DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2017.09.004

·基础研究·

S100A4协同HIF-1通过WNT/β-catenin通路调控胃癌细胞SGC-7901的侵袭和迁移

廖煜,任宁川,房殿亮,胡永强,黄剑,曾波,何平,杨天文(重庆医科大学附属永川医院 消化内科,重庆 402160)

[摘　要] 目的:探讨S100A4在低氧条件下对胃癌细胞SGC-7901迁移及侵袭的作用及其可能的机制。方法:将化学合成的si-S100A4质粒和阴性对照(si-Ctrl)质粒分别转染胃癌细胞株SGC-7901,根据培养条件的不同分为常氧条件(normal,Nor)+ si-S100A4组、Nor + si-Ctrl组、低氧条件(hypoxia,Hyp)+ si-Ctrl)组、Hyp + si-S100A4组。应用Western blotting检测低氧条件下胃癌SGC-7901细胞中HIF-1及S100A4蛋白的表达变化,检测低氧条件下胃癌细胞中抑制S100A4的表达对细胞中S100A4、β-catenin及TCF-4表达的影响;Transwell小室法分别检测低氧及S100A4对胃癌SGC-7901细胞迁移及侵袭能力的影响。结果:低氧条件下:(1)胃癌SGC-7901细胞中HIF-1和S100A4表达水平均明显升高(3.12±0.23 *vs* 1.02±0.05,*P*<0.01;2.75±0.32 *vs* 1.05±0.07,*P*<0.01),且两者变化明显相关(*r* =0.67,*P*<0.01);(2) 胃癌SGC-7901细胞的侵袭及迁移能力增加[(223.31±35.12) *vs* (131.29±26.40)、(142.27±26.37)个, *P*<0.05]。干扰低氧条件中S100A4的表达:(1) 明显减少低氧对细胞中β-catenin及TCF-4的促进作用(均*P*<0.01);(2) 明显减少低氧对SGC-7901细胞的侵袭及迁移能力的促进作用[(161.37±31.02) *vs* (88.21±22.42)、(95.36±21.29)个, *P*<0.05]。结论:S100A4能够促进胃癌细胞SGC-7901的迁移和侵袭,该作用可能是通过S100A4协同HIF-1通过Wnt/β-catenin通路的调控实现的。

[关键词] 缺氧诱导因子-1; S100A4蛋白; Wnt/β-catenin通路; 胃癌;侵袭
[中图分类号] R737.1 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385X(2017)09-0851-05

S100A4 cooperates with HIF-1 to regulate migration and invasion of gastric cancer cells via WNT/β-catenin pathway

LIAO Yu, REN Ningchuan, FANG Dianliang, HU Yongqiang, HUANG Jian, ZENG Bo, HE Ping, YANG Tianwen
(Department of Digestive System, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

[Abstracts] Objective: To explore the effects of S100A4 on the migration and invasion capacity of gastric cancer SGC-7901 cells under hypoxia condition, and to identify the possible mechanism; **Methods:** The gastric cancer cell line, SGC-7901 was transfected with chemically synthesized si-S100A4 plasmidand si-control plasmid (negative control). Depending on the different culture conditions, SGC-7901 cells were further divided into four groups: normoxia(Nor)+si-S100A4 group, Nor+si-Ctrl group, hypoxia(Hyp) + si-Ctrl group and Hyp+si-S100A4 group. Under the hypoxia condition, the protein expressions of HIF-1 and S100A4 in SGC-7901 cells were detected using the Western blotting assay. We further explored the effects of si-S100A4 on the expression of S100A4, β-catenin and TCF-4 upon hypoxia condition. Moreover, the Transwell assay were conducted to explore the effects of hypoxia and si-S100A4 on the migration and invasion capacity of gastric cancer SGC-7901 cells. **Results:** Under the hypoxia condition, (1) the expression of HIF-1 and S100A4 in gastric cancer SGC-7901 cells were significantly up-regulated (3.12±0.23 *vs* 1.02±0.05, *P*<0.01; 2.75±0.32 *vs* 1.05±0.07, *P*<0.01), and the expressions were significantly correlated (*r*=0.67, *P*<0.01); (2) the migration and invasion capacity of SGC-7901 cells were significantly increased (223.31±35.12 *vs* 131.29±26.40, 142.27±26.37,*P*<0.05]. Under hypoxia+si-

