论著

文章编号:1000-5404(2012)03-0214-05

hS100A6抑制卵巢癌细胞HO8910和HO8910 PM增殖、促进凋亡并上调其Wnt/β-catenin活性

邹正渝[1],陈英华[2],孙双双[1],黎玉叶[1],叶立伟[1],段 亮[1],武 睿[1],杨 霞[3],罗进勇[1],周 兰[1] (400016 重庆,重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室[1];400015 重庆,重庆市第四人民医院肿瘤科[2];400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院口腔黏膜科[3])

[摘要] **目的** 研究hS100A6(human S100A6)对人卵巢癌细胞系(低转移系HO8910和高转移系HO8910 PM)增殖、凋亡和Wnt/β-catenin信号途径的影响。**方法** 通过MTT以及台盼蓝染色检测细胞增殖的变化;Hoechst检测细胞凋亡的变化;提取细胞总蛋白及核蛋白Western blot检测hS100A6对β-catenin的影响。**结果** MTT及台盼蓝染色结果显示hS100A6抑制HO8910细胞和HO8910 PM细胞的增殖($P<0.05$),Hoechst染色结果显示hS100A6同时促进这两系细胞的凋亡($P<0.05$);Western blot显示hS100A6增加β-catenin的水平并促进其发生核转位。**结论** hS100A6能抑制人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM增殖,促进其凋亡,同时激活Wnt/β-catenin信号途径。

[关键词] S100A6;卵巢癌;Wnt/β-catenin信号途径

[中图法分类号] R341; R730.23; R737.31 [文献标志码] A

hS100A6 inhibits proliferation, induces apoptosis and up-regulates Wnt/β-catenin activity in ovarian cancer cell lines HO8910 and HO8910 PM

Zou Zhengyu[1], Chen Yinghua[2], Sun Shuangshuang[1], Li Yuye[1], Ye Liwei[1], Duan Liang[1], Wu Rui[1], Yang Xia[3], Luo Jinyong[1], Zhou Lan[1]([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, Faculty of Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Oncology, Fourth People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400015; [3]Department of Periodontal Mucosa, Affiliated Hospital of Stomatological, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of human S100A6 (hS100A6) on the proliferation, apoptosis and Wnt/β-catenin signaling pathway of ovarian cancer cell line HO8910 and HO8910 PM. **Methods** MTT assay and trypan blue exclusion assay, Hoechst staining and Western blotting were used to detect cell proliferation, apoptosis and expression and distribution of β-catenin, respectively. **Results** ① hS100A6 inhibited proliferation of HO8910 and HO8910 PM cells in a dose- and time-dependent manner ($P<0.05$); ② hS100A6 induced apoptosis in HO8910 and HO8910 PM cells ($P<0.05$); ③ Level of β-catenin was increased by hS100A6 in HO8910 and HO8910 PM cells, and β-catenin translocated from cytoplasm to nucleus. **Conclusion** hS100A6 can inhibit cell proliferation, induce cell apoptosis and up-regulate Wnt/β-catenin activity in ovarian cancer HO8910 and HO8910 PM cells.

[**Key words**] S100A6; ovarian cancer; Wnt/β-catenin signaling pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30772548). Corresponding author: Zhou Lan, E-mail: zhoulan0111@gmail.com

卵巢癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤,发病率高,仅次于子宫颈癌和子宫体癌而列居第3位,其预后不良,死亡率高,对患者生命造成严重威胁。目前其病因尚不明确,发病可能与年龄、生育、血型、精神及环境等因素有关。

S100A6也称钙周期蛋白(calcyclin,Cacy)是S100钙黏蛋白家族中的一员,具有2个EF-手型结构[1],该家族成员基因大多定位于人染色体的lq21。大量的文献报道S100A6在黑色素瘤[2]、结肠癌[3]等多种肿瘤中高表达,有潜能成为肿瘤标志物[4]。该蛋白参与多种生物学过程,如蛋白分泌[5]、肿瘤转移[6]等,但是其

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30772548)

