

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.18.002

文章编号: 1005-8982(2017)18-0007-08

## 二烯丙基二硫在 ROR $\alpha$ 抑制人胃癌 细胞上皮间质转化中的作用\*

刘芳<sup>1</sup>, 苏坚<sup>2</sup>, 曾颖<sup>1</sup>, 夏红<sup>1</sup>, 苏波<sup>1</sup>, 凌晖<sup>1</sup>, 曾希<sup>1</sup>, 苏琦<sup>1</sup>

[1.南华大学肿瘤研究所(湖南省胃癌研究中心 湖南省高校肿瘤细胞与分子病理学重点实验室),  
湖南 衡阳 421001;2.南华大学附属第二医院 病理科,湖南 衡阳 421001]

**摘要:目的** 探讨二烯丙基二硫(DADS)是否上调维甲酸相关孤核受体  $\alpha$  (ROR $\alpha$ )抑制人胃癌细胞株 MGC803 细胞上皮-间质转化(EMT)。**方法** 相差显微镜观察 MGC803 细胞形态的改变。逆转录 PCR(RT-PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)、免疫荧光与免疫组织化学检测 EMT 的相关分子表达。裸鼠实验检测 DADS 与沉默 ROR $\alpha$  对移植瘤生长的影响。**结果** 相差显微镜显示,沉默 ROR $\alpha$  细胞较 MGC803 细胞大小与形状差异更明显。DADS 作用后,细胞大小较一致,呈圆形或椭圆形,梭形细胞减少,异型性下降。RT-PCR 与 Western blot 显示,DADS 处理后较处理前各组 ROR $\alpha$  mRNA 与蛋白表达上调( $P < 0.05$ )。DADS 作用对照组与空载体组较沉默组效果更为明显 ( $P < 0.05$ )。ROR $\alpha$  沉默较对照组和空载体组细胞锌指转录因子(Snail)和波形蛋白(Vimentin) mRNA 与蛋白表达上调,而 E-钙黏蛋白(E-cadherin) mRNA 与蛋白下调( $P < 0.05$ )。DADS 处理后,各组 Snail 蛋白下调、Vimentin mRNA 与蛋白下调和 E-cadherin mRNA 与蛋白上调( $P < 0.05$ )。免疫荧光显示,沉默组细胞 Snail 与 Vimentin 阳性表达较对照组增强,而 E-cadherin 阳性表达减弱。DADS 作用后,结果相反。裸鼠移植瘤实验显示,ROR $\alpha$  沉默组移植瘤较对照组生长加快和体重增加( $P < 0.05$ ),增殖细胞核抗原(Ki-67)、Snail、CD34 及 Vimentin 阳性表达较对照组增加,而 E-cadherin 阳性降低。DADS 处理各组移植瘤生长与体积减慢与减小,Ki-67、Snail、CD34 与 Vimentin 阳性表达较对照组减弱,而 E-cadherin 阳性表达增强。**结论** DADS 通过上调 ROR $\alpha$  可体内外抑制人胃癌 MGC803 细胞 EMT。

**关键词:** 二烯丙基二硫;维甲酸相关孤核受体  $\alpha$ ;人胃癌 MGC803 细胞;上皮-间质转化

**中图分类号:** R735.2

**文献标识码:** A

## Up-regulation of ROR $\alpha$ inhibits EMT in human gastric MGC803 cells induced by diallyl disulfide\*

Fang Liu<sup>1</sup>, Jian Su<sup>2</sup>, Ying Zeng<sup>1</sup>, Hong Xia<sup>1</sup>, Bo Su<sup>1</sup>, Hui Ling<sup>1</sup>, Xi Zeng<sup>1</sup>, Qi Su<sup>1</sup>

[1. Cancer Institute of University of South China (Center for Gastric Cancer Research of Hunan Province/Key Laboratory of Cancer Cellular and Molecular Pathology of Hunan Provincial University), Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China]

**Abstract: Objective** To investigate whether diallyl disulfide (DADS) inhibits epithelial mesenchymal transition (EMT) in human gastric cancer MGC803 cells by up-regulation of retinoid acid receptor related orphan receptor  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ). **Methods** The morphological effect of MGC803 cells was observed by phase contrast microscope. The expressions of molecules correlated to EMT were detected by RT-PCR, Western blot, immunofluorescence and immunohistochemistry. The influence of DADS and silencing ROR $\alpha$  on the growth of xenograft tumor in athymic mice was observed. **Results** Phase contrast microscopy showed that MGC803 cells

收稿日期:2016-12-15

\*基金项目:国家自然科学基金(No:81374013);湖南省卫计委资助项目(No:B2015-182);湖南省教育厅资助项目(No:17K081)

[通信作者] 苏琦.E-mail:suqi1945@163.com;Tel:0734-8281547

of ROR $\alpha$  silence were discordancy in size and shape and the number of spindle cells increased. Besides, the MGC803 cells treated by DADS were found with characteristics such as size unification, round or ellipse shape, decreased spindle cells and less atypia. RT-PCR and Western blot revealed up-regulation of ROR $\alpha$  mRNA and protein in each group treated by DADS ( $P < 0.05$ ). Moreover, the effect in control group and the vector group increased compared to the ROR $\alpha$  silence group treated by DADS ( $P < 0.05$ ). RT-PCR and Western blot showed the up-regulation of Snail protein and Vimentin mRNA and protein, and down-regulation of E-cadherin mRNA and protein in the ROR $\alpha$  silence cells ( $P < 0.05$ ). However, in the MGC803 cells treated by DADS Snail and Vimentin were down-regulated and E-cadherin was up-regulated ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence showed that the positive expressions of Snail and Vimentin in the ROR $\alpha$  silence cells were strengthened, but E-cadherin was attenuated. Nevertheless, the positive expressions of Snail and Vimentin were attenuated, and E-cadherin was strengthened in the MGC803 cells treated by DADS. The growth of the xenograft tumor was accelerated, and the weight of the transplantation tumor increased in the ROR $\alpha$  silence group compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The positive expressions of Ki-67, Snail, CD34 and Vimentin were obviously increased, while the positive rate of E-cadherin also increased in the ROR $\alpha$  silence group. Inversely, the rate of the xenograft tumor growth slowed down and the volume of tumor was significantly diminished. The expressions of Ki-67, Snail, CD34 and Vimentin decreased and the positive expression of E-cadherin increased in the MGC803 cells treated by DADS. **Conclusions** DADS can inhibit EMT in MGC803 cells *in vivo* and *in vitro* through up-regulation of ROR $\alpha$ .

