

· 实验研究 ·

二甲双胍对人胃癌 SGC-7901/L-OHP 细胞 奥沙利铂耐药逆转作用的研究

孙玉成, 金恩鸿

延边大学附属医院普外一科, 吉林 延吉 133000

摘要: **目的** 探讨奥沙利铂(L-OHP)耐药的人胃癌细胞(SGC-7901/L-OHP)在联合应用二甲双胍(DMBG)后增殖及凋亡的变化,并探讨其可能的作用机制。**方法** 首先使 SGC-7901 细胞在持续接触并梯次增加 L-OHP 浓度的条件下培养,建立 SGC-7901/L-OHP 细胞株,四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测、计算 DMBG 及 L-OHP 单独使用时对 SGC-7901/L-OHP 的细胞增殖抑制率及半数抑制浓度(IC_{50}),计算 DMBG 联合应用 L-OHP 后细胞增殖抑制率、 IC_{50} 及逆转指数;流式细胞仪检测分析联合用药前后 SGC-7901/L-OHP 细胞周期分布及细胞凋亡的变化,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测细胞周期调节因子 Cyclin D1 mRNA 表达,Western-blot 法检测 Cyclin D1 蛋白表达。**结果** (1)MTT 法检测结果:DMBG 作用于 SGC-7901/L-OHP 细胞 48 h 后 IC_{50} 为 $(320.13 \pm 2.15) \mu\text{g/ml}$,L-OHP 单独作用于 SGC-7901/L-OHP 细胞 48 h 后 IC_{50} 为 $(69.12 \pm 0.27) \mu\text{g/ml}$,联用 DMBG 后的 IC_{50} 降至 $(21.07 \pm 2.15) \mu\text{g/ml}$,差异有统计学意义($P < 0.05$),逆转指数为 3.28 倍。(2)流式细胞仪检测结果:联合用药后各组细胞周期的构成情况有统计学差异($P < 0.05$),L-OHP + DMBG 组 SGC-7901/L-OHP 细胞停留在 G1 期的比例最高,相应的停留在 G2 期及 S 期的细胞比例最低;细胞凋亡率分别为空白组 $(6.51 \pm 3.24)\%$,DMBG 组 $(9.25 \pm 1.27)\%$,L-OHP 组 $(17.63 \pm 0.31)\%$,DMBG + L-OHP 组 $(47.13 \pm 3.26)\%$;依空白组、DMBG 组、L-OHP 组、DMBG + L-OHP 组之序,凋亡率递增($P < 0.01$),组间两两(除空白组与 DMBG 组间)比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(3)Cyclin D1 mRNA 及蛋白检测结果:联用 DMBG 后 Cyclin D1 mRNA 及蛋白表达均较联合用药前明显下调(P 均 < 0.05)。**结论** L-OHP 与 DMBG 联合应用能改变 SGC-7901/L-OHP 细胞周期分布,逆转 SGC-7901/L-OHP 细胞对 L-OHP 的耐药性,促进 SGC-7901/L-OHP 细胞凋亡。

关键词: 胃癌; 耐药; 奥沙利铂; 二甲双胍; 逆转; 细胞周期; 凋亡率; 增殖抑制; 细胞周期调节因子 Cyclin D1

中图分类号: R 735.3 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2018)04-0499-06

Reversal effect of metformin on drug resistance of oxaliplatin in human gastric cancer SGC-7901/L-OHP cells

SUN Yu-cheng, JIN En-hong

First Department of General Surgery, Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China

Abstract: Objective To investigate the changes of proliferation and apoptosis of Oxaliplatin-resistant human gastric cancer cells (SGC-7901/L-OHP) after combination with metformin (DMBG), and explore its possible mechanism.

Methods SGC-7901/L-OHP cell lines were established by persistent contact and gradually increasing of L-OHP concentration on SGC-7901 cells. MTT assay was used to determine and calculate the cell proliferation inhibition rate and IC_{50} of SGC-7901/L-OHP when DMBG and L-OHP were used alone or combined, as well as to calculate the reversal index when DMBG combined with L-OHP used. Cell cycle phase distribution and apoptosis of SGC-7901/L-OHP cells were detected by flow cytometry before and after medication; the expression of Cyclin D1 mRNA (cell cycle regulators) was detected by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); the expression of Cyclin D1 protein was determined by Western blot method. **Results** (1) At 48 hours after medication, MTT results showed that IC_{50} were $(320.13 \pm 2.15) \mu\text{g/ml}$ for DMBG contacting SGC-7901/L-OHP cells, $(69.12 \pm 0.27) \mu\text{g/ml}$ for L-OHP in single use and $(21.07 \pm 2.15) \mu\text{g/ml}$ after combination of DMBG and L-OHP, respectively. There was a significant difference between alone medication and combined medication ($P < 0.05$). The reversal index was 3.28 times. (2) Flow cytometry showed that

