

雌二醇在胃癌发生发展中的作用

赵轶峰¹, 李明霞², 章帅¹, 李云¹, 张育¹, 毕仁杰¹, 李曙光^{1*}

1.河北北方学院附属第一医院 胃肠肿瘤外科, 河北 张家口 075000

2.河北北方学院附属第一医院 内分泌科, 河北 张家口 075000

【摘要】 目的 探究雌二醇是否是影响胃癌发病性别差异的关键因素,并从雌激素受体(ER)方面探讨可能的机制。方法 选取2012年6月至2020年3月河北北方学院第一附属医院收治的胃癌患者372例,对患者的性别、年龄、病理学分型等临床资料进行统计分析。通过建立异种移植瘤小鼠模型来观察性别对胃癌细胞EC109异种移植瘤的影响。体外培养胃癌EC109细胞激光共聚焦显微镜检测ER α 和ER β 的表达。通过细胞活力和迁移能力分析在细胞水平上雌激素抗肿瘤效应的可能机制。结果 胃癌的入院患者中男性高于女性(男91.13%,女8.87%, $P<0.05$)。胃癌细胞异种移植瘤模型结果表明,雌性小鼠的异种植物重量体重之比低于雄性小鼠,与雄性组比较,雌性组的抑瘤率高达73.65%。细胞免疫荧光检测显示,ER α 在胃癌的细胞核中表达,ER β 则检测不到。细胞迁移能力结果显示,雌二醇降低胃癌细胞迁移能力,ER拮抗剂抵消了雌二醇对胃癌细胞迁移能力的影响,ERS抑制剂可以对抗雌二醇对胃癌细胞迁移能力的抑制效应,ER激动剂可增强雌二醇对胃癌细胞迁移能力的抑制效应。细胞生长活力结果与细胞迁移能力结果具有相同的趋势。结论 性别差异参与胃癌的发生发展,雌二醇通过ER α 抑制胃癌细胞的活力和迁移。

【关键词】 胃癌; 性别; 雌激素; 雌激素受体

The role of estradiol in the development of gastric cancer

Zhao Yifeng¹, Li Mingxia², Zhang Shuai¹, Li Yun¹, Zhang Yu¹, Bi Renjie¹, Li Shuguang^{1*}

1.Department of Gastrointestinal Tumor Surgery, the First Hospital Affiliated to Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

2.Department of Endocrinology, the First Hospital Affiliated to Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

*Corresponding author: Li Shuguang, E-mail: 59li@163.com

【Abstract】 Objective To explore whether estradiol is a key factor affecting gender differences in gastric cancer, and to explore the possible mechanism from estrogen receptors. **Method** A total of 372 patients with gastric cancer admitted to the First Affiliated Hospital of Hebei North University from June 2012 to March 2020 were included in this study. The clinical data of the patients, including gender, age, and pathological type, were analyzed to explore the effects of gender. The effect of gender on EC109 xenograft tumours was observed by establishing a xenograft tumour mouse model. The expression of estrogen receptor (ER) α and ER β in gastric cancer EC109 cells cultured in vitro was detected by laser confocal microscopy, and the cell viability and migration capacity were analyzed to observe the effect of estrogen on gastric cancer cells in vitro. **Result** The male patients were significantly higher than the female patients (91.13%:8.87%, $P<0.05$). The results of the gastric cancer cell xenograft model showed that the xenograft weight and the ratio of xenograft weight to body weight of female mice were lower than those of male mice, and the tumor

基金项目:河北省2020年度医学科学研究课题计划项目(20200502)

*通信作者:李曙光, E-mail: 59li@163.com

inhibition rate of female mice was as high as 73.65% compared with the male group. Immunofluorescence assay showed that ER α was expressed in the nucleus of gastric cancer, but ER β was not detected. The cell migration capacity results showed that estradiol decreased the migration capacity of gastric cancer cells, ER antagonists counteracted the effect of estradiol on the migration capacity of gastric cancer cells, ERS inhibitors counteracted the inhibitory effect of estradiol on the migration capacity of gastric cancer cells, and ER agonists enhanced the inhibitory effect of estradiol on the migration capacity of gastric cancer cells. The cell growth viability results showed the same trend as the cell migration ability results. **Conclusion** Gender are involved in the development of gastric cancer and estradiol inhibits the viability and migration of gastric cancer cells via ER α .

