

S100A6 在胶质瘤组织中表达及对 U87 细胞增殖和侵袭力的影响

马 建, 付旭东, 周少龙, 孟恩平, 刘菲菲, 杨 卓

(郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要: [目的] 探讨 S100A6 在胶质瘤组织中表达及对 U87 细胞增殖和侵袭力的影响。 [方法] 选取 2017 年 3 月至 2019 年 3 月在郑州大学第五附属医院择期行手术治疗的胶质瘤患者 105 例, 利用实时荧光定量 PCR 技术检测胶质瘤和癌旁组织中 S100A6 基因表达, 培养人胶质瘤 U87 细胞, 根据转染物的不同将细胞分为 siRNA-S100A6 组、siRNA-对照序列组和空白对照组, 利用实时荧光定量 PCR 技术和 Western blot 技术检测细胞中 S100A6 基因和蛋白表达, MTT 法检测细胞增殖能力, 划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 小室检测细胞侵袭能力。 [结果] 胶质瘤组织中 S100A6 mRNA 相对表达量为 1.95 ± 0.16 , 癌旁组织中 S100A6 mRNA 相对表达量为 1.33 ± 0.13 , 两组差异有统计学意义 ($t=30.776, P<0.001$)。与 WHO 分级 I~II 级相比, III~IV 级中 S100A6 mRNA 表达量显著性升高 ($P<0.001$)。与空白对照组和 siRNA-对照序列组相比, siRNA-S100A6 组细胞中 S100A6 mRNA 和蛋白表达量均降低 (P 均 <0.001), 24h、48h、72h 和 96h 细胞增殖活性被抑制 ($P<0.05$), 划痕愈合率降低 ($P<0.001$), 且侵袭细胞数显著性减少 ($P<0.001$)。 [结论] S100A6 在胶质瘤组织中呈高表达, 且与胶质瘤恶性程度有关, 特异性沉默 U87 细胞中 S100A6 基因表达可有效抑制细胞增殖, 降低细胞迁移和侵袭能力。

关键词: 胶质瘤; S100A6; 小分子 RNA 干扰; 迁移; 侵袭

中图分类号: R739.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)09-0798-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.09.B007

Expression of S100A6 in Glioma Tissue and Its Effect on Proliferation and Invasion of U87 Cells

MA Jian, FU Xu-dong, ZHOU Shao-long, MENG En-ping, LIU Fei-fei, YANG Zhuo

(The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of S100A6 in glioma tissue and its effect on the biological characteristics of U87 cells. [Methods] 105 cases of patients with glioma undergoing elective surgery treatment were selected from March 2017 to March 2019 in the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University. The expressions of S100A6 genes in gliomas tissues and adjacent tissues were detected by using real-time fluorescence quantitative PCR. The human glioma U87 cells were cultured. According to the different transfectants, the cells were divided into siRNA-S100A6 group, siRNA-control sequence group and blank control group. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect the expressions of S100A6 gene and protein. MTT assay was used to detect cell proliferation. Scaling experiment was performed to detect cell migration ability and Transwell chamber was used to detect cell invasion. [Results] The relative expression level of S100A6 mRNA in the glioma tissues was 1.95 ± 0.16 , while in the adjacent tissues was 1.33 ± 0.13 , the difference was statistically significant ($t=30.776, P<0.001$). Compared with WHO grade I~II, the expression level of S100A6 mRNA in grade III~IV was significantly increased ($P<0.001$). Compared with the blank control group and the siRNA-control sequence group, the expression levels of S100A6 mRNA and protein in siRNA-S100A6 group were decreased (all $P<0.001$). Cell proliferation activities at 24h, 48h, 72h and 96h were inhibited ($P<0.05$), the wound healing rate was decreased ($P<0.001$), and the number of invasive cells was significantly reduced ($P<0.05$). [Conclusion] S100A6 is highly expressed in glioma tissues, and was related to the degree of glioma malignancy. Specific silencing of S100A6 gene expression in U87 cells could effectively inhibit cell proliferation and reduce cell migration and invasion.

