文章编号:1000-5404(2014)01-0025-04

论著

鞘氨醇激酶促进胃癌细胞SGC-7901转移和侵袭

史福军[1],黄宗海[1],厉 周[1],蔡 寨[1],李秀勤[1],彭 亮[1],刘 灏[2] (510280 广州,南方医科大学珠江医院普通外科[1];510515 广州,南方医科大学南方医院血管外科[2])

[摘要] **目的** 探讨鞘氨醇激酶-1(sphingosine kinase 1, SphK1)促进胃癌细胞转移和侵袭的机制。**方法** 使用转染、RNA干扰及Sphk1过表达载体构建的方法分别实现胃癌细胞SGC-7901中SphK1蛋白的过表达、低表达,通过Transwell实验检测SphK1对胃癌细胞转移和侵袭能力的影响,并利用ELISA检测1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate,S1P)及其受体水平的变化。**结果** SphK1的过表达可显著促进胃癌细胞的转移和侵袭($P<0.05$),而SphK1特异性siRNA可轻微降低胃癌细胞的转移和侵袭能力,但与对照相比差异不显著。SphK1转染细胞S1P表达水平(0.32±0.01)高于对照组(0.24±0.02)($P<0.05$),SphK1的过表达可提高S1P的水平,而外源性S1P的添加可通过EDG1促进胃癌细胞的转移和侵袭。**结论** SphK1/S1P/EDG1途径在胃癌的转移中有重要的作用,为胃癌的诊断及治疗提供了一个可能的新靶点。

[关键词] 鞘氨醇激酶;1-磷酸鞘氨醇;EDG1;胃癌细胞
[中图法分类号] R345.57; R730.23; R735.2 [文献标志码] A

Sphingosine kinase 1 improves migration and invasion in gastric cancer cells

Shi Fujun[1], Huang Zonghai[1], Li Zhou[1], Cai Zhai[1], Li Xiuqin[1], Peng Liang[1], Liu Hao[2] ([1]Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510282; [2]Department of Vascular Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the underlying mechanism of sphingosine kinase 1 (SphK1) in promoting metastasis and invasion in gastric cancer cells. **Methods** Transfection, RNA interference and recombinant plasmid encoding SphK1 (pWPXL-SphK1) were applied to change the expression of the target protein in gastric cancer cell line SGC-7901. Transwell assay was adopted to detect the metastasis and invasion ability of different types of SGC-7901 cells. The content of sphingosine 1-phosphate (S1P) in the supernatant was measured by ELISA. The mRNA expression of S1P receptors, EDG1 and EDG2, were studied by qRT-PCR. While the protein expression of SphK1, EDG1 and EDG2, was measured by Western blotting. **Results** SphK1 over-expression in SGC7901 cells enhanced the metastasis and invasion in the cells, while, SphK1 specific siRNA transfection reduced both the metastasis and invasion, without significant difference when compared with original SGC-7901 cells. Furthermore, overexpression of SphK1 also improve the expression of S1P, and exogenous S1P improved the migration and invasion in gastric cancer cells through EDG1 receptors. **Conclusion** SphK1/S1P/EDG1 plays important roles in the metastasis in gastric cancer, and might provide new target for the diagnosis and therapy of the disease.

[**Key words**] sphingosine kinase 1; sphingosine 1-phosphate; EDG1; gastric cancer

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81172383) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2011040002946).
Corresponding author: Liu Hao, E-mail:i191601714@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81172383);广东省自然科学基金(S2011040002946)
[通信作者] 刘 灏,E-mail:i191601714@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131107.1612.003.html(2013-11-07)

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其发病率居各类肿瘤的首位。胃癌可以在胃的任何部位形成,并通过胃扩散至其他器官,尤其是食道、肺、淋巴结和肝脏。早期胃癌通常没有症状或只有一些非特异的轻微症状,当临床症状明显时胃癌已到达晚期,这是胃癌预后较差的主要原因之一。

