

网络出版时间: 2021-7-28 13:59 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.041.html>

全反式视黄酸衍生物逆转高水平胰岛素对胃癌细胞 BGC-823 迁移的作用研究

王 陈¹, 胡安拉¹, 赵奇红¹, 汪 渊², 张素梅²

摘要 目的 探讨高水平胰岛素条件下全反式视黄酸衍生物 4-氨基-2-三氟甲基-苯基-维甲酸酯(ATPR) 对人胃癌细胞 BGC-823 迁移能力的影响及其潜在的分子机制。方法 首先采用不同浓度胰岛素刺激 BGC-823 细胞, CCK-8 法检测胰岛素对细胞增殖能力的影响; 然后采用等同人高胰岛素血症水平(≥ 0.5 ng/ml) 而对 BGC-823 增殖能力没有影响的胰岛素剂量(< 10.0 ng/ml), 联合 ATPR 处理 BGC-823 细胞后, 通过细胞划痕实验和 Transwell 实验明确 BGC-823 细胞迁移能力的改变; Western blot 检测与细胞迁移能力相关蛋白的表达水平。结果 CCK-8 结果显示, 与对照组比较, 0.5 、 5.0 ng/ml 胰岛素作用 48 h 后对 BGC-823 细胞的增殖无影响, 而 10.0 ng/ml 胰岛素能够促进 BGC-823 细胞增殖; 细胞划痕和 Transwell 实验显示, 5.0 ng/ml 胰岛素明显促进 BGC-823 细胞的迁移能力; 但是, 联合 ATPR 后能够抑制胰岛素对 BGC-823 迁移的促进作用, 作用与肌球蛋白轻链激酶(MLCK) 抑制剂 ML-7 类似; Western blot 结果显示胰岛素促进 MLCK 蛋白表达且下调胃特异性紧密连接蛋白 Claudin 18 的表达, 而 ATPR 联合处理后能抑制 MLCK 并促进 Claudin 18 蛋白的表达。结论 ATPR 可逆转高水平胰岛素对胃癌细胞 BGC-823 迁移的促进作用, 可能与其抑制胰岛素对 MLCK 和 Claudin 18 的调控密切相关。

关键词 ATPR; 胃癌; 迁移; 胰岛素

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1390-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.009

随着卫生水平提高和预防措施的完善, 中国胃癌的发病率和死亡率呈现下降趋势^[1]。但是, 胃癌患者的代谢综合征或其相关疾病风险有所增高^[2]。代谢综合征相关疾病均由胰岛素抵抗导致, 胰岛素抵抗会导致机体代偿性分泌更多的胰岛素。研究^[3]显示, 高水平胰岛素人群胃癌的发生风险增

加, 高胰岛素相关饮食和生活方式与消化道肿瘤的风险也密切相关。胰岛素能促进一些肿瘤细胞迁移和侵袭^[4-5]。但胰岛素与胃癌迁移和侵袭之间的关系尚不清楚。

全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, ATRA) 能在胰岛素环境下抑制肿瘤的进展^[6-7], 但其副作用限制了它的临床应用。4-氨基-2-三氟甲基-苯基-维甲酸酯(4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate, ATPR) 是安徽医科大学合成的一种 ATRA 衍生物, 研究显示 ATPR 的抗肿瘤效果明显优于 ATRA^[8]。该研究拟探讨在高水平胰岛素条件下, ATPR 对胃癌细胞迁移能力的影响及其潜在的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 ATPR 由安徽医科大学药学院合成, 陈飞虎教授馈赠; ML-7 肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK) 抑制剂 购自美国 Cayman 公司; 胰岛素和结晶紫 购自碧云天公司; 抗 MLCK 鼠一抗 购自美国 Santa 公司; 抗 Claudin 18 兔一抗 购自英国 Abcam 公司; 抗 GAPDH 兔一抗、山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 二抗 购自美国 CST 公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清、 $100\times$ anti-anti 和 Trypsin-EDTA 购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂 购自 Biomiky 公司; 4% 多聚甲醛 购自武汉赛维尔公司; RIPA 裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒 购自美国 Thermo Scientific 公司; PVDF 膜 购自美国 Millipore 公司; ECL 化学发光显影液 购自天能公司; Transwell 小室 购自美国 Corning 公司。

1.2 细胞培养 人低分化胃癌细胞株 BGC-823 购自上海中科院细胞库; 细胞培养在含有 10% 胎牛血清、 $1\times$ anti-anti 的 RPMI1640 完全培养基中; 细胞培养在 37°C 、含有 5% CO_2 的潮湿培养箱中; 细胞密度达到 90% 以上时消化换液处理; 所有细胞实验在细胞处于对数生长期时进行; 细胞开始实验之前, 用无血清培养基培养 6 h 进行同步化处理, 所有细胞实验均在低血清培养基(含有 0.1% 胎牛血清) 培养条件下进行。

2021-03-04 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2019A0227); 国家自然科学基金(编号: 81272399)

