基础研究 文章编号:0253-3626(2010)09-1321-06

外源性重组 S100A6 蛋白对 5 株转化细胞系的增殖、迁移能力及 β-catenin 水平的影响

马 闻[1],李星星[1],王 胜[2],游 莉[3],郭元元[3],徐兰兰[3],周 兰[3]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系;2. 重庆医科大学实验动物中心;3. 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,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 S100A6 对 5 种转化细胞系株(HEK293、9HTE、CHO、MEF 和 $C_3H_{10}T1/2$)的增殖、迁移能力和 β-catenin 水平的影响。方法:通过转化质粒 pMoluc-GST-hS100A6 到大肠杆菌 BL21,经 IPTG 诱导表达重组 S100A6 蛋白,为后续实验提供材料;MTT 法检测细胞增殖,细胞划痕和 Transwell 法检测细胞迁移,免疫细胞化学法及 Western-blotting 检测 β-catenin 表达水平。结果:①通过 IPTG 诱导表达,从大肠杆菌中收获了高纯度重组 S100A6(GST-S100A6);②外源性重组 S100A6 对作为阳性对照的肿瘤细胞系——人骨肉瘤细胞 143B 的增殖及迁移均有抑制作用($P<0.05$),而对 5 株转化细胞系的增殖及迁移均无显著影响($P>0.05$);③免疫细胞化学法和 Western-blotting 一致揭示重组 S100A6 可上调 5 株转化细胞系的 β-catenin 水平($P<0.05$)。结论:S100A6 对 5 株转化细胞系的增殖、迁移无明显影响,但可上调此 5 株转化细胞系 Wnt/β-catenin 水平。

【关键词】S100A6;转化细胞系;细胞增殖;细胞迁移;β-catenin

【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-02

Effects of exogenetic recombinant protein S100A6 on proliferation and migration of 5 transformed cell lines and β-catenin expression level

MA Wen, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: This study aimed to investigate effects of exogenetic recombinant protein S100A6 on 5 transformed cells (HEK293, 9HTE, CHO, MEF and $C_3H_{10}T1/2$) and their β-catenin expression level. *Methods*: Plasmid pMoluc-GST-hS100A6 was transformed into E coli.BL21, in which S100A6 can be induced to express by IPTG; Cell proliferation was measured by MTT, cell migration was measured by cell scratch assay and Transwell assay and levels of β-catenin were measured by ICC and Western-blotting. *Results*: ① High purity recombinant S100A6(GST-S100A6) was obtained from E Coli via induction of IPTG induction. ②Exogenetic S100A6 can not only inhibit 143B cell lines(positive control) proliferation but also the migration($P<0.05$). However, effects of different concentration of S100A6 cast on proliferation ($P>0.05$) and migration ($P>0.05$) of these 5 transformed cell lines were not statistically significant. ③ S100A6 can up-regulate β-catenin level in these 5 transformed cell lines significantly ($P<0.05$). *Conclusion*: Effects of S100A6 on these 5 transformed cell lines were not significant neither on proliferation nor on migration, but it can up-regulate their β-catenin levels.

【Key words】S100A6; Transformed cell lines; Cell proliferation; Cell migration; β-catenin

对 S100A6 的研究已超过 20 年,目前认为该蛋白是一种活跃的信号蛋白分子,参与多种信号途径,调节细胞生理活动[1,2],如:S100A6 能与 P53 相互作用调节细胞增殖与凋亡[3];与 Sgt1 和 melusin 相互作用介导调节热休克反应[4],与 RAGE 结合通过激活 JNK 和 caspases 途径诱导凋亡[5];与 CacyBP/SIP 相互作用调节 β-catenin 水平[6]。

同时,它在多数肿瘤中高表达,且与肿瘤进程密切相关[2]。Joo 等报道,S100A6 能抑制人肝癌细胞 Hep3B 的增殖并促进凋亡[7]。我们的实验结果也提示,S100A6 能抑制人骨肉瘤细胞 U2OS 的增殖并促进其凋亡,且能上调其 β-catenin 水平[8],能抑制人骨肉瘤细胞 MG63 和 143B 的增殖和迁移[9,10]。

