

• 论 著 •

他莫昔芬对胃癌 HGC-27 细胞 Mcl-1 siRNA、miR-302a 表达的影响

王月诚, 汤晶晶[△]

(十堰市人民医院/湖北医药学院附属人民医院消化内科, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 分析他莫昔芬对胃癌 HGC-27 细胞髓样细胞白血病-1 蛋白(Mcl-1) siRNA、micorRNA-302a(miR-302a)表达的影响。**方法** 将细胞分为对照组、他莫昔芬 0、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 组,检测细胞增殖及凋亡情况;检测细胞中 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平;检测血管内皮生长因子(VEGF)及纤维细胞生长因子 b(bFGF)水平。**结果** 随着他莫昔芬给药量增加,HGC-27 细胞增殖活性显著降低($P<0.05$),早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);HGC-27 细胞 Mcl-1 siRNA 水平均显著降低($P<0.05$),miR-302a 水平均显著升高($P<0.05$);HGC-27 早期 VEGF 及 bFGF 水平均明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 采用他莫昔芬对胃癌 HGC-27 细胞干预后可有效提高细胞中 miR-302a 表达并降低细胞中 Mcl-1 siRNA 水平。

关键词:他莫昔芬; HGC-27 细胞; Mcl-1 siRNA; micorRNA-302a

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.04.020 **中图法分类号:**R735.2

文章编号:1673-4130(2020)04-0462-04 **文献标识码:**A

Effects of tamoxifen on the expression of Mcl-1 siRNA and miR-302a in gastric cancer HGC-27 cells

WANG Yuecheng, TANG Jingjing[△]

(Department of Gastroenterology, Shiyan People's Hospital/People's Hospital

Affiliated to Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the effect of tamoxifen on the expression of myeloid cell leukemia-1(Mcl-1) siRNA and microR-302a(miR-302a) in gastric cancer HGC-27 cells. **Methods** The cells were divided into control group, tamoxifen 0, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ groups, then the proliferation and apoptosis of the cells were detected, the levels of Mcl-1 siRNA and miRNA-302a in the cells were detected, and the levels of vascular endothelial growth factor(VEGF) and b fibroblast growth factor(bFGF) in the medium were detected. **Results** With the increase of tamoxifen dosage, the proliferative activity of HGC-27 cells decreased significantly($P<0.05$), the early apoptosis rate, late apoptosis rate and total apoptosis rate increased significantly($P<0.05$); the Mcl-1 siRNA level of HGC 27 cell decreased significantly($P<0.05$), and the level of miRNA-302a was significantly lower($P<0.05$). The levels of VEGF and bFGF in the early stage of HGC-27 decreased significantly with the increase of tamoxifen dosage($P<0.05$). **Conclusion** Tamoxifen can effectively increase the expression of miRNA-302a and decrease the level of Mcl-1 siRNA in gastric cancer HGC-27 cells.

Key words: tamoxifen; HGC-27 cell; myeloid cell leukemia-1 siRNA; micorRNA-302a

胃癌是临床上较为常见的胃黏膜上皮恶性肿瘤,目前,在中国全部恶性肿瘤中病死率居第 3 位,发病率第 2 位,对人类健康造成严重威胁^[1]。有研究结果显示,雌激素异常表达常导致胃癌细胞增殖,并可能造成胃癌出现内源性免疫逃逸^[2]。他莫昔芬是临床中应用较广的雌激素受体抑制剂,又名三苯氧胺,可抑制内源性诱导丝氨酸蛋白酶抑制剂 9 表达^[3]。

micorRNA-302a(miR-302a)是人体内重要的与细胞发育和分化密切相关的 miRNA,在诸多分子生物学过程中均起到十分重要的作用。此外,有研究指出乳腺癌及卵巢癌病灶组织中可见明显的 miR-302a 低表达,是体内重要的抑癌基因^[4]。髓样细胞白血病-1 蛋白(Mcl-1)是人体内重要的抗凋亡蛋白,在骨髓样白血病细胞系的分化过程中起到十分重要的作用^[5]。

作者简介:王月诚,男,主治医师,主要从事消化道癌症方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:122460431@qq.com。

本文引用格式:王月诚,汤晶晶. 他莫昔芬对胃癌 HGC-27 细胞 Mcl-1 siRNA、miR-302a 表达的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(4): 462-464.

