

RNASE4 异常表达对胶质瘤细胞侵袭迁移的影响及机制研究

申友奎¹, 徐良², 王雁秋¹, 李军¹, 叶琦¹, 董勇¹

(1. 杭州市中医院, 浙江 杭州 310007;

2. 浙江大学医学院第二附属医院, 浙江 杭州 310009)

摘要: [目的] 阐明 RNASE4 在胶质瘤细胞迁移和侵袭中的潜在作用及机制。[方法] 利用实时定量 PCR(qPCR)检测 RNASE4 在正常胶质细胞和胶质瘤细胞系中的表达水平。将胶质瘤 U87 细胞分为对照组、siRNA-NC 组和 siRNA-RNASE4 组。在体外细胞中瞬时转染 siRNA-RNASE4, 利用 CCK-8 法检测胶质瘤细胞 U87 增殖率。采用伤口愈合实验和 Transwell 小室实验检测 U87 细胞的侵袭和迁移能力。通过定量 PCR 和 Western blot 实验检测各组细胞中相关因子的表达。[结果] RNASE4 在胶质瘤细胞系 T98(1.34±0.06, $P<0.01$)、A172(1.79±0.10, $P<0.01$)、U251(1.86±0.09, $P<0.01$)、U118(2.19±0.17, $P<0.01$) 和 U87(2.64±0.17, $P<0.01$) 中较 NHAs 细胞系均异常高表达(1.00±0.05)。在胶质瘤细胞 U87 中下调 RNASE4 表达引起细胞增殖活力下降(48h, $P<0.05$; 72h, $P<0.01$)。同时, siRNA-RNASE4 组 U87 细胞的划痕愈合能力(46.0±4.6 vs 87.2±3.6, $P<0.01$)以及细胞侵袭能力(72.5±4.7 vs 147.8±16.8, $P<0.01$)均明显降低。下调 RNASE4 表达抑制了 BCL2、MMP9 基因表达, 并促进各组细胞中 E-cadherin 表达($P<0.01$)。[结论] RNASE4 能够通过调节 BCL2、MMP9 等因子的表达来调节胶质瘤细胞的增殖与迁移能力, 发挥促癌因子的作用。

关键词: 胶质瘤; RNASE4; 侵袭; 迁移

中图分类号: R739.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0610-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B009

Effect of RNASE4 Abnormal Expression on Invasion and Migration of Glioma Cells and Its Mechanism

SHEN You-kui¹, XU Liang², WANG Yan-qiu¹, LI Jun¹, YE Qi¹, DONG Yong¹

(1. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medical, Hangzhou 310009, China)

Abstract: [Objective] To elucidate the potential role and mechanism of RNASE4 in glioma cell migration and invasion. [Methods] Real-time quantitative PCR(qPCR) was used to detect the expression level of RNASE4 in normal glioma and glioma cell lines. Glioma U87 cells were divided into control group, siRNA-NC group and siRNA-RNASE4 group. The proliferation rate of glioma cells U87 was detected by CCK-8 method after transient transfection of siRNA-RNASE4 in vitro. The invasion and migration of U87 cells were examined by wound healing and Transwell assay. Quantitative PCR and Western blot were used to detect the expression of related factors in each group. [Results] RNASE4 was abnormally highly expressed in glioma cell lines T98(1.34±0.06, $P<0.01$), A172(1.79±0.10, $P<0.01$), U251(1.86±0.09, $P<0.01$), U118(2.19±0.17, $P<0.01$) and U87(2.64±0.17, $P<0.01$) compared with NHAs cell (1.00±0.05). Down-regulation of RNASE4 expression in glioma cells U87 resulted in decreased cell proliferation activity (48h, $P<0.05$; 72h, $P<0.01$). At the same time, the scratch healing ability(46.0±4.6 vs 87.2±3.6, $P<0.01$) and cell penetrating ability(72.5±4.7 vs 147.8±16.8, $P<0.01$) of the siRNA-RNASE4 group U87 cells were significantly decreased. In addition, down-regulated RNASE4 expression inhibited the expression of BCL2 and MMP9 genes, and promoted the expression of E-cadherin in each group($P<0.01$). [Conclusion] RNASE4 can regulate the proliferation and migration of glioma cells by regulating the expression of BCL2, MMP9 and other factors, and play the role of pro-cancer factors.

Subject words: glioma; RNASE4; migration; invasion

胶质细胞瘤是最常见的脑肿瘤, 胶质母细胞瘤

基金项目: 浙江省自然科学基金(Q19H160215)

通信作者: 徐良, 主治医师, 博士; 浙江大学医学院第二附属医院神经外科, 浙江省杭州市上城区解放路 88 号(310009); E-mail: maxalive@163.com

收稿日期: 2020-02-25; **修回日期:** 2020-04-11

患者预后极差, 患者生存期通常不到 2 年^[1]。随着医学技术的进步, 人们对于胶质细胞瘤的发生发展有了更深入的认识, 但是关于其发病机制了解仍不足。分析胶质瘤具体的遗传特征以及对胶质瘤的深入研

究,能够为其靶向治疗提供理论依据。RNASE4(ribonuclease 4)是人类核糖核酸酶 RNASE 超家族的一员,胰腺核糖核酸酶是一种对宿主防御至关重要的分泌酶^[2]。研究显示,多种 RNASE 具有微生物杀伤功能,但不能发挥催化作用^[3],表明 RNASE 可能与某些内在功能有关,而不是酶促活性。研究显示 RNase 可作为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)的配体,在胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma,PDAC)中,该受体是受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase,RTK)的成员。人的 RNASE 被鉴定为一种致癌蛋白,可在体内和体外诱导血管形成,从而促进血管生成^[4]。最近有研究发现 RNASE4 在胶质瘤中异常表达,但是 RNASE4 在胶质瘤进展中的作用及其在胶质瘤转移调控中依赖的信号通路仍未确定。在这项研究中,我们探讨 RNASE4 在人胶质瘤细胞 U87 表达及潜在作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系及实验试剂

人正常胶质细胞 NHAS 和人胶质瘤细胞系 T98、A72、U251、U118、U87 由实验室保存。siRNA-RNASE4、阴性对照 siRNA-NC 购自上海吉码生物科技有限公司;转染试剂脂质体 Lipofectamine® 2000 购自美国 Thermo 公司;RPIM1640 培养基、胎牛血清(FBS)及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;青霉素—链霉素混合溶液购自美国 Hyclone 公司;荧光定量试剂盒购自大连宝生物有限公司;兔源性一抗 GAPDH、Bcl2、MMP9 和 E-cadherin,经过 HRP 标记的二抗均购自美国 Abcam 公司,CCK-8 检测试剂盒购自南京曼夫特生物科技有限公司。

1.2 细胞培养及处理

复苏胶质瘤细胞 U87,在培养基中加入含有 10% FBS 和 100U/ml 双抗,置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。待 U87 细胞长至 80%时,加入 0.25%胰蛋白酶进行消化传代。以每孔 1×10⁵ 个细胞的密度,将 U87 细胞接种于 6 孔板中,待细胞长至 50%~60%时,更换成不含血清的培养基。将 siRNA-RNASE4 和 siRNA-NC 转染到胶质瘤细胞中,同时设置空白对照。细胞转染处理 6h 后,更换新鲜培养基。

1.3 CCK-8 实验

将 U87 细胞按照每孔 1×10⁴ 密度接种到 96 孔板中,当孔内细胞密度达到 80%左右将 siRNA-RNASE4 转染到细胞中(转染步骤同上)。分别在 U87 细胞转染后 0、24、48 和 72h,每孔加入 50μl CCK-8 溶液,继续培养 2h 后,用酶标仪在 450nm 的波长下测定各孔内吸光度值,以空白为对照判断各孔内 U87 细胞的增殖情况。

1.4 细胞划痕实验

取处于生长期的细胞将密度为 5×10⁵/ml 的 U87 细胞常规培养,待细胞生长到汇合度达到 95%左右后,利用灭菌的 10μl 白色 Tip 枪头垂直于培养板,在单层培养的 U87 细胞上划一条直线,形成无细胞的生长区域(即划痕),在显微镜下观察并拍照记录每条划痕区相对距离,随后用无血清培养基洗去脱落的 U87 细胞,记为 0h 的结果。将细胞置于 37℃、5%恒温培养箱中培养 24h 之后,用 PBS 缓冲液洗去划落的 U87 细胞,于倒置显微镜下观察并拍照,通过比较各组 U87 细胞在 24h 时细胞划痕相对于 0h 时的愈合程度,来分析细胞从致伤区的迁移能力。

1.5 细胞 Transwell 小室实验

制备 Matrigel 稀释液(稀释比例 1:20),取稀释液 75μl,加入基底膜上,4℃风干;加入 100μl 培养液,水化基底膜,37℃静置 1h。加入含 1%FBS 的培养液,重悬 U87 细胞至浓度约为 1×10⁵/ml;弃 Transwell 小室上腔多余液体,加入含 10%FBS 培养液 900μl;接种细胞数为 1×10⁵,进行常规培养 24h;取出 Transwell 小室,PBS 缓冲液洗涤,加入 4%多聚甲醛固定 30min 以上;待小室底膜风干,加入晶紫染液,染色 25min,置于 PBS 缓冲液中反复洗涤。光学显微镜下 100 倍放大观察、照相,并每组细胞随机选取 5 个视野进行细胞计数。

1.6 荧光定量 PCR(qPCR)实验

取转染 48 h 后 U87 细胞,在每孔细胞中加入 1ml Trizol 试剂,进行细胞总 RNA 提取。使用 One Step Prime Script cDNA Synthesis Kit 试剂盒,按照说明书所示,进行 cDNA 合成。以此 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR 检测,反应条件如下:95℃ 30s;40 循环,95℃ 5s;60℃ 30s。RNASE4 表达使用 GAPDH 作为内参,定量结果采用 2^{-ΔΔCt} 表示。引物见 Table 1 所示。

Table 1 Primer sequence information

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
RNASE4	CCGACCCTGGCTCAGGATAA	AGTAGCGATCACTGCCACCT
BCL2	CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA	GGGCCGTACAGTTCCACAAA
E-cadherin	GCTGGACCGAGAGAGTTTCC	CAAAATCCAAGCCCCGTGGTG
MMP9	TCTATGGTCCTCGCCCTGAA	CATCGTCCACCGGACTCAAA
GAPDH	TATGACAACAGCCTCAAGAT	AGTCCTTCCACGATACCA

1.7 Western blot 检测

U87 细胞经转染处理 48h 后, 加入 200 μ l 蛋白裂解液, 进行细胞总蛋白提取。按照比例将蛋白样本与上样缓冲液混合, 沸水煮 10min, 经蛋白变性。每孔加样 30 μ g, 进行 SDS-PAGE 电泳; 通过湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。加入 5% BSA, 摇床封闭脱色 2h。TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 5min, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育特异性一抗 (稀释比例 1:1000)。次日, TBST 溶液洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5min; 室温孵育二抗 (稀释比例 1:5000) 1h; TBST 溶液再次洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5min。最后在避光环境中, 加入 ECL 显影液反应, 拍照。最终结果以目标基因条带与内参 GAPDH 的光密度比值表示。

1.8 统计学处理

数据采用 SPSS 19 统计软件进行统计分析, 计量资料以平均值 $\pm$ 标准差表示, 两组间差异分析采用 Student's *t* 检验, 多组间差异分析采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNASE4 在胶质瘤细胞系中表达

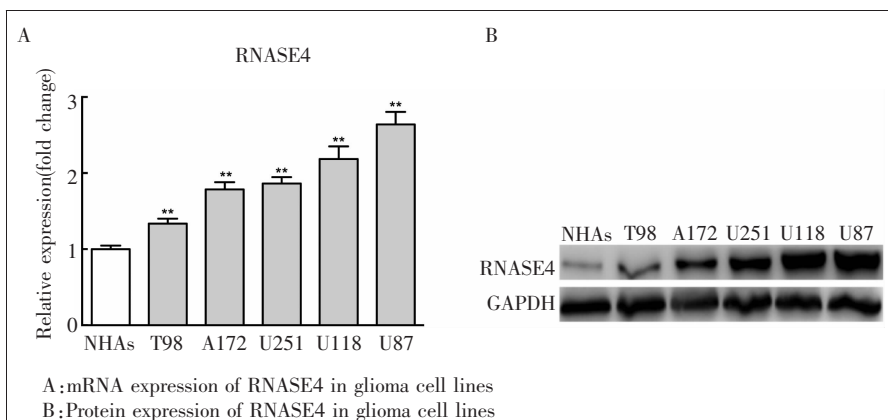
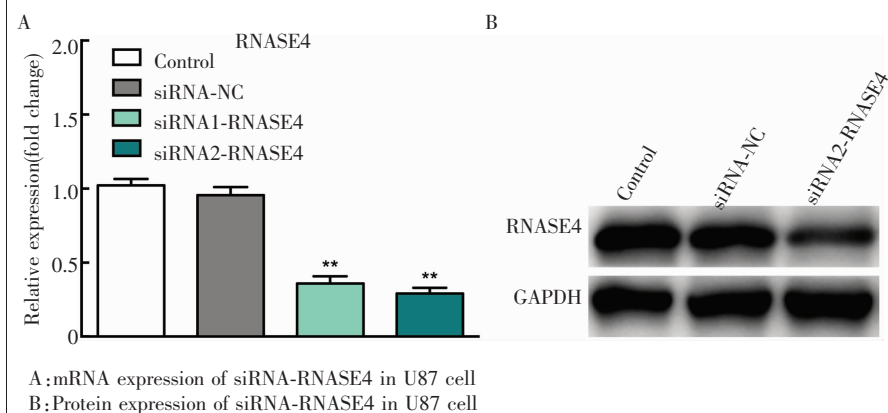
RT-qPCR 检测结果显示, 与正常人星形胶质细胞 NHAs (1.00 $\pm$ 0.05) 相比, RNASE4 在不同胶质瘤细胞系表达呈现不同程度的上调。T98 细胞中 1.34 $\pm$ 0.06 ($P < 0.01$); A172 细胞中 1.79 $\pm$ 0.10 ($P < 0.01$); U251 细胞中 1.86 $\pm$ 0.09 ($P < 0.01$); U118 细胞中 2.19 $\pm$ 0.17 ($P < 0.01$);

U87 细胞中 2.64 $\pm$ 0.17 ($P < 0.01$) (Figure 1A)。同时, Western blot 检测得到的结果一致, 不同胶质瘤细胞系中 RNASE4 蛋白的表达均明显高于 NHAs 细胞, 具体表现为: T98 细胞 < A172 细胞 < U251 细胞 < U118 细胞 < U87 细胞 (Figure 1B)。

其中, 胶质瘤细胞 U87 中 RNASE4 mRNA 和蛋白表达水平增量最明显, 因此作为后续细胞实验对象。

2.2 下调 RNASE4 表达对 U87 细胞中 RNASE4 表达的影响

RT-qPCR 检测结果显示, 与阴性对照 siRNA-NC 组 (0.96 $\pm$ 0.05) 相比, siRNA1-RNASE4 组 (0.36 $\pm$ 0.05, $P < 0.01$) 和 siRNA2-RNASE4 组 (0.29 $\pm$ 0.04, $P < 0.01$) U87 细胞中 RNASE4 mRNA 表达量均显著性降低; 而对照组 (1.00 $\pm$ 0.05) 和阴性对照 siRNA-NC 组间 RNASE4 mRNA 表达量无显著性变化 (Figure 2A)。同样, 我们取下调效果更显著的 siRNA2-RNASE4, 利用 Western blot 检测 RNASE4 的蛋白表

