

衣霉素诱导的内质网应激对胃癌细胞侵袭力的影响及机制

付政祺, 邹丰, 王绪明, 李艳, 刘丽江

付政祺, 邹丰, 王绪明, 刘丽江, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室 湖北省武汉市 430056

付政祺, 李艳, 刘丽江, 江汉大学病理诊断所 湖北省武汉市 430056

付政祺, 讲师, 主要从事胃肠道肿瘤病理学与病理生理学的教学和科研。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 30870981, 81272754

湖北省自然科学基金青年基金资助项目, No. 2013CFB215

江汉大学博士科研启动基金资助项目, No. 2010023

作者贡献分布: 此课题由付政祺与刘丽江设计; 研究过程由付政祺、邹丰及李艳操作完成; 研究所用试剂由刘丽江提供; 数据分析由付政祺与王绪明完成; 本论文写作由付政祺完成。

通讯作者: 刘丽江, 教授, 430056, 湖北省武汉市经济技术开发区, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室。

liulijiang@163.com

电话: 027-84226503

收稿日期: 2013-12-22 修回日期: 2014-01-13

接受日期: 2014-01-18 在线出版日期: 2014-03-18

Involvement of tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in invasion of gastric cancer cells

Zheng-Qi Fu, Feng Zou, Xu-Ming Wang, Yan Li, Li-Jiang Liu

Zheng-Qi Fu, Feng Zou, Xu-Ming Wang, Li-Jiang Liu, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Zheng-Qi Fu, Yan Li, Li-Jiang Liu, Pathology Institute, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30870981, 81272754; the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2013CFB215; and the Jiangnan University Doctor Foundation, No. 2010023

Correspondence to: Li-Jiang Liu, Professor, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Jiangnan University, Economic Development Zone, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@163.com

Received: 2013-12-22 Revised: 2014-01-13

Accepted: 2014-01-18 Published online: 2014-03-18

Abstract

AIM: To investigate the involvement of tunicamycin (TM)-induced endoplasmic reticulum stress in the invasion of gastric cancer cells and the underlying mechanisms.

METHODS: SGC7901 cells were treated with TM at a concentration of 3 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. After treatment, the invasion of gastric cancer cells

was evaluated by Transwell chamber assay. The phosphorylation of protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (pPERK) and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) at Ser9 was examined by Western blot.

RESULTS: TM treatment induced endoplasmic reticulum stress, which was demonstrated by increased pPERK. Endoplasmic reticulum stress decreased the invasion ability of gastric cancer cells and the phosphorylation of GSK-3 β at Ser9.

CONCLUSION: Endoplasmic reticulum stress induced by TM may decrease the invasion of gastric cancer cells by activation of GSK-3 β .

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Endoplasmic reticulum stress; Tunicamycin; Gastric cancer; GSK-3 β ; Tumour invasion

Fu ZQ, Zou F, Wang XM, Li Y, Liu LJ. Involvement of tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in invasion of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(8): 1101-1105 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1101.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i8.1101>

摘要

目的: 探讨衣霉素(tunicamycin, TM)诱导的内质网应激, 对胃癌细胞侵袭力的影响及机制。

方法: 以浓度为3 $\mu\text{mol/L}$ 的TM处理胃癌SGC7901细胞24 h, Transwell侵袭实验检测细胞侵袭能力, 并应用Western blot检测pPERK和GSK-3 β 蛋白Ser9位点的表达。

结果: Transwell侵袭实验显示, TM处理胃癌SGC7901细胞24 h, 细胞的侵袭性明显减弱。Western blot结果显示, 相对于DMSO对照组, TM处理组pPERK蛋白的表达明显高于DMSO对照组, 而Ser9-GSK-3 β 蛋白的表达明显降低, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。

