

全反式维甲酸与胃癌预后相关性及其机制研究

冯振游, 胡孔旺, 丁慧明, 黄志国

摘要 目的 探讨全反式维甲酸(ATRA)治疗对胃癌术后患者生存期是否产生影响,分析ATRA是否通过调控上皮间质转化(EMT)对胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡产生影响。**方法** 选取胃癌术后患者共198例,分为对照组和ATRA组,比较两组间患者生存期的差异。体外培养MGC-803胃癌细胞,分为对照组和ATRA组。CCK-8实验检测其增殖能力,细胞划痕实验检测其迁移能力,Transwel实验检测其侵袭能力,流式细胞术检测凋亡情况。Western blot、RT-qPCR和免疫荧光检测EMT相关基因(E-cadherin、N-cadherin和Vimentin)的表达情况。**结果** ATRA可以延长胃癌术后患者的生存时间。经ATRA处理后,胃癌细胞增殖、迁移、侵袭能力下降,同时会促进胃癌细胞的凋亡。Western blot、RT-qPCR和免疫荧光结果显示ATRA会下调胃癌细胞N-cadherin和Vimentin的表达水平,上调E-cadherin表达水平。**结论** ATRA可以延长胃癌术后患者的生存时间,促进胃癌细胞凋亡,通过调控EMT抑制胃癌细胞增殖,迁移,侵袭。**关键词** 全反式维甲酸;胃癌;预后相关性;上皮间质转化

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)08-1216-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.008

胃癌(gastric carcinoma, GC)是发病率最高的肿瘤之一。大多数胃癌患者确诊时已经处于中晚期。研究^[1]表明,胃癌细胞中的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)会促进细胞的增殖、迁移和侵袭。课题组前期试验表明,全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)会提高胃癌患者的生存率。ATRA属于维生素A的一种,其相对分子量为300.44。ATRA对于人体的生长发育以及细胞的分化起到了重要的作用。已经有相关研究^[2]证明,ATRA与受体RAR α /RXR结合后,对胃癌细胞的增殖和凋亡等产生了一定的抑制作用。如

ATRA与受体RAR α 结合后可诱导神经母瘤细胞分化,与RAR β 结合后则使其生长受到抑制^[3]。ATRA在临床中已经被用作细胞诱导分化剂,对于多种肿瘤均存在治疗效果。因此,该实验探讨了ATRA对胃癌术后患者预后的影响,以及ATRA参与胃癌发生发展的机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 2001年5月—2012年12月在安徽医科大学第一附属医院普外科就诊,并且病理组织学诊断为胃癌组织浸润到黏膜下层以下的胃癌患者,外周血常规检查、肝功能和血脂检测指标均正常,美国东部肿瘤协作组(Eastern cooperative oncology group, ECOG)体力状态评分4分以下。

1.2 治疗方法 按照均衡循序随机的方法将入选胃癌患者于手术后分为对照组和ATRA组。其中对照组对患者进行静脉辅助化疗的方式,具体为患者采用FLP[5-Fu 400 mg/m² × 5 d, DDP 60 mg/m² × 1次,亚叶酸钙每天200 mg/m² × 5 d]方案,3周为一个化疗周期,共计6个疗程。ATRA组患者为静脉辅助化疗+口服ATRA的方式,口服ATRA具体为手术后2 d开始服用ATRA,10 mg/次,3次/d,共计6个月。上述研究方案经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准,并获得患者的知情同意。

1.3 随访 通过当地行政管理人员、社区医疗卫生服务人员及患者或家属电话联系随访,了解患者是否生存或患者的死亡时间。随访截止到2020年10月,248例患者中198例获得随访。其中ATRA组98例,对照组100例。

1.4 细胞株及主要试剂 胃癌MGC-803细胞购自上海冠道生物科技有限公司;全反式维甲酸购自美国sigma公司;CCK-8试剂盒购自广州济恒医药科技有限公司;胰酶购自武汉金开瑞科技有限公司;胎牛血清购自上海江林生物科技有限公司;DMEM低糖培养基购自合肥欣乐生物科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒,快速凝胶试剂盒购自武汉赛维尔科技有限公司;E-cadherin、N-cadherin和Vimentin一抗购自美国CST公司;GAPDH一抗和过氧化物

2022-05-31 接收

基金项目:安徽省科技厅重点研究与开发项目(编号:202004j07020036);吴阶平医基金会临床科研专项资助基金(编号:320.6750.19092-19)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

作者简介:冯振游,男,硕士研究生;