【Key words】 Gastric cancer; Sex; Estrogen; Estrogen receptor

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 每年约有 100 万新发病例, 超过 72 万死亡; 在中国胃癌新发病例也高达 40 万~50 万, 占世界总新发病例的 40% 以上^[1]。流行病学调查发现, 男性胃癌发病率是女性 2 倍以上, 但是女性绝经后这种差异消失^[2], 这一结果提示雌激素在胃癌的发生和发展过程中发挥重要作用。雌激素不仅仅是一种类固醇性激素, 它几乎调控着机体所有的关键功能, 如糖脂代谢、骨骼发育、神经功能、心血管功能、卵泡生长、水盐代谢等^[3-4]。雌激素由芳香化酶催化雄激素去甲基化形成, 在体内有 3 种不同的亚型: 雌酮 (estrone, E1)、雌二醇 (estradiol, E2)、雌三醇 (estriol, E3), 其中雌二醇的生物活性最强。雌激素不同生物学效应的发挥有赖于其特异性的受体及受体后信号转导。目前已知的雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 包括 α 和 β 两大类, 由于其受体后信号转导机制的差别, 即便接受相同配体的信息表现出的生物学效应也具有明显的差异^[5]。近年来, 研究人员证明雌激素及其受体在胃肠道中发挥着重要作用^[6], 并影响许多胃肠道疾病的进展, 包括胃反流、胃癌、消化性溃疡、胃癌、炎症性肠病、肠易激综合征和结肠癌^[7]。本研究旨在探讨雌激素是否是影响胃癌发病性别差异的关键因素, 并从 ER 方面探讨可能的机制。

1 材料和方法

1.1 临床资料 选取 2012 年 6 月至 2020 年 3 月河北北方学院第一附属医院收治的 372 例胃癌患者资料。术后经病理切片分析确诊。

1.2 细胞培养 人胃癌细胞细胞株 EC109 由河北北方学院生命科学研究提供。细胞生长于

10% 胎牛血清 (Gibco) 和 1% 双抗的 RPMI1640 培养基 (Gibco) 中, 置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱。

1.3 异种移植模型建立 收集指数生长阶段的胃癌细胞 EC109 并以 1000 转/min 的速度离心 5 min。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 2 次后, 用不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养基将细胞浓度调整为 5 \times 10⁷ 细胞/ml。将 1 \times 10⁷ 细胞皮下注射到 4~6 周龄 C57 小鼠的右侧腹壁来建立胃癌细胞肿瘤异种移植。荷瘤小鼠分为雄性组和雌性组; 每组包括 8 只小鼠。所有动物手术操作均在异氟烷气体麻醉下进行, 程序经河北北方学院动物伦理委员会批准。饲养 4 周后, 颈椎脱臼处死小鼠, 取肿瘤组织、拍照并称重。雌性组的抑瘤率计算公式为: 抑瘤率 = (雄性组平均肿瘤重量 - 雌性组平均肿瘤重量) / 雄性组平均肿瘤重量 \times 100%。

1.4 细胞活力分析 胃癌细胞 EC109 分为对照组 (载体)、E2 组 (10 nmol/L)、E2+ICI 组 (10 nmol/L E2 和 1 μ mol/L ICI 182780, ER 拮抗剂)、E2+4-PBA (ERS 抑制剂) 组 (10 nmol/L E2 和 5 nmol/L 4-PBA) 和 ER 激动剂伊霉素 (TM) 组 (10 μ g/ml)。CCK-8 法检测细胞活力: 将在指数生长阶段的细胞以 5000 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 最终体积为 100 μ l, 并进行各种处理 24 h。向每个孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液, 孵育 4 h。通过测量 450 nm 处的吸光度来计算细胞活力。所有实验重复 3 次, 数据以每次处理 3 个孔的 (均数 \pm 标准差) 表示。

