

· 论著 ·

S100A6 对肺鳞癌细胞株 H520 生物学行为的影响研究

杜歌¹, 刘自双¹, 张新峰¹, 李琦², 王婷³扫描二维码
查看更多

【摘要】 目的 分析S100A6对肺鳞癌细胞株H520生物学行为的影响。**方法** 本实验时间为2021年11月至2022年11月。取对数生长期的H520, 将其随机分为H520组、H520+空载体组、H520+S100A6组, 其中H520组不进行干预, H520+空载体组转染空载体质粒, H520+S100A6组转染过表达S100A6的载体质粒。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测各组细胞增殖率, 采用细胞划痕试验检测各组细胞迁移距离, 采用Transwell实验检测各组细胞侵袭数, 采用流式细胞术检测各组细胞周期。**结果** H520+S100A6组48、72 h时细胞增殖率高于H520组、H520+空载体组($P<0.05$)。H520+S100A6组细胞迁移距离长于H520组、H520+空载体组($P<0.05$)。H520+S100A6组细胞侵袭数多于H520组、H520+空载体组($P<0.05$)。H520+S100A6组G₁期细胞占比高于H520组、H520+空载体组, G₂期细胞占比低于H520组、H520+空载体组($P<0.05$)。**结论** S100A6可促进肺鳞癌细胞株H520增殖、迁移、侵袭, 促使细胞进入分裂周期。

【关键词】 肺肿瘤; H520; S100钙结合蛋白A6; 生物学行为

【中图分类号】 R 734.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.281

Effect of S100A6 on Biological Behavior of Lung Squamous Cell Strain H520 DU Ge¹, LIU Zishuang¹, ZHANG Xinfeng¹, LI Qi², WANG Ting³

1.Department of Rehabilitation Center for Elderly, Beijing Rehabilitation Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100144, China

2.Department of Scientific Research, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, China

3.Department of Respiratory Medicine, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an 710004, China

Corresponding author: WANG Ting, E-mail: hdt.wt@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the effect of S100A6 on biological behavior of lung squamous cell strain H520. **Methods** This study was conducted from November 2021 to November 2022. H520 at logarithmic growth stage was randomly divided into H520 group, H520+empty carrier group and H520+S100A6 group, in which H520 group did not receive intervention, H520+empty carrier group was transfected with empty plasmid and H520+S100A6 group was transfected with carrier plasmid overexpressing S100A6. Cell proliferation rate was detected by cell counting kit-8 (CCK-8), cell migration distance was detected by cell scratch assay, cell invasion number was detected by Transwell assay, and cell cycle was detected by flow cytometry. **Results** At 48 and 72 hours, the cell proliferation rate of H520+S100A6 group was higher than that of H520 group and H520+empty carrier group ($P<0.05$). The cell migration distance of H520+S100A6 group was longer than that of H520 group and H520+empty carrier group ($P<0.05$). The number of cell invasion in H520+S100A6 group was higher than that in H520 group and H520+empty carrier group ($P<0.05$). The proportion of G₁ phase cells in H520+S100A6 group was higher than that in H520 group and H520+empty carrier group, and the proportion of G₂ phase cells was lower than that in H520 group and H520+empty carrier group ($P<0.05$). **Conclusion** S100A6 can promote the proliferation, migration and invasion of lung squamous cell strain H520, and promote the cell to enter the division cycle.

【Key words】 Lung neoplasms; H520; S100 calcium binding protein A6; Biological behavior

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2022SF-539); 西安市人民医院(西安市第四医院)孵化基金项目(FZ-75, CX-34)

作者单位: 1.100144北京市, 首都医科大学附属北京康复医院老年康复中心 2.710004陕西省西安市人民医院(西安市第四医院)科研科 3.710004陕西省西安市人民医院(西安市第四医院)呼吸内科

