

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.04.002

文章编号: 1005-8982(2016)04-0005-06

论著

S100A4 真核表达载体构建及对鼻咽癌细胞侵袭转移的影响*

江青山, 谭俞佳, 邓珊

(南华大学附属第一医院 耳鼻喉科, 湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 构建 S100A4 稳定高表达的鼻咽癌细胞株, 研究 S100A4 与鼻咽癌侵袭转移关系。方法 PCR 方法扩增 S100A4 片段, 将产物插入 pCMV 载体, 将重组质粒及其空白质粒分别转染到鼻咽癌细胞 CNE2; MTT 法绘制细胞生长曲线, Western blot 检测 S100A4、E-cadherin、Fibronectin、基质金属蛋白酶 2(MMP2)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)的表达; Transwell 实验检测细胞侵袭转移能力变化。结果 成功构建了 S100A4 稳定高表达的重组细胞株; 细胞生长曲线表明 S100A4 稳定高表达的重组细胞株生长较快; S100A4 稳定高表达的重组细胞株中 E-cadherin、Fibronectin 低表达而 MMP2、MMP9 高表达; Transwell 实验发现 S100A4 稳定高表达的重组细胞株的侵袭细胞计数明显高于空白载体转染组和未转染组($P > 0.01$)。结论 S100A4 能调控鼻咽癌上皮-间质转化(EMT)过程, 并上调 MMP2、MMP9 表达而促进鼻咽癌细胞侵袭和转移。

关键词: 鼻咽肿瘤; S100A4; 上皮-间质转化; 基质金属蛋白酶; 侵袭转移

中图分类号: R739.63; R392.31

文献标识码: A

Establishment of S100A4 eukaryotic expression vector and the effects to metastasis and invasion of NPC*

Qing-shan Jiang, Yu-jia Tan, Shan Deng

(Department of ENT, Clinical Research Institute, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To build a stable cell line with S100A4 high expression and study the relationship between S100A4 and metastasis and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC). Methods To amplify the fragment of S100A4 by PCR method, and PCR products were inserted into pCMV vector. The reconstructed pCMV-S100A4 vector and empty vector were transferred into CNE2 cell line. Then the growth curve were drawn by MTT method. The expression of S100A4, E-cadherin, Fibronectin, MMP2 (matrix metalloproteinase 2) and MMP9 (matrix metalloproteinase 9) were detected by Western blot. And the changes of ability of metastasis and invasion were examined by Transwell. Results Succeed to build a stable cell line with S100A4 high expression; The grow curves showed that the growth speed were more quickly in pCMV-S100A4-CNE2 than in pCMV-empty-CNE2 and CNE2. Western blot results showed that there were low expression of E-cadherin, Fibronectin and high expression of MMP2, MMP9 in pCMV-S100A4-CNE2 than in pCMV-empty-CNE2 and CNE2. Transwell results showed that there were more invaded cells in pCMV-S100A4-CNE2 than in pCMV-empty-CNE2 and CNE2 ($P < 0.01$). Conclusions S100A4 can regulate the process of EMT in NPC and upregulate the expression of MMP2 and MMP9 to promote the metastasis and invasion of NPC cells.

Keywords: NPC; S100A4; EMT; MMP; invasion and metastasis

收稿日期: 2015-09-30

* 基金项目: 湖南省科技厅资助项目(No.2012SK3159)

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)发病具有地域特点,我国南方地区是鼻咽癌的高发区域,其发病部位比较隐蔽,容易早期发生淋巴转移。临床上鼻咽癌患者化疗和放疗治疗效果均不理想,其5年生存率约50%^[1]。鼻咽癌的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程,其分子机制包括肿瘤细胞接触性抑制的丧失、运动性的增加和细胞外基质的降解等^[2]。S100A4是一种低分子质量的钙结合调节蛋白,S100A4参与细胞增殖、分化、信号传导、细胞黏附、胞外基质重建及细胞运动等多种生命活动。其与恶性肿瘤的发生、侵袭、转移及预后差密切相关^[3-4]。近年来研究发现,S100A4与肿瘤生物学行为的关系密切,但作用机制尚未完全阐明。本研究拟对S100A4在鼻咽癌中的作用进行探讨,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