但是,目前尚无文献报道 S100A6 对正常细胞增殖、迁移及细胞内 β-catenin 水平的影响。我们拟用人胚肾细胞 HEK293、人气道上皮细胞 9HTE、中国仓鼠卵巢细胞 CHO、小鼠胚胎成纤维细胞 MEF 及小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2T1/2

作者介绍:马 闻(1983-),男,硕士,研究方向:肿瘤学。

通讯作者:周 兰,女,教授,E-mail:zhoulan0111@gmail.com。

共 5 株转化细胞系就此展开研究。

1　材料与方法

1.1　细胞株和质粒

人胚肾细胞 HEK293、人气道上皮细胞 9HTE、中国仓鼠卵巢细胞 CHO 和人骨肉瘤细胞 143B 购于中国典型培养物保藏中心；小鼠胚胎成纤维细胞 MEF、小鼠间充质细胞 C3H10T1/2、质粒 pGST-Moluc-hS100A6 和 pGST-Moluc 由美国芝家哥大学医学中心分子肿瘤学实验室馈赠。

1.2　重组 S100A6 的制备

重组 S100A6，即 GST-S100A6 融合蛋白的原核表达与纯化方法参照文献[13]进行。SDS-PAGE/Western-blotting 对重组蛋白定性，BCA 法对重组蛋白定量。

1.3　试剂

DMEM、DMEM/F12、RPMI1640 培养液及胎牛血清由 *Hyclone* 提供；*MTT* 及 *S100A6* 单克隆抗体由 *Sigma* 提供；兔抗人 β-catenin 多克隆抗体由 promega 提供；免疫组织化学、DAB 显色试剂盒由中杉金桥提供；BCA 蛋白定量试剂盒由 Bio dev 提供；Transwell 小室由 Costar 提供。

1.4　细胞培养及实验分组

HEK293、9HTE、MEF 和 C3H10T1/2 用含 10% FBS 的 DMEM 培养；CHO 用含 10%的 DMEM/F12 培养；人骨肉瘤细胞系 143B 用含 10%FBS 的 RPMI1640 培养。所有细胞均按时行换液和传代处理。

实验分为 3 组：①空白对照组；②GST 对照组；③ GST-S100A6 组。

1.5　MTT 法检测 S100A6 对细胞增殖影响

浓度依赖实验：各细胞以每孔 0.2×10^4 个接种于 96 孔板中，细胞贴壁后（约需 12 h）进行蛋白干预。分别以终浓度均为 3、10、30、100、300、1 000 μg/ml 的 GST-S100A6 作用于各细胞系。72 h 后 MTT 处理，记录 490 nm 处吸光度值。根据该实验结果，筛选出 30 μg/ml 作为后续实验的终浓度。

时间依赖实验：用 30 μg/ml 的 GST-S100A6 对上述 5 株细胞进行干预，依次在第 1、2、3、4 d 和第 5 d 取出孔板进行 MTT 处理，记录每孔 490 nm 处吸光度值。

所获实验数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。实验重复 3 次。

1.6　细胞划痕实验及 Transwell 法检测 S100A6 对细胞迁移的影响

细胞划痕实验：各细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中，待贴壁后（约需 12 h）划痕。用无菌 10 μl Tip 头沿孔板直径轻轻划痕，PBS 冲洗后重新加入 2 ml 相应无血清培养基，其中含 30 μg/ml 的 GST-S100A6。每隔 12 h 测定划痕宽度直至划痕愈合。细胞迁移率 =（1- 划痕宽度/划痕原始宽度）× 100%。因此，细胞迁移率在划痕结束时为 0%，划痕完全愈合时为 100%。实验重复 3 次。

Transwell 实验：细胞以 1×10^6 个接种于 100 ml 培养瓶，加入 30 μg/ml 的 GST-S100A6，继续培养 24 h 后消化各瓶细胞，每孔 1.0×10^4 个接种于 Transwell 小室的上腔，继续用 30 μg/ml 的 GST-S100A6 干预，48 h 后取出小室，4%多聚甲醛固定穿膜细胞，甲基紫染色。于倒置显微镜下计数穿膜细胞。随后，用 700 μl 33%醋酸溶液洗脱细胞，于 490 nm 处记录吸光度值（与穿膜细胞数成正比）。实验重复 3 次。

