VD通过VDR下调β-catenin磷酸化水平抑制 胃癌细胞增殖

胡倩1 杜超2 董辉2 张秉强1*

(「重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆400016; 2陆军军医大学第二临床医学院消化内科,重庆400037)

摘要 为探讨维生素D(vitamin D, VD)及维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)对胃癌细胞增殖的作用及分子机制,该研究首先通过免疫荧光实验观察胃癌细胞SGC-7901和MKN-45中 VDR的表达水平,进一步利用shRNA干扰慢病毒转染两种胃癌细胞,嘌呤霉素筛选建立shVDR稳 定株,应用CCK8及细胞集落形成实验,流式细胞学实验,Western blot实验检测VD/VDR在两种胃 癌细胞恶性表型增殖及细胞周期中的作用;最后再次应用Western blot实验检测VD/VDR在两种胃 细胞中β-catenin磷酸化表达水平的影响。结果表明两种胃癌细胞均表达VDR;在配体骨化三醇 (1α,25(OH)₂D₃)存在的情况下,胃癌细胞的增殖和集落形成受到明显抑制,同时抑制β-catenin的磷酸 化水平,但对细胞周期分布及细胞周期蛋白Cyclin D1无明显作用。下调VDR的表达水平后,VD对 β-catenin磷酸化表达水平无明显影响。证实VDR通过下调β-catenin的磷酸化水平,发挥抑制胃癌细 胞增殖的作用。

关键词 维生素D受体;维生素D; β-catenin; 胃癌细胞; 集落形成; shRNA

Vitamin D Inhibits The Proliferation of Gastric Cancer Cells via Down-Regulating the Expression of β-catenin Phosphorylation by VDR

Hu Qian¹, Du Chao², Dong Hui², Zhang Bingqiang^{1*}

(¹Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; ²Department of Gastroenterology, The Second Clinical Medical College of Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract To investigate the effect and molecular mechanism of vitamin D (VD) and vitamin D receptor (VDR) on the proliferation of gastric cancer cells, the first step is that we observed the expression of VDR in SGC-7901 and MKN-45 gastric cancer cells by immunofluorescence (IF) assay. Furthermore, VDR-shRNA stable cell lines of SGC-7901 and MKN-45 cells were selected by puromycin under using shRNA interfere with lentivirus and transfecting the gastric cancer cells. The effects of VD/VDR on the proliferation and cell cycle of two kinds of gastric cancer cells were detected by CCK-8 (Cell Counting Kit-8) assay, colony formation assay, flow cytometry and Western blot. Eventually, the effects of VD/VDR on the expression of β -catenin phosphorylation (p- β -catenin) of gastric cancer cells were tested by Western blot. The results showed that VDR was expressed in both MKN-45 and SGC-7901 cells. The proliferation and colony formation of gastric cancer cells were significantly inhibited, while the expression of p- β -catenin was inhibited in the presence of

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81702931)

收稿日期: 2019-01-25 接受日期: 2019-04-24

国家自然科学基金(批准号: 81702931)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 13114082507, E-mail: Zhbingqiang@163.com

Received: January 25, 2019 Accepted: April 24, 2019

^{*}Corresponding author. Tel: +86-13114082507, E-mail: Zhbingqiang@163.com

网络出版时间: 2019-08-12 15:00:08 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1459.014.html

Osteotriol(1α ,25(OH)₂D₃),but there were no significant effects on cell cycle distribution and the expression of cyclin D1. After down-regulation the expression of VDR, VD had no significant effect on the the expression of p- β -catenin. It confirmed that VDR can inhibit the proliferation of gastric cancer cells via inhibiting the expression of p- β -catenin.

