

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01563

低氧模拟剂氯化钴对胃癌细胞 BGC823 中 *S100A4* 基因表达的影响

滑君¹, 付浩^{1,2}, 张瑞秀¹, 陈丹琦¹, 闫扬¹, 陈芳杰¹, 孙开来¹, 孙秀菊¹

1. 中国医科大学医学遗传学教研室, 沈阳 110001;
2. 沈阳医学院生物化学教研室, 沈阳 110046

摘要: *S100A4* 基因是肿瘤侵袭转移相关的重要基因, 该基因高表达与胃癌浸润、淋巴结转移及胃癌细胞体外侵袭力密切相关。为探讨 *S100A4* 基因高表达的机制, 文章应用低氧模拟剂氯化钴处理胃癌细胞 BGC823, RT-PCR、免疫组化、免疫荧光及 Western blotting 方法分别检测 BGC823 细胞中 *S100A4* mRNA 及蛋白表达情况。结果显示, 氯化钴处理胃癌 BGC823 细胞后, *S100A4* mRNA 及蛋白表达明显增加。提示低氧模拟剂氯化钴可促进胃癌细胞 BGC823 中 *S100A4* 基因表达。

关键词: 胃癌; 低氧; 氯化钴; *S100A4* 基因

Effect of cobalt chloride on *S100A4* expression in human gastric cancer cell BGC823

HUA Jun¹, FU Hao^{1,2}, ZHANG Rui-Xiu¹, CHEN Dan-Qi¹, YAN Yang¹, CHEN Fang-Jie¹, SUN Kai-Lai¹, SUN Xiu-Ju¹

1. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China;
2. Department of Biochemistry, Shenyang Medical College, Shenyang 110046, China

Abstract: *S100A4* is an important metastasis-associated gene. Researches have confirmed the close correlation between overexpression of *S100A4* gene and gastric cancer's infiltration, lymph node metastasis and *in vitro* invasiveness of gastric cancer cells. In order to investigate the mechanism of overexpression of *S100A4* gene, hypoxia mimetic cobalt chloride (CoCl₂) was used to treat gastric cancer cell BGC823, and then the expression of *S100A4* mRNA and protein in BGC823 cells were detected by RT-PCR, immunohistochemistry, immunofluorescence, and Western blotting analysis. After treatment with CoCl₂, the expression of *S100A4* mRNA and protein in BGC823 cell was increased. These results suggested that hypoxia mimetic cobalt chloride could increase the expression of *S100A4* gene in gastric cancer cell BGC823.

Keywords: gastric cancer; hypoxia; cobalt chloride; *S100A4*

低氧是实体肿瘤的共同特征, 它是癌细胞快速增殖与血液供应相对滞后的结果。低氧引起肿瘤细胞生物学特性发生改变, 如细胞侵袭、转移能力增

加, 并可能对放化疗产生耐受^[1]。低氧对细胞的影响主要通过调节基因表达而实现, 因此研究低氧环境下转移相关基因的表达变化具有重要意义。*S100A4*

收稿日期: 2008-03-11; 修回日期: 2008-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30570848)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30570848)]

作者简介: 滑君(1979-), 辽宁沈阳人, 硕士研究生, 专业方向: 肿瘤细胞分子遗传学。E-mail: huajungirl@yahoo.com.cn

通讯作者: 孙秀菊(1965-), 辽宁大连人, 教授, 研究方向: 肿瘤细胞分子遗传学。E-mail: xjsun@mail.cmu.edu.cn

蛋白是 Ca^{2+} 结合蛋白 S100 家族的成员之一,可降低肿瘤细胞间黏附能力、促进细胞外基质水解和重塑、增强肿瘤细胞运动能力、促进血管生成等,在肿瘤侵袭转移过程中发挥关键性作用^[2-6]。现已证实 S100A4 高表达与胃癌浸润、淋巴结转移及胃癌细胞体外侵袭力密切相关^[7-10],但是目前关于 S100A4 表达调控的研究报道甚少。低氧是否可调节 S100A4 表达,尚未见报道。我们应用生物信息学软件在 S100A4 基因的调控区预测到低氧反应元件,推测微环境低氧可能上调 S100A4 基因表达。因此本实验观察了低氧模拟剂氯化钴处理对人胃癌细胞系 BGC823 中 S100A4 表达的影响,旨在研究微环境低氧对胃癌侵袭转移影响的机制,并探讨 S100A4 基因表达调控的新途径。