**Figure 1** Expression of RNASE4 in glioma cell lines**Figure 2** Down-regulated of RNASE4 inhibited the expression of RNASE4 in U87 cell

达。结果显示,对照和 siRNA-NC 组间 RNASE4 蛋白表达无显著性差异;与 siRNA-NC 组相比,siRNA-RNASE4 组 U87 细胞中 RNASE4 的蛋白表达明显降低(Figure 2B),说明干扰 RNASE4 表达成功。

2.3 下调 RNASE4 表达对 U87 细胞增殖的影响

在干扰 RNASE4 表达后第 0、24、48 和 72h,利用 CCK-8 法检测 U87 细胞的增殖活性(OD 值),结果显示,与 siRNA-NC 组相比,siRNA-RNASE4 组中 U87 细胞的增殖能力从处理 24h 开始逐渐减弱,在处理 48h 细胞活力显著性降低($P<0.05$),并在处理 72h 时下调达到最高($P<0.01$);而对照和 siRNA-NC 组 U87 细胞活力在处理期间均无显著性差异(Figure 3)。

2.4 下调 RNASE4 表达对 U87 细胞迁移的影响

利用伤口愈合实验检测干扰 RNASE4 表达 24h 后 U87 细胞的伤口愈合,结果显示,与 siRNA-NC 组(87.2 ± 3.6)相比,下调 RNASE4 表达显著性减弱了 U87 细胞的伤口愈合能力(46.0 ± 4.6 , $P<0.01$),而对照组(88.5 ± 4.3)和 siRNA-NC 组 U87 细胞伤口愈合程度无显著性差异(Figure 4)。

2.5 下调 RNASE4 表达对 U87 细胞侵袭的影响

利用 Transwell 小室实验分别评估下调 RNASE4 表达 24h 后的穿膜细胞数量,结果显示,与 siRNA-NC 组(147.8 ± 16.8)相比,siRNA-RNASE4 组 U87 细胞的穿膜细胞数量显著性减少(72.5 ± 4.7 , $P<0.01$),而对照组(151.5 ± 12.5)和 siRNA-NC 组 U87 细胞的穿膜细胞数量无显著性差异(Figure 5)。

2.6 下调 RNASE4 表达对 U87 细胞中相关因子表达的影响

在 RNASE4 干扰处理 48h 后,利用 RT-qPCR 与

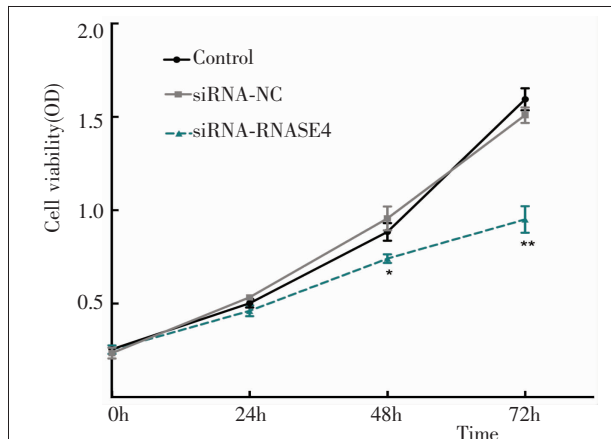


Figure 3 Down-regulated of RNASE4 inhibited the proliferation activity of U87 cell

Western blot 检测 U87 细胞中 BCL2、MMP9 以及 E-cadherin 表达变化,结果显示,下调 RNASE4 表达显著性抑制了 BCL2 基因($P<0.01$)、MMP9 基因($P<0.01$)和 E-cadherin($P<0.01$)mRNA 水平,同时其蛋白表达也显著性降低(均 $P<0.01$)(Figure 6)。

3 讨论

众所周知,胶质瘤的治疗具有很大挑战性,恶性程度高,患者预后差,高度侵袭转移性是胶质瘤的基本特征^[5-7]。本研究检测发现,RNASE4 在胶质瘤患者的胶质瘤组织中出现异常高表达,这与前人在胶质瘤细胞系中表达趋势一致,提示 RNASE4 可能对胶质瘤的发生发展起到一定调控作用。我们选取胶质瘤细胞系 U87 为研究对象,在体外抑制 RNASE4 表达水平,检测 RNASE4 表达抑制后对 U87 细胞增

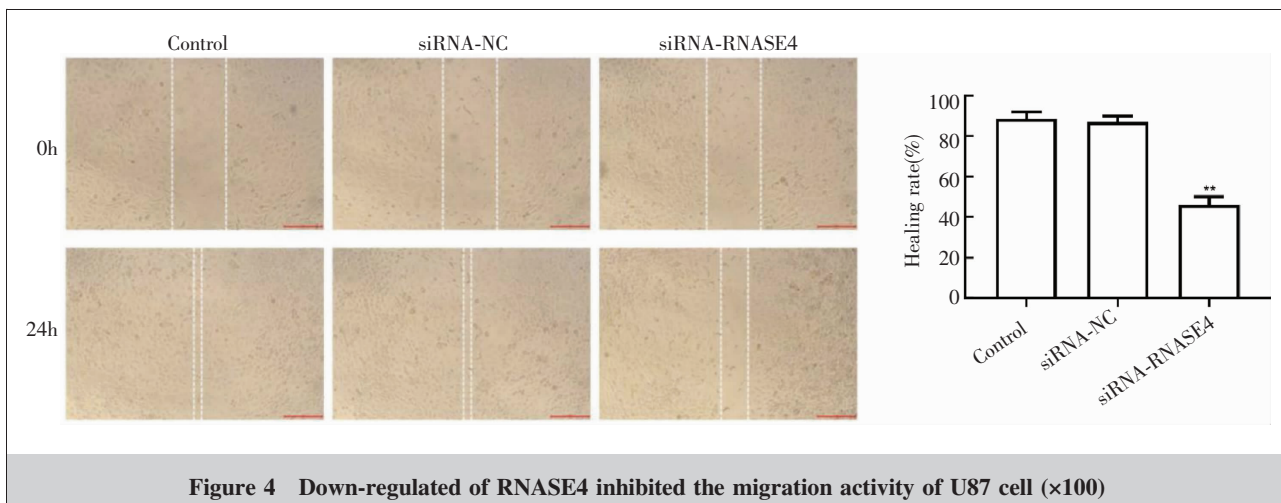


Figure 4 Down-regulated of RNASE4 inhibited the migration activity of U87 cell ($\times 100$)

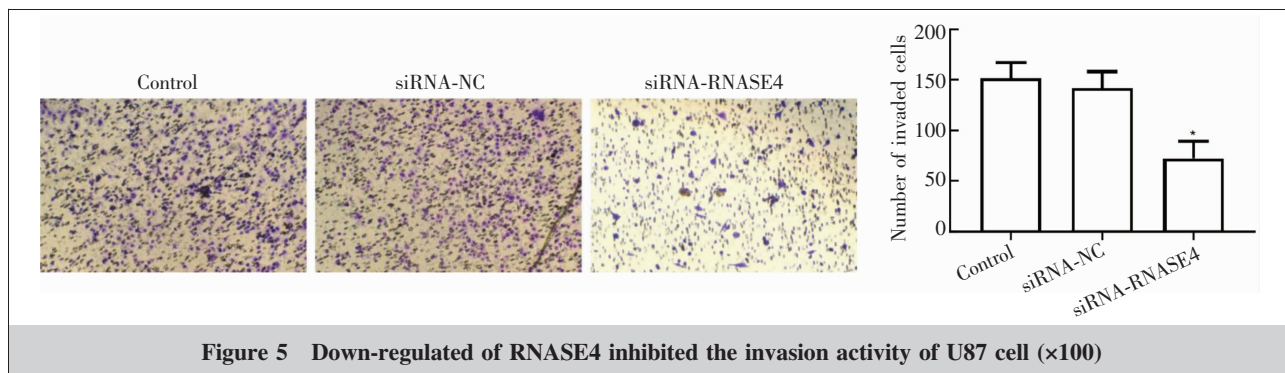


Figure 5 Down-regulated of RNASE4 inhibited the invasion activity of U87 cell (×100)

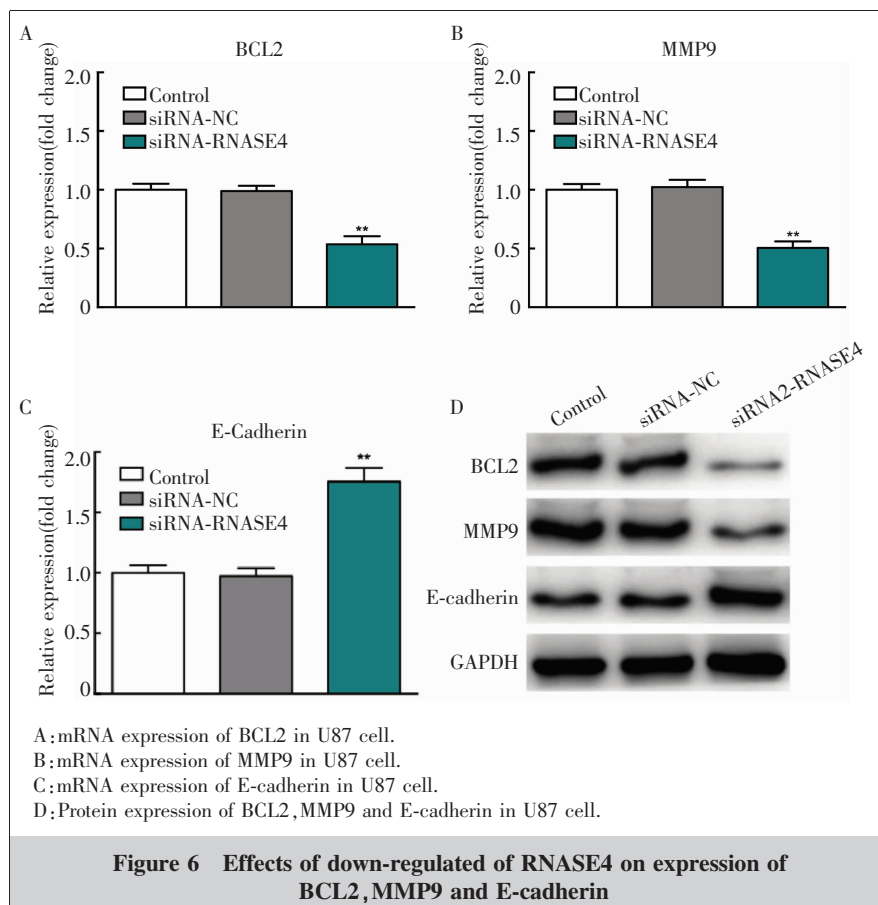


Figure 6 Effects of down-regulated of RNASE4 on expression of BCL2, MMP9 and E-cadherin

殖、侵袭和迁移的影响。CCK-8 试剂盒检测显示,下调 RNASE4 的表达,能够引起 U87 细胞增殖能力减弱;Trans-well 小室实验检测显示,减弱 RNASE4 表达对胶质瘤细胞的侵袭过程产生显著性抑制作用;划痕实验结果显示,下调 RNASE4 表达减弱了 U87 细胞的迁移过程。

RNASE4 是对宿主防御至关重要的分泌酶,具有抗微生物活性,通常被认为是针对病原体的宿主防御系统的一部分^[8]。研究显示 RNASE 可作为 EGFR 的配体,在 PDAC 中,该受体是酪氨酸激酶

(RTK)的成员^[4],参与胰腺癌发展。人的 RNASE 可在体内和体外诱导血管形成,从而促进血管生成。因此,它也被称为血管生成素(angiotensin,以下简称 ANG)。因为 RNASE4 和 ANG 同源基因在结构上类似,而且共享启动子,所以两者在功能上能够相互影响。据报道 ANG 通过同时促进干细胞静止和祖细胞增殖来调节造血再生^[9]。血管生成在肿瘤的相关研究中扮演重要角色,ANG 可以影响肿瘤细胞的增殖侵袭迁移能力,通过影响细胞的存活调节肿瘤的发生发展。也有报道显示血清 ANG 水平升高与胰腺癌的侵袭性相关^[10]。所以,RNASE4 可能在肿瘤的发生过程中具有重要作用。本研究还发现减弱 RNASE4 表达后,U87 细胞中侵袭迁移标志物金属蛋白酶 9 (MMP9)mRNA 和蛋白表达均明显下降,细胞中 E-cadherin 表达升高,E-cadherin 和 MMP9 是肿瘤细胞侵袭迁移的标志物。研究发现 E-cadherin 和 MMP9 表达变化对肿瘤细胞的侵袭迁移具有重要的影响^[11-12]。所以我们结果提示减弱 RNASE4 表达抑制后,能够进一步地降低细胞中 MMP9 表达,抑制胶质瘤细胞的侵袭迁移能力。另外,RNASE4 表达抑制后,细胞中的增殖相关因子 BCL2 表达显著性下降。BCL2 在肿瘤细胞的增殖凋亡中具有重要的作用^[13-14],说明 RNASE4 能够通过调节 BCL2 调节胶质瘤细胞的增

殖侵袭和迁移过程。

基于上述结果,本研究表明 RNASE4 在胶质瘤细胞中呈现异常高表达,并且可能通过负调控细胞中 BCL2、E-cadherin、MMP9 加速胶质瘤细胞的增殖、侵袭和迁移的发生,促进胶质瘤进一步发展,发挥癌基因功效。RNASE4 可能成为胶质瘤一个有价值的新型治疗靶点。但是 RNASE4 如何实现对胶质瘤细胞生物学功能的调控,仍需要大量研究进行阐明。

参考文献:

- [1] Yang Q,Wang R,Wei B,et al. Gene and microRNA signatures are associated with the development and survival of glioblastoma patients[J]. DNA Cell Biol,2019,38(7):688-699.
- [2] Gupta SK,Haigh BJ,Wheeler TT. Abundance of RNase4 and RNase5 mRNA and protein in host defence related tissues and secretions in cattle[J]. Biochem Biophys Rep, 2016,8:261-267.
- [3] Padhi AK,Narain P,Gomes J. Rare angiogenin and ribonuclease 4 variants associated with amyotrophic lateral sclerosis exhibit loss-of-function;a comprehensive in silico study[J]. Metab Brain Dis,2019,34(6):1661-1677.
- [4] Wang YN, Lee HH, Chou CK, et al. Angiogenin/ribonuclease 5 is an EGFR ligand and a serum biomarker for erlotinib sensitivity in pancreatic cancer[J]. Cancer cell,2018,33(4):752-769,e8.
- [5] Miklja Z,Pasternak A,Stallard S,et al. Molecular profiling and targeted therapy in pediatric gliomas:review and consensus recommendations[J]. Neuro Oncol,2019,21(8):968-980.
- [6] Brown TJ,Brennan MC,Li M,et al. Association of the extent of resection with survival in glioblastoma:a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Oncol,2016,2(11):1460-1469.
- [7] Gallaher JA,Massey SC,Hawkins-Daarud A,et al. From cells to tissue:how cell scale heterogeneity impacts glioblastoma growth and treatment response[J]. PLoS Comput Biol,2020,16(2):e1007672.
- [8] Koczera P,Martin L,Marx G,et al. The ribonuclease a superfamily in humans;canonical RNases as the buttress of innate immunity[J]. Int J Mol Sci,2016,17(8):piiE1278.
- [9] Agnandji ST,Huttner A,Zinser ME,et al. Phase 1 trials of rVSV ebola vaccine in Africa and Europe [J]. N Engl J Med,2016,374(17):1647-1660.
- [10] Raju G S R,Pavitra E,Merchant N,et al. Targeting autophagy in gastrointestinal malignancy by using nanomaterials as drug delivery systems[J]. Cancer Lett,2018,419:222-232.
- [11] Gao H,Lan X,Li S,et al. Relationships of MMP-9,E-cadherin,and VEGF expression with clinicopathological features and response to chemosensitivity in gastric cancer[J]. Tumor Biol,2017,39(5):1010428317698368.
- [12] Moirangthem A,Bondhopadhyay B,Mukherjee M,et al. Simultaneous knockdown of UPA and MMP9 can reduce breast cancer progression by increasing cell-cell adhesion and modulating EMT genes[J]. Sci Rep,2016,6:21903.
- [13] Delbridge ARD,Grabow S,Strasser A,et al. Thirty years of BCL-2;translating cell death discoveries into novel cancer therapies[J]. Nat Rev Cancer,2016,16(2):99-109.
- [14] Adams J M,Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets[J]. Cell Death Differ, 2018,25(1):27-36.