**Keywords:** diallyl disulfide; ROR $\alpha$ ; human gastric cancer MGC803 cell; EMT

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,发生率为死亡率居第 2 位。由于患者就诊时大多已发生侵袭转移,疗效不佳,5 年生存率  $< 10\%$ <sup>[1-2]</sup>。因此,筛选有效药物和寻找治疗靶点对防治胃癌具有重要的意义。二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)是大蒜中的一种脂溶性的有效成分,对多种肿瘤均有抑制作用,是一种具有开发潜力的抗肿瘤药物<sup>[3]</sup>。笔者发现, DADS 处理人胃癌 MGC803 细胞后,维甲酸相关孤儿核受体  $\alpha$  (retinoid acid receptor related orphan receptor  $\alpha$ , ROR $\alpha$ ) 蛋白上调<sup>[4]</sup>。目前认为, ROR $\alpha$  是候选抑癌基因,在肿瘤表达下调,与肿瘤的发生密切相关,可能是肿瘤治疗的靶点<sup>[5-6]</sup>。ROR $\alpha$  在胃癌中低表达,与胃癌发生和分化程度有关<sup>[7]</sup>。本研究进一步探讨 DADS 上调 ROR $\alpha$  表达对胃癌细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)的影响及其相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人胃癌 MGC803 细胞由本实验室保存, ROR $\alpha$  沉默 MGC803 细胞由本实验室构建<sup>[8]</sup>,置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱内传代培养。取对数生长期的细胞用于实验。

### 1.2 主要试剂

DADS(购自美国 Fluka 公司), RNA 提取试剂盒

(购自美国 Omega 公司), 逆转录试剂盒与二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(购自美国 Promega 公司), E-cadherin、Vimentin 与  $\beta$ -actin 抗体(购自英国 Abcam 公司), Snail、Ki-67 与 CD34 等抗体及增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(购自美国 Santa Cruz 公司), 胎牛血清(购自浙江省杭州四季青生物工程公司), 引物经 Primer Premier 5.0 软件设计, 由上海生物工程(股份)有限公司合成。羊抗兔 IgG-HR 和羊抗小鼠 IgG-HRP(购自江苏省南京凯基生物科技发展有限公司), 羊抗小鼠 IgG(H+L)(购自美国 Protech 生物公司), 荧光染料 DAPI 和正常山羊血清(购自湖北省博士德生物公司), Max Vision™ 试剂盒(购自福建省福州迈新生物技术开发公司)。

### 1.3 相差显微镜观察

人胃癌 MGC803 细胞与 ROR $\alpha$  沉默 MGC803 细胞培养 24 h 后, 倒置相差显微镜观察 DADS 处理前后细胞形态学变化。

### 1.4 逆转录 PCR (RT-PCR) 分析

总 RNA 提取试剂盒(Total RNA Kit)提取细胞总 RNA, AMV 逆转录酶作用下逆转录合成 cDNA。设计并合成 PCR 引物序列。ROR $\alpha$  正向引物: 5'-GTCAGCAGCTTCTACCTGGAC-3'; 反向引物: 5'-CAGTTGGGGAAGTCTCGCCG-3', 产物长度 151 bp。Vimentin 正向引物: 5'-ACACCCTGCAATCTTTCAGACA-3'; 反向引物: 5'-AGAAATCCTGCTCTCCTCGCCT-

3',产物长度 635 bp。E-cadherin 正向引物:5'-CTC CCAATACATCTCCCTTCAC-3';反向引物:5'-CGCC TCCTTCTTCATCATAGTAA-3',产物长度 423 bp。 $\beta$ -actin 正向引物:5'-TCTACAATGAGCTGCGTGTG G-3';反向引物:5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-3',产物长度 498 bp。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,(ROR $\alpha$ 、Vimentin 和 E-cadherin 退火温度分别为:53℃、52℃和 54℃)45 s 退火,72℃延伸 80 s,28 个循环,72℃继续延伸 10 min。5  $\mu$ l 的 PCR 产物经 1%的琼脂糖电泳,溴化乙啶染色,IS1000 图像分析软件读取灰度值,相对值以目的基因与  $\beta$ -actin 灰度值之比表示。

### 1.5 Western blot 检测

收集细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,每组取等量样本进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶电泳,电泳后转膜,封闭 1 h,加一抗,4℃过夜,三羟甲基氨基甲烷缓冲液冲洗膜,加二抗孵育 1 h,洗膜,ECL 发光,X 片曝光、显影、定影。

### 1.6 细胞免疫荧光实验

先在 6 孔板中滴加培养基,然后将消毒的盖玻片放入 6 孔板。将对数期的 MGC803 细胞制成悬液,每孔接种  $5 \times 10^5$  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 5 min  $\times$  3,4%多聚甲醛固定细胞,常温下静置 15 min,PBS 洗 5 min  $\times$  3;将 0.5% Triton 覆盖细胞后,常温下静置 30 min,后用 PBS 洗 5 min  $\times$  3,吸干净残存 PBS 液;山羊血清封闭,37℃孵育 1 h;滤纸吸净封闭液,加入一抗,湿盒内 4℃孵育过夜;第 2 天移置 37℃复温 1 h,PBS 洗 5 min  $\times$  3 次;在暗室中加异硫氰酸荧光素的二抗,37℃避光湿盒中孵育 1 h,PBS 洗 5 min  $\times$  3。染核:将 0.4  $\mu$ g/ $\mu$ l 的 DAPI 覆盖细胞,常温下避光静置 2~5 min,PBS 洗 5 min  $\times$  3,甘油封片在荧光显微镜下观察。

