

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.005

◇ 药学研究 ◇

N-myc 下游调控基因 2 蛋白在喉鳞状细胞癌中的表达 及对人喉表皮样癌细胞生物学特性的影响

赵谦, 白艳霞, 张少强, 李宏慧, 姚小宝, 戴皓, 邵渊

作者单位: 西安交通大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 陕西 西安 710061

通信作者: 邵渊, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 研究方向为头颈部肿瘤发生及进展的分子机制, E-mail: shaoyuan1976@163.com

基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目(2017JM8072)

摘要:目的 检测 N-myc 下游调控基因 2(N-myc downstream regulated gene 2, NDRG2)在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其人类上皮细胞 2 型(Human Epithelial cells of type 2)对人喉表皮样癌细胞(Hep-2 细胞)侵袭的影响。方法 收集西安交通大学第一附属医院 2014 年 1 月 1 日至 2017 年 12 月 31 日接受喉部分切除术的病人, 共计 41 例喉鳞状细胞癌组织及癌旁组织。采用免疫组织化学检测喉鳞状细胞癌组织中 NDRG2 的表达, χ^2 检验分析不同临床病理特征分组中 NDRG2 阳性率的差异; 实时定量聚合酶链式反应及蛋白质印迹法检测喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞中 NDRG2 的表达水平; Transwell 检测 NDRG2 对 Hep-2 细胞侵袭及转移的影响。结果 41 例喉鳞状细胞癌组织中 NDRG2 的阳性率明显低于癌旁组织, ($\chi^2=30.781, P < 0.05$) TNM III 期和 IV 期及淋巴结转移的喉鳞状细胞癌病人中 NDRG2 的阳性率低于 TNM I 期和 II 期及未发生转移的病人(TNM I 和 TNM II NDRG2 阳性率: 37.500%, TNM III 和 IV NDRG2 阳性率: 5.882%, $\chi^2=5.394, P < 0.05$; 无淋巴结转移病人 NDRG2 阳性率: 55.556%, 有淋巴结转移病人 NDRG2 阳性率: 15.625%, $\chi^2=6.073, P < 0.05$)。此外, Hep-2 细胞中 NDRG2 的表达也明显低于正常鼻咽上皮 NP-69 细胞 [Hep-2(1.193±0.053), NP-69(0.238±0.072), $t=3.536, P < 0.05$]。上调 Hep-2 细胞中 NDRG2 的表达后, 转移 [Lv-control(141.328±23.424)个, Lv-NDRG2(54.925±16.825)个, $t=4.413, P < 0.05$] 及侵袭 [Lv-control(71.782±18.675)个, Lv-NDRG2(25.931±9.729)个, $t=3.757, P < 0.05$] 细胞数目显著降低。结论 NDRG2 在喉鳞状细胞癌组织及细胞中低表达, 并可作为抑癌基因抑制 Hep-2 细胞增殖、侵袭及转移。

关键词: 喉肿瘤; 癌, 鳞状细胞; 基因, myc; 基因表达调控, 肿瘤; 人喉表皮样癌细胞; 转移; 侵袭

Expression of NDRG2 in laryngeal squamous cell carcinoma and its effects on cellbiological character of Hep-2 cells

ZHAO Qian, BAI Yanxia, ZHANG Shaoqiang, LI Honghui, YAO Xiaobao, DAI Hao, SHAO Yuan

