肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0817-05

外源性 S100A6 对人骨肉瘤细胞株 U2OS 的增殖、凋亡及 β-catenin 表达的影响

陈英华[1],卫 佳[1],李星星[1],吴丽美[1],马 闻[1],张 彦[1],何通川[2],周 兰[1]

(1. 重庆医科大学生物医学工程系、重庆市生物医学工程学重点实验室、重庆市超声医学工程重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地,重庆 400016;2. 美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室)

【摘 要】目的:探讨外源性 S100A6 对骨肉瘤细胞株 U2OS 的生物学作用及其可能机制。方法:MTT 法检测 S100A6 对 U2OS 细胞增殖的影响及浓度依赖性,台盼蓝拒染法计数活细胞检测 S100A6 对 U2OS 增殖作用的时间依赖性,Hoechst 染色检测细胞凋亡,Western blot 法及免疫细胞化学法检测细胞内 β-catenin 的表达变化。结果:S100A6 作用 3 d 时,浓度为 30、100、300 和 1 000 μg/ml 的重组 S100A6(GST-S100A6)组的 OD 值分别比相应浓度的 GST 对照组的 OD 值减少 20.5%、23.7%、32.2%和 36.8%,$P<0.05$;蛋白浓度为 100 μg/ml 时,GST-S100A6 组的细胞数在前 2 d 与 GST 组相似,第 3、4、5 d 的细胞数分别降低到 GST 组的 59%、46%、48%,$P<0.05$;GST-S100A6 干预 3 d 后细胞凋亡率增高 3.16 倍,$P<0.01$;免疫细胞化学法测得经 GST-S100A6 处理 3 d 后 β-catenin 的平均光密度值比 GST 组增加 22.9%,$P<0.01$;经携带 S100A6 基因的重组腺病毒(Ad-S100A6)处理 3 d 后,Western blot 法检测细胞中 β-catenin 的校正灰度值为 1.420 4±0.199 9,比对照组(Ad-GFP 组,0.999 6±0.100 0)显著增高,$P<0.01$。结论:外源性 S100A6 能够抑制 U2OS 细胞的增殖、促进其凋亡和增加 U2OS 细胞中 β-catenin 水平。

【关键词】S100A6;骨肉瘤;β-catenin

【中国图书分类法分类号】R730.231 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-16

Effect of exogenous S100A6 on human osteosarcoma cell line U2OS proliferation, apoptosis and β-catenin expression

CHEN Ying-hua, et al

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

【Abstract】*Objective*: we investigated the biological effects of exogenous S100A6 on osteosarcoma cell line U2OS and explored its possible mechanism. *Methods*:MTT assay was used to determine S100A6 influence on U2OS cells proliferation and their conce ntration-dependent relationship. The trypan blue exclusion assay was used to observe S100A6 inhibitory effect on U2OS cells proliferation in a time-dependent manner;Hoechst staining was used to determine cell apoptosis;Western blot and immunocytochemical methods to determine expressions of cyto-β-catenin. *Results*:We found that ,on the first three days,OD values in cells subjected to the recombinant protein S100A6(GST-S100A6)with the concentrations of 30, 100, 300 and 1 000 μg/ml respectively were obviously lower than those in the GST group,by 20.5%,23.7%,32.2% and 36.8% accordingly ($P<0.05$);when protein concentration was 100 μg/ml,cell counting in GST-S100A6 group was similar with GST group in the first two days,while decreased significantly to 59% ,46% ,48% on the third, fourth,fifth day compared with the GST group ($P<0.05$);cell apoptosis rates increased by 3.16 fold three days after subjected to GST-S100A6 ($P<0.01$). Average optical density of β-catenin in GST- S100A6 group increased by 22.9% compared with the GST group ($P<0.01$) 72h after exposure,using immunocytochemical assay;72 h after treatment with the recombinant adenovirus carrying S100A6 gene (Ad-S100A6),corrected gray value of intracellular β-catenin was 1.420 4±0.199 9,obviously higher than those in the control group 0.999 6±0.100 0 ($P<0.01$).*Conclusion*: Exogenous protein S100A6 could inhibite U2OS cells proliferation,promote apoptosis and then increase intracellular β-catenin concentration.