Subject words: glioma; S100A6; small interference RNA; cell proliferation; cell invasion

胶质瘤作为中枢神经系统常见肿瘤, 具有进展

快、侵袭力强、术后易复发等特点^[1], 临床上仍以手术切除为主, 辅以放疗治疗, 但患者总体生存率依然较低^[2]。研究表明胶质瘤细胞高侵袭力是影响患者预后的主要因素^[3]。因此, 积极探讨影响胶质瘤细

基金项目: 河南省自然科学基金(182300410379)

通信作者: 付旭东, 主任医师, 博士; 郑州大学第五附属医院神经外科, 河南省郑州市二七区康复前街 3 号 (450052); E-mail: fxd1064@126.com

收稿日期: 2019-04-16; 修回日期: 2019-06-18

胞侵袭性的基因对于该肿瘤靶向治疗及改善预后具有重要意义。S100 钙结合蛋白 A6 (S100 calcium-binding protein A6, S100A6) 作为 S100 蛋白超家族重要成员,在与其靶蛋白结合后在细胞分化、细胞周期等多种生物学功能中发挥重要作用^[4]。近年来研究发现 S100A6 在恶性肿瘤组织中表达异常,且与肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭转移过程有关^[5-6]。本研究拟分析 S100A6 在胶质瘤组织中表达,并利用小分子 RNA 干扰技术 (small interference RNA, siRNA) 特异性干扰胶质瘤 U87 细胞中 S100A6 基因,观察其对细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响,为胶质瘤高侵袭力机制研究提供参考资料。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2017 年 3 月至 2019 年 3 月在我院择期行手术治疗的胶质瘤患者 105 例,术前均未接受放疗治疗,术后均经病理学检查确诊,其中,男性 61 例,女性 44 例,年龄 16~75 岁,中位年龄 48 岁。根据 2010 年 WHO 关于中枢神经系统肿瘤分类标准分为:Ⅰ级 5 例,Ⅱ级 44 例,Ⅲ级 34 例,Ⅳ级 22 例。所有患者均于术中留取胶质瘤组织,以及距离瘤灶边缘>2cm 的正常组织,迅速置于液氮中,保存于-80℃冰箱以备检。本研究通过医院伦理委员会批准,患者均知情同意。

1.2 主要试剂和设备

人胶质瘤 U87 细胞购自美国 ATCC 公司,胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,Trizol 总 RNA 提取试剂盒、Lipfectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 S100A6 多克隆抗体购自上海斯信生物科技有限公司,逆转录和 PCR 扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,S100A6 及内参引物由上海生工生物公司设计合成,siRNA-S100A6 和 siRNA-对照序列由上海美轩生物科技有限公司设计合成,MTT 细胞增殖试剂盒购自上海嵎崑达实业有限公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,凝胶电泳成像系统购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测胶质瘤和癌旁组织中 S100A6 基因表达

取胶质瘤和癌旁组织,研磨后加入细胞裂解液,

用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取细胞中总 RNA,用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度和浓度,以 A280/A260 在 1.80~2.30 为合格。用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成模板链 cDNA,取 cDNA 作为模板进行 PCR。引物序列:S100S6 引物:上游:5'-GGGGA-GACTCGTCACCAGGC-3',下游:5'-GGTCCAAGTC-TTCCATCAGCCT-3', β -actin 引物:上游:5'-AAATC-TGGCACCACACCTTC-3',下游:5'-GGGGTGTGAA-GGTCTCAAA-3'。PCR 反应条件:95℃ 5min,92℃ 30s,92℃ 30s,58℃ 30s,76℃ 30s,连续进行 38 次循环,每个样品均设 3 个平行反应复孔。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算胶质瘤和癌旁组织中 S100A6 基因相对表达量。

1.4 细胞分组及转染处理

取 U87 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于含 5%CO₂ 37℃ 恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞,胰酶消化,重悬后接种于 6 孔板中,继续恒温培养,待细胞融合度达到 70% 以上时,利用 Lipfectamine 2000 转染试剂盒分别进行转染:①siRNA-S100A6 组:转染 S100A6 干扰序列:5'-AGAAGGAGCUCACCAUUGG-3';②siRNA-对照序列组:转染对照序列:5'-GGACGCAUCCUUCU-UAA-3';③空白对照组:不作任何处理。各组转染后继续恒温培养 48h,完成后续实验操作。