1.7　免疫细胞化学法（ICC）及 Western-blotting 法检测 S100A6 对细胞 β-catenin 表达水平的影响

免疫细胞化学法：制作细胞爬片，用 30 μg/ml 的 GST-S100A6 作用细胞 72 h 后行免疫细胞化学染色。β - catenin 多克隆抗体浓度为 1:100。PBS 代替一抗作阴性对照。用 IPP ver6.0 记录阳性染色平均光密度值。实验重复 3 次。

Western-blotting 法：100 ml 培养瓶中培养细胞，30 μg/ml 的 GST-S100A6 作用细胞 72 h 后提取总蛋白，行 SDS-PAGE /Western-blotting，β - catenin 抗体浓度 1:100。Quanity One ver.4.0 记录条带灰度比值。

1.8　统计分析

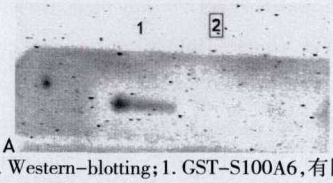
所得数据均用 SPSS ver.13.0 进行 t 检验，并行显著性分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1 重组 S100A6 蛋白（GST-S100A6）的鉴定

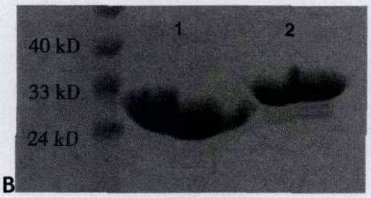
①以 S100A6 抗体（1:1 000）为一抗，经 Western-blotting 法检测纯化后的重组 S100A6，结果如图 1A，对照蛋白 GST 为阴性反应，实验组出现相应阳性杂交条带。

②SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色，可见 36 kD 处的GST-S



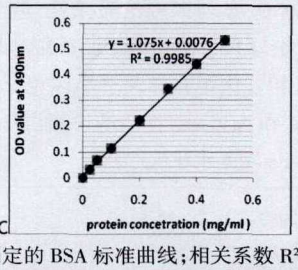
A

A. Western-blotting；1. GST-S100A6，有阳性条带；2. GST，无阳性条带（ECL）



B

B. SDS-PAGE/ 考马斯亮蓝染色可见 36 kD 处的 GST-S100A6 和 26 kD 处的 GST



C

C. BCA 法测定的 BSA 标准曲线；相关系数 R^2=0.998 5

图 1　S100A6 重组蛋白的鉴定

100A6 条带和 26 kD 处的 GST(对照蛋白)的条带,Quanity One 分析纯度可达 92%(图 1B)。

③以标准化的 BSA 为参照品,以 BCA 法测定其浓度并绘制蛋白浓度标准曲线(图 1C),由此曲线推算洗脱的 GST 及 GST-S100A6 浓度分别为 11.8 mg/ml 和 12.3 mg/ml,则 1 L 菌液中可得 5.9mgGST 和 6.15mgGST-S100A6。

提示:制备重组 GST-S100A6 蛋白成功。

2.2 S100A6 对各细胞增殖的影响

2.2.1 浓度依赖实验 全部数据见表 1。在各浓度(3、10、30、100、300、1 000 μg/ml)下,5 株转化细胞系的 GST-S100A6组的 OD 值与 GST 组的正负差值均小于 5%,差异不具统计学意义($P>0.05$);而作为阳性对照的 143B 细胞的增殖则呈浓度依赖性抑制。

2.2.2 以 30 μg/ml 浓度做时间依赖实验 全部数据见表 2。在蛋白干预后 5 d 观测时间内,5 株转化细胞系 GST-S100A6 组的 OD 值与 GST 组的正负差值均小于 2%,差异不具统计学意义($P>0.05$);而作为阳性对照的 143B 细胞的 OD 值从干预后第 3 d 起开始降低,第 3~5 d 的 OD 值较 GST 组分别下降 11.7%、14.7%和 16.6%($P<0.05$)。