【Key words】S100A6;Osteosarcoma;β-catenin

S100 蛋白家族是一类具有 EF-手形结构的信号分子,与钙离子及其靶蛋白结合后发挥多种生理功能,例如,参与细胞增殖和分化、钙稳态、蛋白质磷酸化、酶活性和转录因子的调节。该家族有 20 多

作者介绍:陈英华(1983-),女,硕士,研究方向:肿瘤学。

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

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772548)。

个成员,其中一些成员已经被证明与人类多种癌症密切相关,现已有几种 S100 蛋白在临床上被用作一些肿瘤(包括神经内分泌瘤、肾癌、甲状腺癌、黑色素瘤、嗜铬细胞瘤等)的诊断及分类的标志物。

S100A6 是 S100 蛋白家族中的一员,在多数上皮肿瘤、骨肉瘤、卵巢癌等多种肿瘤细胞中高表达[1]。我们前期在骨肉瘤上开展的研究结果与之一致:即 84%(42/50)的骨肉瘤标本 S100A6 呈阳性,其表达的增加与病人的转移呈负相关趋势[2];最近又发现 S100A6 在多种骨肉瘤细胞株 TE85、143B、MG63 等中高表达,并能通过促进骨肉瘤细胞的粘附和抑制其细胞运动性来抑制其转移[3];本实验以另外一株人骨肉瘤细胞 U2OS 作为研究对象,为阐明 S100A6 对骨肉瘤的生物学作用提供更多实验依据。

Wnt/β-catenin 信号失调与肿瘤的发生发展密切相关,其活性升高也常常存在于 S100A6 高表达的肿瘤细胞中[4,5];因此,本研究拟初步探讨 S100A6 对 U2OS 细胞 β-catenin 的影响,为阐明 S100A6 对骨肉瘤生物学作用的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、质粒和重组蛋白 人骨肉瘤细胞株 U2OS 购自中国典型培养物保藏中心;重组腺病毒 AdS100A6、AdGFP、质粒 pGST-moluc 和 pGST-moluc-hS100A6 为美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室馈赠,GST-S100A6 融合蛋白的原核表达和纯化方法参见文献[6],重组腺病毒的扩增方法同参考文献[7]。

1.1.2 试剂 Hoechst 试剂盒(北京晶美,中国),兔抗人 β-catenin 多克隆抗体(promega,USA),免疫组化、DAB 显色试剂盒、FITC 标记羊抗兔 IgG(北京中杉,中国),荧光素酶检测试剂盒(promega,USA)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测不同浓度外源性 S100A6 对 U2OS 细胞增殖的影响 用 0.25%胰蛋白酶消化 U2OS 细胞,制成单细胞悬液,以每孔 0.2×10^4 个接种于 96 孔板中,每孔 200 μl 完全培养基。12 h 后进行实验干预,实验分 3 大组:①空白对照组;②GST 对照组;③ GST-S100A6 组。其中,GST 组和 GST-S100A6 组又分别设置 3、10、30、100、300 和 1 000 μg/ml 共 6 个浓度梯度,于 37℃、5% CO_2 的饱和湿度箱中继续培养和观察,此时记为 0 d,于 3 d 进行 MTT 检测,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.2 台盼蓝拒染法细胞计数活细胞检测 S100A6 作用后不同时间 U2OS 的增殖情况 用 0.25%胰蛋白酶消化 U2OS 细胞,制成单细胞悬液,以每孔 0.2×10^4 个接种于 96 孔板中,每孔 200 μl 完全培养基。12 h 后进行实验干预,实验分 3 组:①空白对照组;②GST 对照组;③ GST-S100A6 组。分组同前,根据 1.2.1 的实验结果确定实验所用重组蛋白的终浓度,于 37℃、5% CO_2 的饱和湿度箱中继续培养和观察,此时记为 0 d,分别于 1、2、3、4 和 5 d 取出 96 孔板,用台盼蓝拒染法计数活细胞。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.3 Hoechst 染色检测细胞凋亡情况 分组同前,实验干预后 3 d 按照 Hoechst 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,实验重复 3 次。计数凋亡细胞,计算凋亡率。