Author Affiliation: Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Abstract: Objective To investigate the expression of N-myc downstream regulated gene 2(NDRG2) in tissues of laryngeal squamous cell carcinoma(LSCC) and its effect on human epithelial cells of type 2(Hep-2) invasion. **Methods** A total of 41 cases of laryngeal squamous carcinoma tissues and adjacent tissues who underwent partial laryngectomy in the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University from January 1, 2014 to December 31, 2017 were collected. Immunohistochemistry(IHC) was performed to detect the expression of NDRG2 in tissues of LSCC, chi-square analysis was performed to analyze the difference of NDRG2 positive rate in different clinicopathological feature groups. Quantitative polymerase chain reaction(QPCR) and western blot(WB) were performed to detect the expression of NDRG2 in Hep-2 cells, and Transwell assays were performed to detect the effects of NDRG2 on cell migration and invasion of Hep-2 cells. **Results** The positive rates of NDRG2 in tissues of 41 cases of LSCC were lower than that in adjacent tissues($\chi^2=30.781, P < 0.05$). Compared to LSCC patients at TNM I and TNM II stage or without lymph node metastasis, the positive rates of NDRG2 in LSCC patients at TNM III and TNM IV stage or with lymph node metastasis were significantly down-regulated(NDRG2 positive rates in TNM I and TNM II: 37.500%, NDRG2 positive rates in TNM III and TNM IV: 5.882%, $\chi^2=5.394, P < 0.05$; NDRG2 positive rates in patients with lymph node metastasis: 55.556%, NDRG2 positive rates in patients without lymph node metastasis: 15.625%, $\chi^2=6.073, P < 0.05$). Furthermore, the expression of NDRG2 was also lower in Hep-2 cells than that in normal nasopharyngeal epithelial NP-69 cells [Hep-2(1.193±0.053), NP-69(0.238±0.072), $t=3.536, P < 0.05$]. After upregulating the expression of NDRG2 in Hep-2 cells, the numbers of migratory [Lv-control(141.328±23.424), Lv-NDRG2(54.925±16.825), $t=4.413, P < 0.05$] and invasive [Lv-control(71.782±18.675), Lv-NDRG2(25.931±9.729), $t=3.757, P < 0.05$] cells were significantly

reduced. **Conclusion** NDRG2 is down-regulated in tissues and cells of LSCC. NDRG2 functions as tumor suppressor to inhibit cell migration and invasion of Hep-2 cells.

Key words: Laryngeal neoplasms; Carcinoma, squamous cell; Genes, myc; Gene expression regulation, neoplastic; Hep-2 cells; Migration; Invasion

喉鳞状细胞癌是头颈部常见的恶性肿瘤,发病率高居所有头颈部鳞状细胞癌的第二位^[1]。近年来,随着早期诊断及治疗手段的大幅进步,多种肿瘤相关致死率逐年下降^[2-3]。但是,喉鳞状细胞癌病人的死亡率却无显著改善^[4-5]。喉鳞状细胞癌的复发及进展是一个多因素、多阶段的过程,其病因涉及环境及基因等多方面原因。然而,喉鳞状细胞癌发生及进展的潜在分子机制研究成果较少。因此,鉴定喉鳞状细胞癌诊断及判断预后分子标志物,探索其余临床治疗及预后的相关性具有很高的价值。N-myc下游调控基因2(N-myc, downstream regulated gene 2, NDRG2)近年来在国内首次克隆并报道并确定为潜在的抑癌分子^[6],NDRG2的过表达可显著抑制多种肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移能力^[7-8]。但是截至目前,NDRG2在喉鳞状细胞癌细胞的生物学特性尚无报道。本研究拟应用体内及体外实验的方法来研究NDRG2对喉鳞状细胞癌发生、发展的相关性。

1 材料与方法

1.1 一般材料

1.1.1 临床标本 41例喉鳞状细胞癌组织及癌旁组织于2014年1月1日至2017年12月31日在西安交通大学第一附属医院接受喉部分切除术的病人,其中男性37例,女性4例,年龄范围52~78岁,中位年龄63.7岁。按TNM分期,T1有15例(36.6%),T2有12例(29.3%),T3有10例(24.4%),T4有4例(9.8%)。组织标本切除后经4%多聚甲醛固定24h,常规石蜡包埋、切片、储存于西安交通大学第一附属医院病理科。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》关要求。

1.1.2 实验试剂及仪器 免疫组化染色试剂盒购自福州迈新科技有限公司,QPCR试剂盒购自日本TAKARA公司,DEME培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自北京赛澳美细胞技术有限公司,兔抗人NDRG2抗体购自英国Abcam公司,羊抗兔二抗购自美国CST公司,NDRG2过表达慢病毒由上海吉凯科技有限公司设计并包装,Transwell小室购自美国Millipore公司,基质胶购自美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色(Immunohistochemistry, IHC) 喉鳞状细胞癌及癌旁组织石蜡切片常规脱蜡,高压