Keywords Vitamin D; vitamin D receptor; β-catenin; gastric cancer cells; colony formation; shRNA

胃癌致死率在所有恶性肿瘤中位居第二,是全球公认的最重要的健康问题之一。中国更是胃癌高发地区,每年新增胃癌患者约30万,占全球发病人数的42%,且每年约有16万人死于该病,5年总体生存率不到29%^[1]。因此,阐明胃癌发生发展所涉及的分子机制,降低胃癌的高发病率和死亡率,尤为重要。

维生素D(vitamin D, VD)作为与人类健康密切 相关的一类脂溶性维生素,对维持人体钙平衡发挥 重要作用。VD在人体内的主要活性形式是骨化三 醇(1α,25(OH)₂D₃)。近年来,维生素D预防和治疗肿 瘤、改善肿瘤预后的研究受到广泛关注。而维生素 D主要通过维生素D受体(VDR)发挥其生物学功能。 维生素D受体(VDR)是配体激活的转录因子类固醇 激素/甲状腺激素受体的超家族成员之一,广泛存在 于多种正常组织细胞和癌细胞中^[2]。VDR被活性维 生素D(1α,25(OH)2D3)激活后可诱导一系列基因调控 和细胞信号传导,进而发挥重要的抗肿瘤作用,如抑 制增殖、刺激细胞凋亡和自噬、抑制血管生成、调 节免疫系统等^[3-4]。因此, 由VDR所介导的抗肿瘤作 用成为近年来的研究热点。据报道, VDR的高表达 可降低乳腺癌、前列腺癌和结肠癌的死亡率,并改 善其预后[5-8]。Wen等[9]报道, VDR在胃癌组织中的 表达量显着降低,而在良好和中度分化组织及小肿 瘤中的表达量较高,这表明,VDR可能是胃癌的预后 因素。此外, VDR的保护作用已在肝癌^[10]、胰腺癌^[11]、 结肠癌^[12]等消化道瘤中得到证实。但VDR在胃癌细 胞中的作用尚无明确报道,因此,阐明该受体蛋白在 胃癌细胞中发挥的作用可为治疗胃癌提供新的思路 和方向。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞SGC-7901和MKN-45为本实验室保存。维生素D₃购自MedChemExpress公司,用助溶剂 二甲基亚砜(DMSO)溶解后于4°C保存待用。

1.2 试剂及仪器

1α,25(OH)₂D₃(MedChemExpress)、VDR抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗体CyclinD1(兔抗)、β-catenin(兔 抗)及Phospho-β-catenin(Ser675,兔抗)购自Cell Signaling Technology公司。Actin(鼠抗)购自中国碧云天生 物技术研究所。青霉素、链霉素、蛋白提取试剂盒、 Cell Counting Kit-8、RIPA、荧光二抗及封片剂/抗荧 光淬灭剂购自中国碧云天生物技术研究所。shRNA 干扰慢病毒购自上海吉凯基因科技有限公司。 RPMI-1640培养基、高糖DMEM培养液及胎牛血清 购自美国HyClone公司。流式周期PI/RNase Staining Buffer试剂购自美国BD公司。结晶紫购自上海生工 生物工程有限公司。4%多聚甲醛购自武汉博士德 生物工程有限公司。96孔板、6孔板和12孔板购 自美国Corning公司。

CO₂细胞培养箱购自美国Forma Scientific公司; 倒置显微镜购自德国Leica公司; 荧光显微镜购自日 本Olympus公司。

1.3 细胞培养

1.3.1 人胃癌细胞 SGC-7901和MKN-45,分别培养于含10%胎牛血清、1%青霉素及链霉素的RPMI-1640培养基和DMEM高糖培养基中,37°C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,2~3天传代一次,适时更换新鲜培养液。

1.3.2 细胞转染 设置对照组和干扰组,每组各 3个复孔,首日处理细胞为单细胞悬液,以浓度为 10×10⁴个/mL、1000 μL/孔接种于12孔板内。37 °C、 5% CO₂过夜。次日待细胞贴壁后,吸去孔内旧培养液, 稀释慢病毒,将500 μL含完全培养基、0.3 μL Polybre(5 mg/mL)和30 μL慢病毒混匀后加入复孔中,放 入37 °C、5% CO₂孵箱继续孵育。约18~24 h后,更 换新鲜完全培养基。待细胞继续生长2~3天至80%, 添加嘌呤霉素进行筛选干扰稳定株, Western blot检 测干扰效果。