[通信作者] 周 兰,E-mail: zhoulan0111@gmail.com

发挥的具体功能及作用机制尚不明确。

Wnt/β-catenin是一条经典生物信号途径,该途径通过调节β-catenin在细胞质中的浓度而参与多种生物学过程,如组织稳态、胚胎发育及肿瘤发生等[7]。在卵巢癌中,β-catenin的增高常伴随S100A6的高表达,但是具体的机制尚不明了。本研究拟采用重组融合蛋白GST-hS100A6干预两系卵巢癌细胞,探讨S100A6与其细胞增殖、凋亡以及与Wnt/β-catenin信号途径之间的关系。

1 材料与方法

1.1 重组hS100A6蛋白(GST-hS100A6)的制备和鉴定

方法同文献[8]。

1.2 细胞和试剂

HO8910和HO8910 PM细胞从中国典型培养物保藏中心(武汉)购得,DMEM/HIGH GLUCOSE培养基培养基及胎牛血清由美国HyClone公司购得,MTT、DMSO由美国Sigma公司购得,Hoechst试剂盒由北京晶美购得,β-actin和β-catenin单克隆抗体由Santa Cruz公司购得,ECL试剂盒由Sigma公司购得,核蛋白提取试剂盒由凯基生物公司购得。AdGFP为本实验室保存,AdhS100A6由芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室惠赠。

1.3 细胞培养和分组

HO8910及HO8910 PM细胞贴壁培养于含10% FBS,1%青霉素/链霉素的DMEM/HIGH GLUCOSE培养基中,37 ℃、5% CO_2孵箱培养,每天换液,对数生长期传代。实验分组:①空白对照组;②GST实验对照组;③GST-hS100A6实验组。相同条件重复3次。

1.4 MTT检测h100A6对人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM增殖的影响

用0.25%胰蛋白酶消化细胞,以每孔0.2×10^4接种于96孔板中,每孔加入DMEM/HIGH GLUCOSE完全培养基,于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,12 h后换成无血清培养基并进行实验干预,实验分组同前。其中,实验对照组和实验组又分别设置3、10、30、100、300 μg/ml和1 mg/ml共6个浓度梯度,每组设3个重复孔,此时记为0 h;于37 ℃、5% CO_2孵箱中继续培养和观察。72 h后去上清,加入180 μl的RPMI1640完全培养基和20 μl MTT,37 ℃继续培养4 h,小心吸弃上清。再加入200 μl DMSO,振荡10 min。酶标仪测定各孔490 nm光密度值,重复3次。依此结果拟选择100 μg/ml作为后续实验蛋白浓度,时间依赖性试验实验分组同上,台盼蓝染色活细胞计数法检测hS100A6对细胞增殖作用的时间依赖性。相同条件下重复3次。

1.5 Hoechst染色检测hS100A6对人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM凋亡的影响

将细胞以每孔0.2×10^4接种于96孔板中,每孔加入200 μl DMEM/HIGH GLUCOSE完全培养基。在12 h后进行实验干预,分组同前,其中GST和GST-hS100A6的终浓度均为100 μg/ml;每组设3个重复孔,此时记为0 d;于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,3 d后,每孔依次加入细胞染色缓冲液100 μl、Hoechst染色液0.5 μl,冰浴30 min,PBS洗涤1次,荧光显微镜下计数凋亡细胞。凋亡率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

凋亡细胞判定标准:细胞核呈波纹状或折缝样,部分染色质出现浓缩、凝聚、边缘化,甚至细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。

1.6 Western blot检测hS100A6对人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM中β-catenin水平的影响

接种细胞于直径为10 cm的培养皿中,待细胞融合度达到60%~70%时加入干预因素(AdGFP或AdS100A6病毒),24 h后观察荧光强度判断病毒感染的有效性;另设空白对照组(不加干预因素);继续常规培养,分别在48 h和72 h收集细胞,提取细胞总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。各取200 μg样品上样进行SDS-PAGE,一抗分别为兔抗人β-catenin单克隆抗体(1∶1 000);鼠抗人β-actin单克隆抗体(1∶1 000),二抗分别为羊抗兔IgG(1∶5 000)和羊抗鼠IgG(1∶5 000),最后按ECL试剂盒说明进行电化学发光检测,并用Gel Doc凝胶成像仪采集图像。

