

S100A8/A9 蛋白对人舌鳞癌 SCC-25 及 CAL-27 细胞侵袭的影响*

鲍玲娜^{1**}, 马洪^{1***}, 李超², 孙俊泽¹

(1. 贵州医科大学附属口腔医院 口腔颌面外科, 贵州 贵阳 550004; 2. 四川省肿瘤医院·研究所 四川省癌症防治中心 头颈外科, 四川 成都 610000)

[摘要] 目的: 探讨外源性 S100A8/A9 蛋白对人舌鳞癌细胞 SCC-25 及 CAL-27 侵袭能力的影响。方法: 人舌鳞癌 SCC-25 及 CAL-27 细胞分别分为实验组及对照组, 实验组用 5 mg/L S100A8/A9 蛋白干预 24 h, 对照组添加等量培养基; 采用 Transwell 小室侵袭实验检测 SCC-25 及 CAL-27 细胞侵袭情况, 实时定量 PCR (RT-qPCR) 检测 SCC-25 及 CAL-27 细胞中基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 及 MMP-9 基因的表达情况。结果: 与对照组比较, 实验组 SCC-25 及 CAL-27 细胞在 Transwell 小室中降解人工基底膜并穿过聚碳酸酯膜的能力增强 ($P < 0.05$), 且实验组 SCC-25 及 CAL-27 细胞 MMP-2 及 MMP-9 的基因相对表达量增加 ($P < 0.05$)。结论: 5 mg/L 外源性 S100A8/A9 蛋白能增强舌癌 SCC-25 及 CAL-27 细胞的侵袭能力, 其机制可能与 S100A8/A9 蛋白影响两种细胞中 MMP-2 及 MMP-9 表达有关。

[关键词] 舌肿瘤; 癌; 钙卫蛋白; 细胞侵袭; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R739.86 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)11-1283-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.11.008

Effect of S100A8/A9 Protein on Invasion of Human Tongue Squamous Cell Carcinoma Cells SCC-25 and CAL-27

BAO Lingna¹, MA Hong¹, LI Chao², SUN Junze¹

(1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital of Stomatology Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Dept. of Head and Neck Surgery, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Cancer Center, Chendu 610000, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of exogenous S100A8/A9 protein on the invasive ability of human tongue squamous cell carcinoma (TSCC) SCC-25 and CAL-27 and to provide a theoretical basis for the study of the mechanism of invasion and metastasis of S100A8/A9 protein in tongue squamous cell carcinoma. **Methods:** Human tongue squamous cell carcinoma scc-25 and cal-27 cells were divided into the experimental group and the control group respectively. The experimental group was treated with 5 mg/L S100A8/A9 protein for 24 h, and the control group was treated with the same amount of medium. Transwell cell invasion assay was used to detect the invasion of S100A8/A9 protein on SCC-25 and CAL-27 cells after 24 hours. RT-q PCR was used to detect the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) genes in SCC-25 and CAL-27 cells. **Results:** Compared with the control group, adding 5 mg/L exogenous S100A8/A9 protein could enhance the ability of SCC-25 and CAL-27 cells of the experimental group to degrade artificial basement membrane and pass through polycarbonate membrane in Transwell chamber ($P <$

*[基金项目] 贵州省教育厅项目[黔科合外 KY 字(2017)005]

** 贵州医科大学 2019 届硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: mahong1966@126.com

网络出版时间: 2019-11-21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191120.2125.008.html>

0.05), and the relative expression of MMP-2 and MMP-9 genes was increased ($P < 0.05$).

Conclusion: 5 mg/L exogenous S100A8/A9 protein can enhance the invasion ability of tongue cancer scc-25 and cal-27 cells, and the mechanism may be related to the influence of S100A8/A9 protein on the expression of mmp-2 and mmp-9, which may provide a potential biomarker for targeted therapy of tongue squamous cell carcinoma.

[**Key words**] tongue neoplasms; carcinoma; calprotectin; cell invasion; matrix metalloproteinases-2; matrix metalloproteinases-9