1.4 细胞免疫荧光

设置空白对照组和实验组。将12孔板专用Cover-

slip爬片提前放入12孔板中,并将SGC-7901和MKN-45细胞常规消化,铺板,次日待细胞贴壁后,从孵箱中取出,PBS洗3遍,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3遍,0.2% Triton X-100通透10 min,PBS洗3遍,5% BSA室温封闭30 min,PBS洗3遍,VDR一抗4°C过夜。次日于湿盒中室温避光孵育荧光二抗2 h,PBS洗3遍,DAPI染核10 min,PBS洗4遍,每次5 min,封片后观察荧光结果。

1.5 细胞CCK8(Cell Counting Kit-8)实验

设置对照组和实验组。每组设置6个复孔,进行3 次生物学重复。将SGC-7901和MKN-45细胞常规消化 离心,制成单细胞悬液,以浓度为2×10⁴个/mL、100 μL/孔 接种于96孔板内。待细胞贴壁后(次日)吸去孔内旧 培养液,并将1α,25(OH)₂D₃用新鲜培养基稀释并按 照1 μmol/L的浓度加入实验组,阴性对照组未进行 1α,25(OH)₂D₃干预。培养72 h 后,吸去旧培养基,每 孔加入含有10%的CCK-8 试剂的新鲜培养基100 μL, 作用90 min后在酶标仪上于450 nm波长处测定吸光 度(D)值,D值与正常活细胞数目成正比。

1.6 细胞集落形成实验

设置对照组和实验组。常规消化SGC-7901和 MKN-45细胞,重悬SGC-7901细胞以5×10²个/mL、 1 000 μL接种到6孔板里,MKN-45细胞以3×10²个/mL、 1 000 μL/孔接种到6孔板里,第二天细胞贴壁后更换 对照组培养基,并将1α,25(OH)₂D₃用新鲜培养基稀 释并按照1 μmol/L的浓度加入实验组,连续培养12 天,每3天更换一次培养液,并重新加药。待肉眼明 显观察到集落形成,吸去旧培养基,PBS洗2次,4%多 聚甲醛固定15 min后,结晶紫染色30 s,待PBS洗净 后,将培养板置于显微镜低倍镜下观察,并对形成的 集落进行计数(10个细胞以上所形成的细胞团作为 一个集落),实验重复3次。

1.7 流式细胞周期检测

设置对照组和实验组。每组一个复孔,进行3次 生物学重复。将SGC-7901和MKN-45细胞常规消化 离心,制成单细胞悬液,以30×10⁴个/mL、1000 μL/孔 接种于6孔板内,待细胞贴壁后(次日)吸去孔内旧培养 液,将1α,25(OH)₂D₃用新鲜培养基稀释并按照1 μmol/L 的浓度加入实验组,对照组未进行1α,25(OH)₂D₃干 预。培养72 h 后,消化细胞于EP管中,7000 r/min离 心5 min, PBS洗两次,75%冰乙醇固定24 h,采用PI/ RNase Staining Buffer试剂盒检测细胞在各周期中所

占比值。

1.8 Western blot检测

配制细胞裂解液,按照PMSF:RIPA:磷酸酶抑 制剂=1:100:1的体积比配制,检测细胞内β-catenin、 Cyclin D1及磷酸化β-catenin的表达水平。收集实 验组和阴性对照组(未给予VD₃处理)细胞,提取蛋 白。12 000 r/min 离心5 min去除不溶性沉淀,取部 分上清液,按照BCA法测定蛋白浓度,其余上清液加 入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,100 °C水浴锅中加热 处理8 min,放置冰上冷却。计算上样量,进行SDS-PAGE电泳。常规湿转法转膜(恒压100 V,90 min), 5%的脱脂奶粉常温封闭2 h,一抗4 °C过夜(β-catenin 1:1 000,分子量92 kDa; p-β-catenin 1:1 000,分子量57 kDa; VDR 1:100,分子量: 55 kDa; Cyclin D1 1:1 000,分子量 36 kDa; Actin 1:1 000,分子量42 kDa; GAPDH 1:5 000,分 子量36 kDa);二抗常温孵育1 h(山羊抗鼠1:5 000,山羊抗 兔1:10 000)。ECL化学发光,凝胶成像系统显影。

1.9 数据统计

采用GraphPad Prism统计软件分析数据,两配对 样本之间采用配对样本t检验,两组间比较采用t检 验。显著性分析以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VDR在胃癌细胞MKN-45和SGC-7901中的 表达情况