鞘氨醇激酶-1(sphingosine kinase 1,SphK1)是鞘氨醇代谢平衡的重要限速酶,其催化反应的产物是1-磷酸鞘氨醇(sphingosine 1-phosphate,S1P),而S1P是一个同时具有细胞内第二信使和细胞外第一信使双重功能的脂类生物活性分子[1-2]。研究显示SphK1在促进细胞生存、增殖和肿瘤转移中有一定的作用[3-5]。SphK1在不同类型的人肿瘤中均过表达,而且SphK1表达量的升高与肿瘤的血管再生和肿瘤对辐射和化学治疗的抗性有关[6-8]。这些研究均提示,SphK1途径是肿瘤治疗的一个极有前途的靶点。SphK1抑制因子,包括沙芬各和苯妥帝尔目前已用于针对不同癌症的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期临床试验。已有研究表明,SphK1/S1P组成的信号通路在肿瘤的发生和发展中具有重要的作用,并可以调节细胞增殖、迁移和侵袭等,但SphK1在胃癌发生、发展中的作用机制目前尚不清楚。本实验探讨胃癌细胞SGC-7901中过表达的SphK1对胃癌细胞的转移和侵袭的影响及其机制。以期为抗胃癌药物的发展提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

胃癌细胞SGC-7901购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection),细胞培养在含有10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。细胞培养在37℃、5% CO_2和95%的湿度的环境中。TRizol、Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;RT-PCR试剂盒、Transwell小室、ELISA试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 实验方法

1.2.1 载体的构建及转染 收集生长良好的胃癌细胞并用TRIzol提取总RNA。经无RNase的DNase处理后,取2 μg进行RT-PCR获得鞘氨醇激酶-1(SphK1) cDNA序列,对SphK1序列进行PCR扩增并克隆进pMD-18T载体,测序鉴定后亚克隆到pWPXL载体构建pWPXL-SphK1重组载体,根据使用说明,将pWPXL-SphK1重组载体转染至细胞SGC-7901,并用G418对转染细胞进行筛选,获得稳定转染SphK1的胃癌细胞SGC-7901。

1.2.2 Transwell细胞外转移和侵袭实验 将生长良好的SphK1过表达SGC-7901用胰酶消化,并用完全培养基洗涤细胞2次,制备细胞悬液。将含有1×10^5细胞的细胞悬液培养基加入上室,下室注入培养基。对于胃癌细胞的转移实验,将胃癌细胞种于没有基底膜的上室。对侵袭实验,细胞种于底部加入150 μg人工基底膜的上室。将细胞置于37 ℃孵育2 h后,倒置Transwell小室,滤膜下表面朝上,自然风干后用0.1%的结晶紫染色,染色完毕再次倒置Transwell小室。待其自然风干后,用刀片取下滤膜置于载玻片上,加树胶封片。显微镜计算3个随机视野中的细胞数,取平均值并分析实验数据。

1.2.3 siRNA转染 SphK1序列特异性的siRNA购自Thermo Scientific Dharmacon。生长良好的胃癌细胞以3×10^4到5×10^4/孔种植于6孔板上。根据Lipofectamine 2 000使用说明对细胞进行siRNA转染。转染48 h后通过RT-PCR和Western blot检测SphK1的表达水平。

1.2.4 S1P的定量 细胞培养物上清中的S1P用S1P反应试剂盒通过酶联免疫反应(ELISA)进行检测。主要步骤如下:将5×10^5稳定表达SphK1的胃癌细胞或对照细胞种植于6孔板中。细胞用含有10%的胎牛血清的RPMI-1640培养基进行培养。每组设3孔重复。当细胞贴壁后,将培养基更换为无血清RPMI1640培养基。在细胞种植24 h后收集上清并用滤膜进行过滤。

1.2.5 qRT-PCR检测 生长良好的胃癌细胞再接种24 h后,加入外源性S1P(终浓度为1 μmol/L)处理24 h。然后收集细胞,并根据1.2.1所述提取总RNA,进行qRT-PCR扩增S1P受体EDG1和EDG2 mRNA,并将GAPDH mRNA作为对照。

1.2.6 Western blot实验 收集不同处理的SGC-7901细胞,以RIPA裂解液裂解细胞并提取细胞总蛋白,并以BCA法测定蛋白质含量。取等量的蛋白质进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(20 μg/泳道)后,电转至PVDF膜上进行抗原抗体反应,一抗分别为鼠抗人SphK1、EDG1或EDG5单克隆抗体和鼠抗人β-actin或GAPDH单克隆抗体(稀释度1∶200),4℃孵育过夜。二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG二抗(稀释度1∶2 000),ECL显色、X线片曝光后,Image J软件扫描灰度定量。