抗原修复,3%过氧化氢阻断非特异性过氧化物酶,5%非免疫血清封闭,兔抗人NDRG2抗体一抗4℃孵育过夜,PBS清洗三次后,羊抗兔二抗室温避光孵育20min,PBS清洗三次后,链霉菌抗生物素-过氧化酶染色20min,PBS清洗三次后,DAB显色,苏木素复染,PBS反蓝,水性封片剂封片,显微镜拍照检测。免疫组化评分根据染色强度及阳性染色范围进行综合评估。染色强度为蓝色计0分,淡黄色计1分,黄色计2分,棕褐色计3分。阳性染色范围5%~25%计1分,26%~50%计2分,51%~75%计3分,76%~100%计4分。两者乘积大于等于4分判定为NDRG2阳性,乘积小于4分判定为NDRG2阴性。

1.2.2 实时定量聚合酶链式反应(Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, QPCR) 配置QPCR反应液:10xbuffer 2 μL,NDRG2或β-actin正义链引物1 μL,NDRG2或β-actin反义链引物1 μL,反转录模板2 μL,去离子水14 μL。程序设定为预变性95℃ 2min;变性94℃ 30s,退火60℃ 15s,延伸72℃,35个循环;4℃。NDRG2正向引物序列:5'-GCCAGCGATCCTTACCTACC-3',NDRG2反向引物序列:5'-GGCTGCCCAATCCATCCAACC-3';β-actin正向引物序列:5'-CGTCTTCCCCTCCATCGT-3';β-actin反向引物序列:5'-GAAGGTGTGGTGCCAGATTT-3'。

1.2.3 细胞培养及慢病毒感染 喉鳞状细胞癌Hep-2细胞及正常鼻咽上皮NP-69细胞购自于上海吉凯基因化学技术有限公司,培养基为10%胎牛血清的DEME培养液,细胞孵箱条件设置为:37℃,5%二氧化碳浓度。细胞铺6孔板,汇合度至40%左右时,行慢病毒感染实验。更换为1mL无血清培养液,加入2 μL NDRG2过表达或对照病毒及5 μL Enhanced Infection Solution,感染12h后更换为完全培养基。72h后行Transwell检测两组细胞侵袭及转移能力的差异。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western Blot) 提取感染NDRG2过表达及对照慢病毒组细胞蛋白,蛋白定量后,添加6x上样缓冲液,煮沸5min,每孔加20 μg蛋白样品。跑胶,电泳条件设定为恒压110V,时间70min。转膜至PVDF膜,转膜条件设定为恒流300mV,时间70min。5%BSA孵育1h,兔抗人NDRG2一抗(1:800稀释)4℃过夜孵育,TBST清洗3次后,

羊抗兔二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h, TBST清洗三次后,化学发光,拍照。

1.2.5 Transwell无血清培养基重悬感染 NDRG2过表达及对照病毒的Hep-2细胞 接种200 μ L共计60 000个细胞至Transwell小孔,每组设3个副孔。其中细胞侵袭实验所用Transwell小孔预先包被基质胶,细胞转移试验所用Transwell小孔无需预先处理。将小室置于已加入600 μ L 20%血清浓度DMEM培养基的24孔板中。24 h后,无水甲醇固定10 min, PBS清洗后,0.1%结晶紫染色10 min, PBS清洗,显微镜下拍照。

1.3 统计学方法 所有数据均采用SPSS 22.0软件包进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异分析采用独立样本双侧 t 检验;不同临床病理特征分组间NDRG2阳性率差异分析采用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