### 1.7 裸鼠成瘤实验

裸鼠(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),4 周龄,雄性,分为 MGC803 细胞组(对照组)、(MGC803+DADS)组、ROR $\alpha$  沉默组和(ROR $\alpha$  沉默+DADS)组,每组 5 只。将各组处于对数生长期的细胞密度调至  $1 \times 10^7$  个/ml,分别取 0.2 ml 细胞悬液接种于裸鼠腋下。观察接种后裸鼠进食、饮水、毛发、精神及活动等情况。每隔 7 d 测量移植瘤大小(长径和短径),肿瘤体积: $V=a \times b^2/2$ 。移植瘤组织固定

于 10%的中性甲醛。

### 1.8 免疫组织化学法检测

采用 Max Vision™ 法,分别滴加一抗室温 60 min,4℃过夜,PBS 洗 3 min  $\times$  3,滴加即用型 Max Vision™ 试剂,室温下 15 min,PBS 洗 5 min  $\times$  3。二氨基联苯胺显色,自来水冲洗,苏木素复染,脱水、透明、封固及镜检。

### 1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均值比较用重复测量设计的方差分析或单因素方差分析,两两比较用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

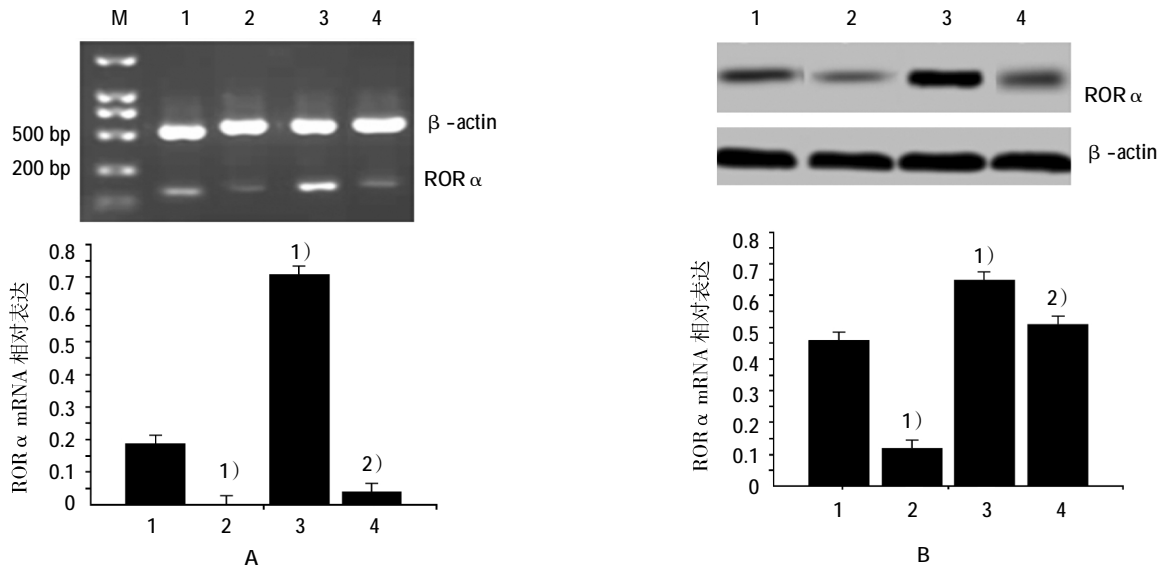
### 2.1 DADS 与沉默 ROR $\alpha$ 对 MGC803 细胞 ROR $\alpha$ 表达的影响

RT-PCR 与 Western blot 显示,ROR $\alpha$  沉默组较对照组 MGC803 细胞 ROR $\alpha$  mRNA( $F=1\ 885.149$ , $P=0.000$ )与蛋白表达下调( $F=190.822$ , $P=0.000$ )。DADS 处理后较处理前各组 ROR $\alpha$  mRNA( $F=1\ 885.149$ , $P=0.000$ )与蛋白表达上调( $F=190.822$ , $P=0.000$ )。见图 1。

### 2.2 DADS 与沉默 ROR $\alpha$ 对 MGC803 细胞形态与 EMT 相关分子的影响

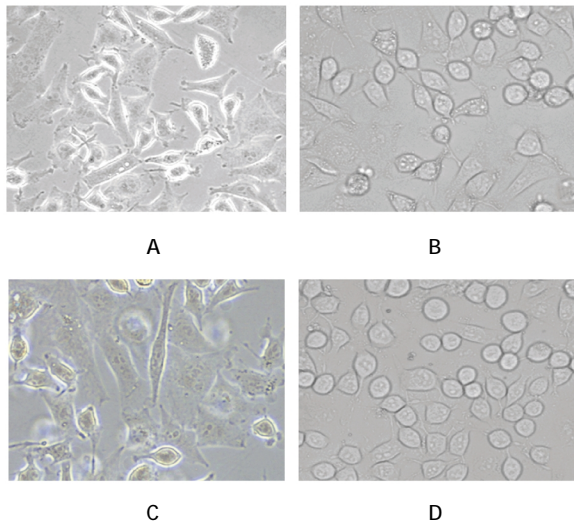
相差显微镜显示,MGC803 细胞大小不一,大部分呈长梭形,纤维母细胞样,细胞膜可见突起,核浆比值增大,异型性明显。ROR $\alpha$  沉默细胞较 MGC803 细胞大小与形状差异更明显,纤维母细胞样梭形细胞增多,异型性更为明显。DADS 作用后,对照组与沉默组较处理前细胞大小一致,大部分呈圆形或椭圆形,核浆比值下降,异型性降低(见图 2)。表明 DADS 可上调 ROR $\alpha$  抑制 MGC803 细胞向间质细胞转化。

