

重组人S100A6促进人乳腺癌细胞MCF-7的增殖和迁移侵袭并抑制其凋亡

游莉 徐兰兰 郭元元 孙双双 邹正渝 黎玉叶 罗进勇 何通川 周兰*
(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 该研究旨在探讨重组人S100A6蛋白对乳腺癌细胞株MCF-7的增殖、凋亡、迁移及侵袭能力的影响。利用原核表达制备重组人S100A6蛋白(GST-hS100A6), SDS-PAGE显示其大小为36 kDa, Western blot显示其可以被S100A6抗体特异识别, BCA法测定1 L菌液共收获约16.7 mg蛋白; 将其作用于人乳腺癌细胞MCF-7, MTT显示细胞培养48 h时, 浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 和300 $\mu\text{g/mL}$ 的GST-hS100A6组的 D_{492} 值较GST组增加29.1%和84.6%($P<0.05$), 提示S100A6促进MCF-7细胞增殖; 平板克隆形成实验显示GST-hS100A6组的克隆形成率较GST组高38.7%($P<0.05$), 提示S100A6促进MCF-7的克隆形成; Hoechst染色显示GST-hS100A6组在24 h时细胞凋亡率较GST组减少67.8%($P<0.05$), 48 h时细胞凋亡率较GST组减少58.4%($P<0.05$), 提示S100A6抑制MCF-7细胞凋亡; 划痕实验显示在24 h时GST-hS100A6组的划痕愈合率为GST组的2.2倍($P<0.05$), 提示S100A6促进MCF-7细胞迁移; Transwell显示GST-hS100A6组在24 h时穿膜细胞数较GST组增加88.1%($P<0.05$), 提示S100A6促进MCF-7细胞侵袭。以上结果显示S100A6对人乳腺癌具有一定的促进作用, 有可能成为乳腺癌分子诊断的标志物和治疗的新靶标。

关键词 S100A6; 乳腺癌; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 据资料统计, 其发病率占全身各种恶性肿瘤的7%~10%, 全球每年有120万妇女罹患乳腺癌, 且有50万死于该病。其病因复杂, 受年龄、环境、生活习惯、遗传等多种因素影响, 然而其确切机理尚待阐明。

S100蛋白是一组具有EF-手形结构的小分子量钙结合蛋白, 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、调节钙稳态、酶的活性和转录因子等^[1]。已知多个S100成员在肿瘤中异常表达, 并与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和肿瘤转移密切相关^[2]。S100A6是S100蛋白家族成员, 又称为钙周期蛋白(calycyclin, Cacy)。据文献报道, 在乳腺癌、人子宫内膜癌、肺癌、结直肠癌、各种类型的皮肤肿瘤以及上皮来源的肿瘤等多种增殖旺盛的细胞中, S100A6均高表达^[3]。本课题组研究亦发现S100A6在乳腺癌中表达明显高于癌旁组织(待发表)。目前, S100A6对于乳腺癌的具体作用尚无报道, 本实验拟研究重组人S100A6蛋白(GST-hS100A6)对乳腺癌细胞MCF-7的增殖、凋亡、迁移及侵袭的作用, 为阐明S100A6在乳腺癌的发生发展

中的作用及其作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pGST-moluc质粒为美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室馈赠, pGST-hS100A6为本课题组前期构建^[4], *E.coli* BL21由重庆医科大学临床检验诊断学实验室提供。

1.1.2 细胞株和培养液 人乳腺癌细胞MCF-7购自中国典型培养物保藏中心, DMEM/HIGH GLUCOSE培养液和胎牛血清购自美国Hyclone公司。

1.1.3 主要试剂 IPTG购自Bio Basic Inc., BCA蛋白定量试剂盒购自上海生工, 预染的蛋白质分子量标准购自Fermertans, 丙烯酰胺、还原型谷胱甘肽购自Amresco, Glutathion-Sepharose 4B球珠购自Amersham, MTT、DMSO、基质胶ECM购自Sigma, Hoechst试剂盒购自北京晶美公司, Millicell小室购

