

# NRAGE 对结直肠癌细胞增殖和侵袭能力的作用机制

周堤侠<sup>1</sup>, 吕海栋<sup>1</sup>, 金秉中<sup>2</sup>, 刘国庆<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究神经营养蛋白受体相互作用同源物(NRAGE)对结直肠癌(CRC)细胞增殖和侵袭能力的作用机制。方法 选取84例CRC患者的临床病理材料,应用荧光定量PCR(qPCR)及免疫印迹实验检测CRC组织及癌旁正常组织中NRAGE的表达,分析癌组织中NRAGE的表达与临床病理特征的关系。RT-PCR及免疫印迹实验检测CRC肿瘤细胞系HT29、SW480、SW620、LOVO及结直肠正常细胞系FHC中NRAGE mRNA及蛋白表达。MTT实验、Transwell迁移实验观察NC组、过表达NRAGE组及NRAGE敲低组肿瘤细胞增殖及迁移能力。qPCR及免疫印迹实验检测各组AKT、p-AKT、ERK1/2、p-ERK1/2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin的表达差异。结果 与癌旁组织相比,CRC癌组织中NRAGE的mRNA及蛋白表达明显升高。癌组织中NRAGE的表达与肿瘤分期、远处转移及淋巴结转移有关( $P < 0.05$ )。与FHC细胞相比,CRC肿瘤细胞系HT29、SW480、SW620、LOVO细胞中NRAGE的mRNA及蛋白表达较高( $P < 0.05$ )。与NC相比,过表达NRAGE组的CRC肿瘤细胞增殖及迁移能力明显增强,而敲低组增殖及迁移能力明显减弱。与NC组相比,过表达NRAGE组SW480细胞p-ERK1/2蛋白表达较高,而ERK1/2、AKT及p-AKT表达无明显差异。予过表达NRAGE组SW480细胞应用ERK抑制剂U0126后,SW480细胞的增殖及迁移能力明显降低。结论 NRAGE可通过激活ERK信号通路,促进CRC细胞上皮间质转化,增强CRC肿瘤细胞的增殖及迁移能力。

**关键词** 结直肠癌;NRAGE;上皮间质转化;增殖;迁移

**中图分类号** R 735.34

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0084-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.016

全世界每年结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病例数达110万,死亡患者例数达88万<sup>[1]</sup>。近年来我国CRC的发病率亦有逐渐升高的趋势,每年新发病例数约38万,死亡例数约20万<sup>[2]</sup>。CRC早期表现不明显,发现时多为中晚期,寻找新的CRC肿

瘤标志物有较大的临床意义。神经生长因子受体介导的黑色素瘤抗原编码基因同源蛋白(neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog, NRAGE)编码基因位于16q23.1,属于黑色素瘤抗原基因家族成员,参与p75神经营养蛋白受体介导神经细胞的程序性细胞死亡<sup>[3]</sup>。NRAGE在口腔鳞癌<sup>[4]</sup>、肝癌<sup>[5]</sup>等多种类型的恶性肿瘤中均存在异常表达,并通过促进肿瘤细胞的增殖及转移,促进肿瘤的恶性进展,有望成为新的肿瘤诊断治疗的分子标志物。而目前CRC中NRAGE的表达及作用机制报道较少。该研究探讨NRAGE对CRC细胞增殖和侵袭能力的作用机制,为临床诊治提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 病例资料** 选取2018年7月—2019年12月青海省人民医院诊治的84例CRC患者的临床病理材料。纳入标准:①CRC的诊断经病理学检查明确;②首次诊治;③患者及家属知情同意。排除标准:①合并炎症性肠病等胃肠道疾病;②合并其他恶性肿瘤;③无放疗化疗等肿瘤治疗史。男50例,女34例;年龄29~79( $53.1 \pm 7.3$ )岁;直肠癌30例,结肠癌54例;合并淋巴结转移者19例,未合并淋巴结转移者65例;合并远处转移9例,未合并远处转移75例;肿瘤直径: $\leq 3$  cm 59例, $> 3$  cm 25例;肿瘤分期:I-II期55例,III-IV期29例;肿瘤分化程度:高中分化53例,低分化31例。

