



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.11.017

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.11.017

· 临床研究 ·

# WD 重复结构域相关蛋白 3 对胃恶性肿瘤细胞增殖的影响

贾佳 王琦 卢光新 金灵莉

**[摘要]** **目的** 探讨外源性基因 WD 重复结构域相关蛋白 3(RFWD3)对胃恶性肿瘤细胞增殖的影响。**方法** 通过癌症基因组图谱(TCGA)数据库选出目的基因,实验分为 shCtrl 组和 shRFWD3 组,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测该基因在胃癌细胞株中的表达,构建慢病毒载体,慢病毒感染胃癌细胞,通过 RT-PCR 检测 mRNA 水平目的基因的敲减率,使用 Celigo 仪器检测细胞增殖,采用比色法(MTT)检测 RFWD3 对目的细胞增殖的影响。**结果** 通过 TCGA 数据库及统计分析,筛选出目的基因 RFWD3。RT-PCR 检测结果显示,该基因在胃腺癌细胞 AGS 中呈高表达( $P < 0.05$ )。慢病毒感染细胞后,shRFWD3 组细胞感染效率达到 80% 以上。RT-PCR 检测结果显示,胃腺癌细胞 AGS 中 RFWD3 基因在 mRNA 水平的表达量受到抑制( $P < 0.05$ ),敲减率达 50.7%。Celigo 仪检测结果显示,经 shRNA 慢病毒感染 AGS 细胞 72 h 后,与 shCtrl 组比较,shRFWD3 组细胞的增殖速率受到明显抑制( $P < 0.05$ )。**结论** 干扰目的基因 RFWD3 具有抑制胃腺癌细胞 AGS 增殖的作用,RFWD3 基因可能成为胃癌临床治疗的潜在靶点。

**[关键词]** WD 重复结构域相关蛋白 3; 胃癌; AGS; 慢病毒

## Effect of ring finger and WD repeat domain 3 on proliferation of gastric malignant tumor cells

Jia Jia, Wang Qi, Lu Guangxin, Jin Lingli. Department of Gastrointestinal, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of ring finger and WD repeat domain 3(RFWD3) on the proliferation of gastric malignant tumor cells. **Methods** Target genes were selected through the TCGA database. The experiment was divided into shCtrl group and shRNA group. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect the expression of the gene at mRNA level in gastric cancer cell. The RFWD3-shRNA vector was constructed and transfected into gastric cancer cells. RT-PCR was used to detect the knockdown efficiency of the gene at mRNA level. Celigo was used to detect the cell growth. The effect on proliferation of gastric cancer cells was detected by MTT. **Results** Through the TCGA database and statistical analysis, the target gene RFWD3 was screened out. RT-PCR detection results showed that this gene was highly expressed in gastric cancer cell AGS ( $P < 0.05$ ). After the lentivirus infects the cells, the infection efficiency of the shRFWD3 group reached more than 80%. RT-PCR results showed that the expression of RFWD3 gene at mRNA level in gastric adenocarcinoma AGS was inhibited ( $P < 0.05$ ), and the knockdown efficiency reached 50.7%. Celigo instrument test results showed that after 72 h of infection of AGS cells with shRNA lentivirus, compared with shCtrl group, the proliferation rate of shRFWD3 group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Interfering with the target gene RFWD3 can inhibit the proliferation of gastric cancer cell AGS, and RFWD3 gene may become a potential target for clinical treatment of gastric cancer.

**[Key words]** Ring finger and WD repeat domain 3; Gastric cancer; AGS cell; Lentivirus

胃癌是全球第五大最常见的恶性肿瘤,是导致癌症死亡的第三大原因,然而胃癌发生的确切分子机制尚不清楚<sup>[1]</sup>,阻碍了个性化治疗策略的发展,因此,寻找可靠的胃部恶性肿瘤治疗性分子标记物至关重要。WD 重复结构域相关蛋白 3(RFWD3)参与 DNA 的损

伤修复<sup>[2]</sup>; <sup>125</sup>碘(<sup>125</sup>I)粒子放疗对裸鼠肝癌起到抑制作用,通过下调 RFWD3 表达抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡,成为晚期胃癌重要的辅助治疗手段<sup>[3]</sup>,但 RFWD3 表达与胃癌的发生、发展及预后也尚不清楚。本研究通过对癌症基因组图谱(TCGA)数据库及 mRNA 芯片数据分析、进行细胞功能学试验等,探索可能的分子生物学机制,论证 RFWD3 作为胃癌分子靶向治疗潜在靶点的可能性。

基金项目:十堰市科学技术研究与开发项目计划(17K72)