莪术醇对乳腺癌细胞增殖凋亡及 JAK2/STAT3 信号通路的影响

马春兰, 张宝亮, 张常虹

(青海省第五人民医院, 青海 西宁 810007)

摘要: [目的] 探讨莪术醇对乳腺癌细胞增殖凋亡及 JAK2/STAT3 信号通路的影响。[方法] 以不同浓度 (0、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$) 莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞, MTT 法检测 MCF-7 细胞增殖抑制率, 流式细胞术观察细胞周期凋亡分布, Hoechst33258 染色法观察细胞凋亡形态学变化, 逆转录聚合酶链反应法检测细胞酪氨酸激酶 2 (JAK2)、信号转导子和转录激活因子 3 (STAT3) 信使核糖核酸相对表达量, 蛋白印迹法检测细胞磷酸化 JAK2 (P-JAK2)、磷酸化 STAT3 (P-STAT3) 蛋白相对表达量。[结果] 莪术醇对 MCF-7 细胞增殖具有明显抑制作用, 且抑制率随药物作用时间及作用浓度的增加而上升。随着莪术醇作用浓度的增加, 细胞凋亡率也有所上升 [(4.27% $\pm$ 0.82%)、(4.54% $\pm$ 1.21%)、(19.32% $\pm$ 1.87%)、(29.58% $\pm$ 2.92%)、(33.74% $\pm$ 3.91%)、(42.94% $\pm$ 2.81%)]。细胞周期结果显示, 莪术醇可将细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 从而抑制细胞增殖。Western blot 结果显示, 莪术醇可抑制 JAK2、STAT3 磷酸化的表达, 而 RT-PCR 结果显示, 莪术醇作用细胞后, JAK2、STAT3 mRNA 表达受到明显抑制。[结论] 莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 G0/G1 期, 从而抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能是通过 JAK2/STAT3 信号通路来实现。

关键词: 莪术醇; 乳腺癌; JAK2/STAT3; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0616-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B010

Effect of Curcuminol on JAK2/STAT3 Signaling Pathway in Breast Cancer Cells

MA Chun-lan, ZHANG Bao-liang, ZHANG Chang-hong

(Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810007, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of curcuminol on JAK2/STAT3 signaling pathway in breast cancer cells. [Methods] Breast cancer MCF-7 cells were treated with different concentrations of curcuminol (0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). The proliferation inhibition rate of MCF-7 cells was detected by MTT assay. Cell apoptosis was observed by flow cytometry. Hoechst33258 staining method was used to observe the morphological changes of cell apoptosis. The relative expression of JAK2 and STAT3 mRNA was detected by RT-PCR. The relative expression of P-JAK2 and P-STAT3 protein was detected by Western blot. [Results] The curcuminol had a significant inhibitory effect on the proliferation of MCF-7 cells, and the inhibition rate increased with the time and concentration of the drug. As the concentration of curcuminol increased, the apoptosis rate also increased [(4.27% $\pm$ 0.82%), (4.54% $\pm$ 1.21%), (19.32% $\pm$ 1.87%), (29.58% $\pm$ 2.92%), (33.74% $\pm$ 3.91%), (42.94% $\pm$ 2.81%)]. Cytometry showed that curcuminol arrested the cell cycle in G0/G1 phase, thereby inhibiting cell proliferation. Western blot showed that curcuminol inhibited the expression of JAK2 and STAT3 phosphorylation, and RT-PCR showed that JAK2 and STAT3 mRNA expression was significantly inhibited after cells were treatment with curcuminol. [Conclusion] Curcuminol acts on G0/G1 phase of breast cancer MCF-7 cells, inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis, in which JAK2/STAT3 signaling pathway may be involved.

Subject words: curcuminol; breast cancer; JAK2/STAT3; apoptosis; cell proliferation

莪术醇是从中药材莪术中分离出的一种倍萜类

化合物, 已有研究表明, 莪术醇对多种肿瘤均具有一定作用^[1]。AK 酪氨酸蛋白激酶-信号传导和转录激活因子 (Janus kinase- signal transducers and activators of transcription, JAK-STAT) 是细胞因子信号传导的

通信作者: 马春兰, 副主任药师, 本科; 青海省第五人民医院药剂科, 青海省西宁市城东区南山东路 166 号 (810007); E-mail: 1649663641@qq.com

收稿日期: 2019-09-10; **修回日期:** 2019-11-08

重要途径,而 JAK2/STAT3 作为 JAK-STAT 通路中的一个重要信号轴,其在机体生长发育中发挥着重要作用^[2-3]。JAK2/STAT3 信号通路在许多实体肿瘤的发展中起到关键作用。本研究通过探讨莪术醇对乳腺癌细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响,旨在为临床治疗乳腺癌提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与仪器

细胞株:人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于中国科学院上海生命科学研究。

主要试剂:莪术醇(上海泽瑞制药有限公司);DMEM、胎牛血清、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、胰蛋白酶、青霉素、链霉素(美国 Sigma 公司);MTT 试剂盒、Hoechst 33258、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);Trizol(Invitrogen 公司);TakaRa 两步法 RT-PCR 试剂盒、SYBR RT-PCR 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司);兔抗磷酸化 JAK2 (P-JAK2)、兔抗磷酸化 STAT3 (P-STAT3)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、兔抗 GAPDH(武汉博士德生物工程有限公司);ECL 高效化学发光试剂盒(美国 Genview 公司)。JAK2 上游引物序列:5'-AGCCTATCGGCATGGAATATCT-3', JAK2 下游引物序列:5'-TAACACTGCCATCCCAAGACA-3', STAT3 上游引物序列:5'-ATCACGCCTTCTACAGACTGC-3', STAT3 下游引物序列:5'-CATCCTGGAGATTCTCTACCACT-3', 内参 β -actin 上游引物序列:5'-GAGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3', 内参 β -actin 下游引物序列:5'-CGATGCCGTCTCGATGGGG-3'。

主要仪器:光学显微镜(Nikon YS100,日本奥林巴斯公司);Real-time PCR 仪(MX3000P,美国 Gene 公司);LabCycler PCR (德国 Sensoquest 公司);Bio Rad 450 酶标仪(美国 Bio Rad 公司);FACS 流式细胞仪(美国 BD 公司);JY-SCZ2 型 SDS-PAGE 蛋白电泳仪(北京六一仪器厂);徕卡 TCS SP5 激光共聚焦显微镜(德国徕卡仪器有限公司)。

1.2 实验方法

细胞培养:于六孔板中培养 MCF-7 细胞,培养基为含 10%胎牛血清完全培养基(每 100ml 培养基

含 10ml 胎牛血清、0.2g 链霉素、0.2g 青霉素),培养条件为 37℃,5%CO₂,细胞单层贴壁培养,待细胞长满至 80%时进行传代培养。

MTT 法细胞增殖实验:取对数生长期 MCF-7 细胞,以 2.5×10^5 /ml 浓度接种于 96 孔板中,每孔 199 μ l,共 6 组。培养 24h 后,4 组加入不同浓度的莪术醇药物,药物作用浓度为 12.5、25、50、100 μ g/ml,同时设置正常对照组(不加入莪术醇)和溶剂对照组(加入 1 μ l DMSO)。处理 24、48、72h 后进行 MTT 实验,于酶联免疫检测仪 490nm 处检测各孔的吸光度(OD)值。细胞增殖抑制率=1-(加药组 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照 OD 值-调零孔 OD 值)×100%。

Hoechst33258 染色法:取对数生长期 MCF-7 细胞,以 1×10^6 /ml 浓度接种于 6 孔板,组别设置同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后涂片于载玻片上,Hoechst33258 染色 5min,PBS 洗涤,封片,于共聚焦显微镜下观察(激发波长 350nm,发射波长 460nm)。

细胞凋亡实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后,用 Annexin V-FITC/PI 试剂盒染色,流式细胞仪检测荧光强度。

细胞周期实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后加入 4%多聚甲醛,于 4℃下固定过夜,次日离心,去上清液,根据周期试剂盒说明书进行操作并上机检测。

Western blot 实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞,提取总蛋白并测定浓度。根据 Western blot 试剂盒说明书进行电泳、转膜、封闭,采用 1:300 比例稀释后的兔抗 (P-JAK2、P-STAT3 和 GAPDH)孵育过夜。次日 TBST 洗涤后,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗,孵育 2h 后进行成像,并采用 Image J 软件进行灰度值分析。根据内参标准计算目标条带相对值,判断蛋白相对表达量。

RT-PCR 实验:细胞分组同上。处理 24h 后,胰酶消化收集细胞。采用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,并根据反转录试剂盒进行反转录反应,根据 SYBR RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 实验。反应体系为:95℃ 预变性 30s,95℃ 5s,60℃ 30s,循环 35 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来测定各组 JAK2、STAT3 和 GAPDH 基因相对表达量,内参 GAPDH,每个样本重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行数据分析, 计量数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间各指标的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较, 若方差齐采用 LSD-*t* 检验, 若方差不齐采用 Dunnett-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 莪术醇对 MCF-7 细胞增殖的影响

同一时间点, 正常对照组与 DMSO 溶剂对照组细胞增殖抑制率比较无统计学差异 ($P>0.05$)。随着莪术醇浓度增加, MCF-7 细胞增殖抑制率也有所上升 (Table 1)。

2.2 莪术醇对 MCF-7 细胞形态的影响

正常对照组和 DMSO 溶剂对照组细胞核呈淡蓝色且荧光亮度均匀。莪术醇处理组中, 随着处理浓度增加, 细胞数量明显减少, 并出现凋亡细胞形态, 如荧光色深, 呈亮蓝色, 细胞间界模糊等 (Figure 1)。

2.3 莪术醇对 MCF-7 细胞凋亡的影响

正常对照组和 DMSO 组凋亡率为 (4.27% $\pm$ 0.82%), (4.54% $\pm$ 1.21%), 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而莪术醇 12.5、25、50、100 μ g/ml 处理组凋亡率分别为 (19.32% $\pm$ 1.87%), (29.58% $\pm$ 2.92%), (33.74% $\pm$ 3.91%), (42.94% $\pm$ 2.81%), 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡率也有所增加 ($F=121.388$, $P<0.001$) (Figure 2)。

2.4 莪术醇对 MCF-7 细胞周期的影响

DMSO 溶剂对照组与正常对照组比较, 各个周期比例无统计学差异 ($P>0.05$), 而莪术醇处理组 G₀/G₁ 期比例增加, 而 S 期及 G₂/M 期比例有所下降, 并表现出一定的浓度依赖性 (Table 2)。

2.5 莪术醇对 MCF-7 细胞 P-JAK2、P-STAT3 蛋白表达的影响

DMSO 溶剂对照组与正

常对照组比较, MCF-7 细胞 P-JAK2、P-STAT3 蛋白相对表达量无统计学差异 ($P>0.05$); 而莪术醇处理组 MCF-7 细胞 P-JAK2、P-STAT3 蛋白相对表达量有所下降, 且药物浓度越高, 蛋白相对表达量越低 (Table 3, Figure 3)。

Table 1 Proliferation inhibition rate of MCF-7 under different concentrations of curcumin ($\bar{x}\pm s$, %)

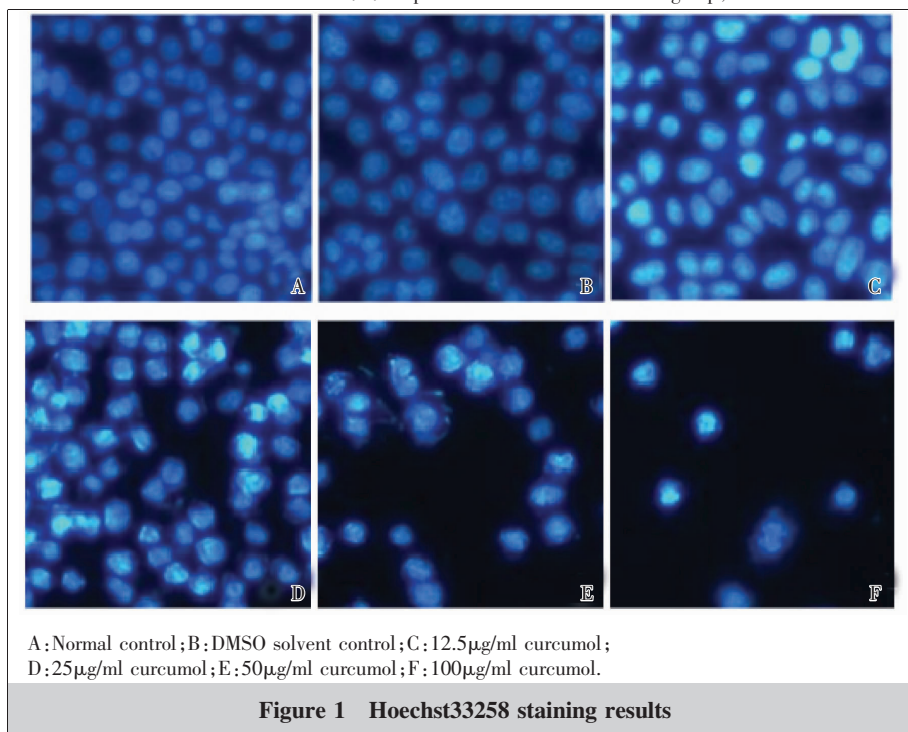
Group	24h	48h	72h
Normal control	0.03 $\pm$ 0.14	0.02 $\pm$ 0.27	0.02 $\pm$ 0.18
DMSO solvent control	0.04 $\pm$ 0.21	0.03 $\pm$ 0.19	0.02 $\pm$ 0.14
12.5 μ g/ml curcumin	3.71 $\pm$ 1.24*	5.78 $\pm$ 2.93*	6.64 $\pm$ 2.16*
25 μ g/ml curcumin	13.98 $\pm$ 2.45*	17.34 $\pm$ 2.78*	21.92 $\pm$ 2.13*
50 μ g/ml curcumin	28.96 $\pm$ 3.37*	34.74 $\pm$ 3.92*	51.12 $\pm$ 4.22*
100 μ g/ml curcumin	38.71 $\pm$ 6.62*	47.63 $\pm$ 5.28*	68.55 $\pm$ 5.49*
<i>F</i>	76.259	117.841	262.619
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$