there were significant differences in compositions of cell cycle in each group after combined use of drugs ($P < 0.05$). In the L-OHP + DMBG group, the proportion of SGC-7901/L-OHP cells staying in G1 phase was the highest, and the corresponding proportion of cells staying in G2 phase and S phase was the lowest. After combined use of drugs, the apoptosis rates were $(6.51 \pm 3.24)\%$ in blank control group, $(9.25 \pm 1.27)\%$ in DMBG group, $(17.63 \pm 0.31)\%$ in L-OHP group and $(47.13 \pm 3.26)\%$ in DMBG + L-OHP group, respectively, and according to control group, DMBG group, L-OHP group, DMBG + L-OHP group of ascending order ($P < 0.01$). There were significant differences in pairwise comparisons except for intra-group of blank control group and DMBG group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). (3) The expressions of Cyclin D1 mRNA and Cyclin D1 protein significantly decreased after combination of drugs compared with pre-medication (all $P < 0.05$). **Conclusion** Application of Oxaliplatin combined with Melbine can change the distribution of SGC-7901/L-OHP cell cycle, reverse the drug-resistance of SGC-7901/L-OHP to L-OHP, and promote the apoptosis of SGC-7901/L-OHP cells.

Key words: Gastric carcinoma; Drug resistance; Oxaliplatin; Metformin; Reverse; Cell cycle; Apoptosis rate; Proliferation inhibition; Cell cycle regulator Cyclin D1

以手术为主,化疗加适度放疗的综合治疗模式仍是当前对胃癌治疗的共识,但是对三、四期不能手术以及术后复发转移的胃癌,化疗则是其最主要的治疗手段^[1],由于胃癌细胞对化疗药物具有固有的和获得性的耐药特点,使这一治疗方法的应用受到一定程度的限制,治疗效果也受到很大影响,以致胃癌的病死率与其他很多恶性肿瘤相比仍居高不下^[2]。奥沙利铂(L-OHP)是目前临床上应用最广泛的第三代铂类抗癌药,用于多种恶性肿瘤的治疗,具有疗效好、毒副作用相对较低的优点^[3]。然而,近年来诸多基础及临床研究发现,胃癌细胞对 L-OHP 易产生耐药性,因而严重影响其抗癌效果,如何逆转胃癌细胞对 L-OHP 的耐药性是提高胃癌疗效、降低病死率的关键。二甲双胍(DMBG)应用于临床治疗 2 型糖尿病多年,近年来发现其具有抗癌作用,且与一些抗癌药物联用可在一定程度上逆转某些癌细胞对该抗癌药物的耐药性,提高抗癌效果^[4]。受此启发,本实验用 DMBG 与 L-OHP 联用对 L-OHP 耐药的胃癌 SGC-7901/L-OHP 细胞进行研究,观察 DMBG 对 SGC-7901/L-OHP 细胞耐药性的逆转作用,以期为临床解决 L-OHP 耐药问题、提高胃癌疗效寻找一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 SGC-7901 细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC),L-OHP 购自南京制药有限公司,DMBG 购自上海施贵宝制药,MTT 试剂盒为美国 Sigma 公司产品,Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自上海美吉生物医药科技,细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司,反转录试剂盒(包括 DNA 模板、引物、DNA 聚合酶、反转录酶、底物、缓冲液及 MgCl₂)购自日本 TaKaRa 公司,Trizol 试剂及内参引物购自日本 TaKaRa 公司,CyclinD1 蛋白检测试剂盒及 β -actin 抗体、鼠抗人

