal component analysis; D: the distribution of Pearson correlation coefficient.

图3 芯片数据的质量评估

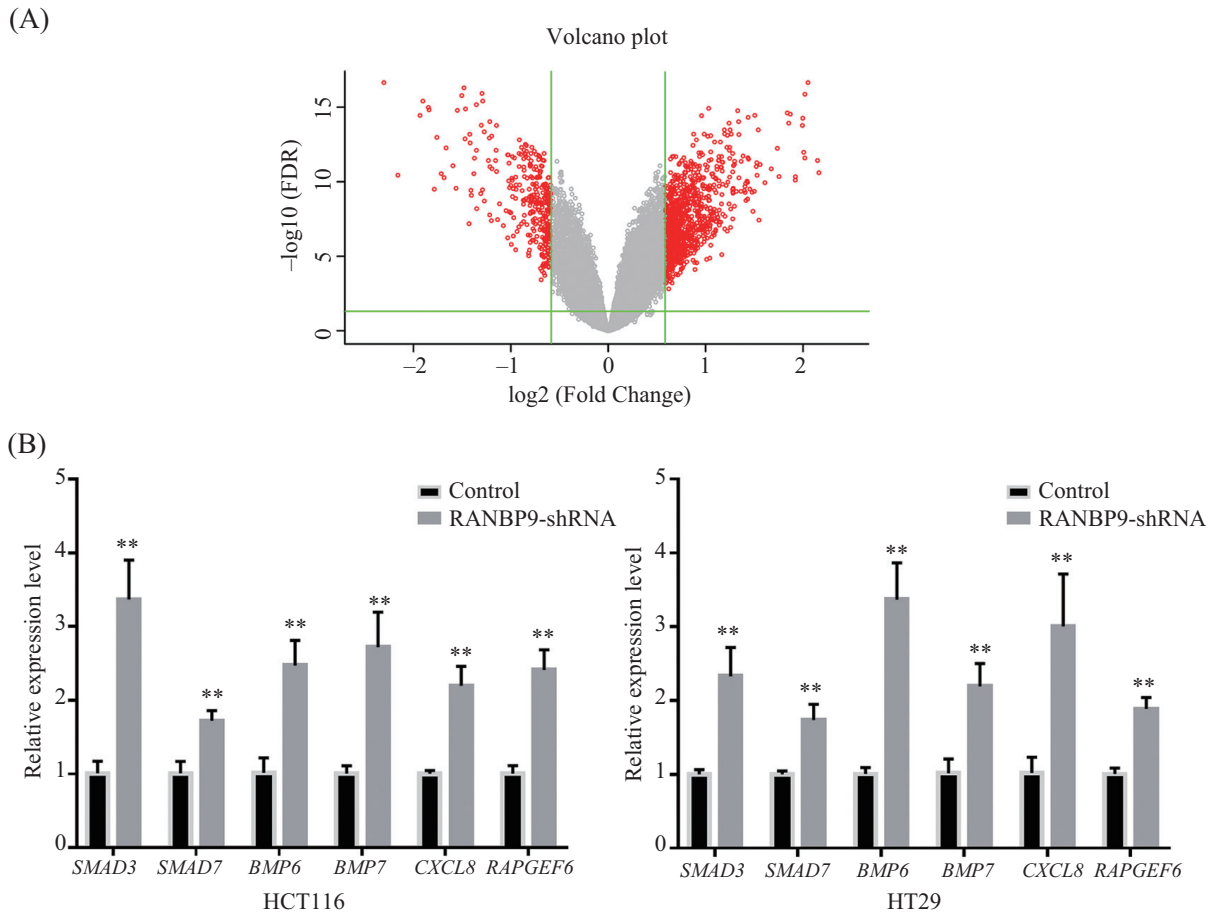
Fig.3 Quality evaluation of microarray data

趋势明显,提示组内样本相似,组间差异显著,符合继续分析标准(图3C)。(4)实验组、对照组内的皮尔森相关系数均大于0.99,提示同组内样本的基因表达趋势相似度高;组间相关系数均显著低于组内相关系数,提示组间差异大,符合继续分析标准(图3D)。

