论著

文章编号:1000-5404(2012)15-1576-04

结肠癌中S100A2的表达及其与Wnt/β-catenin通路的相关性

杨 勇[1],朱明才[1],段 亮[2],周 兰[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院胃肠外科[1],重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室[2])

[摘要] **目的** 探讨钙结合蛋白S100A2与Wnt/β-catenin信号通路关键分子β-catenin、pGSK-3β在人结肠癌组织中的表达和意义以及相关性。**方法** 采用免疫组化和Western blot方法检测42例结肠癌及癌旁正常组织中S100A2、β-catenin和pGSK-3β的表达情况,分析它们与结肠癌临床病理参数的关系,进一步采用Pearson等级相关分析其相关性。**结果** ①免疫组化显示S100A2和β-catenin主要定位于癌细胞核和(或)细胞质,而pGSK-3β主要定位于癌细胞质;②Western blot结果显示S100A2、β-catenin和pGSK-3β在结肠癌组织中均高表达,明显高于癌旁正常组织($P<0.01$),三者在结肠癌Dukes C+D期中的表达明显高于A+B期($P<0.01$),在有淋巴结转移组的表达明显高于无淋巴结转移组($P<0.01$);③S100A2分别与β-catenin、pGSK-3β的表达呈明显正相关($r=0.637$,$P<0.01$;$r=0.626$,$P<0.01$)。**结论** S100A2可能通过调节Wnt/β-catenin通路关键分子而参与结肠癌的发生、发展。

[关键词] 结肠癌;S100A2;Wnt/β-catenin
[中图法分类号] R735.35; R341; R730.23 [文献标志码] A

Correlation of S100A2 expression and wnt/β-catenin signaling pathway in human colon cancer

Yang Yong[1], Zhu Mingcai[1], Duan Liang[2], Zhou Lan[2] ([1] Department of Gastrointestinal Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; [2]Key Laboratory of Clinical Examination Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation of the expression of S100A2 with 2 key molecules of wnt/β-catenin signaling pathway, β-catenin and pGSK-3β in human colon cancer and their clinical significance. **Methods** Expression of S100A2, β-catenin and pGSK-3β in 42 colon cancer tissue samples was detected by immunohistochemical assay and Western blotting. Their relation with the clinicopathological characteristics of colon cancer was studied, and their correlation was analyzed by Pearson rank analysis. **Results** Immunohistochemistry demonstrated that S100A2 and β-catenin were mainly located in the cancer cells nuclear and/or cytoplasm, while pGSK-3β was located in the cytoplasm. Western blotting showed that the expression of S100A2, β-catenin and pGSK-3β was significantly higher in tumor tissue than normal tissue ($P<0.01$). Meanwhile, the expression was markedly higher in Dukes stage C+D than in Dukes A+B ($P<0.01$), in the cases with lymph node metastasis than those without metastasis ($P<0.01$). The expression of S100A2 was positively related with that of β-catenin and GSK-3β, respectively ($r=0.637$, $P<0.01$; $r=0.626$, $P<0.01$). **Conclusion** S100A2 may participate in the incidence and development of colon cancer *via* adjusting the key molecules of Wnt/ β-catenin pathway.

[**Key words**] colon cancer;S100A2;Wnt/β-catenin;immunohistochemistry;Western blotting

Corresponding author: Zhu Mingcai, E-mail:wlh-cq@126.com

S100A2蛋白是一类具有EF-手型结构的信号分子,与钙离子及其靶蛋白结合后发挥多种生理功能,参与细胞增殖、分化、蛋白质磷酸化和转录因子的调节[1]。目前发现S100A2在几种肿瘤中异常表达,并与肿瘤的发生、发展,浸润转移关系密切。已有大量研究证实Wnt/β-catenin信号途径的失调与肿瘤的发生、发展密切相关,细胞质内游离β-catenin水平决定着该信号途径的活性[2],而前期实验也发现外源性S100A2

