

RASGRF1 在结直肠癌组织中高表达对肿瘤转移和不良预后的影响

聂文静^{1, 2}, 刘超², 李东风², 巩波², 卢艳娴², 陈瑜², 李子俊^{2*}

(1.南方医科大学, 广东广州 510515; 2.广东省人民医院//广东省医学科学院, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨 RASGRF1 在结直肠癌组织中表达及临床意义以及下调结肠癌细胞株 RASGRF1 表达, 检测对细胞增殖、细胞周期、迁移的影响。【方法】免疫组化法检测 35 例结直肠癌组织、35 例癌旁正常结肠组织、35 例结直肠腺瘤组织 RASGRF1 表达水平, 并分析 RASGRF1 表达与结直肠癌病人临床病理参数的关系; 采用 RNAi 技术下调结肠癌细胞株 HCT116 中 RASGRF1 表达, CCK8 法、流式细胞术检测对细胞增殖、细胞周期影响。【结果】结直肠癌组织中 RASGRF1 表达高于癌旁正常组织及结直肠腺瘤组织; RASGRF1 蛋白表达与结直肠癌病人性别($P = 0.021$)、组织分型($P = 0.009$)、有无远处转移($P = 0.019$)及 Dukes 分期($P = 0.001$)相关。女性病人 RASGRF1 表达水平高于男性病人; RASGRF1 在黏液腺癌、印戒细胞癌中表达水平显著高于腺癌; 伴有远处转移者高于无远处转移; Dukes C、D 期高于 Dukes A、B 期; 与年龄、肿瘤部位、肿瘤最大径、分化不相关($P > 0.05$)。下调 HCT116 细胞中 RASGRF1 表达可抑制其增殖、迁移及影响细胞周期。【结论】RASGRF1 可能作为促癌因子参与结直肠癌的发生发展, 进一步研究有望将作为结直肠癌患者独立预后分子标志物和新的治疗靶点。

关键词: 结直肠癌; KRAS; RASGRF1

中图分类号: R455.1; R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2015)02-0195-07

High Expression of RASGRF1 in Colorectal Cancer Tissue and Its Relationship with Tumor Metastasis and Poor Prognosis

NIE Wen-jing^{1,2}, LIU Chao², LI Dong-feng², GONG Bo², LU Yan-xian², CHEN Yu², LI Zi-jun^{2*}

(1.Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: LI Zi-jun, E-mail: zijunli2005@aliyun.com

Abstract: 【Objectives】To investigate the expression of RASGRF1 in colorectal cancer tissue and its clinical significance. To detect the effect of RASGRF1-knockdown on biological behavior of colorectal cancer cell HCT116 after RNA interference. 【Methods】Immunohistochemistry staining was performed to detected the expression level of RASGRF1 of 35 colorectal cancer tissue, 35 normal colon tissue, 35 colorectal adenoma tissue. RASGRF1 of HCT116 was knockdown by RNA interference. And cell proliferation, cell cycle were measured by CCK8, flow cytometry. 【Results】The expression of RASGRF1 in colorectal cancer was significantly higher than those of normal colon tissue and colorectal adenoma tissue. High expression level of RASGRF1 in colorectal cancer tissue was associated with female ($P = 0.021$), mucinous adenocarcinoma ($P = 0.009$), distant metastasis ($P = 0.019$), and Dukes C, Dukes D stage ($P = 0.001$), but not with age, tumor site and differentiation ($P > 0.05$). RASGRF1 siRNA significantly inhibited HCT116 proliferation, migration. 【Conclusions】RASGRF1 has a relevance to the development and progression of colorectal cancer as a tumor promoter, which may be a molecular marker and therapeutic target of colorectal cancer prognosis and treatment.

Key words: colorectal cancer, KRAS, RASGRF1

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(2): 195-201]

收稿日期: 2014-12-28

基金项目: 广东省自然科学基金(S2013020012746)

作者简介: 聂文静, 硕士研究生, 研究方向: 结直肠肿瘤分子靶向治疗, E-mail: yfniewenjing@163.com; * 通信作者: 李子俊, 主任医师, 研究生导师, E-mail: zijunli2005@aliyun.com