作者单位: 安徽医科大学¹ 公共卫生学院营养与食品卫生学系、² 基础医学院生物化学教研室, 合肥 230032

作者简介: 王 陈, 男, 硕士研究生;

胡安拉, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huanla@ahmu.edu.cn

1.3 CCK-8 细胞增殖实验 取对数生长期的细胞常规消化,用培养基调整至 20 000 个/ml 的密度,然后取 100 μ l 稀释后的细胞种到 96 孔板中;待细胞贴壁后,更换无血清培养基饥饿 6 h;然后更换不同浓度胰岛素(0.0、0.5、5.0、10.0 ng/ml)培养,分别在 24、48 h 用 CCK-8 试剂检测 450 nm 波长下的吸光度。检测方法:弃去 96 孔板中培养基,然后每个孔加 90 μ l 不含血清培养基和 10 μ l CCK-8 试剂,放到细胞培养箱中继续培养 2 h,然后在酶标仪上检测 450 nm 波长下的吸光度。浓度为 0.0 ng/ml 胰岛素作为对照组;BGC-823 细胞相对活性 = OD_{450} (胰岛素组) / OD_{450} (对照组)。

1.4 形态学观察 使用倒置相差显微镜观察胰岛素作用下 BGC-823 细胞形态改变;将处于对数生长期的 BGC-823 细胞常规消化后以 5 000 个/孔的密度种到 6 孔板中;细胞饥饿处理后,用 0.5 和 5.0 ng/ml 的胰岛素处理细胞 48 h;浓度为 0.0 ng/ml 的胰岛素作为对照组;分别在 24、48 h 用显微镜观察细胞形态改变并拍照。

1.5 细胞划痕实验 细胞划痕实验用来检测细胞迁移能力改变;取对数生长期的 BGC-823 细胞消化后以 1×10^5 个/ml 的密度种到 6 孔板中;待细胞达到 90% 密度时用无血清培养基饥饿 6 h;用灭菌后 200 μ l 的枪头划一条痕并用预热的 PBS 将离壁的细胞轻轻冲洗去除;用 5.0 ng/ml 的胰岛素处理细胞 48 h,分别在 24、48 h 用倒置相差显微镜观察细胞划痕面积愈合程度;0.0 ng/ml 胰岛素用作对照组。细胞迁移率 = (起始面积 - 胰岛素处理后面积) / 起始面积 $\times 100\%$ 。

1.6 Transwell 实验 Transwell 细胞迁移实验用来检测细胞迁移能力的改变;在 24 孔培养板中加 500 μ l 含有 10% 胎牛血清培养基,将 Transwell 小室放到 24 孔板中;用含有 0.1% 胎牛血清培养基将 BGC-823 细胞消化稀释后以 10 000 个/孔的密度种到小室上层;将细胞放到培养箱中分别培养 24、48 h 后将小室取出,用 PBS 轻轻漂洗后用 4% 多聚甲醛固定 0.5 h,然后用 0.1% 结晶紫染色 0.5 h;晾干后在倒置相差显微镜下随机选取 6 个视野拍照并计数发生迁移细胞的数量;细胞相对迁移率 = (胰岛素刺激组细胞数量 - 对照组细胞数量) / 对照组细胞数量 $\times 100\%$ 。

1.7 Western blot 实验 收集处理后的细胞,用 RIPA 细胞裂解液提取总蛋白;用 BCA 蛋白定量法对各组蛋白浓度进行测量,用 $2 \times$ SDS 上样缓冲液

将各组蛋白浓度定为 5 μ g/ μ l,100 $^{\circ}$ C 变性 10 min;用 10% SDS-PAGE 分离胶对蛋白进行分离,然后转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后用纯水将膜洗干净;分别在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜孵育一抗(MLCK,1 : 1 000; Claudin 18,1 : 1 000; GAPDH,1 : 1 000),用 TBST(TBS + 1% 吐温 20)洗膜;用 HRP 标记的 IgG 二抗 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h;TBST 洗膜;用 ECL 化学发光显影液显影;Tanon GIS 软件分析蛋白表达。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 23.0 版统计软件进行数据分析,所有实验均重复 3 次,所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较用单因素方差分析;采用 GraphPad Prism version 8.0 作图。

2 结果

2.1 胰岛素处理对细胞增殖能力的影响 采用不同浓度胰岛素(0.0、0.5、5.0、10.0 ng/ml)刺激 BGC-823 细胞;使用 CCK-8 法检测胰岛素在不同时间点(24、48 h)对细胞增殖能力的影响。结果见图 1。与对照组比较,24 h 各浓度胰岛素处理的细胞相对增殖率分别为(1.03 $\pm$ 0.03)、(1.04 $\pm$ 0.03)、(1.13 $\pm$ 0.04);48 h 各浓度胰岛素处理的细胞相对增殖率分别为(1.00 $\pm$ 0.03)、(1.03 $\pm$ 0.05)、(1.07 $\pm$ 0.01)。与对照组比较,0.5、5.0 ng/ml 胰岛素在 48 h 内对 BGC-823 细胞的增殖能力无影响,而 10.0 ng/ml 胰岛素能明显促进 BGC-823 细胞增殖能力($F = 40.96, P < 0.05$)。为了避免细胞增殖对细胞迁移的影响,在后续实验中采用 0.5、5.0 ng/ml 胰岛素进行刺激。