通信作者: 王婷, E-mail: hdt.wt@163.com

肺癌在全世界范围内均是对人类威胁最大的恶性肿瘤,其所致的死亡人数在所有癌症中位居第一位^[1]。我国肿瘤登记中心数据显示,2015年,不论性别、地区(农村或城市),肺癌均是发病率最高的恶性肿瘤;在肺癌中,非小细胞肺癌是主要类型,约占85%,其主要病理亚型为肺腺癌和肺鳞癌^[2]。近些年,随着驱动基因被发现,部分腺癌患者的预后得到了极大改善,一些驱动基因阳性的IV期肺腺癌患者总生存期甚至超过了5年^[3-4]。在此基础上,肺癌的相关诊治指南也提出了分子分型的概念,并将靶向治疗及免疫治疗纳入驱动基因阳性的早期非小细胞肺癌患者的术后辅助治疗及晚期非小细胞肺癌患者的一线单药治疗^[2]。然而,驱动基因主要是在肺腺癌患者中被检测到,绝大多数肺鳞癌患者因未发现阳性驱动基因而缺乏有效的治疗方案,其预后仍不佳^[5]。S100蛋白家族包含25个小分子钙结合蛋白,大多数成员位于1号染色体长臂2区1带(1q21),此区域易发生基因重排和突变,许多S100蛋白被证实与包括癌症在内的多种疾病的发生发展有关^[6]。S100A6是该家族中重要的一员,与肿瘤的侵袭和迁移有关^[7]。研究显示,S100A6可能与肺鳞癌患者预后有关,其可能是肺鳞癌的重要标志物^[8]。本研究旨在分析S100A6对肺鳞癌细胞株H520生物学行为的影响,以期为后续S100A6在肺鳞癌中具体作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本研究时间为2021年11月至2022年11月。

1.2 实验细胞 肺鳞癌细胞株H520购自武汉普诺赛生命科技有限公司,在37℃、5% CO₂条件下保存。

1.3 主要实验试剂及仪器 DMEM高糖培养基(Dulbecco改良Eagle培养基)、链霉素/青霉素(PB180120)、0.25%胰蛋白酶溶液(PB180228)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,胎牛血清购自美国Gibco公司,Lipofectamine 2000转染试剂(11668-019)购自美国Invitrogen公司,CO₂恒温培养箱〔BPN-150CH(UV)〕购自上海蓝豹实验仪器有限公司,光学显微镜(MF52-N)购自广州市明美科技有限公司,低速离心机(L3-5K)购自可成科技股份有限公司,细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)购于美国MedChemexpress生物科技公司,流式细胞仪(CytoFLEX)购自美国Beckman公司。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养及分组 将肺鳞癌细胞株H520置于DMEM高糖培养基中,加入胎牛血清和100 U/ml的链霉素/青霉素以扩增传代。取对数生长期的H520,将其随机分为H520组、H520+空载体组、H520+S100A6组,其

中H520组不进行干预,H520+空载体组转染空载体质粒,H520+S100A6组转染过表达S100A6的载体质粒(将目的基因和载体质粒进行双酶切,回收产物,将目的DNA片段连接载体质粒,构建过表达S100A6的载体质粒)。转染方法如下:取对数期生长的H520细胞,用0.25%胰蛋白酶溶液消化,调整细胞密度为 3×10^5 个/ml并将其铺于6孔板,置于培养箱中培养,待细胞汇合度达到80%~90%时,加入2 μg过表达S100A6的载体质粒(用100 μl无血清培养基稀释)或空载体质粒和25 μl Lipofectamine 2000转染试剂(用100 μl无血清培养基稀释),混匀,在37℃ CO₂恒温培养箱中培养24 h。

1.4.2 CCK-8检测细胞增殖率 取各组细胞,室温下1 000 r/min离心5 min(离心半径10 cm),收集细胞悬液,调整细胞浓度为 $(5 \sim 10) \times 10^4$ 个/ml并将其接种到96孔板(100 μl),置于培养箱中培养,分别在24、48、72 h时检测细胞增殖率,具体方法为:依次向每个孔中加入10 μl CCK-8溶液,在37℃条件下培养4 h,使用酶标仪于450 nm处测量每孔吸光度,计算细胞增殖率。实验独立重复2次。