结论: TM诱导的内质网应激, 通过激活GSK-3 β , 降低胃癌细胞的侵袭力。

■背景资料

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 易发生侵袭转移是其死亡率高的常见原因。研究发现, 内质网应激在肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 但在胃癌细胞侵袭中的作用及机制尚不完全清楚。内质网陪伴分子在胃癌组织中高表达, 且与肿瘤大小、侵袭深度和淋巴结转移等相关。内质网应激可激活GSK-3 β , 其在人体胃癌组织中的表达, 与淋巴结浸润、转移和生存率负相关。抑制GSK-3 β 表达, 可促进胃癌细胞SGC7901的迁移能力。

■同行评议者

余日胜, 主任医师, 浙江大学医学院附属第二医院放射科

■研究前沿

本研究发现衣霉素(tunicamycin, TM)诱导内质网跨膜蛋白PERK的磷酸化, 可通过降低GSK-3 β 蛋白Ser9位点的磷酸化(非活性位点), 激活GSK-3 β , 从而减弱胃癌细胞的侵袭力。但内质网应激调控GSK-3 β 影响细胞侵袭的机制有待进一步研究。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 内质网应激; 衣霉素; 胃癌; 糖原合成激酶-3 β ; 肿瘤侵袭

核心提示: 衣霉素(tunicamycin)诱导的内质网应激, 可通过降低糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)的Ser9位点磷酸化, 激活GSK-3 β , 从而明显降低胃癌细胞的侵袭力。

付政祺, 邹丰, 王绪明, 李艳, 刘丽江. 衣霉素诱导的内质网应激对胃癌细胞侵袭力的影响及机制. 世界华人消化杂志 2014; 22(8): 1101-1105 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1101.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i8.1101>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 易发生侵袭转移是其死亡率高的常见原因^[1-4]。近年研究发现, 内质网应激在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。在胃癌裸鼠移植瘤模型中, 敲除内质网陪伴分子葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein, GRP78)可抑制体外肿瘤细胞的侵袭生长与转移^[5]。内质网应激诱导剂衣霉素(tunicamycin, TM)可通过降低KL-6 mucin(Krebs von den Lungen-6)的表达, 降低人肝内胆管癌RBE细胞的侵袭力^[6]。但内质网应激在胃癌细胞侵袭中的作用及机制尚不完全清楚。

糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是Wnt信号转导通路的重要分子。研究发现GSK-3 β 参与肿瘤的发生、侵袭与转移^[7]。在人体胃癌组织中GSK-3 β 的阳性率为46%(129/281), 与淋巴结浸润、转移和生存率负相关^[8]。抑制GSK-3 β 表达可促进胃癌细胞SGC7901的迁移能力^[9,10]。为了探讨GSK-3 β 是否受内质网应激调控, 是否参与介导胃癌细胞的侵袭, 本研究拟给予内质网应激特异性诱导剂TM处理胃癌细胞系SGC7901, 通过检测内质网跨膜蛋白pPERK蛋白表达的变化及其与胃癌细胞侵袭力改变的关系, 明确内质网应激对胃癌细胞侵袭力的影响。并通过检测GSK-3 β 蛋白Ser9位点表达的改变情况, 探讨GSK-3 β 途径在内质网应激调控胃癌细胞侵袭中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系SGC7901由华中科技大学同济医学院免疫学系惠赠, 为本实验室保存。TM购自Alexis, 溶于DMSO以3 mmol/L浓度

-20 °C保存。pPERK(Thr 981)和 β -actin(C4)抗体购自Santa Cruz公司; Transwell侵袭试剂盒购自Millipore公司; Bicinchoninic acid(BCA)蛋白测定试剂盒购自Pierce公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理: SGC7901细胞接种在含10%小牛血清的RMPI 1640培养基中, 置于37 °C, 5%CO₂培养箱中培养, 每2-3 d换1次液。细胞增长至约70%-80%左右融合时胰酶消化传代。TM处理细胞的浓度为3 μ mol/L, 时间为24 h^[11]。