作者单位:442000 湖北十堰,湖北医药学院附属人民医院消化内科

通讯作者:王琦, E-mail:346639001@qq.com

## 材料与方法

1. 材料:通过 TCGA 数据库选取 RNAseqV2 的成对样本数据进行分析。TCGA 数据库现存 443 个有可用数据的样本,其中有 RNAseqV2 成对样本数据且有病理信息的一共 32 对,根据 32 对样本的 barcode 信息,使用 TMM (Trimmed Mean of M-Values) 法过滤样本。细胞株、主要试剂和仪器:人胃腺癌细胞株 AGS、人胃癌细胞株 MGC-803、人胃腺癌细胞株 BGC-823、人胃腺癌细胞株 SGC-7901 均购于上海吉凯基因公司;Trizol 购于上海普飞生物有限公司;GV115 载体、TOP10 大肠杆菌感受态细胞、Oligo dT 购于上海国药集团化学试剂有限公司;DNA sequencing 购于上海美季生物有限公司;分光光度计 Thermo、荧光显微镜、奥林巴斯凝胶成像仪购于上海天能科技有限公司。

## 2. 方法

(1)筛选候选基因:对于多个成对样本的统计,首先估算离散度,然后用一般线性模型估算基因在不同分组间是否有差异,同时采用计算方法  $\log_2(\text{Cancer}/\text{Normal})$  过滤标准为  $\geq 1$  或  $\leq -1$ ,最终确定用于分析的基因列表。

(2)逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 RFWD3 mRNA 在不同胃癌细胞中的表达:收集细胞,提取 AGS、MGC-803、BGC-823、SGC-7901 4 种细胞的总 RNA,反转录获得 cDNA,RFWD3 引物序列:上游引物 5'-GACCAACTTCATCAGCGGACT-3',下游引物 5'-CCTGCAACTCTTCAGATACAGGA-3'。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  反映各样品相对对照组样品目的基因的相对表达水平。

(3)构建载体,收获慢病毒:以 RFWD3 基因为模板,设计 RNA 干扰靶点序列,合成含干扰序列的单链 DNA oligo,退火配对,产生双链 DNA,通过其两端酶切位点直接连入酶切后的慢病毒载体,将连接产物转入制备好的大肠杆菌感受态细胞 TOP 10,送测序验证,对测序结果比对正确的克隆进行质粒抽提;质粒载体制备完毕,转染 293T 细胞,转染完成 48~72 h 进行病毒收获,然后离心浓缩去除杂质,纯化后样品分装。

(4)慢病毒感染胃腺癌细胞 AGS:复苏液氮中的胃腺癌细胞 AGS,待细胞汇合度达 80% 左右传代培养,取处于对数生长期的贴壁细胞,完全培养基制成  $3 \sim 5 \times 10^4/\text{ml}$  细胞悬液,将其分为 shCtrl 组和 shRFWD3 组,加入最适病毒进行感染(按预实验结果),8~12 h 左右更换常规培养基,观察感染后细胞状态及感染率。

(5)RT-PCR 检测细胞中 mRNA 水平 RFWD3 基因消减效率:经慢病毒感染 72 h 后,采用 RT-PCR 检测 shRFWD3 组胃腺癌细胞 AGS 中 RFWD3 基因在 mRNA

水平的表达情况,进而判断靶点的干扰效果。

(6)使用 Celigo 仪检测 RFWD3 基因消除对细胞增殖的影响:将处于对数生长期的各实验组细胞采用胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液后计数;根据细胞生长速度决定铺板细胞密度(大多数细胞铺板数设定为 2 000),每组 3 个复孔,培养体系为  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ ,铺板过程中需确保每孔加入细胞数目一致,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养;每天使用 Celigo 仪检测读板一次,连续 3~5 天;通过调整分析设置的输入参数,准确计算出每次扫描孔板中的带绿色荧光的细胞的数量;对数据进行统计绘图,绘出 5 天的细胞增殖曲线,然后进行数据分析。

(7)比色法(MTT)检测胃腺癌细胞 AGS 的增殖:分为 shCtrl 组和 shRFWD3 组,采用 shRNA 慢病毒感染 AGS 细胞,培养 5 天后,经 MTT 法处理后观察,采用多功能酶标仪在 490 nm 处检测细胞光密度值。

