

斯钙素 1 对肾癌细胞生长调控的影响*

杨清滔¹, 谷江^{2*}, 石家齐¹, 贾本忠¹, 顾昌世¹, 张永春², 朱致晖³, 姚茂良²,
刘森², 夏剑锋²

(1. 贵州医科大学附属白云医院, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州省妇幼保健院, 贵州 贵阳 550000)

[摘要] 目的: 研究斯钙素 1 (stanniocalcin1, STC-1) 对肾癌细胞生长的调控机制。方法: 体外培养肾癌细胞, 用 0、0.1、0.5 和 1.0 nmol/L STC-1 溶液浸染肾癌细胞, 分别为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组; 分别用 MTT 法检测各组肾癌细胞的增殖情况, RT-PCR 及 ELISA 法检测各组肾癌细胞中缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、STC-1 基因及蛋白的表达, 荧光分光光度计检测各组细胞内 Ca²⁺ 水平。结果: 随着 STC-1 蛋白给药浓度的增加, 细胞内 HIF-1 α 、STC-1 的表达及 Ca²⁺ 水平逐渐下降, 细胞的促增殖作用逐渐降低, 在低剂量组出现一过性增加。结论: STC-1 蛋白可能通过调节 HIF-1 α 、Ca²⁺ 的水平, 促进肾癌细胞增殖, 而该促增殖作用可能会因为 STC-1 对 HIF-1 α 的抑制而逐渐减弱, 从而调控肾癌细胞的生长平衡。

[关键词] 肾癌细胞; 斯钙素 1; 缺氧诱导因子 1 α ; 钙离子; 增殖; 抑制

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)10-1043-04

Influence of STC-1 on Growth Regulation of Renal Carcinoma Cells

YANG Qingtao¹, GU Jiang^{2*}, SHI Jiaqi¹, JIA Benzong¹, GU Changshi¹, ZHANG Yongchun²,
ZHU Zhihui³, YAO Maoliang², LIU Miao², XIA Jianfeng²

(1. Affiliated Baiyun Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Women and Child Health Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To research the regulation mechanism of Stanniocalcin1 (STC-1) on renal carcinoma cells. **Methods:** Renal carcinoma cells were cultured *in vitro*, and STC-1 solutions of different concentration were added to the culture medium. According to the different concentration, renal carcinoma cells were divided into control group, low-dose group (0.1 nmol/L STC-1), middle-dose group (0.5 nmol/L STC-1), high-dose group (1.0 nmol/L STC-1). The proliferation of cells, expressions of HIF-1 α , STC-1 and levels of Ca²⁺ were detected by MTT, RT-PCR, ELISA and Fluorescence Spectrophotometer respectively. **Results:** The results showed that the cells treated with STC-1 protein exhibited characteristics of proliferation. And along with the increase of STC-1 protein concentration, the proliferation of cells, expressions of HIF-1 α and STC-1, levels of Ca²⁺ were down-regulated. And a transient increase of proliferation of cells occurred in the low-dose group. **Conclusions:** STC-1 protein may participate in malignant proliferation of renal carcinoma cells through depressing HIF-1 α or down-regulation Ca²⁺, which could wear off when HIF-1 α is inhibited by redundant STC-1, thus regulate the growth balance of renal carcinoma cells.

[Key words] renal carcinoma cells; stanniocalcin1; hypoxia-inducible factor 1 α ; calcium; proliferation; inhibition

* [基金项目] 贵州省科技厅社会攻关计划项目[黔科合 sy 字(2011)3060]

** 通信作者 E-mail: 18985009566@189.cn

网络出版时间: 2015-09-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150911.2325.066.html>

