

# S100a7蛋白在体外培养人视网膜色素上皮细胞中的表达及功能★

许光军, 张学东, 陈雪梅

## Expression identification and preliminary function analysis of S100a7 in retinal pigment epithelial cells cultured *in vitro*

Xu Guang-jun, Zhang Xue-dong, Chen Xue-mei

### Abstract

**BACKGROUND:** S100a7 is a new protein that participates in cell proliferation, vascularization and other pathophysiological processes.

**OBJECTIVE:** To discuss the expression of S100a7 in retinal pigment epithelial cell (RPE) and to investigate the effects of S100a7 on RPE proliferation.

**METHODS:** Immunofluorescence and western blot techniques were used to detect the expression of S100a7 in ARPE-19, and MTT was performed to investigate the effects of S100a7 on RPE proliferation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** S100a7 was proven to be expressed in ARPE-19 by immunofluorescence and western blot techniques and it could significantly promote ARPE-19 cell proliferation. This study first confirmed the expression of S100a7 in ARPE-19 cells, which may play a specific role in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy.

Xu GJ, Zhang XD, Chen XM. Expression identification and preliminary function analysis of S100a7 in retinal pigment epithelial cells cultured *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(37): 6909-6912. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing 400016, China

Xu Guang-jun★, Studying for master's degree, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing 400016, China 308855959@qq.com

Correspondence to: Zhang Xue-dong, Professor, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, Chongqing Eye Institute, Chongqing 400016, China zxued@sina.com

Received: 2011-03-09  
Accepted: 2011-03-24

### 摘要

**背景:** S100a7 蛋白在细胞增殖、血管形成等病理生理过程中发挥重要作用,但在视网膜色素上皮细胞中的作用少有报道。

**目的:** 探讨 S100a7 蛋白在体外培养人视网膜色素上皮细胞中的表达及作用。

**方法:** 体外培养 ARPE-19 细胞株,通过免疫荧光及 Western blot 技术,检测 S100a7 在 ARPE-19 细胞中的表达;不同稀释度(1:1 000, 1:10 000, 1:100 000)S100a7 蛋白抗体与 ARPE-19 细胞共培养,通过 MTT 技术检测 S100a7 蛋白在人视网膜色素上皮细胞增殖过程中的作用。

**结果与结论:** 免疫荧光及 Western blot 技术证实该蛋白在 ARPE-19 细胞中表达;MTT 实验结果显示,人视网膜色素上皮细胞加入 S100a7 抗体 72 h 后,各浓度处理组的吸光度值较对照组显著均降低( $P < 0.05$ )。结果证实 S100a7 蛋白在人视网膜色素上皮细胞中的表达,并明显促进人视网膜色素上皮细胞增殖。

**关键词:** 人视网膜色素上皮细胞; S100a7 蛋白; MTT 法; 免疫荧光; Western blot

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.37.017

许光军,张学东,陈雪梅. S100a7 蛋白在体外培养人视网膜色素上皮细胞中的表达及功能[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(37):6909-6912. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelial cell, RPE) 是增殖性玻璃体视网膜疾病发生发展的主要细胞,其受到损伤刺激后迁移和异常增殖是该类疾病的主要病理过程<sup>[1]</sup>。S100a7 蛋白又名牛皮癣素, S100a7 是 S100 蛋白家族新成员,它的过表达与一些癌的发生和转移密切相关,在细胞增殖、血管形成等病理生理过程中发挥重要作用<sup>[2-3]</sup>。

S100a7 蛋白在视网膜色素上皮细胞中的定位以及视网膜色素上皮细胞增殖过程中的作用少有报道。实验拟通过体外培养视网膜色素上皮细胞系 ARPE-19,以期证明 S100a7 蛋白在该细胞中的表达,并初步分析其对 ARPE-19 细胞增殖的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学体外观察

**时间及地点:** 实验于 2010-06/2010-10 在眼科学重庆市省部级重点实验室完成。

**材料:**

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
鼠抗人 S100a7 蛋白抗体	台湾 Abvon 公司
山羊抗小鼠 FITC 荧光二抗	武汉博士德生物工程有限公司
MTT 试剂盒	碧云天生物技术有限公司
荧光正置显微镜	德国 Leica 公司
多功能酶标仪	美国 MD 公司
凝胶成像仪	美国 Bio-Rad 公司
胎牛血清	美国 Gibco 公司