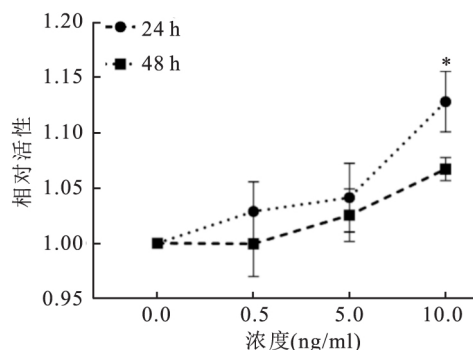


图1 不同浓度胰岛素对细胞增殖能力影响
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 胰岛素对 BGC-823 细胞形态的影响 采用含终浓度 0.5、5.0 ng/ml 胰岛素的培养液,分别处理 BGC-823 细胞 24、48 h,在倒置相差显微镜下观察细

胞变化(见图2)。处理24 h后,可见对照组的细胞散在、稀疏,细胞近似圆形或多边形,细胞有所皱缩;在细胞形态上可见呈多边形的细胞更多,5.0 ng/ml胰岛素组部分细胞出现伪足。处理48 h后,对照组细胞形态较一致,大多呈圆形或椭圆形;胰岛素作用组细胞之间间隙较大,细胞较分散,细胞形态较对照组变化很明显,各细胞均有明显的伪足或出现呈圆形,几近漂浮的细胞,其中5.0 ng/ml胰岛素组细胞几乎都出现伪足。

2.3 胰岛素对BGC-823细胞迁移的影响 为研究胰岛素对BGC-823细胞迁移的影响,本研究使用0.5、5.0 ng/ml胰岛素处理BGC-823细胞;细胞划痕实验和Transwell实验分别在24、48 h检测细胞迁移能力的改变。细胞划痕实验结果见图3。对照组、0.5、5.0 ng/ml胰岛素处理组细胞24 h迁移率分别为 $(21.0 \pm 1.6)\%$ 、 $(19.0 \pm 1.3)\%$ 、 $(29.2 \pm 2.0)\%$;48 h细胞迁移率分别为 $(22.7 \pm 2.4)\%$ 、 $(29.7 \pm 2.4)\%$ 、 $(41.3 \pm 5.0)\%$ 。与对照组比较,0.5 ng/ml胰岛素处理48 h后才促进BGC-823细胞迁移能力($F=12.50, P<0.05$),而5.0 ng/ml胰岛

素处理24 h后即促进细胞的迁移($F=23.06, P<0.05$),48 h后促迁移更明显($F=25.31, P<0.01$)。

Transwell结果见图4。0.5、5.0 ng/ml胰岛素处理的BGC-823细胞24 h相对迁移率分别为 (1.10 ± 0.02) 、 (1.49 ± 0.12) ;48 h相对迁移率分别为 (1.53 ± 0.09) 、 (2.05 ± 0.13) 。与对照组比较,0.5 ng/ml胰岛素处理48 h后才能促进BGC-823细胞的迁移($F=78.03, P<0.01$),而5.0 ng/ml胰岛素处理24 h后即促进细胞的迁移($F=37.52, P<0.01$),48 h后促迁移更明显($F=146.78, P<0.001$)。因此5.0 ng/ml作为后续实验的胰岛素刺激浓度。

2.4 ATPR抑制胰岛素对BGC-823细胞迁移的促进作用 使用5.0 ng/ml胰岛素、5 $\mu\text{mol/L}$ ATPR和10 $\mu\text{mol/L}$ ML-7处理BGC-823细胞,通过细胞划痕实验和Transwell实验检测细胞迁移能力改变。细胞划痕结果见图5。24 h对照组、胰岛素组、胰岛素+ATPR组、胰岛素+ML-7组细胞迁移率分别为 $(27.09 \pm 1.48)\%$ 、 $(34.25 \pm 1.35)\%$ 、 $(21.61 \pm 1.98)\%$ 、 $(16.86 \pm 2.70)\%$,48 h各组细胞迁移率