[基金项目] 重庆市永川区科委项目(No. Ycstc,2013nc8017)。Project supported by the Science and Technology Commission Project of Chongqing Yongchuan District(No. Ycstc,2013nc8017)
[作者简介] 廖煜(1989-),女,硕士生,主要从事消化道肿瘤的早期筛查,E-mail:475404671@qq.com
[通信作者] 杨天文(YANG Tianwen,corresponding author),硕士,副主任医师,硕士生导师,主要从事消化道肿瘤及消化道内镜技术的研究,E-mail:yangtianwen_doc@126.com
[优先发表]

S100A4 condition: (1)the promotion effect of hypoxia on the expressions of β-catenin and TCF-4 was significantly reduced (all $P<0.01$); (2) the promotion effect of hypoxia on the migration and invasion ability of SGC-7901 cells was significantly decreased (161.37±31.02 *vs* 88.21±22.42、95.36±21.29, $P<0.05$). **Conclusion:** S100A4 promoted the migration and invasion capacity of gastric cancer SGC-7901 cells, which was possibly achieved by synergistically working with HIF-1 to regulate Wnt/β-catenin pathway.

[Key words] hypoxia inducible factor-1 (HIF-1); S100A4 protein; Wnt/β-catenin pathway; gastric cancer; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(9): 913-925. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.09.004]

胃癌是中国最常见的、病死率较高的消化道恶性肿瘤之一[1]。胃癌发生发展是一个多因素、多步骤参与的过程，其中癌细胞侵袭、转移是胃癌治疗失败及易复发的重要因素，因此深入了解其发病机制将有助于该病的防治[2]。近年来，肿瘤相关微环境在肿瘤发生发展中的作用倍受关注，尤其是低氧微环境。当实体肿瘤生长到一定体积时，瘤体中心的细胞则处于低氧状态，因此对低氧微环境的适应是肿瘤发生发展中一个关键的步骤[3]。低氧微环境可以通过调控多种基因而促进肿瘤发生和其浸润、转移，其中缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是重要的参与因子之一。本课题组前期研究[4]发现，HIF-1通过调控Wnt/β-catenin通路参与胃癌细胞的增殖及侵袭过程，但其具体的作用机制尚不明了。S100A4是Ca^{2+}结合蛋白S100家族成员，通过参与细胞骨架及细胞膜间相互作用、钙离子信号转导、细胞生长分化等，参与肿瘤的侵袭、转移过程[5]。HIF-1能够正向调控细胞中S100A4的表达[6]，而后者能够参与多种肿瘤细胞中Wnt/β-catenin通路的调控[7]。据此，笔者推测S100A4可能参与了HIF-1α介导的对Wnt/β-catenin通路及胃癌细胞侵袭、迁移能力的调控，本课题将通过一系列实验在胃癌细胞中验证这一推测。

1　材料与方法

1.1　细胞株及主要试剂

人胃癌细胞株SGC-7901购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。新生胎牛血清购自美国PAA有限公司，RPMI 1640培养基、0.25%胰酶(Trypsin-EDTA)、RIPA裂解液和脂质体2000转染试剂(Lipofectamine™ 2000)购自美国Invitrogen公司，化学合成的S100A4小干扰RNA片段(si-S100A4)、阴性对照(si-Ctrl)及Dhamafect 1转染试剂购自美国Thermo Fisher公司，8.0 μm孔径的Transwell小室购自美国Minipore公司，基质胶购自美国Sigma公司。兔抗人HIF-1、S100A4、β-catenin、TCF-4抗体购自美国Cell Signal Technology公司，兔抗人GAPDH多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司，增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence system，ECL)购自美国Millipore公司。