收稿日期: 2011-01-11 接受日期: 2011-03-23

国家自然科学基金(No.30772548)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485239, E-mail: zhoulan0111@gmail.com

自Millipore, S100A6单克隆抗体购自Santa Cruz。

1.2 方法

1.2.1 GST-hS100A6的制备和鉴定 方法同参考文献[4]。

1.2.2 细胞培养和实验分组 MCF-7贴壁生长于完全培养基(含10%胎牛血清, 青霉素和链霉素各50 U/L的DMEM/HIGH GLUCOSE)中, 于37 °C、5% CO₂的饱和湿度箱中培养, 隔天换液, 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。相同条件下实验重复3次。

1.2.3 MTT法检测hS100A6对MCF-7细胞增殖影响的浓度依赖 将对数生长期的MCF-7细胞以每孔 0.5×10^4 个接种于96孔板中, 每孔200 μ L完全培养基, 分组同前。其中蛋白组分别设置3 μ g/mL、10 μ g/mL、30 μ g/mL、100 μ g/mL、300 μ g/mL 5个浓度梯度, 每组设4个复孔, 此时记为0 h。于48 h用MTT法检测492 nm吸光度D值。

1.2.4 平板克隆形成实验检测hS100A6对MCF-7细胞克隆形成能力的影响 取对数生长期的MCF-7细胞以500个均匀接种于直径10 cm的平皿中, 12 h后进行实验干预, 蛋白终浓度为100 μ g/mL, 分组同前。常规培养10 d, 待肉眼可见克隆形成时取出平皿, PBS洗2次, 甲醇固定15 min。弃去固定液, 瑞氏染色计数。计算克隆形成率。

克隆形成率(%)=克隆数/接种数 \times 100%

1.2.5 Hoechst染色法检测hS100A6对MCF-7细胞凋亡的影响 将对数生长期的MCF-7细胞以每孔 2×10^4 个接种于24孔板中, 每孔500 μ L完全培养基, 分组同前。12 h后换为1%胎牛血清的培养基, 同时加入处理因素, 蛋白终浓度为100 μ g/mL, 此时记为0 h。分别于24 h、48 h按照凋亡试剂盒检测凋亡细胞, 并计算凋亡率。

凋亡率(%)=凋亡细胞数/细胞总数 \times 100%

1.2.6 划痕愈合实验(wound healing assay)检测hS100A6对MCF-7细胞迁移能力的影响 接种适量细胞于6孔板中, 每孔加入2 mL完全培养基, 融合度达到80%~90%时, 用0.5 mm中性笔尖行“十”字划痕, PBS洗两次, 更换完全培养基, 并进行实验干预(蛋白终浓度为100 μ g/mL), 实验分组同前, 倒置显微镜下观察照相, 此时记为0 h。37 °C、5% CO₂的饱和湿度箱中继续培养, 于24 h取出孔板, 在同一观察点处观察划痕愈合情况。比较各组细胞的愈合情况, 通

过测量多个点划痕宽度, 计算平均划痕愈合率。

划痕愈合率(%)=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 \times 100%

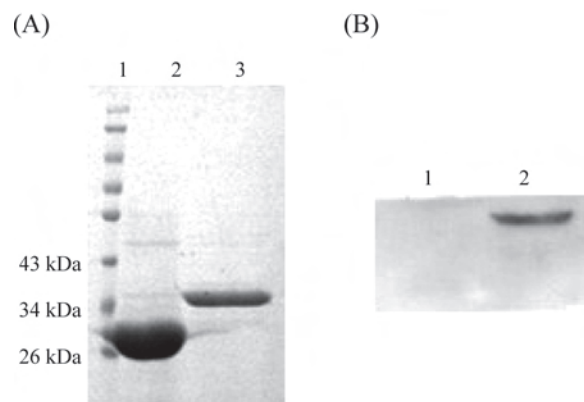
1.2.7 Transwell侵袭实验检测hS100A6对MCF-7细胞侵袭能力的影响 将对数生长期MCF-7细胞制成无血清的单细胞悬液, 细胞密度 3×10^5 个/mL, 取400 μ L接种在已铺基质胶ECM的Transwell小室的上腔中, 下腔中加入600 μ L含20%血清的完全培养基, 上下腔均加入相应的蛋白(终浓度为100 μ g/mL), 分组同前。24 h后取出小室, 用湿棉签擦去微孔膜上层的细胞, 无水乙醇固定20 min, 苏木精和伊红各染色20 min。PBS洗净, 自然风干小室, 用手术刀片沿压痕将小室膜轻轻切下, 置于载玻片上在显微镜下观察、计数。

