

ROR α 激动剂 SR1078 抑制人胃癌 MGC803 细胞增殖与迁移侵袭的作用

裴大兵^{1,2}, 张翼臻^{1,2}, 苏坚^{2,3}, 刘芳², 夏红², 苏琦²

(1. 井冈山大学附属医院, 江西吉安 343000; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南省肿瘤细胞与分子病理学重点实验室, 湖南省胃癌研究中心, 湖南衡阳 421001; 3. 南华大学附属第二医院, 湖南衡阳 421001)

摘要: [目的] 观察 ROR α 激动剂 SR1078 对人胃癌 MGC803 细胞增殖、迁移与侵袭的影响。[方法] 实验分为 10 μ mol/L SR1078 处理 MGC803 细胞组与 MGC803 细胞组。Western blot 与免疫荧光检测 ROR α 表达, MTT 检测细胞增殖; 细胞划痕和 Transwell 实验分别检测细胞迁移与侵袭。[结果] Western blot 检测显示, 10 μ mol/L SR1078 处理组较对照组 ROR α 蛋白明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫荧光显示, SR1078 处理 MGC803 细胞 ROR α 表达增强。MTT 检测显示, 10 μ mol/L SR1078 作用 MGC803 细胞 24h、48h、72h、96h 后, 增殖抑制率分别为 37.2%、46.9%、52.7%、68.6%, SR1078 可呈时间依赖性抑制 MGC803 细胞增殖 ($P < 0.05$)。划痕实验显示, 10 μ mol/L SR1078 处理组迁移距离 ($5.74 \pm 0.078 \mu\text{m}$) 明显低于对照组 ($9.37 \pm 0.098 \mu\text{m}$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Transwell 迁移实验显示, 10 μ mol/L SR1078 处理组迁移细胞 (80 ± 1.155 个) 较对照组 (103 ± 1.155 个) 明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。侵袭实验显示, 10 μ mol/L SR1078 处理组细胞穿膜细胞 (19.67 ± 1.764 个) 较 MGC803 细胞 (40.67 ± 1.202 个) 明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] SR1078 可通过上调 ROR α 抑制 MGC803 细胞增殖与迁移侵袭。

关键词: ROR α ; SR1078; 人胃癌 MGC803 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)08-0674-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.08.B003

Effect of ROR α Agonist SR1078 on Proliferation, Migration and Invasion in Human Gastric Cancer MGC803 Cells

PEI Da-bing^{1,2}, ZHANG Yi-zhen^{1,2}, SU Jian^{2,3}, LIU Fang², XIA Hong², SU Qi²

(1. The Affiliated Hospital, Jinggangshan University, Ji'an 343000, China; 2. Hunan Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology, Hunan Provincial Center for Gastric Cancer Research, Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang 421001, China; 3. The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of ROR α agonist SR1078 on the proliferation, migration and invasion of human gastric cancer MGC803 cells. [Methods] Human gastric cancer MGC803 cells were treated with 10 μ mol/L SR1078. Western blot and immunofluorescence were used to detect ROR α expression, and MTT was used to detect cell proliferation. Cell migration and invasion were determined by cell scratch and Transwell assay respectively. [Results] Western blotting showed that ROR α protein was significantly increased in SR1078 treatment group compared with the control group ($P < 0.05$). Immunofluorescence showed that ROR α expression was enhanced in MGC803 cells treated with SR1078. MTT showed that the proliferation of MGC803 cells were inhibited by 37.2%, 46.9%, 52.7% and 68.6% after SR1078 treatment for 24h, 48h, 72h and 96h, respectively, and it was in a time-dependent manner ($P < 0.05$). The scratching test showed that the migration distance of SR1078 treatment group was decreased [$(5.74 \pm 0.078) \mu\text{m}$] compared with [$(9.37 \pm 0.098) \mu\text{m}$] in the control group ($P < 0.05$). Transwell assay showed that there were 80 ± 1.155 migration cells in SR1078 treatment group, compared with 103 ± 1.155 cells in the control group ($P < 0.05$). Invasion test showed that the number of invasion cells in SR1078 treatment group were significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). [Conclusion] SR1078 can inhibit the proliferation, migration and invasion of MGC803 cells by up-regulating ROR α expression.

