文章编号:1000-5404(2008)16-1545-04

论著

钙结合蛋白S100A2对Wnt/β-catenin信号途径活性的上调作用

赖天霞[1],苗静琨[1],左国伟[1],何焕玲[1],李星星[1],卫 佳[1],吴丽美[1],寇小琴[1],何通川[2],周 兰[1] ([1]重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016; [2]Molecular Oncology Laboratory, Department of Surgery, the University of Chicago Medical Center, Chicago, IL, USA)

摘 要:目的 研究钙结合蛋白S100A2对Wnt/β-catenin信号途径活性的影响,并探讨其可能的机制。**方法** 原核诱导表达GST-hS100A2,经纯化后加入骨肉瘤细胞株MG63和人结肠癌细胞株HCT116的培养液中,Western blot检测细胞中β-catenin含量的变化;荧光素酶活性分析法检测S100A2对HEK293细胞中β-catenin/TCF4活性的影响;以表达GSK-3β、DVL、Axin的相应质粒分别转染HEK293细胞,GST-Pulldown/Western blot实验检测S100A2与这些蛋白质和β-catenin之间的相互作用。**结果** S100A2使MG63和HCT116细胞中β-catenin含量增加、β-catenin/TCF4活性增强;S100A2分别与β-catenin和GSK-3β之间存在相互作用,而与DVL和Axin之间则未发现相互作用。**结论** S100A2可以上调Wnt/β-catenin信号途径的活性,其机制可能涉及S100A2与β-catenin和GSK-3β之间的相互作用。

关键词: S100A2; Wnt/β-catenin信号途径;蛋白质相互作用
中图法分类号: Q513;R394.3;R730.23 **文献标识码:** A

S100 calcium-binding protein A2 upregulates the activity of Wnt/β-catenin signaling pathway

LAI Tian-xia[1], MIAO Jing-kun[1], ZUO Guo-wei[1], HE Huan-ling[1], LI Xing-xing[1], WEI Jia[1], WU Li-mei[1], KOU Xiao-qin[1], HE Tong-chuan[2], ZHOU Lan[1] ([1]Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; [2]Molecular Oncology Laboratory, Department of Surgery, The University of Chicago Medical Center, Chicago, IL, USA)

Abstract: Objective To investigate the effects of calcium-binding protein S100 A2 on Wnt/β-catenin signaling pathway and its mechanisms. **Methods** Human osteosarcoma cell line MG63 and human colon cancer cell line HCT116 were treated with recombinant fusion protein GST-hS100A2 that was expressed in *E. coli* and purified. β-catenin was quantified by Western blot and the effects of S100A2 on the β-catenin/TCF4 activity was analyzed by luciferase activity assay. The interactions between S100A2 and β-catenin/GSK-3β/DVL/Axin were detected by GST-Pulldown and Western blot. **Results** The β-catenin level in MG63 and HCT cells treated with GST-hS100A2 increased significantly as compared with that in the GST control group ($P<0.01$). The luciferase activity in HEK 293 cells transfected with pTOP-Luc and then treated with GST-hS100A2 increased by 12.3 fold as compared with that in the GST control group ($P<0.01$). The interactions between GST-hS100A2 and β-catenin/GSK-3β were verified by GST-Pulldown/Western blot, and no interaction was found between GST-hS100A2 and Axin/DVL. **Conclusion** S100A2 can upregulate the activity of Wnt/β-catenin signaling pathway and its mechanism may involve in the interactions between S100A2 and β-catenin/GSK-3β.

Key words: S100A2; Wnt/β-catenin signaling pathway; protein-protein interaction

基金项目: 国家自然科学基金(30340039);教育部"春晖计划"合作项目(2003);教育部留学回国人员科研启动基金(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30340039), the "Sunshine of Spring" Projects of Ministry of Education of China(2003) and the Initial Funds for Personnel Returning from Overseas by Ministry of Education of China(2004)

作者简介: 赖天霞,女,重庆市人,硕士,主要从事分子肿瘤学方面的研究,现在第三军医大学西南医院儿科。电话:(023)68765413, E-mail:laitianxia@126.com
通信作者: 周 兰,E-mail: zhoulan0111@gmail.com