胡孔旺,男,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail: hukw@sina.com

酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自合肥欣乐生物科技有限公司;细胞凋亡试剂盒和荧光二抗购自武汉赛维尔科技有限公司; Western-blot 凝胶和板均购自康乐有限公司。荧光定量 PCR 仪器购自美国 Thermo Scientific 公司。ATRA 购自山东良福制药有限公司。亚叶酸钙购自连云港伊特诺化工科技有限公司。

1.5 实验方法

1.5.1 细胞培养和药物处理 胃癌 MGC-803 细胞使用 DMEM 低糖培养基培养,细胞培养箱参数为 37 °C、5% CO₂。胎牛血清的浓度为 10%。细胞贴壁生长,每 2 d 进行细胞传代。将培养好的胃癌 MGC-803 细胞分为对照组和 ATRA 组。ATRA 组中用 30 μmol/L ATRA 溶液进行处理。对照组不进行 ATRA 溶液处理。

1.5.2 CCK-8 法检测胃癌 MGC-803 细胞的增殖能力 取对数生长期的细胞,常规消化,将其接种到 96 孔板中,96 孔板中每个孔中细胞悬液量为 100 μl,细胞数为 5 000 个/孔,每组设置 3 次重复组。将 96 孔板放入细胞培养箱中,参数设置为 37 °C、5% CO₂。待细胞贴壁生长后,更换不同浓度的 ATRA 培养(10、25、50、75 和 100 μmol/L),同时设置对照组和 DMSO 组。ATRA 溶液分别处理 24 h 和 48 h 后,加入 CCK-8 试剂,在酶标仪测量 450 nm 波长的吸光度。

1.5.3 细胞划痕愈合实验检测胃癌 MGC-803 细胞的迁移能力 当 6 孔板中胃癌 MGC-803 细胞的细胞密度为 2×10^5 个/孔时,此时加入不含有胎牛血清的培养基,在细胞培养箱中培养 12 h。用 1 ml 的枪头全部沿着同一个方向进行直线划线,之后每孔中的细胞使用 PBS 进行洗涤,加入含有 1% 胎牛血清的培养基,放入细胞培养箱中培养,使用相机拍摄显微镜中细胞迁移的照片。

1.5.4 Transwell 实验检测胃癌 MGC-803 细胞的侵袭能力 基底膜进行预冷处理,使用不含胎牛血清的培养基稀释。基底膜放置在 Transwell 的板上室,将整个聚碳脂膜全部覆盖。将其放入细胞培养箱中 1 h 待其形成稳定的凝胶。在下面加入 700 μl DMEM 低糖培养基,培养基中含有 10% 胎牛血清。在上室孔中加入无血清的细胞悬液,密度为 2×10^5 个/孔。分别设置对照组和 ATRA 组,培养 36 h 后,用甲醇溶液固定胃癌 MGC-803 细胞,加入 0.1% 的结晶紫染色液染色 20 min,用 PBS 洗涤 3 次,放在显微镜下用相机拍照。

1.5.5 流式细胞术检测胃癌 MGC-803 细胞的凋亡水平 收集对照组和 ATRA 组细胞,用不含 EDTA 的胰酶消化收集,室温下 2 000 r/min 离心 5 min,用 4 °C 的 PBS 重悬细胞,室温下 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液洗涤细胞。加入 300 μl 的 1 × Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 混匀后,避免室温孵育 15 min,加入 5 μl 的 PI 染色,200 μl 的 1 × Binding Buffer,进行细胞凋亡检测。

1.5.6 Western blot 实验检测胃癌 MGC-803 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 的表达水平 收集对照组和 ATRA 组细胞,使用 RIPA 裂解液将细胞裂解,离心机参数设置为 12 000 r/min,离心时间 15 min。收集胃癌 MGC-803 细胞的上清液存储于 1 ml 离心管中。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白样品 20 μg 加入上样缓冲液(5 ×)100 °C 加热 10 min。将制得的样品分别加入 8% SDS-PAGE 和 12% SDS-PAGE 凝胶中。电泳条件为电压 120V,电泳时间 30 min。当溴酚蓝到达凝胶底部时停止电泳,使用湿转法进行转膜。将蛋白质转移到 PVDF 膜上后,使用 BSA 溶液在室温的条件下进行封闭 1 h。分别加入一抗 E-cadherin(1 : 2 000)、N-cadherin(1 : 2 000)、Vimentin(1 : 1 000)和 GAPDH(1 : 1 000),在 4 °C 冰箱中孵育 12 h。使用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次洗涤 10 min。使用辣根过氧化物酶标记的山羊兔抗体 IgG(1 : 5 000)在室温的条件下进行孵育 1 h。使用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次洗涤 10 min。加入显色液后使用 BIO RAD 凝胶成像系统观察不同分组的蛋白灰度值,使用 Image J 软件分析蛋白的相对表达量。