[通信作者] 朱明才,E-mail: wlh-cq@126.com

可增加结肠癌细胞株HCT116中β-catenin的含量,上调Wnt/β-catenin通路的活性,并且S100A2与Wnt通路关键分子β-catenin和GSK-3β在体外存在相互作用[3],提示S100A2可能通过调节该信号途径而参与结肠癌的发生、发展,但是在人体组织内是否也存在S100A2与这两种关键分子的相关性呢?本研究以新鲜的人结肠癌组织为实验对象,采用免疫组化和Western blot方法定性、定量检测其中S100A2、β-catenin、pGSK-3β蛋白的表达情况并分析其相关性,旨在为阐明S100A2通过Wnt/β-catenin通路参与结肠癌的发生、发展这一机制积累实验依据。

1 资料与方法

1.1 临床标本

收集重庆医科大学附属第一医院胃肠外科2011年2-6月行结肠癌根治术标本42例,其中男性19例,女性23例,年龄≥60岁的25例,年龄<60岁的17例。病例术前均未行放、化疗,术后经病理诊断证实为高分化腺癌2例,中分化腺癌31例,低分化腺癌9例;有淋巴结转移的25例,无淋巴结转移的17例;Dukes分期A+B期的15例,C+D期的27例。同时取距肿瘤边缘约10 cm处的正常结肠组织42例作为对照组。所有标本离体后按常规的组织病理方法尽快去除过多血迹和污染物,分2份分别放于10%福尔马林中固定和-190 ℃的液氮灌中保存。石蜡包埋固定好组织块,液氮中标本转移至-80 ℃的低温冰箱保存。

1.2 主要试剂

S100A2兔抗人单克隆抗体、pGSK-3β兔抗人单克隆抗体(EPITOMICS公司,USA),β-catenin兔抗人多克隆抗体(ProteinTech Group公司,USA),免疫组化S-P试剂盒,DAB显影液(北京康为世纪),RIPA蛋白裂解液(北京百泰克),BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、5×SDS上样缓冲液、ECL化学发光显影试剂盒(上海碧云天)、预染蛋白Marker(Millipore公司,USA),羊抗兔IgG-HRP二抗(Jackson进口分装),内参抗体β-actin(北京四正柏)。

1.3 免疫组化

石蜡组织块4 μm连续切片,切片后行HE染色复核病理诊断;烤片过夜,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化后行免疫组化S-P法染色,切片均采用微波抗原修复,后续步骤参照试剂盒说明书进行。每例标本均对癌组织和正常黏膜组织染色进行对比。

1.4 SDS-PAGE和Western blot检测

①组织总蛋白提取:称取适量冰冻组织于预冷的匀浆器中,用预冷的剪刀尽量将组织剪碎,按1 mg∶5 μl的比例加入预冷的RIPA蛋白裂解液,置于冰上匀浆30 min,再将样品转移到1.5 ml EP管中,预冷低温离心机后于4℃,15 000 r/min离心样品10 min,用微量移液枪吸取上清液分装在EP管中,采用BCA法进行蛋白定量,根据结果将所有样品调整为相同蛋白浓度10 mg/ml,同浓度同体积的蛋白样品按体积比1∶5加入5×Loading buffer,100 ℃煮5 min使蛋白变性,保存-20 ℃备用。②配制15%分离胶和5%的浓缩胶,待胶凝固后放入电泳槽中倒入足量电泳液拔掉梳子,每个泳道上样7 μl,先用60 V恒压跑电泳待Maker各颜色条带刚好分开后,将电压调至100 V,电泳完毕后将蛋白转印于PVDF膜,5%脱脂牛奶封闭90 min,孵一抗(S100A2稀释比1∶1 000,β-catenin稀释比1∶800,pGSK-3β稀释比1∶10 000),4 ℃过夜,37 ℃复温1 h后,TBST液洗膜10 min×3次,孵二抗(稀释比1∶5 000),37 ℃孵90 min后再TBST洗膜15min×3次。③按ECL显色试剂盒说明书进行显影,Bio-Rad凝胶成像系统采集图像,通过Quantity one软件分析各条带积分光密度值(V值),用目的条带Vx与对应内参条带$V_{\beta\text{-actin}}$相比($Rx = Vx/V_{\beta\text{-actin}}$),Rx即代表样本蛋白相对表达量。