Subject words: ROR α ; SR1078; human gastric cancer MGC803 cells; proliferation; migration; invasion

胃癌是常见恶性肿瘤之一, 据 2018 年报告, 全球

基金项目: 国家自然科学基金 (81374013; 81641112)

通信作者: 苏琦, 二级教授, 博士生导师; 南华大学肿瘤研究所, 湖南省肿瘤细胞与分子病理学重点实验室, 湖南省胃癌研究中心, 湖南省衡阳市常胜西路 28 号 (421001); E-mail: suqi1945@163.com

收稿日期: 2019-07-31; **修回日期:** 2019-10-23

发生率与死亡率分别居恶性肿瘤第 5 位与第 3 位^[1]。

由于胃癌患者就诊时大多已经发生侵袭与转移, 治疗效果较差^[2-3], 因而研究胃癌侵袭转移机制和寻找治疗药物与靶点是关键问题。

研究证实, 维甲酸受体相关孤儿受体 α (retinoic

acid receptor-related orphan receptor α , ROR α) 作为维甲酸受体相关孤儿受体超家族主要成员, 具有调控免疫、生理节律、脂质代谢、炎症与肿瘤生物学等功能^[4-6]。ROR α 在乳腺癌、结肠癌、胃癌、肝癌、黑色素瘤等肿瘤中低表达与肿瘤发生密切相关^[5-7]。并且, ROR α 高表达可体内外抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭等恶性表型, 提示 ROR α 可能是肿瘤抑制基因和治疗靶点^[7]。本课题组前期研究显示, ROR α 高表达可下调 Wnt/ β -catenin 通路靶基因表达, 抑制胃癌细胞增殖与迁移侵袭^[8-9]。本研究探讨 ROR α 激动剂 SR1078 是否可抑制胃癌细胞增殖与迁移侵袭。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃癌 MGC803 细胞由南华大学肿瘤研究所保存, 实验分为 10 μ mol/L SR1078 处理 MGC803 细胞组与 MGC803 细胞组, 置于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂、饱和湿度的培养箱内传代培养, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2 主要试剂

ROR α 与 β -actin 抗体 (Abcam 公司); ECL 发光试剂盒 (Santa Cruz 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (Promega 公司); ROR α 激动剂 SR1078 (MedChem Express 公司)。羊抗兔 IgG-HRP 和羊抗小鼠 IgG-HRP 购于凯基生物公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司。

1.3 MTT 检测

取处理组与对照组对数生长期细胞, 接种于 96 孔平底培养板, 每个样本设 6 个重复孔。细胞贴壁 6~8h 后更换为 150 μ l RPMI 1640 完全培养基, 再加入 20 μ l 5mg/ml MTT 溶液, 继续培养 4h 后, 吸弃培养基, 加 150 μ l DMSO 溶液, 室温震荡 10 min, 酶联免疫检测仪 OD_{570nm} 处测量各孔吸光值。细胞增殖抑制率=(1-实验组 OD₅₇₀ 值/对照组 OD₅₇₀) $\times$ 100%。

1.4 划痕实验检测

将处理组与对照组 0.8 $\times$ 10⁵ 个细胞接种至 6 孔细胞培养板中, 每组设置 3 个平行样本。在 RPMI 1640 细胞培养基中培养, 直至形成细胞单层。用 20 μ l 的 tip 头垂直板面划痕后, 用 RPMI 1640 培养基常规培养。倒置显微镜下观察、测量、记录划痕区

