

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00805

S100A7 表达下调阻断 NF- κ B 途径诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡

赵洁¹, 郭长升¹, 韩怀忠¹, 徐琦¹, 宋书杰¹, 孙立东¹, 石磊¹, 常勤征¹, 盛之玲², 唐家宏^{1*}

1. 解放军 155 中心医院消化内科, 开封 475000

2. 郑州大学基础医学院生理学教研室, 郑州 450006

[关键词] S100A7; 胃肿瘤; NF- κ B; 细胞凋亡

[中图分类号] R 735.2

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2013)07-0805-04

Down-regulation of S100A7 expression blocks NF- κ B pathway-induced cell apoptosis in gastric carcinoma SGC-7901 cells

ZHAO Jie¹, GUO Chang-sheng¹, HAN Huai-zhong¹, XU Qi¹, SONG Shu-jie¹, SUN Li-dong¹, SHI Lei¹, CHANG Qin-zheng¹, SHENG Zhi-ling², TANG Jia-hong^{1*}

1. Department of Gastroenterology, No. 155 Central Hospital of PLA, Kaifeng 475000, Henan, China

2. Department of Physiology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450006, Henan, China

[Key words] S100A7; stomach neoplasms; NF- κ B; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7): 805-808]

S100A7 与肿瘤的发生、发展密切相关。我们的前期研究显示,胃癌组织和细胞中均呈现 S100A7 的过表达^[1-2],并且其表达下调能明显抑制胃癌 SGC-7901 细胞的增殖和迁移^[2]。本研究中我们通过流式细胞术分析 S100A7 表达下调对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响,并探讨其与 NF- κ B 途径之间的关系,为以 S100A7 为靶点的胃癌基因治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞研究所。脂质体 2000 购自美国 Invitrogen 公司;RPMI 1640 和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 Beckman CoulterTM公司;Caspase-Glo[®]-3/7、-8、-9 试剂盒购自美国 Promega 公司;细胞裂解液购自宝生物工程(大连)有限公司;S100A7 siRNA(sc-106459)、对照 siRNA(sc-37007)、抗体 S100A7(sc-52948)、p65(sc-372)、I κ B α (sc-371)、p-I κ B α (sc-8404)、Bcl-2(sc-492)、Bcl-x_L(sc-7195)和 β -actin(sc-130301)均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养及转染 SGC-7901 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中于 37℃、5% CO₂ 的孵

箱中培养,当细胞约达 90% 融合时,按脂质体 2000 的操作步骤将 S100A7 siRNA 和对照 siRNA 转染 SGC-7901 细胞,转染后细胞分为 3 组:未转染组(不作任何处理);对照 siRNA 组(采用对照 siRNA 转染)和 S100A7 siRNA 组(采用 S100A7 siRNA 转染)。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡 3 组 SGC-7901 胃癌细胞(1×10⁶/mL)于转染后 48 h 收获,将其置于预冷 PBS 中洗涤。取 100 μ L 细胞置于流式细胞管中,分别加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI),避光孵育 15 min,接着采用流式细胞仪检测 1×10⁴ 个细胞,最后采用 CellQuest 软件分析细胞凋亡结果。

1.4 细胞中 Caspase-3/-9 活性分析 根据 Caspase-Glo[®]-3/7、-8、-9 试剂盒的操作步骤,分析转染后 48 h 的 3 组 SGC-7901 胃癌细胞中的 caspase-3/-9 活性。具体实验步骤如下:将 3 组细胞分别置于缓冲液[25 mmol/L HEPES (pH 7.5), 5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Pefabloc[®] 和胃酶抑素、亮肽素和抑肽酶各 1 μ g/mL]中充分混匀和悬浮后,于低温离心机中 16 000×g 离心 15 min,澄清提取液。将提取液中的蛋白浓度调整为 1 mg/mL,于 -80℃ 冻存。将稀释后的提取液(10 μ g/mL)与 Caspase-Glo[®] 检测试剂等体积混合,置于 96 孔培养板中。室温孵育 1 h,然后采用发

