

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.13.001

· 基础研究 ·

siRNA 抑制 S100A4 表达对卵巢癌细胞 CP70 生物学特性的影响 *

许欣 辛晓燕[△] 李 佳 刘海霞 魏翻艳

(第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨人卵巢癌顺铂耐药细胞株 CP70 沉默 S100A4 基因后,CP70 细胞对顺铂敏感性、凋亡及细胞迁移的影响。**方法:**设计并合成 S100A4 基因特异性的 siRNA 并转染入卵巢癌细胞 CP70,48 h 后应用 RT-PCR 和 Western Blot 检测在 mRNA 和蛋白水平 siRNA 对 S100A4 的影响,MTT 法检测转染 siRNA 后卵巢癌细胞 CP70 对顺铂敏感性的变化。用流式细胞术检测顺铂(40 μ M)对转染 S100A4 siRNA 后对卵巢癌细胞 CP70 凋亡的影响,Transwell 法观察 siRNA 抑制 S100A4 后对卵巢癌细胞 CP70 迁移能力的影响。**结果:**与空白对照组、阴性对照组相比,S100A4 siRNA 转染组 CP70 细胞的 S100A4 基因和蛋白表达降低($P<0.01$)。MTT 法检测顺铂敏感性发现 S100A4 siRNA 转染组 CP70 细胞顺铂敏感性增强。在顺铂刺激下,siRNA 转染组细胞凋亡率高于其他各组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。Transwell 发现 CP70 细胞迁移能力明显下降($P<0.05$)。**结论:**S100A4 siRNA 能够明显抑制 CP70 细胞 S100A4 的表达,从而增强细胞对顺铂的敏感性,促进细胞凋亡,减弱细胞的迁移能力。S100A4 有望成为逆转卵巢癌铂类耐药的治疗靶点。

关键词:S100A4;小分子干扰 RNA;卵巢癌;顺铂;耐药

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)13-2401-04

Effects of S100A4 Gene Silenced by S100A4 SiRNA on Cisplatin Sensitivity, Apoptosis and Migration of Ovarian Cancer Cell Line CP70*

XU Xin, XIN Xiao-yan[△], LI Jia, LIU Hai-xia, WEI Fan-yan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of silencing the expression of S100A4 on the cisplatin sensitivity, apoptosis and migration in cisplatin resistance cell line CP70. **Methods:** The S100A4 siRNA was constructed and then transfected into CP70. After 48 h, RT-PCR and Western blot were used to detect the inhibition effect of S100A4. MTT assay was performed to evaluate the effect of S100A4 gene silence on cisplatin sensitivity of CP70. The apoptosis rates were detected by using flow cytometry. **Results:** Compared with blank control group and negative control group, the expressions of S100A4 mRNA and protein were inhibited significantly in CP70 cells ($P<0.01$) after transfecting with S100A siRNA for 48 h. MTT assay found that down-regulation of S100A4 enhanced cisplatin sensitivity in CP70. The apoptosis rate of siRNA transfection group induced by cisplatin was higher than other groups, respectively ($P<0.05$). Cell migration ability was reduced in siRNA transfection group ($P<0.01$). **Conclusion:** S100A4 siRNA can significantly enhanced the cisplatin sensitivity and inhibited migration ability of CP70. S100A4 can be the target of reversing the resistance to chemotherapy in ovarian cancer.

Key words: S100A4; siRNA; Ovarian cancer; Cisplatin; Drug resistance

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)13-2401-04

前言

卵巢癌死亡率居女性生殖系统恶性肿瘤第 1 位^[1],由于早期缺乏特异性症状,大约 70%的患者初次就诊时发现盆腔转移或远处转移,已为中晚期^[2]。顺铂是被广泛应用的一线化疗药物,具有明显地抗肿瘤作用^[3]。顺铂作为卵巢癌化疗的“骨架药物”,多数患者化疗后可以达到临床完全缓解,但 70%以上患者会出