**1.2 主要实验材料** NRAGE、Cyclin D1及N-cadherin单克隆抗体(ab104627、ab134175、ab18203,美国Abcam公司);Vimentin、E-cadherin单克隆抗体(sc-6260、sc-8426,美国Santa Cruz公司)。慢病毒过表达(pCDH-GFP-NRAGE)及敲除NRAGE基因的SW480细胞(Plko.1-puro-shNRAGE)及对照空载SW480细胞(上海吉凯生物科技公司);MTT细胞增殖检测试剂盒(货号:TB112,美国Promega公司);Transwell细胞培养板(货号:3822,美国康宁公司);Matrigel基质胶(货号:356234,美国BD公司);293T细胞、正常CRC细胞系FHC及肿瘤细胞系HT29、SW480、SW620、LOVO(美国ATCC公司,细胞培养

2021-06-28 接收

基金项目:青海省卫生计生委科研课题(编号:2018-ZJ-075)

作者单位:青海省人民医院<sup>1</sup> 肿瘤外科,<sup>2</sup> 药学科,西宁 810001

作者简介:周堤侠,男,主治医师;

刘国庆,男,主任医师,责任作者,E-mail:liuq10001@163.

com

条件:10%胎牛血清 RPMI 1640 培养基,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱);SYBR Green PCR Mix(4312704, 美国 ABI 公司)。

**1.3 病毒包装及 SW480 细胞感染** 将 293T 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿,利用增强型磷酸钙转染试剂盒(MaxiCap, 北京迈辰科技公司)进行病毒包装。体系:目的质粒 6 μg, VSVG 1.5 μg, PAX 24.5 μg, HBS 1 ml, 配好体系后,加入 CaCl<sub>2</sub> 67 μl 充分混匀,静置 15 min 后加入到培养皿中。6 h 后换液。48 h 后收集病毒上清液。4 °C、1 500 r/min 离心 15 min,上清液用 0.45 μm 滤器过滤。按照病毒液:浓缩液 = 4 : 1 的比例加入病毒浓缩液,4 °C 过夜,取出离心管,4 °C、7 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加 PBS 重悬后分装,-80 °C 保存。SW480 细胞接种于 6 孔板,加 polybrene(1 : 1 000)和对应的病毒上清液,培养基 2 ml,24 h 后换液,加嘌呤霉素筛选 SW480 细胞(1 : 2 000)3 d,用于下一步实验。

**1.4 RT-PCR 检测** TRIzol 法提取细胞中总 RNA,以总 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 检测。引物序列见表 1。反应体系 20 μl,包括 SYBR premix 10 μl、上游引物 1 μl、下游引物 1 μl、cDNA 模板 2 μl、无核糖核酸酶水 6 μl。反应条件:95 °C 10 s,95 °C 40 s,65 °C 60 s,70 °C 10 s,共 40 个循环。目的基因的相对表达水平采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法表示。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')
NRAGE	F: AGTCCACTGACTACCGGAGAC R: CATTTCACGCATCTGGCGTTC
CyclinD1	F: CAATGACCCCGCAGGATTTTC R: CATGGAGGGCGGATTGGAA
E-cadherin	F: CAACGGAATCCCAAAAGCAGCTG R: TATGGTTGTCTGCTCTCT
N-cadherin	F: TGGCGTACAGTGAACCTGGG R: GAAACCGGGCTATCTGCTCG
Vimentin	F: GACGCCATCAACACCGAGTT R: CTTTGTGCTTGGTTAGCTGGT
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGCTGATGGGATTTTC

**1.5 MTT 增殖实验** 将 NC 组、NRAGE 过表达组、NRAGE 敲低组细胞以每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞的量接种至 96 孔板,每孔补培养基 200 μl,每组 3 个复孔。待细胞贴壁后,培养 0、24、48、72 h 换液,加入 20 μl MTT 试剂,3 h 后弃上清液,加入 200 μl 的 DMSO 溶解紫色的结晶物,然后酶标仪上 450 nm 波