RT-PCR 与 Western blot 显示,ROR $\alpha$  沉默 MGC803 细胞较对照组的 Snail 蛋白表达上调( $F=545.652$ , $P=0.000$ )。并且沉默 ROR $\alpha$  可上调 Vimentin 和下调 E-cadherin mRNA( $F=1\ 250.268$  和  $67.561$ , $P=0.000$  和  $0.016$ )与蛋白表达( $F=155.246$  和  $35.624$ , $P=0.000$ )。DADS 处理后,各组 Snail 蛋白( $F=545.652$ , $P=0.000$ )、Vimentin mRNA( $F=1\ 250.268$ , $P=0.000$ )与蛋白明显下调( $F=155.246$ , $P=0.000$ )和 E-cadherin mRNA( $F=67.561$ , $P=0.000$ )与蛋白上调( $F=35.624$ , $P=0.000$ )。表明 DADS 通过上调 ROR $\alpha$  下调 Snail



A: RORα mRNA 表达; B: RORα 蛋白质表达。1: MGC803 组; 2: miR-RORα 组; 3: MGC803+DADS 组; 4: miR-RORα +DADS 组。1) 与 MGC803 比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 miR-RORα 比较,  $P < 0.05$

图 1 DADS 与沉默 RORα 对 RORα 表达的影响



A: MGC803 组; B: MGC803+DADS 组; C: miR-RORα 组; D: miR-RORα +DADS 组

图 2 DADS 与沉默 RORα 对 MGC803 细胞形态的影响 (×40)

与 Vimentin 和上调 E-cadherin 抑制 MGC803 细胞 EMT。见图 3~5。

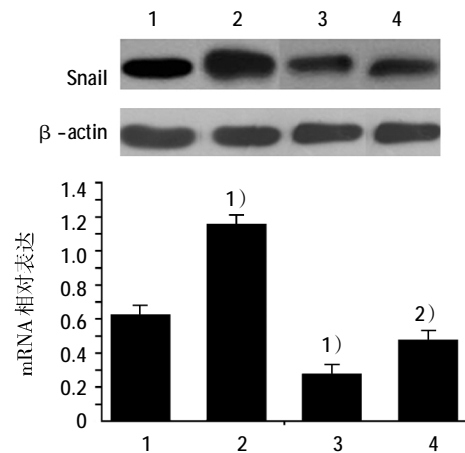
### 2.3 DADS 与沉默 RORα 对 EMT 相关蛋白表达的影响

免疫荧光检测显示, Snail 蛋白定位胞核, Vimentin 与 E-cadherin 蛋白主要定位胞浆。RORα 沉默组细胞 Snail 与 Vimentin 阳性信号较对照组增强, 而 E-cadherin 阳性信号减弱, 然而, DADS 作用后, Snail 与 Vimentin 阳性信号较对照组降低, 而 E-

cadherin 阳性升高, 与 Western blot 检测结果一致。见图 6。

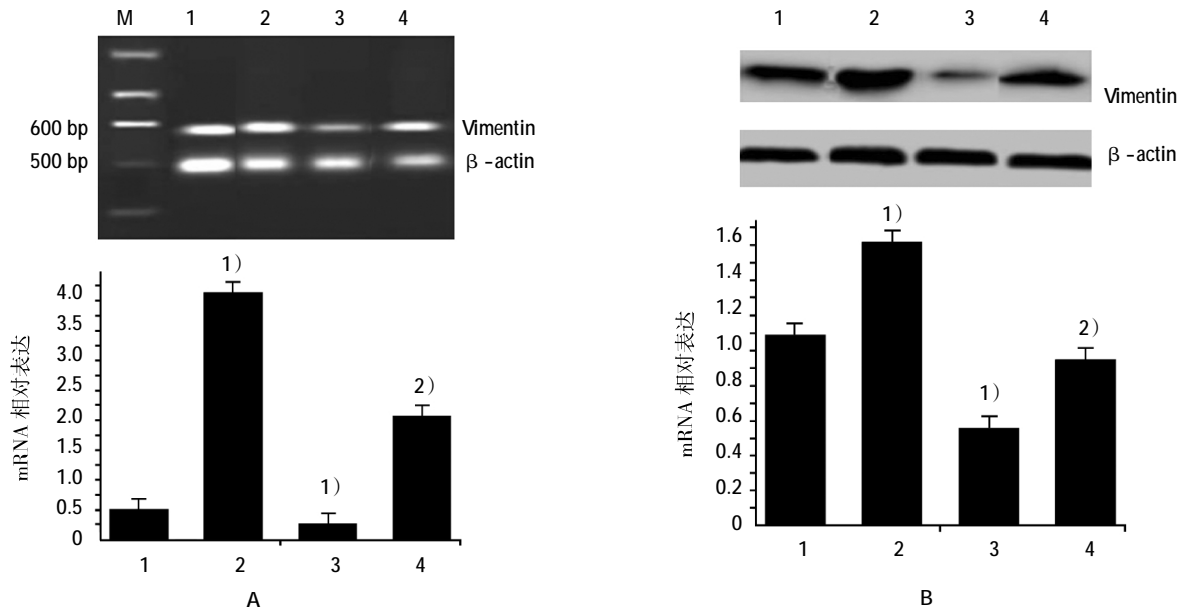
### 2.4 DADS 与沉默 RORα 对 MGC803 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

采用重复测量设计的方差分析, 结果显示: ①各组组内裸鼠移植瘤体积随着时间延长, 肿瘤体积变大, 差异有统计学意义 ( $F=69.921, P=0.000$ )。②各组与对照组比较生长变慢瘤体变小, 差异有统计学意义 ( $F=90.148, P=0.000$ ), miR-RORα 与对照组比较生长加快瘤体变大, 差异有统计学意义 ( $F=72.324,$