现化疗耐药而导致肿瘤转移复发,5 年生存率为 30%左右^[4]。近年来,钙结合蛋白 S100A4 作为 S100 家族中的一个重要成员,探讨其与肿瘤生物学行为相关性的研究越来越多^[5]。Emberley 等研究发现 S100A4 可通过钙离子信号转导通路参与调控细胞增殖分化、细胞运动及细胞凋亡^[6]。大量临床研究发现 S100A4 在乳腺癌、直肠癌、肺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中呈高表达,可能与肿瘤的发生发展、侵袭转移、预后相关^[7,8]。前期

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172460/M162)

作者简介:许欣(1988-),女,医师,在读硕士,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:18792606414, E-mail: xuxin106512@163.com

[△] 通讯作者:辛晓燕, E-mail: gynobs@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-06 接受日期:2013-11-28)

工作中发现 S100A4 在卵巢癌顺铂耐药细胞 CP70 中高表达,推测 S100A4 可能与卵巢癌细胞顺铂耐药有密切关系^[9]。因此本研究以卵巢癌细胞 CP70 为研究对象,观察 siRNA 沉默 S100A4 的表达对卵巢癌顺铂耐药细胞 CP70 顺铂敏感性、凋亡和迁移的影响,进一步探讨 S100A4 在卵巢铂类耐药中的作用机制,为逆转卵巢癌化疗耐药提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人卵巢癌顺铂耐药细胞株 CP70,由西京医院妇产科实验室提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(浙江四季青公司)、DDP(齐鲁制药有限公司)、兔抗人 β -actin 单克隆抗体和兔抗人 S100A4 单克隆抗体(美国 Epitomics 公司)、LipofectamineTM2000(Invitrogen 公司)、小干扰 RNA(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 将卵巢癌细胞 CP70 置于 37℃,饱和湿度,含 5% CO₂ 的孵箱中常规培养,培养液为 15%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液。细胞转染前,将细胞接种于孔板或培养瓶中,细胞融合率达 80%~95%时开始转染。操作按 Lipo 2000 试剂说明书进行,分为空白对照组,阴性对照组,siRNA 转染组。

1.2.2 RT-PCR 检测基因表达 转染 48 小时后,分别收集各实验组细胞后提取细胞总 RNA,反转录反应后,进行实时荧光定量 PCR, β -actin 为内参。

阴性对照的序列:

Sense:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'

Anti-sense:5'-AUG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'

S100A4 siRNA 的序列:Sense:5'-GCAUCGCCAUGAU-GUGUAATT-3'

Anti-sense:5'-UUACACAUCAUGCCGAUGCTT-3'

GAPDH 的序列:Sense: 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGC-AA-3'

Anti-sense:5'-AGATCCACAAACGGATACATT-3'

PCR 扩增的条件为:94℃ 30 s 变性,60℃ 30 s 退火,72℃ 45 s 延伸,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达 细胞转染 48 小时后,去除旧的培养液,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入裂解液,冰上放置 30 分钟后收集细胞,离心后取上清液,测蛋白浓度,与 2× 上样缓冲液 1:1 混合,煮沸 5 min。取蛋白 30 μ g 上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 16%分离胶和 4%浓缩胶,并转印到 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的封闭液,室温封闭 2 h。TPBS 洗涤后加入一抗缓冲液(S100A4 抗体 1:2500; β -actin 抗体 1:3000),4℃ 孵育过夜,二抗封闭(HRP 标记羊抗兔 IgG,1:3000),室温封闭 1 h。化学发光后显影。

1.2.4 MTT 将生长到对数期的细胞用 0.25%的胰酶消化后制备成单细胞悬液,进行细胞计数,调整细胞浓度至 1×10^4

个/ml。取 96 孔板,每孔吸取细胞悬液 100 μ L,在 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的孵箱培养中使细胞贴壁。依次加入 100 μ L 终浓度为 0、2.5、5、10、40、80、160 μ M 的顺铂,以只加培养液为调零孔,以不加顺铂为阴性对照孔,每组设 3 个复孔,继续培养 48h。终止培养前 4 h,每孔加 MTT20 μ L(5mg/ml),弃去上清液,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150 μ L,震荡 10 min。用酶标仪测定每孔的 490 nm 波长的 OD 值。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将细胞转染后的细胞,6 h 后按实验设计给予顺铂进行刺激,继续培养至 24 h 后,分别收集细胞,用 PBS 洗涤 2 次,离心管,去上清,加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞后,在加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀,室温下避光反应 5-15 min,上机前 5 min 中加入 5 μ L PI,避光混匀。以上实验重复 3 次。