人鼻咽癌 CNE2 细胞株购自中南大学细胞中心。改良型 1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,DMSO 购自德国Appllichem 公司,胰酶、G418 及 GIMSA 染液购自 Solarbio 公司,pCMV 载体购自上海碧云天有限公司,E-cadherin、Fibronectin、基质金属蛋白酶 2(Matrix metalloproteinase 2, MMP2)、基质金属蛋白酶 9(Matrix metalloproteinase 9, MMP9)单克隆抗体购自美国 Sant Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 pCMV-S100A4 真核表达载体的构建 ①细胞总 RNA 的提取:当细胞生长至 80%~90%汇合时,收集细胞加 Trizol 冰上裂解。②逆转录反应:反应体系为 10 μ l:5 \times Primer Script Buffer 2 μ l; Primer Script RT Enzyme Mix 0.5 μ l; Random 6 mers 0.5 μ l; Oligo dT Primer 0.5 μ l; Total RNA 1 μ l; dH₂O 5.5 μ l; 反应条件为:37 $^{\circ}$ C 30 min, 85 $^{\circ}$ C 5 min。③PCR 反应:S100A4 正向引物:5'-CGGCTCGAGGAGA AGGCCCTGGATGTGATG-3';反向引物:5'-CGGGAT CCACCTCGTTGTCCTGTTGCTG-3'。PCR 反应体系为 25 μ l: Taq Master Mix 12.5 μ l; PCR 正向引物 1.0 μ l; PCR 反向引物 1.0 μ l; cDNA 2.0 μ l; dH₂O 8.5 μ l; 反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 5 min。④重组 DNA 的构建:将目的 DNA 片段采用双酶切法插入,PCR 扩增,回收 PCR 产物,转染感受态 JM109 菌,扩增后

挑取阳性克隆送往上海生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.2 重组细胞系的建立 1 \times 10³ 个/ml 对数生长期细胞接种于 24 孔板,50 μ l 培养基中加入质粒 DNA 1.5 μ g,柔和混匀,再将稀释好的质粒 DNA 和 Lipofectamine™ 2000 轻柔混匀,室温放置 20 min。常规培养 4~6 h 后转染,72 h 后改用 G418 持续筛选 14 d,挑出阳性单克隆扩大培养。获得 2 个重组细胞系:pCMV (+)-S100A4-CNE2 细胞和 pCMV (-)-empty-CNE2,以未转染组(Control)为空白对照组。

1.2.3 Western blot 检测 Western blot 收集不同细胞,加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液(1 ml 裂解液加入 100 mmol/L PMSF 10 μ l),BCA 法测定蛋白浓度。加入上样缓冲液,制备好的样品置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存;用枪在加样孔中加入蛋白样品及蛋白 Marker 进行电泳;将蛋白转膜至 PVDF 膜,恒压 87 V 转膜 1.5 h;丽春红染色 2 min;含有 5%脱脂奶粉的封闭液,室温封闭 1 h;TBST 洗涤,加入一抗缓冲液(S100A4 抗体,1:3 000; β -actin 抗体,1:3 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;TBST 洗涤,加入二抗缓冲液(1:3 000),室温封闭 1 h;TBST 洗涤,10 min \times 3 次,ECL 化学发光法显影,使用 Alpha Innotech 系统进行扫描及分析。