该结果提示外源性 S100A6 对这 5 株转化细胞系的增殖无明显影响。

2.3 S100A6 对各细胞系迁移的影响

细胞划痕实验:实验结果见表 3。30 μg/ml 的 S100A6 作用于 5 株细胞,各个观测点的细胞迁移率均与 GST 组相差小于 1%,差异无统计学意义($P>0.05$);而 143B 细胞迁移率较 GST 组分别减少 14.8%、16.4%和 18.1%($P<0.05$),差异具有统计学意义。图 2 是其中 9HTE 细胞和 143B 细胞的划痕实验结果。

Transwell 实验:全部实验数据见表 4。30 μg/ml 浓度的 S100A6 作用于 5 株转化细胞,实验组与 GST 组穿膜细胞计数相差小于 1%,差异无统计学意义($P>0.05$);143B 实验组穿膜细胞数较 GST 组减少 11.2%($P<0.05$),差异具有统计

表 1 不同浓度的外源性 S100A6 对各细胞系增殖的影响

	3 μg/ml		10 μg/ml		30 μg/ml		100 μg/ml		300 μg/ml		1 000 μg/ml	
	GST	A6	GST	A6	GST	A6	GST	A6	GST	A6	GST	A6
HEK293	0.74±0.04	0.76±0.06	07.3±0.04	0.77±0.05	0.80±0.02	0.75±0.04	0.75±0.04	0.76±0.06	0.77±0.06	0.75±0.02	0.74±0.04	0.78±0.03
9HTE	0.58±0.04	0.60±0.03	0.57±0.07	0.59±0.02	0.59±0.07	0.60±0.04	0.62±0.06	0.59±0.07	0.59±0.04	0.61±0.07	0.58±0.04	0.61±0.02
MEF	0.64±0.03	0.66±0.07	0.61±0.04	0.65±0.05	0.62±0.06	0.63±0.06	0.65±0.07	0.66±0.06	0.63±0.04	0.62±0.07	0.65±0.02	0.63±0.03
CHO	0.67±0.03	0.69±0.05	0.66±0.06	0.65±0.04	0.66±0.02	0.65±0.07	0.66±0.02	0.68±0.03	0.64±0.03	0.66±0.04	0.67±0.05	0.65±0.02
C3H10T1/2	0.58±0.03	0.61±0.05	0.61±0.02	0.63±0.04	0.62±0.04	0.60±0.06	0.63±0.03	0.59±0.06	0.60±0.04	0.58±0.05	0.60±0.04	0.57±0.05
143B	0.76±0.02	0.77±0.03	0.78±0.03	0.76±0.02	0.77±0.03	0.69±0.04*	0.76±0.04	0.64±0.03*	0.76±0.05	0.63±0.02*	0.76±0.04	0.61±0.03*

*$P<0.05$; A6: GST-S100A6

表 2 外源性 S100A6 对各细胞系增殖的影响

	1 d		2 d		3 d		4 d		5 d	
	GST	A6	GST	A6	GST	A6	GST	A6	GST	A6
HEK293	0.18±0.02	0.19±0.01	0.34±0.02	0.33±0.03	0.64±0.04	0.63±0.03	0.10±0.04	1.08±0.03	1.10±0.03	1.09±0.04
9HTE	0.14±0.01	0.14±0.01	0.16±0.02	0.16±0.02	0.22±0.03	0.22±0.05	0.44±0.02	0.45±0.03	0.54±0.02	0.55±0.05
MEF	0.22±0.03	0.24±0.03	0.36±0.01	0.36±0.03	0.75±0.05	0.76±0.02	0.95±0.04	0.96±0.03	1.08±0.03	1.07±0.04
CHO	0.17±0.03	0.17±0.02	0.18±0.03	0.18±0.02	0.21±0.02	0.23±0.02	0.47±0.04	0.45±0.02	0.67±0.03	0.65±0.05
C3H10T1/2	0.16±0.01	0.15±0.02	0.27±0.03	0.26±0.02	0.45±0.03	0.44±0.04	0.86±0.02	0.87±0.04	1.06±0.03	1.07±0.05
143B	0.20±0.02	0.16±0.02	0.27±0.03	0.23±0.02	0.47±0.03	0.32±0.04*	0.84±0.05	0.57±0.04*	1.12±0.03	0.76±0.05*