1.5.7 RT-qPCR 法检测胃癌 MGC-803 细胞中 E-cadherin、N-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 表达水平 选择生长密度达到 80% ~ 90% 之间的胃癌 MGC-803 细胞,丢弃培养基后使用 PBS 溶液洗涤 2 ~ 3 次。每个培养皿中加入 1 ml TRIzol 试剂,冰上静置 10 min 后使用 200 μl 移液枪进行吹打。将裂解液全部转移至 2 ml 的 EP 管中。TaKaRa 试剂盒反转录 RNA 为 cDNA。将 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA 后用 IDTE 缓冲液(pH = 8.0, Integrated DNA Technologies, 美国)稀释至 10 ng / μl。qPCR 反应体系: 25 μl SYBR Premix Ex Taq II, 20 ng cDNA 和上下游引物共 40 μmol/L, dd H₂O 补充至 50 μl。依据 RT-qPCR 说明书进行检测,反应条件为: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 45 s, 70 °C 45 s, 共 40 个循环。实验重复 3 次。各基因引物序列如表 1 所示。

表1 基因引物序列

基因	上游引物	下游引物
E-cadherin	5'-TTGCTACTGGAA-	5'-GATGTATTGGGAG-
	CAGGGACAC-3'	GAAGGCTCG-3'
N-cadherin	5'-CGAATGGAT-	5'-GGAGCCACTGCCT-
	GAAAGACCCATCC-3'	TCATAGTCAA-3'
Vimentin	5'-CAGATGCGTGAATG-	5'-AAGTTTGAAGAG-
	GAAGA-3'	GCAGAGAAA-3'
β-actin	5'-CTCGCCTTTGC-	5'-GAATCCTTCTGAC-
	CGATCC-3	CCATGCC-3'

1.5.8 免疫荧光检测胃癌 MGC-803 细胞标记蛋白 N-cadherin, E-cadherin 和 Vimentin 的表达 将处理后的胃癌细胞以 1×10^4 个/皿接种于共聚焦小皿中,培养 24 h。将 FBS 进行更换,使用 PBS 溶液将细胞培养基洗去,同时使用多聚甲醛将细胞固定 30 min,用 PBS 缓冲液轻轻晃洗 4 次后吹干,使用 1% 的曲通进行细胞膜的裂解,使用 PBS 缓冲液洗去曲通,100 mmol 甘氨酸进行封闭,再使用 PBS 缓冲液进行清洗,每次 10 min 共 3 次。5% BSA 封闭 1 h 后加入 N-cadherin, E-cadherin 和 Vimentin 一抗,4 °C 孵育过夜,使用 TBST 缓冲液进行清洗,每次 10 min 共 3 次,室温避光孵育荧光二抗 1 h,使用 TBST 缓冲液进行清洗,每次 10 min 共 3 次。加入细胞核染色液 DAPI 室温孵育 10 min,使用 TBST 缓冲液进行清洗,每次 10 min 共 3 次,用超纯水清洗 2 次,加入适量的抗淬灭剂,于正置荧光显微镜下分析样本并拍照记录。

1.6 统计学处理 将收集到的数据在 SPSS 20.0 中进行处理,计量数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据用 *t* 检验的方式。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线数据 两组性别、TNM 分期、分化程度和手术方式等差异无统计学意义,具体见表 2。

2.2 ATRA 治疗延长胃癌患者的生存时间 对 198 例 GC 患者进行术后随访, Kaplan-Meier 的生存分析结果显示, ATRA 组的 GC 患者生存期高于对照组的 GC 患者 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。见图 1。

2.3 ATRA 抑制胃癌 MGC-803 细胞的增殖能力 不同浓度的 ATRA 溶液处理胃癌 MGC-80 细胞 24、48 h 后, CCK-8 法进行检测结果显示: 与对照组相比, ATRA 处理的胃癌 MGC-803 细胞增殖能力降低 ($P < 0.01$), 且随着浓度的增大增殖能力不断下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 2。

表2 两组基线数据(n)