恶性肿瘤由于其侵袭性和异型性等特性,在发生发展过程中肿瘤细胞会激活一系列相关分子信号转导途径以适应环境的变化^[1]。缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)作为介导细胞进行适应性反应的关键性转录调控因子,在维持肿瘤细胞的能量代谢、细胞增殖等方面发挥重要作用^[2]。斯钙素1(stanniocalcin1, STC-1)是一种高表达于肾小管上皮细胞、调节细胞内Ca²⁺平衡的糖蛋白激素^[3],在多种实体瘤组织内高表达^[4]。Ca²⁺的动态平衡与肿瘤细胞增殖、转移和侵袭有关^[5],HIF-1 α 亦是诱导STC-1表达的关键调节因子^[6]。本实验选择HIF-1 α 、Ca²⁺为研究靶点,以外源性STC-1蛋白作为干预条件,通过检测细胞内HIF-1 α 、STC-1基因及蛋白表达和Ca²⁺水平的变化,探讨STC-1是否借助调节细胞内Ca²⁺及HIF-1 α 水平参与肾癌细胞的生长调控。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

肾癌(GRC-1)细胞购于上海弗雷堡生物公司,MTT购于Sigma公司,RPMI1640购于Hyclone公司,STC-1蛋白购于Prospec公司,总RNA提取试剂盒购于Fermentas公司,ELISA试剂盒购于R&D公司,Fura-2 AM钙离子探针购于碧云天生物技术研究所。

1.2 细胞培养及分组

GRC-1细胞置于25 cm²培养瓶中,用含10%胎牛血清及1%青霉素、链霉素的RPMI1640培养液,在5% CO₂、37℃培养,2~3 d换液或消化传代1次,取生长对数期细胞进行试验。用0、0.1、0.5和1.0 nmol/L STC-1溶液浸染细胞培养基,即为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组。

1.3 方 法

1.3.1 HIF-1 α 、STC-1 基因检测 RT-PCR法检测细胞内HIF-1 α 、STC-1基因表达。使用试剂盒提取各组肾癌细胞总RNA,取1 μ g RNA进行逆转录并合成cDNA。引物序列 β -actin,正向5'-CCCTG-GACTTCGAGCAAGAGAT-3',反向5'-GTTTTCT-GCGCAAGTTAGG-3',片段长度531 bp;HIF-1 α ,正向5'-TCCA GCAGACTCAAATACAAGAAG-3',反向5'-GTATGTGGGTAGGAGATGGAGATG-3',片段长度130 bp;STC-1,正向5'-TGAGGTCGTCCAGCTC-CCAATC-3',反向5'-GGCACAGTGGTCTGTCTG-CAGGATG-3',片段长度142 bp。RT-PCR反应条

件:预变性94℃ 3 min,变性94℃ 30 s,退火53℃ 30 s,延伸72℃ 1 min,35个循环后,终止反应72℃ 5 min;以 β -actin作为内参照,PCR产物于2%琼脂糖凝胶进行电泳。

1.3.2 HIF-1 α 、STC-1 蛋白的检测 ELISA法检测HIF-1 α 、STC-1蛋白表达。使用PMSF与细胞裂解液裂解各组细胞,12 000 r/min离心5 min,取上清滴加于酶标包被板中,50 μ L/孔,分别设空白孔、标准孔和待测样品孔,按照试剂盒说明书操作。

1.3.3 Ca²⁺ 含量测定 荧光探针检测细胞内Ca²⁺含量。取生长良好的细胞接种于6孔板中,当汇合度约80%时,分组处理后消化成细胞悬液,1 000 r/min离心5 min弃上清液,用含0.2%小牛血清白蛋白的D-Hanks液重悬细胞,调整细胞数约为8 \times 10⁵/mL。加入Fura-2 AM(3.89 μ mol/L),37℃避光孵育45 min。用D-Hanks液洗涤细胞2次,D-Hanks液3 mL重悬细胞。荧光分光光度计激发波长分别为340 nm、380 nm,发射波长510 nm双波长测定负载探针细胞的荧光强度。加入158 μ L 2% Triton-100,5 min后测定细胞双波长荧光强度;加380 nmol/LEGTA 42 μ L测定细胞双波长荧光强度。所得结果按公式计算:[Ca²⁺] = 224 \times F₀/F_s \times (R - R_{min})/(R_{max} - R)[R为实验测得的F₃₄₀/F₃₈₀,R_{max}为加入Triton-100后的F₃₄₀/F₃₈₀,R_{min}为加入Triton-100后再加EGTA的F₃₄₀/F₃₈₀,F_s为加入Triton-100后的F₃₈₀,F₀为加入Triton-100后再加EGTA的F₃₈₀]。