1 材料和方法

1.1 主要材料

BGC823 细胞系; RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (GIBCO 公司); 氯化钴 (Sigma 公司); 兔抗人 S100A4 多克隆抗体 (Neomarks 公司); β -actin 抗体 (北京中杉生物公司); 总 RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 (Promega 公司) 及 PCR 扩增试剂盒 (天根公司); PCR 引物 (上海生物工程技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和低氧诱导

取低分化的人胃腺癌细胞系 BGC823, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 另加青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的条件下培养。细胞生长至 60%~70% 融合度后, 实验组加入含低氧模拟剂氯化钴 (终浓度为 100~500 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基, 对照组为正常培养基, 继续培养 24 h 后收集细胞。

1.2.2 RT-PCR 检测 BGC823 细胞中 S100A4 mRNA 表达

收集实验组和对照组细胞, 应用 Trizol 提取总 RNA, 采用逆转录试剂盒将 mRNA 逆转录合成 cDNA, 取反转录产物 2 μL 进行 PCR 反应。S100A4 引物序列:

上游: 5'-GATGTGATGGTGTCCACCTT-3';

下游: 5'-ATTTCTTCCTGGGCTGCTTA-3'。

扩增片段长度为 277 bp, 复性温度为 58 $^{\circ}\text{C}$; 内

参照 β -actin 引物序列:

上游: 5'-CCAGATCACTTTTGAGACCT-3';

下游: 5'-TTGAAGGTA GTTTCGTGGAT-3'。

扩增片段长度为 480 bp, 复性温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。循环条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, LabWORKS 凝胶图像分析系统分析扩增产物条带的光密度值, 并通过 S100A4 光密度值与 β -actin 光密度值的比值反映 S100A4 mRNA 表达量的高低。

1.2.3 Western blotting 检测 BGC823 细胞中 S100A4 蛋白表达

收集实验组和对照组细胞, 立即置于冰上, 吸净培养基并以 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 漂洗细胞 1~2 次, 提取细胞总蛋白, 以 Bradford 法作蛋白定量后, 取 50 μg 蛋白作 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (5% 积层胶, 10% 分离胶), 电转膜后, 加入兔抗人 S100A4 多克隆抗体 (1:1000) 和羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体, β -actin 作为内参照, 利用 ECL 显色试剂盒显色, 应用图象分析仪测定条带光密度值, 以 S100A4 光密度值与 β -actin 光密度值的比值来反映 S100A4 蛋白表达的高低。

1.2.4 免疫细胞化学及免疫荧光检测 S100A4 蛋白在 BGC823 细胞中的表达

将 BGC823 细胞接种于玻片上, 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理 24 h 后, 取出玻片, 4% 甲醛固定。一抗为兔抗人 S100A4 多克隆抗体 (1:1000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。免疫组化采用北京中杉金桥生物技术有限公司 SP 检测试剂盒进行, DAB 显色, 光学显微镜下观察结果; 免疫荧光二抗为 FITC 标记的鼠抗兔 IgG (1:2000 稀释), 室温孵育 2 h 后荧光显微镜下观察结果。

1.2.5 统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 氯化钴对 BGC823 细胞 S100A4 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 不同浓度氯化钴处理 24 h 后, BGC823 细胞中 S100A4 mRNA 表达改变如下: 100 $\mu\text{mol/L}$ 、500 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理后, S100A4 mRNA 表达无明显变化, 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理后

S100A4 mRNA 表达明显升高(图 1)。采用 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理细胞重复实验 3 次, 结果显示实验组 mRNA 表达(1.5567 ± 0.2676)显著高于对照组(0.8267 ± 0.1850)($P < 0.05$), 可见 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理可以使 *S100A4* mRNA 表达显著增高。

2.2 氯化钴对 BGC823 细胞 *S100A4* 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24 h 后, *S100A4* 蛋白表达明显增高(图 2), 实验组 *S100A4* 蛋白表达(1.6633 ± 0.3496)显著高于对照组(0.7300 ± 0.1868)($P < 0.05$)。

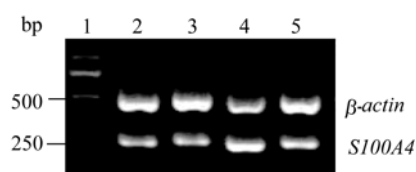


图 1 不同浓度 CoCl_2 处理后 BGC823 细胞中 *S100A4* mRNA 的表达情况

1: DL2000 分子量标志; 2: 对照组 BGC823 细胞; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 ; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 ; 5: 500 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 。

Fig. 1 Expression of *S100A4* mRNA in BGC823 cells after treatment with CoCl_2

1: DL2000 DNA marker; 2: control; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 ; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 ; 5: 500 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 。