Cyclin D1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,Galaxys 型 CO₂ 培养箱购自英国 RS Biotech 公司,FACS Calibur 型流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司,全自动酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 建立 SGC-7901/L-OHP 细胞株 将 SGC-7901 细胞进行常规培养传代后取对数生长期细胞,以 0.25% 胰酶消化后制成单细胞悬液,接种于细胞培养瓶中,根据预实验结果,用含有 12.5 $\mu\text{g/ml}$ L-OHP (抑制率为 20% 浓度)的 RPMI 1640 培养液培养,经过多次传代,当细胞生长稳定无明显变形后梯次增加药物浓度,经过 3 个月的诱导,使胃癌 SGC-7901 细胞依次能在含 25、50、100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ L-OHP 的 RPMI 1640 培养液中稳定生长和传代,从而建立 SGC-7901/L-OHP 细胞株。

1.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖活性、计算细胞抑制率、IC₅₀ 及耐药指数 分别取 DMBG 0.5 g 及 L-OHP 0.2 g,用 PBS 液各配成 5 g/L 工作液,取对数生长期 SGC-7901/L-OHP 细胞经 0.25% 胰酶消化制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 单细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μl ,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 使细胞充分贴壁,取出后分别加入不同浓度的 DMBG 和 L-OHP,使 DMBG 各组终浓度为 25、50、100、200 和 400 $\mu\text{g/ml}$,L-OHP 各组终浓度为 12.5、25、50、100 和 200 $\mu\text{g/ml}$,阴性对照组每孔加入 100 μl RPMI 1640 培养液,空白组加 200 μl 普通培养液,每组设 6 个复孔,培养 48 h 后每孔加入 MTT 液 10 μl ,再培养 4 h,取出后用酶标仪于 570 nm 波长测定各组 OD 值,抑制率 = $1 - (\text{实验组平均 OD 值} - \text{空白组平均 OD 值}) / (\text{阴性对照组平均 OD 值} - \text{空白组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。根据抑制率计算两药的半数抑制浓度(IC₅₀)及 DMBG 的 10% 抑制浓度(IC₁₀),然后选择 IC₁₀ 浓度 DMBG 与不同浓度 L-OHP 联合作用于 SGC-7901/L-

OHP 细胞,重复上述实验步骤,计算两药联合后细胞增殖抑制率及逆转倍数(使用逆转剂前 IC_{50} /使用逆转剂后 IC_{50})。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期分布 取对数生长期 SGC-7901/L-OHP 细胞,消化制备成 1×10^5 /ml 单细胞悬液,接种于 24 孔板,每孔 2 ml,分为 DMBG 组、L-OHP 组、DMBG + L-OHP 组、空白组,每组设 3 个复孔,DMBG 选用 IC_{10} 、L-OHP 选用 $50 \mu\text{g/ml}$ 为实验药物浓度,作用时间为 48 h,结束后将细胞消化并装于 EP 管中进行离心,离心速率为 $300 \times g$,5 min,检测细胞周期时每管加入细胞固定液(70% 预冷乙醇 + 5% FBS + 25% PBS) $200 \mu\text{l}$,离心后弃上清液用 PBS 洗涤 2 次,加碘化丙啶(PI) $100 \mu\text{l}$ 静止 30 min,再加 $300 \mu\text{l}$ PBS 液混匀;检测细胞凋亡时取对数生长期 SGC-7901/L-OHP 细胞,加入 Binding Buffer 液,调整细胞密度为 1×10^5 /ml,制备成 Binding Buffer 悬浮细胞液,取 $400 \mu\text{l}$ Binding Buffer 悬浮细胞加入 EP 管中,在悬液中加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC,于 $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光条件下孵育 15 min,取出后加入 $10 \mu\text{l}$ PI 再孵育 5 min,取出立即进行检测。

1.5 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测 Cyclin D1 mRNA 表达 取对数生成期 SGC-7901/L-OHP 细胞,消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,分为 L-OHP 组、DMBG + L-OHP 组、对照组,分别接种于 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{l}$,每组设 3 个复孔,L-OHP 组、DMBG + L-OHP 组两组 L-OHP 终浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$,DMBG + L-OHP 组另加入 DMBG,使 DMBG 终浓度为 $28.00 \mu\text{g/ml}$ (IC_{10}),对照组仅用等量 PBS 液处理,继续培养 48 h,而后应用荧光定量 PCR 法,以 Trizol 提取细胞总 RNA,取 $1 \mu\text{g}$,以 Oligo dT 作为引物按试剂盒(日本 TaKaRa 公司)说明操作逆转录合成第一条 cDNA 链,以此链为模板按说明书步骤操作,进行 PCR 扩增及定量检测。引物序列: Cyclin D1: 上游: $5'$ -ATG AAG GAG ACC ATC CCC CT- $3'$,下游: $5'$ -CAA TGA AAT CGT GCG GGG TC- $3'$, β -actin: 上游: $5'$ -CGG GAA ATC GTG CGT GAC- $3'$,下游: $5'$ -TGG AAG GTG GAC AGC GAG G- $3'$,PCR 反应条件:先 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,而后 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 30 s, $52 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 45 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 45 s,共进行 35 个循环,最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 下延伸 7 min。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示 Cyclin D1 mRNA 相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 蛋白质印迹法(Western-blot)检测 Cyclin D1 蛋白表达 取对数生成期 SGC-7901/L-OHP 细胞,消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,分别接种于 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{l}$,分为 L-OHP 组、DM-