基线资料	对照组 (n = 100)	ATRA 组 (n = 98)	P 值
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	57.8 ± 11.5	57.5 ± 11.9	0.558
性别			0.784
男	55	52	
女	45	46	
TNM 分期			1.000
I B	10	10	
II	34	33	
III	42	41	
IV	14	14	
分化程度			1.000
低	8	8	
中	57	54	
高	35	36	
手术方式			0.771
根治性手术	80	80	
姑息性手术	20	18	

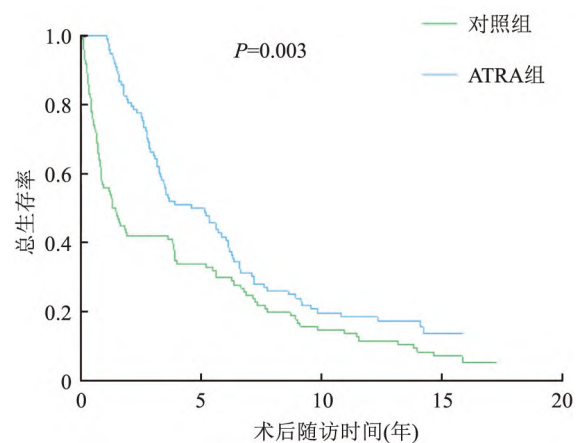


图1 Kaplan-Meier 分析两组胃癌术后患者的生存时间

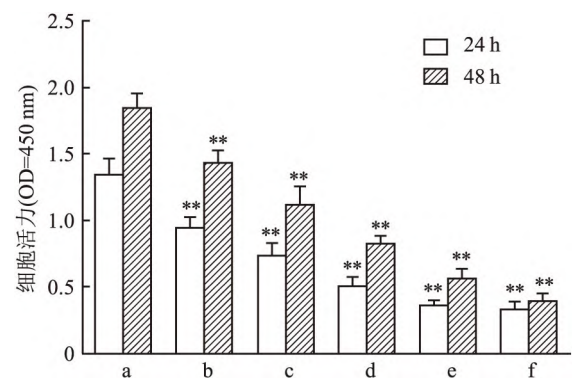


图2 不同浓度的 ATRA 对胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响

a: 对照组; b: DMSO 组; c: 10 μmol/L ATRA; d: 25 μmol/L ATRA; e: 50 μmol/L ATRA; f: 75 μmol/L ATRA; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 ATRA 抑制胃癌 MGC-803 细胞的迁移能力

30 μmol/L ATRA 溶液处理胃癌 MGC-803 细胞 24、48 h 后,与对照组比较,细胞划痕愈合实验结果表明,ATRA 组的胃癌 MGC-803 细胞迁移率下降($F = 41.718, P < 0.01$),差异有统计学意义。见图 3。

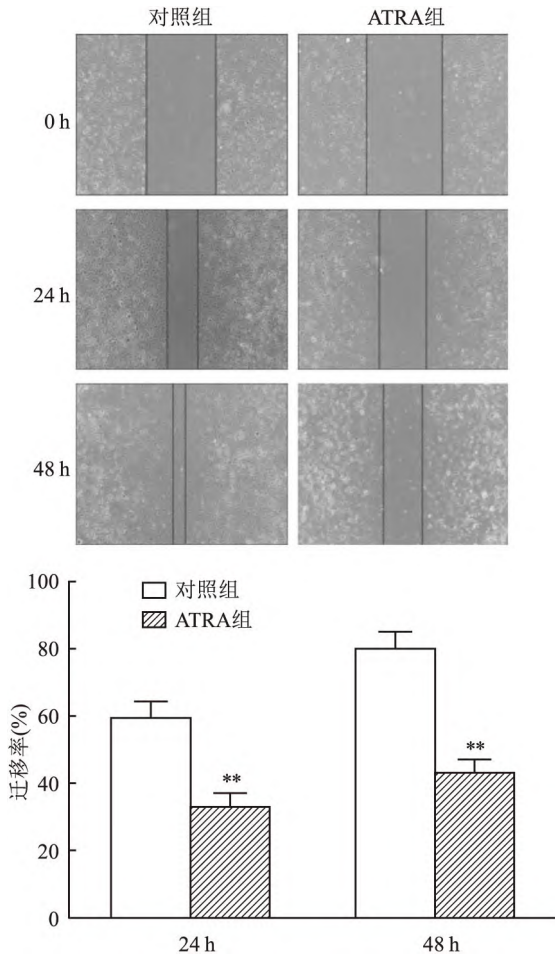


图3 细胞划痕实验检测 ATRA 抑制胃癌 MGC-803 细胞迁移能力 ×200 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 ATRA 抑制胃癌 MGC-803 细胞的侵袭能力