1.2　细胞培养、转染及分组

在含有10 %胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640完全培养基培养胃癌SGC-7901细胞，于5%CO_2、90%饱和湿度培育箱中培养。待细胞80%~90%汇合时，加入适量0.25%胰酶消化传代。将细胞提前1 d铺入细胞培养板中，次日转染时细胞单层汇合度约为50%，处于对数生长期。按照转染试剂说明书将si-S100A4质粒和对应的si-Ctrl质粒分别转染至胃癌SGC-7901细胞中。实验分为4组：常氧条件(normal，Nor)+si-S100A4(转染si-S100A4后在正常氧分压条件下培养24 h)、Nor+si-Ctrl组(转染si-Ctrl后在正常氧分压条件下培养24 h)、低氧条件(hypoxia, Hyp)+ si-Ctrl组(转染si-Ctrl后正常氧分压条件下培养8 h后，再在低氧条件下培养16 h)、Hyp+si-S100A4组(转染si-S100A4后在正常氧分压条件下培养8 h后，再在低氧条件下培养16 h)，其中低氧条件为37℃、5% CO_2、1%O_2、94%N_2的培养箱中培养。转染后6 h换新鲜完全培养基，继续培养以用于后续实验。

1.3　Transwell小室法检测胃癌细胞的迁移能力

将Transwell培养小室插入到24孔板中备用。细胞转染24 h后1 000×*g* 5 min，采用无血清的RPMI培养液制备密度为2×10^5个/ml单细胞悬液，取200 μl沿Transwell小室侧壁加入上室中；将600 μl含有20% FBS的培养液作为趋化因子加入Transwell小室下室中。在5% CO_2、37℃的条件下培养16 h后，弃除小室培养液，用湿棉签擦去小室上层细胞，PBS润洗2次，无水甲醇室温固定15 min，0.5%结晶紫染色15 min，室温下晾干后揭膜，中性树胶封固，光学显微镜下(×100)随机计数5个视野的穿膜细胞数。实验重复3次。

1.4　Transwell小室法检测胃癌细胞的侵袭能力

将稀释的Matrigel基质胶(1 mg/ml)40 μl缓慢加入至Transwell小室，37℃孵育1~2 h后基质胶凝固；细胞转染后24 h后，用无血清的RPMI培养液制备密度为4×10^5个/ml细胞悬液200 μl沿Transwell小室侧壁加入上室Matrigel胶上；将600 μl含有20% FBS的

培养基作为趋化因子加入Transwell小室下室中。在5% CO_2、37℃条件下培养16 h后取出小室，余实验步骤同1.3。

1.5 Western blotting检测胃癌细胞中相关蛋白的表达

用RIPA裂解液提取各组细胞转染48 h后胃癌细胞的总蛋白，按照BCA蛋白测定试剂盒说明书测定其浓度。将20~30 μg蛋白样品行10%SDS-PAGE分离，PVDF膜湿转后置于含5%脱脂奶粉的封闭液中封闭1 h，分别加入1:1 000的HIF-1、S100A4、β-catenin和TCF-4及1:20 000的GAPDH一抗稀释液孵育，4℃过夜，TBST缓冲液洗膜3次（10 min/次），分别加入1:5 000或1:10 000稀释（GAPDH）的HRP标记的山羊抗兔IgG二抗，室温孵育1 h，TBST缓冲液洗膜3次（10 min/次），ECL化学发光剂反应显影。

1.6 统计学处理

应用SPSS 17.1统计学软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 低氧条件下胃癌细胞SGC-7901中HIF-1及S100A4蛋白高表达

Western blotting检测结果（图1）表明，低氧条件下胃癌细胞SGC-7901中HIF-1表达水平明显升高（3.12 ± 0.23 *vs* 1.02 ± 0.05，t=12.40，P<0.01），同时S100A4的表达水平亦明显升高（2.75±0.32 *vs* 1.05±0.07，t=13.29，P<0.01），提示HIF-1与S100A4表达明显相关（r=0.67，P<0.05）。