1.3 统计学分析

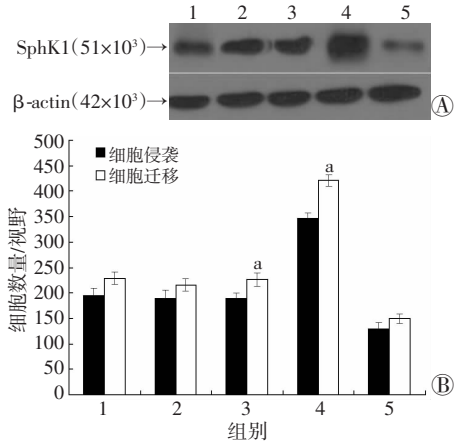
数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 SphK1的过表达促进胃癌细胞的转移和迁移

Western blot检测SGC-7901细胞内SphK1的表达(图1A)。结果显示,与未处理的SGC-7901细胞及转染对照pWPXL载体的SGC-7901细胞相比,pWPXL-SphK1重组载体转染细胞显著提高了细胞内SphK1的蛋白水平。而与转染无关siRNA序列的SGC-7901细胞相比,转染SphK1特异性siRNA显著降低了细胞内SphK1的水平。通过Transwell小室实验检测了转染不同载体或siRNA对细胞转移和侵袭能力的影响,结果见图1B。过表达SphK1的胃癌细胞其转移和侵袭的能力明显高于正常的胃癌细胞($P<0.05$)。进一步采用SphK1特异性的siRNA转染胃癌细胞后,胃癌细胞的转移和侵袭能力与正常的胃癌细胞及转染对照siRNA的细胞相比有轻微下降,差异不明显

($P>0.05$),但与过表达 SphK1 的胃癌细胞相比其转移与侵袭能力显著下降。这些数据说明 SphK1 的过表达可以促进胃癌细胞的转移和侵袭。



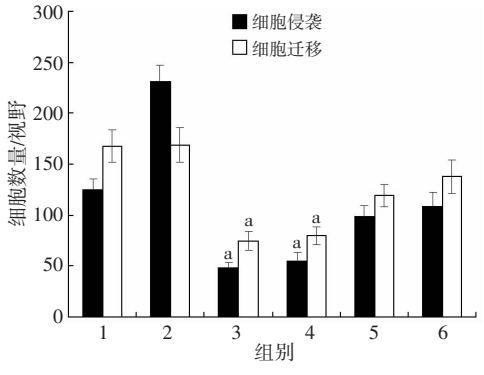
1:正常 SGC-7901;2:pWPXL-SGC-7901;3:对照 siRNA-SGC-7901;4:pWPXL-SphK1-SGC-7901;5:SphK1 特异性 siRNA-SGC-7901

A:Western blot 检测不同细胞内 SphK1 的表达;B:Transwell 小室检测不同细胞的侵袭和迁移能力　a:$P<0.05$,与其他组比较

图 1　SphK1 过表达对胃癌细胞 SGC-7901 转移和侵袭能力的影响

2.2　SphK1 提高胃癌细胞中 S1P 的表达

Sphk1 转染细胞 S1P 表达水平(0.32 ± 0.01)高于对照组(0.24 ± 0.02)($P<0.05$),结果显示,SphK1 的过表达显著提高了 S1P 在胃癌细胞中的表达和分泌。SphK1 可能通过提高细胞中 S1P 的水平发挥作用。用不同稀释倍数的 S1P 单克隆抗体(1∶100,1∶200,1∶500 和 1∶1 000)对 SphK1 过表达的胃癌细胞 SGC-7901 预处理 1 h 后,细胞的侵袭和迁移能力都有所下降(图 2)。与无 S1P 单克隆抗体处理的 SphK1 过表达 SGC-7901 细胞及正常 SGC-7901 细胞相比,1∶100 和 1∶200 稀释的 S1P 单抗处理的细胞其侵袭和迁移能力均显著下降($P<0.05$),但经 1∶500 和 1∶1 000 稀释的 SIP 单抗处理后,SphK1 过表达 SGC-7901 细胞的侵袭和迁移与无处理 SphK1 过表达 SGC-7901 细胞及正常 SGC-7901 细胞相比差异不显著($P>0.05$)。