ATRA 组中加入 30 μmol/L ATRA 溶液,培养 36 h 后与对照组相比,Transwell 实验结果表明,ATRA 组的胃癌 MGC-803 细胞侵袭细胞数量小于对照组($F = 36.098, P < 0.01$),差异有统计学意义。见图 4。

2.6 ATRA 诱导胃癌 MGC-803 细胞的凋亡 ATRA 组 30 μmol/L ATRA 溶液作用 24 h 和 48 h 后,与对照组相比,ATRA 处理后的胃癌 MGC-803 细胞凋亡率升高($P < 0.05$),差异有统计学意义。见图 5。

2.7 ATRA 上调 E-cadherin,下调 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平 ATRA 组 30 μmol/L ATRA 溶液处理细胞 24、48 h 后,Western blot 实验检

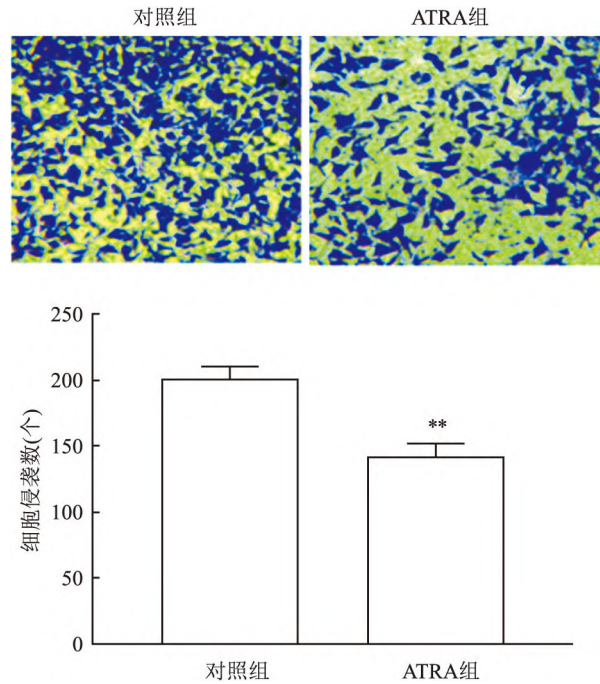


图4 Transwell 实验检测 ATRA 抑制胃癌 MGC-803 细胞侵袭能力 ×200 与对照组比较: ** $P < 0.01$

测结果显示,与对照组相比,ATRA 组的胃癌 MGC-803 细胞中 E-cadherin 表达水平上升($F = 118.022, P < 0.01$),且随着时间的增加表达水平上升。N-cadherin($F = 149, P < 0.01$)和 Vimentin($F = 180, P < 0.01$)表达水平下降,且随着时间的增加表达水平下降,差异有统计学意义。见图 6。

2.8 ATRA 上调 E-cadherin,下调 N-cadherin 及 Vimentin mRNA 表达水平 和对照组相比,ATRA 组经过 30 μmol/L ATRA 溶液处理 24、48 h 后。E-cadherin mRNA 表达水平上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Vimentin、N-cadherin mRNA 表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表3 ATRA 上调 E-cadherin,下调 N-cadherin 及 Vimentin mRNA 表达水平($n = 3, \bar{x} \pm s$)

基因	对照组	24 h	48 h
E-cadherin	1.041 ± 0.310	1.428 ± 0.157 *	1.822 ± 0.012 *
N-cadherin	1.208 ± 0.139	0.822 ± 0.041 *	0.512 ± 0.011 *
Vimentin	1.234 ± 0.256	0.809 ± 0.172 *	0.339 ± 0.019 **

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.9 ATRA 增强 E-cadherin 荧光强度,降低 Vimentin 和 N-cadherin 荧光强度 ATRA 组 30 μmol/L ATRA 溶液作用 24 h 和 48 h 后,和对照组相比,免疫结果表明,ATRA 增强 E-cadherin 荧光强度,降低