1.5 细胞迁移分析 进行细胞培养划痕愈合测定以分析细胞迁移。在指数生长阶段的细胞以 1 \times 10⁵/ml 的密度接种到 6 孔板中, 最终体积为 2 ml。细胞生长至汇合, 并使用 200 μ l 微量移液器尖端在汇合的单层中形成线性划痕。然后用 PBS 洗涤

细胞以消除分离的细胞。在显微镜下拍照以记录每个孔上的划痕。暴露于各种处理 24 h 后,在显微镜(200×)下监测划痕边缘的运动。使用 ImageJ 软件测量划痕两侧之间的区域。细胞迁移率由划痕两侧的相对面积计算得出。计算公式如下:细胞迁移率=(处理前划痕面积-处理后的划痕面积)/(处理前的划痕面积)×100%。

1.6 免疫荧光分析 细胞计数后,将指数生长期的细胞以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种到共聚焦培养皿中,最终体积为 200 μl ,培养 16~18 h。在无血清 RPMI 1640 培养基中培养 24 h 后,将细胞暴露于各种处理 24 h。然后用 PBS 洗涤细胞并用 4%多聚甲醛/PBS 固定 30 min。Triton X-100 透化后,用 5%正常牛血清白蛋白封闭细胞 30 min,并分别与抗 ER α (1:100, ab32063, Abcam) 和抗 ER β (1:100, ab212351, Abcam) 孵育,4℃下过夜。用 PBS 冲洗后,将培养皿与相应的荧光二抗孵育 90 min。DAPI 染色 5 min 后,将培养皿安装好,并在激光共聚焦显微镜(奥林巴斯,日本)下观察、拍照并分析。

1.7 统计学分析 使用 SPSS 22.0 进行统计分析。所有实验均独立进行至少 3 次。正态分布资料均表示为(均数±标准差)。使用单因素方差分析(ANOVA)比较组间差异,并对所有数据进行事后检验。异种移植的相关结果通过两个独立样本 *t* 检验进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌的性别差异 372 例胃癌患者中,男性 339 例(91.13%),女性 33 例(8.87%),男女之比约

10:1。男性胃癌患者比例高于女性($P < 0.05$)。372 例患者中,最小 36 岁,最大 80 岁,男性患者平均发病年龄(61.38 ± 8.34)岁低于女性[(65.97 ± 7.51)岁, $P < 0.05$](表 1)。胃癌类型以鳞状细胞癌为主,占患者总数的 88.98%(331/372),男性占 88.79%(301/339),女性患者为 90.91%(30/33)。男性和女性患者鳞状细胞癌的占比差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。此外,不同性别间淋巴结转移率差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 1A),但不同性别间外膜浸润率差异有统计学意义($P < 0.05$)(图 1B)。

2.2 性别差异对小鼠异种移植瘤的影响 雌性小鼠的异种移植瘤重量低于雄性小鼠,雌性小鼠异种移植瘤与体重之比低于雄性小鼠,差异均有统计学意义。与雄性小鼠比较,雌性小鼠的抑瘤率高达 73.65%($P < 0.05$)(图 2)。

表 1 2012 年 6 月至 2020 年 3 月河北北方学院第一附属医院 372 例胃癌患者性别年龄分布

性别	例数[例(%)]	年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)
男性	265 (71.24)	61.38±8.34
女性	107 (28.76)	65.97±7.52
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05

表 2 2012 年 6 月至 2020 年 3 月河北北方学院第一附属医院 372 例胃癌患者的类型分布[例(%)]

胃癌类型	男性	女性
腺癌	236(89.06)	97(90.65)
鳞状细胞癌	4(1.51)	1(0.93)
神经内分泌瘤	25(9.43)	9(8.41)
合计	265	107