1.4.3 细胞划痕试验检测细胞迁移距离 在6孔板的背面每隔0.5~1.0 cm均匀地绘制1条水平线,横穿过孔,每孔至少穿过3条线;取各组细胞,以 1×10^6 个/ml的浓度接种到6孔板中(每组2个复孔),当细胞密度达到90%以上时,用移液管在培养基中划出一条垂直线,用PBS洗涤细胞表面3次,加入无血清培养基,然后在37℃、5% CO₂培养箱中孵育,分别于孵育0、24 h时拍照,计算细胞生长的位置与划线之间的距离,即细胞迁移距离。实验独立重复2次。

1.4.4 Transwell实验检测细胞侵袭数 取各组细胞,使用0.25%胰蛋白酶溶液消化,800 r/min离心5 min(离心半径10 cm),调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml并将其置于涂覆Matrigel凝胶的Transwell板(6孔,孔径8.0 μm)的上室;将600 μl的DMEM高糖培养基(含有30%胎牛血清)置于Transwell板下室,于37℃、5% CO₂条件下孵育8 h;用75%乙醇溶液固定细胞1 h并进行苏木精染色,用棉签去除上室中的细胞,在光学显微镜(100倍)下观察拍照,选取5个独立视野,统计每个视野第四象限中的细胞数量,即细胞侵袭数。实验独立重复2次。

1.4.5 流式细胞术检测细胞周期 取各组细胞,使用0.25%胰蛋白酶溶液消化,调整细胞浓度为 3×10^5 个/ml并将其接种到6孔板中,孵育48 h,800 r/min离心5 min(离心半径10 cm),用冷却的PBS洗涤2次,并在4℃条件下1 000 r/min离心5 min(离心半径10 cm),收集细胞并用75%乙醇溶液固定1 h,用PBS洗涤2次,加入100 μl RNaseA溶液,重悬并在37℃水浴中孵育30 min;然后将细胞沉淀与PI染色溶液(400 μl)混

合,在37℃水浴中孵育30 min;用流式细胞仪在激发波长488 nm波长处检测红色荧光,同时检测光散射情况;分析不同细胞周期(G₁期、S期、G₂期)细胞占比。实验独立重复2次。

1.5 统计学方法 采用Microsoft Excel 2019记录数据,利用Grandpad Prism 5.0分析数据。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Newman-Keuls检验;不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用秩和检验;计数资料以相对数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖率 三组24 h时细胞增殖率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);三组48、72 h时细胞增殖率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。H520+S100A6组48、72 h时细胞增殖率高于H520组、H520+空载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.2 细胞迁移距离 三组细胞迁移距离比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。H520+S100A6组细胞迁移距离长于H520组、H520+空载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.3 细胞侵袭数 三组细胞侵袭数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。H520+S100A6组细胞侵袭数多于H520组、H520+空载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

2.4 细胞周期 三组G₁期、G₂期细胞占比比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);三组S期细胞占比比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。H520+S100A6组G₁期细胞占比高于H520组、H520+空载体组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

3 讨论

S100A6是S100蛋白家族的重要成员,已被证实参与了多种肿瘤的发生发展,如在骨肉瘤、肝癌以及胰腺癌中,其可促进细胞增殖和迁移^[9]。WANG等^[10]研究了S100A6表达水平与胃癌患者临床病理特征和预后的

关系,结果显示,67.5%的胃癌患者胃癌组织中S100A6表达水平高于癌旁正常组织,且S100A6表达水平与淋巴结浸润、血管浸润、肿瘤分期密切相关。此外,S100A6还被证明参与调节Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt、p38/MAPK、NF- κ B等信号通路^[11]。然而研究显示,S100A6 mRNA水平升高提示乳腺癌、卵巢癌患者预后较好^[12-13]。这些相互矛盾的研究结果表明,S100A6可能在不同类型的肿瘤中发挥的作用不同。本研究旨在分析S100A6对肺鳞癌细胞株H520生物学行为的影响。