结直肠癌是全球第三大肿瘤,发病率逐年升高。20%新发结直肠癌为转移性结直肠癌,而另外80%的病例中的一半在疾病进展中出现转移灶,总生存期约为20个月^[1]。迄今研究表明结直肠癌的发生发展与许多分子信号通路相关,其中RAS信号通路关系最为密切^[2]。以RAS信号通路中分子为靶标,发展抑制RAS信号通路的活化的靶向治疗,如西妥昔单抗等联合化疗治疗晚期转移性结直肠癌是目前标准的治疗方法,但不适宜于KRAS分子突变的结肠恶性肿瘤。通常RAS蛋白活性受上游两类作用相反的重要分子调控处于平衡状态:即RASGEF(Guanine nucleotide exchange factors, GEF)和RASGAP(GTPase activating proteins, GAP)。RASGRF1为RASGEF家族成员之一,对突变型和野生型的KRAS均有调节作用,促进非活化RAS-GDP转化为活化的RAS-GTP,开放RAS信号通路。已有研究发现RASGRF1在横纹肌肉瘤、皮肤癌等肿瘤表达升高,下调RASGRF1可抑制这些肿瘤细胞增殖、转移^[4],而关于在结肠癌中的表达水平及其临床价值未见研究报告。本研究是在前期工作基础上筛选结肠癌细胞RASGEF家族表达谱,发现RASGRF1在结肠癌细胞中表达增高,进一步通过免疫组化检测RASGRF1在结肠癌组织中表达情况及探讨它与患者临床特征的关系,观察下调结肠癌细胞株中RASGRF1表达对细胞增殖、细胞周期、迁移影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

羊血清工作液购自中杉金桥公司,二甲苯、丙酮、30%(体积分数,300 mL/L)H₂O₂为广州化学试剂厂产品,75%(体积分数,750 mL/L)乙醇、95%(体积分数,950 mL/L)乙醇、无水乙醇分别为广东省顺宁葡萄糖药业有限公司、安徽安特生物化学有限公司产品。苏木素购自北京罗基生物技术有限公司,中性树胶为国药集团化学试剂有限公司产品。兔抗人RASGRF1单克隆抗体为Santa Cruz公司产品,二抗使用的HRP标记的兔/鼠通用抗体来源于上海基因科技公司的GTVision兔/鼠通用型免疫组化试剂盒。载玻片、盖玻片为世泰公司产品。Lipofectamine™2000为Invitrogen公司(美

国)产品。RPMI-1640培养基及血清为Gibco公司(美国)生产。96孔板及6孔板、transwell小室均为美国Corning公司产。CCK8细胞增殖检测试剂盒为上海同仁公司产品。细胞周期试剂盒为联科生物公司生产。

1.2 组织标本采集和处理

收集广东省人民医院2008年至2011年间经病理组织学证实诊断,具有完整病例资料的35例非连续结直肠癌组织、35例癌旁正常结肠组织、35例结直肠腺瘤组织石蜡包埋标本。上述标本按照标准流程制成厚度约4 μm石蜡切片。所有结直肠癌患者手术前均未接受过放疗、化学治疗及免疫治疗、生物治疗。

1.3 免疫组织化学检测

1.3.1 采用EnVision法进行免疫组织化学染色,检测RASGRF1在结直肠癌组织、结肠腺瘤组织、癌旁正常组织切片表达部位及强度。主要步骤如下:石蜡切片常规脱蜡水化;pH 9.0 Tris-EDTA抗原修复液高温高压修复;3%(体积分数,30 mL/L)H₂O₂室温避光孵育10 min消除内源性过氧化物酶,PBS洗3次;10%(质量分数,100 g/L)羊血清室温封闭10 min,小心甩去封闭液;兔抗人RASGRF1单克隆抗体(Santa Cruz)1:50稀释,室温孵育70 min,PBS漂洗;HRP-兔/鼠双抗二抗(上海基因科技公司)室温孵育40 min,PBS洗3次;DAB显色,苏木素复染,脱水透明,中性树胶封片。用已知表达阳性的人HeLa细胞作为阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。

1.3.2 结果判读和评分标准 阳性细胞必须具备:组织结构清晰;阳性颗粒定位准确;染色明显高于背景,对比清楚。采用双盲法阅片。评分标准:A:按显色细胞数记分,阳性细胞数<1/3为1分,阳性细胞数1/3~2/3为2分,阳性细胞数≥2/3为3分。B:按细胞显色深浅记分,无阳性反应细胞为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。积分数=A×B。A×B=0判断为(-),A×B=1~2判断为(+),A×B=3~4判断为(++),A×B=6~9判断为(+++)。至少随机观察5~10个高倍镜视野(放大倍数为×400)。

1.4 细胞培养

本研究使用结肠癌细胞株HCT116,培养条件为:RPMI-1640培养基,10%(质量分数,100 g/L)胎牛血清,青、链霉素各100 U/mL,pH 7.4,在37℃、

5% (体积分数, 50 mL/L) CO₂ 浓度, 饱和湿度培养。

1.5 RNA 有效序列的筛选

通过 www.qiagen.com/siRNA 设计 RASGRF1 基因 siRNA 序列, 并由 sigma 公司合成, sense: CUAAAGCUUUGAUUGAUAAdTdT, anti-sense: UUAUCAAUCAAAGCUUUAGdTdT。采用 lipo2000 法将不同浓度 siRNA 导入结肠癌细胞 HCT116 并设相应对照组。PCR 检测干扰效率, 选择干扰效率大于 70% 的干扰浓度。