1.5 统计学处理

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件,计量资料经正态性和方差齐性检验后,用独立样本t检验和单因素方差分析以及Pearson相关分析。

2 结果

2.1 S100A2、β-catenin、pGSK-3β免疫组化检测结果

S100A2在结肠癌组织中主要表达在细胞核和(或)细胞质,呈散在均匀表达,小部分癌组织和正常结肠黏膜组织中未见黄染;β-catenin也主要表达在癌细胞细胞质和(或)细胞核,呈弥漫性棕黄色颗粒状分布,正常组织中不表达或仅有少部分细胞膜表达;pGSK-3β主要表达在癌细胞质,而在正常组织细胞质中呈散在弱表达(图1)。

2.2 S100A2、β-catenin、pGSK-3β的Western blot检测结果

与正常结肠黏膜组织相比,结肠癌组织中S100A2、β-catenin和pGSK-3β蛋白表达量显著增高($t = 8.091$, $P < 0.01$; $t = 7.893$, $P < 0.01$; $t = 8.768$, $P < 0.01$)。在结肠癌中,S100A2、β-catenin、pGSK-3β蛋白表达强度与结肠癌的Dukes分期、有无淋巴结转移密切相关,其中Dukes C+D期表达量均明显高于Dukes A+B期($t = 4.387$, $P < 0.01$; $t = 5.565$, $P < 0.01$; $t = 7.700$, $P < 0.01$)。25例有淋巴结转移的结肠癌中S100A2、β-catenin和pGSK-3β蛋白表达量高于17例无淋巴结转移的标本($t = 5.082$, $P < 0.01$; $t = 5.680$, $P < 0.01$; $t = 8.298$, $P < 0.01$);三者的表达强度与病人的年龄、性别、肿瘤分化程度均无关($P > 0.01$)。见表1、图2。

表1 结肠癌中S100A2、β-catenin、pGSK-3β蛋白表达与临床病理参数之间的关系($\bar{x} \pm s$)

临床参数	n	S100A2	β-catenin	pGSK-3β
正常组织	42	0.107±0.127	0.277±0.083	0.184±0.090
肿瘤组织	42	1.307±0.520[a]	1.388±0.544[a]	1.262±0.477[a]
淋巴结转移				
有	25	1.653±0.379[b]	1.603±0.473[b]	1.551±0.285[b]
无	17	0.998±0.453	0.871±0.291	0.836±0.257
Dukes分期				
A+B期	15	0.995±0.484	0.830±0.285	0.804±0.258
C+D期	27	1.606±0.402[c]	1.572±0.469[c]	1.516±0.302[c]