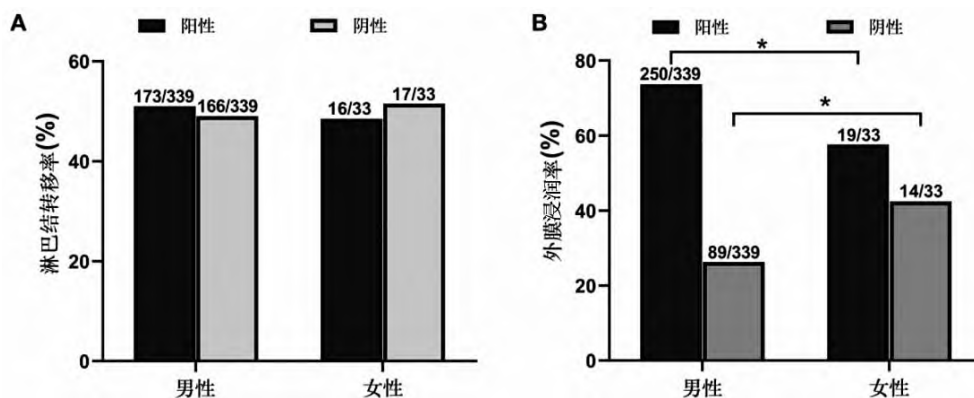


图 1 2012 年 6 月至 2020 年 3 月 372 例胃癌患者不同性别间淋巴结转移率、外膜浸润率的差异
注:A,不同性别间淋巴结转移率差异无统计学意义;B,不同性别间外膜浸润率差异有统计学意义,* $P < 0.05$ 。

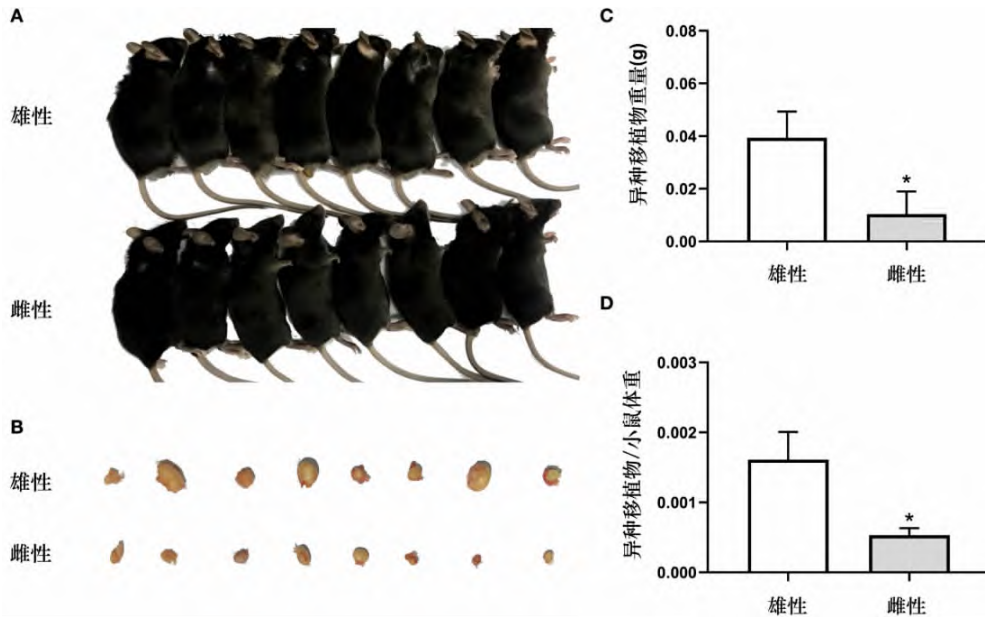


图2 雄性和雌性小鼠胃癌异种移植比较

注:A,小鼠异种移植模型的建立;B,雄性和雌性小鼠肿瘤异种移植物的形态;C,雌雄小鼠肿瘤重量比较,雄鼠(0.039 ± 0.010)g,雌鼠(0.010 ± 0.002)g;D,雌雄小鼠肿瘤重量与体重的比率比较,雄鼠 0.002 ± 0.000 ,雌鼠 0.001 ± 0.000 ; * $P < 0.05$ 。

