基础研究 文章编号:0253-3626(2009)03-0296-04

S100A4 基因在膀胱移行细胞癌中的表达及意义

卢 东,唐 伟

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 S100A4 基因在膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of the bladder,TCCB)中的表达及意义。方法:通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 38 例膀胱移行细胞癌组织及其相应癌旁组织中 S100A4 基因的表达情况,结合临床及组织病理学特点探讨 S100A4 基因与膀胱癌发生及发展的关系。结果:S100A4 基因在膀胱移行细胞癌及正常膀胱移行上皮组织中的阳性表达率分别为 60.5%(23/38)和 0%(0/38)。膀胱移行细胞癌组织中 S100A4 基因的表达率明显高于正常膀胱移行上皮组织($P<0.005$)。其中膀胱移行细胞癌组织中 S100A4 基因的表达率随肿瘤分级、分期的增高及淋巴结转移而相应增高($P<0.05$)。结论:S100A4 基因表达与移行膀胱癌分化有关,癌组织 S100A4 基因有可能成为膀胱癌的一个新的肿瘤标记物;S100A4 基因差异表达与移行膀胱癌侵袭和转移明显相关,移行膀胱癌组织中 S100A4 基因可望作为移行膀胱癌的病情发展及指导临床治疗的标记物之一。

【关键词】膀胱移行细胞癌;S100A4 基因;逆转录聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-09

Expression of S100A4 gene in transitional cell carcinoma of the bladder and its significance

LU Dong, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

作者介绍:卢 东(1975-),男,医师,硕士,
研究方向:泌尿系统肿瘤。

通讯作者:唐 伟,男,教授,E-mail:tangwei2060@yahoo.com.cn。

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and clinical signi ficance of S100A4 gene in transitional cell carcinoma of bladder (TCCB). *Methods*: The expression of S100A4 gene in 38

或抑制,而且全身毒副作用少,术后 5 年生存率明显高于全身静脉用化疗药。

总之,术中 RAIC 可有效降低术中残留的癌细胞 Ki-67、VEGF 的表达并降低癌细胞的活性。术中 RAIC 操作简便,经济,不需要特殊设备,选择性强,药物集中,全身毒副反应小,因此可作为胃癌手术的重要辅助治疗手段,提高手术的疗效,改善病人的预后。

参 考 文 献

[1] 孙 燕,周际昌.临床肿瘤内科[M].北京:人民卫生出社,2003.102-104,106-107.

[2] 段 红,张俊文,汤为学,等.5-氟脲嘧啶及丝裂霉素对人胃癌细胞 SGC-7901 及 BGc-823 的相互作用[J].中国病理生理杂志,2000,16(10):1058.

[3] Maurer C A, Borner M, Buchler M W. Regional chemotherapy of gastric intestinal cancer [J]. Digestive Surgery, 1997, 14(1):9-22.

[4] 孙世良,温海燕,张连阳,等.现代大肠癌诊断与治疗[M].重庆:重庆出版社,2004.393.

[5] 朱志东,蒲永东.氟尿嘧啶经胃左动脉和外周静脉化疗的药代动力学比较[J].中华胃肠外科杂志,2000,3(1):28-30.

[6] Goishi H, Tanaka S, Haruma K, et al. Predictive value of Cathepsin D and Ki-67 expression at the deepest penetration site for lymph node metastases in gastric cancer[J]. Oncology Reports, 2000, 7(4):713-718.

[7] Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, et al. Plasma concentrations of VEGF and bFGF in patients with gastric carcinoma[J]. Cancer Letters, 2000, 153(1-2):7-12.

[8] Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, et al. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas[J]. Annals of surgery, 2006, 243(3):334-340.

[9] Sethna K S, Sugarbaker P H. New prospects for the control of peritoneal surface dissemination of gastric cancer using perioperative intraperitoneal chemotherapy[J]. Cancer Therapy, 2004, 2(A):B79.

[10] Kobayashi M, Yamamoto H, Sugimoto T, et al. Intraoperative local infusion chemotherapy (ILIC) for gastric cancer[J]. Gan To Ksgaku Ryoho, 1998, 25(9):1281-1283.

(责任编辑:冉明会)

cases of TCCB and corres ponding non-cancerous tissues was examined by RT-PCR. *Results*: The posi tive rates of S100A4 gene in TCCB and non-cancerous tissues were 60.5%(23/38) and 0%(0/38), respectively. The expression level of S100A4 gene in TCCB was significantly higher than that in normal bladder urothelial tissues(P<0.005).The expression rate of S100A4 gene in TCCB was posi tively correlated with tumor grade, clinical stag and lymph node metas tasis (P<0.05).*Conclusion*: S100A4 gene is correlated to TCCB different iation and may become a new marker of TCCB. Differential expression of S100A4 gene is correlated to invasion and metastasis of TCCB.S100A4 may be one of the markers for assessment of the progress of the cancer and clinical treatment instruction for TCCB.