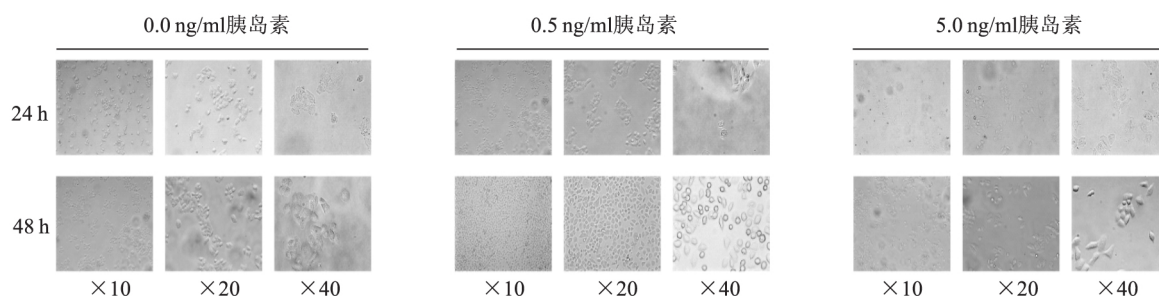


图2 胰岛素对细胞形态的影响

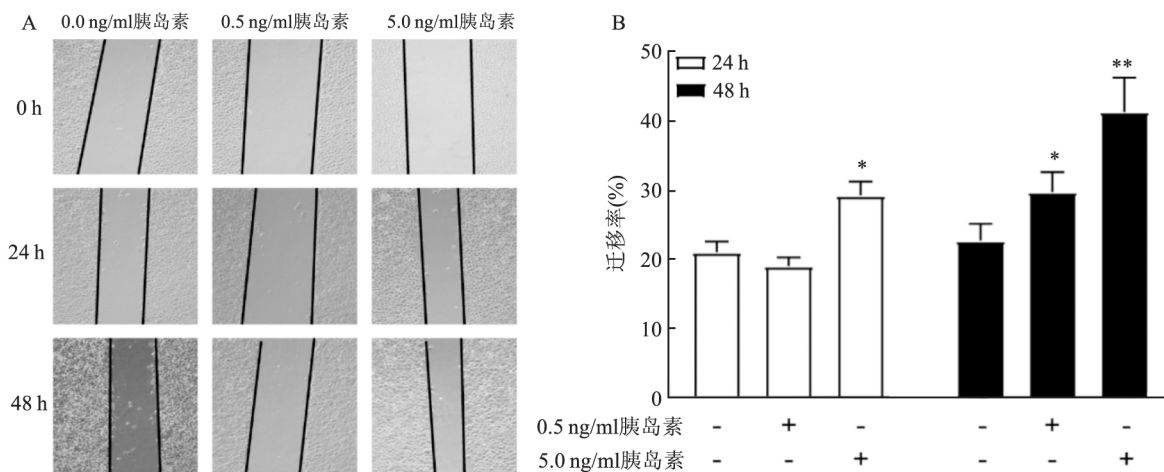


图3 细胞划痕实验

A: 细胞划痕实验检测不同浓度胰岛素对细胞迁移能力影响 $\times 200$; B: 细胞划痕实验结果统计图; 与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

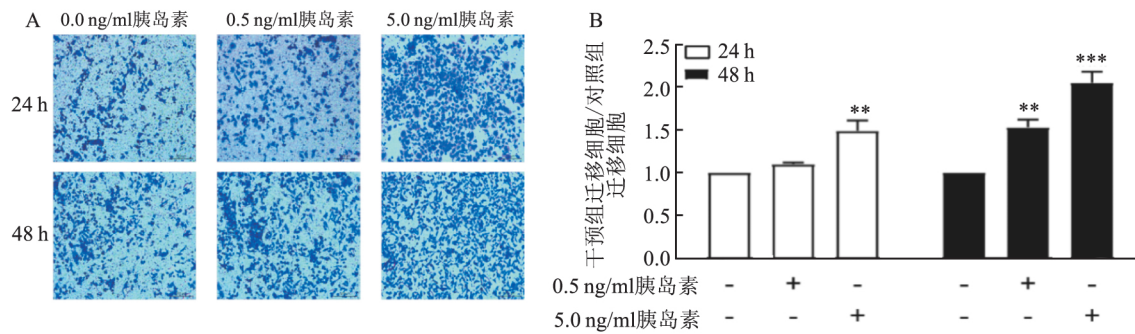


图4 Transwell 迁移实验

A: Transwell 迁移实验检测不同浓度胰岛素对细胞迁移能力影响 $\times 200$; B: Transwell 实验结果统计图; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