在肺癌中,总的来说,目前尚缺乏较系统、全面的研究来证实S100A6的具体作用和机制。本研究组前期研究显示,S100A6可影响人未分化肺癌细胞株Calu-6的生物学行为,包括抑制细胞分裂、增殖、迁移及促进细胞凋亡^[14]。然而,既往相关研究发现,原发性肺癌组织和转移性肺癌组织中S100A6表达水平均高于正常肺组织,S100A6可以通过抑制P53乙酰化来促进A549细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成,表明S100A6可能参与了肺癌的发生^[15-16]。分析上述研究结果存在差异的原因,A549细胞与Calu-6处于不同分化阶段,前者属于肺腺癌细胞系,后者属于未分化的人肺癌细胞株。据此,本研究组猜测,S100A6可能在肺癌的不同病理类型、不同的分化阶段发挥不同的作用。ISHII等^[17]研究显示,具有细支气管肺泡癌特征的肺腺癌——腺癌混合亚型患者S100A6表达水平升高。HE等^[8]分析了177例可切除肺鳞癌患者的肿瘤组织,根据免疫组化结果,将其分为高表达S100A6组和低表达S100A6组,随访并记录所有患者的生存期,结果显示,高表达S100A6组患者的生存期短于低表达S100A6组。而LI等^[18]在小细胞肺癌组织中并未发现S100A6 mRNA及其蛋白。本研究结果显示,H520+S100A6组48、72 h时细胞增殖率高于H520组、H520+空载体组,细胞迁移距离长于H520组、H520+空载体组,细胞侵袭数多于H520组、H520+空载体组,G₁期细胞占比高于H520组、H520+空载体组,G₂期细胞占比低于H520组、H520+空载体组,提示S100A6可促进肺鳞癌细胞株H520增殖、迁移、侵袭,促使细胞进入分裂周期。

表1 三组细胞增殖率、细胞迁移距离、细胞侵袭数、细胞周期比较($\bar{x} \pm s$, $n=2$)

Table 1 Comparison of cell proliferation rate, cell migration distance, cell invasion number, and cell cycle among the three groups

组别	细胞增殖率			细胞迁移距离 (μ m)	细胞侵袭数 (个)	细胞周期(%)		
	24 h	48 h	72 h			G ₁ 期细胞占比	S期细胞占比	G ₂ 期细胞占比
H520组	0.456 \pm 0.010	0.763 \pm 0.016	0.949 \pm 0.009	256.0 \pm 50.5	232.0 \pm 4.9	42.8 \pm 0.4	27.6 \pm 0.5	29.5 \pm 0.6
H520+空载体组	0.462 \pm 0.020	0.762 \pm 0.012	0.951 \pm 0.013	246.7 \pm 41.9	233.3 \pm 2.3	44.0 \pm 0.4	26.5 \pm 0.4	29.4 \pm 0.3
H520+S100A6组	0.484 \pm 0.013	0.924 \pm 0.020 ^{ab}	1.191 \pm 0.009 ^{ab}	457.0 \pm 16.4 ^{ab}	460.7 \pm 5.2 ^{ab}	66.4 \pm 0.9 ^{ab}	27.4 \pm 1.1	6.2 \pm 0.3 ^{ab}
F值	1.044	32.510	171.700	9.265	908.500	584.900	0.581	1 120.000
P值	0.408	0.001	<0.001	0.015	<0.001	<0.001	0.588	<0.001

注:^a表示与H520组比较, $P < 0.05$; ^b表示与H520+空载体组比较, $P < 0.05$

综上所述, S100A6可促进肺鳞癌细胞株H520增殖、迁移、侵袭, 促使细胞进入分裂周期。但本研究仅纳入了一种肺鳞癌细胞株, 且并未分析S100A6导致肺鳞癌的具体作用机制, 未来本研究组会纳入更多类型细胞株、设计多层面实验来探究S100A6在不同病理类型肺癌中的具体作用机制。