相对距离。

1.5 迁移实验

0.25% 胰蛋白酶消化处理组与对照组细胞, 制成 2 $\times$ 10⁵ 个细胞悬液, 用移液器吸取 200 μ l 加入 10 μ g/ml 纤维连接蛋白处理的 Transwell 小室上部, 置 3 复孔。并在 24 孔板下室加入 500 μ l 无血清的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 恒温培养箱中培养 12h。实验结束后, 用镊子取出 Transwell 小室, 用移液器吸出下室每个孔的培养基, 预冷的 PBS 清洗小孔 3 遍, 多聚甲醛固定, 再用 PBS 清洗小室 3 遍并将小室晾干, 0.1% 结晶紫染色, 用棉签擦掉上层未迁移的细胞, PBS 洗 3 遍。用小刀将 Transwell 小室底部膜切割下来, 并用镊子将其取出, 放于载玻片上, 甘油封片, 倒置显微镜下对微孔过滤器下层的样本进行计数, 随机选择 10 个视野迁移细胞进行计数及统计分析。

1.6 侵袭实验检测

将基质胶与 RPMI1640 培养基按照 1:7 的体积比混合, 取 50 μ l 的混合液平铺到 Transwell 小室上层, 再将小室放入 24 孔板内, 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 3h, 等待基质胶混合物凝固。3h 后凝胶形成, 轻轻将小室提起, 往小室下层加入 500 μ l 10% 完全培养基。将每孔处理组与对照组 1 $\times$ 10⁵ 的细胞接种到小室上层, 每组 3 个复孔, 将孔板放置在培养箱中培养。5h 后, 加入 SR1078, 继续培养。36h 后取出小室在 PBS 中浸洗 3 次, 擦去小室上层细胞后用 4% 多聚甲醛固定 10min, 结晶紫染色 10min, PBS 清洗小室 3 次。倒置显微镜下观察拍照, 随机选取 4 个高倍视野进行细胞计数, 取平均值。

1.7 Western blot 检测

收集处理组与对照组 1 $\times$ 10⁶ 个细胞, 加 100 μ l 裂解液, 冰上裂解 1h, 低温高速离心收集蛋白, 细胞核提取试剂盒分离核蛋白, BCA 蛋白定量测定蛋白浓度。每孔加 30 μ g 蛋白, 以 5:1 体积与 5 $\times$ SDS 缓冲液混合, 100 $^{\circ}$ C 5min, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂牛奶的 TBST (Tris-HCl 20mmol/L, NaCl 137mmol/L 含 0.1% Tween-20) 封闭 2h, TBST 洗膜 3 次, 一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, TBST 洗 3 次, 每次 15min, 二抗孵育 1h, TBST 洗 3 次, 每次 10min, 化学发光剂检测蛋白质印迹, 薄层扫描仪测定印迹区带的光密度值。

1.8 免疫荧光

将对数期的各组细胞制成悬液, 每孔接种 5×10^5 个细胞, 待细胞贴壁融合至 80% 时, 弃旧培养基, 取出盖玻片, PBS 洗 $3 \times 5 \text{ min}$, 4% 多聚甲醛固定, 静置 15 min, PBS 洗 $3 \times 5 \text{ min}$, 0.5% Triton 覆盖细胞后, 静置 30 min, PBS 洗 $3 \times 5 \text{ min}$, 吸干 PBS 液, 山羊血清封闭, 37°C 孵育 1 h, 吸净封闭液, 加入一抗, 湿盒内 4°C 孵育过夜; 第二天移置 37°C 复温 1 h, PBS 洗 $5 \text{ min} \times 3$ 次; 在暗室中加 FITC 的二抗, 37°C 避光湿盒中孵育 1 h, PBS 洗 $3 \times 5 \text{ min}$ 。0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 DAPI 染核, 避光静置 5 min, PBS 洗 $3 \times 5 \text{ min}$, 甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 各组实验数据采用均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