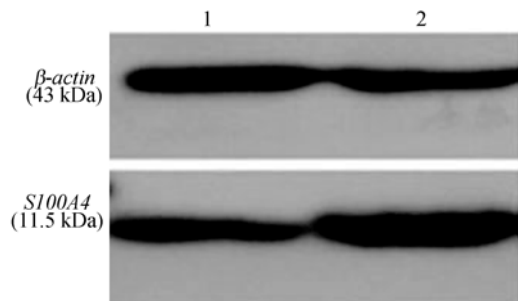


图 2 Western blotting 检测 BGC823 细胞中 *S100A4* 蛋白表达

1: 对照组; 2: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24 h。

Fig. 2 Expression of *S100A4* protein in BGC823 cells detected by Western blotting analysis

1: Control; 2: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment for 24 h.

2.3 免疫组化和免疫荧光检测 *S100A4* 在 BGC823 细胞中的表达

免疫组化(图 3)及免疫荧光(图 4)结果显示, 氯化钴处理后 *S100A4* 蛋白表达明显高于对照组。

3 讨论

近年来微环境低氧与肿瘤的关系倍受关注, 低

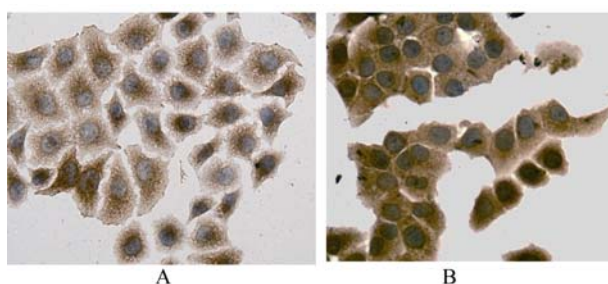


图 3 免疫组化检测 BGC823 细胞中 *S100A4* 蛋白的表达
A: 对照组; B: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24 h。

Fig. 3 Expression of *S100A4* protein in BGC823 cells detected by immunohistochemistry

A: Control; B: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment for 24 h.

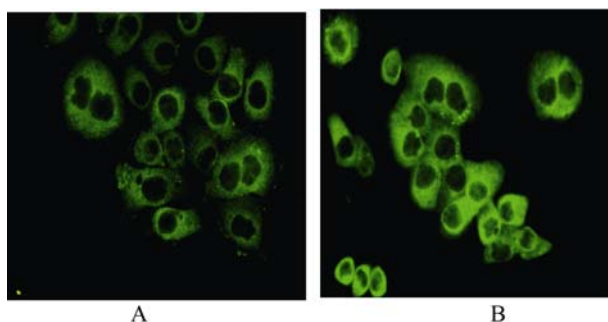


图 4 免疫荧光检测 BGC823 细胞中 *S100A4* 蛋白的表达
A: 对照组; B: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24 h。

Fig. 4 Expression of *S100A4* protein in BGC823 cells detected by immunofluorescence

A: Control; B: 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment for 24 h.

氧通过调控多种基因表达而影响肿瘤细胞的生物学特性。为探讨低氧对胃癌细胞中 *S100A4* 表达是否具有调控作用, 本实验首先应用不同浓度低氧模拟剂氯化钴对胃癌 BGC823 细胞进行体外模拟低氧处理, RT-PCR 结果显示, 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理 24 h 后 BGC823 细胞中 *S100A4* mRNA 表达无明显改变, 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理 24 h 后 *S100A4* mRNA 表达明显增高, 500 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理后 *S100A4* mRNA 表达较对照组稍高, 但是低于 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理组。鉴于 200 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴处理 24 h 后 *S100A4* mRNA 表达明显增高, 进一步采用该条件处理细胞后, 应用 Western blotting 以及免疫组化等方法检测细胞中 *S100A4* 蛋白质表达, 结果一致显示氯化钴处理后 *S100A4* 蛋白表达较对照组明显增高, 表明微环境低氧可使胃癌细胞 *S100A4* 基因表达增高; 而 *S100A4* 作为一种重要转移相关基因, 其高表达可使胃癌细胞生物学特性发生变化, 如侵袭转移等能力增加, 因而促进胃癌的进展, 可见 *S100A4* 是低氧对胃癌细胞影响的一个重要介导者。

另外, 以往的研究发现 *S100A4* 在乳腺癌^[11]、结直肠癌^[12]、食管鳞癌^[13]、骨肉瘤^[14]、前列腺癌^[15]等肿瘤中均呈高表达, 且与肿瘤侵袭、转移和患者的预后不良有关。而这些肿瘤作为实体瘤也存在低氧微环境, 因此我们在胃癌中的研究结果可能对这些肿瘤侵袭转移的分子机制研究也具有借鉴意义。