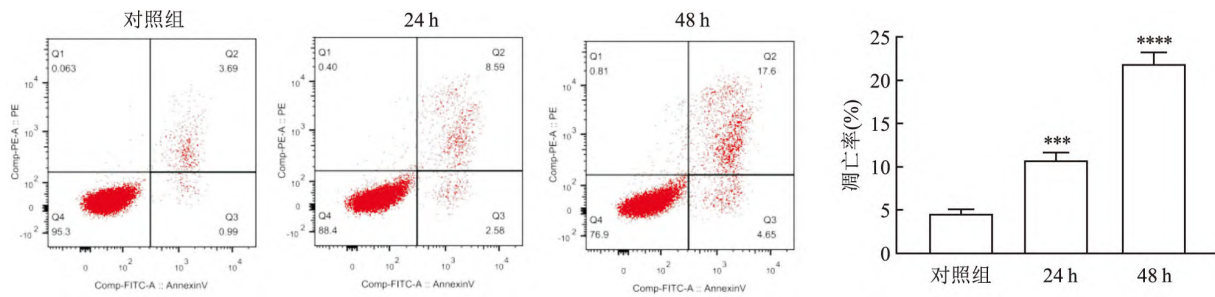


图5 流式细胞术实验检测 ATRA 促进胃癌 MGC-803 细胞凋亡
与对照组比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

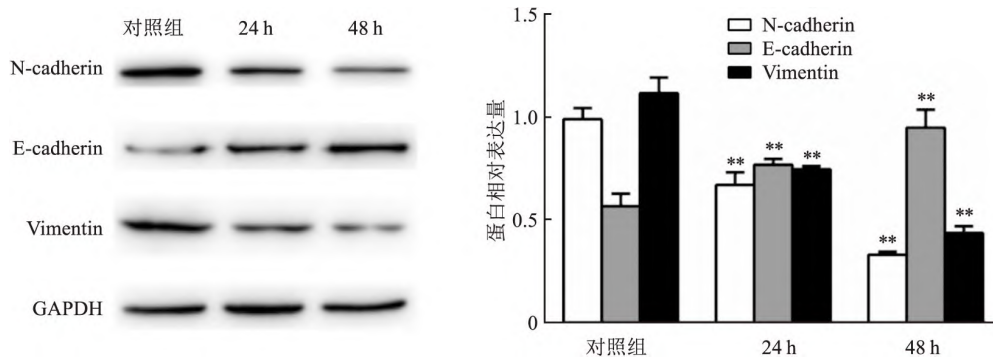


图6 Western blot 实验检测 ATRA 对 EMT 相关蛋白表达水平的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$

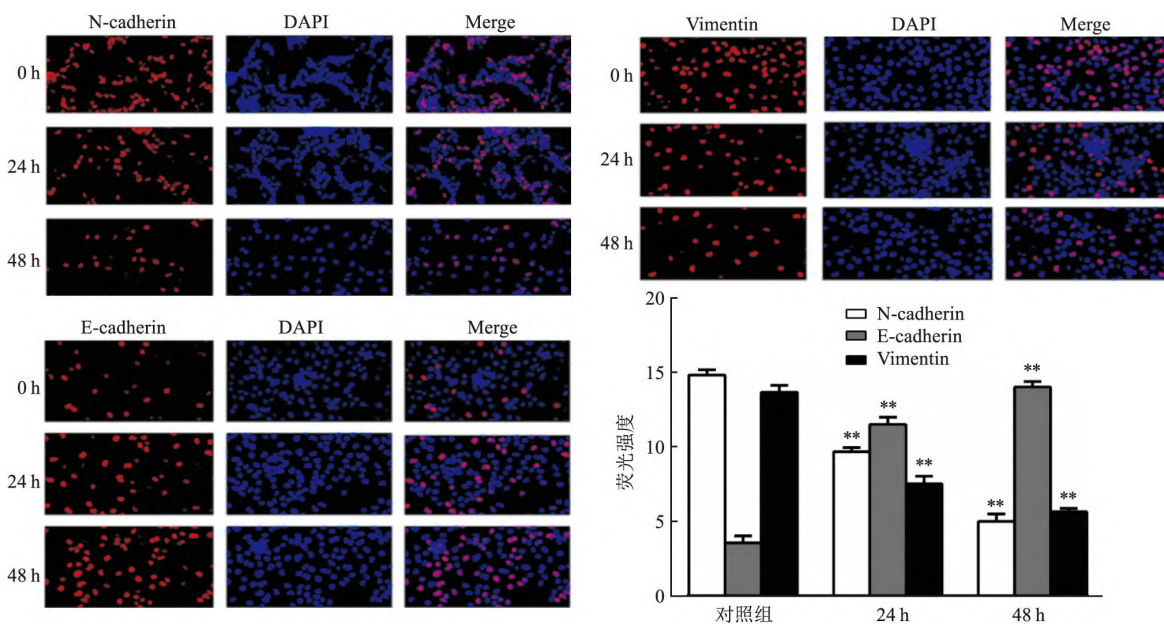


图7 ATRA 影响 E-cadherin, Vimentin 和 N-cadherin 的荧光强度 $\times 200$
与对照组比较: ** $P < 0.01$