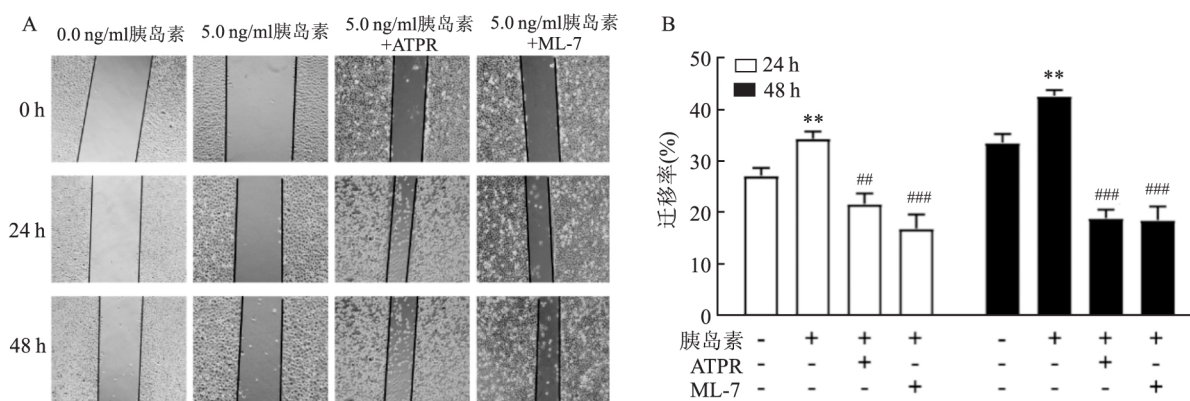


图5 细胞划痕实验探讨 ATPR 抑制胰岛素对 BGC-823 迁移能力的促进作用

A: 胰岛素联合 ATPR 以及 ML-7 抑制剂作用于 BGC-823 细胞 48 h, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力的变化 $\times 200$; B: 细胞划痕实验结果统计图; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与胰岛素组比较: # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

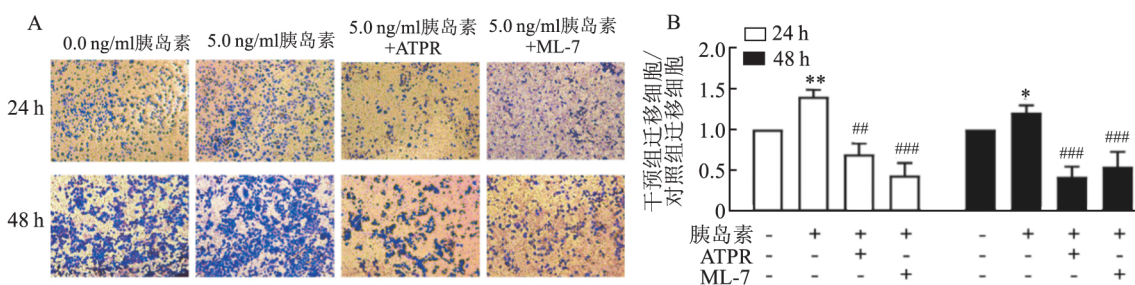


图6 Transwell 划痕实验探讨 ATPR 抑制胰岛素对 BGC-823 迁移能力的促进作用

A: 胰岛素联合 ATPR 以及 ML-7 抑制剂作用于 BGC-823 细胞 48 h, Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力的变化 $\times 200$; B: Transwell 实验结果统计图; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与胰岛素组比较: # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

分别为 $(33.48 \pm 1.68)\%$ 、 $(42.52 \pm 1.12)\%$ 、 $(18.84 \pm 1.65)\%$ 、 $(18.47 \pm 2.65)\%$; 与胰岛素组比较, ATPR 以及 ML-7 能抑制胰岛素对 BGC-823 细胞迁移的促进作用 ($F_{24h} = 62.60, 74.67, P_{24h} < 0.01, < 0.001, F_{48h} = 317.25, 157.23$, 均 $P_{48h} < 0.001$)。Transwell 实验结果见图 6: 与对照组比较, 24 h 各组相对迁移率分别为 (1.41 ± 0.08) 、 (0.69 ± 0.13) 、 (0.44 ± 0.15) ; 48 h 各组相对迁移率分别

为 (1.21 ± 0.09) 、 (0.42 ± 0.12) 、 (0.54 ± 0.18) 。与胰岛素组比较, 24 h ATPR 和 ML-7 能抑制胰岛素对 BGC-823 细胞迁移的促进作用 ($F = 50.06, 73.25, P < 0.01, < 0.001$), 48 h 抑制现象更明显 ($F = 62.41, 24.94$, 均 $P < 0.001$)。