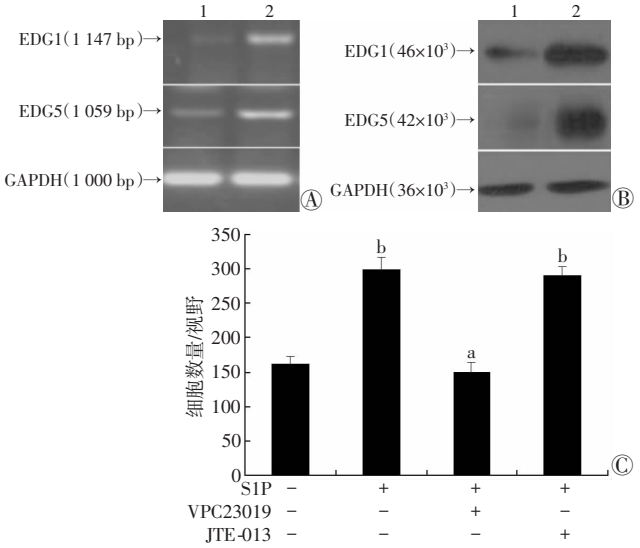


1:正常 SGC-7901;2:无处理 SphK1 过表达 SGC-7901;3 ~ 6:S1P 抗体稀释倍数分别为 1∶100,1∶200,1∶500 和 1∶1 000　a:$P<0.05$,与无处理 SphK1 过表达 SGC-7901 细胞比较

图 2　不同稀释倍数的 S1P 单克隆抗体检测 SGC-7901 细胞侵袭和迁移能力

2.3　S1P 通过 EDG1 促进细胞的转移

使用外源性 S1P 处理正常胃癌 SGC7901 细胞,结果表明,1 μmol/L 外源性 S1P 处理可提高胃癌细胞 SGC-7901 的迁移和侵袭能力。检测胃癌细胞表面 S1P 受体的表达水平见图 3A、B,细胞表面的 2 个 S1P 受体(S1PR1/EDG1 和 S1PR2/EDG5)mRNA 水平和蛋白质水平表达明显升高。这说明在 SphK1 诱导的胃癌细胞的转移和侵袭中,EDG 可能发挥了重要的作用。为进一步确定 EDG 的功能,在添加外源性 S1P 前分别用 EDG1 拮抗剂 VPC23019 和 EDG5 拮抗剂 JTE-013 预处理 SGC7901 细胞 2 h。结果表明,VPC23019 预处理后,S1P 诱导的胃癌细胞的转移和侵袭能力受到显著抑制,但与无 S1P 处理的对照组相比,没有明显变化(图 3C)。而 JTE-013 预处理后,细胞的转移和侵袭能力较正常 SGC7901 细胞显著提高($P<0.05$,图 3C)。表明 S1P/EDG1 信号通路是 SphK1-S1P 诱导胃癌细胞的转移和侵袭的主要途径。



A:qRT-PCR 检测细胞内 S1PR1/EDG1、S1PR2/EDG5 mRNA 的表达　1:S1P(−);2:S1P(+);B:Western blot 检测细胞内 S1PR1/EDG1、S1PR2/EDG5 蛋白的表达　1:S1P(−);2:S1P(+);C:Transwell 小室实验检测细胞转移与侵袭能力的变化　a:$P<0.05$:与其余实验组比较;b:$P<0.05$:与正常 SGC7901 细胞比较

图 3　S1P 通过 EDG1 促进胃癌细胞的转移和侵袭能力

3　讨论

现有研究显示,SphK1 在多种肿瘤中的表达量均升高[9],如结肠癌[10]、胃癌等[3],它参与肿瘤的发生和发展,但在不同的肿瘤中其具体作用机制及涉及的信号传导通路目前尚无详细研究。大多数肿瘤导致的死亡都与原初肿瘤的恶性转移有关,胃癌也是如此。而 Li 等[11]证明在胃癌中,SphK1 的表达量比正常组织显著性升高,这说明 SphK1 与胃癌的发生有重要的关

系,但却未能提出 SphK1 的具体作用机制。在此基础上,本实验构建了 SphK1 过表达的胃癌细胞,发现胃癌细胞中 SphK1 的过表达可提高细胞的转移和侵袭能力。人们在乳腺癌等肿瘤中也得到了类似的研究结果[12],这提示 SphK1 有可能成为治疗和预防胃癌等肿瘤的一个潜在的靶分子[13]。