1.7 Western blot检测hS100A6对细胞核β-catenin水平的影响

接种细胞于直径为10 cm的培养皿中,待细胞融合度达到60%~70%时加入干预因素(GST或者GST-hS100A6蛋白,终浓度到100 μg/ml)。48 h后按照凯基生物公司核蛋白试剂盒KGP1100说明书提取细胞核蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。各取120 μg样品上样进行SDS-PAGE,一抗分别为兔抗人β-catenin单克隆抗体(1∶1 000);鼠抗人β-actin单克隆抗体(1∶1 000),二抗分别为羊抗兔IgG(1∶5 000)和羊抗鼠IgG(1∶5 000),最后按ECL试剂盒说明进行电化学发光检测,并用Gel Doc凝胶成像仪采集图像。

1.8 统计学处理

实验数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析和显著性检验。

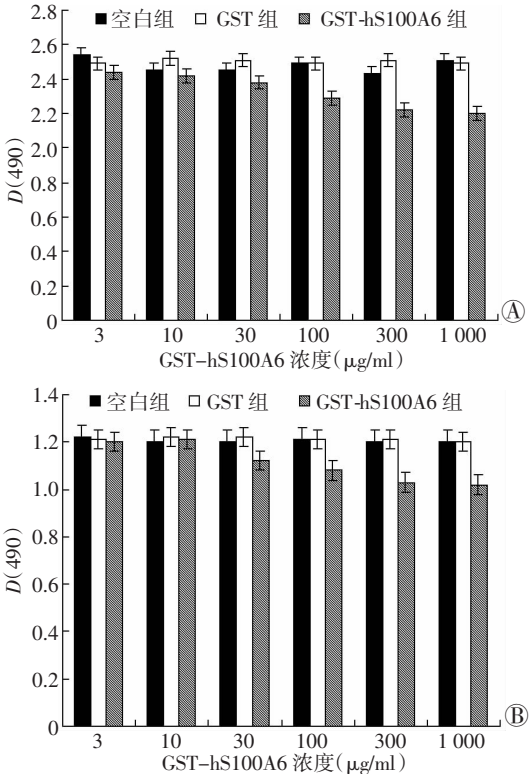
2 结果

2.1 hS100A6抑制人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM增殖并呈浓度依赖性

人卵巢癌细胞低转移系HO8910培养72 h时,3 μg/ml和10 μg/ml的GST-hS100A6组的光密度值与相应浓度的GST组差异不具有统计学意义,而30、100、300 μg/ml和1 000 μg/ml的GST-hS100A6组的光密度值分别较相应浓度的GST组减少10.6%、13.7%、17.2%和18.7%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图1A。

人卵巢癌细胞高转移系HO8910 PM的结果与HO8910细胞系相似,即3 μg/ml和10 μg/ml的GST-hS100A6组的光密度值与相应浓度的GST组差异无统计学意义,而30、100、300 μg/ml和1 000 μg/ml的GST-hS100A6组的光密度值分别较相应浓度的GST组减少8.7%、11.1%、13.9%和15.2%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图1B。

提示hS100A6对人卵巢癌细胞低转移系HO8910和高转移系HO8910 PM细胞的增殖均有抑制作用,且呈浓度依赖性。依据本次实验,选择100 μg/ml为后续实验的干预浓度。



A:人卵巢癌细胞低转移系HO8910培养72 h;B:人卵巢癌细胞高转移系HO8910 PM培养72 h

图1 不同浓度hS100A6对人卵巢癌细胞增殖的影响

2.2 S100A6对人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM增殖影响的时间依赖性

HO8910和HO8910 PM的GST-S100A6组的活细胞数在前2 d与各自的GST组差异均无统计学意义;第3、4、5天的活细胞数分别是各自GST组的74.4%、72.1%和79.3%,71.4%、68.0%和63.7%,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图2。