收稿日期: 2007-08-30;**修回日期:** 2007-11-14

β-catenin 的突变率低,同时该信号途径上游的调节因子也很少发生突变,因此,导致该途径失调的分子机制尚待阐明[1]。S100 蛋白于 1965 年由 Moore 首先发现。迄今,已发现有 23 个成员,共同特征是具有 EF-手型结构。S100 蛋白具有多种生理功能[2],功能的实现除与其钙结合功能有关外,更与其介入其他细胞信号转导途径密切相关[2,3]。同时,该家族中一些成员与人类肿瘤相关,有的甚至已经作为肿瘤标志物用于肿瘤鉴别和分类,包括 S100A2[2]。为深入研究 Wnt/β-catenin 信号途径失调的机制和 S100A2 在肿瘤发生发展中的作用及机制,本研究探讨了 S100A2 与 Wnt/β-catenin 信号途径的关系及其与 Wnt/β-catenin 信号途径的主要成员 β-catenin、糖原激酶合成酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)、dishevelled(DVL,Dsh)和 Axin 之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21(DE3)购自 Amersham Biosciences 公司,人胚肾细胞株(HEK)293、人结肠癌细胞株 HCT116 和骨肉瘤细胞株 MG63 购自中国典型培养物保藏中心,质粒 pGST-Moluc-hS100A2、pcDNA-GSK-3β-HA、pCMV-DVL-Myc、pCMV-Axin-Myc、pTOP-LUC 和 pFOP-LUC 由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤学实验室惠赠。

谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠(glutathione Sepharose 4B beads)、还原型谷胱甘肽(Glutathione)购自 Amersham Biosciences 公司,异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Bio Basic Inc. 公司,兔抗人 β-catenin/HA/Myc 多克隆抗体、羊抗兔 IgG 及 ECL 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,荧光素酶检测试剂购自 Promega 公司,FITC 标记羊抗兔购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白的诱导表达及其分离纯化 用 pGST-Moluc-hS100A2 转化表达宿主 BL21,挑取阳性菌株在含氨苄青霉素(200 μg/ml)的 LB 培养基中 37 ℃振荡培养过夜,次日按 1% 接种于新鲜培养基中,37 ℃振荡培养 3.5 h,加 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,继续培养 3 h,离心收集细菌,按每毫升培养物用 50 μl 冰预冷的 1×PBS 重悬。冰上超声破碎细菌,得的细菌裂解液中加入 TritonX-100 至终浓度 1%,放置冰水浴中轻轻摇动 30 min。4 ℃,12 000×g 离心 20 min,留取上清,加入 50% 谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠混悬液,冰浴中翻转摇动孵育 3 h,4 ℃ 下离心,收集球珠沉淀,用 PBS 洗涤 3 次,再加入谷胱甘肽洗脱缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,0.02 mol/L Glutathione,pH 8.0),重复洗脱多次直至洗脱完全,用 SDS-PAGE、考马司亮蓝染色观察洗脱效果,纯度鉴定,用 Brad-ford 法进行蛋白定量,纯化的融合蛋白分装后保存于 -80 ℃ 备用。用空载体 pGST-Moluc 按上述方法同时制备 GST 蛋白作为对照蛋白。

1.2.2 Western blot 分析 β-catenin 的表达 接种 MG63 和 HCT116 细胞于 12 孔板,待细胞融合度达到 50% ~60% 时加入 GST-hS100A2,终浓度为 40 μg/ml,继续常规培养,分别于第 2 天和第 3 天收集细胞。以 GST 为实验对照。

SDS-上样缓冲液裂解细胞后,用紫外分光光度计进行蛋白定量。各取 10 μg 样品上样,进行 SDS-PAGE/Western blot,一抗为兔抗人 β-catenin 多克隆抗体(1∶500)、二抗为羊抗兔 IgG(1∶5 000),按 ECL 试剂盒说明进行化学发光检测,并用 Gel Doc 凝胶成像仪采集图像。用 Quantity One Vesion 4.5.0 软件测定各条带的灰度值,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

1.2.3 荧光素酶活性分析检测 S100A2 对 Wnt/β-catenin 信号途径活性的影响 ①实验分组:GST-hS100A2 实验组、GST 对照组和空白对照组。每组设 3 个复孔。实验重复 3 次。②细胞培养、转染及实验干预:将 293 细胞接种于 12 孔板,常规培养,待细胞融合度达 70% ~80% 时,用脂质体 PolyFect 将报告基因质粒 pTOP-Luc 和 pFOP-Luc 分别转入其中,常规培养;转染 16 h 后按上述实验分组分别加入 GST-hS100A2 和 GST,终浓度为 40 μg/ml;继续培养 36 h 后收获细胞。③荧光素酶活性检测:按荧光素酶活性检测试剂盒说明制备细胞裂解液,用紫外分光光度计测定总蛋白浓度,取 20 μg 蛋白加入 100 μl 荧光素酶检测试剂,用多功能酶标仪检测荧光素酶活性。参见文献[1]。