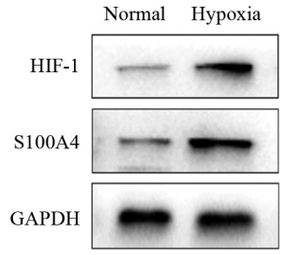
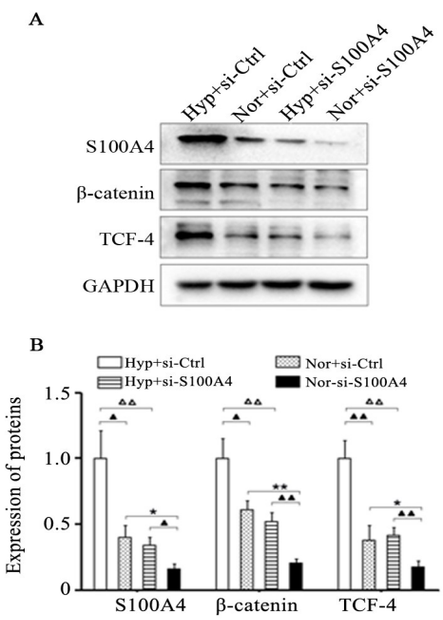


图1 低氧条件下胃癌SGC-7901细胞中HIF-1及S100A4蛋白的表达

Fig. 1 Expressions of HIF-1 and S100A4 protein in SGC-7901 cells upon hypoxia condition

2.2 低氧条件下胃癌细胞中S100A4对Wnt/β-catenin通路的调控

Western blotting检测结果（图2）显示，正常培养条件下，转染si-S100A4后，能够明显抑制胃癌细胞中S100A4的表达（t =4.22, P< 0.05），且β-catenin（t = 2.96，P < 0.01）及其下游TCF-4的表达（t = 2.96，P < 0.05）均明显下降，表明S100A4干扰质粒表达有效；另一方面，转染对照质粒的、同时低氧处理的SGC-7901细胞中S100A4及Wnt通路下游的β-catenin（t = 5.23，P < 0.01）、TCF-4（t = 6.60，P < 0.01）表达均明显升高，再次表明低氧处理能够诱导细胞中S100A4及其下游通路的激活表达，而干扰S100A4表达能够拮抗低氧处理对胃癌细胞中S100A4的表达促进作用。



$^{*}P$<0.05; $^{\blacktriangle}P$<0.05; $^{**}P$<0.01; $^{\blacktriangle\blacktriangle}P$<0.01; $^{\triangle\triangle}P$<0.01

图2 低氧培养下抑制SGC-7901细胞中S100A4表达对Wnt/β-catenin通路的调控

Fig. 2 Effects of down-regulating S100A4 expression in SGC-7901 cellson the regulation of Wnt//β-catenin pathway