2.5 ATPR 调控 MLCK 和 Claudin 18 蛋白表达
为探究 ATPR 抑制胰岛素对 BGC-823 细胞迁移促进作用的分子机制, 我们检测迁移相关蛋白 MLCK 和

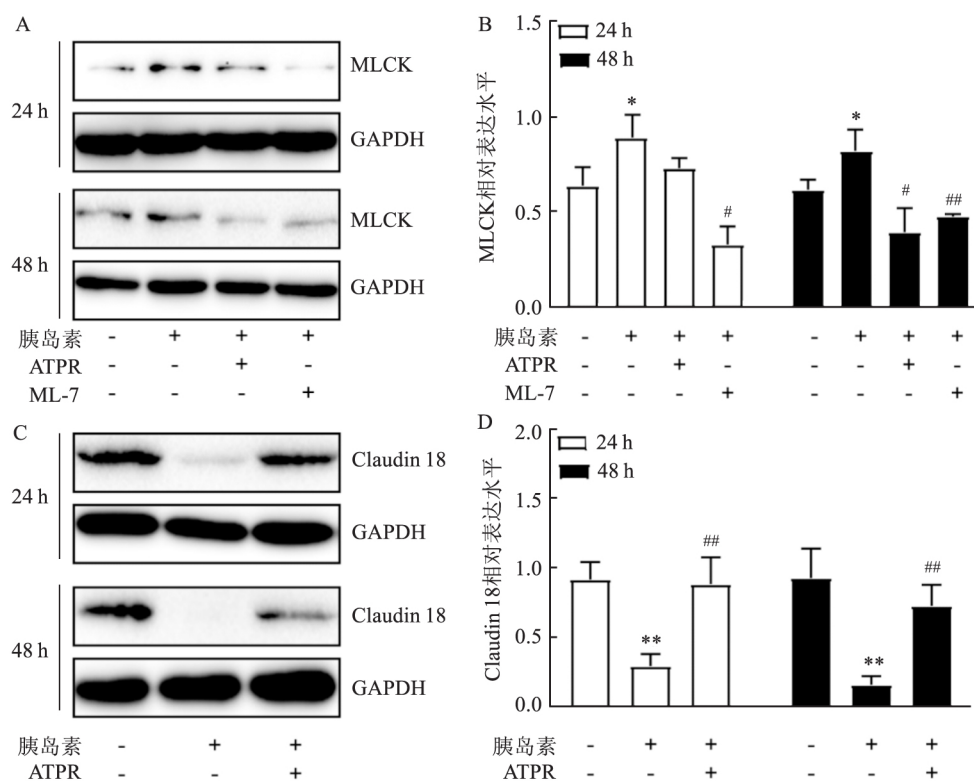


图7 ATPR抑制胰岛素对BGC-823迁移能力促进作用的机制

A: 胰岛素联合 ATPR 以及 ML-7 抑制剂作用于 BGC-823 细胞 24、48 h, Western blot 检测 MLCK 蛋白表达水平; B: MLCK 蛋白表达水平统计图; C: 胰岛素联合 ATPR 作用于 BGC-823 细胞 24、48 h, Western blot 检测 Claudin 18 蛋白表达水平; D: Claudin 18 蛋白表达水平统计图; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与胰岛素组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

Claudin 18 表达水平, 结果见图 7。24 h 各处理组 MLCK 蛋白表达水平分别为 (0.64 ± 0.10) 、 (0.89 ± 0.12) 、 (0.75 ± 0.01) 、 (0.33 ± 0.10) ; Claudin 18 蛋白表达水平分别为 (0.92 ± 0.12) 、 (0.30 ± 0.09) 、 (0.88 ± 0.19) ; 48 h 各处理组 MLCK 蛋白表达水平分别为 (0.62 ± 0.05) 、 (0.82 ± 0.11) 、 (0.39 ± 0.13) 、 (0.48 ± 0.01) ; Claudin 18 蛋白表达水平分别为 (0.93 ± 0.21) 、 (0.16 ± 0.06) 、 (0.73 ± 0.15) 。与对照组比较, 胰岛素能明显促进 MLCK 表达并抑制 Claudin 18 表达 ($F_{24h} = 13.92, 38.44, P_{24h} < 0.05, < 0.01$; $F_{48h} = 20.81, 27.97, P_{48h} < 0.05, < 0.01$); ATPR 和 ML-7 能抑制 MLCK 表达 ($F_{24h} = 28.92, 33.84, P_{24h} > 0.05, < 0.01$; $F_{48h} = 14.35, 21.32, P_{48h} < 0.05, < 0.01$), 同时 ATPR 促进 Claudin 18 表达 ($F_{24h} = 17.12, P_{24h} < 0.01$; $F_{48h} = 28.01, P_{48h} < 0.01$)。结果提示, ATPR 通过抑制 MLCK 表达并促进 Claudin 18 表达抑制胰岛素对 BGC-823 细胞迁移的促进作用。

3 讨论

本研究探讨了在高水平胰岛素条件下, ATPR

对人胃癌细胞 BGC-823 迁移的抑制作用及其机制。我们的研究表明, ATPR 通过降低 BGC-823 细胞中 MLCK 的表达, 同时增加胃特异性紧密连接蛋白 Claudin 18 的表达, 逆转了高水平胰岛素对 BGC-823 细胞迁移的影响, 从而发挥了抗迁移的作用。

研究提示, 代谢紊乱可能在胃癌的发生发展中起重要作用。与没有代谢综合征的胃癌患者比较, 患有代谢综合征的胃癌患者预后更差^[2,9]。代谢综合征具有共同的病理基础, 即胰岛素抵抗和高胰岛素血症。高胰岛素血症患者的血胰岛素水平比正常人高得多, 一般认为空腹血清胰岛素 ≥ 85 pmol/L 为高水平胰岛素, 转换后相当于 0.5 ng/ml。在我们的研究中, 用该浓度的胰岛素刺激 48 h 后, 胃癌细胞的迁移能力明显提高, 而细胞的增殖能力未见明显增加; 在胰岛素浓度达到 10.0 ng/ml 时, 才观察到其促进胃癌细胞的增殖, 说明胰岛素对胃癌细胞运动能力的促进作用明显高于对增殖能力的影响。