Mcl-1 在多种肿瘤细胞系及组织中均可见明显的异常高表达,通过 RNA 干扰及反义寡核苷酸技术抑制 Mcl-1 表达可有效增强肿瘤细胞对化疗药物敏感性^[6]。但他莫昔芬对胃癌细胞 Mcl-1 siRNA、miR-302a 影响报道较少,因此,笔者选择胃癌 HGC-27 细胞作为研究对象,分析他莫昔芬对胃癌 HGC-27 细胞 Mcl-1 siRNA、miR-302a 表达的影响。现报道如下。

1 资料方法

1.1 一般资料 所用人胃癌细胞 HGC-27 细胞(生产批号:20150321)购自 ATCC 细胞中心,使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,并将细胞置于 37℃,5% CO₂ 的条件培养箱中进行培养。在对细胞进行分组检测时分对照组、他莫昔芬 0、50、100、200、400 μg/mL 组。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖检测 取对数生长期细胞消化后以 2×10⁵/mL 水平接种于 96 孔板中,每孔 90 μL 培养 24 h 后,依照分组要求加入他莫昔芬,对照组加入 10 μL 空白培养基,他莫昔芬 0 μg/mL 组(空白组)加入 10 μL 无血清培养基,培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,4 h 后以吸光度(A)_{450 nm} 检测各孔 A 值。细胞增殖抑制率(%)=(A_{对照组}-A_{给药组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。

1.2.2 细胞凋亡检测 取对数生长期细胞消化后以 3×10⁵/mL 水平接种于 6 孔板中,每空 2 mL,继续培养 24 h,吸除培养基,加入 0、50、100、200、400 μg/mL 他莫昔芬培养 48 h,收集细胞采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。

1.2.3 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平检测 采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平,采用 Trizol 法提取细胞中总 RNA 水平,参照 Takara 公司说明书进行逆转录及 PCR 反应检测,并以 U6 做内参基因,分析细胞中 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平,所有引物均购自中国金斯瑞生物有限公司(生产批号:8172634480001/PE6010),Mcl-1 siRNA 引物序列上游:5'-GTG CCT TTG TGG CTA AAC A-3',下游:5'-TGT TTA GCC ACA AAG GCA C-3';miR-302a 引物序列上游:5'-TAA GRG CTT CCA TGT TTT GGT GA-3',下游:5'-TAA ACC AAG GTA AAA TGG TCG AT-3';U6 引物序列上游:5'-TTA TGG GTC CTA GCC TGA C-3'。

1.2.4 血管内皮生长因子(VEGF)及纤维细胞生长因子 b(bFGF)水平检测 取对数生长期细胞消化后以 2×10⁵/mL 水平接种于 96 孔板中,每孔 90 μL 培养 24 h,依照分组加入他莫昔芬,对照组加入 10 μL

空白培养基,他莫昔芬 0 μg/mL 组加入 10 μL 无血清培养基,培养 24 h,离心收集培养基采用酶联免疫吸附测定法检测血中 VEGF 及 bFGF 水平。