1.2.4 外源性 S100A6 作用后 Western blot 分析 U2OS 细胞 β-catenin 的表达变化 接种 U2OS 细胞于 12 孔板,待细胞融合度达到 50%~60%时加入 AdS100A6,继续培养,分别于 2 d 和 3 d 收集细胞;以 AdGFP 为实验对照。用细胞裂解液裂解细胞,收集裂解液上清并测定其中的蛋白含量(紫外分光光度计);各取 80 μg 样品进行 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 试剂盒说明书进行化学发光检测,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。

1.2.5 免疫细胞化学(Immunocytochemical,ICC)法检测细胞内 β-catenin 的表达水平及部位的变化 细胞生长达 80%融合度时消化传代,于 12 孔板中放入无菌玻片,0.25%胰酶消化 U2OS 细胞后接种于无菌玻片上,贴壁后并达到 20%~30%融合度时(约 8 h)加入融合蛋白,分组同前,继续常规培养 3 d 后获得所需细胞爬片。按照免疫组化试剂盒说明书操作,一抗为兔抗人 β-catenin 多克隆抗体(1:100),每组制备 3 张细胞爬片,实验重复 3 次。

1.3 统计方法

所获实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行单因素方差分析,进行单因素方差分析和显著性检验。预先用 Homogeneity of Variances 进行方差齐性检验,如方差齐采用 LSD 检验,如方差不齐采用 TamhaaeT2 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 外源性 S100A6 抑制 U2OS 增殖,并呈浓度依赖性

细胞培养 3 d 时,浓度为 3 μg/ml 和 10 μg/ml的 GST-S100A6 组的 OD 值与相应浓度的 GST 组相似($P>0.05$),而浓度为 30、100、300 μg/ml 和 1 000 μg/ml 的 GST-S100A6 组的 OD 值分别较相应浓度的 GST 组的 OD 值减少了 20.5%、23.7%、32.2%和 36.8%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。提示

外源性 S100A6 对 U2OS 细胞的增殖有抑制作用，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。

2.2 外源性 S100A6 对 U2OS 增殖抑制作用呈一定的时间依赖性

蛋白浓度为 100 μg/ml 时，GST-S100A6 组的细胞数在前 2 d 与 GST 组相似，3、4、5 d 的细胞数分别是 GST 组的 59%、46%、48%，两组差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。进一步证实外源性 S100A6 对 U2OS 细胞增殖的抑制作用，并提示该作用呈一定的时间依赖性。

表 1 不同浓度 S100A6 对 U2OS 增殖的影响（3 d，MTT）

分组 /OD 值	3 μg/ml	10 μg/ml	30 μg/ml	100 μg/ml	300 μg/ml	1 000 μg/ml
空白对照组	1.533 33 ± 0.049 33	1.529 98 ± 0.052 96	1.498 73 ± 0.025 84	1.543 27 ± 0.064 82	1.521 98 ± 0.078 62	1.534 52 ± 0.049 36
GST 组	1.525 01 ± 0.047 70	1.551 30 ± 0.131 60	1.566 01 ± 0.019 71	1.479 02 ± 0.090 07	1.487 01 ± 0.083 83	1.519 32 ± 0.036 35
GST-A6 组	1.450 00 ± 0.028 28	1.421 00 ± 0.234 21	1.245 31 ± 0.038 31*	1.129 01 ± 0.103 12*	1.007 30 ± 0.024 11*	0.968 01 ± 0.025 53*

注：与空白对照组比较，* $P<0.05$

表 2 不同的 S100A6 作用时间对 U2OS 增殖的影响（100 μg/ml，台盼蓝拒染法）

分组	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
空白对照组	2 666.67 ± 288.67	3 166.67 ± 577.35	8 666.67 ± 763.76	12 666.60 ± 1 154.70	12 166.67 ± 2 020.73
GST 组	2 333.33 ± 288.67	3 166.67 ± 763.76	7 666.67 ± 288.68	11 333.33 ± 288.68	11 500.00 ± 1 322.88
GST-A6 组	2 666.67 ± 577.35	3 666.67 ± 577.35	4 500.00 ± 500.00*	5 166.67 ± 288.68*	5 500.00 ± 866.03*