1.3.4 细胞增殖活性 MTT法检测细胞的增殖活性。取生长良好的细胞接种于96孔板中,约10⁴个/孔,每组设6复孔,培养24 h分组处理后吸取孔内培养基,每孔加80 μ L无血清培养基和MTT(5 μ g/L) 20 μ L,37℃孵育4 h后弃去孔内液体,加二甲亚砜150 μ L低速震荡10 min,用酶标仪检测490 nm处的吸光度(OD)值。

1.4 统计学方法

所有数据均应用SPSS 19.0软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

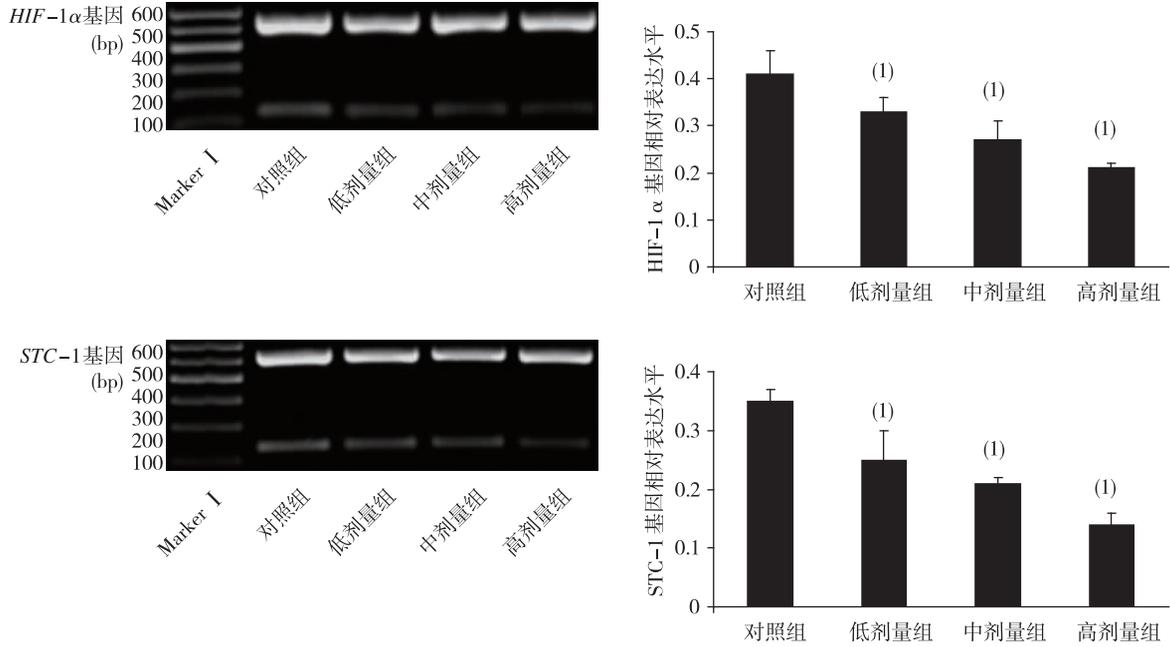
2.1 HIF-1 α 和 STC-1 基因的表达

各剂量组HIF-1 α 、STC-1基因的表达量均显著

低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且随着 STC-1 剂量的增加而逐渐降低。见图 1。

2.2 HIF-1 α 和 STC-1 蛋白相对表达水平

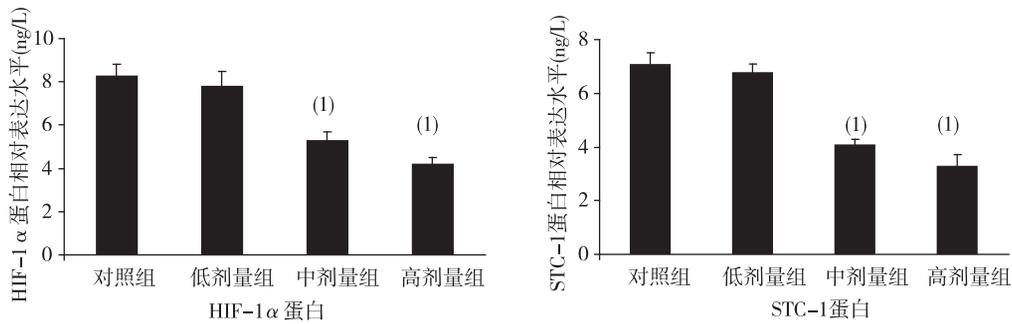
除低剂量组外,各剂量组 HIF-1 α 、STC-1 蛋白的表达量均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



注: Marker I 为 100 ~ 600 bp 作为标准参照;⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.05$

图 1 各组细胞内 HIF-1 α 、STC-1 基因相对表达水平

Fig. 1 Relative expression of HIF-1 α and STC-1 genes in each group



⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.05$

图 2 各组细胞内 HIF-1 α 、STC-1 蛋白相对表达水平

Fig. 2 Relative expression of HIF-1 α and STC-1 proteins in each group

2.3 细胞内 Ca²⁺ 含量及细胞增殖活性