N-cadherin、Vimentin 荧光强度 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见图7。

3 讨论

在目前已知的肿瘤中,GC 是发病率较高的一种,且发病率和病死率呈逐年上升趋势。根据报

道^[4],我国2019年GC患者数量就已经超过了110万例。由于国内的饮食习惯存在一定的差异,导致GC发病率是其他国家的两倍以上^[5]。目前对于GC的治疗主要有药物,手术化疗等方式。术后GC患者的预后较差,5年的生存率仅为35%^[6]。研究^[7]发现,在常规治疗中加入ATRA可改善胃异型

增生患者的预后。Rb 蛋白的定量可以作为肿瘤转阴的标记物,经过 ATRA 处理后的样本显示 Rb 水平升高,这可能有助于抑制胃异型增生。

实验证明,ATRA 可以通过抑制 GC 细胞的上皮间质转化作用,从而抑制 GC 细胞的增殖、迁移、侵袭等。EMT 是大多数肿瘤细胞在进行分化时所存在的一种过程。因此 EMT 对于肿瘤细胞的侵袭和转移过程存在显著的作用。研究 EMT 显示,此过程中出现较多的标志性蛋白表达量的改变,例如 E-cadherin 表达下降, N-cadherin 和 Vimentin 表达增高等。如果抑制此过程,相关蛋白的表达量会呈现相反的趋势。探究 ATRA 对 GC 细胞 EMT 的影响中显示,ATRA 组的 E-cadherin 蛋白表达量增多, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达量下降,这和预期结果一致。EMT 过程中,肿瘤细胞的黏附性降低,同时伴有大量细胞因子分泌,从而发生侵袭和转移的现象。已经有相关实验^[8]表明,EMT 对于肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭过程具有增强作用。且研究^[9]发现,GC 细胞中已经明确存在 EMT。ATRA 属于维生素 A 的中间代谢产物,是一种新型的细胞诱导分化剂,对肿瘤细胞有着明显的抑制效果。ATRA 可以抑制多种肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭,在临床中应用较为广泛。在宫颈癌、甲状腺癌患者的治疗中,口服 ATRA 的治疗作用和预防效果较为显著^[10]。前期研究^[11]已经证明,ATRA 治疗 GC 具有一定的疗效,且在一些肿瘤细胞株中 ATRA 可以增强顺铂的治疗作用^[12]。ATRA 联合 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-Fu)或顺铂腹腔灌注治疗 GC 有较好的临床疗效。

本研究中以 198 例 GC 患者为研究对象,结果表明,ATRA 治疗的 GC 术后患者生存期大于未进行 ATRA 治疗的患者。因此 ATRA 联合化疗治疗的方式可以延长患者的生存时间。ATRA 可以抑制 GC MGC-803 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,促进 GC 细胞的凋亡。经过 ATRA 处理后,EMT 相关基因(N-cadherin、Vimentin)表达水平下降,E-cadherin 表达

水平上升。

参考文献

- [1] Meyer-Schaller N, Cardner M, Diepenbruck M, et al. A hierarchical regulatory landscape during the multiple stages of EMT[J]. *Dev Cell*, 2019, 48(4): 539–53.
- [2] 杜娟,吴博,史海燕,等. 全反式维甲酸调节 GAS5 基因表达诱导人胃癌细胞凋亡[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(10): 4808–12.
- [3] Viswanathan S, Berlin Grace V M, Danisha J P, et al. Enhancement of tumor suppressor RAR- β protein expression by cationic liposomal-ATRA treatment in benzo(a)pyrene-induced lung cancer mice model[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2019, 392(4): 415–26.
- [4] 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.
- [5] 杨之洵,郑荣寿,张思维,等. 中国胃癌发病趋势及预测[J]. *中国肿瘤*, 2019, 28(5): 321–6.
- [6] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(1): 52–8.
- [7] Jin J, Li X, Xing L, et al. Addition of all-trans-retinoic acid to omeprazole and sucralfate therapy improves the prognosis of gastric dysplasia[J]. *Int Med Res*, 2015, 43(2): 204–16.
- [8] Ling J, Sun Y, Pan J, et al. Feedback modulation of endothelial cells promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of osteosarcoma cells by Von Willebrand Factor release[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 12(9): 15971–9.
- [9] 阮君山,周欢,蒋宗胜,等. 木犀草素调控非小细胞肺癌上皮间质转化的分子机制[J]. *医药导报*, 2018, 37(1): 20–6.
- [10] Matos M L, Lapyckyj L, Rosso M, et al. Identification of a novel human E-Cadherin splice variant and assessment of its effects upon EMT-related events[J]. *Cell Physiol*, 2017, 232(6): 1368–86.
- [11] Patrad E, Niapour A, Farassati F, et al. Combination treatment of all-trans retinoic acid (ATRA) and γ -secretase inhibitor (DAPT) cause growth inhibition and apoptosis induction in the human gastric cancer cell line[J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(2): 865–77.
- [12] Liang Z, Li J, Zhu B. Lung cancer combination treatment: evaluation of the synergistic effect of cisplatin prodrug, vinorelbine and retinoic acid when co-encapsulated in a multi-layered nano-platform[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 4519–31.