免疫荧光结果显示, VDR(标记为绿色荧光)在 胃癌细胞SGC-7901和MKN-45细胞质和细胞核中均 有表达, 这与文献报道VDR在其他细胞中的定位一 致^[22-23], VDR主要表达在细胞质中, 被VD激活后可 入核发挥转录调控作用(图1)。

2.2 VD抑制SGC-7901和MKN-45胃癌细胞的增殖

与正常对照组相比, VD(1 μmol/L) 作用72 h后, 胃癌细胞SGC-7901的D值明显降低, 说明其增殖能 力受到显著抑制(图2A); VD对胃癌细胞MKN-45增 殖的影响与之类似(图2B)。因此, VD能够明显抑制 SGC-7901和MKN-45胃癌细胞的增殖。

2.3 VD抑制SGC-7901和MKN-45胃癌细胞的集 落形成

与正常对照组相比, VD(1 μmol/L)作用12天后, 细胞集落形成实验结果显示, SGC-7901细胞的集落形成数明显减少(图3A); VD对胃癌细胞MKN-45集落形成的影响具有相同的效应(图3A)。因此, VD具有明显抑



A: 空白对照组, DAPI/细胞核染色, SGC-7901细胞; B: 空白对照组, VDR表达及定位, SGC-7901细胞; C: 图A和图B的合成图; D: 实验组, DAPI/ 细胞核染色, SGC-7901细胞; E: 实验组, VDR表达及定位, SGC-7901细胞; F: 图D和图E的合成图; G: 空白对照组, DAPI/细胞核染色, MKN-45细 胞; H: 空白对照组, VDR表达及定位, MKN-45细胞; I: 图G和图H的合成图; J: 实验组, DAPI/细胞核染色, MKN-45细胞; K: 实验组, VDR表达及 定位, MKN-45细胞; L: 图J和图K的合成图; DAPI(蓝色荧光), VDR(绿色荧光)。

A: blank control group, DAPI/cell nuclear staining, SGC-7901 cells; B: blank control group, expression and localization of VDR, SGC-7901 cells; C: composite image of figure A and figure B; D: experimental group, DAPI/cell nuclear staining, SGC -7901 cells; E: experimental group, expression and localization of VDR, SGC-7901 cells; F: composite image of figure D and figure E; G: blank control group, DAPI/cell nuclear staining, MKN-45 cells; H: blank control group, expression and localization of VDR, MKN-45 cells; I: composite image of figure G and figure H; J: experimental group, DAPI/cell nuclear staining, MKN-45 cells; K: experimental group, expression and localization of VDR, MKN-45 cells; L: composite image of figure J and figure K; DAPI (blue fluorescence), VDR (green fluorescence).

图1 免疫荧光实验观察VDR在胃癌细胞SGC-7901 和MKN-45中的表达情况





A: 1 µmol/L VD作用SGC-7901细胞72 h, 细胞CCK8增殖实验; B: 1 µmol/L VD作用MKN-45细胞72 h, 细胞CCK8增殖实验。**P<0.01, ****P<0.0 001, n=3。

A: effects of 1 μ mol/L VD on proliferation of SGC-7901 cells for 72 h; B: effects of 1 μ mol/L VD on proliferation of MKN-45 cells for 72 h. **P<0.01, ****P<0.0 001, n=3.

图2 细胞CCK8实验检测VD对胃癌细胞SGC-7901和MKN-45增殖能力的影响 Fig.2 Effects of proliferation on SGC-7901 and MKN-45 cells with VD were detected by CCK8 experiment

制胃癌细胞SGC-7901和MKN-45集落形成的能力。

2.4 VD通过VDR抑制SGC-7901和MKN-45胃癌 细胞的增殖

建立胃癌细胞SGC-7901和MKN-45的VDR-shRNA 稳定株, Western blot检测干扰效果(图4A)。1 μmol/L VD 分别处理对照组(NC+VD)和实验组(shVDR+VD) 72 h, 与对照组相比,实验组胃癌细胞SGC-7901的D值明 显增高,说明下调VDR的表达水平后,VD不再发挥 抑制胃癌细胞增殖的作用(图4B);VD对胃癌细胞 MKN-45增殖的影响与之类似(图4C)。因此,VD通 过VDR抑制胃癌细胞SGC-7901和MKN-45的恶性增 殖。