1.2.8 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS12.0统计软件进行t检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 重组蛋白GST-hS100A6的鉴定

如图1A所示, SDS-PAGE显示GST相对分子量为26 kDa, GST-hS100A6约为36 kDa, 用Quantity One 4.5.0软件分析其纯度为94%。如图1B所示, Western blot显示重组蛋白GST-hS100A6与S100A6抗体呈阳性反应, 而GST无此条带, BCA法定量计算得出1 L菌液共收获约16.7 mg GST-hS100A6蛋白。



A: SDS-PAGE电泳图, 1: Marker, 2: GST, 3: GST-hS100A6; B: Western blot鉴定图, 1: GST, 2: GST-hS100A6。

A: SDS-PAGE, 1: Marker, 2: GST, 3: GST-hS100A6; B: Western blot, 1: GST, 2: GST-hS100A6。

图1 重组蛋白GST-hS100A6的鉴定

Fig.1 The identification of recombinant protein GST-hS100A6

2.2 hS100A6促进MCF-7细胞的增殖

MTT显示, 细胞培养2 d时, 浓度为3 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 和30 $\mu\text{g/mL}$ 的GST-hS100A6组的D值与相应浓度的GST组无统计学差异($P>0.05$), 而浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 和300 $\mu\text{g/mL}$ 的GST-hS100A6组的D值分别为: 0.972 ± 0.047 和 1.405 ± 0.111 , 较GST组增加29.1%和84.6%($P<0.05$), 见图2。提示外源性S100A6促进MCF-7细胞的增殖, 并且呈浓度依赖性。据此, 后续试验选用100 $\mu\text{g/mL}$ 为干预浓度。

2.2 hS100A6促进MCF-7细胞的克隆形成

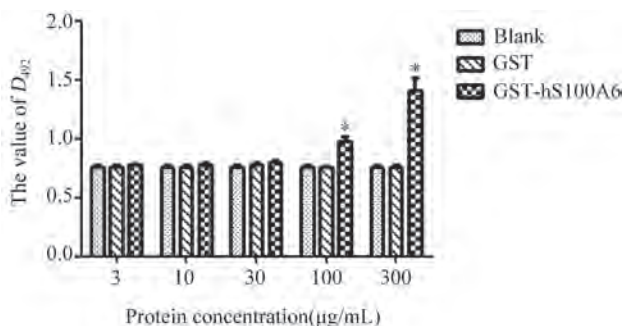
平板克隆形成实验结果显示, 蛋白作用于MCF-7细胞10 d后, GST-hS100A6组的克隆形成率为 $(89.7\pm 3.1)\%$, 较GST组增加38.7%($P<0.05$), 而GST组与空白组之间差异无显著性($P>0.05$), 见图3。提示外源性S100A6促进MCF-7细胞的克隆形成。

2.4 hS100A6抑制MCF-7细胞的凋亡

Hoechst染色显示, 蛋白作用于MCF-7细胞24 h后, GST组细胞凋亡率为 $(8.6\pm 0.4)\%$, GST-hS100A6组为 $(2.7\pm 0.4)\%$, 较GST组凋亡减少67.8%($P<0.05$), 48 h后GST组细胞凋亡率增加至 $(10.1\pm 0.6)\%$, GST-hS100A6组增加至 $(4.2\pm 0.6)\%$, 但仍较GST组凋亡减少58.4%($P<0.05$), 各时间点GST组凋亡率与空白组无差异($P>0.05$), 见图4, 提示外源性S100A6有抑制MCF-7细胞凋亡的作用。