1.3 统计学处理 使用 SPSS19.0 进行统计学分析,采用单因素方差分析各组间数据的差异,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖活性检测结果 本组研究结果显示,随着他莫昔芬给药量增加,HGC-27 细胞增殖活性均显著降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 细胞增殖活性检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)	
组别	增殖率
对照组	0.67±0.12
0 μg/mL 组	0.66±0.13*
50 μg/mL 组	0.21±0.08*
100 μg/mL 组	0.13±0.05*
200 μg/mL 组	0.09±0.02*
400 μg/mL 组	0.05±0.01*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 细胞凋亡活性检测结果 本组研究结果显示,随着他莫昔芬给药量增加,HGC-27 细胞早期凋亡率、晚期凋亡率及总凋亡率均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 患者细胞凋亡活性检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)			
组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
对照组	0.89±0.18	0.47±0.12	1.36±0.15
0 μg/mL 组	0.97±0.25*	0.48±0.14*	1.41±0.24*
50 μg/mL 组	7.58±1.03*	4.19±0.86*	11.77±0.93*
100 μg/mL 组	10.83±1.89*	6.35±1.23*	17.18±1.45*
200 μg/mL 组	19.29±2.18*	11.25±2.19*	30.54±2.18*
400 μg/mL 组	26.13±2.12*	13.18±2.14*	39.31±2.13*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平检测结果 本组研究结果显示,随着他莫昔芬给药量增加,HGC-27 细胞 Mcl-1 siRNA 水平均显著降低($P < 0.05$),miR-302a 水平均显著升高($P < 0.05$),见表 3。

表 3 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平检测结果($\bar{x} \pm s$)		
组别	Mcl-1 siRNA	miR-302a
对照组	1.94±0.21	0.21±0.03
0 μg/mL 组	1.89±0.25*	0.22±0.06*
50 μg/mL 组	1.41±0.19*	0.98±0.12*
100 μg/mL 组	1.08±0.20*	1.22±0.11*
200 μg/mL 组	0.89±0.13*	1.43±0.13*
400 μg/mL 组	0.28±0.09*	1.89±0.15*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 细胞 VEGF 及 bFGF 水平检测结果 本组研究结果显示,随着他莫昔芬给药量增加,HGC-27 细胞早期 VEGF 及 bFGF 水平均明显降低,差异比较有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 细胞 VEGF 及 bFGF 水平检测结果($\bar{x}\pm s$,pg/mL)		
组别	VEGF	bFGF
对照组	3.69±0.89	4.37±0.43
0 μg/mL 组	3.71±0.92 [*]	4.38±0.39 [*]
50 μg/mL 组	1.92±0.33 [*]	3.81±0.37 [*]
100 μg/mL 组	1.59±0.27 [*]	2.18±0.24 [*]
200 μg/mL 组	1.42±0.12 [*]	1.82±0.21 [*]
400 μg/mL 组	1.21±0.11 [*]	1.54±0.13 [*]

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3 讨 论

胃癌是临床中较为常见的全球范围内恶性肿瘤,中国是胃癌的发病高发区,每年新增 40 万新发病例,约占全球的 42%,且呈年轻化趋势^[7]。有研究指出,胃癌发病早期多无明显症状且发病隐匿,大部分患者仅表现为消化不良,极易造成临床误诊及漏诊,因而多数患者在病情确认后已发展至晚期^[8]。临床中胃癌多采用手术、放疗、化疗、生物疗法进行治疗,患者由于在确诊时已发展至晚期失去最佳治疗时机。目前,顺铂、依托泊苷、丝裂霉素、蒽环类药物对胃癌患者的治疗,有一定临床疗效,但存在严重毒副反应,无法取得令人满意的结果^[9]。本研究结果显示,采用他莫昔芬干预后,胃癌 HGC-27 细胞凋亡率显著升高、增殖率显著降低,且细胞表达 VEGF 及 bFGF 水平显著降低。结果提示,他莫昔芬可有效改善肿瘤细胞凋亡及增长状态,具有较高的抗肿瘤效果。分析认为他莫昔芬是临床中应用较广的非甾体类雌激素拮抗剂,可竞争性抑制雌激素受体而发挥生物学功能,具有较高的临床应用价值,本研究结果进一步阐释了其作用机制,为临床应用提供了依据。此外,研究发现他莫昔芬可抑制蛋白激酶 C 信号通路,参与细胞中多种肿瘤相关蛋白降解过程,促进肿瘤细胞凋亡^[10]。本组研究结果表明,胃癌 HGC-27 细胞凋亡及增殖的改变,以及细胞因子水平的改善均可能与其所引起的肿瘤相关蛋白降解密切相关,与 PHUONG 等^[10]的研究一致。同时,有学者指出,采用他莫昔芬对人雌激素阳性细胞干预后可有效抑制肝癌细胞增殖,且呈现明显的时间剂量依赖性^[11],但其在胃癌 HGC-27 细胞中是否具有相似现象,仍有待后续研究分析。