舌癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是口腔癌中最常见的种类,预后较差,患者5年生存率较低^[1]。根据 Globocan 及世界卫生组织(WHO)公布的最新统计数据显示,2018年在我国口腔癌新发病例达到28 730例,死亡病例13 805例^[2],在科学技术日益发展的今天,仍无法有效干预 TSCC 的侵袭和转移,导致其复发率及病死率未得到明显改善。S100A8/A9 蛋白又称钙卫蛋白(calprotectin),是由 S100 蛋白家族中的重要成员, S100A8 和 S100A9 蛋白以 Ca^{2+} 依赖形式形成异二聚体复合物,在中性粒细胞及单核细胞中大量表达,参与肿瘤的免疫反应^[3-4]。研究显示,较高浓度的 S100A8/A9 蛋白可以促使肿瘤细胞凋亡,而在低浓度时可促进肿瘤细胞增殖与迁移^[5-7]。基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类蛋白质水解酶,参与细胞外基质和基底膜的降解,与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[8]。MMP-2 和 MMP-9 能够降解基底膜最重要的成分 IV 型胶原,从而促进肿瘤细胞的转移,被认为是肿瘤侵袭转移过程中最直接、最重要的金属蛋白酶^[9-10]。本实验通过研究 5 mg/L 外源性 S100A8/A9 蛋白对舌鳞癌细胞 SCC-25 及 CAL-27 的侵袭能力和对 MMP-2 及 MMP-9 表达的影响,为 S100A8/A9 蛋白在舌鳞癌细胞侵袭转移中的相关机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人舌鳞癌细胞 SCC-25 及 CAL-27 购自美国模式菌种收集中心(ATCC,美国),DMEM/F-12 培养基、胰蛋白酶及青链霉素混合液购自美国 Gibco 公司,细胞培养瓶、离心管、Transwell 小室及 Matrigel matrix 购自美国 BD 公司,胎牛血清(BI,以色列),4%多聚甲醛溶液(Leagene,中国),0.1%结晶紫染色液(Solaibio,中国),TriPure RNA Isolation Rea-

gent (Roche, 美国), PrimeScript™ RT reagent Kit (TAKARA, 日本)。生物安全柜(ESCO, 美国),倒置显微镜(OLYMPUS, 日本),实时荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 SCC-25 及 CAL-27 细胞按 ATCC 官方说明分别培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM/F-12 及 DMEM 完全培养基中,在 37 °C、5% CO_2 的细胞培养箱内培养,待细胞生长至 80% ~ 90% 时进行传代。将 SCC-25 及 CAL-27 细胞分别分为实验组及对照组,实验组用 5 mg/L S100A8/A9 蛋白进行干预 24 h,对照组添加等量培养基。

1.2.2 细胞侵袭实验 将 S100A8 和 S100A9 重组蛋白以 1:1 的质量比均匀混合,置于 4 °C 冰箱作用 1 h,使之结合形成 S100A8/A9 复合物^[7]。取对数生长期的 SCC-25 及 CAL-27 细胞进行清洗、消化、重悬,并调整细胞浓度约 1×10^5 个/mL。用对应培养基以 1:5 稀释 Matrigel matrix 并铺在 Transwell 小室底部,取 0.2 mL 细胞悬液接种于 Transwell 小室,在下室内添加 0.5 mL 完全培养基,实验组在培养基中加入 5 mg/L S100A8/A9 蛋白;4 h 后取出小室,于 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,清洗、风干,镜下放大 400 倍观察结晶紫染色情况并随机选取 5 个视野拍照,计数每个视野中的穿聚碳酸酯膜细胞数。

1.2.3 实时定量 PCR (RT-qPCR) 分别用 Tri-pure 法提取各细胞样本的总 RNA,按逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 制备。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计及合成,内参基因为 GAPDH,行 MMP-2 及 MMP-9 基因实时定量 PCR 扩增。MMP-2 引物 F 链为 CTGATGTCCAGCGAGTGGAT、R 链为 CTTACCTCATTGTATCTCCAGAA, MMP-9 引物 F 链为 CAGTACCGAGAGAAAGCCTATT、R 链为 CAGGATGTCATAGGTCACGTAG, GAPDH 引物 F 链为 GTATCGTGAAGGACTCATGAC、R 链为 AC-

CACCTTCTTGATGTCATCAT。反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法计算各组 *MMP-2* 及 *MMP-9* 基因的相对表达量。