Table 2 Effect of curcumin on cell cycle of MCF-7 ($\bar{x}\pm s$, %)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Normal control	57.24 $\pm$ 0.21	38.49 $\pm$ 0.22	4.27 $\pm$ 0.31
DMSO solvent control	56.98 $\pm$ 0.34	38.13 $\pm$ 0.29	4.89 $\pm$ 0.44
12.5 μ g/ml curcumin	65.21 $\pm$ 0.42*	33.26 $\pm$ 0.50*	1.53 $\pm$ 0.22*
25 μ g/ml curcumin	67.98 $\pm$ 0.49*	30.84 $\pm$ 0.25*	1.18 $\pm$ 0.13*
50 μ g/ml curcumin	73.47 $\pm$ 0.17*	25.43 $\pm$ 0.25*	1.10 $\pm$ 0.16*
100 μ g/ml curcumin	78.45 $\pm$ 0.22*	20.56 $\pm$ 0.17*	0.99 $\pm$ 0.23*
<i>F</i>	2047.057	1691.307	129.452
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$



2.6 莪术醇对 MCF-7 细胞 JAK2、STAT3 mRNA 表达的影响

DMSO 溶剂对照组与正常对照组比较, MCF-7

细胞 JAK2、STAT3 mRNA 相对表达量无统计学差异 ($P>0.05$); 莪术醇处理组 MCF-7 细胞 JAK2、STAT3 mRNA 相对表达量有所下降, 且药物浓度越高, mRNA 相对表达量越低 (Table 4)。

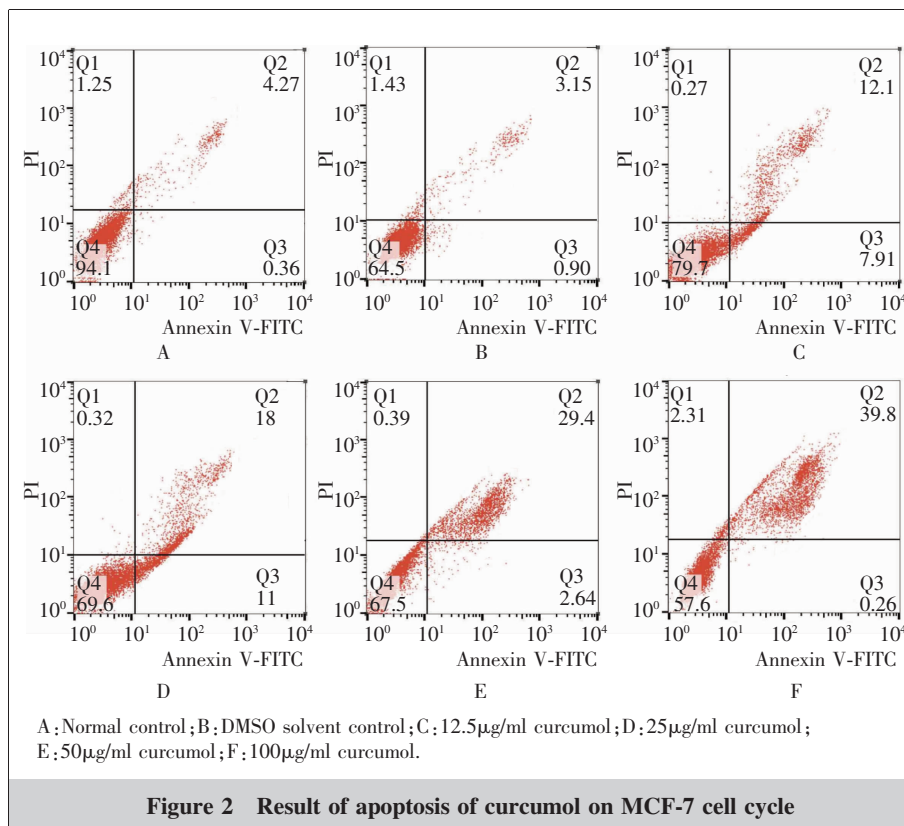


Figure 2 Result of apoptosis of curcumol on MCF-7 cell cycle

Table 3 Effect of curcumol on expression of P-JAK2 and P-STAT3 proteins in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	p-JAK2	p-STAT3
Normal control	0.82 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.16
DMSO solvent control	0.79 $\pm$ 0.16	0.73 $\pm$ 0.21
12.5 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	0.51 $\pm$ 0.09*	0.49 $\pm$ 0.12*
25 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	0.32 $\pm$ 0.11*	0.33 $\pm$ 0.10*
50 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	0.21 $\pm$ 0.07*	0.24 $\pm$ 0.08*
100 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	0.08 $\pm$ 0.03*	0.18 $\pm$ 0.11*
F	25.492	10.227
P	<0.001	0.0005

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$

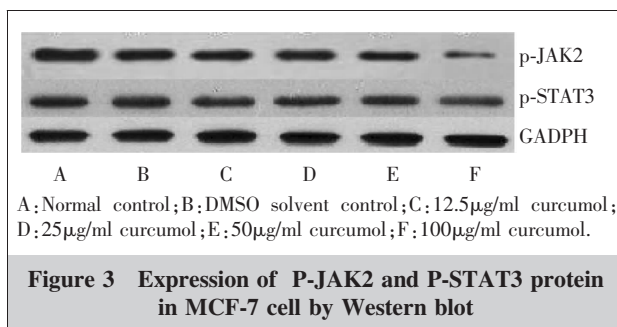


Figure 3 Expression of P-JAK2 and P-STAT3 protein in MCF-7 cell by Western blot

3 讨论

近年来已有大量文献报道一些中草药的活性成分可通过抑制肿瘤细胞增殖, 促进凋亡来达到治疗肿瘤的目的^[4-5]。莪术醇是一类从中药植物莪术中提取的活性成分, 临床研究发现, 其对多种实体肿瘤均具有抑制增殖的作用, 如肺癌、胃癌、卵巢癌等^[6-7]。研究表明, 莪术醇可直接杀伤肿瘤细胞, 同时其还可通过提高机体免疫功能、抑制新血管生成以及核酸代谢, 并诱导细胞凋亡从而达到抗肿瘤作用^[8]。本研究结果发现莪术醇可

呈药物依赖性抑制 MCF-7 细胞的增殖, 并促进其凋亡。研究进一步通过细胞周期实验检测, 结果显示, 莪术醇可能是通过将 MCF-7 细胞阻滞在 G0/G1 期, 从而发挥其抑制作用。

JAK 家族是一类非受体酪氨酸激酶家族, 主要包括 4 个成员: JAK1、JAK2、JAK3 以及 TYK4。STAT 是 JAK 的下游信号, 具有信号转导功能和转录活化功能^[9]。JAK/STAT 信号通路正常活化途径为: 由细胞因子组成的配体通过与靶细胞上的受体相结合从

Table 4 Effect of curcumol on expression of JAK2 and STAT3 mRNA in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	JAK2	STAT3
Normal control	2.51 $\pm$ 0.24	1.87 $\pm$ 0.35
DMSO solvent control	2.56 $\pm$ 0.31	1.85 $\pm$ 0.29
12.5 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	2.21 $\pm$ 0.24*	1.58 $\pm$ 0.18*
25 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	1.83 $\pm$ 0.17*	1.17 $\pm$ 0.24*
50 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	1.26 $\pm$ 0.21*	0.82 $\pm$ 0.12*
100 $\mu\text{g/ml}$ curcumol	0.87 $\pm$ 0.17*	0.35 $\pm$ 0.09*
F	27.298	20.886
P	<0.01	<0.01

Note: *, compared with the normal control group, $P<0.01$

而形成多聚体,并在胞浆内形成 JAKs 结合位点, JAKs 通过与其相结合进而磷酸化并活化,进而促进带有酪氨酸的蛋白磷酸化,并产生激酶活化的级联反应,将活化的信号传导给 STATs,诱导 STATs 磷酸化,并进一步将活化信号转移到细胞核内,从而与目的 DNA 启动子上的特异性反应元件相结合,诱导目的基因的表达及转录,最终促进蛋白质合成,启动细胞内的信号转导^[10-11]。研究表明, JAK/STAT 信号通路持续活化可能是肿瘤细胞异常增殖的机制之一^[11],而 JAK2/STAT3 作为 JAK-STAT 通路中的一个重要信号轴,已有研究证实, JAK2/STAT 通路参与多种肿瘤细胞的增殖与凋亡^[12]。研究发现, JAK2/STAT3 参与乳腺癌的发生发展,而 STAT3 活化与非受体酪氨酸的活化存在密切联系, JAK2 参与调节 STAT3 的活化^[13]。本研究通过 Western blot 法及 RT-PCR 探讨了莪术醇对 MCF-7 细胞 JAK2/STAT3 通路的影响,莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞后,可抑制 STAT3 表达及磷酸化,最终抑制 MCF-7 细胞的 JAK2/STAT3 信号轴,从而达到抗肿瘤的作用。

综上所述,莪术醇作用于乳腺癌 MCF-7 细胞 G0/G1 期,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,其机制可能是通过 JAK2/STAT2 信号通路来实现。但关于莪术醇是否通过其他通路或多通路结合来达到抑制乳腺癌细胞的增殖,以及这些通路与 JAK2/STAT3 通路的相关性目前尚不清楚,仍需后续研究加以探讨。

参考文献:

- [1] Wang H, Wang Y, Jiang X, et al. The molecular mechanism of curcumin on inducing cell growth arrest and apoptosis in Jurkat cells, a model of CD4 + T cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 21(2): 375-382.
- [2] Xie YL, Tao WH, Yang TX, et al. Anticancer effect of curcumin B on MKN-45 cells via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2709-2715.
- [3] Li W, Saud SM, Young MR, et al. Cryptotanshinone, a Stat3 inhibitor, suppresses colorectal cancer proliferation and growth in vitro[J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 406(1-2): 63-73.
- [4] Wang H, Chen X, Li T, et al. Amyrinsol diterpene isolated from a traditional herbal medicine, LANGDU reverses multidrug resistance in breast cancer cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 194(12): 1-5.
- [5] Chen XX, Lam KH, Chen QX, et al. Ficus virens proanthocyanidins induced apoptosis in breast cancer cells concomitantly ameliorated 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 110(12): 49-61.
- [6] Wang J, Li XM, Bai Z, et al. Curcumin induces cell cycle arrest in colon cancer cells via reactive oxygen species and Akt /GSK3 β /cyclin D1 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210(1): 1-9.
- [7] Zang SL, Tang QL, Dong FR, et al. Curcumin inhibits the proliferation of gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via downregulation of IDH1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3583-3591.
- [8] Tang QL, Guo JQ, Wang QY, et al. Curcumin induces apoptosis in SPC-A-1 human lung adenocarcinoma cells and displays anti-neoplastic effects in tumor bearing mice[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(6): 2307-2312.
- [9] Xu L, Lao Y, Zhao Y, et al. Screening active compounds from garcinia species native to china reveals novel compounds targeting the STAT /JAK signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2015; 910453.
- [10] Springuel L, Renauld JC, Knoops L. JAK kinase targeting in hematologic malignancies: a sinuous pathway from identification of genetic alterations towards clinical indications[J]. *Haematologica*, 2015, 100(10): 1240-1253.
- [11] Rodriguez-Barrueco R, Yu J, Saucedo-Cuevas LP, et al. Inhibition of the autocrine IL6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2+ breast cancers[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(5): 1631-1648.
- [12] Su D, Gao YQ, Dai WB, et al. Helicteric acid, oleanic acid, and betulinic acid, three triterpenes from helicteres angustifolia L, inhibit proliferation and induce apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells via suppressing NF- κ B and STAT3 signaling[J]. *Evi Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 5180707.
- [13] Liu X, Xiao Q, Bai X, et al. Activation of STAT3 is involved in malignancy mediated by CXCL12-CXCR4 signaling in human breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(6): 2760-2768.

CAV-1 基因多态性与散发乳腺癌易感性的相关性分析

王佳美, 刘欣跃

(兰州大学第二医院, 甘肃 兰州 730030)

摘要: [目的] 探讨 CAV-1 基因多态性与散发乳腺癌的相关性。[方法] 采用病例对照研究, 纳入经病理确诊的 135 例女性乳腺癌患者作为实验组, 166 例女性健康体检者为对照组。通过竞争性等位基因特异性 PCR 法对研究对象基因位点进行分型; 采用 χ^2 检验比较 CAV-1 各 SNP 基因型及等位基因频率在两组中的分布差异; 非条件 Logistic 回归分析 CAV-1 基因多态性与乳腺癌易感性的关联。[结果] 在共显性模型、显性模型及等位基因模型下 rs3807987 及 rs7804372 位点多态性与乳腺癌易感性密切相关。rs3807987: 相对于 GG 基因型, AG、AA 基因携带者 (AG/AA 基因型) 均增加乳腺癌的发病风险 ($P < 0.05$), OR 值分别为 2.110 (95%CI: 1.270~3.505)、1.968 (95%CI: 1.205~3.216)。rs7804372 位点: 相对于 TT 基因型, AT、AA 基因携带者 (AT/AA 基因型) 均增加乳腺癌的发病风险 ($P < 0.05$), OR 值分别为 2.088 (95%CI: 1.285~3.392)、2.059 (95%CI: 1.293~3.280)。rs12672038 位点: 在共显性模型、显性模型、等位基因模型均未见 rs12672038 位点多态性分布与乳腺癌发病风险之间存在相关性。[结论] CAV-1 基因 rs3807987 与 rs7804372 多态性与乳腺癌易感性相关。

关键词: 散发性乳腺癌; CAV-1 基因; 基因多态性; 易感性

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0621-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B011

Relationship Between Single Nucleotide Polymorphisms of CAV-1 Gene and Susceptibility of Sporadic Breast Cancer

WANG Jia-mei, LIU Xin-yue

(Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: [Objective] To investigate the association of CAV-1 polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer. [Methods] Competitive allele specific PCR (KASP) was performed to identify the genotypes of CAV-1 polymorphisms in 135 female breast cancer patients (study group), and 166 healthy women (control group). The distribution of CAV-1 SNP genotype and allele frequency were compared by Chi-square test, and unconditioned Logistic regression was used to analysis the relationship between CSV-1 gene polymorphisms and susceptibility of breast cancer. [Results] The co-dominant model, dominant model and allelic model showed a significant association of CAV-1 gene rs3807987 and rs7804372 with the risk of breast cancer (all $P < 0.05$). The risk of breast cancer was increased in women with rs3807987 AG, or AG/AA genotypes compared to those with GG genotype (OR=2.110, 95%CI: 1.270~3.505, $P < 0.05$; OR=1.968, 95%CI: 1.205~3.216, $P < 0.05$), respectively; and increased in women with rs7804372 AT, AT/AA genotypes compared to those with TT genotype (OR=2.088, 95%CI: 1.285~3.392, $P < 0.05$; OR=2.059, 95%CI: 1.293~3.280, $P < 0.05$), respectively. No significant association of rs12672038 polymorphism with risk of breast cancer was found in co-dominant model, dominant model or allelic model. [Conclusion] The polymorphisms of CAV-1 gene rs3807987 and rs7804372 are associated with susceptibility to sporadic breast cancer.