1.6 细胞转染

将筛选好的 RASGRF1 有效 siRNA 序列及浓度, 采用 lipo2000 法导入目标细胞中, 并设阴性对照及空白对照。

1.7 CCK8 检测细胞增殖

采用 CCK8 法测定分别干扰 RASGRF1 前后 1、2、3 天的细胞存活率。消化细胞后吹打散细胞, 计数, 调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL, 分到 96 孔板, 每孔 100 μ L, 即每孔细胞为 1×10^4 个。贴壁细胞需待细胞贴壁后, 再收集各时间点细胞进行检测。加入 CCK8 增殖检测试剂(上海同仁公司), 比例为 1/10。即 100 μ L 培养液加入 10 μ L 检测液。避光孵育 1 h 后, 酶标仪读板, 检测读取 OD450 数据。

1.8 流式检测细胞周期

细胞转染后 48 h 后每样收集 1×10^6 细胞固定: 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗细胞两次, 加入预冷 70% (体积分数, 700 mL/L) 乙醇, 于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。细胞染色: 离心收集细胞, 以 1 mL 的 PBS 洗细胞一次, 加入 500 μ L PBS 含 50 μ g/mL 溴化丙锭 (PI), 100 μ g/mL RNase A, 0.2% (质量分数, 2 g/L) Triton X-100, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。流式分析: 以标准程序用流式细胞仪检测, 计数 2~3 万个细胞, 结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.9 细胞迁移实验

收集各个处理组细胞, 计数 1×10^5 个细胞, 用 100 μ L 无血清培养基重悬, 加入 Transwell 细胞培养板的小室上室, 在下室加入 600 μ L 完全培养基。在 37 $^{\circ}$ C, 5% (体积分数, 50 mL/L) CO₂ 孵育 48 h 后, 取出小室, 用棉签擦去上室的细胞, 4% (质量分数, 40 g/L) 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤 1 次, 结晶紫染色 10 min, PBS 洗涤 1 次, 显微镜下观察细胞穿过小孔数目, 并拍照统计。

1.10 统计方法

采用 SPSS 13.0 对实验数据进行分析。采用多个独立样本的非参数检验 (Kruskal-Wallis *H* 检验) 比较 RASGRF1 在结直肠癌组织切片和结肠腺瘤、癌旁正常组织切片的表达情况。RASGRF1 表达与结直肠癌患者临床病理参数之间的相关性采用两独立样本的非参数检验 (Mann-Whitney *U* 检验) 及多个独立样本的非参数检验 (Kruskal-Wallis *H* 检验)。用重复测量数据的方差分析及 One Way ANOVA 分析细胞增殖变化; Kruskal-Wallis *H* 检验分析细胞迁移变化。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

