

钙离子结合蛋白 S100A16 对胃癌细胞生物学行为的影响

蔡宏伟,洪 晔,苏东明*

南京医科大学病理学系,江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探讨钙结合蛋白 S100A16 在胃癌组织和细胞中的表达,及其对胃癌细胞 SGC-7901 增殖、迁移、侵袭能力的影响。方法:应用免疫组织化学染色法检测 S100A16 在胃癌和相应癌旁组织中的差异表达。应用 Western blot 检测正常胃上皮细胞 GES-1 以及胃癌细胞 MGC-803 和 SGC-7901 中 S100A16 的表达水平。将 S100A16 高表达质粒和干扰质粒分别转染至人胃癌细胞株 SGC-7901 中,用 Western blot 检测各组细胞中 S100A16 的表达。采用磺酰罗丹明 B(sulforhodamine B,SRB)比色法和克隆形成实验检测细胞的增殖能力。采用划痕实验检测细胞迁移能力,采用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力。结果:在胃癌组织及胃癌细胞中,S100A16 的表达量明显高于相应癌旁组织及正常胃上皮细胞。SRB 染色和克隆形成实验显示,过表达 S100A16 会增加 SGC-7901 细胞的增殖能力,敲低 S100A16 后增殖能力降低。划痕实验 Transwell 实验显示,过表达 S100A16 会增加 SGC-7901 细胞的迁移和侵袭能力,敲低 S100A16 则会降低。免疫共沉淀实验显示在胃癌细胞 SGC-7901 中,S100A16 与 YBX-1 存在结合。结论:胃癌组织及细胞中 S100A16 的表达明显上调,S100A16 在胃癌中的异常表达可能是由于与 YBX-1 的相互结合,进而促进胃癌细胞增殖、迁移、侵袭从而影响胃癌的发生发展。

[关键字] 胃癌;钙结合蛋白 S100A16;增殖;YBX-1

[中图分类号] R75.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)07-892-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20180705

Effects of calcium binding protein S100A16 on biological behavior of gastric cancer cells

Cai Hongwei, Hong Ye, Su Dongming*

Department of Pathology, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of calcium binding protein S100A16 in gastric cancer tissues and cells and its effect on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cell SGC-7901. **Methods:** Immunohistochemical staining was used to detect the differential expression of S100A16 in 8 pairs of gastric cancer and corresponding adjacent tissues. S100A16 overexpression plasmid and empty plasmid, interference plasmid and empty vector were transfected into human gastric cancer cell line SGC-7901 respectively, and the expression of S100A16 in each group was detected by Western blot. SRB staining and colony formation assay were used to detect the proliferation of cells in each group. Scratch test was used to detect the migration ability of cells in each group. Transwell assay was used to detect the invasive ability of each group. **Results:** The expression of S100A16 in gastric cancer tissues and gastric cancer cells were significantly higher than that in corresponding paracancerous tissues and normal gastric epithelial cells. SRB staining and colony formation assays showed that overexpression of S100A16 increased the proliferation of SGC-7901 cells and knocked down the proliferation of S100A16 cells. Scratch and Transwell experiments showed that overexpression of S100A16 increased SGC-7901 cell migration and invasiveness, while knockdown of S100A16 decreased. Western blot analysis showed that the expression of YBX-1 in SGC-7901 cells transfected with S100A16 over-expression plasmid was significantly increased compared with the control group. Co-immunoprecipitation experiments showed that S100A16 bound to YBX-1 in gastric cancer cell line SGC-7901. **Conclusion:** The expressions of S100A16 in gastric cancer tissues and cells are significantly up-regulated. The abnormal expression of S100A16 in gastric cancer may be due to the interaction with YBX-1, thereby promoting the proliferation, migration, invasion of gastric cancer cells and affecting the occurrence and development of gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; calcium binding protein S100A16; proliferation; YBX-1

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(07):892-897]

[基金项目] 国家自然科学基金(81570779)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sudongming@njmu.edu.cn