【Key words】Transitional cell carcinoma of bladder; S100A4 gene; Reverse transcriptase polymerase chain reaction

膀胱癌(90%以上为膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of the bladder, TCCB)是我国常见的恶性肿瘤，占全部恶性肿瘤 1%~2%，在国内无论其发病率和死亡率均占泌尿系肿瘤的首位。膀胱癌侵袭和转移仍是影响其预后的重要因素之一。分子生物学研究表明:肿瘤细胞的某些基因活性的改变及其表达产物在肿瘤的发生、侵袭转移和预后等一系列病理过程中发挥着重要作用[1]。新近发现 S100A4 基因参与细胞周期调节，促进细胞异常增生，在多种恶性肿瘤中表达率都有升高[2]。S100A4 属于S100 家族，定位于染色体 1q21，已经证实 S100A4 的表达与乳腺癌、肺癌、胃癌等的发生、发展及预后相关。本研究采用 RT-PCR 检测 S100A4 基因在膀胱移行细胞癌组织中的表达情况，并进一步探讨 S100A4 基因的表达与临床病理特征的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

取 2007 年 9 月 ~ 2008 年 5 月重庆医科大学附属第一医院泌尿外科膀胱肿瘤开放手术切除标本，标本切取后迅速置入液氮中保存，备用。术后经病理证实均为膀胱移行细胞癌。其中膀胱癌组织 38 例，配对正常膀胱组织 38 例(距肿瘤边缘 >5 cm)。男性 29 例，女性 9 例，年龄 47 ~ 78 岁，平均 57.6 岁。病理分级：Ⅰ级 11 例，Ⅱ级 19 例，Ⅲ级 8 例；临床 TNM 分期：Ta 期 4 例，T_1 期 6 例，T_2 ~ T_4 期 28 例。

1.2 主要试剂

Trizol 裂解液为 Invitrogen 公司产品，S100A4 基因和内参照引物由北京博迈德科技发展有限公司合成，反转录试剂盒购自 Fermentas 公司。PCR 试剂盒购自盖宁生物科技北京有限公司。

1.3 实验方法

RT-PCR 方法检测膀胱癌组织及其配对癌旁正常膀胱组织 Sl00A4 基因表达水平。

组织总 RNA 提取：在液氮速冻条件下将标本组织磨成粉末，趁液氮尚未挥发光时，把组织粉末转移到 1.5 ml EP 管中，每 50 mg 组织中加 1.0 ml 的 Trizol 裂解液，其余按 Trizol 试剂盒说明书进行。

RT-PCR 方法：采用 Fermentas 公司反转录试剂盒进行反转录，然后进行 PCR 扩增，PCR 反应体积为 50 μl。反应引物及条件如下：

S100A4 上游引物:5'-GCAAAGAGGGTGACAAGTT-3'，下游引物:5'-ACCTCGTTGTCCCTGTTG-3'，产物长度为 144 bp;human β-actin 上游引物:5'-CGGGAAATCGTGCGTGAC-3'，下游引物:5'-CACGGAGTACTTGCGCTCAG-3'，产物长度为 408 bp。

应用 BIO—RAD PCR 扩增仪，S100A4、human β-actin-PCR 反应条件：94℃预变性 3 min 后，以 94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 1 min 循环 30 次，最后 72℃延伸 7 min。

1.4 结果判定

MARKER 采用 DL2000(盖宁生物科技北京有限公司)，与反应产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳 25 min，经 BIO-RAD 数字化凝胶成像分析仪扫描成像，以出现条带为阳性表达，无明确条带形成为阴性表达(图 1)。



M. DL2000 DNA Marker; 1、2、5、6. 膀胱移行细胞癌组织中 S100A4 基因阳性表达；3、4. 癌旁组织中 S100A4 阴性表达；1、2、3、4. human β-actin 的表达

图 1 S100A4 基因的表达情况

1.5 统计学方法

采用 SPSS12.0 软件分析各种因素与 S100A4 表达的关系。统计学方法采用了 χ^2 检验，对于样本较小的病例采用 Fisher 精确概率法。P<0.05 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 S100A4 基因在肿瘤组织与正常组织中的表达(表 1)

S100A4 基因在膀胱移行细胞癌及相应的癌旁

组织中的阳性表达率分别为 60.5%(23/38)和 0(0/38)。膀胱移行细胞癌组织中的 S100A4 基因表达率明显高于正常膀胱移行上皮组织(χ^2=32.981，P<0.005)。