miRNA 是肿瘤细胞中具有广泛功能且性质稳定的重要组成部分,是胃癌诊断、治疗及预后评估的重

要指标^[12]。有研究显示,在诸多肿瘤组织中均可见 miR-302a 表达异常,miR-302a 可有效抑制肿瘤细胞中多种耐药蛋白表达,提高耐药乳腺癌细胞对传统化疗药物敏感性^[13]。Mcl-1 基因是肿瘤细胞中重要的高度扩增基因,在肿瘤发生及发展过程中均起到重要作用。在多种肿瘤细胞中均可见明显的 Mcl-1 高表达,可能在肿瘤细胞逃逸、死亡及抵抗化疗药物机制过程中扮演十分重要的角色。本组研究结果显示,随着他莫昔芬给药量增加,HGC-27 细胞 Mcl-1 siRNA 水平均显著降低,miR-302a 水平均显著升高。miR-302a 可抑制细胞内 SDC1 蛋白表达,阻止卵巢癌发生及发展,在治疗卵巢癌时具有十分重要作用。上调 miR-302a 表达可调节 PI3K 及 MAPK 通路有效抑制多种肿瘤细胞侵袭和增殖能力,可作为治疗肿瘤的重要靶点。miR-302a 表达可有效降低 CXCR4 表达并抑制乳腺癌转移,在预防乳腺癌转移过程中具有十分重要的价值^[14]。在肿瘤病灶组织中,Mcl-1 蛋白表达水平显著高于健康组织,且与肿瘤的临床分期、血管浸润、转移及患者生存率密切相关^[15]。结果表明,他莫昔芬可有效改善肿瘤细胞中 Mcl-1 siRNA、miR-302a 水平,降低肿瘤细胞侵袭及增殖能力。

4 结 论

综上所述,采用他莫昔芬对胃癌 HGC-27 细胞干预后可有效提高细胞中 miR-302a 表达并降低细胞中 Mcl-1 siRNA 水平。

参考文献

[1] KIM J, LEE J, KIM C, et al. Anti-cancer effect of metformin by suppressing signaling pathway of HER2 and HER3 in tamoxifen-resistant breast cancer cells [J]. Tumor Biology, 2016, 37(5): 5811-5819.

[2] WON H S, LEE K M, OH J E, et al. Inhibition of β -catenin to overcome endocrine resistance in tamoxifen-resistant breast cancer cell line [J]. PLoS One, 2016, 11(5): 155983-155995.

[3] 丁瑜莉, 王海霞, 俞腾飞. 他莫昔芬临床应用研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(2): 275-279.

[4] ZHAO J, JIE Q, LI G, et al. Rac1 promotes the survival of H9c2 cells during serum deficiency targeting JNK/c-JUN/Cyclin-D1 and AKT2/MCL1 pathways [J]. Int J Med Sci, 2018, 15(10): 1062-1071.

[5] 杨侠, 王瑞, 徐凯, 等. 敲低髓细胞白血病基因 1 (MCL-1) 促进前列腺癌细胞的增殖并促进其凋亡 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(1): 62-66.

[6] ANINDITA D, DAVID D, CLINT M, et al. Sildenafil (viagra) sensitizes prostate cancer cells to doxorubicin-mediated apoptosis through CD95 [J]. Oncotarget, 2016, 7(4): 4399-4413.