1.2.6 Transwell 检测细胞的迁移能力 将细胞培养试剂和 Transwell plate 放在 37℃ 温育;取出转染 48 小时后的细胞,用 PBS 洗涤细胞两次,0.25%胰酶消化,制备单细胞悬液(1×10^5 /ml),在下室(即 24 孔板底部)加入 600 μ L~800 μ L 含 10%血清的完全培养基,上室加入 200 μ L 细胞悬液,5% CO₂ 继续培养 24 h;取出 Transwell 小室,弃去孔中培养液,用 PBS 洗 2 遍,甲醇固定 30min;弃甲醇,将小室适当风干,PBS 洗 2 遍,0.1%结晶紫染色 20 min,用湿棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞。显微镜下取随机取 3 个视野计数,取平均数。

1.2.7 统计学处理 采用 spss18.5 统计软件分析数据,实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 S100A4 siRNA 后卵巢癌顺铂耐药细胞 CP70 中 S100A4 的表达差异

实时荧光定量 PCR 显示,siRNA 转染组 S100A4 的 mRNA 表达量明显低于空白对照组和阴性对照组($P < 0.01$,图 1)。Western blot 结果显示,siRNA 转染组 S100A4 的表达水平明显下调,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.2 S100A4 siRNA 对 CP70 顺铂敏感性的影响

转染 48 h 后,MTT 结果显示,空白对照组、阴性对照组、转染组 IC₅₀ 值分别为 74.36 μ M、61.76 μ M、40.12 μ M,即 S100A4 表达下调后,CP70 细胞对顺铂的敏感性提高了约 1.85 倍,见图 3。

2.3 S100A4 siRNA 对卵巢癌细胞 CP70 的促凋亡作用

40 μ M 的顺铂刺激 CP70 细胞 24 h,空白对照组(1.8 ± 0.3)%,空白对照 +DDP(6.2 ± 0.8)%,阴性对照 +DDP(7.1 ± 0.6)%,siRNA 组 +DDP(18.6 ± 4.5)%。沉默 S100A4 后,并用顺铂刺激 24 h 后,siRNA 转染组细胞的凋亡率升高,明显高于单用顺铂组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 S100A4 siRNA 对卵巢癌耐药细胞 CP70 迁移能力的影响

S100A4 siRNA 转染 CP70 细胞后,与空白对照组、阴性对照组相比,转染组细胞迁移数目减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。

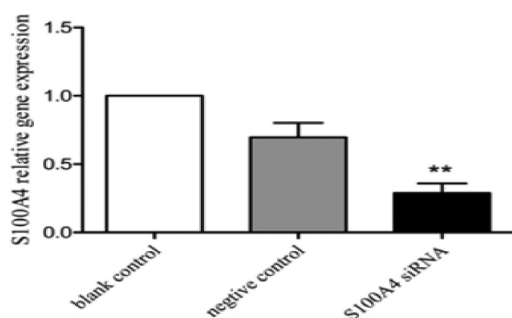


图 1 RT-PCR 检测转染后 S100A4 的表达水平 **P<0.01 转染组 vs 空白对照组

Fig. 1 RT-PCR analysis S100A4 expression after transfection**P<0.01 transfection group vs blank control