进一步证实了S100A6对人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM细胞增殖的抑制作用,并提示该作用呈一定的时间依赖性。

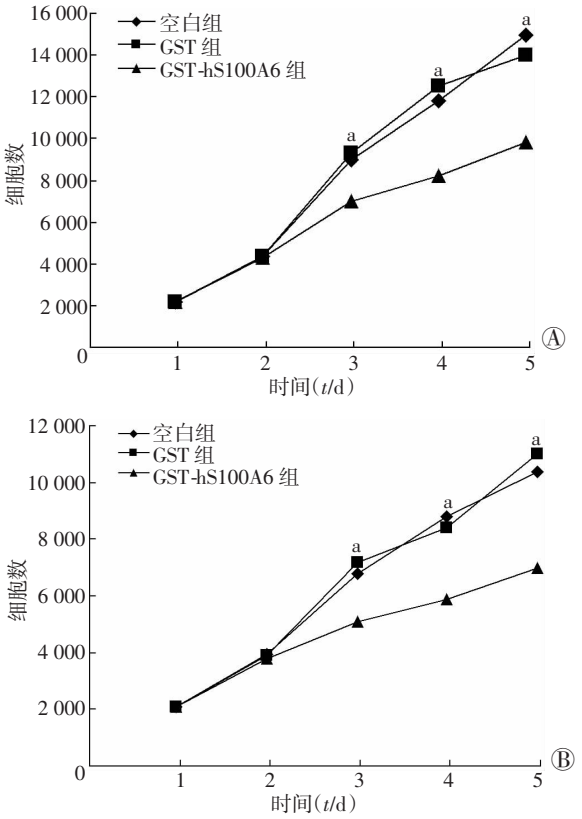
2.3 hS100A6促进人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM凋亡

如图3所示重组hS100A6作用于HO8910H和HO8910 PM细胞后,荧光显微镜下观察凋亡细胞明显增加,细胞凋亡率比各自GST组分别增加3.33倍和2.61倍,差异均具有统计学意义($P<0.01$),相应对照组之间的差异均无统计学意义($P>0.05$)。提示S100A6有促进人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM细胞凋亡的作用。

2.4 Western blot显示hS100A6上调人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM的β-catenin水平

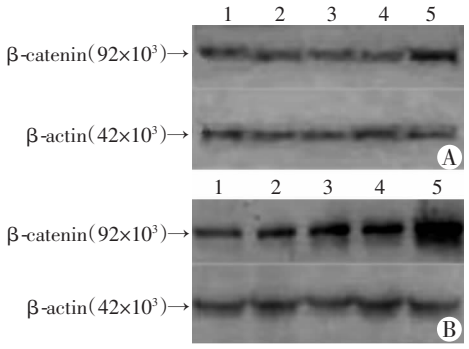
Western blot分析(图4)AdS100A6作用48和72 h,HO8910细胞内β-catenin,AdS100A6组48 h和72 h的β-catenin的校正灰度值较相应的AdGFP组增加15.4%($P>0.05$)和86.5%($P<0.01$);GST对照组和空白对照组之间的差异无统计学意义。