2.4 基因芯片检测结果

在本实验中,我们先滤除信号强度排序最低的20%范围内的探针,然后滤除变异系数均大

于25%的探针,共得到的探针数目为:39 276。按照预定的筛选标准,我们最后得到差异表达mRNAs 857个,其中上调表达677个,下调表达180个(图4A)。基于Gene Ontology数据库进行GO注释,其涉及的分子功能主要包括 γ -谷氨酰转移酶活性、钙离子结合、胰岛素受体结合、病毒受体活性、GTP酶活性、细胞外基质结合、 β -连环蛋白结合、SMAD结合、转录调节、AMP活化蛋白激酶活性、蛋白质转运蛋白活性、细



A: 横坐标为差异倍数(以2为底的对数变换), 纵坐标为差异的显著性FDR(以10为底的对数变换), 红色点为以 $|\text{Fold Change}| > 1.5$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 为筛选标准得到的显著性差异基因, 灰色点为其他无显著差异的基因, 总的基因探针数为39 276个; B: RT-qPCR检测HCT116、HT29细胞中相关分子mRNA水平的变化; ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: the abscissa is the Fold Change of the difference (the logarithmic transformation based on 2), the ordinate is the FDR of the difference (the logarithmic transformation based on 10), the red dots are the differentially expressed genes obtained by the criteria of $|\text{Fold Change}| > 1.5$ and $\text{FDR} < 0.05$, the gray dots are the other genes without significant difference; the total number of probes is 39 276; B: the mRNA level of selected molecules was detected by RT-qPCR in HCT116 and HT29 cells. ** $P < 0.01$ compared with control group.

图4 基因芯片火山图与RT-qPCR验证
Fig.4 Volcanic map and RT-qPCR assay

胞骨架结合等(表2)。

2.5 生物信息学分析结果

基于IPA软件的注释系统, 我们将所有差异基因数据输入IPA软件后进行经典通路分析, 这些差异基因显著参与的信号通路主要涉及癌症的TGF- β 、BMP、IL-8、RhoA、ErbB、GDNF、GNRH、mTOR、HGF、结直肠癌转移、Stat3、GPCR介导的肠内分泌、EGF、P53、AMPK信号等以及VEGF家族配体-受体相互作用、细胞周期G₁/S检验点调节等(表3)。我们后续在HCT116、HT29细胞样品中进行RT-qPCR实验验证: 上述通路中的SMAD3、SMAD7、BMP6、BMP7、CXCL8、RAPGEF6的mRNA表达水平在RANBP9-shRNA组中均显著高于

Control组(图4B)。

3 讨论

RANBP9是一种分子量为90 kDa的蛋白, 最初是由NISHIMOTO等学者通过酵母双杂交实验利用G蛋白胞核运输的调节分子RAN(ras-related nuclear protein)作为诱饵筛选并鉴定出来的、第9个RAN结合分子, RAN属于Ras超家族成员, 可以携带GTP, 控制DNA合成和细胞周期进程^[7]。RANBP9在不同的生物中保守, 包括人类、恒河猴、小鼠和青蛙, 它在哺乳动物组织中广泛表达, 几乎所有组织和细胞中都能检测到^[8]。RANBP9在免疫系统和神经系统中的研究比较充分, 已经被发现参与免疫细胞、神经

表2 差异表达基因的Gene Ontology分子功能分析

功能 Function	基因数 Molecules	P值 P value
Gamma-glutamyltransferase activity	6	$P<0.01$
Calcium ion binding	52	$P<0.01$
Insulin receptor binding	7	$P<0.01$
Virus receptor activity	10	$P<0.01$
GTP binding	30	$P<0.01$
Extracellular matrix binding	6	$P<0.01$
GTPase activity	20	$P<0.01$
Beta-catenin binding	10	$P<0.05$
Neutral amino acid transmembrane transporter activity	4	$P<0.05$
R-SMAD binding	5	$P<0.05$
Protease binding	11	$P<0.05$
Amino acid transmembrane transporter activity	7	$P<0.05$
Transcription factor activity	5	$P<0.05$
Double-stranded RNA binding	8	$P<0.05$
Glutathione hydrolase activity	3	$P<0.05$
MHC class II receptor activity	4	$P<0.05$
AMP-activated protein kinase activity	3	$P<0.05$
Protein transporter activity	8	$P<0.05$
Actin binding	20	$P<0.05$
Myosin heavy chain binding	3	$P<0.05$

