基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1332-04

# 葡萄糖调节蛋白 78 对胃癌 SGC7901 细胞侵袭和转移的影响

颜晓丽,高 青,李禄椿
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨钙离子螯合剂 BAPTA-AM 和钙离子载体 A23187 对胃癌 SGC7901 细胞葡萄糖调节蛋白 78(Glucose regulated protein,GRP78)表达水平的影响,分析 GRP78 表达改变对胃癌细胞侵袭转移能力的影响。方法:BAPTA-AM 和 A23187 处理细胞,RT-PCR 和 Western-blot 检测 3 组细胞 GRP78 在 mRNA 和蛋白水平的表达,体外侵袭实验和划痕实验检测 3 组细胞的侵袭转移能力。结果:与对照组相比,BAPTA-AM 组 GRP78 在 mRNA 和蛋白水平表达量降低,A23187 组 GRP78 表达量升高;且 BAPTA-AM 组侵袭和转移能力明显低于对照组,而 A23187 组则高于对照组。结论:BAPTA-AM 和 A23187 可分别下调和上调胃癌细胞 GRP78 的表达水平,GRP78 的表达水平可能与胃癌细胞的侵袭和转移有关。

【关键词】胃癌;葡萄糖调节蛋白 78;BAPTA-AM;侵袭;转移
【中国图书分类法分类号】R735 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-27

# Effect of GRP78 on invasion and metastasis of human gastric carcinoma SGC7901 cells in vitro

*YAN Xiao-li, et al*
(*Department of Digestive Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of BAPTA-AM and A23187 on GRP78 expression of gastric carcinoma SGC-7901 cells in vitro, and the effect of GRP78 on invasion and metastasis of these tumor cells. *Methods*: The SGC7901 cells were treated by BAPTA-AM and A23187. RT-PCR and Western blot were used to assess the expression of GRP78 at both mRNA and protein levels. Matrigel invasion assay and a scratch wound assay were used to assess the invasion and migration levels. *Results*: The expression of GRP78 at both mRNA and protein levels, the invasion and migration levels were decreased in the BAPTA-AM-treated cells and increased in A23187-treated cells as compared with those of control group. *Conclusion*: BAPTA-AM can down-regulate the expression of GRP78 in SGC7901 cells and A23187 can up-regulate it. The expression of GRP78 in SGC7901 cells may be associated with their migration and invasion levels.

【Key words】Gastric carcinoma; GRP78; BAPTA-AM; Invasion; Metastasis

侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征之一,也是导致肿瘤治疗失败的主要原因。肿瘤的侵袭转移是一个复杂的病理生理过程,其具体分子生物学机制尚未完全阐明。葡萄糖调节蛋白 78(Glucose regulated protein,GRP78)的基本功能是参与蛋白质的折叠和转运过程以及内质网应激反应,在机体的生长发育和维持细胞稳定方面起重要作用。近年来,研究发现,GRP78 在多种肿瘤细胞中大量表达,并与肿瘤的生长、耐药以及转移等恶性生物学行为有关[1-5]。本研究将药物 BAPTA-AM 和 A23187 作用于胃癌细胞株 SGC7901,以观察其对肿瘤细胞 GRP78 的表达水平的影响,以及改变 GRP78 的表达后,肿瘤细胞侵袭转移能力的变化。

作者介绍:颜晓丽(1984- ),女,硕士,
研究方向:胃肠肿瘤。
通讯作者:高 青,男,主任医师,E-mail:gaoqing27@yahoo.com.cn。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品及试剂

BAPTA-AM 和 A23187(Sigma),抗 GRP78 抗体(santacruz),RNAiso Plus 和 Prime Script RT reagent Kit (Takara),PCR 试剂盒(北京天根生物技术有限公司)。Transwell(膜孔径 8 μm,24 孔板)(Costar,USA),Matrigel (BD,USA)。A23187 和 BAPTA-AM 用 DMSO 配成终浓度分别为 10、40 μmol/ml 的母液,使用前用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液稀释成应用液。

### 1.2 细胞培养

胃癌细胞 SGC7901 由重庆医科大学附属第一医院神经病学实验室馈赠,细胞在 5%$CO_2$,37℃条件下传代培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 RT-PCR 检测 BAPTA-AM 和 A23187 对胃癌细胞 GRP78 mRNA 表达水平的影响