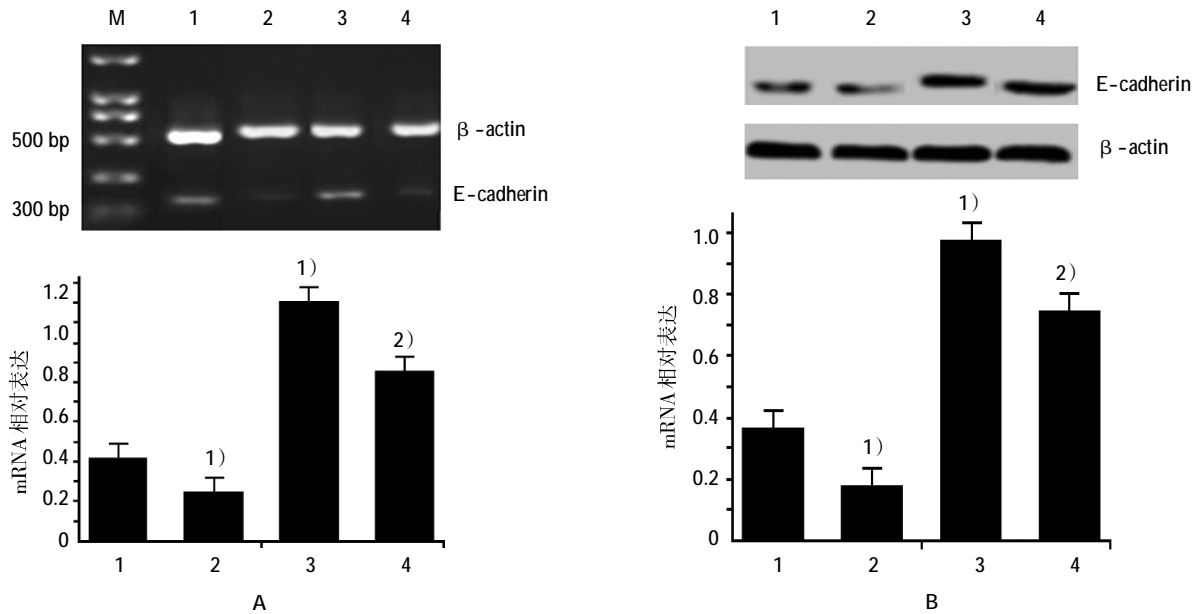
1: MGC803 组; 2: miR-RORα 组; 3: MGC803+DADS 组; 4: miR-RORα +DADS 组。1) 与 MGC803 比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与 miR-RORα 比较,  $P < 0.05$

图 3 DADS 与沉默 RORα 对 MGC803 细胞 Snail 蛋白表达的影响



A:Vimentin mRNA 表达;B:Vimentin 蛋白质表达。1:MGC803 组;2:miR-ROR $\alpha$  组;3:MGC803+DADS 组;4:miR-ROR $\alpha$  +DADS 组。1)与 MGC803 比较, $P < 0.05$ ;2)与 miR-ROR $\alpha$  比较, $P < 0.05$

图 4 DADS 与沉默 ROR $\alpha$  对 MGC803 细胞 Vimentin 表达的影响



A:E-cadherin mRNA 表达;B:E-cadherin 蛋白质表达。1:MGC803 组;2: miR-ROR $\alpha$  组;3:MGC803+DADS 组;4:miR-ROR $\alpha$  +DADS 组。1)与 MGC803 比较, $P < 0.05$ ;2)与 miR-ROR $\alpha$  比较, $P < 0.05$

图 5 DADS 与沉默 ROR $\alpha$  对 MGC803 细胞 E-cadherin 表达的影响

$P=0.000$ ),而(miR-ROR $\alpha$  +DADS)组与 miR-ROR $\alpha$  组比较生长又变慢,瘤体变小,差异有统计学意义( $F=86.356, P=0.000$ );③(MGC803+DADS)组和 miR-ROR $\alpha$  组分别与对照组肿瘤体积变化趋势比较,差异有统计学意义( $F=109.278$  和  $122.437$ ,均  $P=0.000$ ),而(miR-ROR $\alpha$  +DADS)组与 miR-ROR $\alpha$  组肿瘤体积变化趋势比较,差异有统计学意义( $F=78.905, P=$

$0.000$ )。见附表。

### 2.5 DADS 与沉默 ROR $\alpha$ 对裸鼠移植瘤组织 EMT 相关蛋白表达的影响

免疫组织化学显示,ROR $\alpha$  沉默组较 MGC803 细胞对照组的 Ki-67、Snail 及 Vimentin 阳性表达均增强,E-cadherin 阳性表达减弱。但是 MGC803+DADS 组与(ROR $\alpha$  沉默组 +DADS 组)结果相反,Ki-67、

附表 各组移植瘤不同时间平均体积 ( $n=5, \text{cm}^3, \bar{x} \pm s$ )

组别	7 d	21 d	35 d	42 d	56 d	70 d
MGC803	$0.401 \pm 0.14$	$1.206 \pm 0.28$	$2.832 \pm 0.44$	$3.761 \pm 0.49$	$6.656 \pm 0.46$	$10.544 \pm 0.59$
MGC803+DADS	$0.327 \pm 0.19$	$0.831 \pm 0.24$	$2.367 \pm 0.42$	$3.061 \pm 0.48$	$5.367 \pm 0.47$	$7.835 \pm 0.58^{1)}$
miR-ROR $\alpha$	$0.555 \pm 0.18$	$1.821 \pm 0.24$	$3.795 \pm 0.37$	$5.734 \pm 0.47$	$9.787 \pm 0.62$	$15.661 \pm 0.67^{1)}$
miR-ROR $\alpha$ +DADS	$0.504 \pm 0.16$	$1.385 \pm 0.21$	$3.211 \pm 0.33$	$4.011 \pm 0.25$	$8.324 \pm 0.58$	$13.003 \pm 0.69^{2)}$