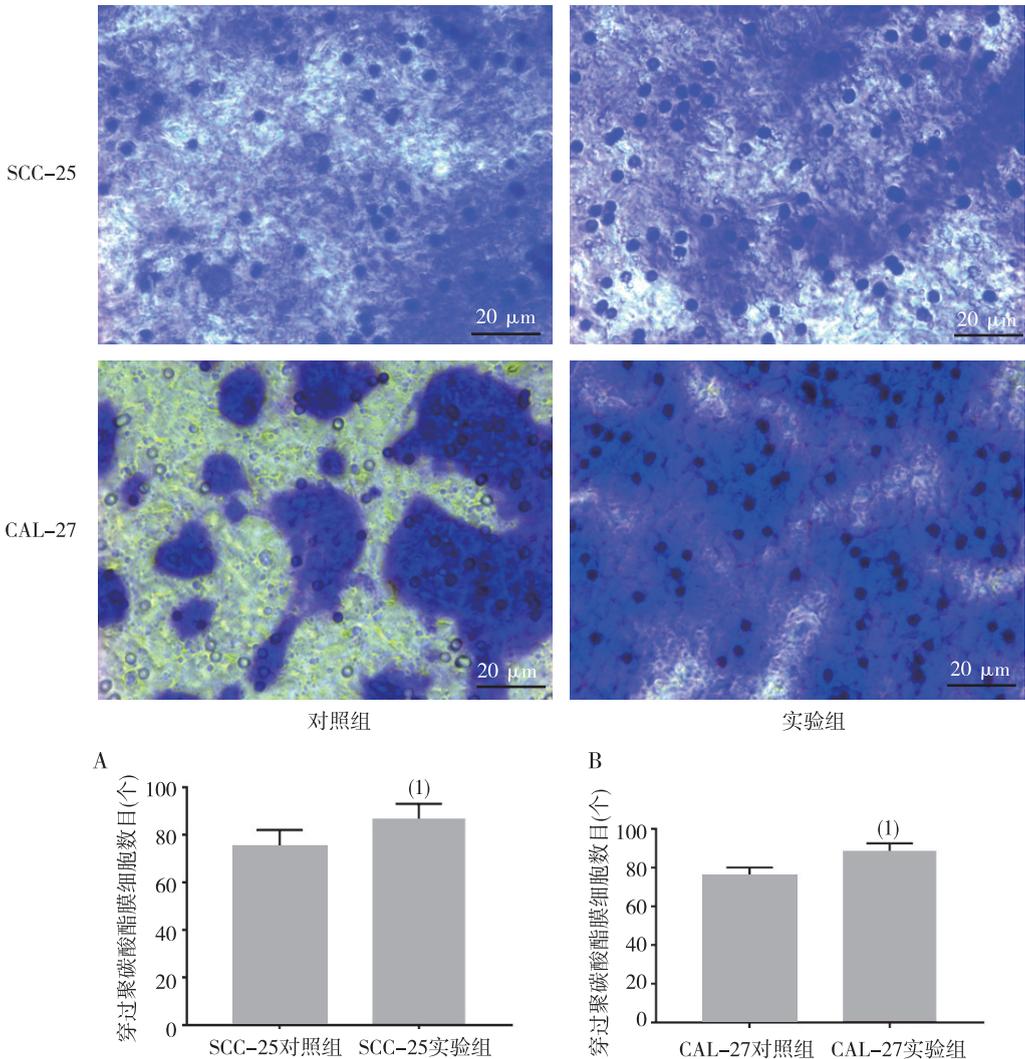
1.3 统计学方法

所有实验重复 3 次, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Graphpad prism7.0 软件进行分析, 2 组比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞侵袭能力

实验结果显示, 与对照组比较, 实验组降解人工基底膜并穿过聚碳酸酯膜的 SCC-25 及 CAL-27 细胞数目明显增加 ($P < 0.05$), 说明 5 mg/L S100A8/A9 蛋白能提高 SCC-25 及 CAL-27 细胞的迁移及侵袭能力。见图 1。



注: ⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$ 。

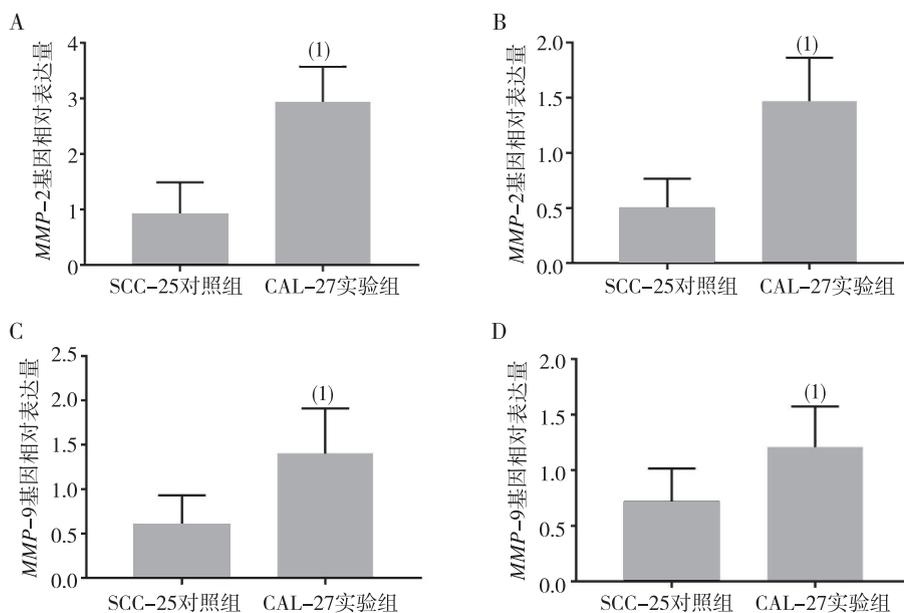
图 1 S100A8/A9 蛋白对 SCC-25 及 CAL-27 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫染色, $\times 40$)