S1P 是 SphK1 催化反应的产物,是从肿瘤释放至肿瘤微环境的一个促肿瘤发生和血管生成的试剂[14]。Pettus 等[15]研究发现 SphK1 的激活可导致 S1P 的产生和分泌,S1P 又通过与各种受体的相互作用调节各种细胞功能。在本实验中,我们发现胃癌细胞中 SphK1 的过表达使 S1P 的分泌明显增加,这也提示我们胃癌患者中 S1P 的水平可能成为胃癌检测的一个标志分子。另外我们还发现外源性的 S1P 能促进胃癌细胞的侵袭和迁移。已有研究已证明 S1P 通过 S1PR1/EDG1、S1PR2/EDG5、S1PR3/EDG3、S1PR4/EDG6 和 S1PR5/EDG8 等 G 蛋白偶联的受体发挥其生物学功能[16]。而 S1P 对胃癌细胞的侵袭和迁移的作用也由其受体介导。在本研究中我们通过受体拮抗剂阻断实验,发现 SphK1-S1P 通过 S1PR1/EDG1 促进胃癌细胞的转移和侵袭。这也使 S1P 成为胃癌治疗的一个潜在靶点。

综上所述,SphK1 在胃癌中表达量升高并促进胃癌细胞的转移和增殖。另外,SphK1 的过表达提高 S1P 的水平,同时外源性 S1P 的增加可通过 EDG 受体提高细胞的转移和侵袭。这些结果说明 SphK1/S1P/EDG 途径在胃癌的转移中有重要的作用,使其可能成为抗胃癌药物的新靶点。

参考文献:

[1] Kohama T, Olivera A, Edsall L, *et al*. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(37): 23722 – 23728.

[2] Ogretmen B, Hannun Y A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(8): 604 – 616.

[3] French K J, Schrecengost R S, Lee B D, *et al*. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5962 – 5969.

[4] Sarkar S, Maceyka M, Hait N C, *et al*. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells[J]. FEBS Lett, 2005, 579(24): 5313 – 5317.

[5] Pyne N J, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(7): 489 – 503.

[6] Li J, Guan H Y, Gong L Y, *et al*. Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(21): 6996 – 7003.

[7] Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, *et al*. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis[J]. FASEB J, 2009, 23(2): 405 – 414.

[8] Akao Y, Banno Y, Nakagawa Y, *et al*. High expression of sphingosine kinase 1 and S1P receptors in chemotherapy-resistant prostate cancer PC3 cells and their camptothecin-induced up-regulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(4): 1284 – 1290.

[9] 张彦,郑晓东,唐鹏,等. Sphk1 基因对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响[J]. 第三军医大学学报,2012,34(21): 2141 – 2144.

[10] Liu S Q, Su Y J, Qin M B, *et al*. Sphingosine kinase 1 promotes tumor progression and confers malignancy phenotypes of colon cancer by regulating the focal adhesion kinase pathway and adhesion molecules[J]. Int J Oncol, 2013, 42(2): 617 – 626.

[11] Li W, Yu C P, Xia J T, *et al*. Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1393 – 1399.

[12] Ruckhaberle E, Karn T, Denkert C, *et al*. Predictive value of sphingosine kinase 1 expression in neoadjuvant treatment of breast cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(10): 1681 – 1689.

[13] Lima S, Spiegel S. Sphingosine kinase: a closer look at last[J]. Structure, 2013, 21(5): 690 – 692.

[14] Zhang J, Dunk C E, Lye S J. Sphingosine signalling regulates decidual NK cell angiogenic phenotype and trophoblast migration[J]. Hum Reprod, 2013, 28(11): 3026 – 3037.

[15] Pettus B J, Bielawski J, Porcelli A M, *et al*. The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha[J]. FASEB J, 2003, 17 (11): 1411 – 1421.

[16] Zu-Heringdorf D M, Ihlefeld K, Pfeilschifter J. Pharmacology of the sphingosine-1-phosphate signalling system[J]. Handb Exp Pharmacol, 2013(215): 239 – 253.

(**收稿**:2013-06-04;**修回**:2013-09-26)

(编辑　汪勤俭)