重庆医科大学附属第一医院眼科, 眼科学重庆市省部级重点实验室, 重庆市眼科研究所, 重庆市 400016

许光军★, 男, 1982年生, 山东省乐陵市人, 汉族, 重庆医科大学硕士在读, 主要从事眼底病研究。308855959@qq.com

通讯作者: 张学东, 教授, 重庆医科大学附属第一医院眼科, 眼科学重庆市省部级重点实验室, 重庆市眼科研究所, 重庆市 400016 zxued@sina.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225  
(2011)37-06909-04

收稿日期: 2011-03-09  
修回日期: 2011-03-24  
(20110112016/ZW S)

ARPE-19细胞株购买于美国ATCC细胞库。

#### 实验方法:

**细胞培养:** 将ARPE-19细胞置于37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>培养箱中行细胞培养<sup>[4]</sup>, 所用培养液为含有体积分数为10%的新生牛血清、100 mg/L青霉素和100 mg/L链霉素的低糖DMEM完全培养液。

取3~5代细胞用于实验, 用免疫荧光技术及Western blot技术检测S100a7在ARPE-19细胞中的表达。

**免疫荧光法检测定位S100a7蛋白:** 取第3~5代ARPE-19细胞, 1×10<sup>5</sup>/孔接种于放置有0.8 mm×0.8 mm的24孔板板孔中, 加培养基至500 μL/孔培养过夜做细胞爬片。吸净各培养孔中的培养液, PBS清洗爬片2次, 5 min/次, 4 g/L多聚甲醛固定细胞10min, 体积分数0.3%triton打孔5 min, PBS清洗。

用体积分数1%胎牛血清封闭30 min后, 鼠抗人S100a7抗体与体积分数1%胎牛血清按1:200混合, 实验组每个培养孔中加入上述培养液250 μL, 对照组每孔中加入等量的PBS, 将培养板置于湿盒中, 于37℃孵箱中孵育2 h; 将各孔中液体吸出, PBS清洗4次, 5 min/次, 每孔中加入体积比为1:64的山羊抗小鼠FITC荧光二抗, 37℃避光条件下孵育45 min, 将每孔中的小盖玻片小心取出, 体积分数50%甘油封固, 正置显微镜下观察。

**Western blot检测S100a7蛋白:** 使用三去污裂解液裂解细胞, 提取第3~6代细胞膜蛋白检测S100a7, 设置4个泳道, 分别加入不同代次细胞蛋白提取液。蛋白定量试剂盒做蛋白定量, 按照40 μg蛋白/泳道上样, 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(标准蛋白为MBI公司预染的标准蛋白), 4℃下90 V电转移75 min至PVDF滤膜, 50 g/L脱脂奶粉封闭过夜, 加入鼠源抗S100a7一抗(1:500), 37℃孵育2 h, TBST漂洗3次, 加碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠二抗(1:5000), 37℃孵育1 h, TBST漂洗3次, 每次10 min, 化学发光法显色后用Bio-Rad成像系统成像, Quantity One软件分析成像条带吸光度值。

**MTT实验检测细胞增殖:** 取第3~5代ARPE-19细胞1×10<sup>4</sup>/孔接种于96孔板中, 每孔中加入培养基至100 mL, 实验组和对照组各设4个复孔, 实验组在细胞过夜贴壁后, 分别用稀释倍数为1:1000, 1:10000, 1:100000