1.2.4 细胞生长曲线绘制 分别收集处于对数生长期的鼻咽癌细胞,制成单细胞悬液。常规接种培养于 24 孔板中,每孔中加入 1 ml 含 10%小牛血清的培养基,最后调整细胞密度为 10⁴ 个/ml。每 24 h 用胰酶消化后收集其中 3 孔的细胞,进行细胞计数。MTT 法连续 7 d 对活细胞进行计数。以日期作为 X 轴,细胞计数作为 Y 轴,绘出鼻咽癌细胞株的生长曲线。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 用 RPMI 1640 无血清培养基 1:100 稀释人工基底膜(Matrigel),浸泡上室约 5 min,加入 100 μ l 稀释的 Matrigel;在侵袭小室腔的上下室分别加入 200 μ l、600 μ l RPMI 1640 无血清培养基;调整细胞数为 12.5 \times 10⁴/ml,下室中加入 600 μ l 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,上室中加入 200 μ l 细胞悬液,孵育 40 h;结晶紫染色,自来水漂洗;用棉签轻轻擦拭掉聚碳酸酯膜上表面的细胞,显微镜下计数穿过聚碳酸酯膜的细胞,观察 8 个高倍视野(\times 200),实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,两两比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 结果

采用 PCR 扩增得到 S100A4 的 DNA 片段,琼脂糖凝胶电泳结果显示产物大小约 200 bp,与 S100A4 基因片段 194 bp 基本一致(见图 1A)。酶切鉴定:重组质粒 pCMV-S100A4 双酶切结果大小约 4 300 bp 和 317 bp 的两个片段,分别代表线性化 pCMV 质粒和插入的 S100A4 目的片段(见图 1B)。经上述 PCR 和酶切鉴定正确的阳性克隆菌液送上海生物技术有 限公司进一步测序鉴定,测序结果证实成功构建重组质粒 pCMV-S100A4。

2.2 重组细胞系的建立

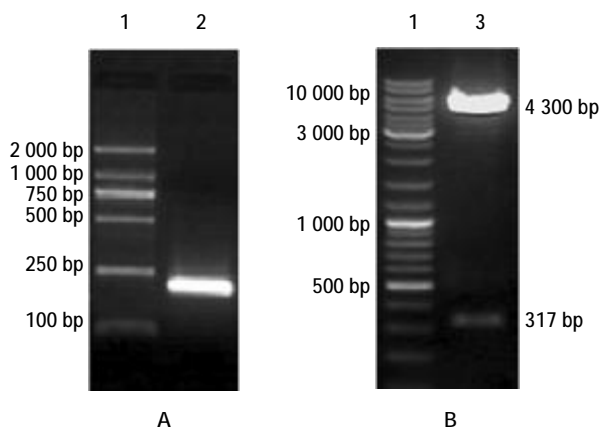
将重组质粒 pCMV-S100A4 转染到鼻咽癌 CNE2 细胞,G418 筛选,建立 pCMV(+)-S100A4-CNE2 细胞和 pCMV(-)-empty-CNE2 细胞系,Western blot 检测 S100A4 蛋白在重组细胞系中的表达,发现 S100A4 蛋白在 pCMV(+)-S100A4-CNE2 中高表达(见图 2)。

2.3 生长曲线变化

观察 S100A4 蛋白表达对 CNE2 细胞生长、增殖的影响,发现 pCMV(+)-S100A4-CNE2 中高表达 S100A4 能促进肿瘤细胞生长(见图 3)。

2.4 EMT 转移相关蛋白检测

通过 Western blot 检测上皮标志物 E-钙黏蛋白(E-cadherin),间质标志物纤黏蛋白(Fibronectin)改变,发现 pCMV(+)-S100A4-CNE2 中 E-cadherin 和 Fibronectin 表达下调(见图 4, $P<0.01$)。说明 S100A4 高表达能抑制 E-cadherin 和 Fibronectin 的表达而影响肿瘤细胞的 EMT 过程。



1:Maker;2:PCR 产物;3:pCMV-S100A4
A:PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳;B:双酶切鉴定结果