Subject words: sporadic breast cancer; CAV-1 gene; gene polymorphism; susceptibility

乳腺癌是由遗传因素和环境因素等诸多因素共同作用导致的复杂疾病, 而遗传因素在乳腺癌发生、

基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目 (GSWSKY2017-31); 兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划项目 (CY2017-MS17)

通信作者: 刘欣跃, 教授, 主任检验师, 博士生导师, 博士; 兰州大学第二医院检验医学中心, 甘肃省兰州市城关区萃英门 82 号 (730030); E-mail: liuxy@lzu.edu.cn

收稿日期: 2019-11-19; **修回日期:** 2020-02-21

发展中起着至关重要的作用。Caveolin (CAV) 是一种横跨膜的支架蛋白, 称小窝蛋白或窖蛋白, 是构成细胞表面小窝样质膜结构的主要膜内在蛋白, 由 CAV-1、CAV-2 及 CAV-3 组成, 其中 CAV-1 是 Caveolin 家族的主要标志性蛋白^[1]。近年来, 研究人员发现 Caveolin 蛋白不仅在细胞生理功能中起着重要的作

用,在各种疾病中亦异常表达,如癌症、动脉粥样硬化、肌肉发育不良等^[2]。目前,关于乳腺癌与 Caveolin 相关研究多集中在其蛋白表达谱^[3]。本文探讨 CAV-1 位点 rs3807987、rs7804372 及 rs12672038 多态性与散发乳腺癌发病风险及临床病理特征之间的相关性,以期为乳腺癌的诊断及治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 10 月至 2019 年 6 月就诊于兰州大学第二临床医院经病理学确诊的 135 例浸润性乳腺癌患者为实验组,所有患者相互间无血缘关系,无肿瘤家族史。同期收集与实验组年龄相匹配的健康体检女性 166 例设为对照组,无乳腺癌病史、家族史和其他相关肿瘤病史。对照组中各位点基因型频率进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE)遗传平衡分析,结果符合遗传定律(P 均 > 0.05),可见,样本来自随机的自然群体且具有群体代表性(Table 1)。

1.2 临床资料收集

收集乳腺癌患者年龄、初始月经年龄、绝经状况、腋窝淋巴结转移等资料,且所有患者组织标本均进行肿瘤组织雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及 Ki67 检查:ER(+)99 例,ER(-)36 例;PR(+)78 例,PR(-)57 例;Ki-67 $\leq 14\%$ 12 例, Ki-67 $> 14\%$ 者 123 例。

1.3 竞争性等位基因特异性 PCR 法基因分型

实验组与对照组受试者均抽取空腹静脉血,采用相同处理方法。方法如下:采用全血 DNA 提取试剂盒提取两组样本基因组 DNA。采用竞争性等位基

因特异性 PCR 法进行各 SNP 位点分型。实验中所有引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司,实验用 KASP Master Mix 由 LGC 公司设计并合成(货号 KBS-1016012)。引物序列为 rs3807987-FAM:5'-GGGGGA-TAAGGCTAATCTCCTAG-3';rs3807987-HEX:5'-GGG-GGATAAGGCTAATCTCCTAA-3';rs3807987-R:5'-CAG-CAGCAGATGGTATATTTTGG-3';rs7804372-FAM:5'-GCTGTGCTTTGATTGATGTGGAT-3';rs7804372-HEX:5'-GCTGTGCTTTGATTGATGTGGAA-3';rs7804372-R:5'-ACAAAGCTCGGCTAAATA-ATTGG-3';rs7804372-FAM:5'-GCTGTGCTTTGATT-GATGTGGAT-3';rs12672038-FAM:5'-GCTGTGCTTT-GATTGATGTG-GAT-3';rs7804372-HEX:5'-GCTGTGCTTTGATTGATGTGGAA-3';rs7804372-R:5'-ACAAA-GCTCGGCTAA-ATAATTGG-3'。

阶段 1:94℃ 预变性 15min; 阶段 2:94℃ 20s, 64℃~58℃(每个循环降 0.6℃)1min,共循环 10 次;阶段 3:94℃ 20s, 58℃ 1min,共循环 26 次。采用 LGC 的 IntelliQube 仪器对 PCR 扩增产物进行荧光扫描,读取荧光信号进行分型鉴别。SNP 分型结果抽取部分样本进行一代测序验证。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计结果分析。年龄等计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验组及对照组采用独立样本 t 检验;计数资料用例数和百分率表示,两组间比较采用卡方检验,并用拟合优度 χ^2 检验评估 SNP 位点的基因型频率在对照组中的分布是否满足 HWE。采用非条件多因素 Logistic 回归模型分析各 SNP 位点在不同遗传模型(共显性、显性、隐性、等位基因模型)与乳腺癌易感性关联,计算比值比(odds ratio, OR)及 95%可信区间(confidence

Table 1 Frequency distribution of CAV-1 polymorphisms in cases and controls[n(%)]

Polymorphisms	Genotype				Allele			
	wt/wt	vt/wt	vt/vt	P^a	wt	vt	P^b	P^c
rs3807987								
Cases	81(60.60)	51(37.80)	3(2.20)	0.014	213(78.89)	57(21.11)	0.026	0.489
Controls	124(74.70)	37(22.29)	5(3.01)		285(85.84)	47(14.17)		
rs7804372								
Cases	65(48.14)	61(45.19)	9(6.67)	0.010	191(70.74)	79(29.26)	<0.01	0.702
Controls	109(65.67)	49(39.16)	8(4.80)		267(80.42)	65(19.58)		
rs12672038								
Cases	58(51.79)	54(48.21)	0(0.00)	0.054	166(74.11)	58(25.89)	0.413	0.188
Controls	73(60.83)	46(38.33)	1(0.01)		165(77.46)	48(22.54)		

Note:a; P for genotype;b; P for allele;c; P for HWE

interval, CI)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CAV-1 基因型及其等位基因频率分布比较

rs3807987 位点 GG、AG、AA 基因型和 G、A 等位基因在实验组分布频率分别为 81 例 (60.60%)、51 例 (37.80%)、3 例 (2.20%) 和 213 例 (78.89%)、57 例 (21.11%)；对照组分布频率分别为 124 例 (74.70%)、37 例 (22.29%)、5 例 (3.01%) 和 285 例 (85.84%)、47 例 (14.17%)。

rs7804372 位点 TT、AT、AA 基因型和 G、A 等位基因在实验组分布频率分别为 65 例 (48.14%)、61 例 (45.19%)、9 例 (6.67%) 和 191 例 (70.74%)、79 例 (29.26%)，对照组分布频率分别为 109 例 (65.67%)、49 例 (39.16%)、8 例 (4.80%) 和 267 例 (80.42%)、65 例 (19.58%)。

rs12672038 多态性位点由于部分标本未能成功分型，最终实验组纳入 112 例，对照组 120 例，其 GG、AG、AA 基因型和 G、A 等位基因在实验组分布频率分别为 58 例 (51.79%)、54 例 (48.21%)、0 例 (0.00%) 和 166 例 (74.11%)、58 例 (25.89%)，对照组分布频率分别为 73 例 (60.83%)、46 例 (38.33%)、1 例 (0.01%) 和 165 例 (77.46%)、48 例 (22.54%)。经统计，rs3807987 及 rs7804372 等位基因及其基因型在实验组与对照组间的分布差异均具有统计学意义 (均 $P<0.05$)，rs12672038 位点基因型及等位基因频率在两组间的分布均无统计学意义 (Table 1)。

2.2 CAV-1 基因型与乳腺癌发病风险的关系

采用共显性、显性、等位基因模型分析 CAV-1 位点基因多态性与乳腺癌易感性之间的关系，结果显示 (Table 2)：rs3807987 及 rs7804372 位点多态性在 3

种模型下与乳腺癌易感性密切相关 (均 $P<0.05$)；rs3807987 位点：相对 GG 基因型，AG 和 AG/AA 基因型显著性增加乳腺癌患病风险 ($P<0.05$)，OR 值分别为 2.110 (95% CI: 1.270~3.505)、1.968 (95% CI: 1.205~3.216)，携带 A 等位基因较 G 等位基因，其乳腺癌的患病风险增加 1.623 倍 (95% CI: 1.061~2.482， $P<0.05$)。rs7804372 位点：相对于 TT 基因型，AT 和 AT/AA 基因型显著性增加乳腺癌患病风险 ($P<0.01$)，OR 值分别为 2.088 (95% CI: 1.285~3.392)、2.059 (95% CI: 1.293~3.280)，携带 A 等位基因较 T 等位基因，其乳腺癌的患病风险增加 1.699 倍 (95% CI: 1.165~2.477， $P<0.05$)。rs12672038 位点：由于 AA 基因型例数过少，将 AA 基因型与 AG 合并分析，在等位基因及显性模型下 rs12672038 位点多态性乳腺癌发病风险均无相关性，且对该位点不进行后续分析。

2.3 CAV-1 基因多态性与乳腺癌临床病理特征的相关性分析

非条件二元 Logistic 回归方法分析 rs3807987

Table 2 CAV-1 polymorphisms in relation to breast cancer risk in studied population

SNP	Models	Cases	Controls	OR	95%CI	P
rs3807987	Codominant model					
	GG	81	124	1.000		
	AG	51	37	2.110	1.270~3.505	0.004
	AA	3	5	0.919	0.214~3.949	0.909
	Dominant model					
	GG	81	124	1.000		
	AG+AA	54	42	1.968	1.205~3.216	0.007
	Allele model					
	G	213	285	1.000		
rs7804372	A	57	47	1.623	1.061~2.482	0.026
	Codominant model					
	TT	65	109	1.000		
	AT	61	49	2.088	1.285~3.392	0.003
	AA	9	8	1.877	0.694~5.132	0.214
	Dominant model					
	TT	65	109	1.000		
	AT+AA	70	57	2.059	1.293~3.280	0.002
	Allele model					
rs12672038	T	191	267	1.000		
	A	79	65	1.699	1.165~2.477	0.006
	Dominant model					
	GG	58	73	1.000		
	AG+AA	54	47	3.723	0.991~2.810	0.054
	Allele model					
	G	166	165	1.000		
	A	58	48	0.670	0.774~1.863	0.413

和 rs7804372 位点多态性与 ER、PR、Ki67、腋窝淋巴结转移等乳腺癌临床病理特征之间的关系, 结果显示: rs3807987 和 rs7804372 基因多态性与腋窝淋巴结转移、ER、PR、Ki-67 蛋白表达均无相关性 (均 $P>0.05$) (Table 3)。

rs3807987 位点: 未绝经组中, 携带 AG 和 AG/AA 基因型乳腺癌的患病风险显著性增高 ($P<0.05$), 分别增加了 2.121 (95%CI: 1.008~4.462) 和 2.099 倍 (95%CI: 1.012~4.351)。rs7804372 位点: 未绝经组中, 携带 AT 和 AT/AA 基因型, 乳腺癌的罹患率显著性增高, 分别增加了 2.900 (95%CI: 1.371~6.138) 和 2.406 倍 (95%CI: 1.188~4.872)。

3 讨论

CAV-1 基因编码的 Caveolin-1 是构成 Caveolae

主要膜蛋白, 其相对分子质量为 21~24kDa。研究指出 CAV-1 作为结构蛋白参与调节, 诸如 ER、EGFR、Her2/neu、TGF- β 和 mTOR 的信号通路^[4]。遗传因素在乳腺癌的发生发展中起着至关重要的作用, 参与编码乳腺癌发展蛋白质的基因多态性可以作为生物标志物, 甚至可能成为治疗乳腺癌治疗方法的有效靶点。

目前, 对 CAV-1 与乳腺癌易感性的关联研究集中在 C239A(rs1997623)、G14713A(rs3807987)、G21985A(12672038)、T28608A(rs3757733)、T29107A(rs7804372), 和 G32124A(rs3807992) 6 个位点^[5-8], G14713A(rs3807987)、T29107A(rs7804372) 两个位点尤著, 但研究结果尚不一致。除此之外, 相关 meta 分析指出 CAV-1 位点多态性与多种癌症易感性相关^[9-10]。

Wihandani 等^[5]研究结果显示 rs3807987 和 rs7804372 位点多态性与乳腺癌的发生、发展没有关

Table 3 Association of CAV-1 polymorphisms with tumor characteristics in studied cases

rs3807987	Cases/Controls	OR(95%CI) ^a	P ^a	rs7804372	Cases/Controls	OR(95%CI) ^b	P ^b
ER(+)breast cancer cases vs. ER(-)breast cancer controls							
GG	63/18	1		TT	51/14	1	
AG	33/18	0.524(0.241~1.140)	0.103	AT	41/20	0.563(0.254~1.249)	0.157
AG+AA	36/18	0.571(0.264~1.235)	0.155	AT+AA	48/22	0.599(0.275~1.303)	0.196
G	159/54	1		T	143/48	1	
A	36/18	0.679(0.357~1.294)	0.240	A	55/24	0.769(0.431~1.374)	0.376
PR(+)breast cancer cases vs. PR(-)breast cancer controls							
GG	51/30	1		TT	42/23	1	
AG	25/26	0.566(0.278~1.151)	0.116	AT	31/30	0.566(0.277~1.156)	0.118
AG+AA	27/27	0.588(0.293~1.183)	0.137	AT+AA	36/34	0.598(0.290~1.158)	0.122
G	127/86	1		T	115/96	1	
A	29/28	0.701(0.390~1.261)	0.236	A	41/38	0.901(0.537~1.512)	0.692
Ki-67 $\leq$ 14% breast cancer cases vs. Ki-67>14%breast cancer controls							
GG	8/73	1		TT	6/59	1	
AG	3/48	0.570(0.144~2.258)	0.424	AT	5/56	0.878(0.254~3.040)	0.837
AG+AA	4/52	0.702(0.201~2.454)	0.579	AT+AA	6/64	0.922(0.282~3.017)	0.893
G	19/194	1		T	17/174	1	
A	5/52	0.982(0.350~2.754)	0.972	A	7/72	0.955(0.396~2.502)	0.992
Menopausal breast cancer cases vs. Non-menopausal breast cancer controls							
GG	38/43	1		TT	33/32	1	
AG	15/36	2.121(1.008~4.462)	0.048	AT	16/45	2.900(1.371~6.138)	0.005
AG+AA	16/38	2.099(1.012~4.351)	0.046	AT+AA	21/49	2.406(1.188~4.872)	0.015
G	91/122	1		T	82/109	1	
A	17/40	0.570(0.304~1.069)	0.08	A	26/53	1.534(0.885~2.658)	0.127
Lymph metastatic breast cancer cases vs. No lymph node metastasis breast cancer controls							
GG	44/37	1		TT	34/31	1	
AG	27/24	1.057(0.524~2.134)	0.877	AT	34/27	0.871(0.432~1.757)	0.700
AG+AA	29/25	1.025(0.514~2.046)	0.944	AT+AA	39/31	0.872(0.443~1.717)	0.692
G	115/98	1		T	102/89	1	
A	31/26	0.984(0.547~1.770)	0.958	A	44/35	0.912(0.538~1.544)	0.731

Note: ^a: P and OR(95%CI) for rs3807987; ^b: P and OR(95%CI) for rs7804372

联,但本研究认为 rs3807987 和 rs7804372 位点与乳腺癌的发病风险存在相关,这与 Hamta^[6]、Fard^[7]、Liu^[8]与 Wang 等^[11]的结论一致,同时本研究发现 rs12672038 与乳腺癌的发病风险无相关性,这与 Fard 等^[7]的结果相反,Fard 等^[7]认为携带 rs12672038 AA 基因型罹患乳腺癌的风险增高,笔者认为这可能与选择的研究人群有关。本研究发现 rs3807987 位点中,相对于 GG 基因型,AG、A 基因携带者(AG/AA 基因型)使乳腺癌发病风险分别增加了 2.110 倍和 1.968 倍,携带 A 等位基因较 G 等位基因者乳腺癌的发病风险增加了 1.623 倍。