将细胞分为 3 组，上调组，A23187 作用细胞 24 h，浓度为 10 μmol/L；对照组，培养在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中，培养液含 0.15%的 DMSO；下调组，BAPTA-AM 预处理细胞 2 h，浓度分别为 20、40、60 μmol/L，2 h 后培养条件同对照组。24 h 后检测各组细胞 GRP78 在 mRNA 水平的表达[5]。收获对数生长期的细胞，按 TRIZOL 试剂说明书常规提取总 RNA，经紫外分光光度计定量 RNA 浓度和纯度，逆转录合成 cDNA，RT 反应条件为 37℃ 15 min，85℃ 5 s。引物序列：目的基因上游引物：5'-CATCCCGTGGCATAAAC-3'，下游引物：5'-CCCTGTACCCTTGTCTTC-3'，扩增出 407 bp 片断；内参 β-actin 上游引物：5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'，下游引物：5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'，扩增出 200 bp 片断。将反应体系置 PCR 扩增仪上 94℃预变性 3 min，然后开始 PCR 循环：94℃ 30 s，54℃ 30 s，72℃ 1 min，共 35 个循环，最后一个循环 72℃延长 5 min。

1.4 Western-blot 检测 BAPTA-AM 和 A23187 对胃癌细胞 GRP78 蛋白表达水平的影响

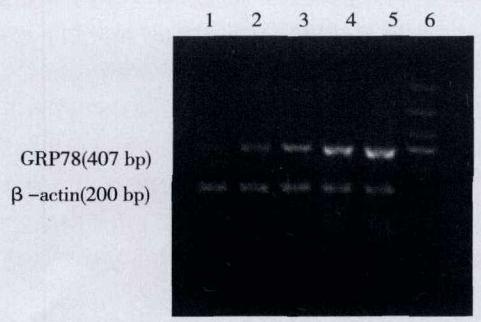
分组方法如 1.3，收集各组细胞，用 PBS 洗涤，并加入细胞裂解液（含复合蛋白磷酸化酶抑制剂）于冰上裂解 30 min，4℃，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清。BCA 法测定蛋白质浓度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，5%脱脂奶粉封闭过夜，加入 1:1 000 倍稀释的一抗杂交 2 h，TBST 洗膜后加入二抗温育 1 h，TBST 洗膜后进行 BCIP/NBT 显色。采用 Chemi-genius 凝胶成像系统分析目的蛋白的表达量。

1.5 划痕实验检测各组细胞转移能力的变化

将各组细胞做相应处理后，用胰蛋白酶消化细胞接种于 6 孔板中，每孔 $1\times10^6$ 个，待细胞汇合成细胞单层后，用灭菌中枪头在细胞单层上小心地做一个划痕，用 PBS 彻底洗去细胞碎片，拍照，继续培养 48 h，拍照，高倍倒置显微镜下观察划痕程度。

1.6 体外侵袭实验检测各组细胞侵袭能力的变化

将各组细胞做相应处理后，用胰酶消化接种于铺有 25 μl Matrigel 胶的小室。上室加细胞悬液 400 μl（$2\times10^5$ 个/室），下室加入 600 μl 3T3 细胞条件培养液作为趋化因子。5%$CO_2$ 培养箱中培养 24 h，取出滤膜，用棉签擦去滤膜内表面的细胞，4%多聚甲醛固定 30 min，HE 染色，中性树胶封片。光学显微镜下随机选取 10 个视野，计数每视野中的细胞数。




1. 60 μmol/L BAPTA-AM；2. 40 μmol/L BAPTA-AM；3. 20 μmol/L BAPTA-AM；4. 对照组；5. A23187 组；6. 1 000 bp DNAmarker：1 000、700、500、400、300、200、100 bp

**图 1 BAPTA-AM 和 A23187 对 GRP78 mRNA 表达水平的影响**

1.7 统计学处理

所有结果均用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，数据分析采用 SPSS17.0，计量资料的多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK 法，$P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 BAPTA-AM 和 A23187 对胃癌细胞 GRP78 mRNA 表达水平的影响