长处检测各孔的吸光度值,结果取各浓度复孔的平均值。

**1.6 Transwell 实验** 将 Matrigel 基质胶与培养基以 1 : 8 的比例稀释制备工作浓度的基质胶,将工作浓度的基质胶包被 24 孔板的 Transwell 小室的上室面于 37 °C 静置 30 min,基底膜用无血清培养基水化 30 min。调整 NC 组、NRAGE 过表达组、NRAGE 敲低组细胞密度至 50 × 10<sup>4</sup>/ml。取 200 μl 加入上室,下室加入 500 μl 含 20% 胎牛血清的培养基。24 h 后取出 Transwell 小室,用 PBS 洗 2 次,10% 多聚甲醛固定 40 min,0.5% 结晶紫染色 15 min,棉签轻轻擦掉膜上层的细胞,PBS 洗 2 次。镜下(×400)随机选取 5 个视野,数下室侧贴壁细胞数目,结果取平均值。

**1.7 免疫印迹实验** 将 NC 组、NRAGE 过表达组、NRAGE 敲低组细胞以每孔 3 × 10<sup>5</sup> 个接种至 6 孔板,待细胞贴壁长满后,弃培养基,冷 PBS 洗 2 次,加 RIPA 细胞裂解液 300 μl,冰上裂解 10 min,将细胞刮下提取细胞蛋白。BCA 法蛋白定量后,加 5 × SDS-上样缓冲液,99 °C 金属浴 15 min。SDS-PAGE 胶电泳:浓缩胶恒压 80 V,分离胶恒压 120 V,湿转法转膜 90 min 恒流 300 mA。将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h;TBST 洗 3 次,每次 10 min,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温 1 h。电化学发光法(ECL)暗室显影照相。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,采用 GraphPad 8.0 软件绘图。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验进行比较。计数资料以  $\bar{x} \pm s$  率表示,使用  $\chi^2$  检验进行比较。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 NRAGE 在 CRC 癌组织中的表达** 与癌旁组织相比,癌组织中 NRAGE mRNA 的相对表达量为 (2.631 ± 0.303)、(1.054 ± 0.212)。癌组织中 NRAGE mRNA 相对表达量明显高于癌旁组织(*t* = 40.475, *P* < 0.001);与癌旁组织相比,癌组织中 NRAGE 蛋白表达明显较高,见图 1。

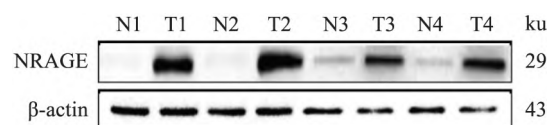


图 1 免疫印迹检测癌组织与癌旁组织中 NRAGE 的蛋白表达  
T:癌组织;N:相应的癌旁组织;1~4:4 组癌与癌旁组织

**2.2 CRC 癌组织中 NRAGE 的表达与临床病理参数的关系** CRC 癌组织中 NRAGE 的表达与肿瘤分期、远处转移及淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ ), 而与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、肿瘤分化程度无关。见表 2。

表 2 癌组织中 NRAGE 表达与临床病理特征关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

参数	n	NRAGE	t 值	P 值
年龄(岁)			0.816	0.417
≤60	38	2.602 ± 0.312		
>60	46	2.655 ± 0.283		
性别			1.888	0.063
男	50	2.581 ± 0.268		
女	34	2.705 ± 0.332		
肿瘤大小(cm)			1.213	0.229
≤3	59	2.605 ± 0.262		
>3	25	2.692 ± 0.378		
肿瘤位置			1.658	0.101
结肠	54	2.591 ± 0.253		
直肠	30	2.703 ± 0.363		
肿瘤分化			0.226	0.622
高中分化	53	2.625 ± 0.282		
低分化	31	2.641 ± 0.360		
临床分期			4.363	<0.001
I - II 期	55	2.531 ± 0.263		
III - IV 期	29	2.821 ± 0.335		
淋巴结转移			5.115	<0.001
阳性	19	2.935 ± 0.396		
阴性	65	2.542 ± 0.259		
远处转移			6.265	<0.001
有	9	3.248 ± 0.405		
无	75	2.557 ± 0.301		

**2.3 CRC 肿瘤细胞系及正常细胞系中 NRAGE 的表达** CRC 肿瘤细胞系 HT29、SW480、SW620、LOVO NRAGE mRNA 及蛋白明显高于正常细胞系 FHC ( $t = 7.325, 9.124, 18.644, 19.012, P < 0.001$ ), 高转移性细胞系 SW620、LOVO NRAGE mRNA 及蛋白的表达明显高于低转移性 CRC 肿瘤细胞系 HT29、SW480 ( $t = 5.378, 5.105, 7.709, 7.913, P < 0.001$ )。见图 2。