提示S100A6能增加HO8910和HO8910 PM两系细胞β-catenin的水平,且呈一定的时间依赖性。



A:人卵巢癌细胞低转移系HO8910;B:人卵巢癌细胞高转移系HO8910 PM a:$P<0.05$,与GST-hS100A6组比较

图2 hS100A6作用不同时间对人卵巢癌细胞增殖的影响

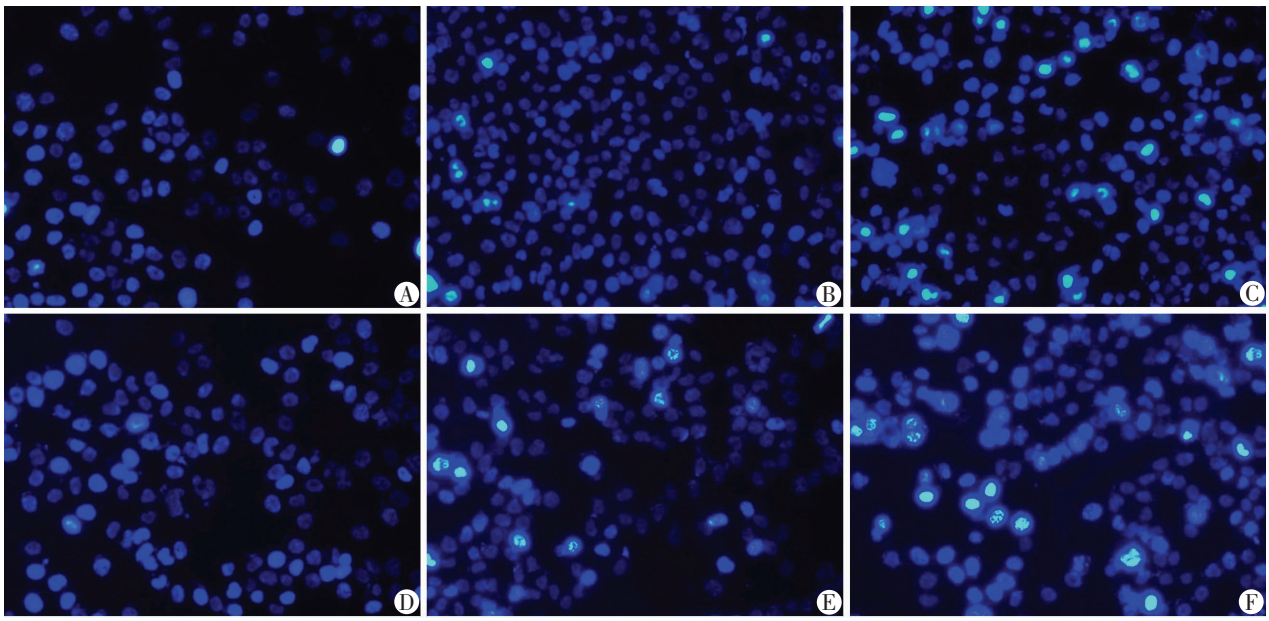


A:HO8910;B:HO8910 PM;1:空白组;2:AdGFP(48 h)组;3:AdS100A6(48 h)组;4:AdGFP(72 h)组;5:AdS100A6(72 h)组

图4 Western blot检测S100A6对HO89100和HO8910 PM细胞β-catenin的影响

2.5 细胞核蛋白的Western blot显示hS100A6上调人卵巢癌细胞系HO8910和HO8910 PM核内β-catenin及促进其核转位

在HO8910细胞中,β-catenin主要在胞质及核膜上表达,核内几乎无表达;GST-hS100A6干预48 h后图5所示:HO8910细胞核β-catenin,GST-S100A6组48 h的β-catenin的校正灰度

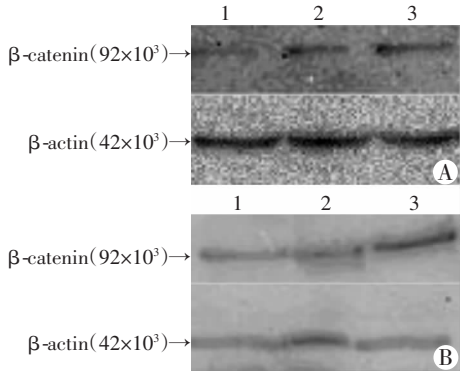


A:空白组(HO8910);B:GST 组(HO8910);C:GST-hS100A6 组(HO8910);D:空白组(HO8910 PM);E:GST 组(HO8910 PM);F:GST-hS100A6 组(HO8910 PM)

图 3 hS100A6 对人卵巢癌细胞系(HO8910 和 HO8910 PM)凋亡的影响 (荧光显微镜 ×400)