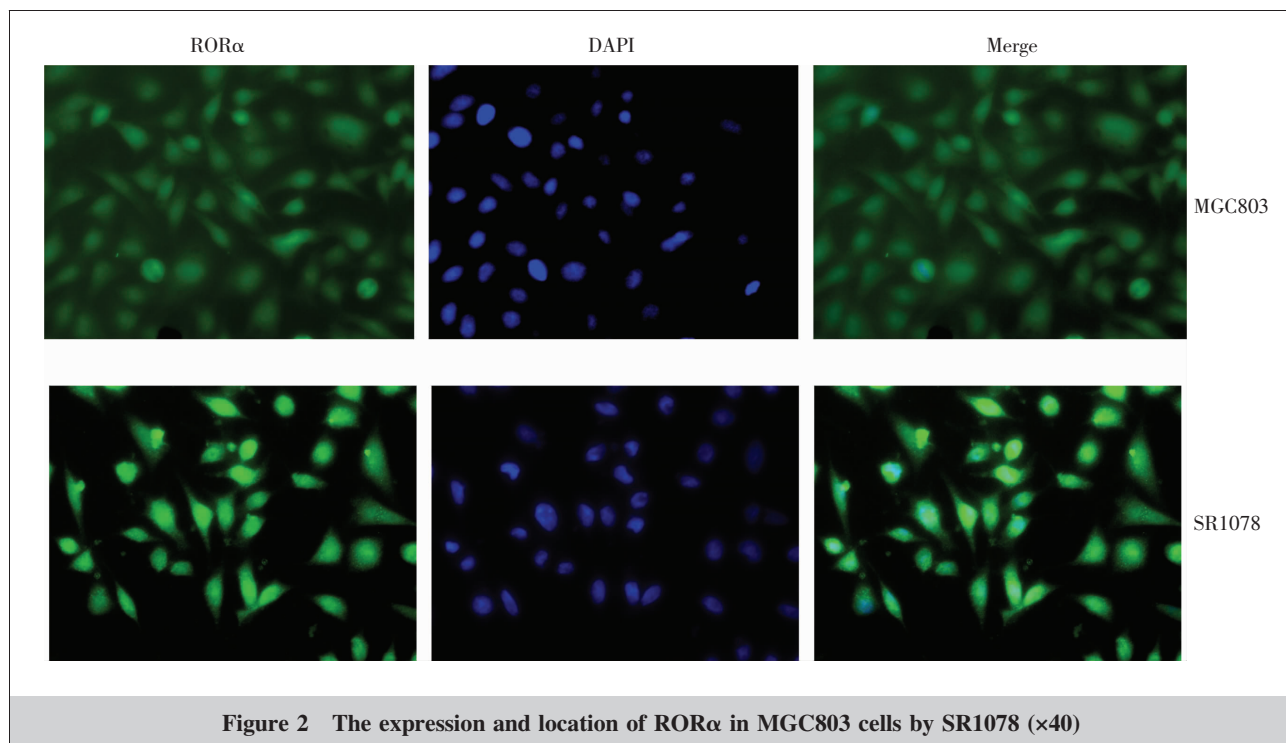
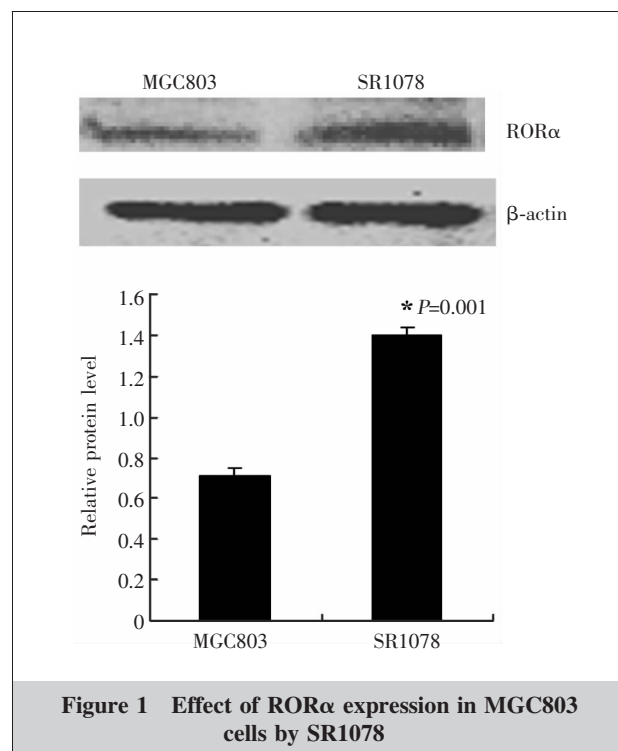
2 结 果