STC-1 低、中、高剂量组细胞内 Ca²⁺ 含量均显著低于对照组($P < 0.05$),且细胞内 Ca²⁺ 含量均随 STC-1 给药浓度的增加而逐渐减少;除高剂量组外,低、中、高剂组细胞 OD 值均高于对照组,但随着 STC-1 剂量的增加 OD 值逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),在低剂量组出现一过性增加。见表 1。

表 1 各组细胞内 Ca²⁺ 含量及细胞增殖活性
Tab. 1 Level of Ca²⁺ and proliferation activity of renal carcinoma cells in each group

组别	n	细胞内 Ca ²⁺ 含量 (nmol/L)	细胞增殖活性 (OD 值)
对照组	6	95.7 ± 8.6	0.226 ± 0.021
低剂量组	6	60.3 ± 5.5 ⁽¹⁾	0.343 ± 0.024 ⁽¹⁾
中剂量组	6	48.6 ± 6.3 ⁽¹⁾	0.293 ± 0.018 ⁽¹⁾
高剂量组	6	33.7 ± 4.2 ⁽¹⁾	0.252 ± 0.023

⁽¹⁾与对照组相比, $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤发生发展在很大程度上依赖 HIF-1 α 来维持肿瘤细胞的能量代谢、新血管形成、细胞增殖^[2]。HIF-1 α 表达的增减可使肿瘤细胞生长、血管化和转移出现相应的增减,最终影响患者预后^[7]。STC-1 高表达于肾小管上皮细胞,调节细胞内 Ca²⁺ 平衡^[3],而 Ca²⁺ 作为细胞内重要的第二信使,参与了多种肿瘤细胞的增殖及凋亡调控^[8]。随着对 STC-1 不断深入研究,发现 STC-1 在肿瘤生长过程中发挥着重要作用,原因可能与 STC-1 调节细胞内 Ca²⁺ 含量,从而诱导细胞增殖有关^[5]。鉴于 HIF-1 α 、STC-1 及 Ca²⁺ 之间的相互联系,故本研究选择 HIF-1 α 、Ca²⁺ 为研究靶点,用不同浓度 STC-1 干预肾癌细胞,通过检测细胞 HIF-1 α 、STC-1 表达和 Ca²⁺ 水平的变化,探讨 STC-1 是否借助调节细胞内 Ca²⁺ 及 HIF-1 α 水平参与肾癌细胞的生长调控。