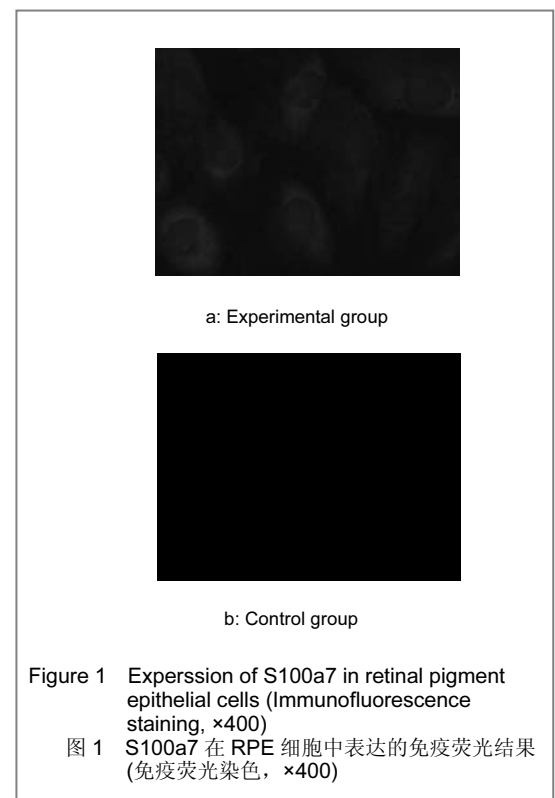
的S100a7抗体处理细胞, 以不加抗体的细胞孔作为对照, 在37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>恒温孵箱中培养, 分别在24, 48, 72 h时, 向各孔中加入5 g/L的MTT溶液20 μL, 继续培养4 h后, 每孔中加入Formazan溶解液100 μL, 继续孵育至紫色结晶全部溶解, 在570 nm测定吸光度值。

**统计学处理:** 采用SPSS 13.0软件对数据进行分析, 不同浓度组与对照组和各实验组的组间比较采用LSD-*t* 检验。

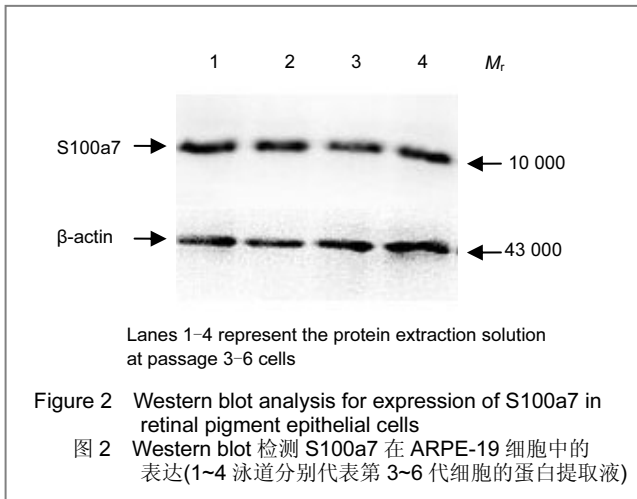
实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 S100a7在ARPE-19细胞中的表达** 通过荧光正置显微镜观察处理好的细胞爬片, 结果显示S100a7蛋白在ARPE-19细胞的胞浆中表达, 在胞核中不表达, 而在对照组中细胞中未见荧光显示, 见图1。



**2.2 Western blot检测S100a7蛋白的表达** 通过对ARPE-19细胞蛋白提取物的Western blot检测, 结果显示S100a7蛋白明显表达于该细胞中, 得到的PVDF膜在相应相对分子质量区域( $M_r$  11 000)出现一长条形抗原条带, 即为检测到的S100a7蛋白, 见图2。



### 2.3 MTT法检测细胞增殖结果分析 见表1。

表1 不同稀释度 S100Aa7 蛋白抗体处理后细胞的吸光度值  
Table 1 Absorbance of cells treated with different concentrations of S100a7 antibody (x±s)

Antibody dilution	24 h	48 h	72 h
0 (control group)	0.209±0.016	0.199±0.013	0.215±0.008
1:10 <sup>3</sup>	0.196±0.021	0.196±0.01	0.192±0.051 <sup>a</sup>
1:10 <sup>4</sup>	0.197±0.005	0.193±0.038	0.188±0.033 <sup>a</sup>
1:10 <sup>5</sup>	0.201±0.006	0.184±0.046	0.193±0.085 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, vs. control group

表1可见对照组与实验组在24和48 h时, 不同浓度处理细胞的吸光度值差异均无显著性意义(P > 0.05), 实验组细胞加入抗体72 h后, 各浓度处理组的吸光度值较对照组降低(P < 0.05), 不同浓度组间的吸光度值差异无显著性意义(P > 0.05), 结果表明S100a7蛋白对细胞增殖具有促进作用, 并且具有时间依赖性, 而对浓度依赖的关系不明显。