注：与空白对照组比较，* $P<0.05$

2.3 外源性 S100A6 促进 U2OS 细胞凋亡

重组 S100A6 作用于 U2OS 细胞后细胞凋亡增加，荧光显微镜下可见大量凋亡细胞，见图 1（A~C）。GST-S100A6 组细胞凋亡率增高了 3.16 倍，$P<0.01$；两对照组之间差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 1（D）。提示，S100A6 有促进 U2OS 细胞凋亡的作用。

2.4 Western blot 法检测 S100A6 对 U2OS 细胞 β-catenin 表达的影响

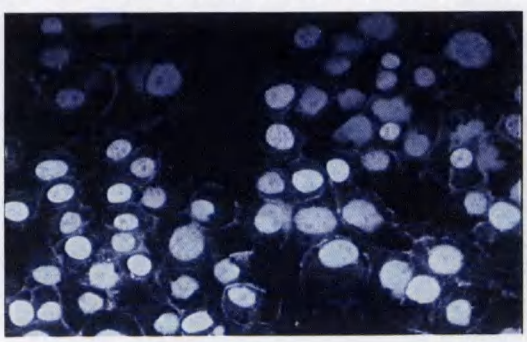
AdS100A6 感染 2 d 和 3 d 后 U2OS 细胞的 β-catenin 变化见图 2（A）。S100A6 组的 β-catenin 杂交带比空白对照组和 GFP 组灰度明显增加，Quantity One Vesion 4.5.0 软件测定各条带的灰度值，Ad-S100A6 组 2 d 和 3 d 的 β-catenin 校正灰度值（经 β-actin 校正）分别较相应的 Ad-GFP 组增加 21.8%（$P>0.05$）和 42.1%（$P<0.01$），见图 2（B），提示外源性 S100A6 能增加 U2OS 细胞 β-catenin 的水平，且呈一定的时间依赖性。

2.5 ICC 法检测 S100A6 对 U2OS 细胞 β-catenin 表达的影响

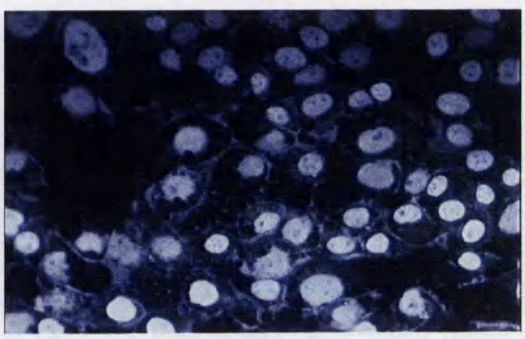
ICC 法：该检测法的阳性细胞呈棕色；对照组细胞为浅棕色，其中胞浆及核膜染色较胞核深；GST-S100A6 干预 3 d 后的 U2OS 细胞染色普遍加深，以核膜及核内深染更为明显，见图 3（A~D）。用图像分析系统测得各组图片的平均光密度值，其中 GST-S100A6 组比 GST 组增加 22.9%（$P<0.01$），见图 3（E）。

3 讨 论

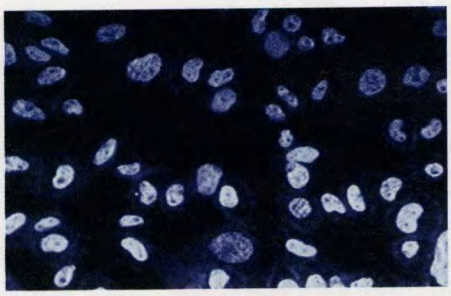
关于 S100A6 对肿瘤增殖的影响目前的报道不尽一致。多数报道认为它能促进肿瘤的增殖。例如，用 RNAi 阻遏 S100A6 的翻译后，可抑制胰腺癌细