[收稿日期] 2013-01-10

[接受日期] 2013-05-24

[作者简介] 赵洁, 硕士, 副主任医师. E-mail: zjie1010@163.com

* 通信作者(Corresponding author). E-mail: tangjihong155@163.com

光检测仪读取数据。

1.5 蛋白质印迹分析检测 3组 SGC-7901 胃癌细胞于转染后 48 h 收获,采用细胞裂解液提取总蛋白,并采用 Bradford 法测定各组蛋白浓度。将 50 μ g 总蛋白在上样缓冲液中煮 10 min,采用 10% SDS-PAGE 进行蛋白分离,将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC)上。将 NC 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 于室温封闭 2 h,分别加一抗(S100A7、p65、I κ B α 、p-I κ B α 、Bcl-2、Bcl-x_L 和 β -actin;按 1:200 稀释)于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 中,置于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,洗膜结束后加二抗室温孵育 2 h,然后曝光。最后用 Gene Tools 软件分析蛋白相对表达量。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 S100A7 siRNA 下调 SGC-7901 细胞中 S100A7 蛋白的表达 与未转染组和对照 siRNA 组相比,S100A7 siRNA 组中 S100A7 蛋白表达下调($P < 0.05$),而未转染组和对照 siRNA 组之间 S100A7 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

图 1 蛋白质印迹分析检测 S100A7 蛋白在 3 组胃癌 SGC-7901 细胞中的表达

* $P < 0.05$ 与未转染组和对照 siRNA 组比较. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 S100A7 表达下调对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 流式细胞术检测(图 2)结果表明,S100A7 siRNA 组中 SGC-7901 细胞早期凋亡率[(19.02 \pm 0.44)%]高于未转染组 [(7.87 \pm 0.26)%]和对照 siRNA 组 [(8.06 \pm 0.14)%],差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

图 2 流式细胞术检测 SGC-7901 细胞凋亡结果

2.3 S100A7 表达下调对 SGC-7901 细胞 Caspase-3/-9 活性的影响 与未转染组和对照 siRNA 组相比,S100A7 siRNA 组中 Caspase-3/-9 的活性均上升(P 均 < 0.05 ,图 3)。

2.4 S100A7 表达下调阻断 NF- κ B 途径 与未转染组和对照 siRNA 组相比,S100A7 siRNA 组中 p65 和 p-I κ B α 蛋白的表达下调,而 I κ B α 蛋白的表达上调(P 均 < 0.05 ,图 4)。提示 S100A7 能阻断胃癌 SGC-7901 细胞中 NF- κ B 途径。

2.5 S100A7 表达下调对 NF- κ B 途径下游调控蛋白表达的影响 S100A7 siRNA 组中 Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白表达均低于未转染组和对照 siRNA 组(P 均 < 0.05 ,图 5)。

图 3 SGC-7901 细胞 Caspase-3/-9 活性的检测结果

* $P < 0.05$ 与未转染组和对照 siRNA 组比较. $n=3, \bar{x} \pm s$

图4 蛋白质印迹分析检测3组胃癌SGC-7901细胞中NF- κ B途径中关键蛋白p65、I κ B α 和p-I κ B α 的表达

* $P < 0.05$ 与未转染组和对照 siRNA 组比较. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

图5 蛋白质印迹分析检测3组胃癌SGC-7901细胞中NF- κ B途径中下游靶蛋白Bcl-2和Bcl-xL的表达

* $P < 0.05$ 与未转染组和对照 siRNA 组比较. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

S100A7对肿瘤发生发展的作用涉及到多种细胞生物学过程,包括:增殖、细胞周期、凋亡、免疫调节以及浸润和转移等^[3-6]。我们前期的研究也表明,采用 siRNA 干扰胃癌细胞 SGC-7901 中 S100A7 的表达能

抑制细胞的增殖和迁移^[2]。为了进一步探讨 S100A7 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响,本研究首先利用 S100A7 siRNA 转染 SGC-7901 细胞,降低胃癌 SGC-7901 细胞中 S100A7 蛋白的表达,然后采用流式细胞术分析 S100A7 表达下调对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响,结果显示,S100A7 siRNA 组中 SGC-7901 细胞的早期凋亡率高于未转染组和对照 siRNA 组 (P 均 < 0.01),提示 S100A7 表达下调能诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