1.2.4 GST-Pulldown/Western blot 实验分析 S100A2 与 β-catenin 信号途径主要成员的相互作用 用电穿孔法分别将质粒 pcDNA-GSK-3β-HA、pCMV-DVL-Myc 和 pCMV-Axin-Myc 转染对数生长期的人胚肾 HEK293 细胞,培养 36 h 后用细胞裂解缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、0.1%(体积比)NP-40、0.1% SDS,pH 7.5]裂解,获得分别富含 GSK-3β-HA、DVL-Myc 和 Axin-Myc 的细胞裂解液;含 β-catenin 的细胞裂解液则通过直接裂解 HEK293 细胞而获得。上述细胞裂解液均用谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠进行预吸附,以清除非特异吸附的蛋白。经过预清洁的细胞裂解液各 100 μl 与 GST-hS100A2 10 μg 在冰浴中孵育 1 h,然后加入 15 μl 谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠在冰浴中翻转摇动孵育 3 h,4 ℃离心收获球珠,用 1 ml 细胞裂解缓冲液洗涤 3 次,加入等体积 1×SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE/Western blot 分析。以 GST 为阴性对照,以含相应目的蛋白的细胞裂解液为阳性对照。

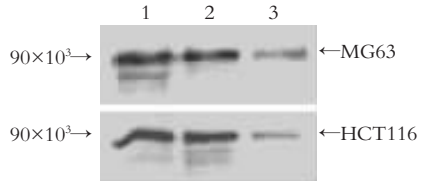
2 结果

2.1 Western blot 检测 S100A2 对细胞内 β-catenin 水平的影响

通过诱导表达和分离纯化后的 GST-S100A2 的纯度约为 92%。

GST-hS100A2 分别作用 MG63 和 HCT116 细胞 24 h 和 48 h 后,收集细胞,细胞内 β-catenin 的 Western blot 分析结果见图 1。MG63 细胞的 GST-hS100A2 组杂交带明显较其 GST 对照组增粗,二者的灰度值分别为(80.52 ± 2.09)和(54.00 ± 1.54),差异具有显著性($P < 0.05$);HCT116 细胞的 GST-hS100A2 组杂交带明显较其 GST 对照组增粗,三者的平均灰度值分别为

(100.60 ±4.39)、(52.96 ±1.65)和(50.94 ±3.87)。两个实验组与其相应的 GST 对照组间的差异均具有显著性($P<0.05$),提示 S100A2 能增加 MG63 和 HCT116 细胞内 β-catenin 水平。



1: GST-S100A2(2 d); 2: GST-S100A2(1 d); 3: GST(2 d)

图 1　Western blot 检测 S100A2 对 MG63 和 HCT116 的 β-catenin 水平的影响

2.2　S100A2 对 β-catenin/TCF4 转录活性即 Wnt/β-catenin 途径活性的影响

本实验中,报告基因质粒 pTOP-Luc 中荧光素酶的表达受转录复合物 β-catenin/TCF4 的调节,即 β-catenin/TCF4 的转录活性决定荧光素酶的活性,两者呈正向变化。因此,报告基因的产物荧光素酶活性也就反映了 β-catenin/TCF4 活性,也即 Wnt/β-catenin 途径活性。pFOP-Luc 是 pTOP-Luc 突变型,它不受 β-catenin/TCF4 的调控,用作阴性对照,以证明 S100A2 对 β-catenin/TCF4 活性的影响是特异性的。

转染 pTOP-Luc 的 HEK293 细胞经过 GST-hS100A2 作用 36 h 后,其荧光素酶活性较相应的 GST 组增加 12.3 倍,而 GST 组与空白对照组无明显差异;但是,转染 pFOP-Luc 的 HEK293 细胞在同样经过 GST-hS100A2 处理 36 h 后,其荧光素酶活性与相应的 GST 组和空白对照组一样,没有明显变化。见图 2。