注:1)与 MGC803 比较,  $P < 0.05$ ; 2)与 miR-ROR $\alpha$  比较,  $P < 0.05$

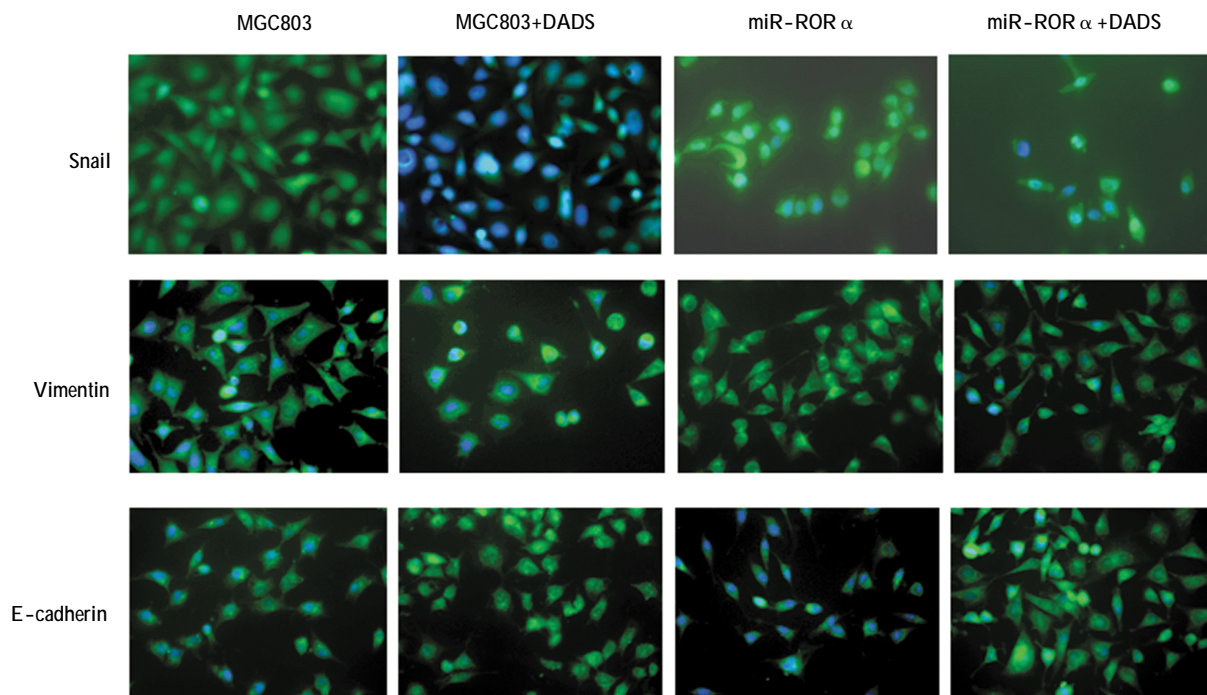
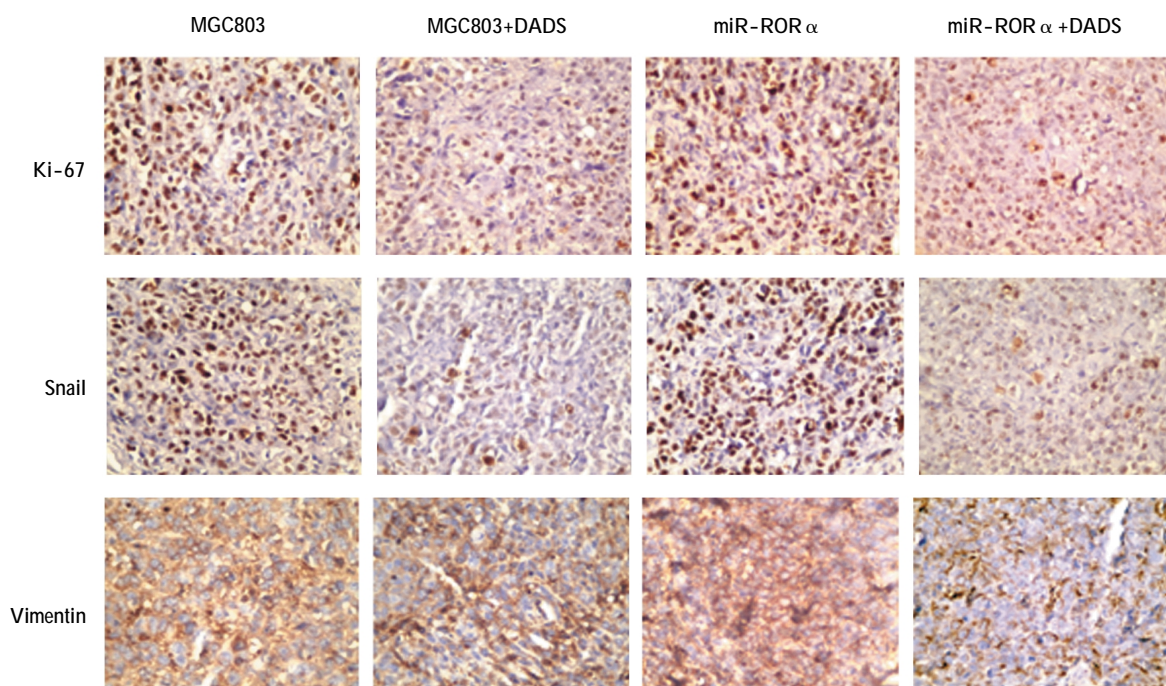


图 6 DADS 与沉默 ROR $\alpha$  对 EMT 相关蛋白表达的影响 ( $\times 40$ )