Hamta 等^[6]以伊朗人群为基础,研究 rs7804372 位点与乳腺癌相关性时发现 AA 基因型降低乳腺癌的发病风险,Liu 等^[8]通过中国台湾地区乳腺癌的研究发现乳腺癌患者 rs7804372 的 A 等位基因及 AT 基因型携带率较低,认为是人群免于罹患乳腺癌的保护因素,但 Fard 等^[7]以伊朗人群为研究对象分析时却得出了相反的结论,认为 rs7804372 AA 基因型增加了罹患乳腺癌的风险,本研究发现携带 A 等位基因较 T 等位基因,其乳腺癌的患病风险增加 1.699 倍,这与 Fard 等^[7]研究结论一致。笔者认为 rs7804372 位点多态性与乳腺癌患病风险的关系仍不明确,结果不一致的原因可能与复杂的遗传因素和环境因素、样本量的选择、种族差异等其他因素有关,尚需进一步探讨。

Wang 等^[11]发现携带 rs3807987 A 等位基因者,PR 阳性表达率较低,但本研究却发现两者之间无相关性。此外,本研究发现 rs3807987 基因多态性腋窝淋巴结转移、ER、Ki-67 蛋白表达均无相关性。鉴于 PR、ER、Ki-67 等蛋白对临床的重要性,后续研究应当多中心、多地区继续探讨 rs3807987 基因多态性与乳腺癌的临床病理特征的相关性。本研究发现 rs3807987 在未绝经乳腺癌中,相较于 GG 基因型,携带 A 等位基因、AG 基因型和 AG/AA 基因型频率显著性增高,这可能与未绝经女性处于雌、孕激素及其受体生理活跃期、生活压力较大等危险因素增加有关。但是,为何危险的环境因素会促使 A 等位基因、AG 基因型和 AG/AA 表达率升高的原因尚不明确,因此认为后续研究尚需进一步采用多中心研究。Wang 等^[11]认为携带 rs7804372 的 AA 基因型的乳腺癌患者,其 PR、ER 表达阳性率显著性增高,但本

研究发现两者之间无相关性,rs7804372 在未绝经乳腺癌中,相较于 TT 基因型,携带 AT 和 AT/AA 基因表达率显著性增高,有待在不同种族、不同区域中进一步扩大样本量以获得更丰富的理论依据。

本研究受时间和病例样本量的限制、未能根据月经周期对未绝经乳腺癌进一步分层探讨基因多态性,后续研究还需在不同地区进行多中心、大样本量的研究加以验证,并对其遗传多态性与乳腺癌易感相关性及临床病理特征机制进行更深层次的研究。

参考文献:

- [1] Routray S, Hosalkar RM, Hosalkar RM, et al. En-cyclo-pedia of signaling molecules [M]. New York: Springer International Publishing AG, 2018. 763-768.
- [2] Yin HL, Liu TY, Zhang GY, et al. Caveolin proteins: a molecular insight into disease [J]. Front Med, 2016, 10(4): 397-404.
- [3] Li X, Sun J, Hu S. Expression of caveolin-1 in breast cancer stroma as a potential prognostic biomarker of survival and progression: a meta-analysis [J]. Wien Klin Wochenschr, 2017, 129(15-16): 558-563.
- [4] Anwar SL, Wahyono A, Aryandono T, et al. Caveolin-1 in breast cancer: single molecule regulation of multiple key signaling pathways [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(16): 6803-6812.
- [5] Wihandani DM, Adiputra PAT, Supadmanaba IGP. Low prevalence of caveolin-1 oncogenic polymorphism G14713A and T29107A among breast cancer patient in Sanglah General Hospital [J]. Bali Medical Journal (Bali Med J), 2017, 3(3): 109-112.
- [6] Hamta A, Ghaderi M, Khazaei S, et al. Genotypic frequency of Caveolin-1(CAV1)T29107A polymorphism in the Iranian patients with breast cancer [J]. J Kermanshah Univ Med Sci, 2016, 20(2): 79-83.
- [7] Frad ZT, Nafisi N. The relationship between 6 polymorphisms of caveolin-1 gene and the risk of breast cancer [J]. Clin Breast Cancer, 2018, 18(5): e893-e898.
- [8] Liu LC, Su CH, Wang HC, et al. Significant association of caveolin-1(CAV1) genotypes with breast cancer in Taiwan [J]. Anticancer Res, 2011, 31(10): 3511-3515.
- [9] Fan S, Meng JL, Zhang L, et al. CAV1 polymorphisms rs1049334, rs1049337, rs7804372 might be the potential risk in tumorigenicity of urinary cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Pathology, Research and Practice, 2019, 215(1): 151-158.
- [10] Yan C, Sun C, Ding X, et al. Association of CAV1 polymorphisms with the risks of breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(9): 1-4.
- [11] Wang M, Tian T, Ma XB, et al. Genetic polymorphisms in caveolin-1 associate with breast cancer risk in Chinese Han population [J]. Oncotarget, 2017, 8(53): 91654-91661.

SOX1 对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

陈冉, 戴立玲, 倪静

(江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 探究性别决定区 Y 框蛋白 1 (sex determining region Y-box, SOX1) 对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。[方法] 选择稳定表达 SOX1 基因的 HeLa 细胞株为实验组, 同时选择稳定表达空白质粒的 HeLa 细胞株和 HeLa 细胞为对照组。采用二甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测 SOX1 对 HeLa 细胞增殖的影响; 通过细胞基质黏附实验、体外细胞迁移实验、体外细胞侵袭实验分别研究 SOX1 对 HeLa 细胞粘附、迁移、侵袭能力的影响; 采用明胶酶谱法检测细胞内相关蛋白的水平。[结果] 在研究第 1 天, 两组的增殖能力比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 实验组在研究第 3 天 (0.526 ± 0.067)、第 5 天 (1.169 ± 0.148)、第 7 天 (1.160 ± 0.134) 的增殖能力均显著性低于对照组 ($P<0.05$)。实验组黏附率 (0.754 ± 0.041) 显著性低于对照组 (0.931 ± 0.135) ($P<0.05$); 实验组在 24h (5.84 ± 1.20)、48h (10.28 ± 3.01)、72h (14.51 ± 2.31) 迁移距离均显著性小于对照组 ($P<0.05$); 实验组侵袭细胞的数量 (120.09 ± 10.04 个) 明显较对照组 (215.67 ± 6.98 个) 少 ($P<0.05$)。实验组基质金属蛋白酶 2 (0.981 ± 0.199)、基质金属蛋白酶 9 (0.536 ± 0.033)、波形纤维蛋白 (0.429 ± 0.029) 表达水平显著性低于对照组, SOX1、E 钙黏附蛋白水平明显高于对照组 ($P<0.05$)。[结论] SOX1 表达水平升高, 会使宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭抑制, MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白表达水平降低, E-cadherin 表达水平升高。

关键词: 宫颈癌; 性别决定区 Y 框蛋白 1; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0626-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B012

Effect of SOX1 on Proliferation, Migration and Invasion of Cervical Cancer Cells

CHEN Ran, DAI Li-ling, NI Jing

(Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research & The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of sex determining region Y-box (SOX1) on the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells. [Methods] HeLa cell line stably expressing SOX1 gene was selected as the study group, while HeLa cell line stably expressing blank plasmid and HeLa cell line as the control group. The effect of SOX1 on HeLa cell proliferation was detected by MTT method, the effect of SOX1 on HeLa cell adhesion, migration and invasion was studied by cell matrix adhesion test, cell migration test and cell invasion test, the level of related proteins in HeLa cell was detected by gelatin zymogram. [Results] There was no significant difference in proliferation rate at d1 of cell culture between study group and control groups ($P>0.05$). The proliferation rate on d3 (0.526 ± 0.067), d5 (1.169 ± 0.148) and d7 (1.160 ± 0.134) in study group was lower than that in control group ($P<0.05$). The adhesion rate in study group was significantly lower than that in control group (0.754 ± 0.041 vs 0.931 ± 0.135 , $P<0.05$), the migration distance of the study group at 24h (5.84 ± 1.20), 48h (10.28 ± 3.01), 72h (14.51 ± 2.31) was significantly shorter than that of control group ($P<0.05$), the number of invasive cells in the study group was significantly less than that of control group (120.09 ± 10.04 vs 215.67 ± 6.98 , $P<0.05$). The expression levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) (0.981 ± 0.199), matrix metalloproteinase-9 (MMP9) (0.536 ± 0.033), vimentin (0.429 ± 0.029), and the levels of SOX1 and E-cadherin in the study group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$). [Conclusion] High SOX1 expression can inhibit the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells, and can decrease the expression of MMP2, MMP9 and vimentin, and increase the expression of E-cadherin.

Subject words: cervical cancer; sex determining region Y-box protein 1; proliferation; migration; invasion

宫颈癌的细胞增殖、迁移和侵袭的生物学行为是影响宫颈癌的主要因素之一。宫颈癌发生可能与

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 有关^[1], 而性别决定区 Y 框蛋白 (sex determining region Y-box, SOX) 家族在肿瘤干细胞中起着关键作用, SOX1 是最早被证实的转录因子之一, 在细胞胚胎发育、肿瘤的发生与发展中发挥着重要的作用^[2-3]。研究显示 SOX1

通信作者: 戴立玲, 实验师, 学士; 江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 南京医科大学附属肿瘤医院科技处, 江苏省南京市百子亭 42 号 (210009); E-mail: 272444568@qq.com

收稿日期: 2019-10-22; 修回日期: 2019-11-26

是通过抑制 β -catenin 表达及 Wnt/ β -catenin 信号通路来对肿瘤的发生进行调控的^[4]。本研究通过观察在宫颈癌患者 SOX1 基因稳定表达来探讨其对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

宫颈癌 HeLa 细胞株由 ATCC 公司提供;SOX1 干扰质粒由美国 Sigma 公司提供;二甲基偶氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)试剂均由美国 Sigma 公司提供;纤维黏连蛋白(FN)由北京医科大学生物教研室提供;磷酸盐平衡生理盐水(PBS)缓冲液由赛默飞世尔科技有限公司提供;生物牛血清蛋白(BSA)由李记生物科技有限公司提供;DMEM 细胞培养基由 Gibco 公司提供;Transwell 小室由美国 Corning 提供;Matrigel 由美国 BD 公司提供。

1.2 实验分组

选择稳定表达 SOX1 基因的 HeLa 细胞株为实验组,同时选择稳定表达空白质粒的 HeLa 细胞株和 HeLa 细胞为对照组。

1.3 方法

1.3.1 检测细胞增殖

两组细胞在 96 孔板(2000 个/孔)的培养箱中进行接种,培养 1、3、5、7 天后,在孔内加 20 μ l MTT 继续孵育 4h 左右,吸弃培养基,加入 DMSO。每组 5 个复孔,采用酶标仪检测两组细胞在 490nm 波长处的吸光值,然后分析其增殖差异。

1.3.2 检测细胞黏附

用 PBS 将纤维黏连蛋白配成 0.02 μ g/ μ l,将其注入到 96 孔板中,每孔 50 μ l,在 4℃ 中包被过夜;将 5% BSA 与 37℃ 密闭培养 40min,用无血清 DMEM 培养液漂洗 3 次,除去多余纤维黏连蛋白;培养 HeLa 和 HeLa-SOX1 细胞悬液,接种于上述孔中,浓度为 4 $\times$ 10⁵ 个细胞/孔,每个细胞 9 个重复孔,在 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 12h;取每组中 6 个重复孔的上清液,离心处理后酶谱分析,490nm 处吸光度;用 PBS 漂洗 6 个重复孔细胞,3 个用于测定总细胞的吸光度;每个孔在加入 MTT 在培养箱中培养 4h,加入 DMSO 200 μ l,震荡 10min。黏附率=(黏附细胞 A/总细胞 A) $\times$ 100%。

1.3.3 检测迁移和侵袭

将两组无血清培养基稀释的细胞悬液加入到铺

好 Matrigel 的 Transwell 上室中,在下室加入 10% PBS 培养基,在培养箱中孵育 24h,风干后甲醇固定 30min,苏木素染色 3min,观察并记录迁移的距离。侵袭实验,则是将 Matrigel 加入到小室上层底部,然后依据上述实验步骤进行操作,观察并记录侵袭细胞的数量。

1.3.4 检测相关蛋白的表达

取 20 μ l 总蛋白,采用明胶酶谱法检测 SOX1、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase, MMP2)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP9)、E 钙黏附蛋白(E-cadherin)和波形纤维蛋白(Vimentin)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 进行数据分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验比较差异;计数资料用百分比表示,采用 χ^2 检验比较组间差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖比较

研究第 1 天,两组增殖能力比较差异无统计学意义($P>0.05$);但在第 3 天、第 5 天、第 7 天,实验组增殖能力显著性低于对照组($P<0.05$)(Table 1)。

Table 1 Comparison of cell proliferation in two groups

Time	Study group	Control group	t	P
d1	0.355 $\pm$ 0.046	0.367 $\pm$ 0.054	1.385	0.357
d3	0.526 $\pm$ 0.067	0.743 $\pm$ 0.092	7.294	0.034
d5	1.169 $\pm$ 0.148	1.635 $\pm$ 0.148	8.532	0.025
d7	1.160 $\pm$ 0.134	1.641 $\pm$ 0.146	7.913	0.031

2.2 细胞黏附比较

实验组黏附率为 0.754 $\pm$ 0.041,对照组黏附率为 0.931 $\pm$ 0.135;实验组黏附率显著性低于对照组($t=8.657$, $P=0.021$)。

2.3 细胞迁移比较

实验组在 24h、48h、72h 迁移的距离分别为 (5.84 $\pm$ 1.20) μ m、(10.28 $\pm$ 3.01) μ m、(14.51 $\pm$ 2.31) μ m,对照组在这三个时间段的迁移距离分别为 (12.76 $\pm$ 2.61) μ m、(21.13 $\pm$ 4.17) μ m、(28.59 $\pm$ 5.64) μ m;实验组每个时间段迁移距离均小于对照组 ($P<0.05$)(Table 2, Figure 1)。

2.4 细胞侵袭比较

实验组侵袭细胞数量为 (120.09 $\pm$ 10.04) 个,对照

组侵袭细胞数量为(215.67±6.98)个;实验组侵袭细胞数量显著性少于对照组($t=15.709$, $P<0.001$) (Figure 2)。

2.5 相关蛋白表达比较

实验组 MMP2、MMP9、波形纤维蛋白表达水平显著性低于对照组($P<0.05$), SOX1、E-cadherin 水平明显高于对照组($P<0.05$) (Table 3, Figure 3)。

3 讨论

细胞增殖、迁移和侵袭等生物行为是影响宫颈癌的发生、发展以及预后的重要因素^[5]。SOX 家族参与宫颈癌细胞的发生与发展,且 SOX1 自身或通过影响其他因子或通路来抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[6-7]。