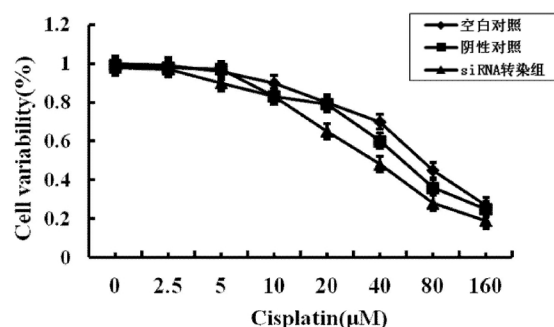


图 3 MTT 检测 CP70 对顺铂敏感性

Fig. 3 MTT analysis the sensitivity to cisplatin of CP70

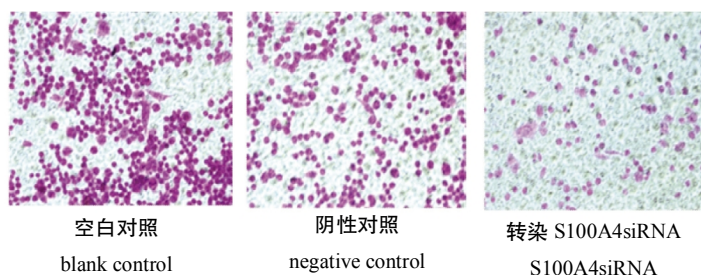


图 5 Transwell 法检测细胞迁移能力 *P<0.05 转染组 vs 空白对照组

Fig. 5 Transwell analysis migration of cells*P<0.05 transfection group vs blank control

3 讨论

卵巢癌铂类耐药是造成卵巢癌死亡率高的主要原因之一,而造成卵巢癌耐药的机制十分复杂,其主要机制有肿瘤的血流量减少,细胞内药物摄入减少而外流增加,DNA 损伤修复能力增强,凋亡通路受阻及耐药相关分子等^[10]。目前,寻找有效的铂类耐药相关的分子靶点是研究的热点。迄今为止,已发现的 S100 家族 25 个成员中包括 16 个 S100A 蛋白(S100A1-16)和其他一些蛋白(例如 S100B、S100G、S100P、S100Z)^[11]。在结构上它们具有同源性,即 EF 双螺旋型结构。S100 蛋白在氨基端和羧基端分别由 14 和 12 个氨基酸组成,当与 Ca^{2+} 结合后,S100 蛋白构象发生变化,使相应的靶蛋白与暴露的位点结合,从而发挥生物学效应^[12]。S100A4 通常以非共价键结合的二聚体分子形式与钙依赖的靶蛋白相互作用,从而发挥生物学功能^[13]。S100A4 已被证实可以作为预测肿瘤患者预后的重要指标,辅

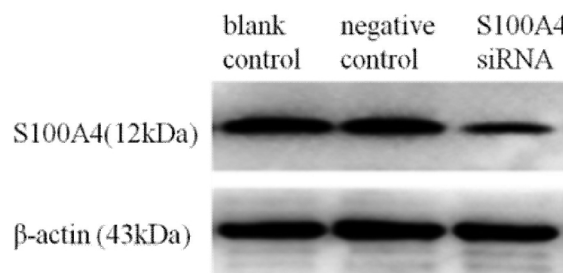


图 2 Western blot 检测转染后 S100A4 的表达变化

Fig. 2 Western blot analysis the expression of S100A4 after transfection

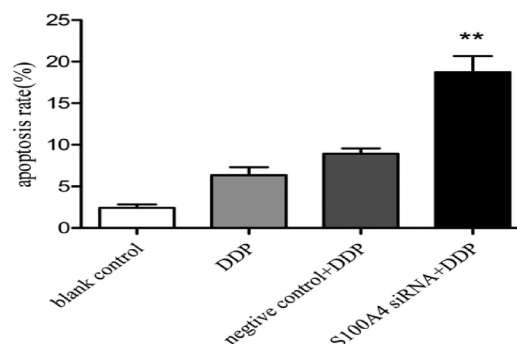
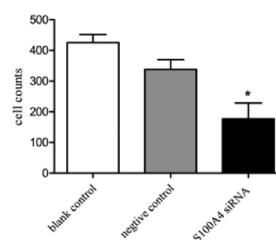


图 4 流式细胞术检测细胞凋亡率 **P<0.01 转染+DDP 组 VS DDP 组

Fig. 4 Flow cytometry showing the effect of apoptosis **P<0.01 transfection group+DDP VS DDP group