关于低氧调控 *S100A4* 表达的分子机制目前尚不清楚, 低氧诱导的关键性分子事件是 HIF-1 (Hypoxia induced factor 1) 的激活, HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的异源二聚体, 与低氧反应元件 (Hypoxia Responsive Element, HRE) 结合后激活靶基因如 VEGF、EPO、Glut1 等转录^[16], 产生相应的生物学效应, 我们应用生物信息学软件预测到 *S100A4* 基因的内含子存在 HRE, 目前本课题组已初步鉴定了该反应元件(结果待发表), 因而 *S100A4* 基因很可能是 HIF-1 的靶基因。

总之, 本研究首次证明低氧模拟剂氯化钴处理可以使胃癌细胞 BGC823 中 *S100A4* 基因表达增高, 该结果加深了低氧对胃癌侵袭转移影响分子机制的认识, 同时也发现了 *S100A4* 基因表达调控的新途径-微环境低氧。该结果为胃癌侵袭转移的防治研究提供了重要科学依据, 也为其他肿瘤的研究提供了新思路。

参考文献(References):

- [1] Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald- Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer*, 1999, 80(4): 617-623.[\[DOI\]](#)
- [2] Mazzucchi L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 7-13.
- [3] Jenkinson SR, Barraclough R, West CR, Rudland PS. S100A4 regulates cell motility and invasion in an *in vitro* model for breast cancer metastasis. *Br J Cancer*, 2004, 90(1): 253-262.[\[DOI\]](#)
- [4] Keirsebilck A, Bonne S, Bruyneel E, Vermassen P, Lukanidin E, Mareel M, van Roy F. E-cadherin and metastasis (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumour cell families. *Cancer Res*, 1998, 58(20): 4587-4791.
- [5] Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3386-3394.
- [6] Grigorian M, Andresen S, Tulchinskyn E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, C Annette, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem*, 2001, 276(25): 22699-22708.[\[DOI\]](#)
- [7] SUN Xiu-Ju, SUN Kai-Lai, FU Hao, WANG Shu-Bao, CAO Hui, ZHAO Yan-Yan, CHEN Jun-Qing. The correlation of nm23H1 and S100A4 mRNA expression with gastric cancer lymph nodes metastasis. *Natl Med J China*, 2001, 81(1): 59-60.
孙秀菊, 孙开来, 付浩, 王舒宝, 曹慧, 赵彦艳, 陈峻青. *S100A4* 基因和 *nm23H1* 基因相关表达与胃癌淋巴结转移的关系. *中华医学杂志*, 2001, 81(1): 59-60.
- [8] SUN Xiu-Ju, SUN Kai-Lai, CHEN Jun-Qing, LI Fu-Cai, ZHAO Yan-Yan. The correlation of nm23H1 and S100A4 mRNA expression with *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cells. *J Chin Med Univ*, 2001, 30(3): 161-163.
孙秀菊, 孙开来, 陈峻青, 李福才, 赵彦艳. *nm23H1* 和 *S100A4* mRNA 表达与胃癌细胞体外侵袭力的关系. *中国医科大学学报*, 2001, 30(3): 161-163.
- [9] Lee OJ, Hong SM, Razvi MH, Peng D, Powell SM, Smoklin M, Moskaluk CA, El-Rifai W. Expression of calcium-binding proteins S100A2 and S100A4 in Barrett's adenocarcinomas. *Neoplasia*, 2006, 8(10): 843-850.[\[DOI\]](#)
- [10] Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Yoon SH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(31): 4852-4856.
- [11] Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1595-1603.
- [12] Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. S100A4(p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer*, 2002, 86(3): 409-416.[\[DOI\]](#)
- [13] Ninomiya I, Ohta T, Fushida S, Endo Y, Hashimoto T, Yagi M, Fujimura T, Nishimura G, Tani T, Shimizu K, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T, Miwa K. Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 2001, 18(4): 715-720.[\[DOI\]](#)
- [14] Pedersen KB, Andersen K, Fodstad O, Maelandsmo GM. Sensitization of interferon-gamma induced apoptosis in human osteosarcoma cells by extracellular S100A4. *BMC Cancer*, 2004, 19(4): 52.
- [15] Saleem M, Kweon MH, Johnson JJ, Adhami VM, Elcheva I, Khan N, Bin Hafeez B, Bhat KM, Sarfaraz S, Reagan-Shaw S, Spiegelman VS, Setaluri V, Mukhtar H. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(40): 14825-14830.
- [16] Airley RE, Mobasheri A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy*, 2007, 53(4): 233-256.[\[DOI\]](#)