**2.4 过表达或敲低 NRAGE 对 SW480 细胞增殖及迁移能力的影响** 免疫印迹实验验证 NRAGE 的过表达或敲低的效率良好, 见图 3A。与 NC 组相比, NRAGE 过表达组细胞活力较高 ( $t = 9.524, P < 0.001$ )、侵袭细胞数增多 ( $t = 6.324, P < 0.001$ ), 而 NRAGE 敲低组细胞活力较低 ( $t = 11.132, P < 0.001$ )、侵袭细胞数减少 ( $t = 8.748, P < 0.001$ ), 见

图 3B、C。

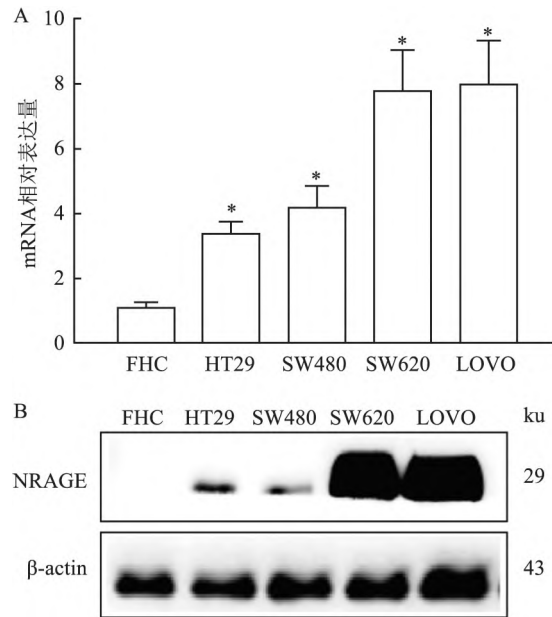


图 2 CRC 肿瘤细胞系及正常细胞系中 NRAGE 的表达

A: 各细胞系 NRAGE mRNA 表达; B: 各细胞系 NRAGE 蛋白表达; 与 FHC 比较: \*  $P < 0.05$ ;

**2.5 过表达或敲低 NRAGE 对 SW480 细胞增殖及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关指标的影响** 与 NC 组相比, 过表达 NRAGE 组 SW480 细胞 CyclinD1、N-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 及蛋白表达升高, E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达降低, NRAGE 敲低组 SW480 细胞 CyclinD1、N-cadherin 及 Vimentin 的 mRNA 及蛋白表达降低, E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。见图 4A、B。

**2.6 NRAGE 通过 ERK 信号通路调节 SW480 细胞增殖及迁移能力** 与 NC 组相比, 过表达 NRAGE 组 SW480 细胞 p-ERK1/2 蛋白表达较高, 而 ERK1/2、AKT 及 p-AKT 表达无明显差异, 见图 5A。予过表达 NRAGE 组 SW480 细胞应用 ERK 抑制剂 U0126 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 24 h 后, NRAGE 组 + U0126 组细胞的增殖及迁移能力明显降低。见图 5B、C。

### 3 讨论

CRC 的病因包括遗传因素、饮食及慢性炎症刺激等, 多种因素共同作用导致基因或染色质结构的不稳定, 引起多种癌基因的过度激活或(和)抑癌基因的失活, 表现为无限增殖、凋亡抑制、免疫抑制、代谢改变及获得浸润转移等恶性生物学潜能。深入