2.1 SR1078 对 MGC803 细胞 ROR α 表达的作用

ROR α 激动剂 10 $\mu\text{mol/L}$ SR1078 处理组较对照组 ROR α 蛋白表达明显升高 ($t = 2.97, P = 0.001$), SR1078 上调 ROR α 表达 (Figure 1)。

2.2 ROR α 定位与表达

ROR α 在细胞浆与细胞核均有染色, 但以细胞核染色为主。10 $\mu\text{mol/L}$ SR1078 处理组细胞 ROR α 阳性信号较对照组增强, 此结果与 Western blot 检测结果相符 (Figure 2)。



2.3 SR1078 对 MGC803 细胞增殖的作用

10 μ mol/L SR1078 作用 MGC803 细胞 24h、48h、72h、96h 后,增殖抑制率分别为 37.2%、46.9%、52.7%、68.6%,SR1078 可呈时间依赖性抑制 MGC803 细胞增殖 ($t=2.76, P=0.132$)(Table 1)。

2.4 SR1078 对 MGC803 细胞迁移的影响

划痕实验显示,0h 时各组的划痕距离大体相同,24h 后,SR1078 组迁移距离($5.74\pm 0.078\mu\text{m}$)明显低于 MGC803 细胞($9.37\pm 0.098\mu\text{m}$) ($t=2.62, P=0.032$)(Figure 3)。Transwell 迁移实验显示,SR1078 组迁移细胞(80 ± 1.155 个)较 MGC803 细胞(103 ± 1.155 个)明显减少 ($t=2.95, P=0.017$)(Figure 4)。

2.5 SR1078 对 MGC803 细胞侵袭的影响

Transwell 侵袭实验显示,SR1078 组细胞穿膜细胞(19.67 ± 1.764 个)较 MGC803 细胞(40.67 ± 1.202 个)明显减少,差异有统计学意义 ($t=2.14, P=0.031$)(Figure 5)。

3 讨论

基于 ROR α 可能是肿瘤抑制基因和治疗靶点,因此,研发促进 ROR α 表达的有效药物与激动剂为治疗肿瘤开拓了新的途径^[7]。例如,小分子 Nedd8 活化酶抑制剂 MLN4924 减少 ROR α 泛素化稳定 ROR α ,上调 ROR α 及其 p21 与 Bmal1 表达^[10]。有研究从 12 000 种植物提取物发现,neoruscogenin 是与 ROR α 高亲和力的激动剂,其可体内外活化 ROR α 及影响其靶基因的表达^[11]。Wang 等^[12]首次合成 ROR α /ROR γ 的配体 SR1078,发现 SR1078 可激活 ROR α 与 ROR γ 转录,刺激内源性 ROR 靶基因葡萄

Table 1 The effect on proliferation in MGC803 cells by SR1078

Groups	24h	48h	72h	96h
MGC803	0.982 $\pm$ 0.002	0.985 $\pm$ 0.009	1.083 $\pm$ 0.003	1.104 $\pm$ 0.002
SR1078	0.635 $\pm$ 0.008	0.538 $\pm$ 0.006	0.429 $\pm$ 0.010	0.243 $\pm$ 0.007