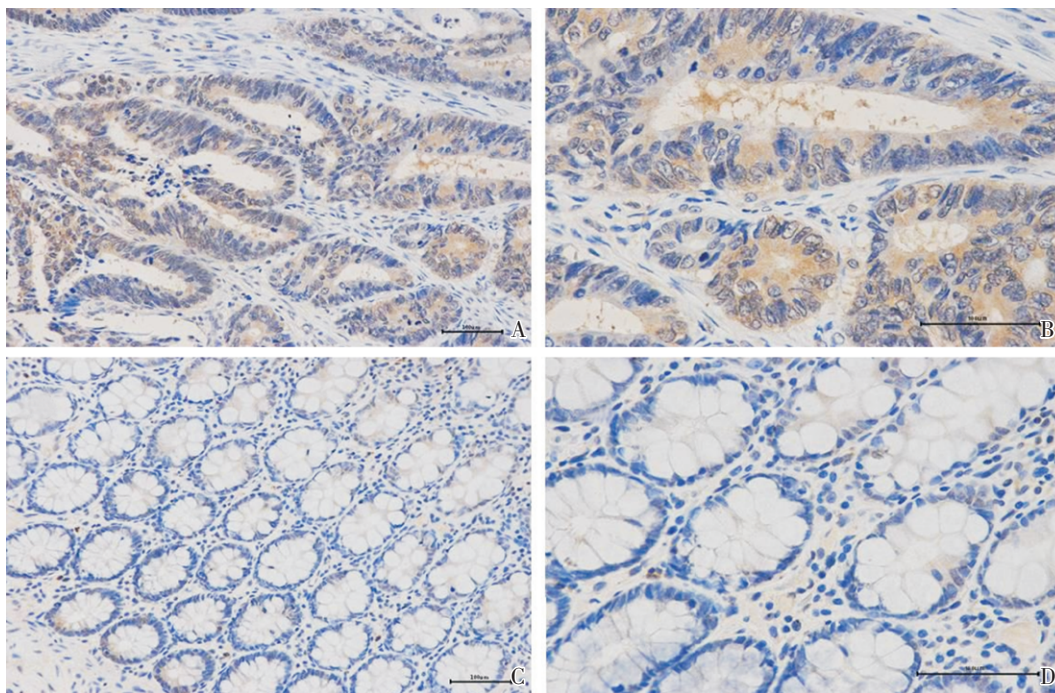
2.1 结肠癌组织、癌旁正常组织及结肠腺瘤组织中 RASGRF1 的表达情况

免疫组化结果显示: RASGRF1 蛋白在结直肠癌组织和癌旁正常组织、结直肠腺瘤组织均表达于细胞浆中, 未见明显胞核染色, 见图 1。根据前述评分标准, 对比了 35 例结直肠癌组织切片、35 例结直肠腺瘤组织及 35 例癌旁正常组织切片 RASGRF1 表达。35 例结直肠癌组织切片中, 4 例为(-), 10 例为(+), 13 例为(++), 8 例为(+++); 35 例结直肠腺瘤组织中, 2 例为(-), 14 例为(+), 16 例为(++), 3 例为(+++); 35 例癌旁正常组织切片中, 11 例为(-), 9 例为(+), 14 例为(++), 1 例为(+++)。统计分析得出: RASGRF1 在结直肠癌组织、腺瘤组织及癌旁正常组织中表达有差异 (Kruskal-Wallis *H* 检验 $P = 0.038$), 癌组织高于腺瘤及癌旁正常组织, 腺瘤组织高于癌旁正常组织。

35 例结直肠腺瘤中 17 例为管状腺瘤, 18 例为绒毛管状腺瘤, 两者在 GRF1 表达上差异无统计学意义 (Mann-Whitney *U* 检验 $P = 0.171$)。

2.2 结直肠癌组织 RASGRF1 表达水平与临床病理特征的关系

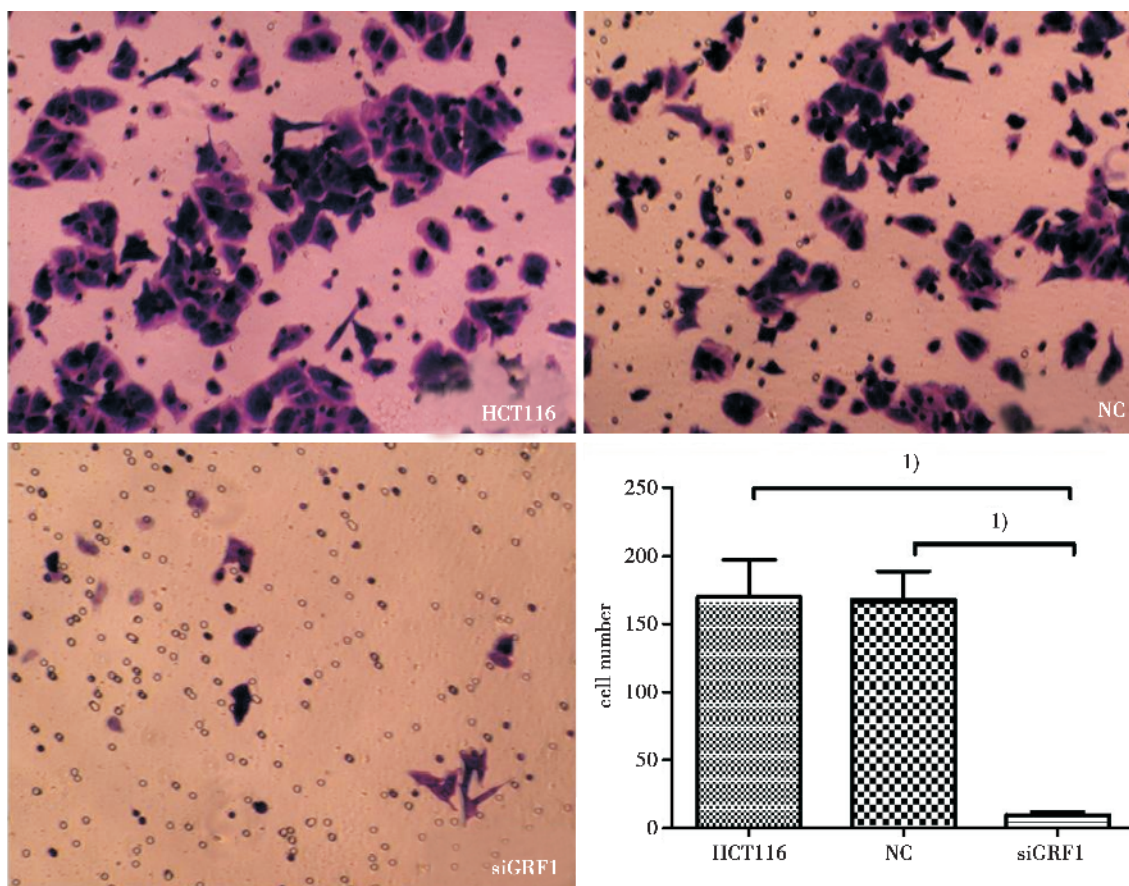
进一步分析结直肠癌组织 RASGRF1 表达水平与结直肠癌临床病理参数相关性显示, RASGRF1 蛋白表达与性别 ($P = 0.021$)、组织分期 ($P = 0.009$)、有无远处转移 ($P = 0.019$) 及 Dukes 分期 ($P = 0.001$) 相关, 女性高于男性; 黏液腺癌、印戒细胞癌高于腺癌; 有远处转移者高于无远处转移; Dukes C、D 期高于 Dukes A、B 期。与年龄、