助肿瘤患者化疗^[14]。我们的前期研究证明在卵巢癌细胞中 S100A4 表达亦有明显差异,在卵巢癌顺铂耐药细胞株 CP70 中的表达明显高于卵巢癌顺铂敏感细胞株,因此,推测 S100A4 与卵巢癌顺铂耐药有相关性。尽管,S100A4 在卵巢癌耐药中发挥的功能还不清楚,但是了解 S100A4 在肿瘤发生发展及癌症演进过程中发挥的功能和分子机制,能够为我们早期诊断卵巢癌和逆转卵巢癌耐药带来新的机会。

为了进一步了解 S100A4 与卵巢癌铂类耐药的相关性,选择高表达 S100A4 的卵巢癌耐药细胞株 CP70,利用 siRNA 沉默 CP70 中 S100A4 的表达。为了验证 siRNA 是否靶向作用于 S100A4 基因,我们分别在 mRNA 和蛋白水平进行验证,结果表明转染 S100A4 siRNA 后细胞 CP70 中 S100A4 在 mRNA 和蛋白水平中的表达明显下调。MTT 结果提示通过沉默 S100A4 基因的表达使 CP70 细胞对顺铂敏感性增加,推测 S100A4 可能参与卵巢癌顺铂耐药的过程。与文献报道中的相似,Kim 等

利用免疫组化法检测 109 例术后采用顺铂和 5-FU 化疗的患者的胃癌组织,发现 S100A4 的过表达与肿瘤复发密切相关,可作为胃癌化疗的辅助指标^[5]。在转染 S100A4 siRNA 后,通过 PI/Annexin V 双染流式检测细胞凋亡,通过顺铂诱导发现 S100A4 siRNA 转染组中卵巢癌 CP70 的凋亡率明显增加,提示通过沉默 S100A4 的表达能够促进卵巢癌细胞的凋亡。在 Grigorian 等的研究结果相同,他们发现沉默 S100A4 可促进细胞的凋亡,并发现其可与调控凋亡的其他蛋白协同作用,例如 p53 及调控 p53 转录的基因(如 MDM2、Bax、p21 等)^[16]。除了体外实验,EL Naaman C 等利用 S100A4 基因敲出小鼠发现其可存活并且表型正常,但是大约 10% 的小鼠在 10 至 14 个月发生肿瘤,推测可能是由于 S100A4 基因的沉默使 p53 的抑癌作用缺失,从而促进肿瘤细胞的增殖^[17]。

迁移能力是肿瘤细胞离开原发灶和进入循环播散的先决条件^[18]。大多卵巢癌患者对顺铂耐药后,引起复发转移,直接影响患者预后。我们又通过 Transwell 证明与阴性对照组和空白对照组相比,S100A4 siRNA 转染组中卵巢癌 CP70 细胞迁移能力显著下降,表明 S100A4 的表达水平可影响肿瘤细胞迁移及侵袭能力。但在本文中我们未探讨 S100A4 影响细胞迁移的机制。但已有许多研究表明 MMPs(金属基质蛋白酶)与 S100A4 在肿瘤细胞的迁移过程中相互作用。Björnland K 等发现骨肉瘤细胞中下调 S100A4 的表达导致 MMP-2 和 MT1-MMP 表达下调,继而根据 Transwell 实验发现 MMP-2 下调的细胞迁移能力显著减弱^[19]。在前列腺癌细胞中亦发现细胞的迁移与 S100A4 和 MMP-9 的调控相关^[20]。在结直肠癌细胞中,沉默 S100A4 后与转移相关的四种基因 MMP9、MMP10、CDH11 表达下调,TIMP4 表达上调^[21]。我们推测 S100A4 在肿瘤的生长和转移中是通过一系列基因发挥其功能。

综上所述,我们目前的研究表明,siRNA 沉默 S100A4 的表达能够增强卵巢耐药细胞株 CP70 对顺铂的敏感性,促进 CP70 细胞凋亡,减弱 CP70 细胞的迁移能力。S100A4 参与肿瘤的发生发展,促进肿瘤细胞的迁移,并且与肿瘤耐药具有相关性。本研究提示 S100A4 有望成为潜在的靶点参与卵巢癌的治疗逆转卵巢癌耐药,提高卵巢癌患者的 5 年生存率。