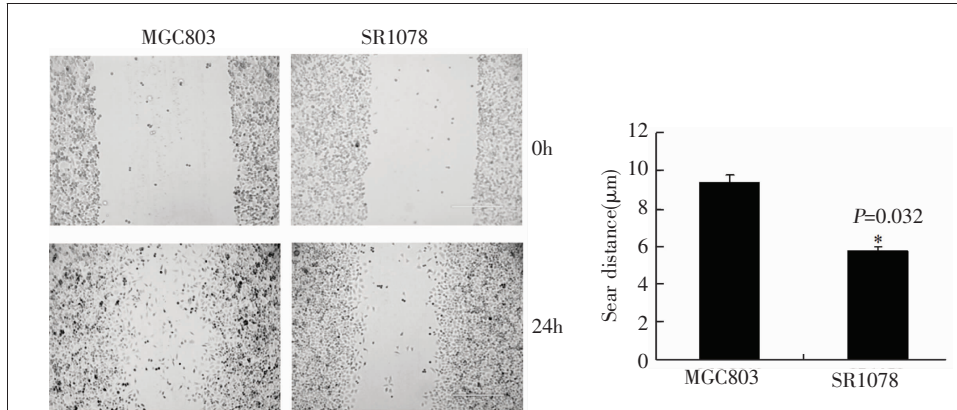


Figure 3 The effect on migration in MGC803 cells by SR1078 detected by scarification experiment

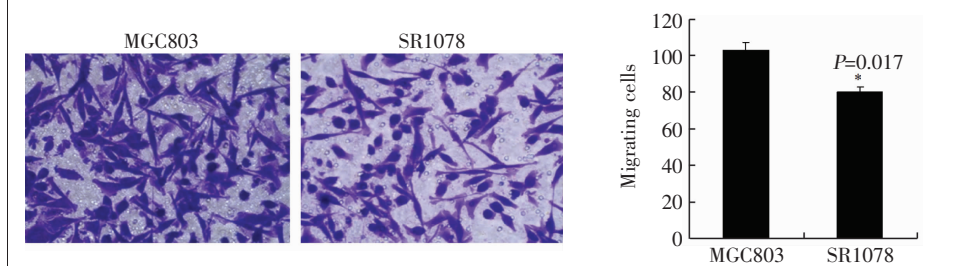


Figure 4 The effect on migration in MGC803 cells by SR1078 detected by migration experiment

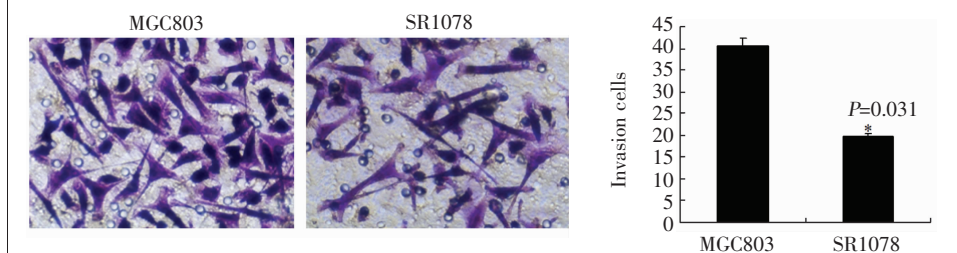


Figure 5 The effect on invasion in MGC803 cells by SR1078 detected by invasion experiment

糖-6-磷酸酶和 FGF21 的表达,确定 SR1078 是合成的 ROR α 激动剂。研究显示,ROR α 在肾局部缺血与再灌注(I/R)后损伤组织中显著下调。ROR α 缺失的不利影响是由于肾小管上皮细胞凋亡,加重肾小管细胞中线粒体功能障碍。然而,SR1078 可改善 I/R 诱导肾功能损伤破坏和减少肾小管上皮细胞凋亡^[13]。SR1078 在 C2C12 肌管中刺激 FGF21 的产生和表达,可呈剂量依赖性的方式明显上调 ER 应激的标

志 C/EBP 同源蛋白 CHOP 表达^[14]。

关于 ROR α 激动剂 SR1078 对肿瘤的作用, Wang 等^[15]采用 SR1078 处理肿瘤细胞显示, SR1078 可稳定 p53 表达与诱导凋亡。SR1078 作用人神经母细胞瘤细胞, 可增加 ROR α 靶基因 A2BP1、CYP19A1、NLGN1 与 IPTR 表达^[16]。此外, SR1078 可减少肝癌细胞需氧糖酵解和抑制生物合成途径, 下调 PDK2 表达和磷酸化, 上调 p21, 抑制肝癌生长与移植瘤形成^[17]。