图 1 PCR 结果

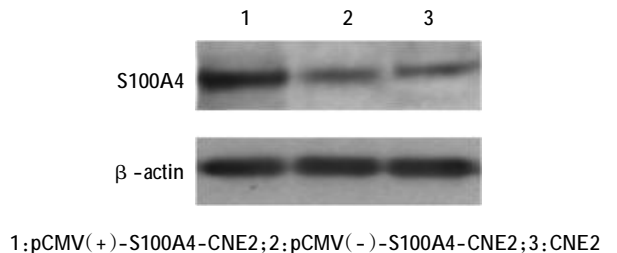


图 2 S100A4 蛋白在重组细胞系中表达情况

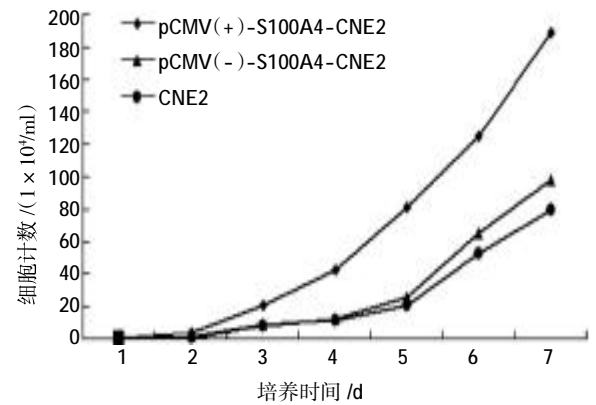
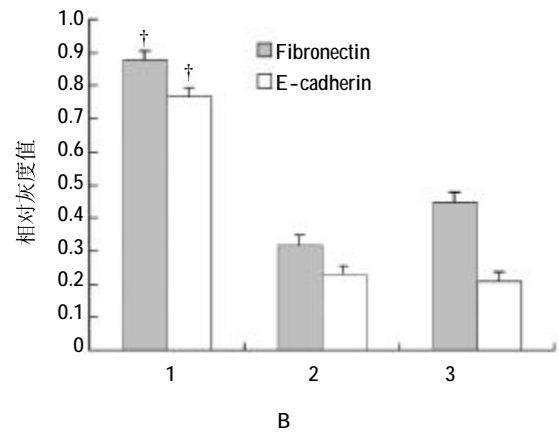
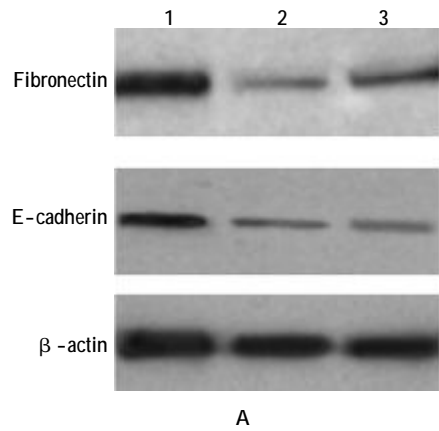


图 3 S100A4 蛋白表达对 CNE2 细胞生长的影响



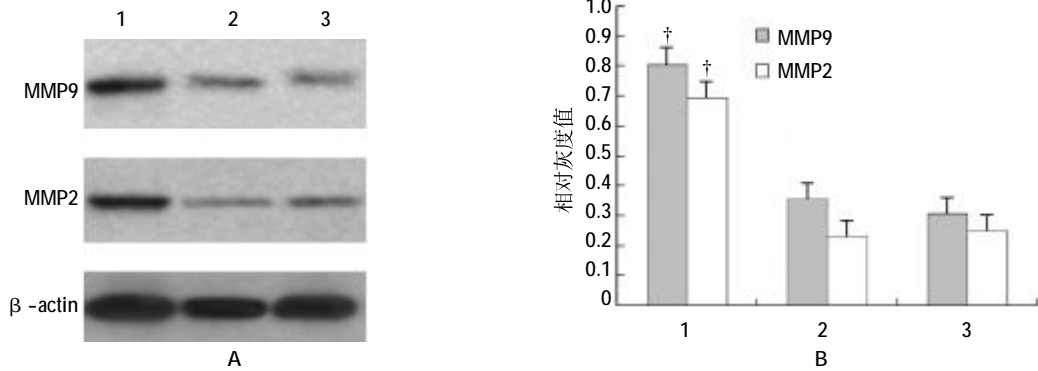
† 与其他两组比较, $P<0.01$;1:pCMV(+)-S100A4-CNE2;2:pCMV(-)-S100A4-CNE2;3:CNE2;A:Western blot 图;B:相对灰度值