BG + L-OHP 组、对照组, L-OHP 组、DMBG + L-OHP 组加入 L-OHP,使两组 L-OHP 终浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$, DMBG + L-OHP 组另加入 DMBG,使 DMBG 终浓度为 $28.00 \mu\text{g/ml}$ (IC_{10}),对照组仅用等量 PBS 液处理,每组设 3 个复孔,继续培养 48 h,应用 Western-blot 法,对各实验组和对照组进行 Cyclin D1 蛋白检测,按照美国 Santa Cruz 公司试剂盒说明书要求和步骤进行操作,利用 Kodak DigitalScience1D Image Analysis Software(EastmanKodak Company, USA)测定 Western blot 条带净灰度值,而后与内参 β -actin(美国 Santa Cruz 公司)相比较,计算其比值,为蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件对实验结果进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多元方差分析, Bartlett 检测方差齐性,组间两两比较,方差齐时用 LSD- t 法,方差不齐时用 Dunnett's T_3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DMBG 对 SGC-7901/L-OHP 细胞 L-OHP 耐药的逆转作用 应用 MTT 法,使用不同梯度浓度 DMBG 作用 SGC-7901/L-OHP 细胞 48 h,检测细胞抑制率结果: $25 \mu\text{g/ml}$ 为 $(9.02 \pm 4.17)\%$, $50 \mu\text{g/ml}$ 为 $(17.15 \pm 3.43)\%$, $100 \mu\text{g/ml}$ 为 $(29.21 \pm 4.75)\%$, $200 \mu\text{g/ml}$ 为 $(41.03 \pm 1.32)\%$, $400 \mu\text{g/ml}$ 为 $(57.41 \pm 2.56)\%$ 。 IC_{50} 为 $(320.13 \pm 2.15) \mu\text{g/ml}$, IC_{10} 浓度为 $(28.02 \pm 1.37) \mu\text{g/ml}$,使用 $28.00 \mu\text{g/ml}$ (即 IC_{10} 浓度) DMBG 联用 L-OHP 后能明显逆转 SGC-7901/L-OHP 细胞对 L-OHP 的耐药性,增强药物敏感性, L-OHP 单独作用 48 h 的 IC_{50} 为 $(69.12 \pm 0.27) \mu\text{g/ml}$,联用 DMBG 后 IC_{50} 为 $(21.07 \pm 2.15) \mu\text{g/ml}$,逆转指数为 3.28 倍。

2.2 DMBG 与 L-OHP 联用对 SGC-7901/L-OHP 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测两药单用及联用的细胞凋亡情况,结果细胞凋亡率空白组为 $(6.51 \pm 3.24)\%$, DMBG 组 $(9.25 \pm 1.27)\%$, L-OHP 组 $(17.63 \pm 0.31)\%$, DMBG + L-OHP 组 $(47.13 \pm 3.26)\%$;依空白组、DMBG 组、L-OHP 组、DMBG + L-OHP 组之序,凋亡率递增($P < 0.01$),组间两两(除空白组与 DMBG 组间)比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。显示两药联用较单独应用 L-OHP 具有明显促进 SGC-7901/L-OHP 细胞凋亡作用,见图 1。