(下转第 469 页)

- [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2017, 9(12): 1507-1508.
 - [9] KOZAR E F, PLYUSHCH M G, POPOV A E, et al. Markers of myocardial damage in children of the first year of life with congenital heart disease in the early period after surgery with cardioplegic anoxia[J]. Bull Exp Biol Med, 2015, 158(4): 421-424.
 - [10] 王希荣. 急性心肌梗死患者血清 BNP、Hcy、hs-CRP 与甲状腺激素变化的检验分析[J]. 系统医学, 2018, 3(9): 66-68.
 - [11] 蔡玲, 范雪梅, 孙健, 等. 血清 H-FABP 和 cTnT 水平联合测定在急性心肌梗死诊断中的作用[J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33(7): 643-645.
 - [12] 苏周. 血清 BNP、HCY、hs-CRP 及心肌三联在急性心肌梗死中的诊断价值[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(30): 21-22.
 - [13] DOROUDGAR S, QUIJADA P, KONSTANDIN M, et al. S100A4 protects the myocardium against ischemic stress[J]. J Mol Cell Card, 2016, 100: 54-63.
 - [14] WANG Y P, WANG J H, WANG X L, et al. Roles of ST2, IL-33 and BNP in predicting major adverse cardiovascular events in acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11): 2677-2684.
 - [15] GONG X J, SONG X Y, WEI H, et al. Serum S100A4 levels as a novel biomarker for detection of acute myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(12): 2221-2225.
 - [16] 陆兆华, 卢谦, 叶少武, 等. 吸烟对青年急性心肌梗死患者治疗及预后的影响[J]. 海南医学, 2014, 25(1): 26-28.
 - [17] 封红灵. 脑钠素与急性心肌梗死预后关系的临床分析[J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(5): 1062-1063.
 - [18] SAKIC A, CHAABANE C, AMBARTSUMIAN N, et al. Extracellular S100A4 and PDGF-BB act in synergy to induce smooth muscle cell phenotypic transition and activation: implications in atherosclerosis[J]. Eur Heart J, 2017, 38(1): 671.
 - [19] GONG XJ, SONG XY, WEI H, et al. Serum S100A4 levels as a novel biomarker for detection of acute myocardial infarction[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(12): 2221-2225.
 - [20] MARUYAMA S, NAKAMURA K, PAPANICOLAOU KN, et al. Follistatin-like 1 promotes cardiac fibroblast activation and protects the heart from rupture[J]. EMBO Mol Med, 2016, 8(8): 949-966.
 - [21] SCHNEIDER M, KOSTIN S, STRØM CC, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes[J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(1): 40-50.
- (收稿日期: 2019-06-12 修回日期: 2019-10-28)
-
- (上接第 464 页)
- [7] KORKMAZ G, RUI L, UGALDE A P, et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9[J]. Nature Biotechnol, 2016, 34(2): 192-198.
 - [8] 黄喜顺, 邓立新, 邱耀辉, 等. 早期胃癌筛查血清学指标研究进展[J]. 临床误诊误治, 2016, 29(8): 109-116.
 - [9] UNSOY G, GUNDUZ U. Targeted silencing of survivin in cancer cells by siRNA loaded chitosan magnetic nanoparticles[J]. Expert Re Anti Therapy, 2016, 16(7): 789-797.
 - [10] PHUONG N T T, SANG K K, JI H I, et al. Induction of methionine adenosyltransferase 2A in tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 13902-13916.
 - [11] 金伟, 袁媛, 汤继春, 等. 他莫昔芬与辛伐他汀对人乳腺癌细胞 MCF-7 的协同效应及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(5): 677-681.
 - [12] LI A, LI J, LIN J, et al. COL11A1 is overexpressed in gastric cancer tissues and regulates proliferation, migration and invasion of HGC-27 gastric cancer cells in vitro[J]. Oncol Res, 2017, 37(1): 333-340.
 - [13] DAI Y, JIN S, LI X, et al. The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 1354-1368.
 - [14] 张振华, 阚云珍, 苏自杰. miR-139 通过下调 CXCR4/CXCL12 生物轴抑制乳腺癌定向转移的分子机制研究[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(1): 61-67.
 - [15] RIZVI S, YAMADA D, HIRSOVA P, et al. A hippo and fibroblast growth factor receptor autocrine pathway in cholangiocarcinoma[J]. J Bio Chem, 2016, 291(15): 8031.
- (收稿日期: 2019-06-08 修回日期: 2019-10-20)