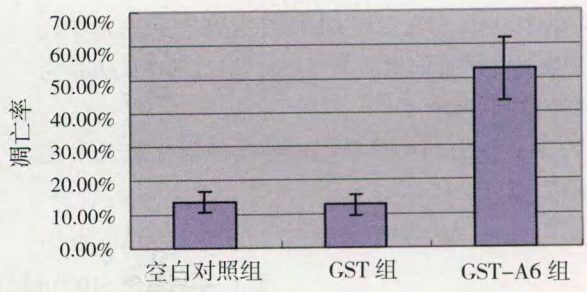
A. 空白对照组



B. GST 组

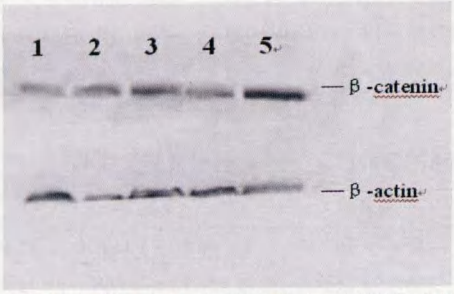


C. GST-A6 组



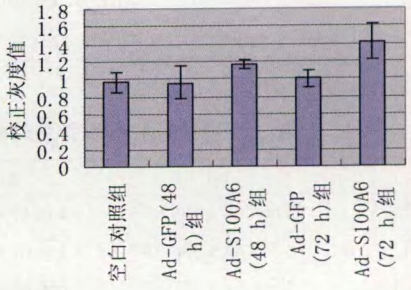
D. S100A6 作用后 U2OS 凋亡率的变化

图 1 S100A6 对 U2OS 细胞凋亡的影响（3 d, ×200，Hoechst 染色）



1. 空白对照组；2. Ad-GFP(2 d)组；3. Ad-S100A6 (2 d)组；4. Ad-GFP (3 d)组；5. Ad-S100A6 (3 d)组

A. Western blot 图片



B. Ad-S100A6 对 U2OS 细胞 beta-catenin 水平的影响

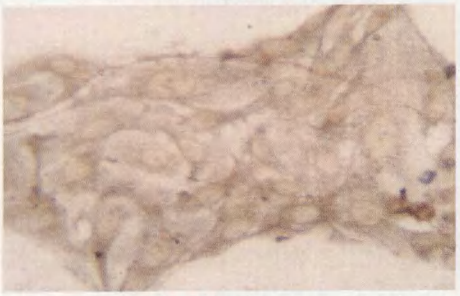
图 2 Ad-S100A6 对 U2OS 细胞 β-catenin 水平的影响（Western blot）



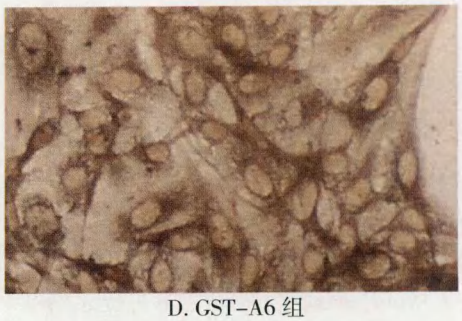
A. 阴性对照组



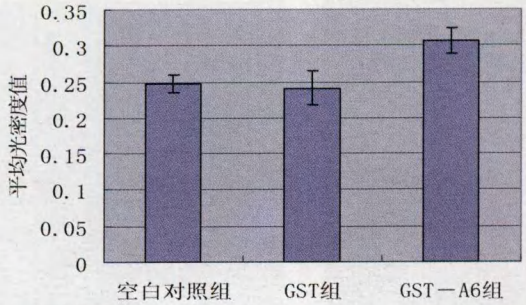
B. 空白对照组



C. GST 组



D. GST-A6 组



E. ICC 检测 S100A6 作用后 β-catenin 表达增加

图 3 外源性 S100A6 对 U2OS 细胞内 β-catenin 表达的影响(3 d，×200, ICC,DAB 显色)

胞株 CFPAC-1 的增殖[8]。但是,Tonini 等[9]则发现用视黄酸诱导神经母细胞瘤分化时,S100A6 mRNA 水平增加,提示 S100A6 可能参与肿瘤的增殖抑制。本研究中,我们发现 S100A6 重组蛋白作用后 U2OS 细胞的生长速度减缓,提示外源性 S100A6 能够抑制 U2OS 细胞的增殖。