胃癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,并且已成为癌症相关死亡的第三大原因^[1]。尽管胃癌发病率在世界范围内有所下降,但在中国的发病率(每10万人中有29.9人新发病)仍然很高。据估计,中国每年因胃癌死亡的人数约为221 478人,占世界胃癌死亡人数的一半^[2]。目前为止,手术仍然是胃癌唯一的治愈性疗法,但是一半以上的患者在进行根治术后又发生了局部或远处转移,或是在初次诊断时已经发生了转移^[3]。胃癌的发生发展是一个十分复杂的过程,涉及多种基因的改变^[4],所以,深入研究胃癌发生发展的分子机制成为亟待解决的问题,也为临床提供新治疗靶点的理论基础。

钙结合蛋白S100A16是S100家族中的第20个成员,与S100家族特异性EF-hand(14个氨基酸)不同,S100A16在C端的EF-hand只有12个氨基酸,而N端有15个氨基酸,并且缺少谷氨酸残基,谷氨酸残基在与Ca²⁺结合中起决定性作用,它提供2个重要的氧原子侧链作为Ca²⁺配体,所以N端EF-hand的功能是部分失活的,只能结合1个钙离子,但在二聚体形式时却具有更强的疏水作用,使S100A16的二聚体形式更加稳定^[5]。已有多篇文献报道,S100A16在肺癌、乳腺癌、结直肠癌等恶性肿瘤中的表达都有异常上调,并促进肿瘤细胞的增殖和迁移^[6-8]。临床上已将S100蛋白作为肿瘤标志物应用^[8-9],但其在胃癌中的表达尚未见报道。本文旨在探讨S100A16在胃癌中的表达,及其对胃癌细胞生物学行为的影响,期待为胃癌的治疗提供新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

8例样本来自于南京医科大学附属逸夫医院2016—2017年间被诊断为胃癌的患者,病理诊断均为腺癌,其中1例为低分化腺癌,1例为高分化腺癌,6例为中分化腺癌。组织芯片购于上海芯超公司,芯片包含100例胃癌组织及80例癌旁组织,组织类型均为腺癌。以上样本都经过2位病理科医生严格鉴定。

1.2 方法

1.2.1 细胞系和培养条件

SGC-7901、MGC-803以及胃黏膜上皮正常细胞系GES-1购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。细胞用含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基于37℃、含5%CO₂的潮湿恒温培养箱中常规培养。每1~2d更换新鲜培养基,当细胞融合度达到80%~90%时进行传代培养。

1.2.2 免疫组织化学染色

采用链霉菌生物素-过氧化物酶法(SP法)。兔抗人S100A16抗体购于美国Sigma公司,PV8000鼠兔通用型二抗系统及浓缩型DAB kit购于北京中杉金桥公司。染色结果由两位病理科医生分别评判,根据S100A16的表达量进行评分,阴性0分,弱阳性1分,阳性2分,强阳性3分。

1.2.3 蛋白质免疫印迹实验

RIPA裂解液裂解细胞20 min,提取细胞总蛋白。选取12%的SDS-PAGE胶进行蛋白质电泳,每孔加样品30 μg。湿转法将蛋白质转到PVDF膜上,室温条件下用5%的脱脂奶粉溶液封闭1.5 h。分别加入S100A16、Y-box结合蛋白1(YBX-1)一抗(Proteintech公司,美国)4℃过夜,次日室温孵育与一抗相应的二抗(Santa Cruz公司,美国)1 h。在摇床上进行以上操作,每个步骤之间用TBST洗膜10 min×3次,最后加ECL超敏发光液暗室内曝光,拍照并进行灰度分析。