Correlation between ATRA and prognosis of gastric cancer and its related mechanism

Feng Zhenyou, Hu Kongwang, Ding Huiming, Huang Zhiguo

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate whether all-trans-retinoic acid (ATRA) treatment affects the survival of
(下转第 1228 页)

Isolation, culture and identification of glomerular mesangial cells from macaca mulattas

Liu Xiaoyi, Zhang Chunmei, Zhang Lei, Xu Zhen, Wei Qi, Jiang Haifeng,

Dong Tingyu, Yang Xuezhi, Yan Shangxue, Chang Yan, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Rheumatoid Arthritis Research Centre, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective To explore a simple, convenient and reproducible method for the *in vitro* extraction, culture and identification of primary glomerular mesangial cells (GMCs) from non-human primate. **Methods** The kidneys of macaca mulattas were removed under aseptic conditions, and the glomeruli were separated using two different pore sizes (between 100 and 200 mesh) and digested with type VI collagenase at different concentrations (0.1 mg/ml and 0.2 mg/ml), and different digestion times (10 min and 15 min) were set for the two concentrations. The growth of GMCs under different digestion conditions was observed in the bottles. The structure of GMCs was observed under microscope and the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Nephryn in GMCs was detected by immunofluorescence and Western blot. The biological properties of GMCs were observed after stimulation with tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the viability and proliferation of GMCs were detected by CCK-8 and High Connotation Cell Imaging System, respectively and the migration ability of GMCs was detected by Transwell and cell scratch assay. **Results** The glomeruli collected using 0.1 mg/ml type VI collagenase digestion for 10 min were more apposed and the glomeruli cells were in a better growth state. Glomeruli in primary culture were adherent at 3 d. Irregularly shaped or star-shaped cells began to migrate at 7 d. GMCs gradually spread to the bottom of the bottle after 21 ~ 35 d. GMCs were positive for α -SMA protein and negative for Nephryn protein. 10 ng/ml TNF- α *in vitro* stimulation significantly enhanced the proliferation and migration ability of GMCs. **Conclusion** The method of collagenase digestion (0.1 mg/ml type VI collagenase digestion for 10 min) was successfully established for the isolation and culture of GMCs, which can provide a suitable cell model to better simulate human kidney diseases in the future.

Key words macaca mulattas; primary glomerular mesangial cells; primary cell culture; collagenase digestion method

(上接第 1221 页)

gastric cancer patients after surgery, and to analyze whether ATRA affects the proliferation, migration, invasion and apoptosis of gastric cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** A total of 198 patients with gastric cancer after surgery were selected and divided into control group and ATRA group, and the difference in survival time between the two groups was compared. MGC-803 gastric cancer cells were cultured *in vitro* and divided into control group and ATRA group. The proliferation ability was detected by CCK-8 experiment, the migration ability was detected by cell scratch experiment, the invasion ability was detected by Transwell experiment, and the apoptosis was detected by flow cytometry. The expressions of EMT-related genes (E-cadherin, N-cadherin and Vimentin) were detected by Western blot, RT-qPCR and immunofluorescence. **Results** ATRA could prolong the survival time of patients after gastric cancer surgery. After ATRA treatment, the proliferation, migration and invasion abilities of gastric cancer cells decreased, and the apoptosis of gastric cancer cells was promoted at the same time. Western blot, RT-qPCR and immunofluorescence results showed that ATRA down-regulated the expression levels of N-cadherin and Vimentin and up-regulated the expression level of E-cadherin in gastric cancer cells.

Conclusion ATRA can prolong the survival time of gastric cancer patients after surgery, promote the apoptosis of gastric cancer cells, and inhibit the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells by regulating EMT.

Key words all-trans-retinoic acid; stomach neoplasms; prognostic correlation; EMT