A: 1 μmol/L VD作用SGC-7901和MKN-45细胞72 h, 细胞集落形成实验; B: 统计学分析SGC-7901细胞和MKN-45细胞的集落形成实验结果, *P<0.05、****P<0.0 001, n=3。

A: effects of 1 μ mol/L VD on proliferation of SGC-7901 cell and MKN-45 cell for 72 h Colony formation; B: statistical analysis of Colony formation assay on SGC-7901 and MKN-45, **P*<0.05, *****P*<0.001, *n*=3.

图3 细胞集落形成实验检测VD对胃癌细胞SGC-7901和MKN-45集落形成能力的影响

Fig.3 Effects of proliferation on SGC-7901 and MKN-45 cells with VD were detected by colony formation assay



A: Western blot检测 GC-7901细胞和MKN-45细胞VDR干扰效果; B: 1 µmol/L VD作用SGC-7901细胞及其shVDR稳定株, 细胞CCK8增殖实验; C: 1 µmol/L VD作用MKN-45细胞及其shVDR稳定株, 细胞CCK8增殖实验。**P<0.01, ****P<0.0 001, n=3。

A: effects of shVDR in SGC-7901 cell and MKN-45 cell by Western blot; B: effects of proliferation on SGC-7901 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 μ mol/L VD for 72 h; C: effects of proliferation on MKN-45 cells and their shVDR stable cells and t

图4 细胞CCK8实验检测VD对胃癌细胞shVDR稳定株增殖能力的影响

Fig.4 Effects of proliferation on shVDR stable cell lines with VD were detected by CCK-8 experiment

2.5 VD及VDR对胃癌细胞周期的影响

与正常对照组相比,VD作用72h后,胃癌细胞 SGC-7901中周期G₁期、S期和G₂期的细胞分布均无显 著差异(图5A和图5B),MKN-45胃癌细胞中周期G₁期、 S期和G₂期的细胞分布也无明显差异(图5A和图5B)。 Western blot实验检测发现,VD并不影响细胞周期蛋白 Cyclin D1的表达(图5C),下调VDR的表达水平后,细 胞周期蛋白Cyclin D1的表达量也无明显差异(图5D)。 因此,VD及VDR对胃癌细胞周期未见明显影响。

2.6 VD通过VDR抑制胃癌细胞β-catenin磷酸化

与对照组相比, VD作用10h后, 胃癌细胞SGC-7901和MKN-45中β-catenin磷酸化水平明显降低。下 调VDR表达后, 胃癌细胞SGC-7901和MKN-45中 β-catenin磷酸化水平显著增强, 同时VD对胃癌细胞 β-catenin磷酸化抑制作用消失。因此, VD能够通过 VDR降低胃癌细胞β-catenin的磷酸化水平(图6)。

3 讨论

近年来, 维生素D预防和治疗肿瘤、改善肿瘤 预后的研究受到广泛关注。尤其在对乳腺癌^[13]、前 列腺癌^[14]、结肠癌^[15]等研究中证实, 维生素D有明确 的保护作用。大量流行病学调查结果显示, 人体内 血清维生素D水平的增加与胃癌风险成负相关^[16-17]。 维生素D的抗胃癌作用在动物模型中也得到广泛研 究^[18-19], 这些流行病学和动物模型的研究证据表明, 维生素D可明显抑制胃癌的发生与进展, 但其相关 机制尚未完全清楚。