2.3 L-OHP 与 DMBG 单用及联用对 SGC-7901/L-OHP 细胞周期的影响 用流式细胞仪检测分析显

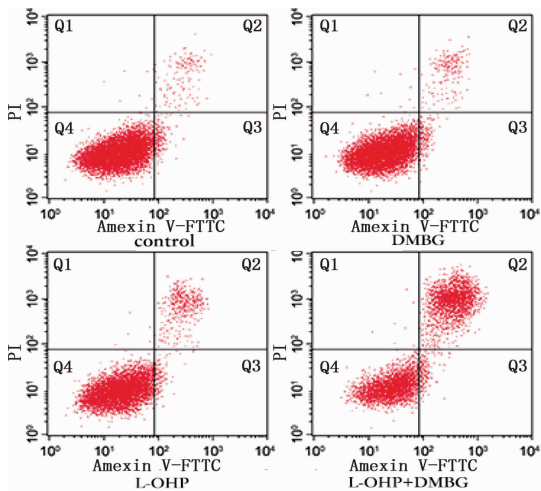
示,各组细胞周期的构成情况有统计学差异($P < 0.05$),L-OHP + DMBG 组 SGC-7901/L-OHP 细胞停留在 G1 期的比例最高,相应的停留在 G2 期及 S 期的比例最低。提示 L-OHP 与 DMBG 联用可改变 SGC-7901/L-OHP 细胞周期分布,见表 1 和图 2。

2.4 L-OHP 与 DMBG 单用及联用对 Cyclin D1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 法检测各组 Cyclin D1 mRNA 表达,结果显示,与对照组(0.0087 ± 0.0013)相比,L-OHP(0.0079 ± 0.0002)与 DMBG 单独用药时(0.0084 ± 0.0021) Cyclin D1 mRNA 相对表达量无明显变化($P > 0.05$),L-OHP 与 DMBG 联用后 Cyclin D1 mRNA 相对表达量(0.0027 ± 0.0016)较 L-OHP 组或 DMBG 组分别降低(P 均 < 0.05)。见图 3。

2.5 L-OHP 与 DMBG 单用及联用对 Cyclin D1 蛋白表达的影响 Western-blot 法 Cyclin D1 蛋白检测结

表 1 L-OHP 与 DMBG 单用及联用后 SGC-7901/L-OHP 细胞周期分布变化 ($n=6, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞周期		
	G1 期	G2 期	S 期
对照组	36.58 ± 0.75	30.11 ± 3.21	33.31 ± 1.43
DMBG 组	38.23 ± 2.15	32.21 ± 1.37	29.56 ± 0.35
L-OHP	39.32 ± 2.57	28.51 ± 0.44	32.17 ± 4.05
L-OHP + DMBG	59.03 ± 3.12	21.22 ± 1.37	19.75 ± 2.03
P 值	< 0.05		