1.5 qRT-PCR 检测细胞中 S100A6 基因表达

取各组转染后培养 48h 细胞,加入细胞裂解液,其余步骤同 1.2.1。

1.6 蛋白质印迹检测细胞中 S100A6 蛋白表达

取各组转染后培养 48h 细胞,加入细胞裂解液,提取总蛋白。用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白纯度和浓度。取 50 μ g 总蛋白,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至 PVDF 膜上,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 60min, PBST 冲洗 3 次,将一抗兔抗人 S100A6 多克隆抗体(稀释比例 1:1500)加入,4℃ 条件下过夜孵育, PBST 冲洗 3 次,将二抗加入,室温下孵育 120min,用 PBST 冲洗 3 次,加入超敏化学发光液,避光显色 20min,曝光、拍照,利用 Image J 图像分析软件对各条带灰度值进行分析,获得各组细胞中 S100A6 蛋白相对表达量。

1.7 MTT 法检测细胞增殖能力

取各组转染后细胞,胰酶消化,接种于 96 孔板,调整细胞密度为 2×10^3 个/孔,继续恒温培养,分别

于培养 12、24、48、72 和 96h 时, 分别加入 MTT 液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 4h, 弃上清, 将二甲基亚砜 150 μ l 加入, 待沉淀完全溶解, 利用酶标仪取 490nm 波长处对各孔吸光度 A 值进行检测。重复实验 3 次。

1.8 划痕实验检测细胞迁移能力

取各组转染后培养 48h 细胞, 胰酶消化, 接种于 6 孔板, 调整细胞密度 1×10^6 个/ml, 待细胞生长覆盖板底 80% 以上时, 用 20 μ l 加样枪头进行划痕, 用 PBS 将悬浮细胞除去, 分别于 0h 和 24h 时观察细胞在同一划痕处迁移情况, 利用 Image J 软件分析细胞划痕愈合率 = $(1 - 24h \text{ 划痕面积} / 0h \text{ 划痕面积}) \times 100\%$ 。重复实验 3 次。

1.9 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

取各组转染后培养 48h 细胞, 胰酶消化, 重悬细胞, 调整细胞密度为 2.0×10^6 个/ml, 取 100 μ l 细胞悬液加入 Transwell 小室上室, 将 600 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液加入下室, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中恒温培养 24h。取出小室, 多聚甲醛固定 25min, 结晶紫染色 15min, 将多余细胞用棉签去除, PBS 冲洗后, 用倒置显微镜观察, 并随机取 10 个高倍视野计数穿膜细胞数, 取均值。重复实验 3 次。

1.10 统计学处理

利用 SPSS 21.0 统计分析软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 S100A6 在胶质瘤和癌旁组织中表达

qRT-PCR 检测结果显示胶质瘤组织和癌旁组织中 S100A6 mRNA 表达量分别为 1.95 ± 0.16 和 1.33 ± 0.13 , 与癌旁组织相比, S100A6 mRNA 在胶质瘤组织中的表达量显著性升高 ($t = 30.776, P < 0.001$)。

2.2 S100A6 在胶质瘤组织中表达及其与临床病理特征之间的关系

胶质瘤组织中 S100A6 mRNA 表达量与性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤大小无关 ($P = 0.178, 0.103, 0.254$ 和 0.208); 与 WHO 分级 I ~ II 级相比, III ~ IV 级中表达量显著性升高 ($P < 0.001$) (Table 1)。

2.3 细胞中 S100A6 mRNA 和蛋白表达

在 U86 细胞中分别转染 siRNA-S100A6、siRNA-对照序列和不作任何处理, 48h 后检测细胞中 S100A6 mRNA 和蛋白表达。与空白对照组和 siRNA-对照序列组相比, siRNA-S100A6 组细胞中 S100A6 mRNA 和蛋白表达量均降低 (P 均 < 0.001) (Table 2, Figure 1)。

2.4 细胞增殖活性比较

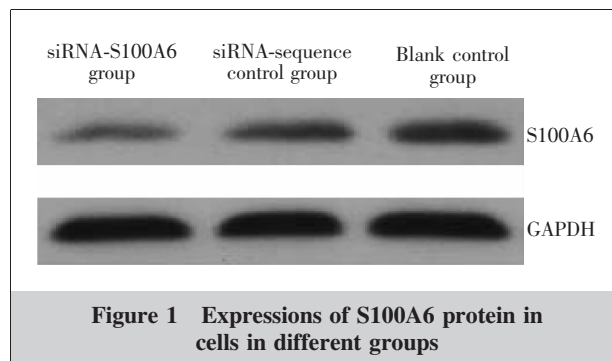
在 U86 细胞中分别转染 siRNA-S100A6、siRNA-对照序列和不作任何处理, 分别于 12、24、48、72 和 96h 时检测细胞增殖活性。与空白对照组和 siRNA-