A: colorectal cancer tissue (× 200); B: colorectal cancer tissue (× 400); C: normal colon tissue (× 200); D: normal colon tissue (× 400)

图 1 结肠组织 RASGRF1 免疫组化染色

Fig.1 Immunohistochemical staining for RASGRF1 in colon tissue



1); Kruskal-Wallis H test $P < 0.01$

图 4 RASGRF1siRNA 处理后对细胞迁移能力影响

Fig.4 The effect of RASGRF1siRNA transduction on cell migration

表1 35名结直肠癌病人肿瘤切片 RASGRF1 表达与临床病理参数关系

Clinicopathological feature		RASGRF1 expression level				P
n	-	+	++	+++		
Sex						0.021 ¹⁾
Male	21	4(19.0)	8(38.1)	5(23.8)	4(19.0)	
Female	14	0(0)	2(14.3)	7(50.0)	5(35.7)	
Age						0.558 ¹⁾
<60	18	2(11.1)	5(27.8)	5(27.8)	6(33.3)	
≥60	17	2(11.8)	5(29.4)	7(41.2)	3(17.6)	
Tumor location						0.420 ²⁾
Right colon	10	0(0)	2(20.0)	5(50.0)	3(30.0)	
Left colon	12	2(16.7)	4(33.3)	3(25.0)	3(25.0)	
Rectum	13	2(15.4)	4(30.8)	4(30.8)	3(23.1)	
Tumor size						0.228 ¹⁾
<5 cm	18	1(5.6)	5(27.8)	6(33.3)	6(33.3)	
≥5 cm	17	3(17.6)	5(29.4)	6(35.3)	3(17.6)	
Histological classification						0.009 ¹⁾
adenocarcinoma	29	4(13.8)	10(34.5)	10(34.5)	5(17.2)	
Mucinous adenocarcinoma	6	0(0)	0(0)	2(33.3)	4(66.7)	
Differentiation						0.203 ²⁾
Poor	3	0(0)	0(0)	2(66.7)	1(33.3)	
Moderate	31	4(12.9)	10(32.3)	10(32.3)	7(22.6)	
High	1	0(0)	0(0)	0(0)	1(100.0)	
Lymph node metastasis						0.075 ¹⁾
Yes	13	0(0)	2(15.4)	6(46.2)	5(38.5)	
No	22	4(18.2)	8(36.4)	6(27.3)	4(18.2)	
Distant metastasis						0.019 ¹⁾
Yes	15	0(0)	3(20.0)	6(40.0)	6(40.0)	
No	20	4(20.0)	7(35.0)	6(30.0)	3(15.0)	
Kras						0.059 ¹⁾
Wild	24	3(12.5)	9(37.5)	8(33.3)	4(16.7)	
Mutant	11	1(9.1)	1(9.1)	4(36.4)	5(45.5)	
Dukes stage						0.001 ¹⁾
A、B	17	4(23.5)	7(41.2)	5(29.4)	1(5.9)	
C、D	18	0(0)	3(16.7)	7(38.9)	8(44.4)	

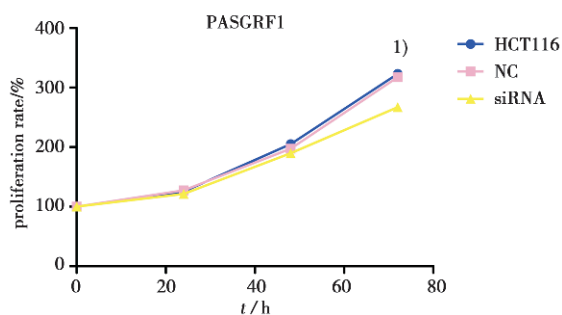
1); Mann-Whitney U test; 2); Kruskal-Wallis H test.