图 4 重组细胞系中 E-cadherin 和 Fibronectin 表达变化

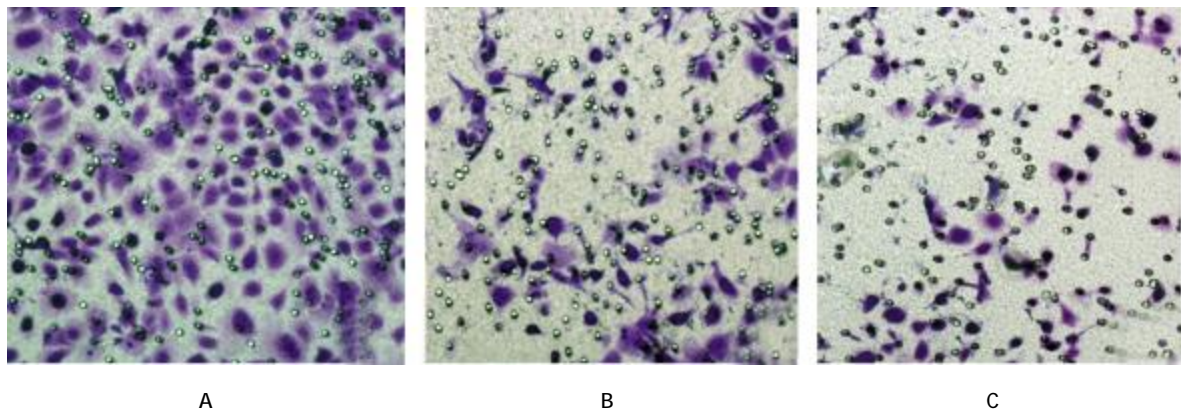
转移相关蛋白 MMP2、MMP9 检测结果发现：pCMV (+)-S100A4-CNE2 中 MMP2、MMP9 表达增高(见图 5, $P < 0.01$),说明 S100A4 能通过提高 MMP 2、MMP9 表达促进鼻咽癌细胞转移。

2.5 Transwell 侵袭细胞计数

观察肿瘤细胞侵袭能力的改变:pCMV(+)-S100A4-CNE2 侵袭细胞计数明显高于 pCMV(-)empty-CNE2 细胞和 CNE2 细胞(见图 6 和附表, $P < 0.01$)。



† 与其他两组比较, $P < 0.01$; 1:pCMV(+)-S100A4-CNE2; 2:pCMV(-)-S100A4-CNE2; 3:CNE2; A:Western blot 图; B:相对灰度值
图 5 重组细胞系中 MMP2、MMP9 表达变化



A:pCMV(+)-S100A4-CNE2; B:pCMV(-)-S100A4-CNE2; C:CNE2

图 6 Transwell 侵袭细胞计数

附表 Traswell 侵袭细胞计数

组别	细胞计数
pCMV(+)-S100A4-CNE2	186 ± 25
pCMV(-)-S100A4-CNE2	96 ± 12
CNE2	90 ± 11

3 讨论

S100A4 蛋白 S-100 蛋白家族的成员之一,是一种钙结合蛋白,其氨基酸序列具有 EF 双螺旋结构,可与钙离子高亲和性结合。当该 EF 结构域与钙离子结合后,S100A4 蛋白的三维分子构象发生改变,暴露出其结合位点,可与反向靶蛋白进行结合,在细胞的运动、侵袭、转移以及凋亡等生物学过程中具有