研究表明,S100A7 表达水平与增加的细胞存活率和 NF- κ B 途径密切相关^[7-8],NF- κ B 途径在肿瘤细胞凋亡中发挥重要的功能^[9-11]。为了探讨 S100A7 下调介导 SGC-7901 细胞凋亡的可能分子机制,我们分析了转染 S100A7 siRNA 前后 NF- κ B 途径中关键分子 p65、I κ B α 和 p-I κ B α 蛋白的表达,结果发现,S100A7 表达下调后 p65、p-I κ B α 蛋白水平均降低 (P 均 < 0.05),I κ B α 蛋白水平升高 ($P < 0.05$),提示 S100A7 表达下调能阻断胃癌细胞的 NF- κ B 途径。为了进一步探讨 NF- κ B 途径中与细胞凋亡有关的下游调控基因的表达,我们采用蛋白质印迹法分析了转染 S100A7 siRNA 前后 Bcl-2 和 Bcl-x_L 蛋白表达的变化,结果发现,S100A7 在胃癌 SGC-7901 中表达水平的下调能降低 Bcl-2 和 Bcl-x_L 的表达 (P 均 < 0.05),这可能是 S100A7 调控胃癌细胞凋亡过程的主要分子机制。

总之,本研究结果显示,S100A7 表达下调能促进胃癌细胞凋亡,其介导的细胞凋亡与 NF- κ B 途径的阻断密切相关,阐明 S100A7 和 NF- κ B 途径之间的关系有望为胃癌的分子靶向治疗提供理论依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 赵洁,米文,孙红英,陈会军,孙晓黎,曾燕,等. S100A7 mRNA 和蛋白在胃癌组织中的表达及其意义 [J]. 世界华人消化杂志,2012,20:1509-1514.
- [2] 赵洁,王薇,孙红英,陈会军,毛海州,曾燕,等. S100A7 表达下调对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和迁移能力的影响 [J]. 第二军医大学学报,2012,33:851-854. Zhao J, Wang W, Sun H Y, Chen H J, Mao H Z, Zeng Y, et al. Effect of down-regulated S100A7 expression on proliferation and migration of gastric carcinoma cell line SGC-7901 [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33: 851-854.

- [3] Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K I, Sakaguchi M, et al. S100A7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products[J]. *Oncol Lett*, 2012, 3:1149-1153.
- [4] Deol Y S, Nasser M W, Yu L, Zou X, Ganju R K. Tumor-suppressive effects of psoriasin (S100A7) are mediated through the β -catenin/T cell factor 4 protein pathway in estrogen receptor-positive breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286:44845-44854.
- [5] Morgan M R, Jazayeri M, Ramsay A G, Thomas G J, Boulanger M J, Hart I R, et al. Psoriasin (S100A7) associates with integrin $\beta 6$ subunit and is required for $\alpha\beta 6$ -dependent carcinoma cell invasion[J]. *Oncogene*, 2011, 30:1422-1435.
- [6] Mandal S, Curtis L, Pind M, Murphy L C, Watson P H. S100A7 (psoriasin) influences immune response genes in human breast cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313:3016-3025.
- [7] Emberley E D, Niu Y, Curtis L, Troup S, Mandal S K, Myers J N, et al. The S100A7-c-Jun activation domain binding protein 1 pathway enhances prosurvival pathways in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:5696-5702.
- [8] Carlsson H, Yhr M, Petersson S, Collins N, Polyak K, Enerbäck C. Psoriasin (S100A7) and calgranulin-B (S100A9) induction is dependent on reactive oxygen species and is downregulated by Bcl-2 and antioxidants[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4:998-1005.
- [9] Carbone C, Melisi D. NF- κ B as a target for pancreatic cancer therapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16 (Suppl 2):S1-S10.
- [10] Madonna G, Ullman C D, Gentilcore G, Palmieri G, Ascierto P A. NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma[J]. *J Transl Med*, 2012, 10:53.
- [11] Liu Y C, Chiang I T, Hsu F T, Hwang J J. Using NF- κ B as a molecular target for theranostics in radiation oncology research[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012, 12:139-146.

[本文编辑] 商素芳