作者贡献: 杜歌进行文章的构思与设计, 撰写论文; 刘自双、张新峰进行研究的实施与可行性分析、数据整理; 刘自双、张新峰、李琦进行数据收集; 李琦进行统计学处理; 张新峰、李琦进行结果的分析与解释; 杜歌、王婷进行论文的修订; 王婷负责文章的质量控制及审校, 对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al.Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209-249.DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.原发性肺癌诊疗指南(2022年版) [J]. *中国合理用药探索*, 2022, 19 (9): 1-28. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3327.2022.09.002.
- [3] 何平, 孙平军, 鹿翠香.肺癌病理分型与临床表现及个人史关系的探讨 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, 20 (10): 1646-1647.DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2012.10.036.
- [4] ALEXANDER M, KIM S Y, CHENG H Y.Update 2020: management of non-small cell lung cancer [J]. *Lung*, 2020, 198 (6): 897-907.DOI: 10.1007/s00408-020-00407-5.
- [5] PARKER A L, BOWMAN E, ZINGONE A, et al.Extracellular matrix profiles determine risk and prognosis of the squamous cell carcinoma subtype of non-small cell lung carcinoma [J]. *Genome Med*, 2022, 14 (1): 126.DOI: 10.1186/s13073-022-01127-6.
- [6] LIU Y, CUI J, TANG Y L, et al.Prognostic roles of mRNA expression of S100 in non-small-cell lung cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 9815806.DOI: 10.1155/2018/9815806.
- [7] BÖNI R, HEIZMANN C W, DOGUOGLU A, et al.Ca (2+) -binding proteins S100A6 and S100B in primary cutaneous melanoma [J]. *J Cutan Pathol*, 1997, 24 (2): 76-80.DOI: 10.1111/j.1600-0560.1997.tb01100.x.
- [8] HE X G, XU X L, KHAN A Q, et al.High expression of S100A6 predicts unfavorable prognosis of lung squamous cell cancer [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 5011-5017.DOI: 10.12659/msm.904279.
- [9] YANG Y Q, ZHANG L J, DONG H, et al.Upregulated expression of S100A6 in human gastric cancer [J]. *J Dig Dis*, 2007, 8 (4): 186-193.DOI: 10.1111/j.1751-2980.2007.00311.x.
- [10] WANG X H, ZHANG L H, ZHONG X Y, et al.S100A6 overexpression is associated with poor prognosis and is epigenetically up-regulated in gastric cancer [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177 (2): 586-597.DOI: 10.2353/ajpath.2010.091217.
- [11] LI A F, GU Y, LI X R, 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.DOI: 10.3892/ol.2018.8018.
- [12] ZHANG S Z, WANG Z, LIU W W, et al.Distinct prognostic values of S100 mRNA expression in breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39786.DOI: 10.1038/srep39786.
- [13] BAI Y, LI L D, LI J, et al.Prognostic values of S100 family members in ovarian cancer patients [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18 (1): 1256.DOI: 10.1186/s12885-018-5170-3.
- [14] WANG T, HAN S L, DU G.S100A6 represses Calu-6 lung cancer cells growth via inhibiting cell proliferation, migration, invasion and enhancing apoptosis [J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39 (6): 771-779.DOI: 10.1002/cbf.3639.
- [15] 南岩东, 常蕊静, 穆德广, 等.肿瘤相关蛋白质S100A6结构和功能的分析与预测 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21 (6): 1180-1184.DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2013.06.05.
- [16] LEŚNIAK W, FILIPEK A.S100A6 protein-expression and function in norm and pathology [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (2): 1341. DOI: 10.3390/ijms24021341.
- [17] ISHII A, SUZUKI M, SATOMI K, et al.Increased cytoplasmic S100A6 expression is associated with pulmonary adenocarcinoma progression [J]. *Pathol Int*, 2009, 59 (9): 623-630.DOI: 10.1111/j.1440-1827.2009.02417.x.
- [18] LI L, PAN Y X, MO X X, et al.A novel metastatic promoter CEMIP and its downstream molecular targets and signaling pathway of cellular migration and invasion in SCLC cells based on proteome analysis [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146 (10): 2519-2534.DOI: 10.1007/s00432-020-03308-5.

(收稿日期: 2023-06-06; 修回日期: 2023-08-14)

(本文编辑: 崔丽红)