细胞的信号转导,它是细胞信号分子相互作用的一个平台^[7,9]。文献及我们的前期研究发现, RANBP9与骨肉瘤、肺癌、胃癌、乳腺癌和CRC的发生发展有关,但其背后的分子机制并不完全明确^[3-4,10-12];而且,在胃癌和肺癌的化学治疗过程中, RANBP9起着截然相反的作用^[4-5],这可能取决于肿瘤分期或其他临床特征,但也可能是细胞类型特异性的。本研究通过流式细胞仪检测发现,在体外RANBP9-shRNA可以促进氟尿嘧啶诱导的CRC细胞凋亡;通过基因表达谱实验和IPA分析,我们发现, RANBP9调控CRC细胞凋亡的途径可能涉及TGF- β 、BMP、IL-8和RhoA等信号通路。

本项目中TGF- β 信号通路被显著激活,芯片中表达上调的SMAD3、SMAD7得到了RT-qPCR的验证。该信号通路调节细胞的生长、分化、凋亡、细胞运动、细胞外基质生成、血管生成和细胞免疫反应,它表现出一种矛盾的活性,在肿瘤发生早期它抑制肿瘤活性,但在晚期则促进肿瘤生长、侵袭和转移^[13]。在CRC细胞中,TGF- β 1通过

激活Smad2、Smad3和Smad1/5/8诱导EMT和侵袭;在体内,TGF- β 1显著增强CRC肝转移、肿瘤细胞有丝分裂/凋亡率、血管生成和祖细胞的循环水平;通过使用特定的肽抑制TGF- β 1信号传导,可以逆转这种细胞因子所产生的促癌作用^[13-14]。越来越多的研究表明,靶向TGF- β 信号可以促进CRC细胞凋亡、减少肿瘤转移;目前正在针对TGF- β 进行的临床研究,包括小分子受体激酶抑制剂、单克隆抗体、反义寡核苷酸、嵌合蛋白和疫苗等^[15]。SMAD7不同于SMAD3,被认为是TGF- β 通路的抑制因子,而在本研究中也表达上调,这需要进一步的实验分析。

本项目中BMP信号通路也被显著激活,其中表达上调的BMP6、BMP7得到了RNA水平的验证。在70%的散发性结直肠癌中,可以观察到BMP信号的丢失与肿瘤分级相关;还有研究发现,BMP2、BMP3和BMP7具有抑制生长的作用,它们的失活可能导致腺瘤癌变^[16-17]。但是也有不同的意见认为,BMP4和BMP7在CRC中的表达随着腺瘤-癌序列的

表3 差异基因在Ingenuity经典通路中的显著性富集情况

Table 3 Significant enrichment of the differential expressed genes in Ingenuity canonical pathways