1.2.4 胃癌细胞转染

S100A16质粒均获赠于南京医科大学第一附属医院老年科刘云教授课题组^[10]。所有用于转染的质粒载体(pCDNA-S100A16和空载体)经DNA Mini-prep或Miniprep盒(QIAGEN公司,德国)提取。按照使用说明书通过Lipofectamine 2000(上海Invitrogen公司)将pCDNA-S100A16或空载体转染至6孔板上培养的胃癌细胞。24 h后用于增殖、迁移、侵袭实验;48 h后收集细胞用于Western blot分析。

1.2.5 细胞增殖实验

本研究使用SRB染色和克隆形成来观察细胞增殖情况,在含有10%FBS培养基的96孔板中,每孔加入250个细胞,分别于0、24、48、72 h检测490 nm波长处吸光度值。在含有10% FBS培养基的6孔板中,每孔加入100个细胞,视细胞生长情况换液,出现肉眼可见细胞克隆时,进行结晶紫染色后拍照分析。这两个实验所选取的都是转染后24 h的细胞,并于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

1.2.6 划痕实验和细胞侵袭实验

取转染后24 h的细胞,进行划痕实验,划痕修复率(%)=[0 h划痕宽度(μm)-24 h划痕宽度(μm)]/0 h划痕宽度(μm)×100%。本研究采用Transwell小室检测各组细胞侵袭能力,用含5% FBS的培养基重悬转染24 h后的细胞,每个小室加入细胞数量为2×10⁴个。在小室下层加入600 μL含20% FBS的培养基,置于细胞培养箱培养10 h后取出小

室,结晶紫染色后在显微镜下随机选取5个视野拍照计数。

1.2.7 免疫共沉淀实验

应用胃癌细胞SGC-7901进行免疫共沉淀实验,在细胞融合率为80%~85%时提取细胞总蛋白。分别加入YBX-1和S100A16抗体并与Protein A agarose混匀进行吸附,次日洗脱后煮样进行蛋白质电泳。

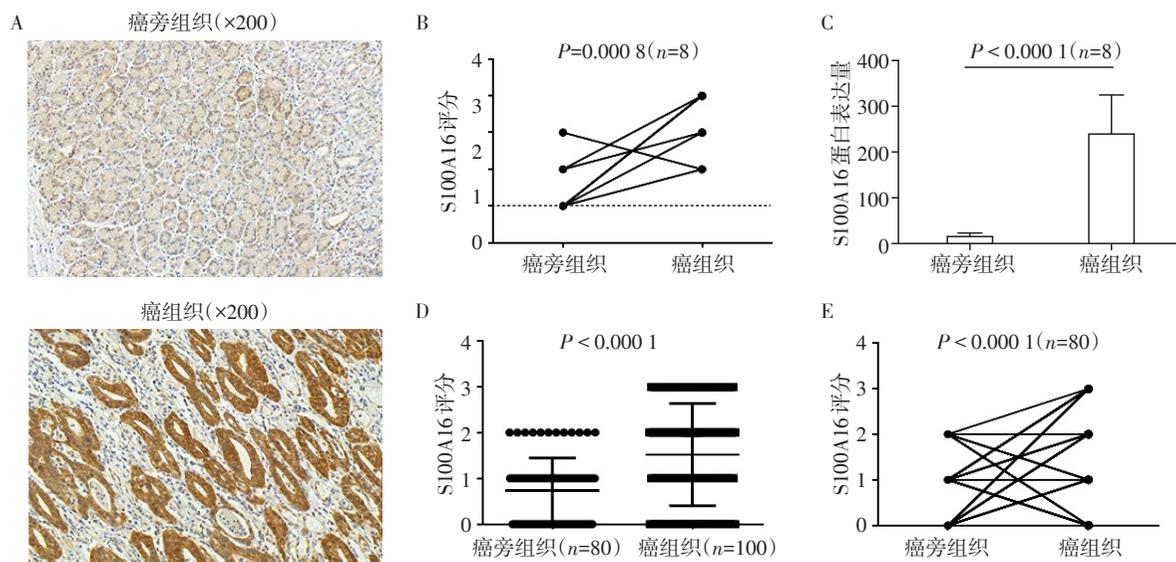
1.3 统计学方法

使用SPSS软件进行统计分析。以上所有实验重复3次,计量结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。配对数据应用配对Student *t* 检验,其余数据使用Student *t* 检验进行统计学显著性分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织中S100A16表达明显高于相应癌旁组织