RT-PCR 结果显示，与对照组相比，A23187 处理组细胞 GRP78 在 mRNA 水平的表达量增加，而 BAPTA-AM 处理组表达量则降低，并呈一定的浓度依赖性。经统计学分析，A23187 处理组、3 个 BAPTA-AM 处理组与对照组比较有显著性差异（$F=3\,745.079$，$P<0.01$），4 个处理组之间两两比较差异均有显著性（$P<0.01$）。因 40 μmol/L 的抑制作用较 20 μmol/L 明显，故选用 40 μmol/L 这个浓度的 BAPTA-AM 进行以后的实验（图 1，表 1）。

**表 1 GRP78 mRNA 水平灰度值分析**

| 分组 | 灰度值分析 |
|---|---|
| A23187 组 | 1.070 ± 0.005 |
| 对照组 | 1.011 ± 0.012 |
| BAPTA-AM 组 | |
| 20 μmol/L | 0.701 ± 0.009 |
| 40 μmol/L | 0.543 ± 0.009 |
| 60 μmol/L | 0.348 ± 0.013 |

2.2 Western blot 检测 BAPTA-AM 和 A23187 对胃癌细胞 GRP78 蛋白表达水平的影响

Western blot 结果显示，A23187 处理组细胞 GRP78 在蛋白水平的表达量（目的条带与内参的灰度值之比为 0.911 ± 0.004）较对照组（0.823 ± 0.007）增加，而 BAPTA-AM 处理组表达量（0.647 ± 0.015）则降低。经统计学分析，A23187 处理组、BAPTA-AM 处理组与对照组比较有显著性差异（$F=581.282$，$P<0.01$），2 个处理组之间比较差异具有显著性（$P<0.01$）（图 2）。

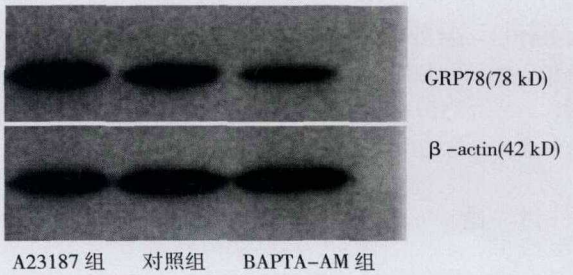
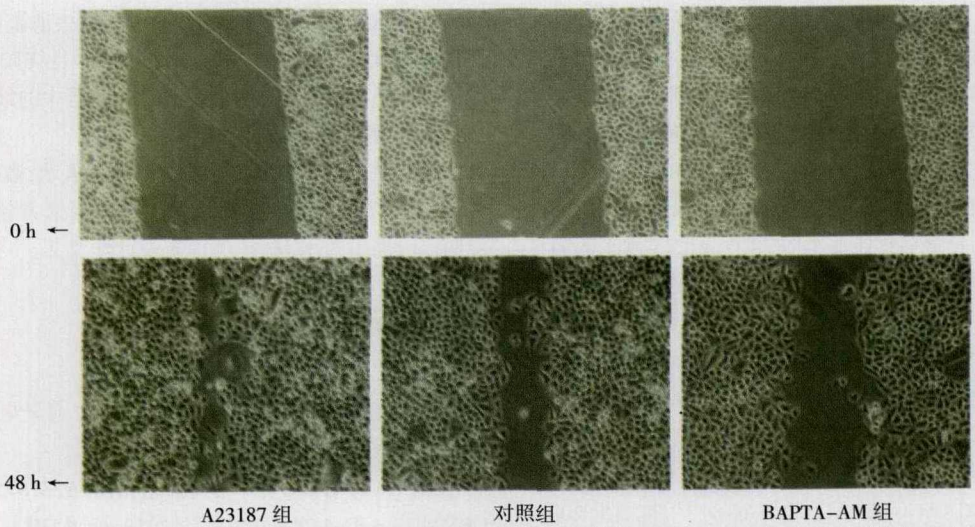



**图 2 BAPTA-AM 和 A23187 对 GRP78 蛋白表达水平的影响**




划痕实验显示，与对照组相比，A23187 处理组细胞的创口愈合较快，BAPTA-AM 处理组细胞的创口愈合较慢，统计学分析表明差异均具有显著性（$P<0.01$）。（×100）