1.2.2 Transwell侵袭实验: 向侵袭小室(Transwell chamber)中加入制备好的密度为0.5 \times 10⁹/L-1.0 \times 10⁹/L的无血清SGC7901细胞悬液, 将小室置于含10%胎牛血清培养基的24孔板内培养24 h。用棉签轻轻刮除小室内未侵袭的细胞后, 将小室底部置于试剂盒中的染色液里染色20 min, 漂洗数次、风干。在显微镜下观察, 细胞计数。

1.2.3 Western blot技术检测: SGC7901细胞收集后, BCA法测蛋白, 进行SDS-PAGE电泳, 电泳后湿转至PVDF膜, 含5%脱脂奶粉的TBS-T(含0.05%Tween-20的TBS)37 °C封闭60 min, 加1:1000稀释的抗pPERK(Thr 981)和 β -actin抗体4 °C孵育过夜。TBS-T漂洗5 min \times 3次, 加入1:4000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠IgG 37 °C孵育45 min。TBS-T漂洗5 min \times 3次, ECL化学发光试剂检测^[12]。

统计学处理 全部数据经SPSS13.0统计学软件处理, 数据均采用mean \pm SD表示, 相关因素分析采用Spearman等级相关分析。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TM处理SGC7901细胞诱导内质网应激 Western blot结果显示, TM处理SGC7901细胞24 h后, pPERK蛋白的表达明显高于DMSO对照组(图1), 提示TM处理诱导内质网应激。

2.2 内质网应激对SGC7901细胞侵袭性的影响 与对照组(DMSO处理组)相比, TM处理组的SGC7901细胞的侵袭性明显减弱(图2)。

2.3 TM处理后Ser9-GSK-3 β 蛋白的表达改变 胃癌细胞SGC7901经TM处理24 h后, Ser9-GSK-3 β 蛋白表达下降(图3), 提示内质网应激通过降低GSK-3 β 的Ser9位点磷酸化, 激活GSK-3 β , 影响细胞侵袭能力。

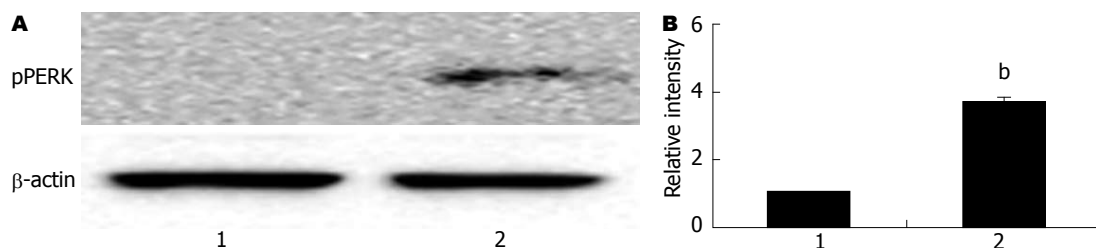


图 1 Western blot方法检测TM处理胃癌细胞SGC7901, pPERK蛋白的表达。A: Western blot图; B: 统计图。1: 对照组; 2: TM处理组。^b $P < 0.01$ vs 对照组。TM: 衣霉素。

■ 创新盘点

内质网应激在胃癌细胞侵袭中的作用及机制尚不完全清楚。本研究发现, TM诱导的内质网应激, 可通过降低GSK-3 β 的Ser9位点磷酸化, 激活GSK-3 β , 从而明显降低胃癌细胞的侵袭力。