*$P<0.05$; A6: GST-S100A6

表 3 外源性 S100A6 对各细胞系迁移的影响(细胞划痕,迁移率%)

	12 h		24 h		36 h	
	GST	A6	GST	A6	GST	A6
HEK293	28	25	82	79	100	100
9HTE	15	17	45	43	68	70
MEF	31	29	83	86	100	100
CHO	23	24	77	73	94	100
C3H10T1/2	25	23	76	73	93	96
143B	27	23*	74	62*	94	77*

*$P<0.05$; A6: GST-S100A6

学意义。图 3 是其中镜下所见的 9HTE 细胞和 143B 细胞穿膜情况。

同时，用 33%醋酸洗脱被甲基紫染色后的细胞，读取490 nm 处的 OD 值，进一步证实了实验组与 GST 组 OD 值相差小于 1%，差异无统计学意义（$P>0.05$，该组具体数据略）。

上述结果提示外源性 S100A6 对这 5 株转化细胞的迁移没有明显影响，而对 143B 的迁移具有一定的抑制作用。

2.4　免疫细胞化学法（ICC）及 Western-blotting 法测定细胞内 β-catenin 表达

免疫细胞化学法，见图 4。5 株细胞实验结果相似，表现在 GST-S100A6 组 β-catenin 阳性染色平均光密度值高于 GST 组，HEK293、9HTE、MEF、CHO 和 C3H10T1/2 分别增高 25.4%、15%、22.1%、22.7%和 28%，差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。

Western-blotting 法，见图 5。实验组灰度比值较 GST 组均有升高，HEK293、9HTE、MEF、CHO 和 C3H10T1/2 分别增高 11.4%、21.9%、13%、14.8%和 10.1%，差异具均有统计学意义（$P<0.05$），并与免疫细胞化学法检测结果一致。