2.5 hS100A6促进MCF-7细胞的迁移

划痕愈合实验显示, 蛋白处理24 h后, GST组划痕愈合率为 $(44.4\pm 13.9)\%$, GST-hS100A6组划痕愈合率为 $(98.0\pm 2.0)\%$, 为GST组愈合率的2.2倍($P<0.05$), GST组与空白组之间的差异无统计学意义($P>0.05$),

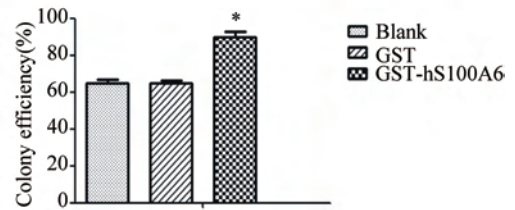
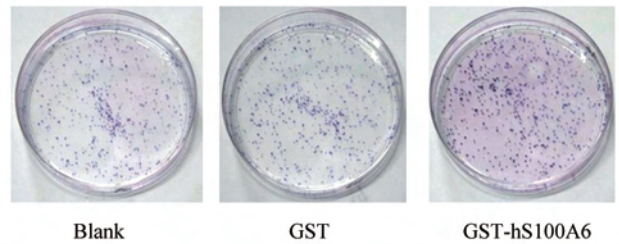


与GST组对照, $*P<0.05$ 。

$*P<0.05$ compared with GST group.

图2 不同浓度GST-hS100A6对MCF-7增殖的影响

Fig.2 The effect of GST-hS100A6 at different concentrations on the proliferation

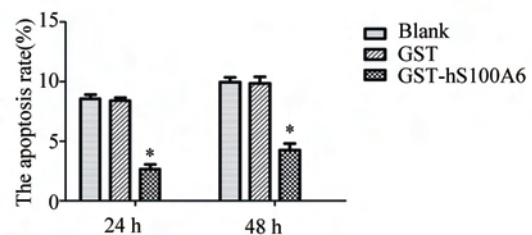
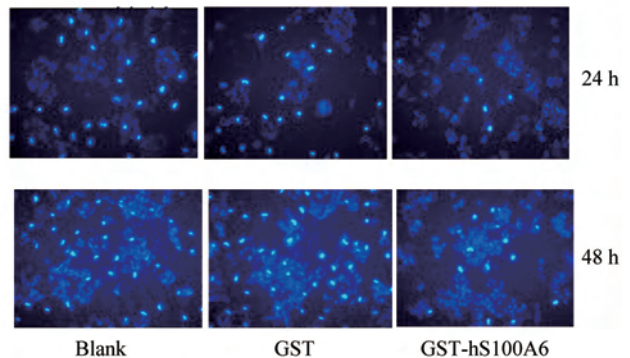


与GST组对照, $*P<0.05$ 。

$*P<0.05$ compared with GST group.

图3 GST-hS100A6对MCF-7克隆形成的影响

Fig.3 The effect of GST-hS100A6 on the colony formation of MCF-7



与GST组对照, $*P<0.05$ 。

$*P<0.05$ compared with GST group.