ATRA 具有多种生理学作用, 包括保护皮肤和抗肿瘤^[10-11]。作为 ATRA 的人工合成衍生物之一, ATPR 显示了优异的抗肿瘤作用, 本研究观察到在

高水平胰岛素作用下 ATPR 依旧可以发挥抗胃癌细胞迁移的作用;且与 MLCK 特异性药物抑制剂(ML-7)作用类似。MLCK 是肌球蛋白轻链(myosin light chain,MLC)磷酸化的主要酶之一,MLC 的磷酸化被认为可以促进肌球蛋白组装,增加基于肌球蛋白的收缩能力^[2],肌球蛋白参与产生细胞迁移的收缩力,收缩力推动细胞体向前运动,细胞的后部与基质分离。而胰岛素信号轴可通过 MLCK 促进 MLC 的磷酸化^[3],我们的结果也表明高水平胰岛素刺激下,胃癌细胞迁移能力增加的同时 MLCK 蛋白的表达升高,但是联合 ATPR 作用后胃癌细胞迁移能力下降且 MLCK 蛋白的表达降低,提示 ATPR 可能通过抑制 MLCK 蛋白的表达逆转了高水平胰岛素对 BGC-823 细胞迁移的影响。

另一方面,MLC 磷酸化诱导的细胞骨架收缩可调节紧密连接屏障功能。Claudins 是紧密连接复合体的主要元素,Claudins 在肿瘤组织中的表达及在细胞中分布异常已被广泛证实,并与肿瘤进展和转移相关^[4]。Claudin 18 主要表达于胃上皮细胞,在胃癌中经常下调。我们的数据显示,在胰岛素处理后,胃癌细胞中 Claudin 18 蛋白表达明显下降^[5];而联合 ATPR 处理后 Claudin 18 表达较胰岛素组明显升高,提示 ATPR 可能通过上调 Claudin 18 表达来增强紧密连接,从而逆转胰岛素的促迁移作用。

综上所述,ATPR 能逆转高水平胰岛素对胃癌细胞 BGC-823 迁移的促进作用,可能与其抑制胰岛素对 MLCK 和 Claudin 18 的调控密切相关。然而高胰岛素血症下肿瘤细胞的迁移机制极其复杂,要为合并代谢综合征的胃癌患者开发新的治疗药物还需更深更进一步的探讨。

参考文献

- [1] Chen W,Zheng R,Baade P D,et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*,2016,66(2):115-32.
- [2] Li F,Du H,Li S,et al. The association between metabolic syndrome and gastric cancer in Chinese [J]. *Front Oncol*,2018,8:

326.

- [3] Wang W,Fung T T,Wang M,et al. Association of the insulinemic potential of diet and lifestyle with risk of digestive system cancers in men and women [J]. *JNCI Cancer Spectr*,2018,2(4):pky080.
- [4] Wang G,Yin L,Peng Y,et al. Insulin promotes invasion and migration of KRAS (G12D) mutant HPNE cells by upregulating MMP-2 gelatinolytic activity via ERK- and PI3K-dependent signaling [J]. *Cell Prolif*,2019,52(3):e12575.
- [5] Zhang X,Sheng X,Miao T,et al. Effect of insulin on thyroid cell proliferation,tumor cell migration,and potentially related mechanisms [J]. *Endocr Res*,2019,44(1/2):55-70.
- [6] Yang D,Vuckovic M G,Smullin C P,et al. Modest decreases in endogenous all-trans-retinoic acid produced by a mouse Rdh10 heterozygote provoke major abnormalities in adipogenesis and lipid metabolism [J]. *Diabetes*,2018,67(4):662-73.
- [7] Jetten A M. Effects of retinoic acid on the binding and mitogenic activity of epidermal growth factor [J]. *J Cell Physiol*,1982,110(3):235-40.
- [8] 孟 遥,夏 泉,葛金芳,等. 4-氨基-2-三氟甲基苯基维甲酸酯抗肿瘤作用研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*,2016,51(4):606-10.
- [9] Yoo H,Kim H,Lee J H,et al. Study on the relevance of metabolic syndrome and incidence of gastric cancer in Korea [J]. *Int J Environ Res Public Health*,2019,16(7):1101.
- [10] 王多梅,宋 梦,汪 枫,等. 全反式维甲酸对角膜上皮损伤修复过程中细胞凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*,2019,54(4):575-9.
- [11] 周 青,魏 翔,张素梅,等. ATRA 对肝癌细胞 HepG2 生物学行为的影响 [J]. *安徽医科大学学报*,2019,54(12):1928-33.
- [12] Liu L,Chen L,Mai Z,et al. Cyclical compressive stress induces differentiation of rat primary mandibular condylar chondrocytes through phosphorylated myosin light chain II [J]. *Mol Med Rep*,2016,14(5):4293-300.
- [13] Woody S,Stall R,Ramos J,et al. Regulation of myosin light chain kinase during insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. *PLoS One*,2013,8(10):e77248.
- [14] Tabaries S,Siegel P M. The role of claudins in cancer metastasis [J]. *Oncogene*,2017,36(9):1176-90.
- [15] Lu Y,Wu T,Sheng Y,et al. Correlation between Claudin-18 expression and clinicopathological features and prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Gastrointest Oncol*,2020,11(6):1253-60.