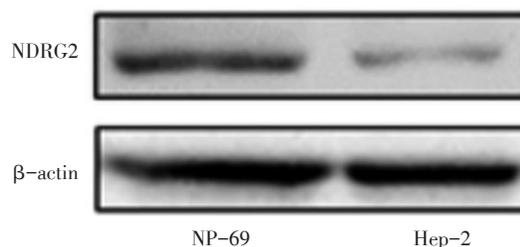
2.1 NDRG2在喉鳞状细胞癌组织中的表达 如图1所示,喉鳞状细胞癌及癌旁组织中NDRG2免疫组化阳性染色主要定位于细胞质,伴轻微核和胞膜阳性染色。41例喉鳞状细胞癌组织中NDRG2阳性率为24.39%(10/41),癌旁组织中NDRG2阳性率为85.37%(35/41),差异有统计学意义($\chi^2=30.781, P=0.001$)。

表1 N-myc下游调控基因2(NDRG2)阳性率在不同临床病理特征比较/例(%)

临床病理特征分组	NDRG2阳性	NDRG2阴性	χ^2 值	P 值
例数	10	31		
年龄			0.012	0.914
<60岁	4(23.529)	13(76.471)		
≥ 60 岁	6(25.000)	18(75.000)		
性别			0.001	0.976
男	9(24.424)	28(75.676)		
女	1(25.000)	3(75.000)		
吸烟史			0.101	0.750
有	7(25.926)	20(74.074)		
无	3(21.429)	11(78.571)		
TNM分期			5.394	0.020
I和II	9(37.500)	15(62.500)		
III和IV	1(5.882)	16(94.118)		
淋巴结转移			6.073	0.014
有	5(55.556)	4(44.444)		
无	5(15.625)	27(84.375)		
位置			0.331	0.848
声门上	3(21.429)	11(78.571)		
声门	5(23.810)	16(76.190)		
声门下	2(33.333)	4(66.667)		

2.2 NDRG2与喉鳞状细胞癌临床病理特征的关系 卡方分析显示TNM III和V期喉鳞状细胞癌的NDRG2阳性率显著低于TNM I和II期病人,淋巴结转移喉鳞状细胞癌病人中NDRG2阳性率亦低于未发生转移病人($P < 0.05$,表1)。其他临床病理特征分组间NDRG2阳性率差异无统计意义。以上结果提示NDRG2可能参与抑制喉鳞状细胞癌淋巴转移。

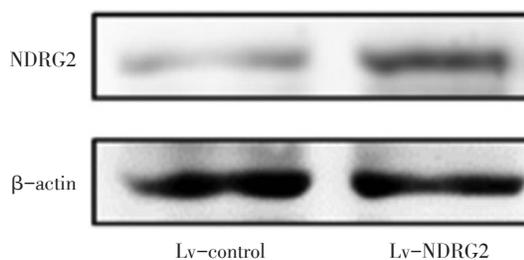
2.3 NDRG2在Hep-2细胞中的表达 QPCR及WB结果显示NDRG2 mRNA及蛋白在喉鳞状细胞癌Hep-2细胞中的表达水平为 1.193 ± 0.053 明显低于正常鼻咽上皮NP-69细胞(0.238 ± 0.072)($t=3.536, P=0.036$)。提示NDRG2可能在喉鳞状细胞癌中扮演抑癌分子的角色。见图2。



注:NDRG2为N-myc下游调控基因2, β -actin为内参 β -肌动蛋白,NP-69为正常鼻咽上皮细胞系,Hep-2为喉鳞状细胞系

图2 NDRG2在喉鳞状细胞癌Hep-2细胞中的表达

2.4 NDRG2过表达慢病毒对NDRG2表达的影响 为了检测NDRG2对Hep-2细胞侵袭及转移的影响,我们包装了NDRG2慢病毒。QPCR及WB结果显示感染NDRG2慢病毒的Hep-2细胞(1.046 ± 0.048)中NDRG2 mRNA及蛋白表达水平较感染对照病毒的Hep-2细胞(5.878 ± 0.483)均明显升高($t=4.825, P=0.017$),见图3。



注:NDRG2为N-myc下游调控基因2, β -actin为内参 β -肌动蛋白

图3 NDRG2慢病毒可上调Hep-2细胞中NDRG2表达

2.5 NDRG2对Hep-2细胞转移能力的影响 Transwell实验结果显示,感染NDRG2过表达慢病毒组转移细胞数目明显低于感染对照病毒组[Lv-control(141.328 ± 23.424)个,Lv-NDRG2(54.925 ± 16.825)个; $t=4.413, P=0.023$],提示NDRG2可抑制喉鳞状细胞癌细胞转移。见图4。