### 3 讨论

RPE是导致增殖性视网膜病变和糖尿病视网膜病变等增殖性玻璃体病变的重要细胞之一, 当其在体外或是受到损伤刺激时就会进入增殖状态并产生大量细胞因子, 包括血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子、转化生长因子, 促使RPE向视网膜下及玻璃体腔内游离游走, 然后增殖发展成膜, 最终导致牵拉性的视网膜脱离<sup>[5]</sup>。在这一过程中, 细胞-细胞因子之间的相互作用、相互调节, 启动并调控着疾病的发展过程。

S100a7是一种主要参与细胞增殖、信号传导、抗菌与血管形成等病理生理过程的蛋白<sup>[6-8]</sup>, 近年来, 对它在肿瘤发生发展中的作用的研究较多, 结果显示S100a7在肿瘤组织中呈高表达, 可能参与了肿瘤细胞

增殖分化过程, 并且与预后较差成正相关<sup>[9-10]</sup>。而在对乳腺导管内原位癌患者的肿瘤组织的研究中发现, S100a7蛋白的表达水平与肿瘤内新生血管数量呈正相关<sup>[9]</sup>, 提示该蛋白对新生血管的形成有促进作用。S100a7蛋白还是一种高效的、具有选择性的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、中性粒细胞趋化因子, 可以使T淋巴细胞、中性粒细胞向炎症病灶游走、趋化<sup>[11]</sup>。实验发现, S100a7对RPE细胞增殖的促进作用主要和作用时间有关, 而与其浓度的关系不显, 推测与其高效性有关, 即在低浓度的情况下技能发挥高效的生物学作用<sup>[12]</sup>, 但其详细的作用机制仍需要做进一步的研究。

RPE细胞的迁移、去分化、异常增殖等生物学行为的改变在增殖性视网膜病变和糖尿病视网膜病变发生发展过程中具有重要的作用, 成为近期研究多种眼底病变的切入点, 发现了多种与疾病相关的细胞因子, 并为该类疾病的治疗提供了新的靶点<sup>[13]</sup>。总之, 本实验通过体外培养RPE细胞, 运用免疫荧光技术及Western blot技术成功验证了S100a7蛋白在该细胞中的表达, 并初步证实了该蛋白对RPE细胞的增殖具有明显的促进作用。

### 4 参考文献

- [1] Naginini CN, Kutty V, Detrick B, et al. Expression of PDGF and their receptors in human retinal pigment epithelial cells and fibroblasts: regulation by TGF-beta. *J cell physiol.* 2005;203(1): 35-43.
- [2] Madsen P, Rasmussen H, Lefers H, et al. Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasis" that is highly up-regulated in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 1991;97(3):701-712.
- [3] Moubayed N, Weichenthal M, Harder J, et al. Psoriasis (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours. *Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133(4):253-261.
- [4] Wang YS, Yan M. *Zhonghua Yandibing Zazhi.* 1996;12(3): 174-176.  
王雨生, 严密. 可见光对原代培养人视网膜色素上皮细胞的光化学损伤[J]. *中华眼底病杂志.* 1996, 12(3):174-176.
- [5] Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia inducible factors. *Exp Eye Res.* 2006;83(3): 473-483.
- [6] Linkskee KC, Eckert RL. S100A7(Psoriasis)-mechanism of antibacterial action in wounds. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4): 945-957.
- [7] LinksWebb M, Emberley ED, Lizardo M, et al. Expression analysis of the mouse S100A7/psoriasis gene in skin inflammation and mammary tumori-genesis. *BMC Cancer.* 2005;5:17.
- [8] Paruchuri V, Prasad A, McHugh K, et al. S100A7-downregulation inhibits epidermal growth factor-induced signaling in breast cancer cells and blocks osteoclast formation. *PLoS One.* 2008; 3(3): e1741.
- [9] Emberley ED, Niu Y, NjHe C, et al. Psoriasis(S100A7)expression is associated with poor outcome in estrogen receptor-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2627-2631.
- [10] Krop I, Marz A, Carlsson H, et al. A putative role for psoriasis in breast tumor progression. *Cancer Res.* 2005;65(24):11326-11334.
- [11] Pone S, Heinanen S, Mantjarvi R, et al. Pmfiasin, a calcium-binding protein with chemotactic properties is present in the third trimester amniotic fluid. *Mol Hum Reprod.* 2005;11(2):87-92.
- [12] Yao JQ, Liu QH, Chen X, et al. Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the proliferation of ARPE-19 cells. *Biomed Sci.* 2010;17(1):30.
- [13] Lu ML, Li M, Xia H, et al. Yanke Yanjiu. 2008;26(5):369-372.  
吕明良, 李敏, 夏辉, 等. 曲安奈德对体外培养的人视网膜色素上皮细胞HSP47表达的影响[J]. *眼科研究.* 2008, 26(5):369-372.