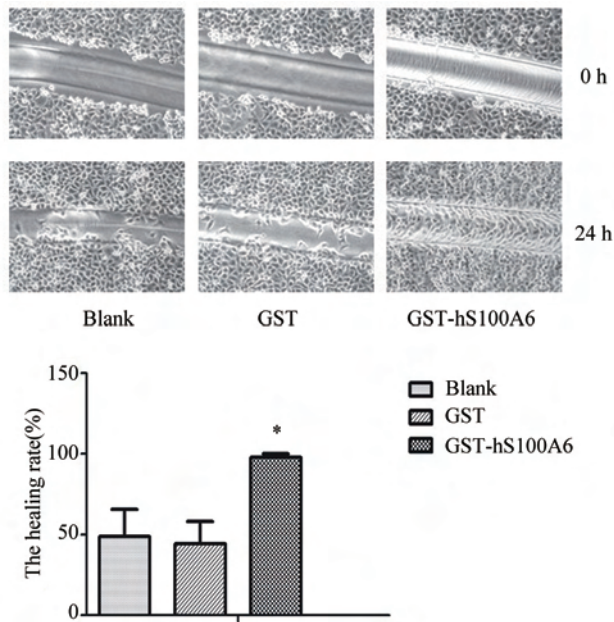
图4 GST-hS100A6对MCF-7细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of GST-hS100A6 on the apoptosis of MCF-7

见图5, 提示外源性S100A6能够促进MCF-7细胞的迁移。

2.6 hS100A6促进MCF-7细胞的侵袭

Transwell侵袭实验结果显示蛋白处理24 h后, GST组穿膜细胞数为 22 ± 3 , GST-hS100A6组穿膜细



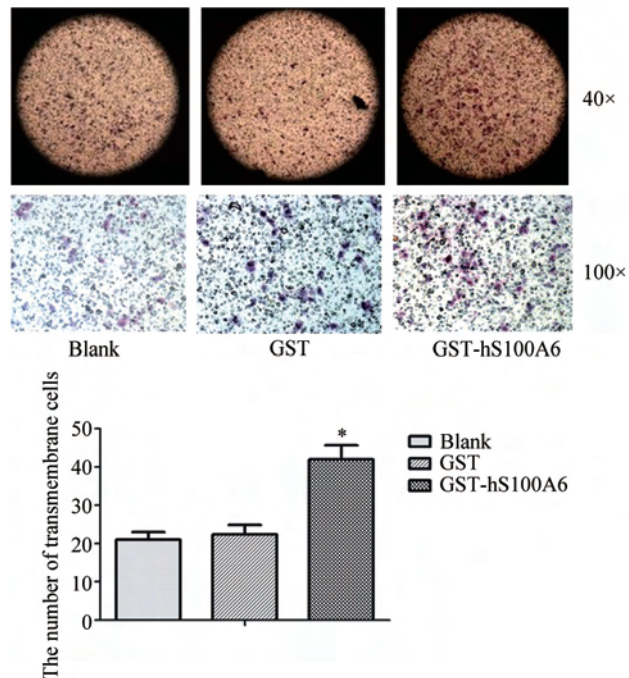
与GST组对照, * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ compared with GST group.

图5 GST-hS100A6对MCF-7细胞迁移的影响

Fig.5 The effect of GST-hS100A6 on the migration of MCF-7

胞数为 42 ± 3 , 较GST组增加88.1% ($P < 0.05$), 而GST组与空白组之间差异无显著性 ($P > 0.05$), 见图6, 提示外源性S100A6能够促进MCF-7细胞的侵袭。



与GST组对照, * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ compared with GST group.

图6 GST-hS100A6对MCF-7细胞侵袭的影响

Fig.6 The effect of GST-hS100A6 on the invasion of MCF-7

3 讨论

S100A6最初由Kuznicki等^[5]在Ehrlich腹水瘤中检出。它在细胞内广泛分布, 主要存在于胞质、胞膜以及核被膜上, 包括核膜的内表面。S100A6蛋白相对分子质量为10.235 kDa, 其活性形式是同源二聚体, 与钙离子结合后暴露出EF手型经典区, 该区可与多种靶蛋白结合, 如钙调结合蛋白、原肌球蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、膜联蛋白II、膜联蛋白VI、膜联蛋白XI(又称为CAP-50)和钙周期蛋白结合蛋白(Calcyclin binding protein, CacyBP)等^[6-7]。