a:$P < 0.01$,与正常组织比较;b:$P < 0.01$,与无淋巴结转移组比较;c:$P < 0.01$,与A+B期比较

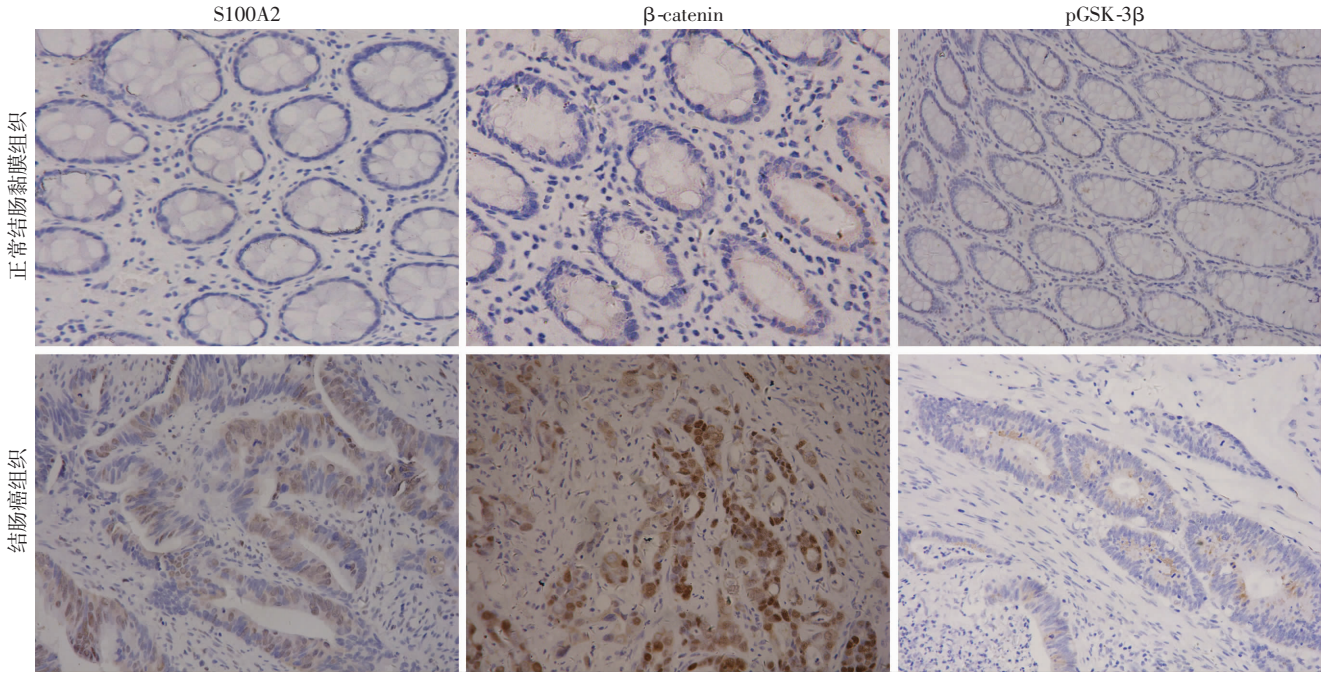
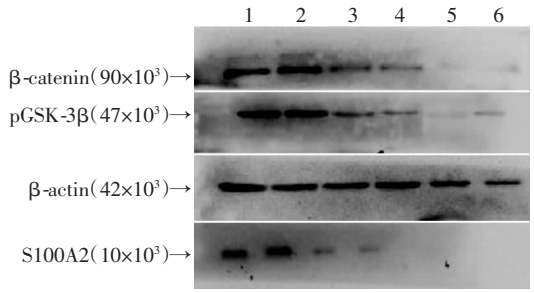


图1 正常结肠黏膜组织和结肠癌组织中S100A2、β-catenin、pGSK-3β的表达 （S-P ×200）



1、2：有淋巴结转移的结肠癌组；3、4：无淋巴结转移的结肠癌组；5、6：正常结肠黏膜组

图2 Western blot检测有无淋巴结转移结肠癌和正常结肠组织的S100A2、β-catenin、pGSK-3β蛋白表达

2.3 结肠癌中S100A2、β-catenin、pGSK-3β的表达相关性

经Pearson等级相关分析结果显示：在结肠癌中，S100A2与β-catenin的表达之间呈明显正相关（$r=0.637$，$P<0.01$）；S100A2与pGSK-3β的表达之间呈明显正相关（$r=0.626$，$P<0.01$）。