2.3 胃癌细胞内 ERs 的表达 免疫荧光显示 ER α 在胃癌的细胞核中表达,未检测到 ER β (图3)。

2.4 雌二醇对胃癌细胞迁移和活力的影响 与对照组相比,雌二醇降低了胃癌细胞的迁移能力($P < 0.05$)。相反,ER拮抗剂 ICI 抵消了雌二醇对胃癌细胞迁移能力的影响;ER抑制剂 4-PBA 可以对抗雌二醇对胃癌细胞迁移能力的抑制效应,

ER激动剂 TM 可增强雌二醇对胃癌细胞迁移能力的抑制效应(图4A、B)。与对照组相比,雌二醇可以降低胃癌细胞生长活力($P < 0.05$),ER拮抗剂 ICI 抵消了雌二醇对胃癌细胞生长活力的影响;4-PBA 可以对抗雌二醇对胃癌细胞生长活力的抑制效应, TM 可增强雌二醇对胃癌细胞生长活力的抑制效应(图4C)。

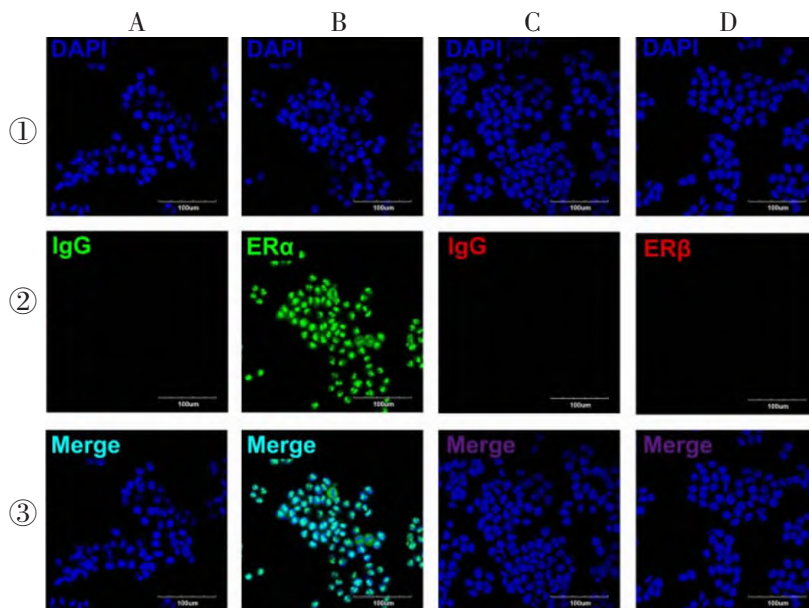


图3 共聚焦显微镜下观察胃癌细胞中雌激素受体的表达

注:第①行为细胞核染色图;第②行为蛋白质染色图;第③行为合成图。A列为 ER α 阴性对照组;B列为 ER α 染色组;C列为 ER β 阴性对照组;D列为 ER β 染色组。