提示：外源性 S100A6 能上调此 5 种细胞内 β-catenin 的水平。

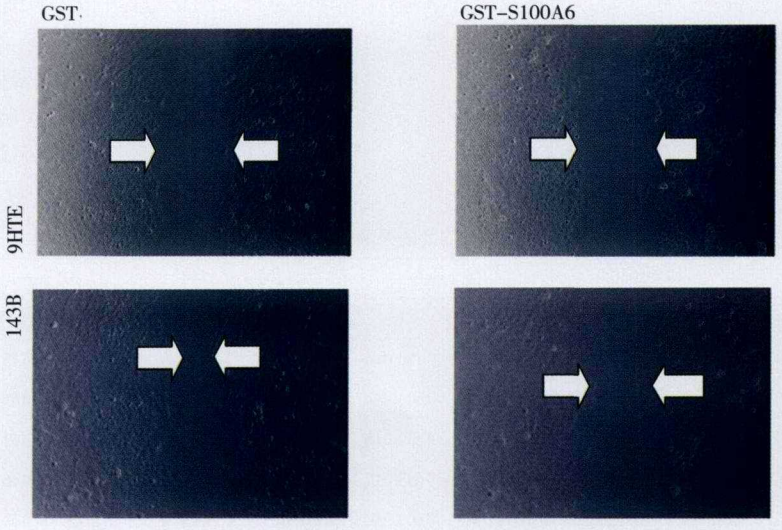


图 2　S100A6 对细胞系 9HTE 和 143B 迁移的影响（细胞划痕实验）

表 4　外源性 S100A6 对各细胞系迁移的影响（穿膜细胞总数）

	HEK293	9HTE	MEF	CHO	C3H10T1/2	143B
GST	482	439	566	544	667	552
A6	507	427	573	539	681	497*

*$P<0.05$；A6: GST-S100A6

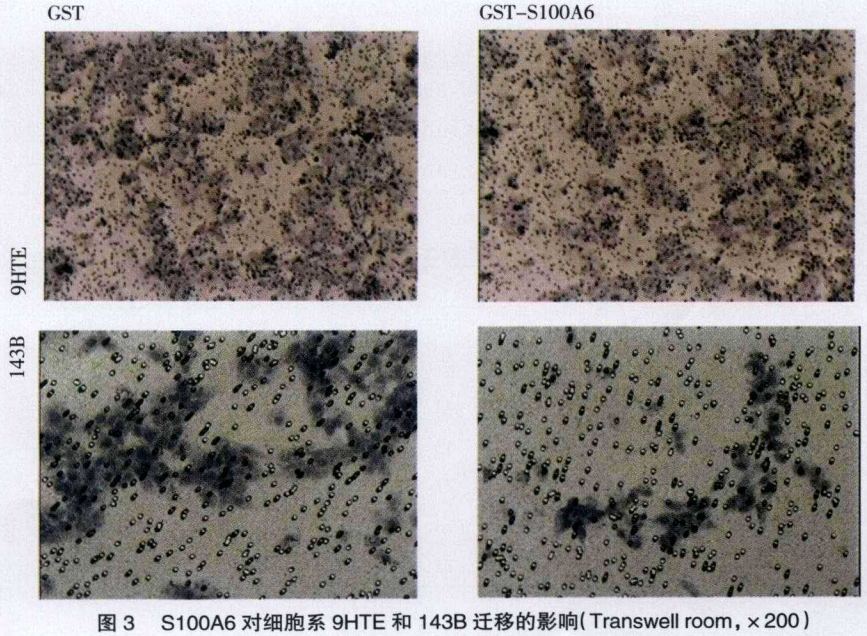


图 3　S100A6 对细胞系 9HTE 和 143B 迁移的影响（Transwell room，×200）

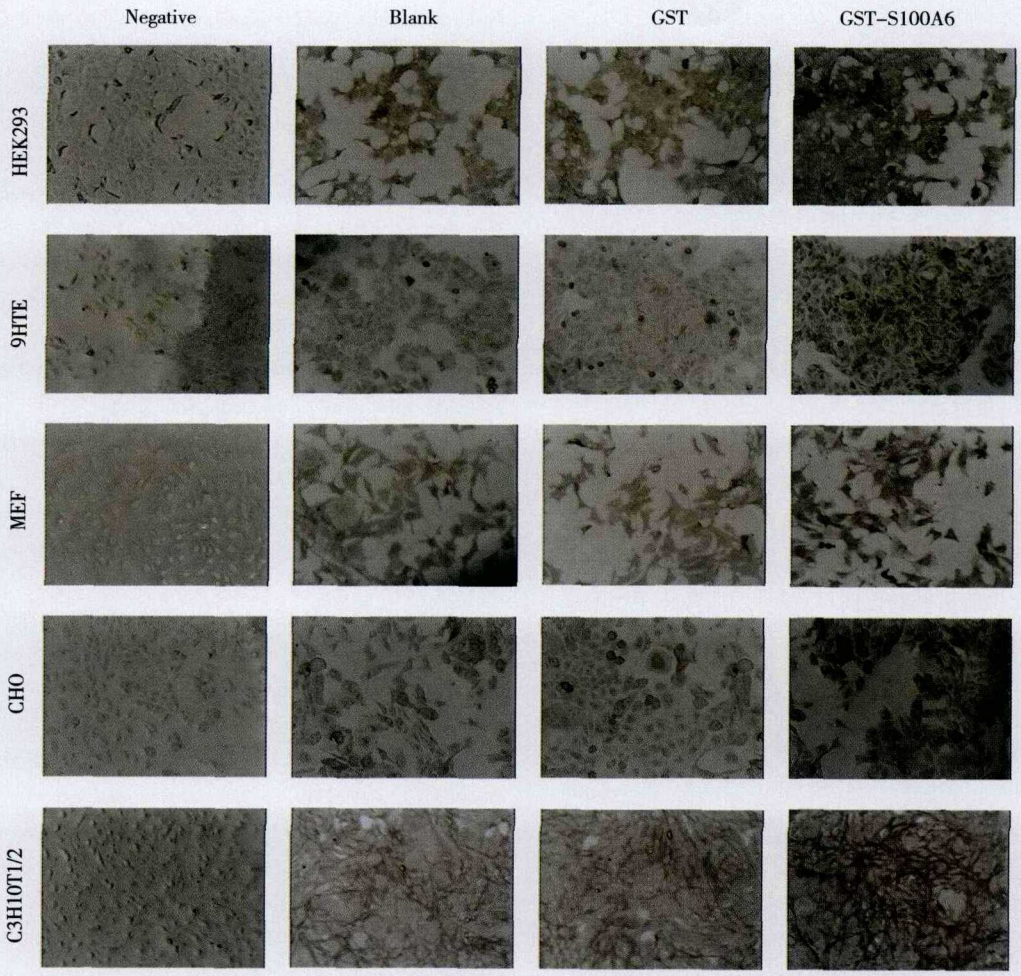