S100A6 对肿瘤细胞凋亡影响的报道较少。有研究发现 S100A6 可提高 Hep-3B 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。本实验发现 S100A6 蛋白能明显增加 U2OS 细胞的凋亡率,提示 S100A6 能够促进 U2OS 细胞凋亡,并且这可能是其抑制 U2OS 细胞增殖的机制之一。

S100A6 是如何实现对骨肉瘤的抑制作用的呢? Wnt/β-catenin 信号途径是一条公认的与肿瘤的发生发展密切相关的信号途径,该途径中的 Wnt 信号可抑制 β-catenin 的降解,使胞浆内游离 β-catenin 水平增高并进入细胞核从而促进肿瘤的发生发展。Hoang 等[10]发现 Dickkopf-3 (Dkk-3)通过抑制 β-cate nin 促使其从胞核转位到胞外,从而抑制骨肉瘤细胞的转移,提示 β-catenin 信号也参与骨肉瘤的病理发生和发展;我们的前期研究发现 70.2% (33/47)的骨肉瘤有 β-catenin 在胞浆和胞核的聚集,这也提示胞内 β-catenin 聚集和活性增高与骨肉瘤的发生发展有关[11]。β-catenin 活性升高也常常与 S100 A6 高表达同时存在于肿瘤细胞中,提示这两个信号系统可能存在着相互联系。同时,S100A6 可能参与 β-catenin 的泛素化降解调节[12],但 S100A6 是上调还是下调 β-catenin 尚待研究。

本实验发现,U2OS 细胞经 S100A6 处理后,β-catenin 表达增加,尤其以核膜及核内增加为主。提示 S100A6 能增加 U2OS 细胞中 β-catenin 水平和促进 β-catenin 的核转移;这可能是骨肉瘤中 β-catenin 高表达的机制之一(S100A6 和 β-catenin 都在骨肉瘤呈高表达[1,5]);同时,S100A6 对骨肉瘤细胞的作用可能与其所致的 Wnt/β-catenin 信号失调有关。

参 考 文 献

[1] 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(11): 256-269.

[2] Luu H H, Zhou, 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 Letters, 2005, 229(1): 135-148.

[3] 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.

[4] Polakis P. The many ways of Wnt in cancer[J]. Current opinion in genetics & development, 2007, 17(5): 45-51.

[5] Suriano G, Vrcelj N, Senz J, et al. beta-catenin (CTNNB1) geneam plification: a new mechanism of protein over expression in cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2005, 42(3): 238-246.

[6] 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.

[7] He T C, Zhou S, da Costa L T, et al. A simplified system for genera ting recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509-2514.

[8] Rehman I, Cross S S, Azzouzi A R, et al. S100A6 (Calcyclin) is aprostate basal cell marker absent in prostate cancer and itsprecursors[J]. Br. J. Cancer, 2004, 91(7): 739-744.

[9] Breen E C, Tang K. Calcyclin (S100A6) regultes pulmonary fibroblast proliferation, morphology, and cytoskeletal organization in vitro[J]. Cell Bio chem, 2003, 88(9): 848-854.

[10] Hoang B H, Kubo T, Healey J H, et al. Dickkopf 3 inhibits and motility of Saos-2 osteosarcoma cells by modulating the Wnt/ beta-catenin pathway[J]. Cancer Res, 2004, 64(5): 2734-2739.

[11] Haydon R C, Deyrup A, Ishikawa A, et al. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma[J]. International Journal of Cancer, 2002, 102(4): 338-342.

[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.

(责任编辑:冉明会)

结构式摘要的写作要求

本刊一律采用结构式摘要,具体层次为:目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)。具体要求:①目的:需与正文前言相一致,与结论相呼应。②方法:需包括文中使用的主要方法的名称、病例(动物)数和必要的分组情况。③结果:与研究结论相关的主要结果及数据、统计学意义均应列出,并与文内核实无误。④结论:需与研究目的相呼应。中文摘要一般在 300 字左右,英文则与之相对应。英文摘要请译出文题,作者姓名、单位科室名称。