将8例胃癌样本与对应癌旁组织进行配对,使用免疫组化染色分别检测S100A16的表达水平,结果可见胃癌组织中的S100A16定位于细胞膜和细胞浆。7例癌组织S100A16表达强于癌旁组织,1例癌组织表达低于癌旁组织(图1A)。将8对标本进行评分及量化分析,并进行配对*t* 检验(图1B、C),差异具有统计学意义。以上结果说明在胃癌组织中,S100A16表达显著上调。对组织芯片进行免疫组化染色,结果一致(图1D、E)。



A:同一患者癌组织及癌旁组织S100A16免疫组化染色图($\times 200$);B:8例配对标本免疫组化染色结果评分统计;C:8例配对标本免疫组化染色结果量化统计;D:组织芯片未配对染色结果评分统计;E:组织芯片配对染色结果评分统计。

图1 S100A16在胃癌组织中表达显著升高

Figure 1 S100A16 expression was significantly increased in gastric cancer tissues

2.2 胃癌细胞中S100A16表达明显高于正常胃上皮细胞

为进一步验证以上结果,选取了正常胃上皮细胞系GES-1和胃癌细胞系MGC-803、SGC-7901,提取细胞蛋白进行蛋白质免疫印迹实验,结果显示,在胃癌细胞系中,S100A16的表达明显高于正常胃上皮细胞系(图2)。

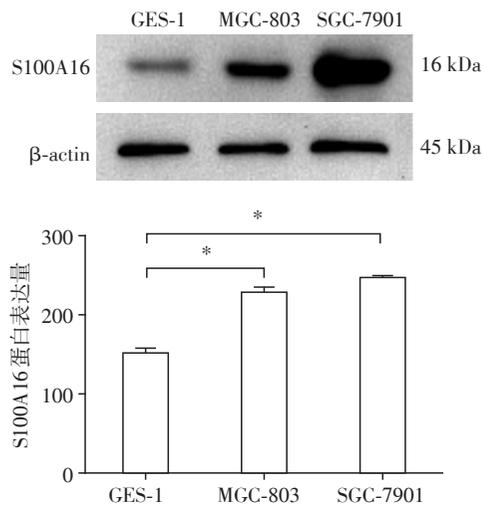
2.3 S100A16促进胃癌细胞SGC-7901的增殖、迁移、侵袭能力

在胃癌细胞SGC-7901中成功转染了S100A16过表达(S100A16OE)和干扰质粒(S100A16KD),以及对应的空载质粒,并用Western blot检测转染效率

(图3),24 h后重悬细胞进行后续实验。

SRB染色实验显示,S100A16促进了SGC-7901细胞的增殖(图4A)。为了进一步证实这个实验结果,又进行了克隆形成实验,结果显示,S100A16能够促进SGC-7901细胞克隆形成能力(图4B)。以上实验结果证实,S100A16能促进胃癌细胞SGC-7901的增殖能力。

同时,进行了划痕实验和Transwell实验来观察S100A16对胃癌细胞SGC-7901迁移和侵袭的影响。结果,敲低S100A16后,胃癌细胞划痕修复率明显低于对照组(图5A),而过表达S100A16后则得到了相反的结果(图5B)。结果显示,S100A16促进了



与胃上皮细胞 GES-1 相比,胃癌细胞 MGC-803 及 SGC-7901 中 S100A16 的表达均有显著升高(两组比较, $P < 0.001, n=3$)。