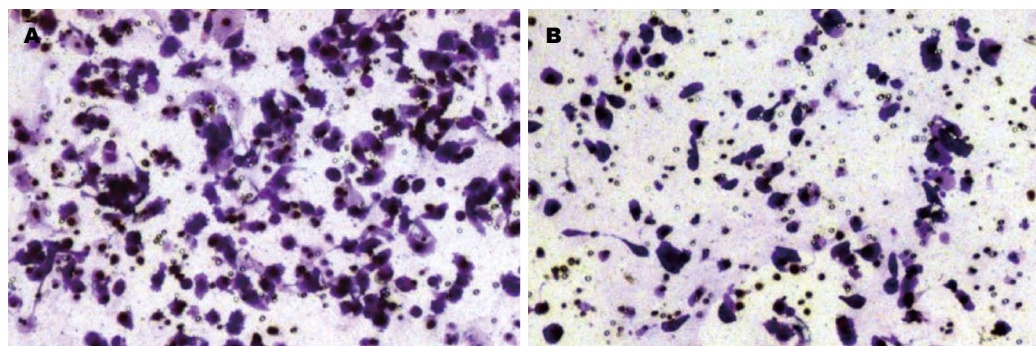


图 2 TM处理胃癌SGC7901细胞后侵袭能力的改变。A: 对照组; B: TM处理组。TM: 衣霉素。

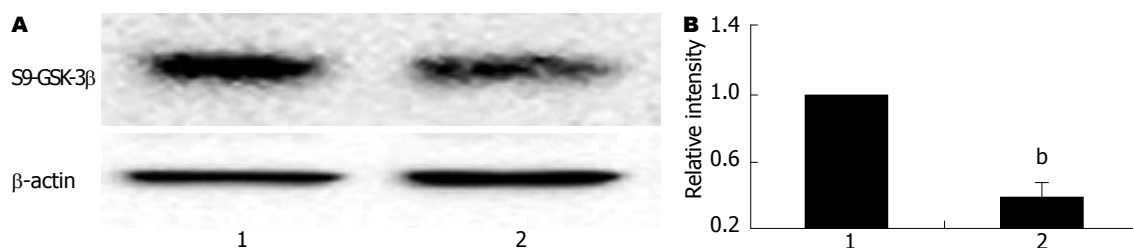


图 3 Western blot方法检测TM处理胃癌细胞SGC7901, S9-GSK-3 β 蛋白的表达。A: Western blot图; B: 统计图。1: 对照组; 2: TM处理组。^b $P < 0.01$ vs 对照组。TM: 衣霉素。

3 讨论

内质网是细胞内蛋白质合成、折叠及转运的重要场所, 并利用其严格的质控系统, 保证其输出蛋白具有正常结构功能。当多种生理或病理因素, 如缺氧、钙超载等, 引起细胞内未折叠/错误折叠蛋白质增多, 内环境失衡时, 将导致内质网应激。此时, 一系列级联反应即未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)被激活, 通过限制未折叠/错误折叠蛋白的合成, 加强对蛋白的折叠能力及加速未折叠/错误折叠蛋白的降解对细胞发挥保护作用。但当这种紊乱持续发展, 超过了自身调节, 将导致细胞的凋亡和死亡^[13,14]。近年研究发现, 内质网应激可能在肿瘤的发生、侵袭、转移中发挥重要作用。内质网陪伴分子GRP78和GRP94在胃癌组织中高表达, 且与肿瘤大小、侵袭深度和淋巴结转移等相关^[15-17]。

内质网应激诱导剂TM可通过降低KL-6 mucin的表达, 降低RBE细胞的侵袭力^[6]。本研究发现TM诱导的内质网应激可降低胃癌细胞的侵袭力。

GSK-3 β 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 活性受其Ser9位点(抑制性)和Tyr216位点(活性)的磷酸化水平调节^[18]。研究发现, GSK-3 β 参与细胞内多种信号转导通路, 在胃癌细胞的增殖与凋亡中发挥重要作用。人体胃癌组织中GSK-3 β 的阳性率为46%(129/281), 且在早期胃癌组织中阳性率较高, 与淋巴结浸润、转移和生存率负相关^[8]。抑制GSK-3 β 表达, 可促进胃癌细胞SGC7901的迁移能力^[9,10]。蛋白激酶RNA样内质网激酶[protein kinase RNA (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase, PERK]是I型内质网跨膜蛋白。应激状态下, PERK被激活, 与GRP78解聚并发生自身磷酸化, 通过减少蛋白质合成, 以减轻内质网内新生