重要作用^[9]。已有不少研究证实,S100A4 在多种恶性肿瘤组织,如结肠癌、胰腺癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、肝癌等肿瘤中高表达^[6-10],其高表达与恶性肿瘤的发生发展以及预后有关。

有研究发现,S100A4 在正常结肠黏膜上皮中无或弱表达,在结肠癌组织中呈阳性表达,且 S100A4 的表达与肿瘤分期及淋巴结转移密切相关^[9];有人通过 RT-PCR 技术检测胰腺癌中 S100A4 mRNA 表达情况,结果发现,胰腺癌细胞中 S100A4 mRNA 呈过表达;而免疫组织化学结果显示 93% 的有侵袭行为的胰腺癌表达 S100A4,正常组织及慢性胰腺炎组织均不表达 S100A4,胰腺癌中 S100A4 蛋白的表达与肿瘤不良分化显著相关^[9];有研究发现,高转移能力的黑色素瘤细胞株中,S100A4 表达明显高于低转移

能力的细胞株,S100A4高表达是导致黑色素瘤细胞高转移能力的重要原因之一^[8];S100A4蛋白在鼻咽癌中表达升高,与淋巴结N分期和临床分期密切相关,有望成为判断鼻咽癌恶性生物学行为的有效指标^[11]。

近年来,为进一步研究S100A4基因在肿瘤中的作用,有人通过将S100A4基因转染小鼠B16细胞系和MCF-7细胞系后发现,转染后的两种肿瘤细胞发生肺转移的概率明显增加^[12];有学者用S100A4 siRNA转染骨肉瘤细胞株后,发现肿瘤细胞中S100A4表达明显减少,并且下调CD44和MMP2,可能是通过影响细胞基质黏附能力下降来影响肿瘤细胞的侵袭转移^[13]。以上研究表明,S100A4高表达能促进肿瘤的发生、发展,可能是一种肿瘤转移促进基因,抑制其表达可能是一种有效的分子靶向治疗策略。

为进一步研究S100A4在鼻咽癌中的作用,本研究成功构建S100A4高表达重组质粒,将重组质粒转染进鼻咽癌细胞株后,发现,重组细胞株中S100A4蛋白高表达,生长曲线检测高表达S100A4能促进肿瘤细胞生长。研究结果表明,S100A4高表达能促进鼻咽癌增殖。与上述研究结果一致。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程。在胚胎发育、慢性炎症、组织重建、肿瘤转移和多种纤维化疾病中发挥重要作用,其主要的特征有细胞黏附分子E-cadherin和间质标志物Fibronectin表达的减少^[14]。研究发现,肝细胞癌中,S100A4高表达和E-cadherin低表达与肝细胞癌的侵袭有关,E-cadherin是肝癌的预后因子^[15]。乳腺癌中S100A4和MMP13表达具有相关性,过表达S100A4能引起MMP13表达增加,而干扰S100A4表达后,MMP13表达下调且肿瘤细胞侵袭转移能力下降^[16]。本研究发现,S100A4转染鼻咽癌细胞株后获得的重组细胞系中,S100A4表达增高,而E-cadherin和Fibronectin表达下调,说明高表达S100A4可能通过抑制E-cadherin和Fibronectin的表达来影响鼻咽癌的EMT过程,增强肿瘤细胞的迁移和运动能力,从而进一步影响鼻咽癌细胞的侵袭和转移能力。

肿瘤细胞发生转移除了首先发生EMT获得细胞活动能力增强外,还必须排除细胞外基质的阻碍,而基质金属蛋白酶则是降解细胞外基质的主要水解

酶类^[17]。本研究发现,S100A4高表达的重组细胞系中MMP2、MMP9表达增高;同时,Transwell实验表明,pCMV(+)-S100A4-CNE2中侵袭细胞计数高于空白载体对照组和未转染组,说明S100A4能通过提高MMP2、MMP9表达,降解细胞外基质,从而促进鼻咽癌细胞的侵袭和转移。