目前, S100A6与肿瘤的关系报道不一。有其抑制肿瘤发生发展的报道, 例如: Luu等^[8]发现高表达的S100A6能限制肿瘤的转移, 并抑制肿瘤细胞的生长, 高表达S100A6的骨肉瘤患者其生存时间远比低表达S100A6的生存时间长。本课题组前期实验也发现, S100A6能够抑制骨肉瘤细胞U2OS的增殖并促进其凋亡^[9], 提示S100A6对骨肉瘤有抑制作用。也有其促进肿瘤发生发展的报道, 例如: Maelandsmo等^[10]研究发现S100A6的高表达与黑色素瘤细胞的转移能力呈正相关, 并与患者存活期相关, 低表达者存活时间长于高表达者; Wang等^[11]发现与胃癌的癌旁组织相比, 67.5%的癌组织有S100A6表达的增加, 且S100A6表达与临床病理学分型及不良预后相关; 同样, Ishii等^[12]研究92例肺癌患者的免疫组化结果也发现, 在肺腺癌组织中均有胞核及胞浆的S100A6表达, 且晚期肺腺癌的胞浆S100A6表达明显高于非侵袭性癌及正常肺组织。

但是, S100A6与乳腺癌发生发展的关系目前报道较少。Melinda等^[13]用基质辅助激光解析及激光捕获显微切割分析发现侵袭性乳腺癌中有三个特异峰异于正常乳腺组织, 其中之一是S100A6, 而Carlsson等^[14]用基因表达连续分析则发现乳腺癌中S100A6表达下调。然而, 关于S100A6对于乳腺癌的具体作用及机制目前尚无报道。

本实验选择pGEX系列表达载体原核表达重组蛋白GST-hS100A6来研究其对入乳腺癌细胞MCF-7的作用。结果发现, S100A6能够促进乳腺癌细胞的增殖, 同时Hoechst实验表明其还能够抑制乳腺癌细胞的凋亡, 这可能是其促进乳腺癌细胞增殖的机制之一; 克隆形成率可以反映细胞群体依赖性和增殖能力两个重要性状, 本课题研究发现S100A6可提高乳腺癌细胞的克隆形成率, 提示S100A6可能促进乳

腺癌的发展。

Ilg等^[3]报道S100A6多聚集于肿瘤边缘,提示其可能参与肿瘤的迁移和侵袭。本课题的划痕愈合及Transwell侵袭实验结果与之相吻合,即S100A6增强乳腺癌细胞的迁移及侵袭能力,提示S100A6可能参与了乳腺癌的转移过程。

S100A6是一种分泌性蛋白,其不仅存在于细胞内,还存在于细胞外如胰液、羊水及细胞培养液中^[15]。近来研究发现胞外的S100A6可能通过与高度聚糖化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)结合从而将其导入胞内起生物学作用^[16]。外源性S100A6对于乳腺癌细胞的作用是否也是通过此途径有待进一步证实。

综上所述, S100A6对乳腺癌细胞MCF-7的生物学行为有促进作用,提示S100A6可能参与乳腺癌的发生发展,并且有可能成为乳腺癌分子诊断的标志物和治疗的新靶标。

参考文献(References)