3 讨论

S100A2蛋白是广泛分布于不同组织的一类分子量较小的酸性蛋白，通过对钙离子和靶蛋白的调节在机体内发挥各种生物学功能，参与细胞增殖、钙稳态、蛋白质磷酸化和转录因子的调节[1]。与其他S100蛋白不同，其主要定位于细胞核而发挥生物学作用，具有明显的组织和细胞特异性，已有文献报道他在多种肿瘤中异常表达并与肿瘤的转移、预后相关。Ohuchida[4]和Biankin等[5]分别对胰腺癌患者研究发现：胰腺癌细胞较炎症和正常胰腺细胞高表达S100A2蛋白，并与胰腺癌转移和预后密切相关，高表达S100A2的胰腺癌患者术后生存期明显低于S100A2阴性表达者。Bulk等[6]用非小细胞型肺癌的老鼠模型作为实验对象，发现S100A2可促进肺癌细胞发生侵袭与转移，用RNA干扰技术下调S100A2的表达后，非小细胞肺癌鼠的癌转移也下降。本研究通过免疫组化和Western blot技术定性、定量分析发现，S100A蛋白主要定位在人结肠癌细胞核中，细胞质也有部分表达，其在结肠癌组织的表达明显高于正常组织（$P<0.01$），有淋巴结转移标本明显高于无淋巴结转移（$P<0.01$），Dukes分期C+D期的肿瘤也明显高于A+B期（$P<0.01$），但S100A2的表达与患者的年龄、性别以及肿瘤的分化程度无显著相关性。最近有报道，Econmescu等[7]采用基因芯片技术也发现S100A2高表达在胃癌中，认为其在胃癌的形成过程中扮演着重要角色。以上研究结果均提示S100A2的高表达与恶性肿瘤的发生、发展，侵袭转移密切相关。然而，S100A2是通过何种机制参与结肠癌等恶性肿瘤生物学行为的呢？前期研究[3]以及文献[8-9]报道均提示S100家族蛋白可能参与了Wnt/β-catenin信号通路调节。Wnt/β-catenin通路是已被大量研究所证实的与结肠癌发生、发展密切相关的重要信号途径，β-catenin是其中最关键的分子。在没有Wnt信号时，细胞内的β-catenin被GSK-3β、

APC 和 Axin 所构成的降解复合体磷酸化降解从而维持在较低水平。一旦 Wnt 信号激活,β-catenin 的磷酸化依赖性降解受到抑制,胞质内的 β-catenin 水平升高并进入细胞核与 TCF/LEF 结合形成转录复合物,激活下游靶基因(如 c-myc、Cyclin D_1、MMP-7、CD44、VEGF、survivin)转录,这些肿瘤的生长和运动相关基因的过度激活将促进结肠癌的发生和发展[10]。降解复合体中 GSK-3β 的异常变化近年来也受到重视,它是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸激酶,依赖其对底物的磷酸化作用调节多种细胞信号途径[11]。GSK-3β 不仅通过对底物的磷酸化来调节底物的活性,而其自身的活性变化也是通过其他分子的磷酸化来实现的[12],磷酸化的 GSK-3β 活性下降从而使 β-catenin 在胞质中积聚。那么 S100A2 的促瘤作用是否与这两种分子相关呢?

本实验结果显示,同 S100A2 一样,β-catenin 和 pGSK-3β 在结肠癌中的表达明显高于正常组织($P<0.01$)。在癌组织中,β-catenin 和 pGSK-3β 的表达强度与结肠癌的 Dukes 分期和有无淋巴结转移密切相关($P<0.01$),而与患者的性别,年龄和肿瘤分化程度无关($P>0.01$)。本结果与最近 Wang 等[13]的报道不谋而合,该研究组同样采用 Western blot、免疫组化和激酶活性分析方法发现 GSK-3β、CTNNB1(β-catenin)在 24 例人结直肠癌中高表达,且 GSK-3β 表达水平与 CTNNB1 呈显著相关性。另外,我们通过 pearson 等级相关分析发现,S100A2 与 β-catenin 的表达之间呈明显正相关($r=0.637$,$P<0.01$),S100A2 与 pGSK-3β 的表达之间也呈明显正相关($r=0.626$,$P<0.01$)。前期还发现,外源性 hS100A2 可增加人结肠癌细胞株中 β-catenin 的表达和上调 Wnt/β-catenin 信号途径的活性,hS100A2 蛋白在体外与 β-catenin 和 GSK-3β 存在相互作用[2]。本实验进一步证实了 S100A2 与 β-catenin、GSK-3β 之间的相互作用关系,正是通过这种相互协同作用使 S100A2 介导了 Wnt/β-catenin 信号途径进而参与了结肠癌的发生和转移。结合上述分析,我们推测其机制可能是 S100A2 与 GSK-3β 相互作用而使其磷酸化活性降低,同时 S100A2 也与 β-catenin 直接相互作用而使其失磷酸化,从而导致胞质内 β-catenin 水平增高,进入细胞核激活下游相关靶基因,最终导致结肠癌的发生乃至侵袭转移。S100A2 的作用机制是否如我们推测的这样还是存在别的机制,我们正在进一步研究中。