2.6 NDRG2对Hep-2细胞侵袭能力的影响 Tran-

swell 实验结果显示,感染 NDRG2 过表达慢病毒组侵袭细胞数目明显低于感染对照病毒组(Lv-control (71.782±18.675)个, Lv-NDRG2(25.931±9.729)个, $t=3.757, P=0.031$),提示 NDRG2 可抑制喉鳞状细胞癌细胞侵袭。见图 5。

3 讨论

喉癌是头颈部的恶性肿瘤,近年来发病率不断升高,每年约增加 25%,且生存预后差,严重危害人们的生活质量,喉鳞状细胞癌占喉癌发病人群的 95%。关于喉鳞状细胞癌的发生机制方面的研究为临床的基因治疗提供了依据。NDRG2 是 N-myc 的下游基因,又被称为分化相关基因,在组织中的表达水平随着发育、生长的过程不断的变化, NDRG2 基因对组织的生长、分化发挥着重要的作用。自 NDRG2 发现以来,众多研究均证实 NDRG2 在包括喉鳞状细胞癌在内的多种肿瘤组织中表达下调,是公认的抑癌分子^[9-10]。

国内研究报道 NDRG1 和 NDRG2 在喉鳞状细胞癌组织中低表达,研究结果显示 NDRG2 在 45 例喉鳞状细胞癌中的阳性率为 33.3%,在 18 例癌旁组织中的阳性率为 83.3%,差异有统计学意义^[11]。与国内外既往研究结果一致,本研究表明,喉鳞状细胞癌组织中 NDRG2 阳性表达率(24.39%)明显低于癌旁组织(85.37%)。与既往研究不同的是,本研究所用癌旁组织均为配对癌旁组织,减少了免疫组化染色中因病人组织来源差异带来的误差。研究结果显示:TNM III&IV 期喉鳞状细胞癌的 NDRG2 阳性率显著低于 TNM I&II 期病人,说明 NDRG2 可能参与喉鳞状细胞癌的发生、发展。对伴有淋巴结转移喉鳞状细胞癌病人中 NDRG2 阳性率低于未发生转移病人,其他临床病理特征分组间 NDRG2 阳性率差异无统计意义,提示 NDRG2 可能参与抑制喉鳞状细胞癌淋巴转移。

在喉鳞状细胞癌的细胞学基础研究方面,本研究应用慢病毒过表达 Hep-2 细胞中 NDRG2 的表达,研究结果显示 Hep-2 细胞 NDRG2 基因及蛋白水平明显增高。细胞生物学特性的检测中,Transwell 迁移及侵袭实验结果显示:与普通 Hep-2 细胞相比,过表达 NDRG2 的 Hep-2 细胞侵袭及转移能力明显降低,证实了 NDRG2 可能参与了喉癌的进展和转移,在临床上, NDRG2 的表达水平的变化影响着喉鳞状细胞癌 TNM 分期及淋巴结转移,进而影响疾病的治疗效果与预后,与既往国内外此方面的研究结果及结论一致^[11]。本研究通过喉鳞状细胞癌组织学水平及 Hep-2 细胞学水平的研究相结合,实验结果达