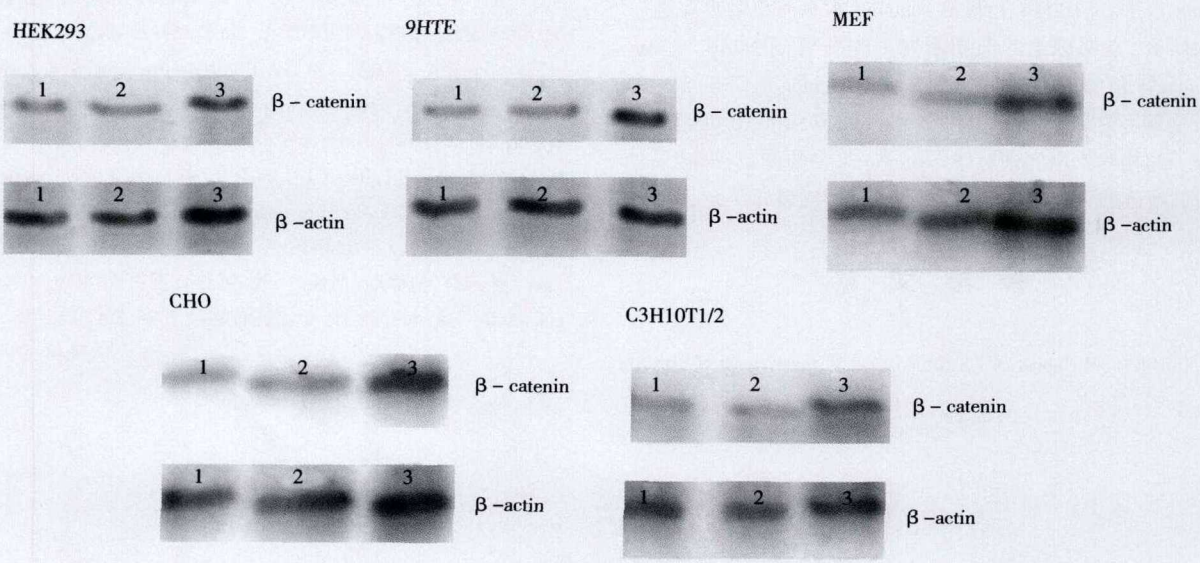


图 4　S100A6 上调 5 株转化细胞内 β－catenin 表达水平（免疫细胞化学，DAB，×200）



1. 空白组；2. GST 组；3. GST-S100A6 组

图 5　S100A6 上调 5 株转化细胞内 β－catenin 表达水平（Western-blotting）

3 讨 论

通过诱导表达 1 分离纯化，我们从大肠杆菌获得高纯度重组 S100A6 蛋白，为本实验研究奠定基础。

迄今，大部分报道认为 S100A6 具有促瘤作用，而另一部分则认为该分子具有抑瘤作用，我们的前期研究发现 S100A6 能抑制多种肿瘤的增殖和迁移，并且这种抑制作用呈一定的剂量时间依赖。尽管如此，可以明确的是 S100A6 能够影响肿瘤细胞的增殖和迁移能力。但是，它对正常细胞是否具有同样的作用，尚未见报道。