注: Q1 为坏死细胞, Q2 为晚期凋亡细胞, Q3 为早期凋亡细胞, Q4 为活细胞。

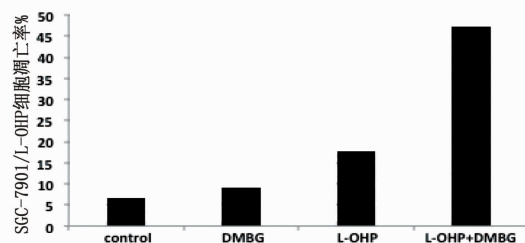


图 1 L-OHP 与 DMBG 联用对 SGC-7901/L-OHP 细胞凋亡的影响

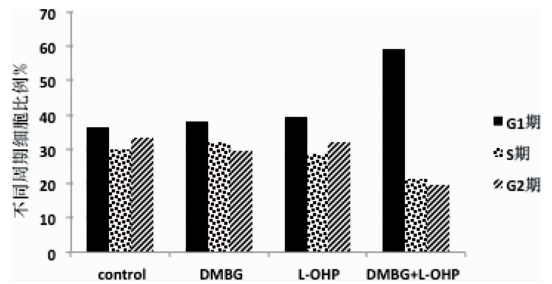


图 2 L-OHP 与 DMBG 单用及联用后 SGC-7901/L-OHP 细胞周期分布变化

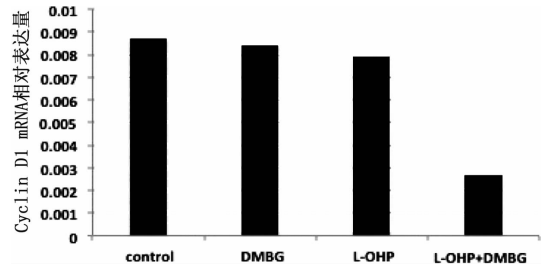


图 3 L-OHP 与 DMBG 单用及联用对 Cyclin D1 mRNA 表达的影响

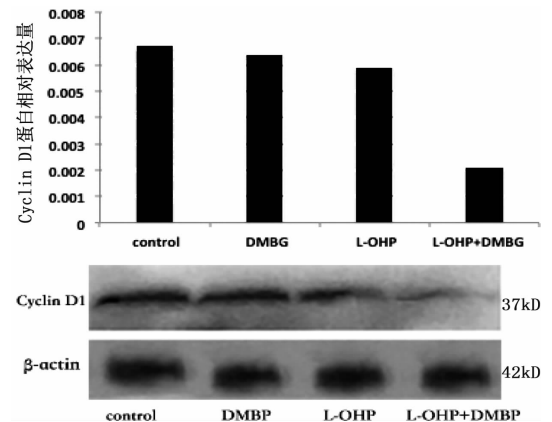


图 4 L-OHP 与 DMBG 单用及联用对 Cyclin D1 蛋白表达的影响,与对照组(0.0067 ± 0.00012)相比,L-OHP(0.0059 ± 0.0031)与 DMBG 单独用药时(0.0064 ± 0.0023) Cyclin D1 蛋白相对表达量无明显变化($P > 0.05$),L-OHP 与 DMBG 联用后 Cyclin D1 相对表达量(0.0021 ± 0.0004)较 L-OHP 组或 DMBG 组分别降低(P 均 < 0.05)。见图 4。

3 讨论

L-OHP 作为第三代铂类抗肿瘤药物是目前胃癌化疗的一线药物,其抗癌机制主要是以 DNA 为靶点,阻断 DNA 复制和转录,从而诱导肿瘤细胞凋亡^[5]。随着临床应用的扩展,其耐药问题开始显现并引起高度重视,如何逆转 L-OHP 的耐药问题已成为当前研究和关注的热点。张冬梅等^[6]研究发现苦参碱能够通过降低细胞内 LRP 和 P-gp 表达逆转人结肠癌细胞 HT29 对 L-OHP 的耐药性。Tan 等^[7]研究发现 miR-409-3p 可通过下调 Beclin-1 介导的自噬作用增加结肠癌细胞对 L-OHP 的敏感性。屈雁玲等^[8]通过对

HCT116/OXA 细胞株体外研究发现甲基莲心碱可逆转人结肠癌细胞对 L-OHP 的耐药性,其机制主要是调节 Bcl-2/Bax 表达水平,从而与 L-OHP 产生协同作用有关。这些研究虽然取得了一定成果,但是所用药物只能在体外实验中使用,尚不能应用于临床。

DMBG 是治疗糖尿病的常用药物,临床用于治疗 2 型糖尿病多年,其抗肿瘤作用最早由 Evans 等发现^[9],此后研究表明它不仅能提高肿瘤患者的生存期,还能增加肿瘤患者化疗及放疗的敏感性。目前关于 DMBG 潜在的抗肿瘤机制有多种观点,如启动 LKB1/AMPK 通路、调控胰岛素/IGF-1 轴^[10]、上调或诱导 microRNA 的表达^[11]、活化 Caspase 分子^[12]、诱导细胞周期停止或凋亡^[13]、激动免疫系统^[14]、消灭肿瘤干细胞^[15]等。除上述机制外,程贝贝等^[16]体外实验发现,DMBG 可影响结肠癌 HCT116 细胞的周期分布,使 S 期细胞的比例减少,G2/M 期细胞的比例明显升高。王立岩等^[17]的体外实验发现在不同浓度 DMBG 作用下卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡率明显升高,同时细胞周期发生明显变化,随着 DMBG 浓度的增加,G0/G1 期细胞百分率降低,而 G2/M 期细胞百分率升高。有关 DMBG 联用抗癌药物增加抗癌药物活性、逆转耐药性的研究始于最近,王小霞等^[18]报道,DMBG 能有效逆转人卵巢癌耐顺铂细胞株 SKOV3/DDP 的耐药作用。潘永红等^[4]报道,吉非替尼联合 DMBG 可显著抑制 EGFR-TKIs 原发性耐药非小细胞肺癌 H1975 细胞的增殖、侵袭和迁移,促使肿瘤细胞凋亡;其机制可能通过激活线粒体凋亡途径及逆转上皮间质转化的发生来发挥抗肿瘤作用。本实验探讨 DMBG 与 L-OHP 联用对 SGC-7901/L-OHP 细胞耐药的逆转作用发现,DMBG 除了单用对 SGC-7901/L-OHP 细胞增殖有一定的抑制作用外,以 IC₁₀ 时的 DMBG 与 L-OHP 联用后能明显逆转 SGC-7901/L-OHP 对 L-OHP 的耐药性,增强药物敏感性,L-OHP 单独作用 48 h 的 IC₅₀ 为 69.12 μg/ml,联用 DMBG 后 IC₅₀ 为 21.07 μg/ml,逆转指数为 3.28 倍。流式细胞仪检测结果,联用后细胞凋亡率 DMBG + L-OHP 组 (47.13 ± 3.26)% 较 L-OHP 组 (17.63 ± 0.31)% 明显提高。由于 L-OHP 对癌细胞的攻击靶点主要在 DNA^[19],而 G1 期是细胞间期起始阶段,也是决定细胞周期能否正常进行的关键阶段,这一阶段 DNA 容易受攻击而损伤,如果肿瘤细胞在 G1 期受到阻滞而停留,则会给 L-OHP 对其 DNA 的攻击和损伤创造更多机会。本实验发现,L-OHP + DMBG 组与 L-OHP 组相比较 SGC-7901/L-OHP 细胞停留在 G1 期的比例明显增加,相应停留在 S 期、G2 期的比例明显减少,