表2 RASGRF1siRNA 干扰对细胞增殖的影响

Table 2 The effect of RASGRF1siRNA transduction on cell proliferation (%)

Proliferation rate	Day0	Day1	Day2	Day3
HCT116	100	125.42	205.32	323.26 ¹⁾
NC siRNA	100	127.58	197.47	317.66 ¹⁾
GRF1 siRNA	100	121.40	189.91	267.03

1); One Way ANOVA $P < 0.05$



1); One Way ANOVA $P < 0.05$

图 2 RASGRF1siRNA 干扰对细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of RASGRF1siRNA transduction on cell proliferation

肿瘤部位、肿瘤最大径、分化不相关($P > 0.05$, 表 1)。

2.3 下调 RASGRF1 对结肠癌细胞增殖的作用

将 RASGRF1siRNA 及 NCsiRNA 分别导入 HCT116 细胞,发现 siRNA 组细胞增殖慢于 NC 组及正常细胞组(表 2,图 2)。

2.4 下调 RASGRF1 对结肠癌细胞周期影响

下调 RASGRF1 影响结肠癌细胞周期分布, siRNA 组细胞阻滞于 G1 期,S 期细胞明显减少,细胞分裂减少(图 3)。

2.5 下调 RASGRF1 对结肠癌细胞迁移能力影响

siGRF1 组穿过小室的结肠癌细胞明显少于无转染组和 NC 组,差异具有统计学意义 (Kruskal-Wallis H 检验, $P = 0.003$,表 3、图 4)。

3 讨论

美国癌症协会(American Cancer Society)发布了 2014 年结直肠癌数据,预测 2014 年将有 136 930 新发病例,并将有 50 310 人死于该病,是美国第三大肿瘤^[5]。在我国,由于人们的生活水平的提高及饮食结构、生活环境改变等原因,可以预计结直肠发病率和死亡率将逐年增高,严重威胁人们的生命健康^[6-8]。

许多分子参与结直肠癌发生发展,其中 KRAS 基因及其调控的 RAS 信号通路在其中占着十分重要的作用。RAS 基因家族包括与人类肿瘤相关的 KRAS、NRAS 和 HRAS。30% ~ 50%结直肠癌常见 KRAS 突变,突变位点多见于第二外显子的 12、13 密码子和第三外显子的 61 密码子。