Ingenuity经典通路 Ingenuity canonical pathways	$-\log(P\text{值})$ $-\log(P\text{ value})$	比值 Ratio	z -值 z -score	Ingenuity经典通路 Ingenuity canonical pathways	$-\log(P\text{值})$ $-\log(P\text{ value})$	比值 Ratio	z -值 z -score
TGF- β signaling	5.25	0.15	0.91	PI3K signaling in B lymphocytes	2.00	0.08	2.53
BMP signaling pathway	4.45	0.15	2.31	HGF signaling	1.97	0.08	1.90
IL-8 signaling	3.85	0.09	1.41	Colorectal cancer metastasis signaling	1.97	0.07	1.70
RhoA signaling	3.82	0.11	2.89	STAT3 pathway	1.93	0.09	1.00
ErbB4 signaling	2.72	0.12	0.82	Aryl hydrocarbon receptor signaling	1.89	0.08	0.33
Bladder cancer signaling	2.70	0.11	-1.00	CDK5 signaling	1.87	0.09	1.00
IGF-1 signaling	2.63	0.10	2.53	IL-3 signaling	1.83	0.09	2.12
Nitric oxide signaling	2.60	0.10	1.90	GPCR-mediated enteroendocrine signaling	1.80	0.10	1.13
GDNF family ligand-receptor interactions	2.57	0.11	1.89	IL-1 signaling	1.75	0.09	2.12
PPAR α /RXR α activation	2.52	0.08	-0.54	Th2 pathway	1.71	0.07	1.41
GNRH signaling	2.45	0.08	2.31	VEGF family ligand-receptor interactions	1.70	0.09	1.41
ErbB signaling	2.37	0.10	1.27	Cell cycle: G ₁ /S checkpoint regulation	1.48	0.09	1.63
Renal cell carcinoma signaling	2.36	0.10	1.63	EGF signaling	1.45	0.09	2.45
P2Y purigenic receptor signaling pathway	2.33	0.09	2.89	Sirtuin signaling pathway	1.45	0.06	1.07
Endothelin-1 signaling	2.31	0.08	2.32	Macropinocytosis signaling	1.43	0.08	1.34
NRF2-mediated oxidative stress response	2.25	0.08	0.71	IL-2 signaling	1.40	0.09	1.34
PEDF signaling	2.21	0.10	-0.33	SAPK/JNK signaling	1.35	0.07	1.89
VDR/RXR activation	2.16	0.10	-1.00	Role of NFAT in the immune response	1.35	0.06	1.51
mTOR signaling	2.09	0.07	-0.30	p53 signaling	1.33	0.07	-0.82
CXCR4 signaling	2.05	0.08	1.16	B cell receptor signaling	1.32	0.06	2.89
UVB-induced MAPK signaling	2.03	0.11	1.89	AMPK signaling	1.31	0.06	2.71

z -值: 正值表示通路是被激活的, 而负值表示被抑制; Ratio: 在此信号通路中差异基因数与该通路中包含的所有基因数的比值。

z -score: a positive value indicates that the pathway is activated, while a negative value indicates inhibition; Ratio: the ratio of the number of differential genes to all genes in the same pathway.

进展而增加, 并与更差的预后相关; 而且体外实验发现, 自分泌BMP4信号抑制CRC细胞凋亡^[18-19]; 另有研究发现, 只有当TP53和SMAD4保持正常功能时, BMP通路才能抑制CRC中的Wnt信号, 而当过度激活时, BMP信号可以激活浸润前沿的CRC细胞中的Wnt信号进而调控CRC细胞的凋亡^[20]。

本项目中IL-8和Rho信号均被显著激活。IL-8被发现可以促进肿瘤增殖, 抑制凋亡, 而干扰它的表达则可以诱导肿瘤凋亡; 在结直肠癌中, IL-8还可通过金属蛋白酶裂解促进肿瘤细胞增殖, 调节黏附和侵袭, 重组表达IL-8趋化因子可以刺激细胞生长^[21-23]。Rho家族的小GTP酶, 包括RhoA、RAC和CDC42, 是在GTP结合的活性形式和GDP非活性形式之间循环的分子开关, 参与致癌的关键过程, 如增殖、极化、凋亡、黏附、浸润和转移, 它的激活可以促进不同类型细胞的恶性转化^[24]。上述通路中的CXCL8和RAPGEF6的mRNA在实验组中表达上调, 与上述文献的结果相悖; 这可能是多个信号转导通路之间的一种反馈作用, 未来需要进行通路间交互作用的分析来阐明其中的机制。

RANBP9在分子结构上也支持以上所分析的多样功能。它具有支架蛋白的许多特征, 包括蛋白质相互作用序列, 细胞骨架结合结构域以及信号转导分子的多个经典锚定位点, 比如它可以与MAPK、ERK信号通路中的Src和Grb2的高亲和力结合; 它包含一个SPRY结构域, 被发现能与肝细胞生长因子酪氨酸激酶受体MET相互结合, 在SPRY远端还包含LisH/CTLH结构域, 这些结构域被认为可调节与微管的结合^[7,9]。