All-trans retinoic acid derivative reverses the effect of high-level insulin on the migration of human gastric cancer cell BGC-823

Wang Chen,Hu Anla,Zhao Qihong,et al

(Dept of Nutrition and Food Hygiene,Anhui Medical University,Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the impact of 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate (ATPR), a derivative of all-trans retinoic acid, on the motility of human gastric cancer cell line BGC-823 and the possible mechanisms

网络出版时间: 2021-7-28 13:06 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.042.html>

骨肉瘤外泌体中 miRNA 促侵袭及血管化机制研究

邢江浩, 郝吉庆

摘要 目的 研究骨肉瘤分泌外泌体中的 miR-301a-3p 对骨肉瘤 U2-OS 细胞侵袭能力以及对血管内皮细胞成血管能力的作用及机制。方法 免疫荧光染色用以检测外泌体能否进入血管内皮细胞(HUVEC)中发挥作用, Western blot 法检测 miR-301a-3p 对于血管相关蛋白 CD31 及 α -SMA 以及信号通路蛋白表达的影响, 侵袭实验检测 miR-301a-3p 对骨肉瘤细胞侵袭性的影响。结果 骨肉瘤细胞分泌的外泌体成功进入 HUVEC 中发挥作用, 血管相关蛋白 CD31 及 α -SMA 含量高表达, PI3K/Akt、Mek/Erk 通路蛋白高表达, 血管生长能力较未处理组增强; miR-301a-3p 处理后骨肉瘤细胞侵袭能力增强。结论 骨肉瘤来源外泌体中的 miR-301a-3p 可能通过 PI3K/Akt、Mek/Erk 信号通路促进骨肉瘤 U2-OS 细胞侵袭能力以及 HUVEC 的成血管能力。

关键词 miR-301a-3p; 血管生成; 肿瘤细胞侵袭; PI3K/Akt 信号通路; Mek/Erk 信号通路

中图分类号 R 738.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1396-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.010

2021-03-06 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目(编号: 1804h0802040)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 邢江浩, 男, 硕士研究生;

郝吉庆, 女, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: ayfy_hjq@163.com

骨肉瘤是一种高度恶性的骨肿瘤, 较多发生于 20 岁以下的年轻人或者儿童。骨肉瘤因其低存活率而广为人知, 患者的 5 年生存率仅有 20%。与骨肉瘤相关的病死率较高^[1]。当前的骨肉瘤治疗策略主要包括化学疗法和外科手术。然而, 治疗后患者面临的重大问题仍是肿瘤的持续生长; 研究^[2]显示, 血管生成是骨肉瘤生长和转移的关键环节, 肿瘤中血管网络的生成是骨肉瘤增长的关键因素。外泌体是几乎所有细胞均会释放的细胞外囊泡。它们可以将内容物(如 microRNA、lncRNA、蛋白质和 mRNA)传输到受体细胞, 从而参与细胞间的各种通讯^[3]。肿瘤来源的外泌体已显示在肿瘤生长的不同时期中发挥作用^[4], 但目前对其中的机制研究较少。miR-301a-3p 是近年发现的一种致癌 miRNA, 虽然目前已有文献报道其在多种恶性肿瘤, 如胰腺癌、胃癌、肝癌、肺癌、乳腺癌及结直肠癌中高表达^[5-8], 参与肿瘤的发生、发展, 并且文献报道其高表达与患者的不良预后密切相关。目前尚未有研究其对于骨肉瘤发生发展的作用, 该研究拟阐明在骨肉瘤的生长过程中, 其来源的外泌体内包含的 miRNA 的作用及可能存在的潜在机制。

involved under high-level insulin. **Methods** Firstly, BGC-823 cells were treated with various concentrations of insulin. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of insulin on cell proliferation. Then, BGC-823 cells were treated with ATPR combined with different concentrations (with no effect on cell growth but could simulate the high insulin level of humans) of insulin. Wound healing and Transwell assays were used to measure the motility of BGC-823 cells under different treatments. Finally, Western blot assay was performed to detect the expression of proteins related to cell migration. **Results** CCK-8 results showed that, compared with the control group, 0.5 ng/ml and 5.0 ng/ml insulin had no effect on proliferation of BGC-823 cells after 48 hours while 10.0 ng/ml insulin significantly promoted the cell proliferation. Wound healing and Transwell assay showed that 5.0 ng/ml of insulin promoted the migration of BGC-823 cells, however, ATPR reversed the effect of insulin on BGC-823 cells motility, which could also be attenuated by a specific inhibitor of myosin light chain kinase (MLCK) -ML-7. Western blot revealed that insulin upregulated the expression of MLCK while downregulated Claudin 18. But, after ATPR treated, the protein expression of MLCK was inhibited while the expression of Claudin 18 increased. **Conclusion** ATPR can reverse the effect of high-level insulin on the motility of BGC-823 cells, which may be attributed to the regulation of ATPR on MLCK and Claudin 18 under high-level insulin.

Key words ATPR; gastric cancer; migration; insulin