正常情况下机体内 RAS 蛋白始终处在 RAS-GTP 和 RAS-GDP 两种循环状态,调节这两种分子状态的主要是两类重要酶蛋白分子:RASGEF 和

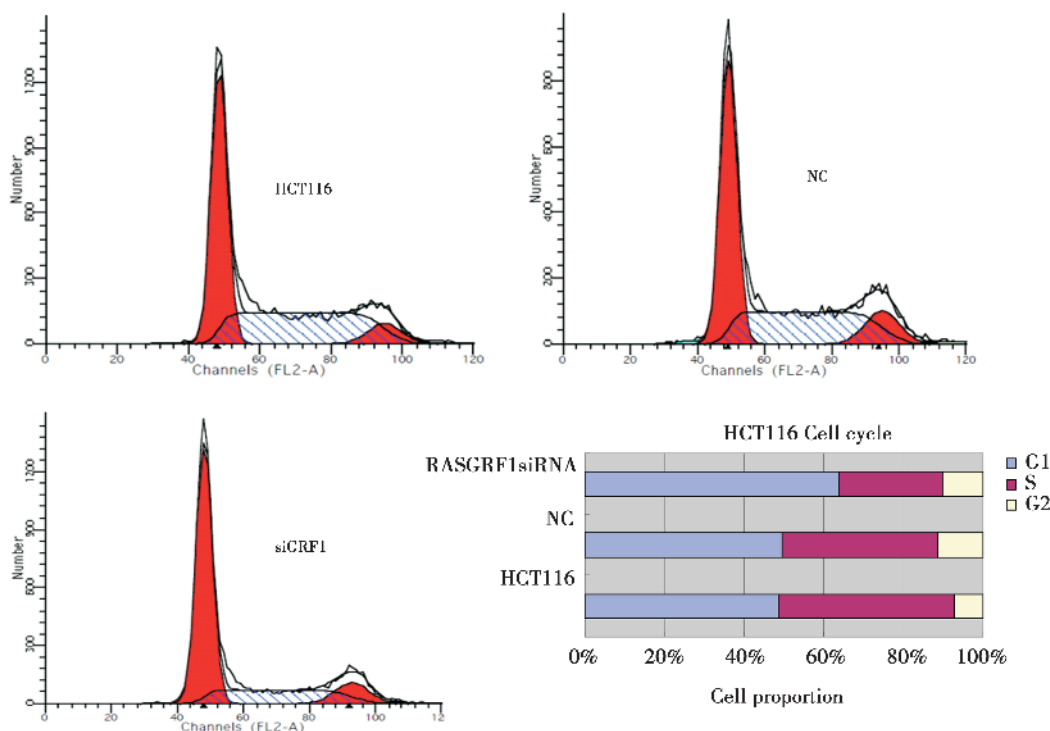


图 3 RASGRF1siRNA 干扰对细胞周期的影响

Fig.3 The effect of RASGRF1siRNA transduction on cell cycle

表 3 HCT-116 细胞处理 RASGRF1siRNA 处理后的细胞迁移实验
Table 3 The effect of RASGRF1siRNA transduction on cell migration

Sample	1	2	3	4	5	6	($\bar{x} \pm s$)
Cell	132	157	192	206	179	148	169 \pm 28.11
NCsiRNA	156	152	188	192	176	136	166.67 \pm 22.15
RASGRF1siRNA	9	9	14	8	9	12	10.17 \pm 2.32

RASGAP。RASGEF 促使 RAS-GDP 转化为活化状态的 RAS-GTP, 开放 RAS 信号通路, 而 RASGAP 则通过增加 RAS 蛋白内在的 GTPase 活性, 水解 RAS-GTP 形成 RAS-GDP 非活性形式, 关闭 RAS 信号通路实施负性调控作用^[3]。而当 RAS 基因突变后(多见于肿瘤状态), RAS 蛋白则不能与 RAS-GAP 结合, RAS-GAP 作用丧失^[9]。此时, RAS-GEF 仍然发挥作用, 结果 RAS 蛋白始终是以 RAS-GTP 活化形式非正常的持续地活化细胞内信号通路, 包括 RAS-RAF-MEK-ERK 通路和 RAS-PI3K-Akt 通路, 促进细胞的增殖和抗凋亡能力并向恶性型转化^[10]。

RAS-GEF 家族包括 SOS1/2, RASGRF1/2, RASGRP1/2/3/4(CalDAG-GEF), Epac 1/2 (cAMP-GEF), C3G, RalGDS 家族成员, RalGPS, BCAR3 和磷脂酶 C ϵ 等 20 余个家族成员^[11]。已有研究结果表明 GEF 可能作为原癌基因产物在肿瘤的形成和发展过程起重要作用, 对于突变型和野生型 KRAS 基因都有调控作用。

我们筛查了结直肠癌细胞中的 RASGEF 表达谱, 发现其中 RASGRF1, RASGRP1, RASGRP2, SOS1 四个分子在结直肠癌中表达显著增高。前期研究也已发现下调 RASGRF1 可以抑制 RAS 蛋白的活化, 但对于结肠癌细胞的生长及在结直肠癌组织中表达的临床意义未见研究报告。至今仅有关 RASGRF1 的零星报道。如 Tarnowski, M.^[4]等在人腺泡型横纹肌肉瘤组织及细胞株中检测发现 RASGRF1 mRNA 明显高于正常骨骼肌细胞。通过激光共聚焦显微镜观察到 RASGRF1 蛋白主要积聚在细胞丝状伪足, 在促转移因子刺激下, RASGRF1 磷酸化增加, 表明 RASGRF1 可能参与横纹肌肉瘤细胞转移。敲除 RASGRF1 后, 肿瘤细胞增殖、转移及体内成瘤能力下降。

本研究检测结直肠癌病人癌组织和癌旁正常组织、结肠腺瘤中 RASGRF1 的表达, 结果发现结直肠癌组织中的 RASGRF1 表达显著高于癌旁正

常组织及腺瘤组织。这提示 RASGRF1 可能在结直肠癌发生发展中起着促癌因子作用。RASGRF1 表达水平与结直肠癌病人性别、组织学分型、有无远处转移及 Dukes 分期相关。黏液腺癌及印戒细胞癌恶性程度高, 其 RASGRF1 表达高于腺癌, 表明 RASGRF1 表达量可能与肿瘤恶性程度相关。有远处转移者 RASGRF1 表达高于无远处转移者, 表明 RASGRF1 高表达可能与结直肠癌转移相关, 检测 RASGRF1 表达可能可以预测远处转移。Dukes C、D 期患者 RASGRF1 表达高于 Dukes A、B 期患者, 表明 RASGRF1 表达水平与临床病理分期相关, 对预测结直肠癌病人预后也有一定的意义。