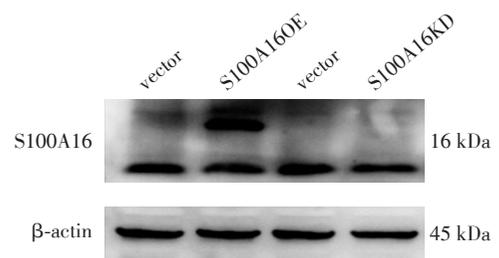
图2 S100A16在胃癌细胞系中表达显著升高

Figure 2 S100A16 was significantly increased in gastric cancer cells

SGC-7901 细胞的迁移。在 Transwell 实验中,敲低了 S100A16 的 SGC-7901 细胞穿过小室的数量与对照组相比明显减少(图 6A),反之则增多(图 6B)。结果说明 S100A16 能增强胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭能力。

2.4 胃癌细胞 SGC-7901 中 S100A16 与 YBX-1 存在直接结合

实验室前期质谱分析显示,S100A16 与 YBX-1 可能存在相互作用。为了进一步研究 S100A16 影响



S100A16OE:过表达 S100A16;S100A16KD:敲低 S100A16。

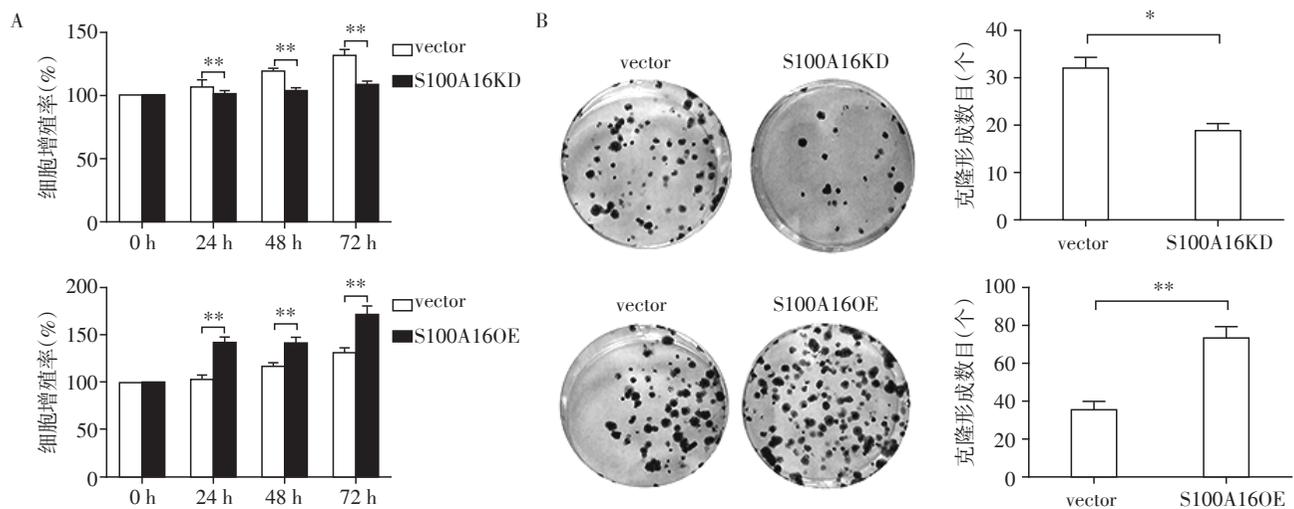
图3 在胃癌细胞 SGC-7901 上过表达、敲低 S100A16 的表达
Figure 3 Overexpression and knockdown of S100A16 expression on gastric cancer cell SGC-7901

胃癌细胞生物学行为的潜在分子机制,检测胃上皮细胞系 GES-1 以及胃癌细胞系 MGC-803 和 SGC-7901 中 YBX-1 的表达,结果显示,在胃癌细胞特别是 SGC-7901 中,YBX-1 的蛋白表达量显著上调(图 7A)。在过表达了 S100A16 的 SGC-7901 细胞中检测 YBX-1 的蛋白表达量,结果显示,在过表达 S100A16 之后,YBX-1 的表达也有显著升高(图 7B)。