维生素D发挥生物学活性一般是通过VDR, VDR也被称为骨化三醇受体,是转录因子核受体家 族的成员^[20]。研究显示,VDR主要通过两种机制调 节维生素D₃的生物学功能,一种涉及核VDR的转 录调节,另一个涉及膜VDR的非基因组信号转导 途径^[21]。第一个是维生素D研究最多的抗肿瘤机 制。在肿瘤细胞内,当核VDR被1α,25(OH)₂D₃(骨化 三醇)活化时,与一种类视黄醇X受体(RXR)形成同 型二聚体或异二聚体VDR-RXR,三者所形成的复合 体可附着于靶标基因启动子上的维生素D反应元件 (vitamin D response elements, VDREs),进一步调控下 游基因的转录和表达,从而起到对肿瘤细胞的抑制 作用^[22-23]。本研究结果表明,CCK8实验和细胞克隆 实验均证实在配体1α,25(OH)₂D₃存在的情况下,胃 癌细胞的增殖和克隆形成受到明显抑制。免疫荧光 实验也观察到VDR在MKN-45和SGC-7901胃癌细胞 中均有表达。当shRNA干扰VDR表达后,即使存在 1a,25(OH)₂D₃, CCK8实验证实胃癌细胞MKN-45和 SGC-7901的增殖作用也不能受到抑制。因此,结果 表明VDR抑制胃癌,且VDR在VD作用下发挥抑制 胃癌细胞增殖的作用。

Mizushina^[24]发现维生素 D₂和维生素 D₃能够 选择性抑制哺乳动物 DNA聚合酶 α,使人胃癌细胞 NUGC-3细胞周期被阻滞在G₁期。Baek S等^[25]发 现,1α,25(OH)₂D₃能够通过降低胃癌细胞SNUI中 HuCCT1Ptch1、Gli1、bcl2的mRNA表达水平,抑制Hh 信号通路从而抑制胃癌细胞活性。但我们通过流式 细胞学检测发现,在维生素D₃干预下,胃癌细胞SGC-7901和MKN-45的周期各期(G₁、S、G₂)均无明显差异。 Western blot实验也显示在维生素D₃激动后,细胞周期 蛋白Cyclin D1表达也无明显改变。说明VDR在配体 VD激动下,并不是通过抑制细胞周期蛋白Cyclin D1 表达从而抑制胃癌细胞增殖。这与Mizushina所报道 结果不一致,可能由于胃癌细胞系不同所致。

在目前已知的癌症中, 肝癌、乳腺癌、宫颈 癌、甲状腺癌等十几种高发性癌变源于Wnt/β-连环 蛋白(β-catenin)信号转导途径的失调。Wnt信号通路 是通过细胞表面受体蛋白将细胞外信号转导至细胞 内的一种信号转导过程^[26]。当Wnt信号通路发生异 常时,会使得细胞质内游离的β-catenin降解受阻,积 聚后进入细胞核,调控靶基因,从而促进多种肿瘤 的发生,包括乳腺癌,前列腺癌等^[27-28]。Johnson等^[29] 报道维生素D₃依赖性VDR信号可通过抑制β-catenin 的活性延迟乳腺癌的发生, Larriba等^[30]也发现VDR 可通过抑制Wnt/β-catenin信号通路来抑制结肠癌细 胞的增殖和迁移能力。因此我们有理由推测, VDR 在维生素D激活下同样能够抑制WNT信号通路中 β-catenin发挥抗胃癌的作用。为了进一步明确VDR 作用机制,我们用活性维生素D刺激胃癌细胞,分析 Wnt信号通路关键蛋白 β -catenin的表达情况。研究 发现, 胃癌细胞受到活性维生素D刺激后, β-catenin 磷酸化表达会相应降低,相反,通过shRNA下调VDR 表达量后, VD对β-catenin磷酸化的表达水平无明显 影响。这表明VD是通过激活VDR,下调β-catenin的 磷酸化水平,进而抑制胃癌细胞的增殖。

本实验首次通过免疫荧光实验观察到VDR可 在胃癌细胞中表达,并且证实VD可通过VDR抑制



A: 1 μmol/L VD作用SGC-7901和MKN-45细胞72 h, 细胞周期分布; B: 统计学分析 SGC-7901细胞和 MKN-45细胞的细胞周期分布; C:1 μmol/L VD作用SGC-7901和MKN-45细胞72 h, Western blot实验检测Cyclin D1的表达情况; D: Western blot实验检测两种胃癌细胞SGC-7901和MKN-45 的shVDR稳定株中VDR和Cyclin D1的表达情况。ns: P>0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=3。

A: cell cycle distribution of SGC-7901 and MKN-45 cells treated with 1 μ mol/L VD for 72 h; B: statistical analysis of cell cycle distribution on SGC-7901 cells and MKN-45 cells; C: expression of Cyclin D1 on SGC-7901 cells and MKN-45 cells with 1 μ mol/L VD by Western blot; D: expression of VDR in both SGC-7901 and MKN-45 shVDR stable cell lines by Western blot and expression of Cyclin D1. ns: P > 0.05, **P < 0.01, **P < 0.001, n = 3.