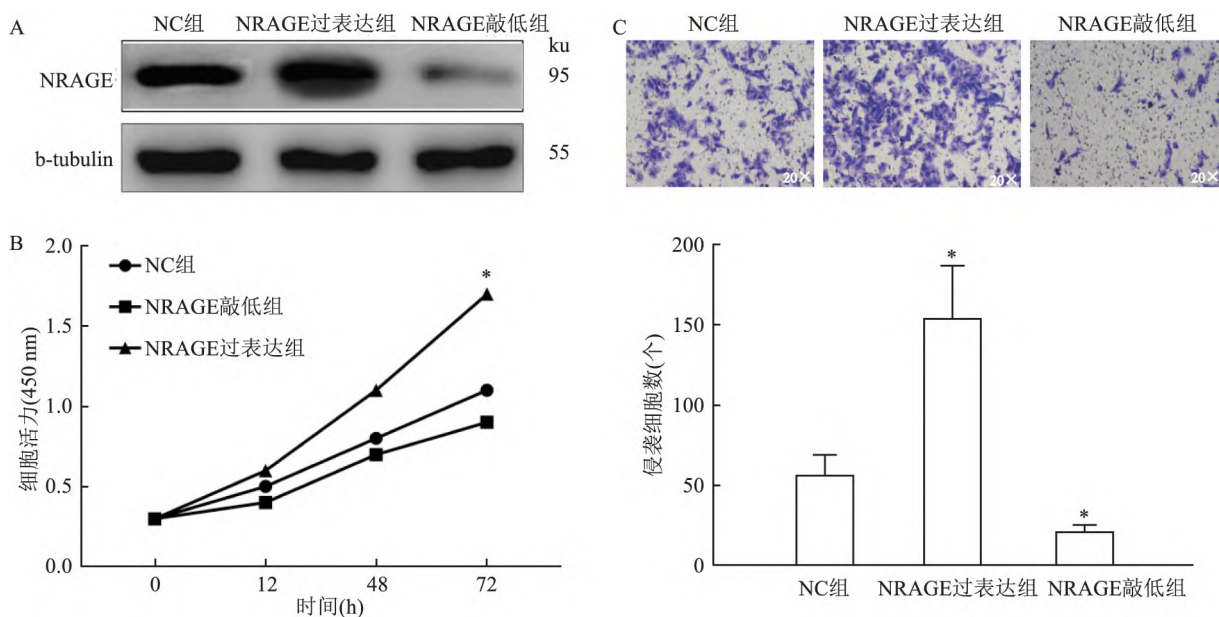


图3 NRAGE对SW480细胞增殖及迁移能力的影响

A: SW480细胞NRAGE蛋白过表达及敲低效果验证; B: 各组细胞增殖能力比较; C: 各组细胞侵袭能力比较 ×20; 与NC组比较; \* P <

0.05

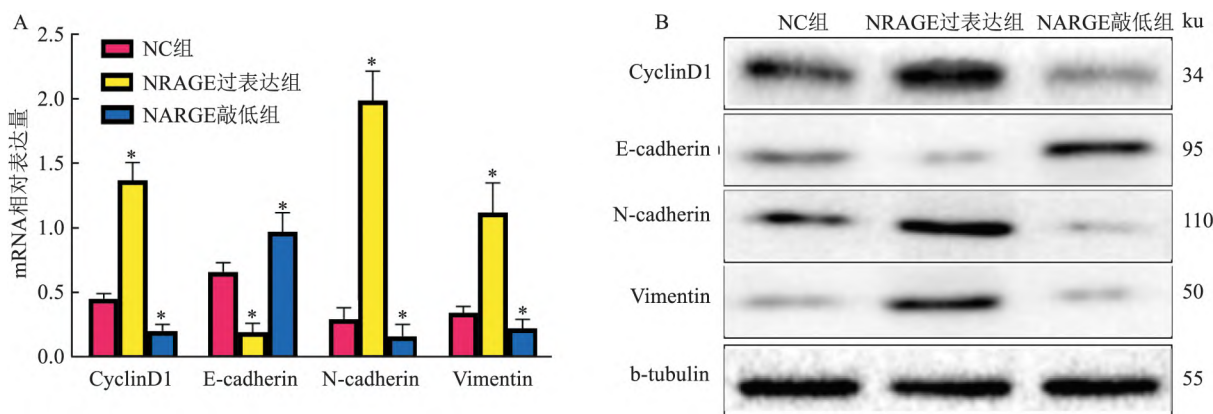


图4 过表达或敲低NRAGE对SW480细胞增殖及EMT相关指标的影响

A: 各组增殖及EMT相关指标mRNA表达比较; B: 各组增殖及EMT相关指标蛋白表达比较; 与NC组比较; \* P < 0.05

研究CRC的病因及发病机制,寻找新的CRC肿瘤标志物对于临床上CRC的早期诊断、治疗药物的研发及治疗效果评估具有重要临床价值。

黑色素瘤相关抗原(MAGE)基因家族成员包括I型和II型<sup>[6]</sup>。具有高度保守特征的II型MAGE基因在人类、小鼠和斑马鱼中广泛表达,在生命个体的分化发育中起着至关重要的作用。NRAGE基因属于II型MAGE亚家族,具有多种功能,包括调节细胞凋亡、细胞分化、生物钟、情绪调节等<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8-9]</sup>表明,NRAGE在肝癌、乳腺癌等肿瘤中表达下调,而在食管癌、胃癌等消化道肿瘤中表达上调,参与影响恶性肿瘤的进展、转移和侵袭等生物学行为。该研究显示,CRC癌组织中NRAGE mRNA及蛋白表达明显上调,并与正常结肠黏膜FHC细胞