宫颈癌患者的病情发展以及预后与宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭密切相关。在本次研究结果中,实验组的增殖能力、黏附率、迁移距离、侵袭细胞数目均显著性低于对照组($P<0.05$)。在胡爱萍等^[8]的研究结果显示,SOX1 表达组细胞增殖、迁移和侵袭能力较低。本研究结果与之相符。研究表明,实验组宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力较对照组弱,提示当 SOX1 表达越活跃时,宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力越低。因此,在治疗过程中可通过上调 SOX1 的表达,从而达到抑癌的目的。

研究报道,SOX 家族可参与肿瘤细胞的发生与发展,SOX1 可通过抑制或促进相关蛋白或通路进而影响肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[9]。E-cadherin 是上皮标志物,该蛋白的缺失参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭过程^[10]。实验组的宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力低于对照组,

Table 2 Comparison of cell migration in two groups(μm)

Time	Study group	Control group	<i>t</i>	<i>P</i>
24h	5.84±1.20	12.76±2.61	8.269	0.029
48h	10.28±3.01	21.13±4.17	8.582	0.025
72h	14.51±2.31	28.59±5.64	9.362	0.019

Table 3 Comparison of the expression of related proteins in two groups

Index	Study group	Control group	<i>t</i>	<i>P</i>
SOX1	0.981±0.199	0.526±0.094	7.921	0.031
MMP2	0.536±0.033	1.039±0.023	9.495	0.015
MMP9	0.429±0.029	0.774±0.050	8.502	0.027
E-cadherin	0.486±0.044	0.299±0.029	9.460	0.017
Vimentin	1.385±0.119	2.246±0.034	8.649	0.022

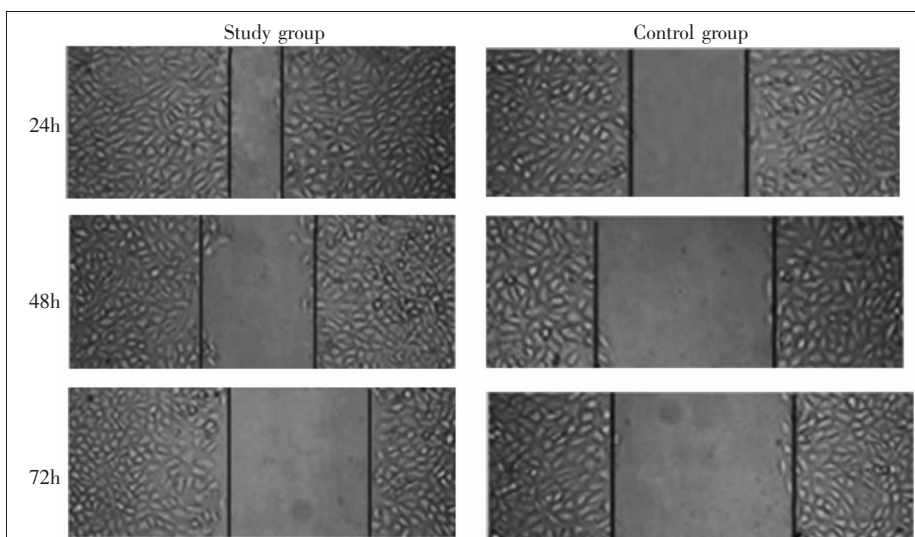


Figure 1 Comparison of SOX1 effect on cervical cancer cell migration(x40)

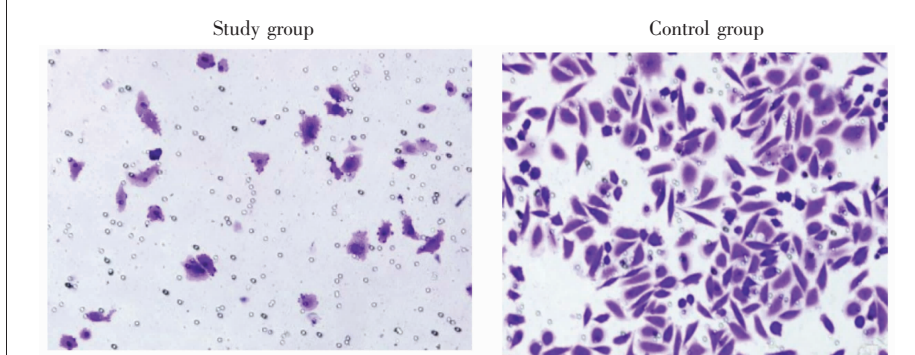
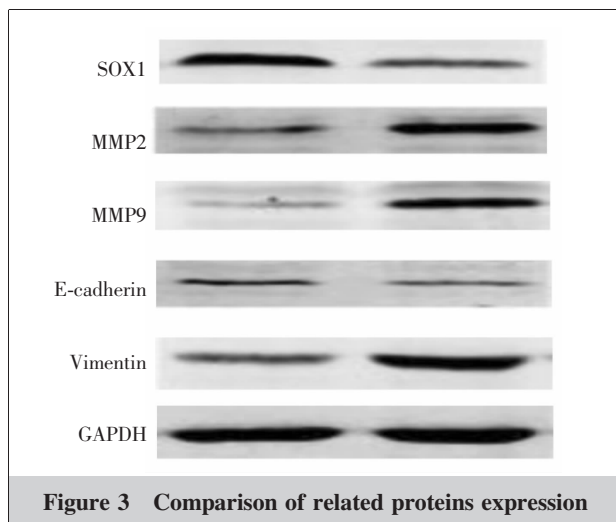


Figure 2 Effect of SOX1 on cell invasion in two groups(crystal violet stainingx200)

SOX1 和 E-cadherin 蛋白表达水平显著性高于对照组($P<0.05$)。因此,宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力与 SOX1、E-cadherin 蛋白有关。SOX1、E-cadherin 蛋白表达水平越高,其增殖、迁移和侵袭能力越低,抑癌作用越明显。MMPs 是由肿瘤细胞分泌的



一种参与肿瘤细胞生长、增殖、转移等生物学行为的蛋白酶,有抑癌作用^[11]。Vimentin 是上皮间质的标志物之一,通过调控其水平,能够达到抑癌或促癌的作用。实验组 MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白的表达水平显著性低于对照组 ($P<0.05$)。因此, MMP2、MMP9、Vimentin 与宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭相关^[12]。MMP2、MMP9、Vimentin 表达水平越高,则宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力越强,癌细胞的扩散加快,病情发展迅速,使疾病恶化进程加快。在陈禹宏等^[13]的研究中,是通过下调 MARCH8 表达水平来降低宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,从而达到抑癌作用。MMP9、Vimentin 蛋白表达水平降低, E-cadherin 蛋白水平明显升高,与本文的研究结果相符。在本研究中,实验组 SOX1、E-cadherin 蛋白水平较高, MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白水平较低,肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭的能力较弱,抑癌作用明显。因此,可通过调控 SOX1 水平,使宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力降低,起到抑癌作用。

综上所述, SOX1 高表达能够抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭,抑制 MMP2、MMP9、Vimentin 蛋白表达,促进 E-cadherin 蛋白表达,抑制癌症的发生与发展。因此在临床治疗中,可通过上调 SOX1 水平,从而起到抑癌作用。

参考文献:

[1] Orsini A, Bonuccelli A, Striano P, et al. Generalized epilepsy and mild intellectual disability associated with 13q34 deletion: a potential role for SOX1 and ARHGEF7 [J]. *Seizure*, 2018, 59(1): 38–40.

[2] Ooft ML, Van Ipenburg J, vanLoo R, et al. Molecular profile of nasopharyngeal carcinoma; analysing tumour suppressor gene promoter hypermethylation by multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(4): 351–359.

[3] Yin C. Molecular mechanisms of SOX transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63(1): 68–78.

[4] Huang J, Tan ZR, Yu J, et al. DNA hypermethylated status and gene expression of PAX1/SOX1 in patients with colorectal carcinoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10(1): 4739–4751.

[5] Walker S, Hamilton W. Risk of cervical cancer in symptomatic women aged ≥ 40 in primary care: a case-control study using electronic records[J]. *Br J Gen Pract*, 2017, 26(614): E643–E648.

[6] Agam Bansal, Abhijit Pakhare, Neelkamal Kapoor, et al. Knowledge, attitude, and practices related to cervical cancer among adult women: a hospital-based cross-sectional study[J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2018, 6(2): 324–328.

[7] Zhang Z, Wang J, Li J, et al. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4[J]. 2018, 97(1): 511–517.

[8] Hu AP, Wu GK, Wu YJ, et al. SOX1 overexpression inhibits gastric cancer cell proliferation and invasion through β -catenin pathway[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2019, (14): 1722–1727. [胡爱萍, 吴贵恺, 吴艳杰, 等. SOX1 过表达通过 β -catenin 通路抑制胃癌细胞增殖和侵袭 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, (14): 1722–1727.]

[9] Li SJ, Yang FX, Wang MY, et al. MIR-378 functions as an onco-miRNA by targeting the ST7L/Wnt/ β -catenin pathway in cervical cancer[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 1047–1056.

[10] Lorna G, Keenan Kathy Rock, Aini Azmi, et al. An atlas to aid delineation of para-aortic lymph node region in cervical cancer: design and validation of contouring guidelines [J]. *Radiother Oncol*, 2018, 127(3): 65–85.

[11] He Y, Northey JJ, Pelletier A, et al. The Cdc42/Rac1 regulator CdGAP is a novel E-cadherin transcriptional co-repressor with Zeb2 in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(24): 3490–3503.

[12] Chaninya Wongwarangkana, Nasamon Wanlapakorn, Jira Chansaenroj, et al. Retinoic acid receptor beta promoter methylation and risk of cervical cancer[J]. *World J Virol*, 2018, 7(1): 1–9.

[13] Chen YH, Meng Y, Hu LN, et al. The effect of down regulating the expression of March8 gene on the invasion, migration and proliferation of cervical cancer Siha cells[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2018, 34(7): 967–971. [陈禹宏, 孟莹, 胡丽娜, 等. 下调 MARCH8 基因的表达对宫颈癌 Siha 细胞侵袭、迁移与增殖的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(7): 967–971.]

重组人血管内皮抑制素联合化疗治疗晚期小细胞肺癌的疗效及安全性 Meta 分析

李华伟¹, 李萌², 刘 强¹

(1. 中国医学科学院肿瘤医院深圳医院, 广东 深圳 518000;

2. 广州中医药大学深圳医院, 广东 深圳 518000)

摘要: [目的] 评价重组人血管内皮抑制素联合化疗治疗晚期小细胞肺癌的有效性和安全性。[方法] 检索 Cochrane 图书馆、PubMed、EMbase、中国知网、万方数据库、中国生物医学文献数据库, 收集重组人血管内皮抑制素联合化疗对比单纯化疗治疗晚期小细胞肺癌的随机对照试验, 采用 RevMan 5.3 软件进行 Meta 分析。[结果] 共纳入 9 篇文献, 合计 661 例病例。Meta 分析结果显示, 重组人血管内皮抑制素联合化疗与单纯化疗相比, 联合治疗在客观缓解率 (RR=1.37, 95%CI: 1.21~1.55, $P<0.001$)、疾病控制率 (RR=1.14, 95%CI: 1.06~1.22, $P=0.0007$) 方面均显示出优势。提高了半年的 PFS (RR=1.83, 95%CI: 1.12~3.01, $P=0.02$) 和 1 年 PFS (RR=3.67, 95%CI: 1.72~7.86, $P=0.0008$)。延长了 2 年 OS (RR=3.53, 95%CI: 1.74~7.14, $P=0.0005$), 但 1 年 OS 无统计学差异 (RR=1.26, 95%CI: 0.86~1.83, $P=0.24$)。不良反应方面, 联合化疗组和单纯化疗组在白细胞减少、血小板减少、血红蛋白减少、肝肾功能损害和胃肠道反应方面差异均无统计学意义。[结论] 重组人血管内皮抑制素联合化疗治疗晚期小细胞肺癌安全有效。

关键词: 重组人血管内皮抑制素; 小细胞肺癌; 化疗; meta 分析

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)07-0630-08

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.07.B013

A Meta Analysis of rh-Endostatin Combined with Chemotherapy for Advanced Small Cell Lung Cancer

LI Hua-wei¹, LI Meng², LIU Qiang¹

(1. Cancer Hospital Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen Center, Shenzhen 518000, China;

2. Shenzhen Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China)

Abstract: [Objective] To evaluate the efficacy and safety of rh-endostatin plus chemotherapy in the treatment of advanced small cell lung cancer (SCLC). [Methods] The randomized controlled trials on rh-endostatin combined chemotherapy for advanced SCLC were searched from PubMed, EMbase, Cochrane library, CNKI, Chinese biomedical literature database and Wanfang database. RevMan 5.3 software was used to analyze studies that met the inclusion criteria. [Results] Nine clinical trials involving 661 patients with advanced SCLC were included. Meta analysis results suggested that the objective response rate and disease control rate of the rh-endostatin combined with chemotherapy was higher than that of chemotherapy alone group (RR=1.37, 95% CI: 1.21~1.55, $P<0.001$; RR=1.14, 95% CI: 1.06~1.22, $P=0.0007$, respectively). It increased the PFS for half a year (RR=1.83, 95% CI: 1.12~3.01, $P=0.02$) and the PFS for 1-year (RR=3.67, 95% CI: 1.72~7.86, $P=0.0008$). The 2-year OS was extended (RR=3.53, 95% CI: 1.74~7.14, $P=0.0005$), but there was no significant difference in 1-year OS (RR=1.26, 95% CI: 0.86~1.86, $P=0.24$). There were no significant differences between the two groups in the occurrence of leukopenia, thrombocytopenia, hemoglobin reduction, liver and kidney function damage and gastrointestinal reactions. [Conclusion] rh-Endostatin plus chemotherapy in the treatment of advanced small cell lung cancer is safe and effective.