这一结果与 DMBG 在结肠癌实验中的一些报道相左,可能与 DMBG 在不同种类肿瘤细胞中影响了不同细胞周期调节因子有关。本实验进一步检测发现,L-OHP 与 DMBG 联用后细胞周期调节因子 Cyclin D1 mRNA 与蛋白表达较单用 L-OHP 及 DMBG 组明显下调。Cyclin D1 是目前公认的细胞 G1 期调节蛋白,Cyclin D1 和 CDK 共同驱使细胞周期从一时期进入下一时期,其中 CDK 发挥引擎作用,而 Cyclin D1 则起着调控作用^[20],由于 Cyclin D1 表达下调,使 SGC-7901/L-OHP 细胞停滞在 G1 期的比例明显增多,因而严重影响细胞周期的正常进程,随着停滞时间的延长,L-OHP 有更多机会攻击肿瘤细胞的 DNA,同时 DNA 损伤的累积效应也会逐渐显现,当损伤累积到一定程度即会导致细胞凋亡,这可能是 DMBG 逆转胃癌细胞对 L-OHP 耐药的重要机制之一。

综上所述,DMBG 与 L-OHP 联用可逆转 SGC-7901/L-OHP 细胞对 L-OHP 的耐药性,其机制可能与二药联用后下调了 Cyclin D1 表达,从而改变 SGC-7901/L-OHP 细胞周期分布有关。由于 DMBG 临床应用多年,其代谢特点、毒副作用已被熟知,因此,是最有希望应用于临床的胃癌化疗 L-OHP 耐药的逆转剂。

参考文献

- [1] 俞悦,周爱萍,曾益新. HER2 阳性胃癌的治疗研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2017,44(2):59-63.
- [2] 李小明,李东芳,王云启. 卡培他滨加奥沙利铂联合鸦胆子油治疗晚期胃癌的临床观察[J]. 中国临床研究,2016,29(3):374.
- [3] 许凤杰,刘瑞斯,彪林海,等. 抗癌药物奥沙利铂与 DNA 分子相互作用的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,2016,43(7):684-690.
- [4] 潘永红,焦琳,林采余,等. 吉非替尼联合二甲双胍对 EGFR-TKIs 原发性耐药非小细胞肺癌 H1975 细胞的抑制作用及其机制研究[J]. 第三军医大学学报,2017,39(7):668-674.
- [5] 龚新雷,杨柳青,秦叔逵. 奥沙利铂抗肿瘤作用及其免疫学新机制的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2016,21(11):1031.
- [6] 张冬梅,张雅明. 苦参碱逆转人结肠癌细胞株 (HT-29) 奥沙利铂耐药性的作用及机制研究[J]. 湖南中医药大学学报,2016,36(11):22-26.
- [7] Tan S, Shi H, Ba M, et al. miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4):1030-1038.
- [8] 屈雁玲,马俊丽,邓甘露,等. 甲基莲心碱逆转人结肠癌细胞奥沙利铂耐药的体外研究[J]. 中国普通外科杂志,2017,26(3):325-332.
- [9] 踪佳鹏,冯文. 二甲双胍增强子宫内腺癌顺铂化疗敏感性及其可能机制[J]. 江苏医药,2016,42(4):387-390,436.
- [10] 冯瑾,陈光侠,费素娟. 二甲双胍抗肿瘤机制的研究进展[J]. 实用药物与临床,2016,19(10):1310-1315.