相比,CRC肿瘤细胞中NRAGE mRNA及蛋白表达均较高,目前CRC中NRAGE表达上调的机制尚不清楚,可能与ERK信号通路的过度激活有关。Jiang et al<sup>[10]</sup>在胃癌的研究中发现,ERK及ZO-1的磷酸化水平升高能促进NRAGE的表达,进而促进胃癌肿瘤细胞的浸润及转移。该研究结果显示,NRAGE的表达与肿瘤分期、淋巴结转移及远处转移有关,表明NRAGE的高表达参与促进CRC的肿瘤进展及转移。Sun et al<sup>[11]</sup>研究报道,肿瘤中NRAGE的高表达能够通过抑制细胞周期抑制因子P27的表达,促进肿瘤细胞G<sub>1</sub>/S周期的转换,促进肿瘤细胞的增殖,导致肿瘤分期升高。本研究显示,在SW480细胞中过表达NRAGE后,CyclinD1表达上调,因而NRAGE可能通过促进CyclinD1的表达,促进细胞

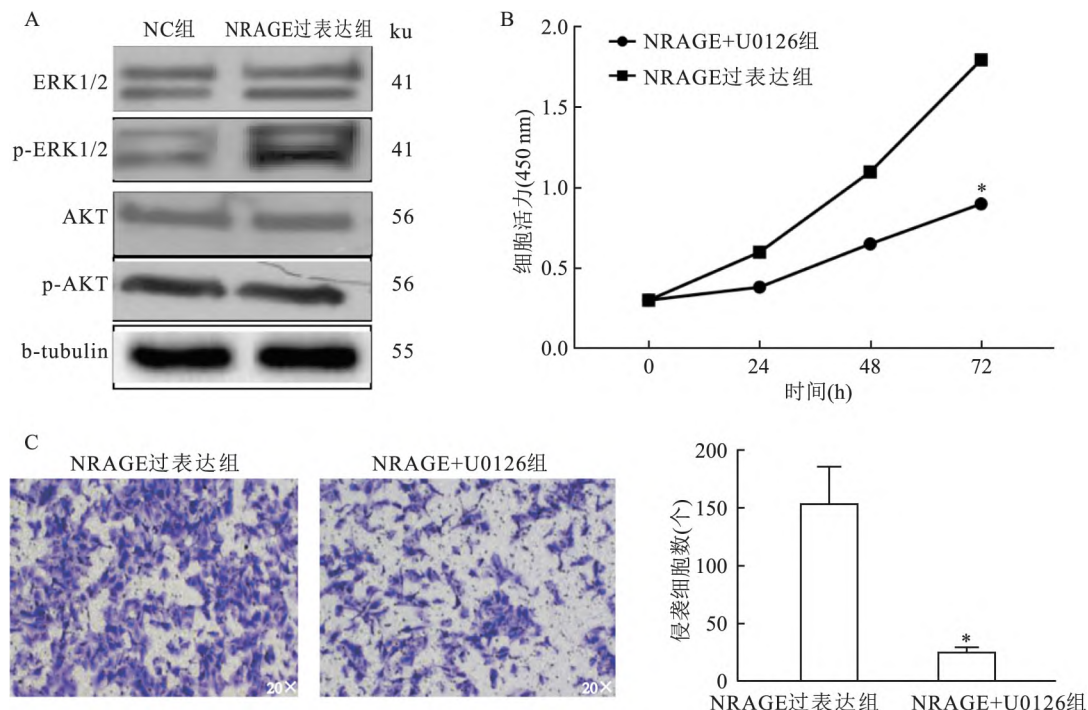


图5 NRAGE 通过 ERK 信号通路调节 SW480 细胞增殖及迁移能力

A: 各组 ERK 信号通路蛋白表达; B: 各组细胞增殖能力比较; C: 各组细胞侵袭能力比较 结晶紫染色 ×20; 与 NRAGE 过表达组比较; \* P < 0.05