Table 1 Relationship between S100A6 gene expression and clinicopathological features in glioma tissues

Indicator	N	S100A6 mRNA	t	P
Gender				
Male	61	1.93 ± 0.14	1.356	0.178
Female	44	1.97 ± 0.17		
Age (years old)				
≥ 48	59	1.98 ± 0.15	1.643	0.103
< 48	46	1.94 ± 0.12		
Tumor location				
Supratentorial area	90	1.98 ± 0.17	1.147	0.254
Subsegmental area	15	1.93 ± 0.13		
Tumor size (cm)				
> 5	36	1.93 ± 0.15	1.268	0.208
≤ 5	69	1.97 ± 0.18		
WHO classification				
I ~ II	49	1.69 ± 0.18	21.635	< 0.001
III ~ IV	56	2.37 ± 0.14		

Table 2 Expressions of S100A6 mRNA and proteins in cells

Groups	S100A6 mRNA	S100A6 protein
siRNA-S100A6 group	1.16 ± 0.07	0.20 ± 0.06
siRNA-sequence control group	2.80 ± 0.18	0.83 ± 0.11
Blank control group	2.96 ± 0.17	0.85 ± 0.07
F	275.070	126.784
P	< 0.001	< 0.001



对照序列组相比,24h 时 siRNA-S100A6 组细胞增殖活性被明显抑制($P=0.020$),且随着时间延长,细胞增殖活性抑制更为明显($P<0.001$)(Figure 2)。

2.5 细胞迁移能力比较

在 U86 细胞中分别转染 siRNA-S100A6、siRNA-对照序列和不作任何处理,转染 24h 后划痕实验结果显示,siRNA-S100A6 组、siRNA-对照序列组和空白对照组细胞的划痕愈合率分别为 $13.11\% \pm 1.77\%$ 、 $40.36\% \pm 1.28\%$ 和 $40.88\% \pm 1.80\%$,siRNA-S100A6 组 24h 时划痕愈合率明显低于 siRNA-对照序列组和空白对照组($P<0.001$)(Figure 3)。

2.6 细胞侵袭能力比较

Transwell 实验结果显示,siRNA-S100A6 组、siRNA-对照序列组和空白对照组侵袭细胞数分别为 (106.28 ± 6.54) 个、 (137.89 ± 8.11) 个和 (141.15 ± 4.29) 个,与 siRNA-对照序列组和空白对照组相比,siRNA-S100A6 组侵袭细胞数显著性减少($P<0.001$)(Figure 4)。

3 讨论

虽然诊疗技术不断进步,但胶质瘤患者预后依然不理想,中位生存期不超过 14 个月^[7]。研究表明胶质瘤细胞在颅内播散性生长与其预后较差密切相关^[8-9]。S100 蛋白家族作为一类钙离子依赖性的低分子量蛋白,可通过调控其他蛋白表达或与靶蛋白结合而在多种生物学功能中发挥重要作用^[10-11]。S100A6 作为 S100 蛋白家族重要成员,定位于人染色体 1q21 的 250~350kb 之间,与原癌基因 ski 比邻^[12],在调控细胞周期及分化中发挥重要作用,参与了肿瘤细胞增殖、凋亡、浸润及转移过程^[13-14],在结直肠癌^[15]、肺癌^[16]、胰腺癌^[17]、胆管细胞癌^[18]等多种恶性肿瘤组织中呈高