Subject words: rh-endostatin; small cell lung cancer; chemotherapy; meta analysis

肺癌是我国男性最常见的恶性肿瘤, 2018 年中

通信作者: 刘强, 科主任, 主任医师, 博士; 中国医学科学院肿瘤医院深圳医院中医科, 广东省深圳市龙岗区宝荷路 113 号 (518000); E-mail: doctor1970@163.com

收稿日期: 2019-09-22; **修回日期:** 2019-11-18

国约有 77.4 万新增肺癌病例, 约有 69 万人死于肺癌^[1]。小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是肺癌中一种常见病理类型, 约占肺癌总数 10%~20%^[1]。小细胞肺癌恶性程度高、易复发转移, 病情进展快, 5 年

生存率低于 5%^[2]。

重组人血管内皮抑制素(恩度)是我国自主研发的抗肿瘤血管生成的药物,可特异性作用于内皮细胞,抑制肿瘤血管生成及转移^[3]。由于抗血管生成在肿瘤治疗中的重要作用,因此在常规治疗的基础上加用抗血管生成药物往往能增加临床获益。目前有多个临床研究提示在常规化疗基础上联合恩度治疗晚期小细胞肺癌能提高总有效率,不明显增加不良反应。为进一步明确恩度联合化疗治疗晚期小细胞肺癌的治疗效果,本研究采用 meta 分析对恩度联合化疗对比单纯化疗治疗晚期小细胞肺癌的疗效和安全性进行综合评价,以期为恩度联合化疗治疗晚期小细胞肺癌提供更有力的循证医学依据。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略

通过计算机对 Cochrane 图书馆、PubMed、Embase、中国知网、万方数据库、中国生物医学文献数据库进行检索,检索时间设置为 2019 年 7 月 1 日。中文检索词为重组人血管内皮抑制素、恩度、小细胞肺癌,英文检索词为 rh-endostatin、endostatin、small cell lung cancer、SCLC。检索均采用主题检索与非主题检索相结合的方式,随机对照试验的检索参照 Cochrane 系统评价手册推荐的检索策略。

1.2 研究方法

文献纳入标准:研究类型为临床随机对照试验,无论是否采用分配隐藏或盲法,语言为中文或英文。

文献排除标准:①疗效判断指标不明确;②临床观察判断有活动性感染者;③合并其他恶性肿瘤者;④对试验药物过敏者;⑤合并心、脑、肾及造血系统等严重原发性疾病患者;⑥不符合纳入标准的研究。

研究对象:①经细胞学或组织病理学确诊为小细胞肺癌;②均为晚期小细胞肺癌;③卡氏评分(karnofsky performance status,KPS)>60 分,预计生存时间>3 个月;④一般情况可,无化疗禁忌证;⑤有可测量的病灶。

干预措施:①试验组采用重组人血管内皮抑制素联合化疗,对照组采用单纯化疗;②试验组与对照组治疗周期至少为 2 个周期。

疗效判定及评价指标:①客观缓解率(objective

response rate,ORR):根据 RECIST 标准对肿瘤的控制情况进行疗效评价。完全缓解(complete response,CR):所有目标病灶消失;部分缓解(partial response,PR):基线病灶最大径之和至少减少 30%;疾病进展(progress disease,PD):基线病灶最大径之和至少增加 20%或出现新病灶;疾病稳定(stable disease,SD):基线病灶最大径之和有减少但未达 PR 或有增加但未达 PD。客观缓解率=(完全缓解+部分缓解)/总病例数×100%。疾病控制率(disease control rate,DCR)=(完全缓解+部分缓解+疾病稳定)/总病例数×100%。②无进展生存时间(progress free survival,PFS):指患者从接受治疗开始,到观察到疾病进展或者发生因为任何原因的死亡的时间。总生存时间(overall survival,OS):所有入选患者从化疗开始至死亡或末次随诊的时间。③不良反应:根据美国国立癌症研究所毒性事件分级标准第 3 版(NCI-CTCAE 3.0)判定患者不良反应^[4]。

1.3 资料提取

由两位评价员分别根据纳入和排除标准筛选文献,对筛选的文献提取以下相关内容:研究基本特征;治疗情况;结局指标,如客观缓解率、疾病控制率、无进展生存时间、总生存时间、不良反应等指标。

1.4 文献质量评价

参考考克兰干预措施系统评价手册(5.2 版本)对纳入研究文献进行质量评价,内容包括:①随机方法是否合理;②分配隐藏;③是否合理采用盲法;④有无失访或退出、失访人数、失访原因是否描述。采用漏斗图评定发表偏倚。

1.5 统计学处理

采用 Cochrane 协作网提供的 RevMan 5.3 软件进行分析。分类变量采用风险比(risk ratio,RR)及其 95%可信区间(95% confidence interval,95%CI)表示统计效应量,连续变量采用标准均数差(standardized mean difference,SMD)及其 95%CI 进行效应量合并分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。当 $I^2<50\%$ 和 $P>0.1$,采用固定效应模型, $I^2>50\%$ 和 $P<0.1$,采用随机效应模型。

2 结 果

2.1 文献检索结果

检索所有数据库共得到 434 篇文献,删除重复

后纳入 363 篇文献,并通过阅读标题、摘要,排除研究对象不是小细胞肺癌文献、基础研究、综述、非随机对照试验以及病例报道等,最终纳入 9 篇文献,中文 8 篇,英文 1 篇。

2.2 纳入研究文献的基本特征和质量评价

纳入研究中试验组和对照组患者基本临床特征差异无统计学意义,组间基线一致,具有良好的可比性(Table 1)。

纳入 9 篇研究中有 8 篇研究描述了随机分组,其中有 2 篇文献描述了产生随机序列的具体方法,所有文献均未描述盲法和分配隐藏内容,1 项研究描述了患者退出例数及原因,3 项研究报道的试验后随访情况。由于文献提供信息有限,无法判断是否存在其他偏倚。纳入文献偏倚风险比较见图 1(Figure 1)。

2.3 Meta 分析结果

2.3.1 客观缓解率

9 项研究均报道了客观缓解率,异质性检验提示各研究间无异质性 ($P=0\%$, $P=0.66$),Meta 分析采用固定效应模型。联合治疗组的客观缓解率优于单纯化疗组($RR=1.37$, $95\%CI: 1.21\sim 1.55$, $P<0.001$) (Figure 2)。

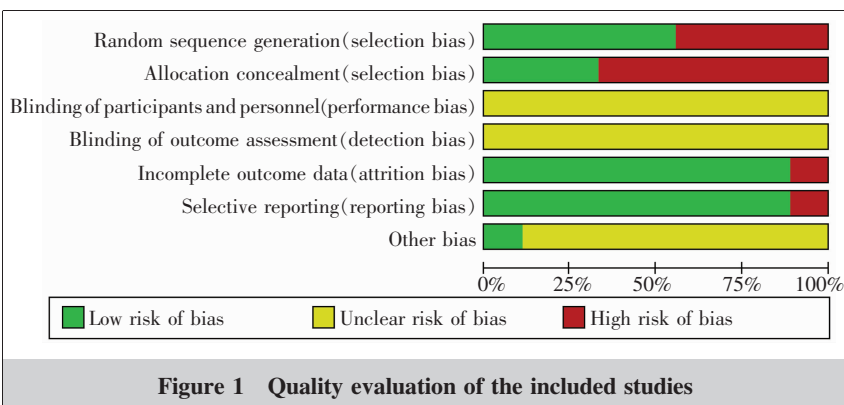


Table 1 General characteristics of included studies

Study	No. of patients		Treatment method		Cycle	Indexes
	Control group (average age)	Experimental group (average age)	Control group	Experimental group		
Dai XL 2012 ^[5]	50(52.3±3.7)	50(52.3±3.7)	EP	EP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, AE
Chen JH 2013 ^[6]	19(56.0±1.8)	24(57.0±2.3)	EC	EC+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, AE
Xiao Y 2017 ^[7]	41(52.3±5.1)	47(56.1±4.7)	IP	IP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, OS, PFS, AE
Wang F 2016 ^[8]	31(52.3±5.1)	37(56.1±4.7)	IP	IP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, OS, PFS, AE
Su L 2011 ^[9]	25(-)	22(-)	EP	EP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, AE
Hu HT 2011 ^[10]	44(57.8±11.9)	45(56.6±12.2)	TP	TP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR
Wang ZJ 2011 ^[11]	20(57.2)	20(56.0)	EP	EP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, AE
Li KY 2010 ^[12]	24(-)	24(-)	EP	EP+endostatin 15mg/d, d ₁₋₁₄	2	ORR, DCR, AE
Shun Lu 2015 ^[13]	69(58.2±7.8)	69(57.7±8.4)	EC	EC+endostatin 7.5mg/m ² , d ₁₋₁₄	4~6	ORR, DCR, OS, PFS

EP: etoposide + cisplatin; EC: etoposide + carboplatin; IP: irinotecan + cisplatin; TP: topotecan + cisplatin; ORR: objective response rate; DCR: disease control rate; PFS: progress free survival; OS: overall survival; AE: adverse event; “-”: not given

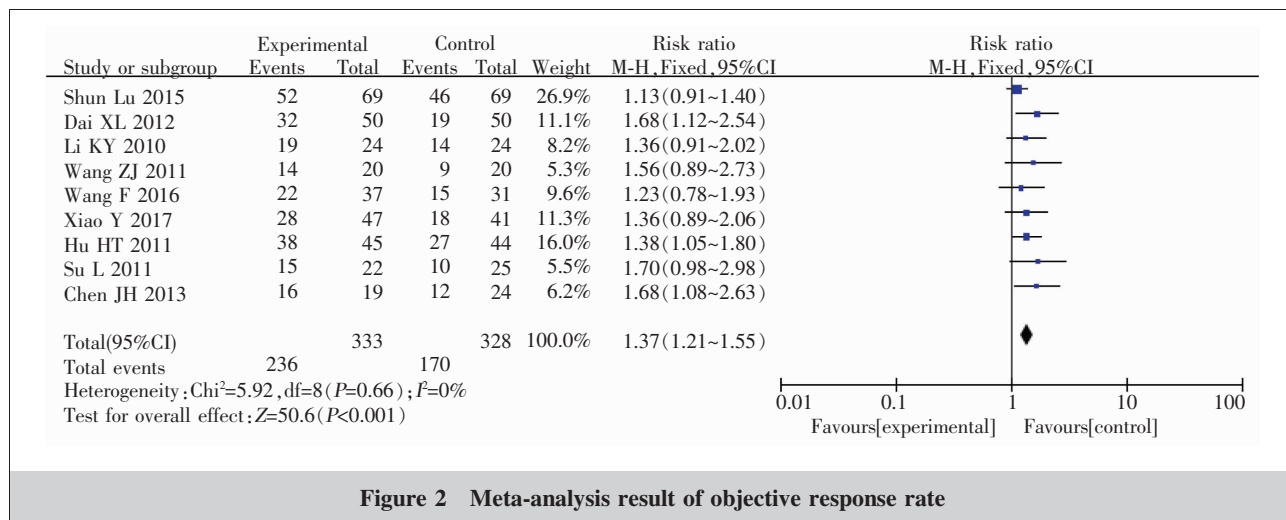


Figure 2 Meta-analysis result of objective response rate

2.3.2 疾病控制率

9项研究均报道了疾病控制率,异质性检验结果提示各研究间无异质性($I^2=0\%$, $P=0.70$),Meta分析采用固定效应模型。联合化疗组的疾病控制率优于单纯化疗组($RR=1.14$,95%CI:1.06~1.22, $P=0.0007$)(Figure 3)。

2.3.3 无进展生存率

3项研究报道了半年、1年无进展生存率,异质性检验结果提示各研究间存在异质性,Meta分析采用随机效应模型。联合化疗组优于单纯化疗组,提高了半年PFS($RR=1.83$,95%CI:1.12~3.01, $P=0.02$)和1年PFS($RR=3.67$,95%CI:1.72~7.86, $P=0.0008$)(Figure 4)。

2.3.4 总生存率

3项研究报道了1年总生存率,2项研究报道了2年总生存率,异质性检验结果提示存在异质性,Meta分析采用随机效应模型。联合化疗组提高了2年OS($RR=3.53$,95%CI:1.74~7.14, $P=0.0005$);但1年OS无统计学差异($RR=1.26$,95%CI:0.86~1.83, $P=0.24$)(Figure 5)。

2.3.5 不良反应

白细胞减少:8项研究报道了联合治疗与单纯化疗后白细胞减少的情况,各研究间无异质性($I^2=0\%$, $P=0.97$),Meta分析采用固定效应模型。联合化疗对比单纯化疗在白细胞减少方面无统计学意义($RR=1.12$,95%CI:0.79~1.58, $P=0.53$)(Figure 6)。

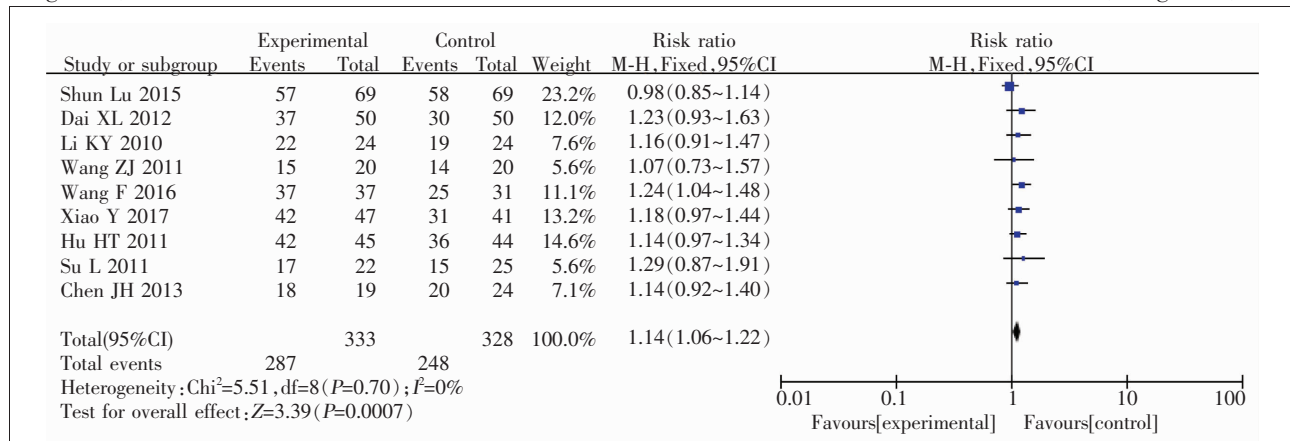


Figure 3 Meta-analysis result of disease control rate

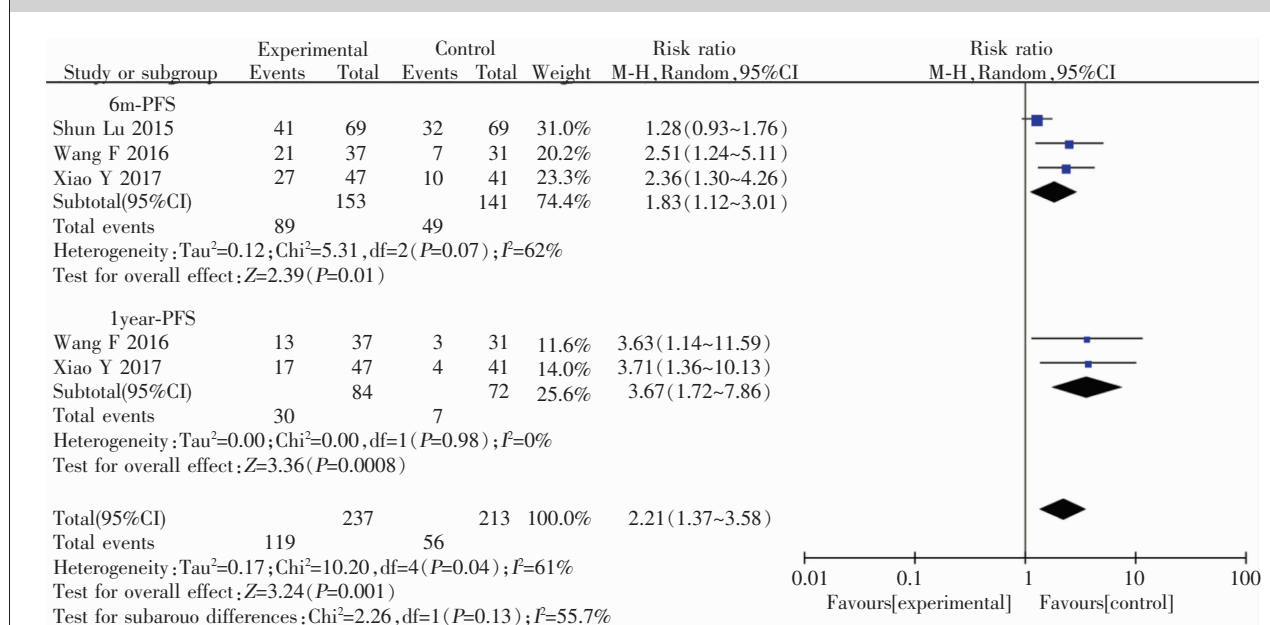


Figure 4 Meta-analysis result of progress free survival