周期的进行, 导致肿瘤分期增高。为进一步研究 NRAGE 对 CRC 肿瘤细胞生物学行为的影响, 通过 MTT 增殖实验及 Transwell 迁移实验对过表达或敲除 NRAGE 的 SW480 细胞进行功能验证, 结果 NRAGE 过表达的 SW480 细胞增殖及迁移能力较 NC 组明显增强, 而敲除 NRAGE 的 SW480 细胞增殖及迁移能力减弱。表明 CRC 中 NRAGE 的表达增加促进肿瘤细胞增殖及迁移。以往亦有研究<sup>[12]</sup>证实, NRAGE 的表达水平升高能够激活下游癌基因如 Ror2、Src 等的表达, 进而促进基质金属蛋白酶 (MMP)1、MMP9 的表达, 导致细胞之间黏附能力减弱, 促进肿瘤细胞的局部浸润和转移。EMT 可促进肿瘤细胞的浸润转移能力, 而 EMT 的调控是一个复杂的网络, 涉及 TGFβ 家族, Wnts、Notch 和 HIF 等多个信号通路的异常改变, 表现为细胞上皮-基底极性的丧失, 上皮性标志 E-cadherin 表达的下调及间质性标志 N-cadherin 表达的上调<sup>[13]</sup>。因此, 可假设 NRAGE 可能通过促进 CRC 细胞发生 EMT, 获得局部浸润及远处转移的能力。为验证该假设, 本实验检测过表达或敲低 NRAGE 后, SW480 细胞中 EMT 相关指标如 E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin 的表达, 结果显示, 与 NC 组相比, 过表达 NRAGE 组的细胞 N-cadherin 及 Vimentin 表达较高, 而 E-cadherin

表达较低, 表明 NRAGE 的表达能够促进 CRC 细胞发生 EMT, 增强肿瘤细胞的浸润及迁移能力。冯振华<sup>[14]</sup>的研究提示, NRAGE 的表达受到 MAPK/ERK 和 AKT/PKB 通路的表达调控, 干扰 NRAGE 基因的表达可以抑制 AKT 激酶及 ERK 活性, 也降低 AKT 及 ERK 的磷酸化水平, 诱导肿瘤细胞的分化<sup>[15]</sup>。为分析 SW480 细胞中 NRAGE 促进肿瘤细胞的增殖及迁移的机制, 该研究初步探索过表达 NRAGE 后 ERK1/2、p-ERK1/2、AKT 及 p-AKT 的表达情况, 显示过表达 NRAGE 后 p-ERK1/2 表达显著上调, 并且加入 ERK1/2 抑制剂 U0126 后, NRAGE 促进 SW480 细胞增殖及迁移的能力受到显著抑制, 提示 NRAGE 可能通过促进 ERK1/2 的磷酸化, 促进肿瘤细胞的增殖和迁移。

参考文献

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6):394-24.

[2] 蒋娜, 隋燕霞, 蒋依娜, 等. 散发性结肠癌微卫星不稳定状态与临床病理特征及预后的关系 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(1):139-42.