3. 统计学处理:应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. TCGA 数据过滤与标准化:胃癌在 TCGA 数据库现存 443 个可用数据的样本,其中 RNAseq 数据样本有 416 个,有 RNAseqV2 成对样本数据且有病理信息的一共 32 对,根据样本的 barcode 信息,拆分出 32 个成对样本的原始数据文件,显示大部分样本 Normal(癌旁)与 Cancer(癌症)样本被明显分离开,而编号 27~32 的样本表现则与其他有明显差异。前 26 个成对样本数据具有较高稳定性,更适合进行后续分析,因此对 32 个样本和 26 个样本的分组均进行计算。过滤后的 26 对样本通过差异基因列表获取。

2. RFWD3 基因筛选:候选基因筛选,通过标准设定有效减少筛选目的基因数量:(1)去除本项目所研究的癌种已有功能与临床相关性 SCI 论文报道的基因;(2)去除多次跨膜蛋白基因;(3)去除 PubMed 中相关文章数量  $> 100$  的;相关的数据来源均为可靠度较高的基因疾病数据库,最终得到的基因列表经过一定的随机浓缩,经过 Card 基因分析结果,得到最终 RFWD3。

3. RFWD3 在 4 种胃癌细胞中 mRNA 的表达比较:RFWD3 mRNA 在 4 种胃癌细胞中的表达均较高,在 AGS 中最高( $P < 0.05$ )。见图 1。

4. shRNA 慢病毒感染胃腺癌细胞 AGS:胃腺癌细胞 AGS 经过 shRNA 慢病毒感染 72 h 后显微镜下荧光观察结果显示,shCtrl 组细胞感染效率较低,而 shRFWD3

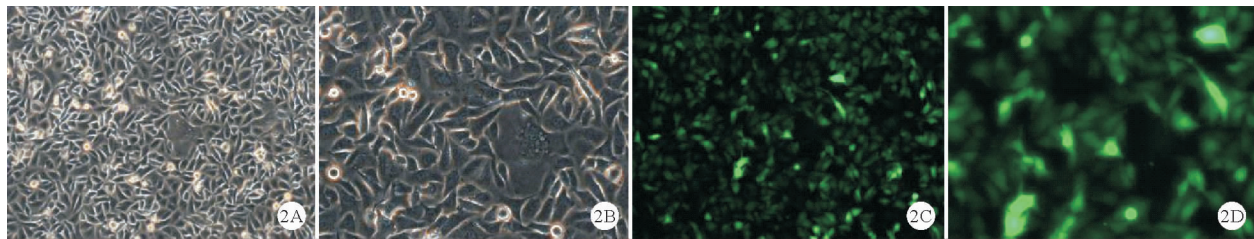


图2 显微镜下 shCtrl 组细胞的慢病毒感染结果(A:明视野, ×100;B:明视野, ×200;C:荧光视野, ×100;D:荧光视野, ×200)

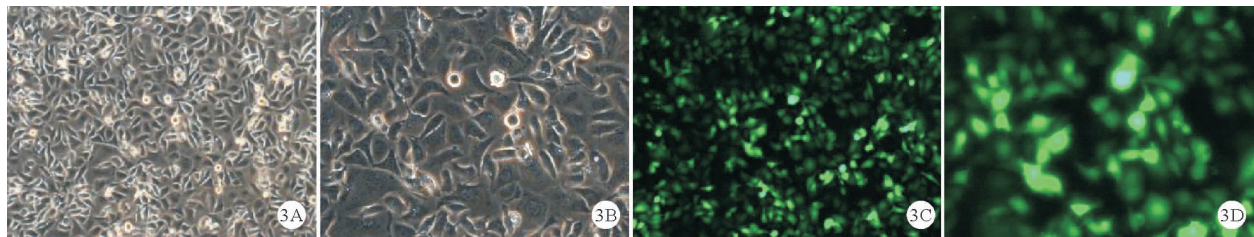


图3 显微镜下 shRFWD3 组细胞的慢病毒感染结果(A:明视野, ×100;B:明视野, ×200;C:荧光视野, ×100;D:荧光视野, ×200)

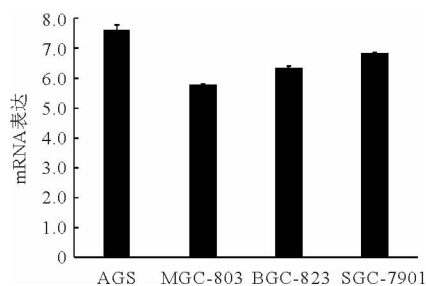


图1 RFWD3 mRNA 在不同细胞中的表达

组细胞感染效率达到 80% 以上,两组细胞状态均正常。见图 2、3。

5. 胃腺癌细胞 AGS 中 RFWD3 基因敲减率:经 shRNA 慢病毒感染后,实验组胃腺癌细胞 AGS 中 RFWD3 基因在 mRNA 水平的表达量受到抑制( $P < 0.05$ ),敲减率达 50.7%。见图 4。