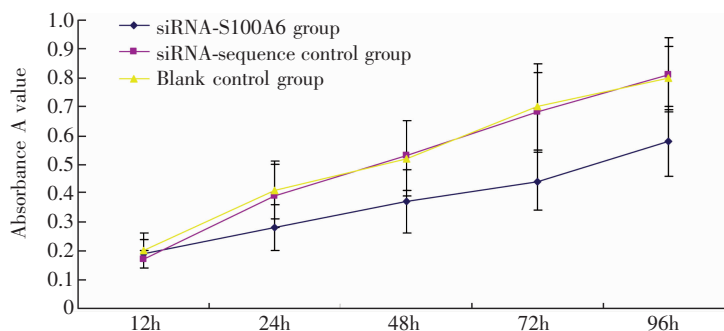


Figure 2 The effect of S100A6 on cell proliferation in U87 cells

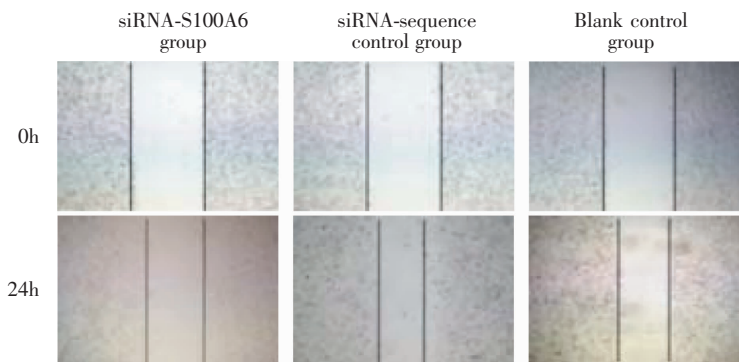


Figure 3 The results of scratch test of U87 cell migration in each group($\times 200$)

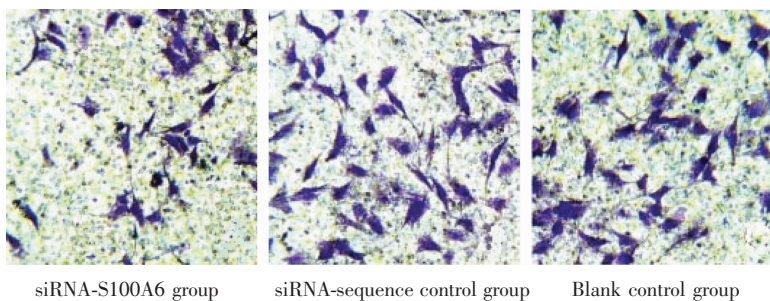


Figure 4 The results of Transwell of U87 cells in each group (Crystal violet staining $\times 200$)

表达。本研究结果显示,胶质瘤组织中 S100A6 mRNA 相对表达量高于癌旁组织,说明 S100A6 在胶质瘤组织中呈高表达。在与临床病理特征之间的关系分析发现,胶质瘤组织中 S100A6 表达与 WHO 分级有关,I~II 级组织中表达低于 III~IV 级,说明 S100A6 在胶质瘤组织中表达与肿瘤级别有关,而胶质瘤级别越高则预示其恶性程度越高,提示胶质瘤组织中 S100A6 表达与胶质瘤恶性程度有关,胶质瘤恶性程度越高,S100A6 表达越高,进一步提示 S100A6 可能参与了胶质瘤恶性过程。

为进一步探讨 S100A6 与胶质瘤生物学特征之间的关系,本研究利用 siRNA 技术特异性沉默胶质瘤 U87 细胞中 S100A6 基因,结果显示,siRNA-S100A6 组细胞中 S100A6 mRNA 和蛋白相对表达量均低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,提示 siRNA-S100A6 组细胞中 S100A6 基因被成功抑制。有研究指出,S100A6 在与其靶蛋白结合后可通过调控相关通路而加速细胞增殖^[19-20]。本研究 MTT 实验结果显示,siRNA-S100A6 组细胞 24h、48h、72h 和 96h 吸光度 A 值均降低,说明特异性沉默 S100A6 基因后,细胞增殖能力被显著性抑制,提示 S100A6 与胶质瘤 U87 细胞增殖能力密切相关。本研究迁移实验结果显示,siRNA-S100A6 组 24h 时划痕愈合率低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,说明在抑制 S100A6 基因表达后,细胞迁移能力被抑制,提示 S100A6 可能参与了 U87 细胞迁移过程。本研究 Transwell 实验结果显示,siRNA-S100A6 组侵袭细胞数显著性低于 siRNA-对照序列组和空白对照组,说明沉默 S100A6 基因后,U87 细胞侵袭能力被抑制,提示 S100A6 可能参与了胶质瘤细胞侵袭过程。

综上所述,S100A6 在胶质瘤组织中呈高表达,且与胶质瘤恶性程度有关,特异性沉默胶质瘤细胞中 S100A6 基因可有效抑制细胞增殖,降低细胞迁移和侵袭能力,有望为胶质瘤的治疗提供新的途径和靶点。