本课题组前期研究表明, 采用真核表达载体转染技术构建 ROR α 高表达 MGC803 细胞, 发现 ROR α 高表达可通过下调胃癌细胞 Wnt/ β -catenin 通路靶基因表达, 抑制增殖与迁移侵袭^[8-9]。本研究为了寻找治疗胃癌药物, 进一步探讨 ROR α 激动剂 SR1078 对胃癌细胞增殖与迁移侵袭的影响, 结果证明, SR1078 可上调胃癌 MGC803 细胞 ROR α 表达, 呈时间依赖性抑制 MGC803 细胞增殖, 且显著抑制胃癌 MGC803 细胞的增殖和迁移侵袭, 提示 SR1078 可能是一种新颖的治疗胃癌药物, 但 SR1078 的作用机制尚待深入研究。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–132.
- [3] Orditura M, Galizia G, Sforza V, et al. Treatment of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(7): 1635–1649.
- [4] Cook DN, Kang HS, Jetten AM. Retinoic acid-related orphan receptors (RORs): regulatory functions in immunity, development, circadian rhythm, and metabolism [J]. *Nucl Receptor Res*, 2015, pii: 101185.
- [5] Fan J, Lv Z, Yang G, et al. Retinoic acid receptor-related orphan receptors: critical roles in tumorigenesis [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1187.
- [6] Brożyna AA, Józwicki W, Skobowiat C, et al. ROR α and ROR γ expression inversely correlates with human melanoma progression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 63261–63282.
- [7] Du J, Xu R. ROR α , a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 15755–15766.
- [8] Zhao XH, Liu F, Xian SL, et al. Effect of ROR α overexpression on proliferation, migration and invasion of human gastric MGC803 Cells[J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2016, 43(11): 926–932. [赵晓红, 刘芳, 向妹霖, 等. ROR α 高表达对入胃癌 MGC803 细胞增殖与迁移侵袭的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(11): 926–932.]
- [9] Su J, Zhao XH, Liu F, et al. Overexpression of ROR α influence target genes of Wnt/ β -catenin signaling pathway in human gastric MGC803 cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016, 38(11): 1358–1365. [苏坚, 赵晓红, 刘芳, 等. ROR α 高表达抑制人胃癌 MGC803 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路靶基因表达[J]. 中国细胞生物学报, 2016, 38(11): 1358–1365.]
- [10] Zhang S, Zhang J, Deng Z, et al. Circadian clock components ROR α and Bmal1 mediate the anti-proliferative effect of MLN4924 in osteosarcoma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 66087–66099.
- [11] Helleboid S, Haug C, Lamotke K, et al. The identification of naturally occurring neoruscogenin as a bioavailable, potent, and high-affinity agonist of the nuclear receptor ROR α (NR1F1)[J]. *J Biomol Screen*, 2014, 19(3): 399–406.
- [12] Wang Y, Kumar N, Nuhant P, et al. Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ [J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(11): 1029–1034.
- [13] Cai J, Jiao X, Fang Y, et al. The orphan nuclear receptor ROR α is a potential endogenous protector in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *FASEB J*, 2019, 33(4): 5704–5715.
- [14] Hirai T, Nomura K, Ikai R, et al. Baicalein stimulates fibroblast growth factor 21 expression by up-regulating retinoic acid receptor-related orphan receptor α in C2C12 myotubes[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 503–510.
- [15] Wang Y, Solt LA, Kojetin DJ, et al. Regulation of p53 stability and apoptosis by a ROR agonist [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34921.
- [16] Wang Y, Billon C, Walker JK, et al. Therapeutic effect of a synthetic ROR α / γ agonist in an animal model of autism [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2016, 7(2): 143–148.
- [17] Byun JK, Choi YK, Kang YN, et al. Retinoic acid-related orphan receptor alpha reprograms glucose metabolism in glutamine-deficient hepatoma cells[J]. *Hepatology*, 2015, 61(3): 953–964.