**图 3　GRP78 表达水平的改变对胃癌细胞转移能力的影响**




侵袭实验显示，与对照组相比，A23187 处理组细胞的侵袭能力增强，BAPTA-AM 处理组细胞的侵袭能力减弱，统计学分析表明差异均具有显著性（$P<0.01$）。（HE 染色 ×200）

**图 4　GRP78 表达水平的改变对胃癌细胞侵袭能力的影响**

2.3　划痕实验检测 GRP78 表达水平的改变对胃癌细胞转移能力的影响

划痕实验结果显示，48 h 后，与对照组（57.32% ± 0.8%）相比，BAPTA-AM 处理组细胞创口愈合较慢（39.92% ± 0.79%），而 A23187 处理组细胞愈合较快（79.68% ± 0.91%）。经统计学分析，A23187 处理组、BAPTA-AM 处理组与对照组比较有显著性差异（$F$=1 700.803，$P<0.01$），2 个处理组之间比较差异具有显著性（$P<0.01$）（图 3）。

2.4　侵袭实验检测 GRP78 表达水平的改变对胃癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验结果显示，对照组每个视野细胞数平均值为（59 ± 2）个，A23187 处理组为（89 ± 2）个，高于对照组，而 BAPTA-AM 处理组为（43 ± 1）个，低于对照组。经统计学分析，A23187 处理组、BAPTA-AM 处理组与对照组比较有显著性差异（$F$=519.686，$P<0.01$），2 个处理组之间比较差异具有显著性（$P<0.01$）（图 4）。

## 3　讨　论

GRP78 属于热休克蛋白 70 家族，由内质网合成和分泌，其基本功能是：作为分子伴侣，在真核生物内质网膜上通过与新生多肽表面的疏水片段以非共价键形式短暂地结合，促进蛋白质的正确折叠、装配以及跨内质网膜转运，在生物机体的生长发育中起重要作用；作为应激蛋白，在低糖、低氧等应激状态下大量表达，参与未折叠蛋白反应以维持细胞的稳定[1-4]。另外，GRP78 在多种肿瘤中呈过表达，并与肿瘤的各种生物学行为有关。关于 GRP78 与胃癌侵袭转移能力关系的报道，国内外尚不多见。

本研究将药物 BAPTA-AM 和 A23187 作用于胃癌细胞 SGC7901，结果发现，BAPTA-AM 和 A23187 能分别下调和上调细胞中 GRP78 的表达水平。GRP78 是一种钙离子结合蛋白，细胞内的钙离子水平可影响其表达[5]。A23187 诱导GRP78 表达的可能机制就是它通过释放储存在内质网腔中的钙离子而降低了内质网钙离子水平，后者将影响蛋白质的释放，引起蛋白质在内质网中的积累，从而导致了内质网应激的发生[6,7]，而 BAPTA-AM 抑制 GRP78 表达的机制尚不清楚，可能与其下调了细胞浆内钙离子的水平有关[8]。

GRP78 在多种肿瘤中大量表达，并与部分肿瘤的侵袭和转移有关。Su R 等[9,10]发现，在人体肝癌组织中，GRP78 的表达水平与患者的肝癌分级呈负相关，而与肿瘤的侵袭和转移

能力呈正相关。体内外实验证实,在肝癌细胞株 SMMC7721 中,GRP78 的过表达可促进肿瘤细胞的侵袭和转移,而 siRNA 特异性下调 GRP78 的表达水平后,肿瘤细胞的侵袭和转移能力受到抑制。Zhuang L 等[11]应用免疫组织化学方法检测了 171 例患者的痣、黑色素瘤以及转移性黑色素瘤中 GRP78 的表达水平,发现其与黑色素瘤的临床病理因素和患者的生存率密切相关,且与肿瘤浸润深度和增殖中的皮肤肿瘤细胞有丝分裂指数呈正相关。在皮下转移性黑色素瘤和淋巴结转移性黑色素瘤中,GRP78 的表达水平明显高于原位癌。Papalas JA 等[12]发现,在原发性黑色素瘤中,GRP78 的表达与肿瘤的侵袭深度有关。本研究通过药物 BAPTA-AM 和 A23187 改变胃癌细胞株 SGC7901 中 GRP78 的表达水平,结果发现,用药物下调 GRP78 的表达可抑制肿瘤细胞的侵袭和转移能力,相反上调 GRP78 的表达则可提高其侵袭和转移能力,从而进一步证实了 GRP78 与胃癌的侵袭和转移有关。