本研究通过 MTT 法、划痕实验和 Transwell 法发现 S100A6 对 5 株转化细胞系的增殖和迁移无明显影响。提示，它虽然明显影响肿瘤细胞的增殖和迁移等，但是对正常细胞的增殖和迁移却没有明显影响。S100A6 的这种对正常细胞和肿瘤细胞的选择性作用的机制尚待探讨，但是该选择性作用的存在可能有利于将 S100A6 作为抗肿瘤治疗靶点。

Filipek A 等发现在 ehrlich 腹水瘤中，S100A6 与 CacyBP/SIP 相互作用，而后者参与 β-catenin 的泛素化和降解[12]；Matsuzawa 等也证实，S100A6 通过 E3 配体与 Siah 相互作用，后者参与 β-catenin 的降解[13]，故 S100A6 参与对 β-catenin 水平的调节，但具体作用尚不明了。而我们的前期研究发现外源性 S100A6 能上调黑色素瘤、卵巢癌、骨肉瘤、人结肠癌多种肿瘤细胞株的 β-catenin 水平，并激活下游 TCF 转录活性，激活 Wnt/β-catenin 信号通路。本研究通过免疫细胞化学法和蛋白质印迹法一致地证实 S100A6 可上调 HEK293、9HTE、CHO、MEF 及 C3H10T1/2 这 5 种转化细胞系的 β-catenin 水平。S100A6 上调 β-catenin 水平的机制需要进一步的研究，本课题组的前期研究工作发现，S100A6 与 wnt/β-catenin 信号途径中的重要成员 β-catenin、GSK-3β 和 DVL 之间存在着直接的相互作用[14]，提示 S100A6 可能与这些分子的相互作用实现对 β-catenin 水平的调节；该结果也为我们新近的免疫共沉淀实验所证实（待发表）。

参 考 文 献

[1] Filipek A, Michowski W, Kužnicki J, et al. Involvement of S100A6 (calcyclin) and its binding partners in intracellular signaling pathways[J]. Adv Enzyme Regul, 2008, 48(1): 225-239.

[2] Wiesława Les'niak, Łukasz P.S100A6- New facts and features[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 390 (4): 1087-1092.

[3] SłomnickiŁ P, Nawrot B, Les'niak W. S100A6 binds p53 and affects its activity[J]. Biochem Cell Biol, 2009, 41(4): 784-790.

[4] Filipek A, Michowski W, Kuznicki J. Involvement of S100A6 (calcyclin) and its binding partners in intracellular signaling pathways[J]. Adv Enzyme Regul, 2008, 48(2): 225-239.

[5] Leclerc E, Fritz G, Weibel M, et al. S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains[J]. Biol. Chem, 2007, 282(43): 31317-31331.

[6] Matsuzawa S I, Reed J C. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses[J]. Mol.Cell, 2001, 7(5): 915-926.

[7] 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]. Cell Biochem, 2008, 103(4): 1183-1197.

[8] 陈英华，卫 佳，李星星，等. 外源性 S100A6 对人骨肉瘤细胞株 U20S 的增殖、凋亡及 β-catenin 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(7): 817-821.

[9] Luo X, Sharff K A, Chen J, et al. S100A6 expression and function in human osteosarcoma [J]. Clin Orthop Relat Res, 2008, 466(9): 2060-2070.

[10] Luu H H, Zhou L, Haydon R C, et al. Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anchorage independent growth in human osteosarcoma [J]. Cancer Lett, 2005, 229(1): 135-148.

[11] 卫 佳，王 胜，苗静琨，等. 人 S100A2-GST 融合蛋白原核表达和纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(12): 1427-1430.

[12] 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.

[13] Matsuzawa S I, Reed J C. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses [J]. Mol. Cell, 2001, 7(5): 915-926.

[14] 赖天霞，苗静琨，何焕玲，等. 钙结合蛋白 S100A6 对 Wnt/β-catenin 信号途径的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(1): 12-15.

（责任编辑：冉明会）