[3] Li R, Gong J, Xiao C, et al. A comprehensive analysis of the MAGE

- family as prognostic and diagnostic markers for hepatocellular carcinoma[J]. *Genomics*,2020, 43(2):310–26.
- [4] 徐增琦,李 杨,高 洁,等. MageD1 在口腔鳞癌中的表达及其促进凋亡作用的研究[J]. *口腔生物医学*,2016,7(2):79–82.
- [5] Zou W, Cui J, Ren Z, et al. NRAGE is a potential diagnostic biomarker of hepatocellular carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018,97(48):134–41.
- [6] Poojary M, Jishnu P V, Kabekkodu S P. Prognostic value of melanoma-associated antigen-A (MAGE-A) gene expression in various human cancers: a systematic review and meta-analysis of 7428 patients and 44 studies[J]. *Mol Diagn Ther*,2020,24(5):537–55.
- [7] Lee A K, Potts P R. A comprehensive guide to the MAGE family of ubiquitin ligases[J]. *J Mol Biol*,2017,429(8):1114–42.
- [8] Zhang G, Zhou H, Xue X. Complex roles of NRAGE on tumor[J]. *Tumour Biol*,2016,37(9):11535–40.
- [9] Kanda M, Koderu Y. Molecular mechanisms of peritoneal dissemination in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(30):6829–40.
- [10] Jiang X, Jiang X, Yang Z. NRAGE confers poor prognosis and promotes proliferation, invasion, and chemoresistance in gastric cancer[J]. *Gene*,2018,668(3):114–20.
- [11] Sun M, Liu X H, Li J H, et al. MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27 (kip1) [J]. *Mol Cancer Ther*,2012,11(4):842–52.
- [12] Nguyen T H, Bertrand M J, Sterpin C, et al. Maged1, a new regulator of skeletal myogenic differentiation and muscle regeneration [J]. *BMC Cell Biol*,2010,11(4):57–65.
- [13] Saxena K, Jolly M K, Balamurugan K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: emerging culprits in metastasis [J]. *Transl Oncol*,2020,13(11):100–25.
- [14] 冯振华. NRAGE 通过 TrkA/MEK/ERK 和 AKT 信号通路抑制 NGF 诱导的 PC12 细胞分化[D]. 南京:南京师范大学, 2007.
- [15] Pan L, de Smet I. Expanding the mitogen-activated protein kinase (MAPK) universe: an update on MAP4Ks [J]. *Front Plant Sci*, 2020,11(4):1220–34.

## The mechanism of NRAGE on the proliferation and invasion of colorectal cancer cells

Zhou Dixia<sup>1</sup>, Lü Haidong<sup>1</sup>, Jin Bingjin<sup>2</sup>, Liu Guoqing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Oncology, <sup>2</sup>Dept of Pharmacy, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810001)

**Abstract Objective** To study the mechanism of neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog (NRAGE) on the proliferation and invasion of colorectal cancer (CRC) cells. **Methods** The clinicopathological data of 84 CRC patients were selected. Fluorescence quantitative PCR (qPCR) and Western blot were used to detect the expression of NRAGE in CRC tissues and adjacent normal tissues. The relationship between the expression of NRAGE in cancer tissues and clinicopathological characteristics was analyzed statistically. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of NRAGE mRNA and protein in CRC tumor cell lines HT29, SW480, SW620, LOVO and colorectal normal cell line FHC. MTT proliferation experiment and Transwell migration experiment were used to observe the tumor cell proliferation and migration ability of the NC group, overexpression NRAGE group and NRAGE knockdown group. The expression differences of AKT, p-AKT, ERK1/2, p-ERK1/2, E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were detected by qPCR and Western blot. **Results** Compared with adjacent tissues, NRAGE mRNA and protein expression in CRC cancer tissues were significantly higher. The expression of NRAGE in cancer tissues was related to tumor stage, distant metastasis and lymph node metastasis (all  $P < 0.05$ ). Compared with FHC cells, CRC tumor cell lines HT29, SW480, SW620, and LOVO cells had higher NRAGE mRNA and protein expression ( $P < 0.05$ ). Compared with the NC group, the proliferation and migration ability of CRC tumor cells in the overexpression NRAGE group was significantly enhanced, while the knockdown group was significantly weakened. Compared with the NC group, the SW480 cells in the overexpression NRAGE group had higher p-ERK1/2 protein expression, but there was no significant difference in the expression of ERK1/2, AKT and p-AKT. After the SW480 cells in the overexpression NRAGE group were treated with ERK inhibitor U0126, the proliferation and migration ability of SW480 cells significantly reduced. **Conclusion** NRAGE can promote the epithelial-mesenchymal transition of CRC cells and enhance the proliferation and migration of CRC tumor cells by activating ERK signaling pathway. **Key words** colorectal cancer; neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog; epithelial-mesenchymal transition; proliferation; migration