值较相应的空白对照组增加 13.8%;GST 对照组和空白对照组之间的差异无统计学意义。HO8910 PM 细胞核 β-catenin,GST-hS100A6 组 48 h 的 β-catenin 的校正灰度值较相应的空白对照组增加 33.1%;GST 对照组和空白对照组之间的差异无统计学意义。

可见 hS100A6 能增加人卵巢癌细胞系 HO8910 和 HO8910 PM 细胞内 β-catenin 的表达,并且促进其核移位。



1:空白组;2:GST(48 h)组;3:GST-hS100A6 (48 h)组

图 5 Western blot 检测 hS100A6 上调 HO8910(A)和 HO8910 PM(B)细胞核蛋白 β-catenin

3 讨论

S100A6 是具有 EF 手型结构的 S100 钙结合蛋白家族中的一员,在多种肿瘤细胞中高表达[9]。S100A6 最初是由 Kuznicki 和 Filipek 在 Ehrlich 腹水瘤中检出[10]。它在细胞内主要存在于细胞质、细胞膜以及核膜上。目前关于 S100A6 对肿瘤增殖的作用尚存争议。在我们前期的实验中发现它能有效抑制骨肉瘤细胞系 MG63 的增殖,促进其凋亡。但多数文献认为其能促进肿瘤的发生、发展,例如,用 adsihS100A6 阻遏 S100A6 的翻译后,可抑制胰腺癌细胞系 CFPAC-1 的增殖;钙周期蛋白结合蛋白 CacyBP/SIP 具有促进胃癌发生和侵袭、抑制胃癌细胞增殖的作用,间接提示 S100A6 具有促进肿瘤增殖的作用[11]。Tonini 等[12]则发现用视黄酸诱导神经母细胞瘤分化时,S100A6 mRNA 水平增加。为了进一步明确该分子对肿瘤增殖的作用,我们选用 HO8910 和 HO8910 PM 作为研究对象,发现 hS100A6 作用后,这些肿瘤细胞的增殖减弱,并呈时间和浓度依赖性。本研究发现的 hS100A6 能促进这两系细胞产生凋亡的作用应该是其机制之一。有研究发现 S100A6 可经 caspase-3 活性的增加来提高肝癌细胞系 Hep3B 细胞对凋亡过程的敏感性,提示 S100A6 参与肿瘤细胞的凋亡过程[13],本研究发现 hS100A6 能增加这两系肿瘤细胞的凋亡率,这一作用可能是其抑制肿瘤细胞增殖的机制之一。

Wnt/β-catenin 是细胞内一条非常保守的信号途径,它在组织发育和肿瘤发生的过程中起着重要作用。正常情况下,β-catenin 主要与 APC、GSK 以及 DVL 等蛋白形成复合物而促其降解,从而使游离 β-catenin 减少,破坏降解复合物,导致细胞质游离 β-catenin 增多是多种肿瘤发生、发展中的关键事件[14]。同时,我们发现 S100A6 高表达与 β-catenin 增多常常并存于肿瘤细胞中,提示这两者之间可能存在着某种联系,有研究发现 S100A6 可能参与 β -catenin 的泛素化降解调节[15],但 S100A6 是如何调控 Wnt/β-catenin 信号途径

则有待进一步研究。本研究发现,hS100A6处理这两系细胞之后,Western显示细胞内β-catenin表达水平增高,免疫细胞化学显示这两系细胞的细胞质和细胞核表达均有增加,表明S100A6能够导致细胞中β-catenin水平上升,并促进其核转位。因此我们认为S100A6能够上调Wnt/β-catenin信号通路的活性。我们在不同的实验中分别运用加入外源性蛋白和腺病毒感染的方式作用于细胞,得到了类似的结果,证明了我们实验的有效性。

参考文献:

[1] Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey A C, Shaw G S. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family [J]. Biochem J, 2006, 396(2): 201 - 214.

[2] Leclerc E, Heizmann C W, Vetter S W. RAGE and S100 protein transcription levels are highly variable in human melanoma tumors and cells [J]. Gen Physiol Biophys, 2009, 28(Spec): F65 - F75.