到了预期一致的结果,更有力的证实了 NDRG2 作为抑癌分子参与喉鳞状细胞癌发生及进展的过程。

在 NDRG2 与喉鳞状细胞癌发生、发展的机制研究中, NDRG2 可调控多种肿瘤侵袭及转移相关蛋白及细胞信号转导通路,其中部分蛋白与通路已被证实对喉鳞状细胞癌侵袭及转移的发挥明确的调控因素。例如,上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)是钙粘附蛋白(cadherin)家族成员,可发挥一致肿瘤细胞侵袭及转移的作用,是已经取得共识的肿瘤抑制分子。相关的细胞及组织学实验显示,与早期喉鳞状细胞癌病人相比, E-cadherin 在中晚期喉鳞状细胞癌中表达下调,并与不良预后及生存期密切相关^[12]。而多项研究已证实 NDRG2 与 E-cadherin 表达呈正相关。其可能的机制为 NDRG2 可增强糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)的活性,从而导致 Snail 溶酶体降解,进而导致 E-cadherin 转录抑制^[13-14]。因此,在喉鳞状细胞癌中, NDRG2 也可通过此种机制上调 E-cadherin 的表达,从而抑制肿瘤侵袭及转移。 NDRG2 与基质金属蛋白酶家族(MMP)的相关性也在近年来的研究中逐渐得到证实。 MMP 家族蛋白是另一类与肿瘤侵袭及转移关系密切的促癌因素。 MMP2 和 MMP9 已被证实在喉鳞状细胞癌中表达上调,并在肿瘤的形成、进展及预后中扮演重要角色^[15,16],而 NDRG2 在多种肿瘤中可通过调控 MMP2 和 MMP9 的表达而抑制肿瘤侵袭及转移^[10,17]。因此,通过抑制 MMP2 和 MMP9 的表达而发挥抑癌分子的作用,也可能是 NDRG2 抑制喉鳞状细胞癌侵袭及转移的分子机制之一。但是, NDRG2 在喉鳞状细胞癌抑制侵袭及转移的具体机制,仍需进一步的实验来逐步阐明。

综上所述,本研究通过免疫组化从组织学方面证实发现 NDRG2 在喉鳞状细胞癌中表达下调,通过包装 NDRG2 慢病毒提高喉鳞状细胞癌 NDRG2 的 mRNA 及蛋白表达水平,进而行细胞侵袭实验和迁移实验证实 NDRG2 可抑制喉鳞状细胞癌 Hep-2 细胞侵袭及转移,通过体内及体外实验相结合说明 NDRG2 可能在喉鳞状细胞癌的发生、发展中可能发挥重要的作用。在喉鳞状细胞癌的临床综合治疗中,以本 NDRG2 作为喉鳞状细胞癌靶向治疗的潜在的分子靶点,可能会发挥重要的治疗作用,具有较高的临床转化应用价值。

(本文图 1,4,5 见插图 10-1)

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J].

- CA Cancer J Clin, 2019, 69(1):7-34.
- [2] DASGUPTA P, TURRELL G, AITKEN JF, et al. Partner status and survival after cancer: A competing risks analysis [J]. Cancer Epidemiol, 2016, 41: 16-23.
- [3] HSU YH, KUNG PT, WANG ST, et al. Improved patient survivals with colorectal cancer under multidisciplinary team care: A nationwide cohort study of 25, 766 patients in Taiwan [J]. Health Policy, 2016, 120(6):674-681.
- [4] LACCOURREYE O, BONFILS P, MALINVAUD D, et al. Survival and laryngeal preservation tradeoff in advanced laryngeal cancer: From the otorhinolaryngology patient to the managing physician [J]. Head Neck, 2017, 39(10):1984-1989.
- [5] STEUER CE, EL-DEIRY M, PARKS JR, et al. An update on larynx cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1):31-50.
- [6] LIN K, YIN A, YAO L, et al. N-myc downstream-regulated gene 2 in the nervous system: from expression pattern to function [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(10):761-766.
- [7] CHEN XL, LEI L, HONG LL, et al. Potential role of NDRG2 in reprogramming cancer metabolism and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Histol Histopathol, 2018, 33(7):655-663.
- [8] HU W, YANG Y, FAN C, et al. Clinical and pathological significance of N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) in diverse human cancers [J]. Apoptosis, 2016, 21(6):675-682.
- [9] LI M, LAI X, ZHAO Y, et al. Loss of NDRG2 in liver microenvironment inhibits cancer liver metastasis by regulating tumor associated macrophages polarization [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):248.
- [10] GOLESTAN A, GHADERI A, MOJTAHEDI Z. Effects of NDRG2 Overexpression on Metastatic Behaviors of HCT116 Colorectal Cancer Cell Line [J]. Adv Pharm Bull, 2017, 7(4):661-664.
- [11] 兰利利. 喉癌组织中NDRG1、NDRG2基因启动子区CpG岛甲基化状态及其蛋白表达[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [12] NARDI CE, DEDIVITIS RA, Camillo de Almeida R, et al. The role of E-cadherin and beta-catenin in laryngeal cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(53):30199-30209.
- [13] KIM YJ, KANG HB, YIM HS, et al. NDRG2 positively regulates E-cadherin expression and prolongs overall survival in colon cancer patients [J]. Oncol Rep, 2013, 30(4):1890-1898.
- [14] LIANG ZL, KANG K, YOON S, et al. NDRG2 is involved in the oncogenic properties of renal cell carcinoma and its loss is a novel independent poor prognostic factor after nephrectomy [J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19(8):2763-2772.
- [15] LIU RR, LI MD, LI T, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) protein expression and laryngeal cancer prognosis: a meta analysis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(2):2261-2266.
- [16] 陈应超, 王玮, 李兆龙, 等. MTDH和MMP-9在喉鳞状细胞癌组织中的表达及意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 30(1):60-63.
- [17] FARAJI SN, MOJTAHEDI Z, GHALAMFARSA G, et al. N-myc downstream regulated gene 2 overexpression reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and cell invasion of A549 lung cancer cell line in vitro [J]. Iran J Basic Med Sci, 2015, 18(8):773-779.