Fig. 1 Effect of S100A8/A9 protein on invasion ability of SCC-25 and CAL-27 cells

2.2 *MMP-2* 及 *MMP-9* 基因表达

实验组 SCC-25 及 CAL-27 细胞中 *MMP-2* 及 *MMP-9* 基因表达水平均有不同程度升高, 实验组 SCC-25 细胞中 *MMP-2* 及 *MMP-9* 基因表达量分别

是对照组的 3.20 及 2.35 倍, 实验组 CAL-27 细胞中 *MMP-2* 及 *MMP-9* 基因表达量分别是对照组的 2.88 及 1.68 倍, 2 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



注: (*)与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图2 S100A8/A9 蛋白对 SCC-25 及 CAL-27 细胞中 MMP-2 及 MMP-9 基因表达的影响

Fig.2 Influence of S100A8/A9 on the relative expression amount of MMP-2 and MMP-9 genes of SCC-25 and CAL-27 cells

3 讨论

TSCC 的发生发展是多因素、多阶段、多机制共同调控而成,主要危险因素包括大量持续咀嚼槟榔、吸烟、饮酒、HPV 感染、锐利牙尖长期机械刺激、黏膜白斑、红斑及其他理化因素等,这些因素引起基因突变,通过复杂机制造成。S100A8 蛋白和 S100A9 蛋白主要存在于细胞质中,在中性粒细胞(占有胞浆蛋白的 45%)、单核细胞等髓系细胞中大量表达,又称为髓系相关蛋白(myeloid related protein, MRP) 8 型及 14 型^[4,11]。肿瘤细胞激活后,S100A8/A9 复合体以两种不同的移位途径分泌,其一根据细胞内 Ca^{2+} 浓度水平,使得 S100A8/A9 蛋白转移到细胞骨架和质膜;其二依赖于蛋白激酶 C 的激活,S100A8/A9 蛋白被特异性的分泌到细胞外环境而发挥生物学作用^[12]。S100A8/A9 蛋白作为 MRP 可与髓系抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 相互作用,一方面 MDSCs 合成、分泌 S100A8/A9 蛋白;另一方面,S100A8/A9 蛋白可与 MDSCs 表面的晚期糖基化终末产物受体(peceptor of advanced glycation end products, RAGE)上的羧酸化 N 聚糖结合,通过转录因子

核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)信号途径,促进 MDSCs 的聚集^[13]。这一过程可形成反馈环,促进 MDSCs 向肿瘤部位迁移,抑制宿主介导的抗肿瘤免疫应答,从而促进肿瘤的发生发展^[3-4,14]。

肿瘤细胞通过其表面受体与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的某些成分结合后而激活或分泌蛋白降解酶类(主要为 MMPs)来降解 ECM,侵袭细胞基底膜(basement membrane, BM),使肿瘤细胞的包膜破坏形成转移通道而促进肿瘤细胞的转移^[15]。另外,MMPs 也可直接作用于肿瘤细胞,释放促进生长或抑制凋亡的细胞因子。MMPs 在结构、分子功能和参与肿瘤进展方面的特性为更有效地靶向肿瘤治疗提供了新的途径^[16]。在口腔鳞癌的研究中发现,MMP-2 的过表达是肿瘤侵袭的必要条件,并且与口腔鳞癌局部复发之间存在显著的相关性,MMP-2 下调可减少肿瘤血管生成^[17],说明 MMP-2 和 MMP-9 的表达在口腔鳞癌的发生发展中起着重要的作用。

在本实验中,通过对 Transwell 小室底部铺一层基质胶来人工模拟肿瘤细胞降解基底膜而发生侵袭的过程,该基质胶是从富含胞外基质蛋白的 EHS 小鼠肉瘤中分离得到,其主要成分是层黏连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、生长因子及基质金属蛋白