- 1 Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 540-51.
- 2 Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia J* 2008; 12(4):198-204.
- 3 Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 1996; 68(3): 325-32.
- 4 苗静琨, 赖天霞, 左国伟, 李星星, 王 嫣, 蒋 薇, 等. 人S100A6-GST融合蛋白的原核表达和纯化. *重庆医科大学学报* 2007; 32(10): 1009-13.
- 5 Kuznicki J, Filipek A. Purification and properties of a novel Ca²⁺-binding protein (10.5 kDa) from Ehrlich-ascitestumour cells. *Biochem J* 1987; 247: 663-7.
- 6 Zeng FY, Gerke V, Gabins HJ. Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calyculin-binding proteins in bovine heart. *Int Biochem Cell Biol* 1993; 25(7): 1019-27.
- 7 Nowotny M, Spiechowicz M, Jastrzebska B, Filipek A, Kitagawa K, Kuznicki J. Calcium-regulated interaction of Sglt with S100A6 (calyculin) and other S100 proteins. *J Biol Chem* 2003; 278(29): 26923-8.
- 8 Luu HH, Zhou L, Haydon RC, Deyrup AT, Montag AG, Huo D, *et al.* Increased expression of S100A6 is associated with decreased metastasis and inhibition of cell migration and anorage independent growth in human osteosarcoma. *Cancer Lett* 2005; 229(1): 135-48.
- 9 陈英华, 卫 佳, 李星星, 吴丽美, 马 闻, 张 彦, 等. 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. *重庆医科大学学报* 2009; 34(7): 817-21.
- 10 Maelandsmo GM, Flørenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 464-9.
- 11 Wang XH, Zhang LH, Zhong XY, Xing XF, Liu YQ, Niu ZJ, *et al.* S100A6 overexpression is associated with poor prognosis and is epigenetically up-regulated in gastric cancer. *Am J Pathol* 2010; 177(2): 586-97.
- 12 Ishii A, Suzuki M, Satomi K, Kobayashi H, Sakashita S, Kano J, *et al.* Increased cytoplasmic S100A6 expression is associated with pulmonary adenocarcinoma progression. *Pathol Int* 2009; 59(9): 623-30.
- 13 Sanders ME, Dias EC, Xu BJ, Mobley JA, Billheimer D, Roder H, *et al.* Differentiating proteomic biomarkers in breast cancer by laser capture microdissection and MALDI MS. *J Proteome Res* 2008; 7(4): 1500-7.
- 14 Carlsson H, Petersson S, Enerbäck C. Cluster analysis of S100 gene expression and genes correlating to psoriasis (S100A7) expression at different stages of breast cancer development. *Int J Oncol* 2005; 27(6): 1473-81.
- 15 Leśniak W, Słomnicki LP, Filipek A. S100A6-new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(4): 1087-92.
- 16 Leclerc E, Fritz G, Weibel M, Heizmann CW, Galichet A. 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: 31317-31.

Recombinant Human S100A6 Promotes the Proliferation, Migration and Invasion but Inhibits the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7

You Li, Xu Lanlan, Guo Yuanyuan, Sun Shuangshuang, Zou Zhengyu, Li Yuye,
Luo Jinyong, He Tongchuan, Zhou Lan*

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Department of Medical Laboratory, Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To aim at effects of human S100A6 on proliferation, apoptosis, migration and invasion of human breast cancer cell line MCF-7, recombinant protein GST-hS100A6 was purified from bacteria BL21 that identified as 36 kDa by SDS-PAGE and recognized by S100A6 antibody with Western blot. MCF-7 were treated by GST-hS100A6 with different concentrations while GST as a control group. MTT was used to detect the cell proliferation. Results showed that after 48 h, the D_{492} value of 100 $\mu\text{g/mL}$ and 300 $\mu\text{g/mL}$ group of GST-hS100A6 increased by 29.1% and 84.6% compared with GST group, respectively ($P < 0.05$). Colony-forming assay showed that the ability of colony formation of GST-hS100A6 increased by 38.7% compared with GST group ($P < 0.05$). Hoechst staining showed that cell apoptosis rate of GST-hS100A6 group decreased by 67.8% compared with GST group at 24 h ($P < 0.05$) and decreased by 58.4% at 48 h ($P < 0.05$). Results of wound healing assay indicated that the healing rate of GST-hS100A6 group was 2.2 times of GST group ($P < 0.05$) at 24 h. Transwell invasion assay showed that the transmembrane cell number of GST-hS100A6 group increased by 88.1% ($P < 0.05$) compared with GST group at 24 h. To sum up, S100A6 could promote cell proliferation, colony formation, migration, and invasion, but inhibit cell apoptosis on human breast cancer cell line MCF-7, indicates that S100A6 has a promoting effect on human breast cancer which would be a new molecular target for treatment of human breast cancer.

Key words S100A6; breast cancer; proliferation; apoptosis; migration; invasion

Received: January 11, 2011 Accepted: March 23, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30772548)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485239, E-mail: zhoulan0111@gmail.com