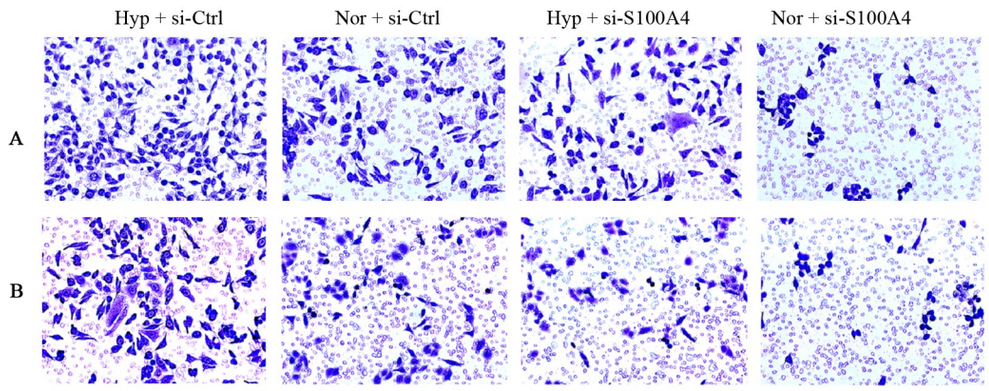
2.3 S100A4参与HIF-1对胃癌细胞迁移的调控

Transwell小室法检测结果（图3A）显示，常规培养下转染si-S100A4组的穿膜细胞数目明显少于转染si-Ctrl组和低氧条件下转染si-S100A4组[(60.06±17.04) *vs* (142.27±26.37)、(131.29±26.40)个，F=10.67, P<0.05]。其中，低氧条件下转染si-Ctrl组穿膜细胞数目明显高于低氧条件下转染si-S100A组及常规培养下转染si-Ctrl组[(223.31±35.12) *vs* (131.29±26.40)、(142.27±26.37)个，F=8.66, P<0.05)，结果表明低氧能够诱导胃癌SGC-7901细胞迁移。

2.4 S100A4参与HIF-1对胃癌细胞的侵袭调控

Matrigel侵袭试验结果（图3B）表明，常规培养下转染si-S100A4组穿膜细胞数目明显少于转染si-Ctrl组和低氧条件下转染si-S100A4组[(42.64±15.13) *vs* (95.36±21.29)、(88.21±22.42)个，F =6.22, P<0.05]。其

中，低氧条件下转染si-Ctrl组穿膜细胞数目明显高于低氧条件下转染si-S100A4及常规培养下转染si-Ctrl组[(161.37±31.02) *vs* (88.21±22.42)、(95.36±21.29)个，F=7.64, P<0.05]，结果表明低氧培养下抑制S100A4的表达能够明显抑制低氧对细胞侵袭能力的诱导作用。



A: Migration test; B: Invasion test

图3 低氧条件下S100A4对SGC-7901细胞迁移和侵袭能力的影响(结晶紫染色，×200)

Fig. 3 Effects of S100A4 on the migration and invasion capacity of SGC-7901 cells upon hypoxia condition (Crystal violet staining, ×200)

3 讨 论

Wnt/β-catenin通路是细胞内重要信号通路，参与多个生物学进程调控，如细胞分化、上皮向间质细胞转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)、细胞的增殖凋亡等[8-9]. 胃癌组织中Wnt3表达明显升高，而且抑制其表达能够明显抑制细胞的增殖，诱导其凋亡[10]。此外还有多项研究证实Wnt/β-catenin通路在胃癌发生发展中发挥重要作用[11]，但是其具体的作用机制尚未完全阐明。本研究拟探讨S100A4是否参与低氧环境对胃癌细胞中Wnt/β-catenin通路调控作用。

S100A4是Ca^{2+}结合蛋白S100家族成员，其通过参与细胞骨架及细胞膜间相互作用、钙离子信号转导等作用，可降低细胞间黏附力、重塑细胞外基质，促进细胞新生血管形成，因此其在肿瘤细胞侵袭、转移过程中发挥重要作用[5, 12]。有研究[6]发现，*S100A4*基因的第一个内含子中存在低氧反应元件(hypoxia responsive element, HRE)，进一步实验证实，HIF-1能够通过该区域与S100A4结合，从而调控其表达。另一方面，Wnt/β-catenin通路可能参与了S100A4对直肠癌细胞侵袭及迁移能力的调控[7]。本研究中，低氧条件下胃癌细胞中S100A4伴随HIF-1表达明显升高，而抑制胃癌细胞中S100A4的表达能够明显拮抗HIF-1对下游β-catenin及TCF-4的促进作用，验证了HIF-1通过激活S100A4参与胃癌细胞中Wnt/β-catenin通路调控。

目前已在多种肿瘤组织证实S100A4与肿瘤的转移复发密切相关，如结肠癌、乳腺癌、食管癌等[12-13]。有研究[14]发现，S100A4在胃癌组织中呈现高表达，且与肿瘤的分化、大小、浸润深度密切相关，提示S100A4可能参与胃癌的侵袭、转移过程。本实验证实，在低氧条件下，胃癌细胞的迁移及侵袭能力均明显增强；而抑制低氧微环境下胃癌细胞中S100A4的表达能够拮抗低氧对其迁移及侵袭能力的促进作用，证实了S100A4能够促进胃癌细胞的迁移及侵袭能力，而其具体的机制可能是参与HIF-1/Wnt/β-catenin通路。