[3] Komatsu K, Murata K, Kameyama M, *et al*. Expression of S100A6 and S100A4 in matched samples of human colorectal mucosa, primary colorectal adenocarcinomas and liver metastases [J]. Oncology, 2002, 63(2): 192 - 200.

[4] Jang J S, Cho H Y, Lee Y J, *et al*. The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates[J]. Oncol Res, 2004, 14(10): 491 - 499.

[5] Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, *et al*. S100A6 is increased in a stepwise manner during pancreatic carcinogenesis: clinical value of expression analysis in 98 pancreatic juice samples [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(4): 649 - 654.

[6] Hua Z, Chen J, Sun B, *et al*. Specific expression of osteopontin and S100A6 in hepatocellular carcinoma[J]. Surgery, 2011, 149(6): 783 - 791.

[7] Almeida M, Han L, Ambrogini E, *et al*. Glucocorticoids and tumor necrosis factor (TNF) α increase oxidative stress and suppress WNT signaling in osteoblasts [J]. J Biol Chem, 2011, [Epub ahead of print]. http://www.jbc.org/content/286152/44326.full

[8] 苗静琨, 赖天霞, 左国伟, 等. 人S100A6-GST融合蛋白的原核表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1009 - 1012.

[9] Cross S S, Hamdy F C, Deloulme J C, *et al*. Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers [J]. Histopathology, 2005, 46(3): 256 - 269.

[10] Kuznicki J, Filipek A. Purification and properties of a novel Ca2 + -binding protein (10.5 kDa) from Ehrlich-ascites-tumour cells[J]. Biochem J, 1987, 247(3): 663 - 667.

[11] Ning X, Sun S, Hong L, *et al*. Calcyclin-binding protein inhibits proliferation, tumorigenicity, and invasion of gastric cancer [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(12): 1254 - 1262.

[12] Tonini G P, Fabretti G, Kuznicki J, *et al*. Gene expression and protein localisation of calcyclin, a calcium-binding protein of the S-100 family in fresh neuroblastomas [J]. Eur J Cancer, 1995, 31A(4): 499 - 504.

[13] Joo J H, Yoon S Y, Kim J H, *et al*. S100A6 (calcyclin) enhances the sensitivity to apoptosis via the upregulation of caspase-3 activity in Hep3B cells[J]. J Cell Biochem, 2008, 103(4): 1183 - 1197.

[14] Salahshor S, Woodgett J R. The links between axin and carcinogenesis [J]. J Clin Pathol, 2005, 58(3): 225 - 236.

[15] Filipek A. S100A6 and CacyBP/SIP-two proteins discovered in ehrlich ascites tumor cells that are potentially involved in the degradation of beta-catenin [J]. Chemotherapy, 2006, 52(1): 32 - 34.

(**收稿**:2011-09-13;**修回**:2011-11-03)

(编辑 张 维)

《中华老年多器官疾病杂志》2012年度征稿、征订启事

《中华老年多器官疾病杂志》是中国科技核心期刊,月刊,全年出刊12期,定价20元/本,国内刊号CN 11 - 4786/R, 邮发代号82 - 408。

本刊由中国人民解放军总医院主管、解放军总医院老年心血管病研究所主办, 创办于2002年, 由王士雯院士任总编辑。本刊是国内外唯一的一本反映老年多器官疾病的期刊, 主要交流老年心血管疾病, 尤其是老年心血管疾病合并其他疾病, 老年两个以上器官疾病及其他老年多发疾病的诊治经验与发病机制的研究成果。开设的栏目有述评、综述、临床研究、基础研究等。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志! 欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

地 址: 100853 北京市复兴路28号, 解放军总医院老年心血管病研究所
100088 北京市西城区德胜门外大街83号德胜国际中心B座301室, 北京中科期刊出版有限公司

联系人: 王雪萍 任开环 **电 话**: (010)66936756,59790736-8087

传 真: (010)59790736 - 8092 **电子邮箱**: mode@mail.sciencep.com

在线投稿: http://www.mode301.cn/ch/author/login.aspx