等。在室温下,它可以聚合形成具有生物学活性的三维基质进而模拟体内细胞基底膜的结构、组成以及物理化学特性等。通过甲醛固定及结晶紫染色检测到在 5 mg/L 外源性 S100A8/A9 蛋白作用下,SCC-25 及 CAL-27 细胞降解基质胶发生侵袭的作用明显增强,穿过小室底部的聚碳酸酯膜的细胞数明显增多。实验也通过 RT-qPCR 检测到经过 5 mg/L 外源性 S100A8/A9 蛋白处理后,SCC-25 及 CAL-27 细胞中与侵袭转移密切相关蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 基因表达量明显增多,说明 5 mg/L 外源性 S100A8/A9 蛋白可以增强 SCC-25 及 CAL-27 细胞的侵袭转移能力,提示 S100A8/A9 蛋白可能在 TSCC 局部侵袭及转移过程中发挥重要的作用,从而与 TSCC 的不良预后密切相关。

随着肿瘤分子生物学的不断深入研究,对于 TSCC 的研究范围也得以延伸,如 TSCC 发生前因素口腔黏膜白斑和红斑、HPV 感染、DNA 甲基化等,TSCC 发生中通路 Wnt/ β -Catenin、p38 MAPKs、SAP/JNK 磷酸化、NF- κ B、EMT 等研究逐渐成为热点;有针对细胞周期、活性氧簇、细胞凋亡家族(Bcl-2 家族、caspase 家族)等的相关研究,研究技术也不断更新,有体内可视化、荧光内镜、唾液和血清检测及 siRNA 技术等。随着分子生物学技术水平的发展,科研的深度及广度可大大提高,探究敏感的肿瘤标志物有利于改善 TSCC 患者的生存率以及减少其复发率。

综上所述,5 mg/L 外源性 S100A8/A9 蛋白能增强 TSCC 细胞的侵袭能力、增加 MMP-2 和 MMP-9 基因表达,S100A8/A9 蛋白可能在 TSCC 侵袭进展中发挥重要作用,可作为潜在的 TSCC 标志物进行深入研究。

4 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(1):7-30.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018,68(6):394-424.
- [3] BRESNICK A R, WEBER D J, ZIMMER D B. S100 proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2015,15:96-100.
- [4] SHABANI F, FARASAT A, MAHDAVI M, et al. Calprotectin (S100A8/S100A9): A key protein between inflammation and cancer[J]. Inflamm Res, 2018,67(10):801-812.
- [5] ANG C W, NEDJADI T, SHEIKH A A, et al. Smad4 loss is associated with fewer S100A8-positive monocytes in colorectal tumors and attenuated response to S100A8 in colorectal and pancreatic cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2010,31(9):1541-1551.
- [6] KWON C H, MOON H J, PARK H J, et al. S100A8 and S100A9 promotes invasion and migration through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent NF- κ B activation in gastric cancer cells [J]. Mol Cells, 2013,35(3):226-234.
- [7] 何芹. 钙结合蛋白 S100A8 和 S100A9 对鼻咽癌侵袭和迁移的影响[D]. 南宁:广西医科大学, 2015.
- [8] CHEN H, XU C, JIN Q, et al. S 100 protein family in human cancer [J]. Am J Cancer Res, 2014,4(2):89-115.
- [9] HOMA-MLAK I, MAJDAN A, MLAK R, et al. Metastatic potential of NET in neoplastic disease [J]. Postepy Hig Med Dosw, 2016,70(10):887-895.
- [10] GHAVAMI S, RASHEDI I, DATTILO B M, et al. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth Via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway [J]. Leukoc Biol, 2008,83(6):1484-1492.
- [11] SCHIOPU A, COTOI OS. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease [J]. Mediators Inflamm, 2013,2013:828354.
- [12] GOYETT E J, GEZCY C L. Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function [J]. Amino Acids, 2011,41(4):821-842.
- [13] SINHA P, OKORO C, FOELL D, et al. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells [J]. J Immunol, 2008,181(7):4666-4675.
- [14] GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells [J]. Cancer Immunol Res, 2017,5(1):3-8.
- [15] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000,100:57-70.
- [16] RADISKY E S, RADISKY D C. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets [J]. Front Biosci, 2015,20:1144-1163.
- [17] JAFARIAN A H, VAZIFE MOSTAAN L, MOHAMMADI-AN ROSHAN N, et al. Relationship between the expression of matrix metalloproteinase and clinicopathologic features in oral squamous cell carcinoma [J]. Iran J Otorhinolaryngol, 2015,27(80):219-223.

(2019-09-02 收稿, 2019-10-15 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 冉海勇