总之,本研究成功构建S100A4高表达的重组质粒,并转染进鼻咽癌细胞株,构建S100A4稳定高表达的重组细胞系,研究还发现,S100A4高表达能促进鼻咽癌细胞增殖;下调E-cadherin和Fibronectin的表达,降解细胞外基质,影响鼻咽癌的EMT过程,增强鼻咽癌细胞的侵袭和转移能力。S100A4在鼻咽癌细胞侵袭和转移过程中具有重要作用。

参 考 文 献:

- [1] Cao SM, Chen SH, Qian CN, et al. Familial nasopharyngeal carcinomas possess distinguished clinical characteristics in southern China[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(5): 543-549.
- [2] Tan G, Tang X, Huang D, et al. Dinitrosopiperazine-mediated phosphorylated-proteins are involved in nasopharyngeal carcinoma metastasis[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20054-20071.
- [3] Huang H, Zheng HY, Liu ZL, et al. Prognostic significance of relaxin-2 and S100A4 expression in osteosarcoma [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(19): 2828-2834.
- [4] Yu LJ, Li Y, Li C, et al. Restoration of S100A4 expression enhances invasive and metastatic potentials of COLO16 cutaneous squamous cancer cells[J]. Cancer Biomark, 2014, 14(5): 325-333.
- [5] Oliveira MV, Fraga CA, Barros LO, et al. High expression of S100A4 and endoglin is associated with metastatic disease in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Clin Exp Metastasis, 2014, 31(6): 639-649.
- [6] Dahlmann M, Okhrimenko A, Marcinkowski P, et al. RAGE mediates S100A4-induced cell motility via MAPK/ERK and hypoxia signaling and is a prognostic biomarker for human colorectal cancer metastasis[J]. Oncotarget, 2014, 5(10): 3220-3233.
- [7] Ji YF, Huang H, Jiang F, et al. S100 family signaling network and related proteins in pancreatic cancer (Review)[J]. Int J Mol Med, 2014, 3(4): 769-776.
- [8] Haase-Kohn C, Wolf S, Herwig N, et al. Metastatic potential of B16-F10 melanoma cells is enhanced by extracellular S100A4 derived from RAW264.7 macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(1): 143-148.
- [9] Chen N, Sato D, Saiki Y, et al. S100A4 is frequently overexpressed in lung cancer cells and promotes cell growth and cell motility[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 7(3): 459-464.
- [10] Zhang J, Zhang DL, Jiao XL, et al. S100A4 regulates migration and invasion in hepatocellular carcinoma HepG2 cells via

- NF- κ B-dependent MMP-9 signal[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(17): 2372-2382.
- [11] 黎思怡, 李丽霞, 邹振宁, 等. 鼻咽癌组织中 S100A4 蛋白的表达及其临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(12): 1364-1366.
- [12] Chik F, Szyf M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 224-232.
- [13] Ma X, Yang Y, Wang Y, et al. Small interfering RNA-directed knockdown of S100A4 decreases proliferation and invasiveness of osteosarcoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2010, 299(2): 171-181.
- [14] Kumar S, Das A, Sen S. Extracellular matrix density promotes EMT by weakening cell-cell adhesions[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(4): 838-850.
- [15] Zhai X, Zhu H, Wang W, et al. Abnormal expression of EMT-related proteins, S100A4, vimentin and E-cadherin, is correlated with clinicopathological features and prognosis in HCC[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(6): 970.
- [16] Wang L, Wang X, Liang Y, et al. S100A4 promotes invasion and angiogenesis in breast cancer MDA-MB-231 cells by up-regulating matrix metalloproteinase-13 [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4): 593-598.
- [17] Sampieri CL, León-córdoba K, Remes-Troche JM. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in gastric cancer as molecular markers[J]. *J Cancer Res Ther*, 2013, 9(3): 356-363.

(张蕾 编辑)