参考文献:

- [1] Garcia-Garcia S, Aldecoa I, Caral LA, et al. Management in chordoid glioma: avoiding the pitfalls in this rare and challenging entity[J]. *Neurol India*, 2017, 65(4): 808-813.
- [2] Chan DT, Hsieh SY, Lau CK, et al. Ten-year review of survival and management of malignant glioma in Hong Kong[J]. *Hong Kong Med J*, 2017, 23(2): 134-139.
- [3] Shan Y, He X, Song W, et al. Role of IL-6 in the invasiveness and prognosis of glioma[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6): 9114-9120.
- [4] Donato R, Sorci G, Giambanco I. S100A6 protein: functional roles[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(15): 2749-2760.
- [5] Zhang J, Zhang K, Jiang X, et al. S100A6 as a potential serum prognostic biomarker and therapeutic target in gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(9): 2136-2144.
- [6] Donato R, Sorci G, Giambanco I. S100A6 protein: functional roles[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(15): 2749-2760.
- [7] Xue Z, Li DL, Li GL, et al. Prognosis factor analysis of cranial multicentric gliomas[J]. *Chin J Neurosurg*, 2017, 33(3): 234-238. [薛湛, 李德岭, 李桂林, 等. 影响多中心脑胶质瘤患者预后的因素分析[J]. *中华神经外科杂志*, 2017, 33(3): 234-238.]
- [8] Nakamura S, Ochiai K, Abe A, et al. Astrocytic growth through the autocrine/paracrine production of IL-1 β in the early infectious phase of fowl glioma-inducing virus[J]. *Avian Pathol*, 2014, 43(5): 437-442.
- [9] Li C, Liu H, Yang J, et al. Long noncoding RNA LINC00511 induced by SP1 accelerates the glioma progression through targeting miR-124-3p/CCND2 axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 4386-4394.
- [10] Shi L, Qiao XJ, Li YX. Correlation between calcium-binding proteins S100 family members and tumors [J]. *Modern Oncology*, 2013, 21(11): 2625-2628. [石琳, 乔晓娟, 李云霞. 钙结合蛋白 S100 家族成员与肿瘤的关系[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(11): 2625-2628.]
- [11] Bresnick AR. S100 proteins as therapeutic targets[J]. *Bio-phys Rev*, 2018, 10(6): 1617-1629.
- [12] Imbalzano E, Mandraffino G, Casciaro M, et al. Pathophysiological mechanism and therapeutic role of S100 proteins in cardiac failure: a systematic review [J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(5): 463-473.
- [13] Li A, Gu Y, Li X, et al. S100A6 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5685-5693.
- [14] Wang XH, Du H, Li L, et al. Increased expression of S100A6 promotes cell proliferation in gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 222-230.
- [15] Duan L, Wu R, Zou Z, et al. S100A6 stimulates proliferation and migration of colorectal carcinoma cells through activation of the MAPK pathways[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(3): 781-790.
- [16] Wang T, Liang Y, Thakur A, et al. Diagnostic significance of S100A2 and S100A6 levels in sera of patients with non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(2): 2299-2304.
- [17] Chen X, Liu X, Lang H, et al. S100 calcium-binding protein A6 promotes epithelial-mesenchymal transition through β -catenin in pancreatic cancer cell line [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121319.
- [18] Li FR, Niu FY, Li H. Relative levels of S100A6 mRNA and its protein expression in tumorous tissues of patients with cholangiocarcinoma [J]. *J Prac Hepatol*, 2018, 21(4): 541-544. [李福荣, 牛福勇, 李华. 胆管细胞癌组织 S100A6 mRNA 及其蛋白表达变化[J]. *实用肝脏病杂志*, 2018, 21(4): 541-544.]
- [19] Shimamoto S, Tsuchiya M, Yamaguchi F, et al. Ca²⁺/S100 proteins inhibit the interaction of FKBP38 with Bcl-2 and Hsp90[J]. *Biochem J*, 2014, 458(1): 141-152.
- [20] Peng Y, Lin J, Ma J, et al. Upregulation of S100A6 in patients with endometriosis and its role in ectopic endometrial stromal cells [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2018, 34(9): 815-820.