本研究中,STC-1 干预肾癌细胞后,发现 HIF-1 α 、STC-1 表达随着 STC-1 给药浓度的增加而逐渐下降,这可能是外源性 STC-1 蛋白经胞质转导肽 (CTP) 介导,被其导入细胞内,其中 CTP 是一种可携带生物活性大分子转运到细胞质的新型转导肽^[9],被导入的 STC-1 发挥其有效蛋白作用,并下调细胞内 HIF-1 α 表达^[10],亦可能是 STC-1 蛋白直接作用于细胞后的负反馈调节所致。本研究结果显示 STC-1 可下调细胞内 Ca²⁺ 含量,且随着 STC-1 给药浓度的增加而逐渐降低。相关文献报道,HIF-1 α 、STC-1 降低 Ca²⁺ 机制不尽相同;一方面 HIF-1 α 通过上调细胞内质网钙泵 SERCA2 蛋白表达和增强线粒体 Ca²⁺ 缓冲能力,促进细胞内 Ca²⁺ 向内质网、线粒体转移,并且下调细胞膜非典型 L 型钙通道表达,从而引起 Ca²⁺ 内流减少^[11];另一方面可能是由于 STC-1 分泌细胞上存在钙离子敏感受体,从而介导 STC-1 分泌细胞合成和分泌 STC-1,进而负反馈降低 Ca²⁺^[12]。结合本研究 MTT 结果,发现 STC-1 能促进肾癌细胞增殖,而促增殖作用却随着 STC-1 给药浓度的增加而降低,其原因可能为随着 STC-1 给药浓度的增加,HIF-1 α 、Ca²⁺ 水平逐渐下降,细胞增殖活性升高可能是通过 STC-1 浓度的增加来减少细胞内 Ca²⁺ 含量,避免钙超载,从而抑制细胞凋亡;但 HIF-1 α 是促肿瘤细胞生长的有利基

因^[7],STC-1 降低 Ca²⁺ 的同时也降低 HIF-1 α ,当 HIF-1 α 表达下降到一定程度时,STC-1 对细胞的增殖促进作用逐渐被 HIF-1 α 表达下降所拮抗;故 STC-1 对细胞促增殖的作用在低剂量组出现一过性增高,在中、高剂量组逐渐降低。

恶性肿瘤是消耗性疾病,肿瘤细胞对能量需求过大或供给不足都将导致细胞生长受限。HIF-1 α 是促肿瘤细胞增殖的有利因子^[7],而 STC-1 蛋白却抑制其表达,这避免了肿瘤细胞过度增殖而减少能量消耗,表明 STC-1 可能作为肿瘤细胞增殖的调节剂或缓解剂。一方面 STC-1 通过降低细胞内 Ca²⁺ 水平,避免钙超载,减少细胞凋亡,从而实现细胞增殖;另一方面 STC-1 通过下调 HIF-1 α 表达,避免细胞过度增殖,最终使细胞达到一种平衡生长状态。尝试打破这一生长平衡可为临床对肾癌的治疗带来新的思考,但肿瘤细胞生长过程受多因素调控,本研究仅为体外实验,尚不能更真实的模拟细胞生长环境,故在后续实验中我们将建立动物模型并选择性沉默或高表达 STC-1,深入研究 STC-1 作用于肿瘤细胞及机制。

4 参考文献

- [1] Tang CM, Yu J. Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in cancer [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013 (3):401-405.
- [2] Liang B, Zheng CS, Feng GS, et al. Correlation of hypoxia-inducible factor 1alpha with angiogenesis in liver tumors after transcatheter arterial embolization in an animal mode [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2010(4):806-812.
- [3] 张延涛,王静蓉,李晓燕.人类斯钙素生物学特性的相关研究[J].医学综述,2009(19):2926-2928.
- [4] 周洁晶,晏培松.斯钙素 1 在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达及其意义[J].中华妇产科杂志,2010(5):390-392.
- [5] Liu G, Yang G, Chang B, et al. Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis [J]. J Natl Cancer Inst, 2010(11):812-827.
- [6] 郝卫刚,张海蓉,段丽平.人类斯钙素与肿瘤相关性研究进展[J].重庆医学,2011(36):3725-3727.
- [7] Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LP-LI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp 1 pathway [J]. Cell Signal, 2012(6):1116-1125.