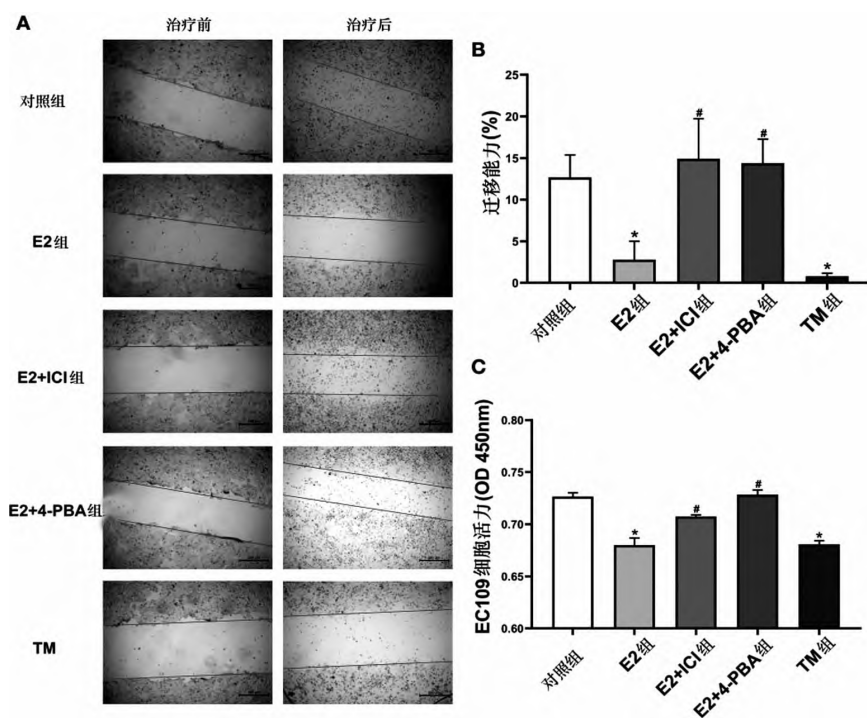


图4 雌二醇治疗对胃癌细胞活力和迁移能力的影响

3 讨论

胃癌的发生、发展存在显著的性别差异,即便肿瘤切除术后,女性总生存率仍高于男性^[8],吸烟、肥胖、运动及生活环境等已知的原因无法很好地解释这种性别差异^[9]。结合流行病学调查和基础研究,更多学者认为性激素可能在胃癌发病中起重要作用^[10]。本研究收集并分析了河北北方学院第一附属医院9年来接受手术治疗的372例胃癌患者的临床资料,其中男性患者的比例高于女性。本研究建立了异种移植模型,以验证小鼠的性别是否影响胃癌的发展。结果表明,雌性小鼠的异种移植瘤重量和异种移植瘤重量/体重均低于雄性小鼠,雌性小鼠的抑瘤率比雄性小鼠高70%以上,差异均有统计学意义。这些结果提示了性别可能在胃癌发展中的发挥重要作用。

流行病学调查显示,胃癌风险的增加与雌激素水平的降低有关^[11];更年期提前会患胃癌的风险^[12]。绝经前食管鳞状细胞癌女性患者的生存期比绝经后患者显著延长,血清雌二醇水平较高的女性患者生存率也显著增加^[13]。此外,一项关于绝经激素治疗的流行病学研究证实,曾经使用MHT的人患胃腺癌和胃鳞状细胞癌的风险降低。仅使

用雌激素的MHT使用者患胃腺癌的风险显著降低^[14]。也有研究报道,雌激素具有降低食管鳞状细胞癌和食管腺癌风险的作用^[15]。基于这些流行病学研究的分析,本研究提出了雌激素具有抗胃癌作用的假说。

雌激素通过ER发挥多样性的生物学作用,研究证实,胃鳞状细胞癌和腺癌组织中ER α 和ER β 均有表达^[16]。Ge等^[17]研究发现,ER α 表达与胃癌患者预后不良有关,ER β 与胃癌淋巴结转移呈负相关。Zhang等^[18]研究还表明,胃食管癌中ER α 过表达预示着较差的生存状态和较低的肿瘤分化程度,而ER β 过表达预示着较好的生存状态和较高的肿瘤分化程度。本研究表明,EC109胃癌细胞系中ER α 高表达,ER β 几乎检测不到。体外研究表明,雌激素对肿瘤细胞生长有一定的抑制作用,并可促进胃癌细胞凋亡。同时发现,只有具有ERs的胃癌细胞才会表现出受到雌激素的抑制效应,没有ER的细胞则不会。细胞活力实验结果表明,雌二醇处理24h降低了胃癌细胞的活力;细胞划痕试验表明,雌二醇处理24h降低了胃癌细胞的迁移能力。ER拮抗剂ICI提高了用雌二醇处理的胃癌细胞的活力和迁移能力。这些结果表明,雌二醇可以降低胃癌细胞的活力和迁移能力,