对于 GRP78 影响肿瘤侵袭和转移的机制,国内外报道较少。上皮 - 间叶转化(Epithelial mesenchymal transformation, EMT)是指在胚胎发育、慢性炎症、纤维化以及肿瘤进展等病理生理过程中,上皮细胞向间质转化,从而丧失上皮细胞的极性,获得间质的特性。EMT 使上皮细胞与周围细胞和基质的粘附力下降,迁移和运动能力增加,该过程与肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移密切相关。Su R[9,10]报道,siRNA 特异性下调肝癌细胞中 GRP78 的表达水平后,可通过抑制肿瘤的上皮 - 间叶转化来抑制肿瘤的侵袭和转移。在前列腺癌细胞中 GRP78 可作为上游蛋白激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt (Serine/threonine protein kinase Akt),后者则可导致磷酸化的糖原合酶激酶 -3β (Glycogen synthase kinase, GSK-3β)增加,GSK-3β 活性下降。而 GSK-3β 活性下降能促进肿瘤细胞的 EMT[13,14]。故我们推测,GRP78 促进胃癌细胞侵袭和转移的机制与 Akt 及 EMT 有关。

以上结果表明,BAPTA-AM 和 A23187 可分别下调和上调胃癌细胞 GRP78 的表达水平,并且影响了肿瘤细胞的侵袭和转移能力。因此我们推测,GRP78 可能促进肿瘤细胞的侵袭和转移,以上两种药物可能通过改变 GRP78 的表达水平来影响肿瘤的侵袭和转移。然而,对于 GRP78 促进胃癌细胞侵袭转移的详细过程,尚需进一步研究。

## 参 考 文 献


[1] Zhang J, Jiang Y X, Jia Z L, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Clin Exp Metastasis, 2006, 23(7-8): 401-410.

[2] Dong D, Ni M, Li J, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development[J]. Cancer Res, 2008, 68(2): 498-505.

[3] Virrey J J, Dong D, Stiles C, et al. Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(8): 1268-1275.

[4] Lee H K, Xiang C, Cazacu S, et al. GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis [J]. Neuro Oncol, 2008, 10(3): 236-243.

[5] Wang Y, Wang W, Wang S, et al. Down-regulation of GRP78 is associated with the sensitivity of chemotherapy to VP-16 in small cell lung cancer NCI-H446 cells[J]. BMC Cancer, 2008, 8(1): 372.

[6] Gosky D, Chatterjee S. Down-regulation of topoisomerase Ⅱ alpha is caused by up-regulation of GRP78[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300(2): 327-332.

[7] Rao R V, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78[J]. FEBS Lett, 2002, 514(2-3): 122-128.

[8] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of $Ca^{2+}$ indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260(6): 3440-3450.

[9] Su R, Li Z, Li H, et al. Grp78 promotes the invasion of hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 20.

[10] 苏荣健,李 贞,程留芳.特异性下调葡萄糖调节蛋白 78 表达对肝细胞癌侵袭和转移能力的影响[J].细胞生物学杂志,2007,29:889-894.

[11] Zhuang L, Scolyer R A, Lee C S, et al. Expression of glucose-regulated stress protein GRP78 is related to progression of melanoma [J]. Histopathology, 2009, 54(4): 462-470.

[12] Papalas J A, Vollmer R T, Gonzalez-Gronow M, et al. Patterns of GRP78 and MTJ1 expression in primary cutaneous malignant melanoma [J]. Mod Pathol, 2010, 23(1): 134-143.

[13] Misra U K, Deedwania R, Pizzo S V. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappa B, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78[J]. J Biol Chem, 2006, 281(19): 13694-13707.

[14] Ye Y, Xiao Y, Wang W, et al. ERalpha signaling through slug regulates E-cadherin and EMT[J]. Oncogene, 2010, 29(10): 1451-1462.


(责任编辑:关蕴良)