图5 流式细胞技术及Western blot实验检测VD和VDR对胃癌细胞SGC-7901 和MKN-45 周期的影响

Fig.5 Effects of cell cycle on SGC-7901 and MKN-45 cells with VD and shVDR were detected by cell cloning assay and Western blot



A: 1 μmol/L VD作用SGC-7901细胞和MKN-45细胞10 h, Western blot检测p-β-catenin蛋白表达水平; B: Western blot检测SGC-7901细胞和MKN-45细胞shVDR稳定株 p-β-catenin蛋白表达水平; C: 1 μmol/L VD作用SGC-7901细胞shVDR稳定株和MKN-45及其shVDR稳定株10 h, Western blot检测p-β-catenin蛋白表达水平。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.01, n=3。

A: expression of p- β -catenin in SGC-7901 cells and MKN-45 cells with 1 µmol/L VD for 10h detected by Western blot; B: expression of p- β -catenin on SGC-7901 cells and their shVDR cell lines, MKN-45 cells and their shVDR cell lines by Western blot; C: expression of p- β -catenin on SGC-7901 and their shVDR stable cell lines, MKN-45 cells and their shVDR stable cell lines with 1 µmol/L VD for 10 h detected by Western blot. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n=3.

图6 Western blot检测VD及VDR对胃癌细胞p-β-catenin蛋白水平表达的影响 Fig.6 Effects of VD and VDR on expression of phosphorylation of β-catenin of SGC-7901 and MKN-45 cells were detected by Western blot 胃癌细胞恶性增殖。更进一步验证VDR主要是通 过调控Wnt/β-catenin信号通路,下调β-catenin的磷酸 化水平,进而抑制胃癌细胞增殖,但VDR调控Wnt/ β-catenin的具体机制有待进一步探究。因此,本实 验不仅为胃癌的预防和治疗提供理论支持,也为新 的治疗药物及治疗靶点奠定实验基础。

参考文献 (References)

- Venerito M, Link A, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric cancer-clinical and epidemiological aspects. Helicobacter 2016; 21(S1): 39-44.
- 2 Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, *et al.* The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. J Bone Miner Res 1998; 13(3): 325-49.
- 3 Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. Nat Rev Cancer 2014; 14(5): 342-57.
- 4 Fleet JC, Desmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a reviewof molecular mechanisms. Biochem J 2012; 441(1): 61-76.
- 5 Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, Fiorentino M, Fang F, Lis R, *et al.* Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. J ClinOncol 2011; 29(17): 2378-85.
- 6 Berger U, McClelland RA, Wilson P, Greene GL, Haussler MR, Pike JW, *et al.* Immunocytochemical determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer and relationship to prognosis. Cancer Res 1991; 51(1): 239-44.
- 7 Ditsch N, Toth B, Mayr D, Lenhard M, Gallwas J, Weissenbacher T, et al. The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. J Histochem Cytochem 2012; 60(2): 121-9.
- 8 Ferrer-Mayorga G, Gómez-López, Gonzalo, Barbáchano A, Fernández-Barral A, Peña C, *et al.* Vitamin D receptor expression and associated gene signature in tumour stromal fibroblasts predict clinical outcome in colorectal cancer. Gut 2017; 66(8): 1449-62.
- 9 Wen Y, Da M, Zhang Y, Peng L, Yao J, Duan Y. Alterations in vitamin D signaling pathway in gastric cancer progression: a study of vitamin D receptor expression in human normal, premalignant, and malignant gastric tissue. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(10): 13176-84.
- 10 Wang W, Zhao CH, Zhang N, Wang J. Vitamin D analog EB1089 induces apoptosis in a subpopulation of SGC-7901 gastric cancer cells through a mitochondrial-dependent apoptotic pathway. Nutr Cancer 2013; 65(7): 1067-75.
- 11 Leung CS, Yeung TL, Yip KP, Pradeep S, Balasubramanian L, Liu J, et al. Calcium-dependent FAK/CREB/TNNC1signalling mediates the effect of stromal MFAP5 on ovarian cancer metastatic potential. Nat Commun 2014; 5: 5092.
- 12 Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. Nat Rev Cancer 2011; 11(8): 609-18.
- 13 Gross M, Kost SB, Ennis B, Stumpf W, Kumar R. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on mouse mammary tumor (GR) cells: evidence for receptors, cellular uptake,inhibition of growth and alteration in morphology at physiologic concentrations of hormone. J Bone Miner Res 2010; 1(5): 457-67.