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics,2010 [J]. CA Cancer J Clin,2010,60(5):277-300
- [2] Cannistra SA. Cancer of the ovary [J]. N Engl J Med, 2004,351(24): 2519-2529
- [3] Fu X, Tian J, Zhang L, et al. Involvement of microRNA-93,a new regulator of PTEN/Akt signaling pathway, in regulation of chemotherapeutic drug cisplatin chemosensitivity in ovarian cancer cells[J]. FEBS Lett, 2012,586(9):1279-1286
- [4] Han, L.Y., E. Kipps, and S.B. Kaye. Current treatment and clinical trials in ovarian cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2010,19(4): 521-534
- [5] Li Z H, Dulyaninova N G, House R P, et al. S100A4 regulates macrophage chemotaxis[J]. Mol Biol Cell,2010,21(15):2598-2610
- [6] Emberley E D, Murphy L C, Weston P H. S100 proteins and their influence on pro-survival pathways in cancer [J]. r.Biochem Cell Biol, 2004,82(4):508-515
- [7] Garrett S C, Varney K M, Weber K, et al. S100A4,a mediator of metastasis[J]. Biol Chem,2006,281(2):677-680
- [8] Feng L Z, Zheng X Y, Zhou L X, et al. Correlation between expression of S100A4 and VEGF-C,and lymph node metastasis and prognosis in gastric carcinoma[J]. Int Med Res,2011,39(4)1333-1343
- [9] 高静,辛晓燕,张颖. S100A4 与卵巢癌细胞顺铂耐药的相关性研究 [J]. 现代妇产科进展,2012,21(4):255-258
Gao Jing, Xin Xiao-yan, Zhang Ying. Relationship between S100A4 expression and platinum-based chemotherapy resistance in ovarian carcinoma[J]. Prog Obstet Gynecol,2012, (4):255-258
- [10] Boulikas T,Vougiouka M.Cisplatin and platinum drugs at the molecular level.(Review)[J]. Oncol Rep,2003,10(6):1663-1682
- [11] Stephane R. Gross·Connie Goh Then Sin·Roger Barraclough· Philip S. Rudland. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health [J]. Cell. Mol. Life Sci.2013.DOI 10.1007/s00018-013-1400-7[in press]
- [12] Pathuri P, Vogeley L, Luecke H. Crystal structure of metastasis-associated protein S100A4 in the active calcium-bound form [J]. J Mol Biol,2008,383(1):62-77
- [13] Valley KM, Rustandi RR, Ellis KC, et al. Solution structure of human Mts1 (S100A4) as determined by NMR spectroscopy [J]. Biochemistry, 2002, 41(42):12670-12680
- [14] Boye K, Maelandsmo GM, S100A4 and metastasis:a small actor playing many roles[J]. Am J Pathol,2010,176(2):528-525
- [15] Kim Y J, Kim M A, Im S A, et al. Nuclear expression of s100A4 and p53 predict relapse in curatively resected stage III and IV(M0)gastric cancer[J]. Cancer Invest,2008,26(2):152-158
- [16] Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, et al. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction [J]. J Biol Chem 2001, 276(25):22699-22708
- [17] EL Naaman C, Grum-Schwensen B, Mansouri A, Grigorian M, et al. Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene[J]. Oncogene, 2004, 23(20):3670-3680
- [18] Kjetil Boye and Gunhild M. Maelandsmo.S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles [J]. The American Journal of Pathology,2010, 176(2):528-535
- [19] Björnland K, Winberg JO, Odegaard OT, et al. S100A4 involvement in metastasis:deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme [J]. Cancer Res, 1999, 59(18):4702-4708
- [20] Saleem M, Kweon MH, Johnson JJ, et al. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103(40):14825-14830
- [21] Liyong HUANG, Ye XU, Guoxiang CAI, et al. Downregulation of S100A4 expression by RNA interference suppresses cell growth and invasion in human colorectal cancer cells [J]. Oncology reports, 2012,27(4):917-922