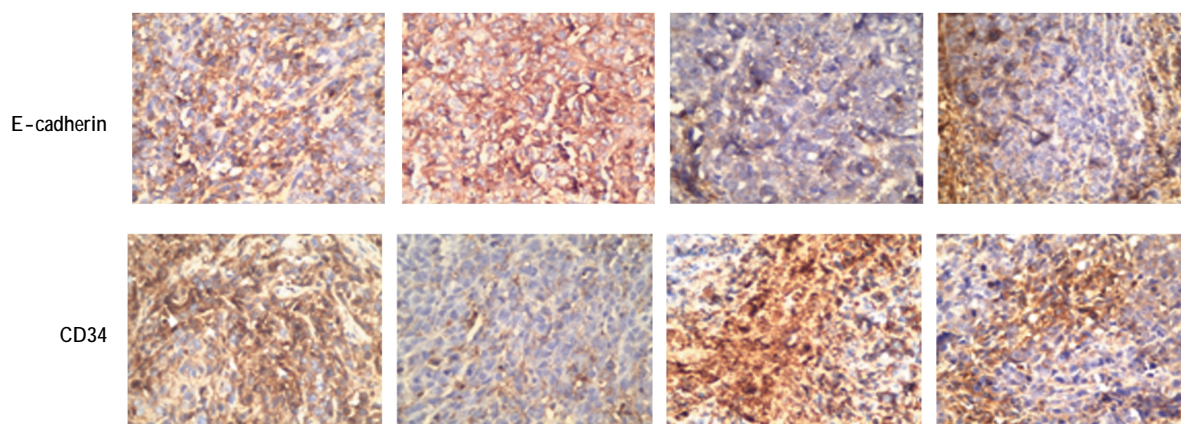


图 7 DADS 与 ROR $\alpha$  沉默对移植瘤 EMT 相关蛋白表达影响 (SP $\times$ 40)

Snail 及 Vimentin 阳性表达均减弱, E-cadherin 阳性增强。见图 7。

### 3 讨论

众所周知, 肿瘤细胞迁移和侵袭是肿瘤转移起始的重要步骤, 而上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的关键。上皮源性肿瘤细胞发生 EMT, 除形态学改变外, 还具有较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型, 如上皮标志物 E-cadherin、紧密连接蛋白(ZO-1)等表达下调, 间质标志物 vimentin、 $\alpha$ -SMA 及 N-cadherin 等上调以及 Snail、Slug 和 Twist 等转录因子活性增强。因此, 阻止 EMT 发生已成为抑制恶性肿瘤转移的治疗策略<sup>[9-11]</sup>。ZHAN 等<sup>[12]</sup>研究显示, 泛素样蛋白(NEDD8)活化酶抑制因子 MLN4924 可上调 ROR $\alpha$ , 抑制骨肉瘤细胞增殖, 阻滞细胞周期与诱导凋亡。近年来, 研究天然植物来源的抗肿瘤药物抑制肿瘤 EMT 已成为研究热点。有人发现, 姜黄通过 Wnt 信号通路下调  $\beta$ -catenin, TCF4 与 vimentin 和上调 E-cadherin 抑制 EMT<sup>[13]</sup>。川陈皮素可对抗 TGF- $\beta$ <sub>1</sub>/Smad3 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞 EMT<sup>[14]</sup>。

笔者前期研究证明, DADS 可抑制 MGC803 细胞的增殖, 增加细胞骨架蛋白合成, 恢复细胞缝隙连接通讯功能, 上调组蛋白乙酰化与细胞周期调控因子(p21WAF1), 激活 p38、抑制细胞外信号调节激酶(ERK)通路, 调节 ATR/Chk1/Cdc25C/Cyclin  $\beta$ <sub>1</sub>, 阻滞 G<sub>2</sub>/M<sup>[15-19]</sup>。笔者采用蛋白质组学技术鉴定 DADS 处理人胃癌细胞的差异蛋白质中, 发现 LIMK1 下调和 ROR $\alpha$  表达上调<sup>[6]</sup>。并证实 DADS 通过 Rac1-Pak1/Rock1 通路下调单丝氨酸蛋白激酶 1(LIMK1)、基质

金属蛋白酶 9(MMP-9)和上调基质金属蛋白酶抑制剂 3(TIMP-3), 抑制人胃癌细胞 EMT 与侵袭<sup>[20]</sup>。研究表明, ROR $\alpha$  在胃癌、结肠癌、食管癌、胰腺癌、肝癌、乳腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、头颈部癌及白血病等多种肿瘤中表达下调, 上调 ROR $\alpha$  可体内外抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭等恶性表型, 提示 ROR $\alpha$  可能是肿瘤治疗靶点<sup>[6]</sup>。ROR $\alpha$  在乳腺癌组织与细胞中表达下调, 恢复 ROR $\alpha$  表达可抑制乳腺癌细胞侵袭能力与裸鼠移植瘤生长, 表明 ROR $\alpha$  是潜在的抑癌基因<sup>[21]</sup>。LEE 等报告, ROR $\alpha$  通过 Wnt5a 与蛋白激酶 C (PKC) 依赖方式负调控 Wnt 通路, 抑制其靶基因表达<sup>[22]</sup>。笔者证明, DADS 可阻断 Wnt 通路上调 miR-200b 和 miR-22, 抑制胃癌细胞增殖与侵袭和诱导凋亡<sup>[23]</sup>。但是, DADS 是否上调 ROR $\alpha$  抑制胃癌细胞 EMT, 尚不清楚。

本研究 RT-PCR 与 Western blot 显示, DADS 处理后, 各组 ROR $\alpha$  mRNA 与蛋白上调, 且对照组与空载体组较沉默组效果更为显著。相差显微镜显示, ROR $\alpha$  沉默组较 MGC803 细胞大小与形状差异更明显, 纤维母细胞样梭形细胞增多, 异型性更为显著。DADS 处理对照组与沉默组较处理前细胞大小一致, 大部分呈圆形或椭圆形, 异型性降低, 表明 DADS 可上调 ROR $\alpha$  抑制 MGC803 细胞向间质细胞转化。基于 Snail、E-cadherin 与 Vimentin 是肿瘤 EMT 的关键因子<sup>[11, 24]</sup>, Ki-67 是肿瘤增殖能力的重要指标<sup>[25]</sup>, CD34 是血管形成的标志<sup>[26]</sup>。本研究进一步检测表明, ROR $\alpha$  沉默较对照组与空载体组的 Snail 与 Vimentin 上调和 E-cadherin 下调。DADS 处理后, 各组 Snail 与 Vimentin 下调和 E-cadherin 上调。且 DADS 作用对照组与空载体组较沉默组效果更为明