我们还发现 RASGRF1 表达水平女性高于男性, 而与年龄、肿瘤部位、大小、组织学分型、分化等未见明显相关。我们在对肿瘤细胞生物学行为影响的初步研究中发现, 下调 RASGRF1 后, 结肠癌细胞株 HCT116 增殖明显减缓、细胞周期阻滞于 G1 期, 分裂期细胞减少, 细胞迁移能力明显下降。初步表明下调 RASGRF1 可能抑制结肠癌细胞增殖、迁移。本研究不足之处为收集的病例较少及为回顾性分析, 有待扩大样本量及进行前瞻性研究进一步验证研究所得结论。

本研究是首次检测报告了结直肠癌、结肠腺瘤、癌旁正常组织 RASGRF1 表达状况及与结直肠癌病人肿瘤组织学类型、有无远处转移、临床分期等关系, 表明了 RASGRF1 可能在结直肠癌发生发展中具有重要作用。研究结果将为下一步深入研究 RASGRF1 功能, 挖掘新的结直肠癌预测和诊治靶分子奠定基础。

参考文献

- [1] Leto SM, Trusolino L. Primary and acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer: impact on future treatment strategies [J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(7): 709-722.
- [2] Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of

- zona pellucida Micromanipulation [J]. SUN Yat-sen Univ: Med Sci, 2001, 22(5):352.
- [16] 余兰, 贾婵维, 王树玉. 慢速冷冻和玻璃化冷冻损伤对冻融胚胎的研究进展 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(3):4-5.
Yu L, Jia CW, Wang YS, et al. The research on embryo injury using slow freezing and vitrification methods [J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2014, 22(3):4-5.
- [17] Zander-Fox D, Lane M, Hamilton H. Slow freezing and vitrification of mouse morula and early blastocysts[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(8):1091-1098.
- [18] 付敏, 李永刚, 李蓉, 等. 玻璃化冻融小鼠囊胚的超微结构观察[J]. 生殖医学杂志, 2007, 16(5):351-354.
Fu M, Li YG, Li R, et al. Ultrastructural observation of frozen-thawed vitrified mouse blastocysts[J]. J Reprod Med, 2007, 16(5):351-354.
- [19] Coeero MJ, DiazdelaEsPina SM, Aguilar B. Ultrastructural characteristics of fresh frozen-thawed ovined embryos using two cryoprotectants [J]. Biol Reprod, 2002, 66(5):1244-1258.
- [20] Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, et al. Birth after vitrification at morula and blastocyst stage: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification[J]. Hum Reprod, 2002, 17(3):744-751.
- [21] 张宁媛, 孙海翔, 胡娅莉, 等. 3 种囊腔人工皱缩技术在小鼠扩张期囊胚玻璃化冷冻中的比较研究 [J]. 中华男科学杂志, 2009, 15(3):228-231.
Zhang NY, Sun HX, Hu YL, et al. Comparison of 3 Techniques for artificial shrinkage of blastocoelic cavity before vitrification of expanded mouse blastocysts [J]. Zhong Hua Nan Ke Xue Za Zhi, 2009, 15(3):228-231.
(编辑 孙慧兰)

(上接第 201 页 from page 201)

- KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer [J]. Nature, 2012, 486(7404):532-536.
- [3] Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, et al. Ras superfamily GEF and GAP: validated and tractable targets for cancer therapy? [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(12):842-857.
- [4] Tarnowski M, Schneider G, Amann G, et al. RasGRF1 regulates proliferation and metastatic behavior of human alveolar rhabdomyosarcomas[J]. Int J Oncol, 2012, 41(3):995-1004.
- [5] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117.
- [6] The Lancet. Toward better control of colorectal cancer [J]. Lancet, 2014, 383(9927):1437.
- [7] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1):1-10.
Chen WQ, Zhang SW, Zeng HM, et al. Report of cancer incidence and mortality in China [J]. China Cancer, 2014, 23(1):1-10.
- [8] 赵丽中, 王宏磊. 大肠癌早期诊断研究进展[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(2):103-108.
Zhao LZ, Wang HL. Research progress in early diagnosis of colorectal cancer[J]. China Cancer, 2014, 23(2):103-108.
- [9] Duan YF, Li DF, Liu YH, et al. Decreased expression of DAB2IP in pancreatic cancer with wild-type KRAS [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2013, 12(2):204-209.
- [10] Stephen AG, Esposito D, Bagni RK, et al. Dragging ras back in the ring[J]. Cancer Cell, 2014, 25(3):272-281.
- [11] Quilliam LA, Rebhun JF, Castro AF. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases[J]. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2002, 71(文献中无期次):391-444.
(编辑 孙慧兰)