这与以往研究雌二醇对胃癌细胞生长有一定的抑制作用是一致的。

应该指出的是,异种移植实验存在一些局限性。本研究并未对小鼠雄激素或雌二醇等类固醇激素的水平进行全面检测,也未观察ICI对在体肿瘤生长的影响,这些问题应该在今后的工作中详细探讨。因此,未来应该对胃癌动物和胃癌患者血清中的类固醇激素水平进行全面分析,阐明类固醇激素在胃癌发生发展中的作用,将使血清类固醇激素水平的检测成为胃癌筛查和个体化治疗的简单而重要的工具。

综上所述,本研究表明性别差异参与胃癌的发生发展,雌二醇通过雌激素受体抑制胃癌细胞的活力和迁移。然而,雌二醇对胃癌细胞抑制效应的具体分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 彭智.GLOBCAN 胃癌流行病学数据解读[J/CD].肿瘤综合治疗电子杂志,2018,4(4):63-65.
- [2] 张思维,杨之洵,郑荣寿,等.2013年中国胃癌发病与死亡分析[J].中华肿瘤杂志,2017,39(7):547-552.
- [3] JIN J, WU P, ZHANG X, et al. Understanding the interaction of estrogenic ligands with estrogen receptors: a survey of the functional and binding kinetic studies [J]. J Environ Sci Health C Toxicol Carcinog, 2020, 38(2):142-168.
- [4] WEI Y, HUANG J. Role of estrogen and its receptors mediated-autophagy in cell fate and human diseases [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 191:105380.
- [5] EYSTER KM. The Estrogen Receptors: An Overview from Different Perspectives [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1366:1-10.
- [6] YANG X, GUO Y, HE J, et al. Estrogen and estrogen receptors in the modulation of gastrointestinal epithelial secretion [J]. Oncotarget, 2017, 8(57): 97683-97692.
- [7] CHEN C, GONG X, YANG X, et al. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease [J]. Oncol Lett, 2019, 18(6): 5673-5680.
- [8] CHOI Y, KIM N, KIM KW, et al. Sex-based differences in histology, staging, and prognosis among 2983 gastric cancer surgery patients [J]. World J Gastroenterol, 2022, 28(9): 933-947.
- [9] JEONG SH, AN J, KWON KA, et al. Predictive risk factors associated with synchronous multiple early gastric cancer [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(26): e7088.
- [10] CHANG WC, HUANG SF, LEE YM, et al. Cholesterol import and steroidogenesis are biosignatures for gastric cancer patient survival [J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 692-704.
- [11] LEAL YA, SONG M, ZABALETA J, et al. Circulating Levels of Sex Steroid Hormones and Gastric Cancer [J]. Arch Med Res, 2021, 52(6): 660-664.
- [12] JEONG SM, YOO JE. Association between obesity and the risk of gastric cancer in premenopausal and postmenopausal women: A nationwide cohort study [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2021, 36(10): 2834-2840.
- [13] LI J, WANG Q, ZHENG Y, et al. Development of a mass spectrometry-based pseudotargeted metabolomics strategy to analyze hormone-stimulated gastric cancer cells [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 180: 113041.
- [14] JANG YC, LEUNG CY, HUANG HL. Association of hormone replacement therapy with risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 12997.
- [15] DUE SL, WATSON DI, HUSSEY DJ. Oestrogen receptors: A potential therapeutic target in oesophageal adenocarcinoma [J]. ANZ J Surg, 2021, 91(7-8): 1390-1396.
- [16] LIJIMA K. Does Estrogen Contribute to the Esophageal Barrier Function in Women [J]. Gut Liver, 2018, 12(4): 373-374.
- [17] ZHANG D, KU J, YI Y, et al. The prognostic values of estrogen receptor alpha and beta in patients with gastroesophageal cancer: A meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(46): e17954.
- [18] GE H, YAN Y, TIAN F, et al. Prognostic value of estrogen receptor α and estrogen receptor β in gastric cancer based on a meta-analysis and The Cancer Genome Atlas (TCGA) datasets [J]. Int J Surg, 2018, 53: 24-31.