(下转第 1050 页)

- (9):710-712.
- [3] Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, et al. Updated ILAE evidence review of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes [J]. *Epilepsia*, 2013 (2):551-563.
- [4] Kiang TK, Teng XW, Karagiozov S. Role of oxidative metabolism in the effect of valproic Acid on markers of cell viability, necrosis, and oxidativestress in sandwich-cultured rat h-Epatocytes [J]. *Toxicol Sci*, 2010 (2):501-509.
- [5] Argikar UA, Rimmel RP. Effect of aging on glucuronidation of valproic acid in human liver microsomes and the role of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009 (1):229-236.
- [6] Tan L, Yu JT, Sun YP, et al. The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2010 (4):320-323.
- [7] Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamb JK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2013 (4):236-241.
- [8] Kiang TK, Teng XW, Surendradoss J, et al. Glutathione depletion by valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes: Role of biotransformation and temporal relationship with onset of toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011 (3):318-324.
- [9] Amini-Shirazi N, Ahmadvani R, Shadnia S, et al. Determination of VPA and its Two Important Metabolites in Iranian Overdosed Patients [J]. *International Journal of Pharmacology*, 2010 (6):854-862.
- [10] 储小曼, 郭岑, 张丽芳. 丙戊酸的代谢特征与其肝毒性的相关性 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013 (19):1611-1614.
- [11] Lee MS, Lee YJ, Kim BJ, et al. The Relationship between Glucuronide Conjugate levels and Hepatotoxicity after Oral Administration of Valproic Acid [J]. *Arch Pharm Res*, 2009 (7):1029-1035.

(2015-04-20 收稿, 2015-08-01 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 刘 华

(上接第 1046 页)

- [8] Chen T, Fei F, Jiang XF, et al. Down-regulation of Homer1b/c attenuates glutamate-mediated excitotoxicity through endoplasmic reticulum and mitochondria pathways in rat cortical neurons [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012 (1):208-217.
- [9] 卓萌, 臧国庆, 汤正好. 胞质转导介导的蛋白转导技术及其在医学领域中的应用 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2013 (3):197-200.
- [10] Ellard JP, McCudden CR, Tanega C, et al. The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007 (1):90-101.
- [11] Neumann AK, Yang J, Biju MP, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005 (47):17071-17076.
- [12] Loretz CA, Pollina C, Hyodo S, et al. Extracellular calcium-sensing receptor distribution in osmoregulatory and endocrine tissues of the tilapia [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009 (2):216-228.

(2015-05-12 收稿, 2015-08-23 修回)
中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 刘 华

注意正确使用“百分点”

百分点(1 百分点 = 1%)的使用现在越来越多,但不少媒体用错了。例如某期刊中说:“2007 年产量为 100 万 t, 2008 年达 112 万 t, 增加了 12 个百分点。”

百分点是一个新的基础数学概念,它只用于比较采用百分数形式表示的数值的增减,例如个人存款的年利率从 3.25% 降至 2.25%,可以说降了 1 个百分点,但决不能说降了 1%。如果是降了 1%,则新利率应为 $3.25\% - 3.25\% \times 0.01 = 3.2175\%$ 。可见,上述年产量的增加应用百分数表示,即说“增加了 12%”。

百分点是一个单位,书写时其前面的“个”应删去,正如“5 小时”“10 厘米”不应写作“5 个小时”“10 个厘米”一样。