- [11] 郭海瑞,徐桂芬,张华. 二甲双胍诱导自噬的研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(3):490-493.
- [12] 胡俊锋,张先娇,王沛侠,等. 二甲双胍抗肿瘤作用及其分子机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2015,15(31):6166.
- [13] Gao ZY, Liu Z, Bi MH, et al. Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(5):1700-1706.
- [14] 李金平,宁志丰,刘复兴,等. 老药新用,小分子药物二甲双胍的抗肿瘤研究进展[J]. 中国生化药物杂志,2016,37(8):16-21.
- [15] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signaling[J]. Cell Research, 2013, 24(1):42-57.
- [16] 程贝贝,冯如,陈光侠,等. 二甲双胍对结肠癌 HCT116 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2017,26(8):857.
- [17] 王立岩,张贝贝,赫东芸,等. 二甲双胍和紫杉醇对卵巢癌 SK-OV3 细胞体外增殖和凋亡的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017,43(2):255-259.
- [18] 王小霞,尹书琴,康佳丽,等. 二甲双胍逆转人卵巢癌细胞株对顺铂耐药的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志,2017,22(1):12.
- [19] 房晓,尹华,胡腾惠,等. 奥沙利铂对结肠癌细胞 DNA 损伤修复类抗药基因表达的影响[J]. 实用临床医药杂志,2017,21(1):1-4.
- [20] 苗玉,周玮玮,张欣,等. Wnt 信号通路成员蛋白 NKD1、 β -catenin 和 Cyclin D1 在结直肠腺癌中的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(2):146-151.

收稿日期:2017-10-21 编辑:王国品

· 实验研究 ·

miR-138 对脑胶质瘤细胞侵袭转移能力的影响及机制

李会兵¹, 姚娟²

1. 湖北省汉川市人民医院神经外科, 湖北 孝感 432300;

2. 湖北省汉川市人民医院静脉用药调配中心, 湖北 孝感 432300

摘要: 目的 研究微小核糖核酸-138(miRNA138, miR-138)对脑胶质瘤细胞 U87 侵袭和转移的影响及其机制。方法 将脑胶质瘤细胞株 U87 分别转染 miR-138 类似物(mimics)及阴性对照(miR-NC),实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 miR-138 表达,Transwell 实验检测 U87 细胞侵袭转移能力,Western-blot 检测信号素(semaphorin, Sema)4C 的表达。结果 qRT-PCR 检测结果证实,miR-138 mimics 组 U87 细胞 miR-138 相对表达量明显高于 miR-NC 组(4.43 ± 0.96 vs 2.58 ± 0.62, $P < 0.05$)。Transwell 实验表明,miR-138 mimics 组 U87 细胞侵袭转移能力明显低于 miR-NC 组($P < 0.01$)。Western-blot 结果表明,miR-138 mimics 组 U87 细胞 Sema4C 相对表达量明显低于 miR-NC 组(0.36 ± 0.03 vs 1.03 ± 0.13, $P < 0.01$)。结论 miR-138 过表达能有效抑制 U87 细胞的侵袭转移,其机制可能是通过下调 Sema4C 表达而实现。

关键词: 微小核糖核酸-138; 信号素 4C 基因; 脑胶质瘤; 侵袭; 转移

中图分类号: R 730.23 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2018)04-0504-04

Effect of miR-138 on invasion and metastasis of glioma cells and its mechanism

LI Hui-bing*, YAO Juan

* Department of Neurosurgery, Hanchuan People's Hospital, Xiaogan, Hubei 432300, China

Corresponding author: YAO Juan, E-mail: 37403542@qq.com

Abstract: Objective To study the effect of microRNA138 (miR-138) on glioma U87 cells invasion and migration and its mechanism. **Methods** Human glioma U87 cell lines were transfected with miR-138 mimics (miR-138 mimics group) and the negative control (miR-NC group), respectively. The expression of miR-138 was detected by real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). The cells migration and invasion abilities were tested by Transwell assay. The expression of semaphorin-4C (Sema4C) protein was detected by Western-blot. **Results** The qRT-PCR detection showed that the expression of miR-138 in U87 cells of miR-138 mimics group was significantly higher than that of miR-NC