综上所述,本研究观察了钙结合蛋白 S100A2 与 Wnt/β-catenin 通路关键分子 β-catenin、GSK-3β 在结肠癌中的表达情况,并发现它们与结肠癌的淋巴结转移和 Dukes 分期密切相关。同时我们在课题组前期工作的基础上进一步证实了 S100A2 与 β-catenin、GSK-3β 不仅在体外癌细胞株中存在相关性,在体内的组织水平同样也存在相关性,为阐明 S100A2 通过 Wnt/β-catenin 通路参与结肠癌的发生、发展这一作用机制积累了实验依据,同时也为临床上联合检测三者的表达作为判断结肠癌的预后提供了理论依据。

参考文献:

[1] Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey A C, Shaw G S. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family[J]. Biochem J, 2006, 396(2): 201-214.

[2] Behrens J, Lustig B. The wnt connection to tumorigenesis[J]. Int J Dev Biol, 2004, 48(5/6): 477-487.

[3] 赖天霞,苗静琨,左国伟,等. 钙结合蛋白 S100A2 对 Wnt/β-catenin 信号途径活性的上调作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16):1545-1548.

[4] Ohuchida K, Mizumoto K, Miyasaka Y, *et al*. Over-expression of S100A2 in pancreatic cancer correlates with progression and poor prognosis[J]. J Pathol, 2007, 213(3): 275-282.

[5] Biankin A V, Kench J G, Colvin E K, *et al*. Expression of S100A2 calcium-binding protein predicts response to pancreatectomy for pancreatic cancer[J]. Gastroenterology, 2009, 137(2): 558-568.

[6] Bulk E, Sargin B, Krug U, *et al*. S100A2 induces metastasis in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(1): 22-29.

[7] Economescu M C, Necula L G, Dragu D, *et al*. Identification of potential biomarkers for early and advanced gastric adenocarcinoma detection [J]. Hepatogastroenterology, 2010, 57(104): 1453-1464.

[8] Filipek A. S100A6 and CacyBP/SIP - two proteins discovered in ehrlich ascites tumor cells that are potentially involved in the degradation of beta-catenin[J]. Chemotherapy, 2006, 52(1): 32-34.

[9] Stein U, Arlt F, Walther W, *et al*. The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer[J]. Gastroenterology, 2006, 131(5): 1486-1500.

[10] White B D, Chien A J, Dawson D W. Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers[J]. Gastroenterology, 2012, 142(2): 219-232.

[11] Zeng X, Huang H, Tamai K, *et al*. Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions[J]. Development, 2008, 135(2): 367-375.

[12] Thornton T M, Pedraza-Alva G, Deng B, *et al*. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation[J]. Science, 2008, 320(5876): 667-670.

[13] Wang H L, Hart J, Fan L, *et al*. Upregulation of glycogen synthase kinase 3beta in human colorectal adenocarcinomas correlates with accumulation of CTNNB1[J]. Clin Colorectal Cancer, 2011, 10(1): 30-36.

(收稿:2011-12-31;修回:2012-03-05)

(编辑 龙 亮)