(收稿日期:2019-05-21, 修回日期:2019-06-18)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.006

◇ 药学研究 ◇

微小RNA-25-3p 靶向下调甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5基因对乳腺癌细胞顺铂耐药性的影响

缪玖麟, 王建荣, 徐志敏, 邱卫明, 陈保华, 李新建

作者单位: 中国人民解放军联勤保障部队第九〇八医院鹰潭医疗区普通外科, 江西 鹰潭 335000

通信作者: 李新建, 男, 副主任医师, 研究方向为普外、甲乳方面, E-mail: 964344862@qq.com

摘要:目的 探讨微小RNA-25-3p(miR-25-3p)靶向甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5(GDPD5)对乳腺癌细胞顺铂耐药性的影响及分子机制。方法 本研究起止时间为2018年10月至2019年6月,人乳腺癌细胞MCF-7和乳腺癌顺铂耐药细胞MCF-7/DDP购于中国科学院上海细胞研究所,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测正常乳腺癌细胞MCF-7和乳腺癌顺铂耐药细胞MCF-7/DDP中miR-25-3p、GDPD5和谷胱甘肽巯基转移酶 π (GST- π)的表达水平。四甲基偶氮唑盐比色(MTT)法检测过表达miR-25-3p或过表达miR-25-3p联合顺铂对MCF-7/DDP细胞的增殖抑制作用,蛋白质印迹法检测GDPD5、GST- π 和细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)蛋白的表达水平。双荧光素酶报告基因实验和蛋白质印迹法验证miR-25-3p和GDPD5的靶向关系。结果 与MCF-7细胞相比,MCF-7/DDP细胞中miR-25-3p的表达显著下调,GDPD5和GST- π 的表达显著上调。过表达miR-25-3p后,MCF-7/DDP细胞存活率显著降低[(50.36±5.04)%比(100.00±10.11)%],CyclinD1相对表达水平降低(0.40±0.05)比(1.12±0.11),GST- π 表达水平降低(0.35±0.04)比(1.15±0.12);且过表达miR-25-3p可降低MCF-7/DDP细胞的顺铂耐药性。miR-25-3p可靶向负性调控GDPD5的表达。过表达GDPD5可部分逆转miR-25-3p对MCF-7/DDP细胞增殖和顺铂耐药性的影响。结论 miR-25-3p通过靶向下调GDPD5抑制MCF-7/DDP细胞存活,进而降低MCF-7/DDP细胞对顺铂的耐药性。

关键词: 乳腺肿瘤; 抗药性, 肿瘤; miR-25-3p; 甘油磷酸二酯酶磷酸结构域5; 顺铂; 谷胱甘肽转移酶