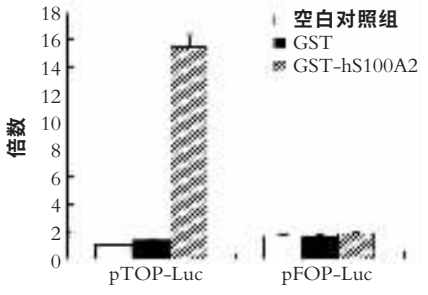
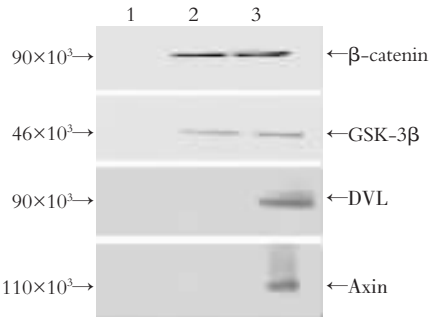


图 2　荧光素酶活性分析法分析 S100A2 对 β-catenin/TCF4 转录活性的影响

2.3　S100A2 与 Wnt/β-catenin 信号途径主要成员间的相互作用

GST-Pulldown/Western blot 分析发现,含 β-catenin 和 GSK-3β-HA 的细胞裂解液与 GST-hS100A2 共同孵育组以及各自相应的阳性对照组均出现特异性杂交条带,而各自的 GST 对照组则为阴性反应(图 3),提示 S100A2 分别与 β-catenin 和 GSK-3β 在体外存在特异性直接相互作用。

含 DVL 和 Axin 的细胞裂解液与 GST-hS100A2 共同孵育组和各自的 GST 阴性对照均未出现特异性杂交条带,而各自相应的阳性对照组则出现阳性条带(图 3),推测 S100A2 分别与 DVL 和 Axin 之间可能不存在直接相互作用。



1:GST;2:GST-S100A2;3:空白对照组

图 3　GST-Pulldown/Western blot 检测 S100A2 与 Wnt/β-catenin 信号途径主要成员在体外的相互作用

3　讨论

S100 蛋白是一组相对分子质量为 9 000 ~ 13 000 的酸性蛋白质,是 EF-手型蛋白超家族中最大的多基因家族,包含S100A1~A13、S100B、S100P、Profilaggrin、Trychohyalin、Reperin 等。他们的生物学作用可以通过与钙离子、锌离子等的结合而实现,也可通过与许多细胞信号途径之间的"对话(cross-talk)"来发挥[2]。例如,S100A4 与 Annexin Ⅱ存在相互作用,进而调节血管生成[4];已经发现 S100A2 可以通过降低 COX-2 的表达而抑制鳞状细胞癌的增殖、迁移和侵袭[5],可以增强 p53 的转录活性[2]等;同时,S100A2 又可能是 DeltaNP63 肿瘤发生信号途径的下游靶分子[6]。

在本实验中,我们采用 Western blot 和荧光素酶活性分析两种方法,发现 S100A2 提高细胞内 β-catenin 的水平和上调 β-catenin/TCF4 活性,这两个结果是一致的,提示 S100A2 可增强 Wnt/β-catenin 信号途径的活性。

Wnt/β-catenin 信号途径是与肿瘤发生发展密切相关的重要信号途径之一,β-catenin 是该途径中的关键分子,细胞质内游离 β-catenin 的水平决定转录复合物 β-catenin/TCF4 的转录活性,从而决定着该信号途径的活性;而 β-catenin 在正常细胞质中维持低水平的主要机制是 β-catenin 的磷酸化依赖的降解。家族性腺瘤性息肉病基因产物(adenomatous polyposis coli, APC)、GSK-3β 和 Axin 促进 β-catenin 的该降解过程,而 DVL 则相反;这些分子的异常可致 β-catenin 的磷酸化依赖的降解受阻,细胞质内游离 β-catenin 水平增高,并进入细胞核内与 TCF4 结合形成转录复合物 β-catenin/TCF4,致 Wnt/β-catenin 信号途径活性增强[7]。

为初步探讨 S100A2 增强 Wnt/β-catenin 信号途径的机制,本研究采用 GST-Pulldown/Western blot 技术,检测了 S100A2 与 Wnt/β-catenin 信号途径中几个