为了进一步验证 S100A16 与 YBX-1 之间的关系,又进行了免疫共沉淀实验,结果显示,在 SGC-7901 细胞中 S100A16 与 YBX-1 存在相互结合(图 7C)。

3 讨论

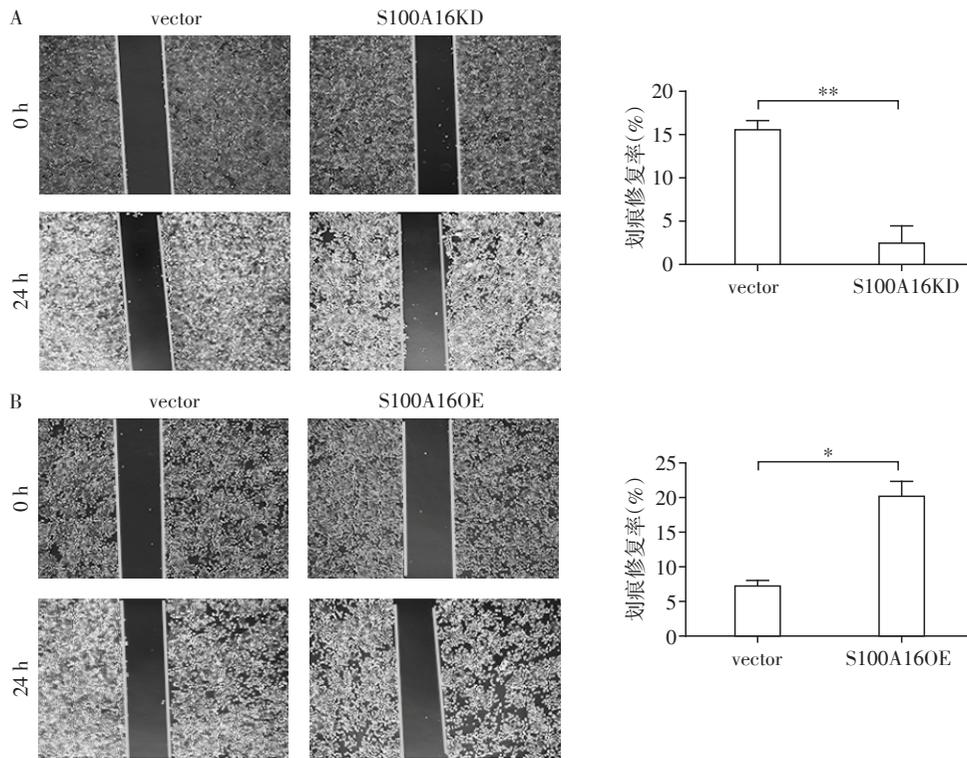
S100A16 是 S100 钙结合蛋白家族的成员。它在许多类型的肿瘤中过表达,并且与增殖、迁移和侵袭相关^[6-8,11]。在乳腺癌中,S100A16 表达上调,并通过 Notch1/ZEB 信号通路诱导上皮间质转化的发



A: SRB 染色计算细胞增殖率;B:克隆形成实验;与空载组相比,敲低 S100A16 后,胃癌细胞 SGC-7901 的增殖能力显著降低,过表达 S100A16 后,增殖能力则显著增强(两组比较, $*P < 0.01, **P < 0.001, n=3$)。