■应用要点

探讨内质网应激在胃癌细胞侵袭中的作用及机制,此成果将对胃癌发生、发展的理论研究以及胃癌治疗新靶点的选择方面,产生重要影响。

蛋白质折叠需求的压力^[19]。研究发现,内质网应激可激活GSK-3 β ^[20,21]。在阿尔茨海默病患者大脑海马神经元中pPERK阳性神经元的GSK-3 β 表达丰富^[22]。肾脏缺血后处理(ischemic postconditioning)及联合曲美他嗪治疗可降低内质网应激蛋白pPERK等的表达,并通过降低GSK-3 β 活性,改善肾功能提高大鼠生存率^[23]。提示,内质网应激时,PERK等通路可通过GSK-3 β 途径,影响细胞存活。本研究发现TM诱导的内质网跨膜蛋白PERK的磷酸化,可通过降低GSK-3 β 蛋白Ser9位点的磷酸化(非活性位点),激活GSK-3 β ,从而减弱胃癌细胞的侵袭力。但内质网应激调控GSK-3 β 影响细胞侵袭的机制有待进一步研究。

总之,本研究结果显示:TM诱导的内质网应激,可通过降低GSK-3 β 的Ser9位点磷酸化,激活GSK-3 β ,从而明显降低胃癌细胞的侵袭力。

4 参考文献

- Deng J, Zhang R, Zhang L, Liu Y, Hao X, Liang H. Negative node count improvement prognostic prediction of the seventh edition of the TNM classification for gastric cancer. *PLoS One* 2013; 8: e80082 [PMID: 24348906 DOI: 10.1371/journal.pone.0080082]
- 邹丰, 王绪明, 刘丽江. ER- α 36和miR-143介导胃癌细胞的侵袭. *中国病理生理杂志* 2012; 28: 2167-2171
- 王绪明, 刘晶晶, 邓昊, 陈莹, 刘丽江. ER- α 36对胃癌SGC7901细胞在裸鼠体内生长的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2919-2924
- 邓昊, 镇鸿燕, 陈莹, 付政祺, 刘丽江. IFN- γ 通过非依赖STAT1途径对人胃癌组织中P53表达的调控机制. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1353-1358
- Zhang J, Jiang Y, Jia Z, Li Q, Gong W, Wang L, Wei D, Yao J, Fang S, Xie K. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 401-410 [PMID: 17187227]
- Xu HL, Inagaki Y, Seyama Y, Sugawara Y, Kokudo N, Nakata M, Wang FS, Tang W. Expression of KL-6 mucin, a human MUC1 mucin, in intrahepatic cholangiocarcinoma and its potential involvement in tumor cell adhesion and invasion. *Life Sci* 2009; 85: 395-400 [PMID: 19631667 DOI: 10.1016/j.lfs.2009.07.004]
- Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal* 2014; 26: 570-579 [PMID: 24308963 DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.032]
- Cho YJ, Kim JH, Yoon J, Cho SJ, Ko YS, Park JW, Lee HS, Lee HE, Kim WH, Lee BL. Constitutive activation of glycogen synthase kinase-3 β correlates with better prognosis and cyclin-dependent kinase inhibitors in human gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 91 [PMID: 20704706 DOI: 10.1186/1471-230X-10-91]
- Liu J, Zhang Y, Xu R, Du J, Hu Z, Yang L, Chen Y, Zhu Y, Gu L. PI3K/Akt-dependent phosphorylation of GSK3 β and activation of RhoA regulate Wnt5a-induced gastric cancer cell migration. *Cell Signal* 2013; 25: 447-456 [PMID: 23123500 DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.10.012]
- Ryu YK, Lee YS, Lee GH, Song KS, Kim YS, Moon EY. Regulation of glycogen synthase kinase-3 by thymosin beta-4 is associated with gastric cancer cell migration. *Int J Cancer* 2012; 131: 2067-2077 [PMID: 22328534 DOI: 10.1002/ijc.27490]
- Fu Z, Zou F, Deng H, Zhou H, Liu L. Estrogen protects SGC7901 cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by the Akt pathway. *Oncol Lett* 2014; 7: 560-564 [PMID: 24396487]