关键的蛋白分子 GSK-3β、DVL、Axin 和 β-catenin 的相互作用。结果显示 S100A2 分别与 GSK-3β 和 β-catenin 之间存在直接的相互作用,未发现 S100A2 与 DVL 和 Axin 之间的相互作用。

GSK-3β 是该信号途径的负性调节因子,在人类肿瘤中尚未检测到 GSK-3β 的基因突变,但可以有其活性的下调[7]。结合本实验结果,我们推测 S100A2 可能通过与 GSK-3β 的直接相互作用实现对其活性的调节,即抑制其对 β-catenin 的磷酸化,进而减少 β-catenin 的磷酸化依赖性降解,终致 β-catenin 在细胞内的水平增加;而 S100A2 与 β-catenin 的直接相互作用则可能直接导致了 β-catenin 的磷酸化被抑制,从而致其细胞内水平增加和 Wnt/β-catenin 信号途径的活性增强。

本实验发现 S100A2 可以上调 Wnt/β-catenin 信号途径的活性,提示它可能通过这一机制促进肿瘤的发生发展,这与文献[8]一致。但是,一直以来,S100A2 都被视为肿瘤抑制因子[9],关于 S100A2 对肿瘤作用的多样性及其机制值得进一步探索。

参考文献:

[1] Zhou L, An N, Haydon R C, *et al*. Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity[J]. Cancer Lett, 2003, 193(2): 161-170.

[2] Mueller A, Schafer B W, Ferrari S, *et al*. The calcium-binding protein S100A2 interacts with p53 and modulates its transcriptional activity [J]. J Biol Chem, 2005, 280(32): 29186-29193.

[3] Stein U, Arlt F, Walther W, *et al*. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer[J]. Gastroenterology, 2006, 131(5): 1486-1500.

[4] Semov A, Moreno M J, Onichtchenko A, *et al*. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin Ⅱ and accelerated plasmin formation[J]. J Biol Chem, 2005, 280(21): 20833-20841.

[5] Tsai W C, Tsai S T, Jin Y T, *et al*. Cyclooxygenase-2 is involved in S100A2-mediated tumor suppression in squamous cell carcinoma[J]. Mol Cancer Res, 2006, 4(8): 539-547.

[6] Hibi K, Fujitake S, Takase T, *et al*. Identification of S100A2 as a target of the DeltaNp63 oncogenic pathway[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(11): 4282-4285.

[7] Dihlmann S, von-Knebel-Doeberitz M. Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics[J]. Int J Cancer, 2005, 113(4): 515-524.

[8] Zhang X, Hunt J L, Shin D M, *et al*. Down-regulation of S100A2 in lymph node metastases of head and neck cancer[J]. Head Neck, 2007, 29(3): 236-243.

[9] Nagy N, Brenner C, Markadieu N, *et al*. S100A2, a putative tumor suppressor gene, regulates *in vitro* squamous cell carcinoma migration [J]. Lab Invest, 2001, 81(4): 599-612.

(编辑 邓强庭)

《第三军医大学学报》对一稿两投和重复发表问题处理的声明

为维护本刊的声誉和广大读者的利益,尊重审稿专家和编辑工作者的劳动,坚决杜绝学术不端行为,我刊编辑部在加强稿件初审和刊用前查重工作的基础上,受编委会的委托,就一稿两投和重复发表问题的处理声明如下:

1. 凡属原始研究的报告,同语种一式两份(或多份)投寄不同的杂志,或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿,分别投寄不同的杂志,属一稿两投;一经两个(或多个)杂志刊用,则为重复发表。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志,以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一种杂志,不属一稿两投。但作者若要重复投稿,应向本刊及相关期刊编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满 3 个月未接到退稿通知,表明稿件仍在处理中,若欲投他刊,应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或重复发表嫌疑时,我们将认真收集有关资料并仔细核对后通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出书面解释。若作者对编辑部的认定和处理有异议,可书面申诉,由编辑部上报校学术规范委员会进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实,立即退稿,由供稿编辑书面通知作者退稿原因给予警示;对该作者作为第一作者及通信作者所撰写的论文,2 年内拒绝在本刊发表;供稿编辑汇总该文稿所有材料,就处理情况提交书面报告,编辑部留存备案。

重复发表一经证实,将择期在期刊中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告;对该作者作为第一作者及通信作者所撰写的论文,2 年内拒绝在本刊发表;向作者所在单位科研管理部门和相关期刊通报情况。

特此声明。

本刊编辑部

2007 年 12 月