显。免疫荧光结果与 Western blot 检测结果一致。裸鼠实验显示,沉默组移植瘤较对照组生长增快,体重明显增加,Ki-67、Snail、CD34 与 Vimentin 阳性表达均增高,E-cadherin 阳性减弱。而 DADS 作用对照组与 ROR $\alpha$  沉默组后,移植瘤体重低于处理前,Ki-67、Snail、Vimentin 阳性均减弱,E-cadherin 阳性增强。上述结果表明,DADS 可上调 ROR $\alpha$  通过下调 Snail 与 Vimentin 和上调 E-cadherin 体内外抑制 MGC803 细胞 EMT。

#### 参 考 文 献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] HAREWOOD G C. Treatment of gastric cancer[J]. *New England Journal of Medicine*, 2006, 355(13): 1386.
- [3] YI L, SU Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide[J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2013, 57(7): 362-370.
- [4] SU B, SU J, HE H, et al. Identification of potential targets for diallyl disulfide in human gastric cancer MGC-803 cells using proteomics approaches[J]. *Oncology Reports*, 2015, 3(5): 2484-2494.
- [5] 赵晓红,苏琦. 维甲酸相关核受体  $\alpha$  与 Wnt 信号途径及肿瘤的关系[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2011, 31(3): 234-237.
- [6] DU J, XU R. ROR $\alpha$ , a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12): 15755-15766.
- [7] 石莺,黄建军,苏坚,等. ROR $\alpha$  蛋白在胃癌中的表达及临床病理意义[J]. *实验与病理学杂志*, 2012, 28(3): 270-273.
- [8] 凌晖,陈真伟,曾铁兵,等. ROR $\alpha$  miRNA 真核表达载体构建及对胃癌细胞增殖的影响[J]. *中国现代医药杂志*, 2011, 13(2): 1-4.
- [9] 朱理辉,罗勇,廖文秋,等. MicroRNA-219-5p 靶向 E-钙黏蛋白调控上皮间质转化抑制肝癌细胞侵袭转移[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(18): 22-29.
- [10] MENG F, WU G. The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis[J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2012, 31(3): 455-467.
- [11] ABOUHASHEM N S, IBRAHIM D A, MOHAMED A M. Prognostic implications of epithelial to mesenchymal transition related proteins (E-cadherin, Snail) and hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  in endometrioid endometrial carcinoma [J]. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2016(22): 1-11.
- [12] ZHANG S, ZHANG J, DENG Z, et al. Circadian clock components ROR $\alpha$  and Bmal1 mediate the anti-proliferative effect of MLN4924 in osteosarcoma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 66087-66099.
- [13] ZHANG Z, CHEN H, XU C, et al. Curcumin inhibits tumor epithelial mesenchymal transition by downregulating the Wnt signaling pathway and upregulating NKD2 expression in colon cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(5): 2615-2623.
- [14] DA C, LIU Y, ZHAN Y, et al. Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway[J]. *Oncology Reports*, 2016, 35(5): 2767-2774.
- [15] YUAN J P, ZHANG M X, LING H, et al. Diallyl disulfide-induced G<sub>2</sub>/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(18): 2731-2374.
- [16] LING H, ZHANG L Y, SU Q, et al. Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803[J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2006, 11(3): 408-423.
- [17] SU B, XIANG S L, SU J, et al. Diallyl disulfide increased histone acetylation and p21WAF1 expression in human gastric cancer cells in vivo and in vitro[J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 1(7): 1-10.
- [18] LING H, WEN L, JI X X, et al. Growth inhibitory effect and Chk1-dependent signaling involved in G<sub>2</sub>/M arrest on human gastric cancer cells induced by diallyl disulfide[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43(3): 271-278.
- [19] LING H, LU L F, HE J, et al. Diallyl disulfide selectively causes checkpoint kinase-1 mediated G<sub>2</sub>/M arrest in human MGC803 gastric cancer cell line[J]. *Oncology Reports*, 2014, 32(5): 2274-2282.
- [20] SU B, SU J, ZENG Y, et al. Diallyl disulfide suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion and proliferation by downregulation of LIMK1 in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10498-10512.
- [21] XIONG G, WANG C, EVERS B M, et al. ROR $\alpha$  suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(7): 1728-1739.
- [22] LEE J M, KIM I S, KIM H, et al. ROR alpha attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKCalpha-dependent phosphorylation in colon cancer[J]. *Molecular Cell*, 2010, 37(2): 183-195.
- [23] TANG H, KONG Y, GUO J, et al. Diallyl disulfide suppresses proliferation and induces apoptosis in human gastric cancer through Wnt-1 signaling pathway by up-regulation of miR-200b and miR-22[J]. *Cancer Letters*, 2013, 340(1): 72-81.
- [24] LAZAROVA D L, BORDONARO M. Vimentin, colon cancer progression and resistance to butyrate and other HDACis [J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2016, 20(6): 989-993.
- [25] LEE W S, PARK Y L, KIM N, et al. Myeloid cell leukemia-1 regulates the cell growth and predicts prognosis in gastric cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2015, 46(5): 2154-2162.
- [26] LEE O, CHOI M R, CHRISTOV K, et al. Progesterone receptor antagonism inhibits progesterone-related carcinogenesis and suppresses tumor cell proliferation[J]. *Cancer Letters*, 2016, 376(2): 310-317.