总之，本研究在前期研究的基础上，进一步在胃癌细胞中验证了HIF-1通过激活S100A4调控Wnt/β-catenin通路促进了胃癌细胞的迁移和侵袭，这将为进一步研究低氧在胃癌中的作用奠定实验基础。

[参考文献]

[1] Information Committee of Korean Gastric Cancer Association. Korean gastric cancer association nationwide survey on gastric cancer in 2014[J/OL]. J Gastric cancer, 2016, 16(3): 131-140[2017-02-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5206320/. DOI:10.5230/jpc.2016.16.3.131.

[2] YU J, ZHANG Y, LEUNG L H, et al. Efficacy and safety of angiogenesis inhibitors in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J/OL]. J Hematol Oncol, 2016, 9(1):111[2017-02-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070169/.DOI: 10.1186/s13045-016-0340-8.

[3] RANKIN E B, GIACCIA A J. Hypoxic control of metastasis[J]. Science, 2016,352(6282):175-180. DOI:10.1126/science.aaf4405.

[4] 杨天文, 刘洪兰, 张俊文. HIF-1α、β-连环蛋白、IMP3和PCNA在胃癌

SGC-7901细胞增殖中的作用[J]. 肿瘤, 2013, 33(3): 234-238.DOI: 10.3781/j.issn.1000-7431.2013.03.005.

[5] DONATO R, CANNON B R, SORCI G, et al. Functions of S100 proteins [J/OL]. Curr Mol Med,2013, 13(1): 24-57[2017-02-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3707951/.PMCID: PMC3707951.

[6] HORIUCHI A, HAYASHI T, KIKUCHI N, et al. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1alpha to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene[J]. Int J Cancer, 2012, 131(8): 1755-1767. DOI: 10.1002/ijc.27448.

[7] SACK U, WALTHER W, SCUDIERO D, et al. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/beta-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells [J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(18): 3344-3354. DOI: 10.1091/mbc.E10-09-0739.

[8] ANASTAS JN, MOON RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(1): 11-26. DOI:10.1038/nrc3419.

[9] KAHN M. Can we safely target the WNT pathway? [J/OL]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(7): 513-532[2017-02-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4426976/.DOI:10.1038/nrd4233.

[10] WANG H S, NIE X B, WU R B, et al. Downregulation of human Wnt3 in gastric cancer suppresses cell proliferation and induces apoptosis[J/OL].Onco Targets Ther,2016,9:3849-3860[2017-02-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4930241/.DOI:10.2147/OTT.S101782.

[11] CHIURILLO M A. Role of the Wnt/β-catenin pathway in gastric cancer: an in-depth literature review[J]. World J Exp Med, 2015, 5(2): 84-102. DOI:10.5493/wjem.v5.i2.84.

[12] JI Y F, HUANG H, JIANG F, et al. S100 family signaling network and related proteins in pancreatic cancer (review)[J]. Int J Mol Med, 2014, 33 (4): 769-776. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1633.

[13] DAHLMANN M, KOBELT D, WALTHER W, et al. S100A4 in cancer metastasis: Wnt signaling-driven interventions for metastasis restriction [J/OL]. Cancer(Basel), 2016, 8(6): E59[2017-02-13]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931624/.DOI: 10.3390/cancers8060059.

[14] LING Z, LI R. Clinicopathological and prognostic value of S100A4 expression in gastric cancer: a meta-analysis[J/OL]. Int J Biol Marker, 2014, 29(2): e99-111[2017-02-13]. http://www.biological-markers.com/issues/archive.DOI: 10.5301/jbm.5000054.

［收稿日期］2017-02-15 ［修回日期］ 2017-06-30
［本文编辑］党瑞山