图4 S100A16促进胃癌细胞 SGC-7901 的增殖能力

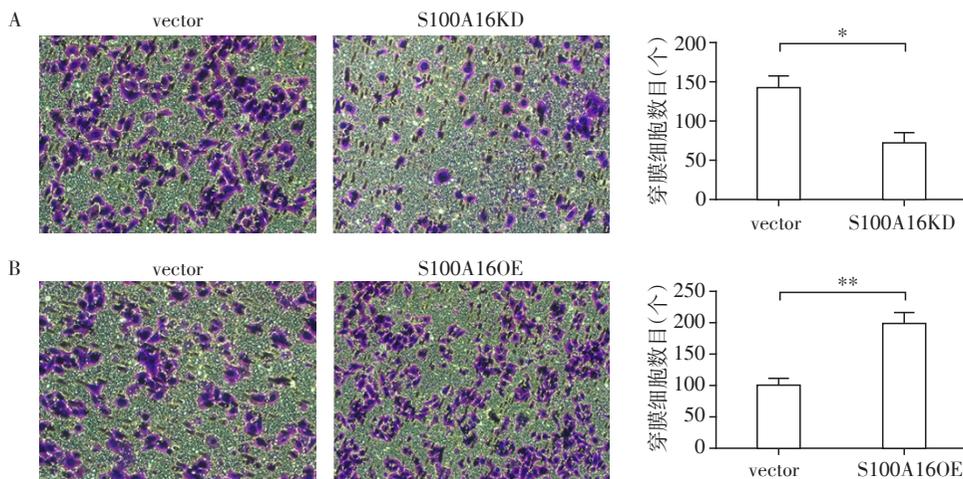
Figure 4 S100A16 promoted the proliferation of gastric cancer cell SGC-7901



与空载组相比,敲低S100A16后,胃癌细胞SGC-7901的迁移能力显著降低(A),过表达S100A16后,迁移能力则显著增强(B);两组比较, $^*P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$, $n=3$ 。

图5 S100A16促进胃癌细胞SGC-7901的迁移能力

Figure 5 S100A16 promoted the migration of gastric cancer cell SGC-7901



与空载组相比,敲低S100A16后,胃癌细胞SGC-7901的侵袭能力显著降低(A),过表达S100A16后,侵袭能力则显著增强(B);两组比较, $^*P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$, $n=3$ 。

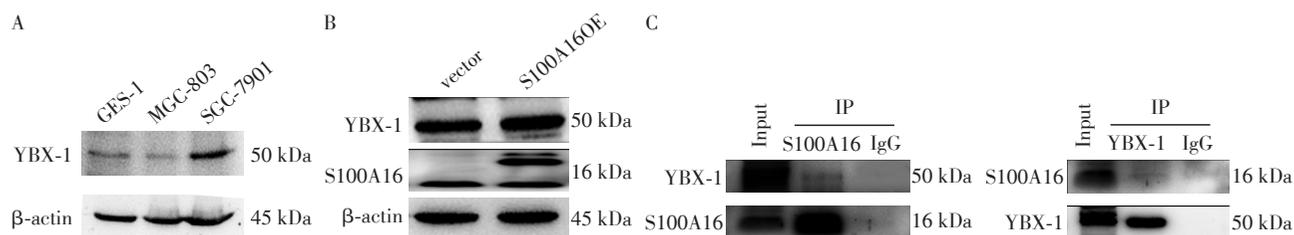
图6 S100A16促进胃癌细胞SGC-7901的侵袭能力

Figure 6 S100A16 promoted the invasion of gastric cancer cell SGC-7901

生^[12]。在前列腺癌中,S100A16通过激活AKT/ERK信号通路并下调抑癌基因P21和P27促进前列腺癌细胞的增殖和转移^[11]。然而,它在胃癌发生发展中的作用还不明确。本课题的主要目标是确定其在胃癌组织和细胞中表达及其对胃癌细胞增殖、迁移

和侵袭的影响,为进一步研究S100A16在胃癌发生发展中的作用提供基础。

本研究首次应用免疫组化染色的方法证实了胃癌组织中S100A16的异常高表达。随后又进行了SRB染色、划痕、克隆形成以及Transwell实验检测



A: 胃上皮细胞系 GES-1 和胃癌细胞系 MGC-803、SGC-7901 中 YBX-1 的表达; B: 过表达 S100A16 的 SGC-7901 中 YBX-1 的表达; C: 免疫共沉淀验证 S100A16 与 YBX-1 的结合。