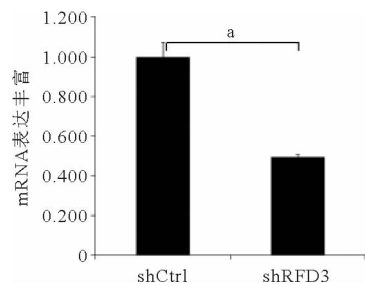


图4 基因 RFWD3 敲减后 mRNA 表达丰度比较 (注:“a” $P < 0.05$ )

6. 两组胃腺癌细胞 AGS 中敲除 RFWD3 基因后比较: Celigo 仪检测结果显示,经 shRNA 慢病毒感染 AGS 细胞 72 h 后,与 shCtrl 组比较,shRFWD3 组的细胞数量及倍数增加明显降低( $P < 0.05$ ),提示细胞增殖抑制明显。见图 5。

7. 两组胃腺癌细胞 AGS 增殖情况比较:与 shCtrl 组相比较,shRFWD3 组细胞吸收率随时间及倍数的增加而降低( $P < 0.05$ ),提示细胞增殖抑制明显,见图 6。

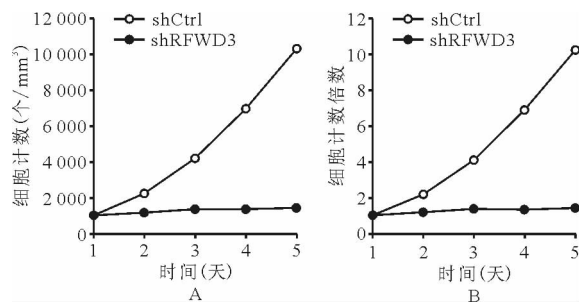


图5 慢病毒感染细胞后 RFWD3 敲减组的变化(A:细胞计数; B:细胞计数倍数)

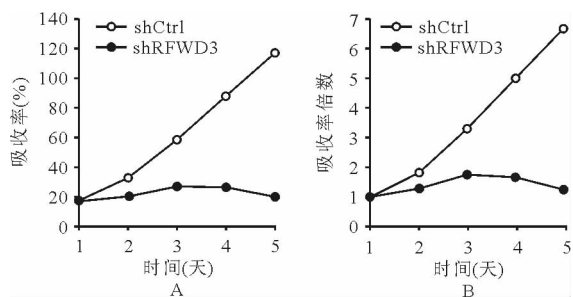


图6 RFWD3 对胃腺癌细胞 AGS 增殖的影响(A:吸收率; B:吸收率倍数)

## 讨 论

RFWD3 是 ATM/ATR 磷酸化底物,参与 DNA 损伤后的修复过程<sup>[4-5]</sup>。DNA 损伤修复时,RFWD3 被停止在复制叉处积累,与复制蛋白 A(RPA)共同定位,并通过 WD40 域与 RPA 相结合,在同源重组(HR)之后促进复制叉重新启动,通过这一机制发现 RFWD3 突

变与 Fanconi 贫血相关<sup>[6]</sup>;有文献报道,RFWD3 参与了恶性睾丸生殖细胞肿瘤的发病机制<sup>[7]</sup>;也有报道 RFWD3 基因下调能够抑制非小细胞肺癌的集落形成,与疾病预后具有相关性,且发现吸烟者的 RFWD3 基因表达水平明显高于非吸烟者<sup>[8]</sup>;在多发骨髓瘤广泛基因关联性研究中,RFWD3 属于易感位点之一,为深入了解肿瘤的提供生物学基础<sup>[9]</sup>。但 RFWD3 与胃癌相关性的报道尚未发现,本实验旨在探讨 RFWD3 是否能够成为胃癌治疗的潜在靶点。