综上所述, RANBP9是真核细胞的重要生物学分子之一, 它调控了CRC细胞的凋亡, 可能是CRC个体化治疗的一个新靶点。我们当前的研究为RANBP9在CRC发生发展中的分子机制研究提供了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] MILLER K D, NOGUEIRA L, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(5): 363-85.
- [2] SANSREGRET L, VANHAESEBROECK B, SWANTON C. Determinants and clinical implications of chromosomal instability in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(3): 139-50.
- [3] QIN C, ZHANG Q, WU G. RANBP9 suppresses tumor proliferation in colorectal cancer [J]. Oncol Lett, 2019, 17(5): 4409-16.
- [4] SHAO S, SUN P H, SATHERLEY L K, et al. Reduced RanBPM expression is associated with distant metastasis in gastric cancer and chemoresistance [J]. Anticancer Res, 2016, 36(3): 1295-303.
- [5] PALMIERI D, SCARPA M, TESSARI A, et al. Ran Binding Protein 9 (RanBP9) is a novel mediator of cellular DNA damage response in lung cancer cells [J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 18371-83.
- [6] GAUDET P, DESSIMOZ C. Gene ontology: pitfalls, biases, and remedies [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1446: 189-205.
- [7] MURRIN L C, TALBOT J N. RanBPM, a scaffolding protein in the immune and nervous systems [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2007, 2(3): 290-5.
- [8] SALEMI L M, LOUREIRO S O, SCHILD-POULTER C. Characterization of RanBPM molecular determinants that control its subcellular localization [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117655.
- [9] SALEMI L M, MAITLAND M E R, MCTAVISH C J, et al. Cell signalling pathway regulation by RanBPM: molecular insights and disease implications [J]. Open Biol, 2017, 7(6): 170081.
- [10] ZHU L L, WANG C H, YANG H P, et al. Expression of cartilage antitumor component RanBP9 in osteosarcoma [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2016, 30(1): 103-10.
- [11] ZHAO Z, CHENG S, ZABKIEWICZ C, et al. Reduced expression of RanBPM is associated with poorer survival from lung cancer and increased proliferation and invasion of lung cancer cells *in vitro* [J]. Anticancer Res, 2017, 37(8): 4389-97.
- [12] EMBERLEY E D, GIETZ R D, CAMPBELL J D, et al. RanBPM interacts with psoriasin *in vitro* and their expression correlates with specific clinical features *in vivo* in breast cancer [J]. BMC Cancer, 2002, 2: 28.
- [13] ITATANI Y, KAWADA K, SAKAI Y. Transforming growth factor-beta signaling pathway in colorectal cancer and its tumor microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2019, doi: 10.3390/ijms20235822.
- [14] VILLALBA M, EVANS S R, VIDAL-VANACLOCHA F, et al. Role of TGF-beta in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy [J]. Cell Tissue Res, 2017, 370(1): 29-39.
- [15] COLAK S, TEN DIJKE P. Targeting TGF-beta signaling in cancer [J]. Trends Cancer, 2017, 3(1): 56-71.
- [16] KODACH L L, WIERCINSKA E, DE MIRANDA N F, et al. The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers [J]. Gastroenterology, 2008, 134(5): 1332-41.
- [17] HARDWICK J C, KODACH L L, OFFERHAUS G J, et al. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(10): 806-12.
- [18] MOTOYAMA K, TANAKA F, KOSAKA Y, et al. Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(5): 1530-7.
- [19] YOKOYAMA Y, WATANABE T, TAMURA Y, et al. Autocrine BMP-4 signaling is a therapeutic target in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2017, 77(15): 4026-38.
- [20] VOORNEVELD P W, KODACH L L, JACOBS R J, et al. The BMP pathway either enhances or inhibits the Wnt pathway depending on the SMAD4 and p53 status in CRC [J]. Br J Cancer,

- 2015, 112(1): 122-30.
- [21] GUO Y, ZANG Y, LÜ L, et al. IL8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NFkappaB pathway in prostate cancer [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 9035-42.
- [22] CHOI S H, PARK J Y, KANG W, et al. Knockdown of HIF-1alpha and IL-8 induced apoptosis of hepatocellular carcinoma triggers apoptosis of vascular endothelial cells [J]. Apoptosis, 2016, 21(1): 85-95.
- [23] SUN Q, SUN F, WANG B, et al. Interleukin-8 promotes cell migration through integrin alphavbeta6 upregulation in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2014, 354(2): 245-53.
- [24] LAWSON C D, RIDLEY A J. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion [J]. J Cell Biol, 2018, 217(2): 447-57.