- Liu ZC, Fu ZQ, Song J, Zhang JY, Wei YP, Chu J, Han L, Qu N, Wang JZ, Tian Q. Bip enhanced the association of GSK-3 β with tau during ER stress both in vivo and in vitro. *J Alzheimers Dis* 2012; 29: 727-740 [PMID: 22460328 DOI: 10.3233/JAD-2012-111898]
- McCloy RA, Shelley EJ, Roberts CG, Boslem E, Biden TJ, Nicholson RI, Gee JM, Sutherland RL, Musgrove EA, Burgess A, Butt AJ. Role of endoplasmic reticulum stress induction by the plant toxin, persin, in overcoming resistance to the apoptotic effects of tamoxifen in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 2013; 109: 3034-3041 [PMID: 24178758 DOI: 10.1038/bjc.2013.693]
- 邢俊丽, 冯若, 李海春, 王亚强, 许培仁, 张钦宪. 衣霉素诱导胃癌细胞内质网应激介导的细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1037-1040
- Fu Z, Deng H, Wang X, Yang X, Wang Z, Liu L. Involvement of ER- α 36 in the malignant growth of gastric carcinoma cells is associated with GRP94 overexpression. *Histopathology* 2013; 63: 325-333 [PMID: 23829397 DOI: 10.1111/his.12171]
- Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, Takano Y. Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2008; 39: 1042-1049 [PMID: 18482745 DOI: 10.1016/j.humpath.2007.11.009]
- Fu Z, Deng H, Chen Y, Liu L. The involvement of GRP78 on estrogen signaling in gastric cancer. The 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. *ICBEB* 2012: 1125-1128
- Park CH, Lee BH, Ahn SG, Yoon JH, Oh SH. Serine 9 and tyrosine 216 phosphorylation of GSK-3 β differentially regulates autophagy in acquired cadmium resistance. *Toxicol Sci* 2013; 135: 380-389 [PMID: 23897984 DOI: 10.1093/toxsci/kft158]
- Vaughn LS, Snee B, Patel RC. Inhibition of PKR protects against tunicamycin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Gene* 2014; 536: 90-96 [PMID: 24334130 DOI: 10.1016/j.gene.2013.11.074]
- Song L, De Sarno P, Jope RS. Central role of glycogen synthase kinase-3 β in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 44701-44708 [PMID: 12228224 DOI: 10.1074/jbc.M206047200]
- Fu ZQ, Yang Y, Song J, Jiang Q, Lin ZC, Wang Q, Zhu LQ, Wang JZ, Tian Q. LiCl attenuates thapsigargin-induced tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK-3 β in vivo and in vitro. *J Alzheimers Dis* 2010; 21: 1107-1117 [PMID: 21504119]
- Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Roze-muller AJ, Eikelenboom P, Scheper W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am*

- J Pathol* 2009; 174: 1241-1251 [PMID: 19264902 DOI: 10.2353/ajpath.2009.080814]
- 23 Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hauet T, Hadj-Ayed K, Miled AH, Ghoul-Mazgar S, Saidane-Mosbahi D, Rosello-Catafau J, Ben Abdennebi

H. Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning application and trimetazidine treatment. *J Biomed Sci* 2012; 19: 71 [PMID: 22853733 DOI: 10.1186/1423-0127-19-71]

■同行评价
本文具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.