本实验首先从 TCGA 数据库的大量样本中分离 Normal(癌旁)与 Cancer(癌症),然后通过差异基因分析,有效减少目的基因数量,随机浓缩从 Card 基因表中得出 RFWD3,但上述实验仅能说明该基因在肿瘤中呈高表达,与 RFWD3 蛋白在肝细胞癌中高表达相一致,该文献是通过基因芯片和抗体芯片探讨该基因在肝癌中的生物学机制<sup>[10]</sup>,说明与肝癌有相关性,但其与胃癌的相关性和机制尚不明确。本实验进一步通过 RT-PCR 检测在 4 种胃癌细胞中发现,RFWD3 不仅高表达,且在胃腺癌细胞 AGS 表达水平极高。为探讨该基因在胃癌的发生、发展中是否起作用,进而进行下一步实验:采用慢病毒转染、感染胃腺癌 AGS 细胞,结果显示感染率在 80% 以上;之后进行 RT-PCR 检测发现,经 shRNA 慢病毒感染后,实验组胃腺癌细胞 AGS 中 RFWD3 基因敲减率 > 50.7%,说明其为有效靶点,并且可以用于进行细胞功能学实验。为探讨 RFWD3 基因对胃癌细胞增殖的影响,本实验使用 Celigo 仪检测 RFWD3 基因消减对细胞增殖的影响,结果显示,胃腺癌细胞 AGS 的增殖速率受到显著抑制,提示 RFWD3 基因与胃腺癌细胞 AGS 的增殖能力具有显著相关性,进一步通过 MTT 检测 RFWD3 基因消减对细胞增殖的影响,结果显示,经 shRNA 慢病毒感染 72 h 后,实验组胃腺癌细胞 AGS 的增殖速率受到显著抑制,也同样提示 RFWD3 基因与胃腺癌细胞 AGS 的增殖能力显著相关。综合上述实验结果,可以看出干扰目的基因 RFWD3 对胃腺癌细胞 AGS 具有抑制其增殖的作用,但本实验未对该基因在蛋白水平及对细胞周期的影响进行检测,有待进一步研究。

在近十年的国外报道中,RFWD3 基因对 DNA 损伤修复的研究较多,如 RFWD3 是一种 E3 泛素连接酶,以单链 DNA 蛋白、RPA、重组酶 RAD51 和人类抑癌基因 P53 为靶点;如最新报道在果蝇中发现 RFWD3

发挥的作用不同于其他哺乳动物,由于果蝇中存在 Mus302,所以能够保留 RFWD3 的原始作用<sup>[11-13]</sup>,而涉及对恶性肿瘤影响的研究较少,尤其是该基因对肿瘤细胞影响的机制更为罕见。

综上所述,本实验通过 TCGA 数据库分析 RFWD3 与癌旁、癌症组织的关系、通过部分功能学实验,发现 RFWD3 能够抑制胃癌细胞 AGS 的增殖,但其是否是通过 DNA 损伤影响了 RFWD3 基因尚不明确,有待进一步研究深入探讨。

## 参 考 文 献

- [1] 周丽雅,肖士渝. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展[J]. 临床内科杂志,2018,35(12):797-799.
- [2] Liu S, Chu J, Yucer N, et al. RING finger and WD repeat domain 3 (RFWD3) associates with replication protein A (RPA) and facilitates RPA-mediated DNA damage response[J]. Biol Chem, 2011, 28(6): 22314-22322.
- [3] Ma ZH, Yang Y, Zou L. 125I seed irradiation induces up-regulation of the genes associated with apoptosis and cell cycle arrest and inhibits growth of gastric cancer xenografts[J]. Exp Clin Cancer Res, 2012, 13(10):61-68.
- [4] Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage[J]. Science, 2007, 31(6):1160-1166.
- [5] Smolka MB, Albuquerque CP, Chen SH, et al. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 10(4):10364-10369.
- [6] Knies K, Inano S, Ramirez MJ, et al. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFWD3 cause Fanconi anemia[J]. Clin Invest, 2017; 12(7): 3013-3027.
- [7] Elzinga-Tinke JE, Dohle GR, et al. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for preinvasive diagnosis[J]. Asian J Androl, 2015, 17(7):381-393.
- [8] Zhang Y, Zhao X, Zhou Y, et al. Identification of an E3 ligase-encoding gene RFWD3 in non-small cell lung cancer[J]. Front Med, 2019, 23(12):234-240.
- [9] Mitchell JS, Li N, Weinhold N, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma[J]. Nat Commun, 2016, 7(10):120-130.
- [10] 王维杰,金婉婉,潘洁,等. RFWD3 在肝细胞癌中的表达及其临床相关性研究[J]. 肝胆胰外科杂志, 2019, 31(12):741-745.
- [11] Carvajal-Garcia J, Gales ER, Ramsden DA. The Ortholog of RFWD3 Functions Independently of RAD51 During DNA Repair[J]. G3 (Bethesda), 2020, 38(9):143-149.
- [12] Fu X, Yucer N, Liu S, et al. RFWD3-Mdm2 ubiquitin ligase complex positively regulates p53 stability in response to DNA damage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(10):4579-4584.
- [13] Holl HM, Brooks SA, Archer S, et al. Variant in the RFWD3 gene associated with PATN1, a modifier of leopard complex spotting. [J] Anim Genet, 2016, 47(1):91-101.

(收稿日期:2020-03-24)

(本文编辑:张一冰)