- 14 Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. Endocrinology 1993; 132(5): 1952-60.
- 15 Lointier P, Wargovich MJ, Saez S, Levin B, Wildrick DM, Boman BM. The role of vitamin D3 in the proliferation of a human colon cancer cell line in vitro. Anticancer Res 1987; 7(4B): 817-21.
- 16 Lin SW, Chen W, Fan JH, Dawsey SM, Taylor PR, Qiao YL, et al. Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin D concentration and mortality in a chinese population. Am J Epidemiol 2012; 176(11): 1043-50.
- 17 Vyas N, Companioni RC, Tiba M, Alkhawam H, Catalano C, Sogomonian R, et al. Association between serum vitamin D levels and gastric cancer: A retr-ospective chart analysis. World J Gastrointest Oncol 2016; 8(9): 688-94.
- 18 Hashiba H, Fukushima M, Chida K, Kuroki T. Systemic inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase in 1 {alpha-hydroxyvitamin D3-treated animals. Cancer Res 1987; 47(19): 5031-5.
- 19 Ikezaki S, Nishikawa A, Furukawa F, Tanakamura Z, Kim HC, Mori H, *et al.* Chemopreventive effects of 24R,25-dihydroxyvitamin D3, a vitamin D3 derivative, on glandular stomach carcinogenesis induced in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride. Cancer Res 1996; 56(12): 2767-70.
- 20 Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, et al. International Union of Pharmacology.LXIL. The NRIH and NRII receptors:constitutive androstane rceptor, pregnenc X receptor,famesoid X rceptor alpha,famesoid X receptor beta,liver X rceptor alpha,liverX receptor beta,and vitamin D receptor. Pharmacol Rev 2006; 58(4): 742-59.
- 21 Heikkinen S, Vaisanen S, Pehkonen P, Seuter S, Benes V, Carlberg C. Nuclear hormone 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy. Nucleic Acids Res 2011; 39(21): 9181-93
- 22 Yang L, Ma J, Zhang X, Fan Y, Wang L. Protective role of the vitamin D receptor. Cell Immunol 2012; 279(2): 160-6.
- 23 Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1α,25(OH)2vitamin D3: Genomic and non-genomic mechanisms. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2011; 25(4): 543-59.
- 24 Mizushina Y, Xu X, Murakami C, Okano T, Takemura M, Yoshida H, *et al*. Selective inhibition of mammalian DNA polymerase alpha by vitamin D-2 and D-3. J Pharmacol Sci 2003; 92(3): 283-90.
- 25 Baek S, Lee YS, Shim HE, Yoon S, Baek SY, Kim BS, *et al.* Vitamin D3 regulates cell viability in gastric cancer and cholangiocarcinoma. Anat Cell Biol 2011; 44(3): 204-9.
- 26 Croce JC, Mcclay DR. Evolution of the wnt pathways. Methods Mol Biol 2008; doi: 10.1007/978-1-60327-469-2_1.
- 27 Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 2004; 20(1): 781-810.
- 28 Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis 2008; 4(2): 68-75.
- 29 Johnson AL, Zinser GM, Waltz SE. Vitamin D3-dependent VDR signaling delays ron-mediated breast tumorigenesis through suppression of β-catenin activity. Oncotarget 2015; 6(18): 16304-20.
- 30 Larriba MJ, Muñoz A. SNAIL vs vitamin D receptor expression in colon cancer: therapeutics implications. Br J Cancer 2005; 92(6): 985-9.