图7 在胃癌细胞SGC-7901中,YBX-1表达显著增高并与S100A16直接结合

Figure 7 In gastric cancer cell SGC-7901, YBX-1 expression was significantly increased and directly bound to S100A16

S100A16对胃癌细胞SGC-7901的增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果显示,过表达S100A16后胃癌细胞SGC-7901的增殖、迁移、侵袭能力均增强,表明S100A16的异常表达可改变胃癌细胞的生物学行为,进而影响胃癌的增殖、侵袭、转移过程。因此,S100A16有望成为胃癌治疗的新靶点。

YBX-1是一种由324个氨基酸组成的多功能蛋白,是冷休克蛋白中的一员,最早发现YBX-1是一种转录因子^[13]。它在许多人类恶性肿瘤中的表达量都有显著增高,并提示与预后不良和疾病复发有关^[13]。已有文献报道,YBX-1会促进胃癌细胞的迁移能力,与胃癌细胞的异常生长有关^[14],并已证明YBX-1的表达是胃癌肝转移的免疫标志物^[15]。通过免疫共沉淀实验证实,在胃癌细胞SGC-7901中,S100A16与YBX-1存在相互结合。

综上所述,猜测YBX-1与S100A16之间的结合可能会影响S100A16的异常表达,从而影响胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力。然而,这其中所涉及的调控位点、信号通路等分子机制仍待进一步研究。

[参考文献]

[1] Wen Q, Chen Z, Chen Z, et al. EphA2 affects the sensitivity of oxaliplatin by inducing EMT in oxaliplatin-resistant gastric cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47998-48011

[2] Strong VE, Wu AW, Selby LV, et al. Differences in gastric cancer survival between the U.S. and China[J]. *J Surg Oncol*, 2015, 112(1): 31-37

[3] Orditura M, Galizia G, Sforza V, et al. Treatment of gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(7): 1635-1649

[4] Mukai S, Oue N, Oshima T, et al. Overexpression of PCD-HB9 promotes peritoneal metastasis and correlates with poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *J Pathol*, 2017, 243(1): 100-110

[5] Babini E, Bertini I, Borsi V, et al. Structural characterization of human S100A16, a low-affinity calcium binder[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2011, 16(2): 243-256

[6] Kobayashi M, Nagashio R, Saito K, et al. Prognostic significance of S100A16 sub-cellular localization in lung adenocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2018, 74: 148-155

[7] Sun X, Wang T, Zhang C, et al. S100A16 is a prognostic marker for colorectal cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2018, 117(2): 275-283

[8] Saito K, Kobayashi M, Nagashio R, et al. S100A16 is a prognostic marker for lung adenocarcinomas [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(16): 7039-7044

[9] Ji YF, 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

[10] 辛 婧,张日华,杜新丽,等. S100A16基因 shRNA 真核表达质粒的构建及其干扰效果的初步鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(3): 323-327

[11] Zhu W, Xue Y, Liang C, et al. S100A16 promotes cell proliferation and metastasis via AKT and ERK cell signaling pathways in human prostate cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 12241-12250

[12] Zhou W, Pan H, Xia T, et al. Up-regulation of S100A16 expression promotes epithelial - mesenchymal transition via Notch1 pathway in breast cancer [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 97

[13] Maurya PK, Mishra A, Yadav BS, et al. Role of Y Box protein-1 in cancer: As potential biomarker and novel therapeutic target[J]. *J Cancer*, 2017, 8(10): 1900-1907

[14] Zhang Z, Dou M, Yao X, et al. Potential biomarkers in diagnosis of human gastric cancer[J]. *Cancer Invest*, 2016, 34(3): 115-122

[15] Wu Y, Wang KY, Li Z, et al. Y-box binding protein 1 expression in gastric cancer subtypes and association with cancer neovasculature [J]. *Clin Transl Oncol*, 2015, 17(2): 152-159

[收稿日期] 2018-03-15