来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 由第二作者负责本实验总体设计、实验进度及实验结果评估和文章的审校工作, 第一、三作者负责实验实施, 第一作者负责成文, 第一、二作者对本文负责。

**致谢:** 感谢眼科学重庆市省部级重点实验室为本实验提供实验场所、实验设备, 感谢该实验室研究员彭周贵老师、陈飞龙博士在实验方面给予的技术指导与支持, 感谢重庆医科大学附属第一医院眼科学博士陈颖师姐和重庆医科大学附属第二医院吴春荣同学在细胞培养方面提供的技术指导,

感谢我的同学周钟强、宫伟和郭蓓蓓在本文成文和修改过程中提供的帮助。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新性:** 截止作者投稿时, 用关键词 S100a7 在PubMed 数据库进行检索, 共检索出相关文章 244 篇, 主要集中于皮肤病、肿瘤等领域的研究, 在眼科疾病中的研究少见报道。同时, 未检索到与本文内容一致的文献, 因此, 本文具有一定的先进性

**NRR编辑致作者:**



如果您是在读博士,  
毕业论文需要在SCI收录期刊上;  
如果您要申请博士或博士后导师,  
需要有SCI收录期刊发表的论文;  
如果您要申请国家级基金或基金结题,  
需要有SCI收录期刊发表论文的先期成绩;  
如果您需要在SCI收录期刊发表论文,  
欢迎选择NRR杂志!

**NRR杂志介绍:**

《中国神经再生研究(英文版)》  
(NRR)杂志, 2008年1月被SCIE,  
CA, SCOPUS, EM, IC等国际  
重要数据库收录, 同时被  
中国统计源期刊(英文版),  
中国科学引文数据库核心版收录,  
并被美国OVID期刊全文数据库  
收录, 可同时被全球2000余家  
机构检索和阅读。



ISSN:1673-5374 CN:11-5422/R



网址: www.crter.org 电子期刊: cn.sjzsj.com

SCI收录的《中国神经再生研究(英文版)》杂志  
Neural Regeneration Research(NRR)

尊敬的作者:  
当你有最优秀的稿件时,  
我是否找到了你?  
当你想最快发表文章时,  
你是否选择了我?

严格审稿录用后  
一般稿件  
6个月发表!

国家级各类基金资助优秀稿件

抢国际首发权稿件  
保证3个月发表!

NRR杂志总编辑



苏国祥 教授  
中国科学院院士  
香港大学李嘉诚  
医学院解剖学系  
讲座教授  
系主任

徐晓明 教授  
印第安纳大学医学院  
Mari Hulman George  
讲座教授解剖和细胞  
生物学系教授  
NIH评审专家

2011年6月  
SCI (CJR)  
首次公布  
影响因子  
0.18

**NRR杂志喜欢的稿件内容重点:**

- 神经发生、神经可塑性及神经再生
- 神经干细胞与神经再生
- 组织工程与神经再生
- 神经退行性变与神经再生
- 中枢神经系统的再生
- 基因治疗与神经再生
- 神经再生的新兴技术
- 周围神经系统的再生
- 中医药与神经再生
- 神经再生的转化医学

**稿件体例:**

论著、综述、学术探讨、询证医学、  
研究方法与报告、临床实践、病例分析等  
详见: www.nrronline.org网址 "About Journal"  
稿件模板:  
详见: www.nrronline.org网址 "Author Instructions"