2.2 S100A4 基因表达与临床病理资料之间的关系（表 1）

膀胱移行细胞癌组中 TNM 分期为 T_a~T_1 与 T_2~T_4 的 S100A 基因阳性表达率分别为 30.0%(3/10)和 71.4%(20/28)。差别有显著性(精确概率计算:P=0.030<0.05)。膀胱移行细胞癌组中病理分级为Ⅰ级、Ⅱ级、Ⅲ级的 S100A 基因阳性表达率分别为 27.3%(3/11)，73.7%(14/19)，75.0%(6/8)，与病理分级有关(P=0.027<0.05)，其中Ⅰ组与Ⅱ组有显著性差异(精确概率计算:P=0.023<0.05)，Ⅰ组与Ⅲ组有显著性差异(P=0.015<0.005)，Ⅱ组与Ⅲ组之间差异无显著性(P=1.000>0.05)。有淋巴结转移的标本（其中病理分级Ⅲ级 6，Ⅱ级 1）S100A4 基因表达率 100.0%(7/7)，与无淋巴结转移组 51.6%(16/31)差异有显著性(P=0.029<0.05)。S100A4 基因的表达与性别、年龄、肿瘤大小无明显关系。

3 讨 论

肿瘤的发生和发展是一个非常复杂的过程，涉及细胞外基质的降解和重塑、细胞的粘附和分离、细胞的运动和血管生成以及凋亡等生命过程[3]。许多基因及其表达产物都参与其中。新近研究发现：S100A4 钙结合蛋白参与细胞周期调节，促进细胞异常增生，在多种恶性肿瘤中表达率都有升高。S100A4 是 S100 家族的成员之一。S100 家族属于钙离子结合蛋白，具有共同的 EF 双螺旋手型结构，当其与钙离子结合后，S100 蛋白构象发生改变，暴露出其与靶蛋白结合的位点，进而通过相应的靶蛋白发挥其生物学效应[4,5]。近年来，对于 S100A4 的研究日益深入，将 S100A4 基因转染至不能转移的小鼠乳腺癌细胞系能使其发生转移；将 S100A4 基因转染至小鼠黑色素瘤细胞系 B16 和人乳腺癌细胞系 MCF-7 中后，其发生肺转移的几率明显增加[6]；而转染 S100A4 反义基因后，则明显降低具有高转移特性恶性肿瘤细胞系的转移率[7]。

S100A4 蛋白影响肿瘤转移侵袭能力的确切机制仍不清楚，可能机制如下：(1)S100A4 蛋白与非骨骼肌肌球蛋白重链及原肌球蛋白直接发生相互作用，并认为此作用是促进肿瘤转移的重要机制之一[8]。①S100A4 蛋白抑制由钙离子依赖性蛋白激酶 C(Protein kinase C，PKC)介导的肌球蛋白重链磷酸化，导致肌球蛋白聚集受抑，细胞转移能力增强；②增加肌浆球蛋白的可溶性并抑制其螯合；③使肌动蛋白细丝失控；④S100A4 蛋白与细胞一种跨膜酪氨

表 1 S100A4 基因表达与临床病理的关系

组 别	S100A4 的表达			P 值
	+	−	阳性率(%)	
组织标本				
正常膀胱组织	0	38	0	0.000 1
膀胱癌组织	23	15	60.5	
性别				
男	17	12	58.6	0.490 0
女	6	3	66.7	
年龄(岁)				
≥50	19	13	59.4	0.556 0
<50	4	2	66.7	
TNM 临床分期				
T_a~T_1	3	7	30.0	0.030 0
T_2~T_4	20	8	71.4	
分化程度				
高分化(Ⅰ级)	3	8	27.3	
中分化(Ⅱ级)	14	5	73.7	0.027 0
低分化(Ⅲ级)	6	2	75.0	
淋巴结转移				
有	7	0	100.0	0.029 0
无	16	15	51.6	
肿瘤大小(cm)				
≥2	5	2	71.4	0.681 0
<2	18	13	58.1	

酸磷酸酶作用蛋白 B1-liprin 结合,抑制 B-liprin 蛋白的磷酸化,影响细胞骨架动力而促进细胞运动。总之,S100A4 蛋白通过以上途径导致细胞骨架结构的改变而增加肿瘤细胞的运动能力,进而促进肿瘤转移的发生;(2)S100A4 蛋白引起基质金属蛋白酶及其抑制剂 E 钙粘素表达下调,使其能正常介导同型细胞间的粘附,肿瘤细胞易脱离母体肿瘤而发生转移;(3)凋亡在肿瘤的发生中发挥着重要作用,p53 就是一种重要的细胞凋亡相关基因。国外学者[9]研究发现,S100A4 可与 p53 蛋白 C 末端的调控区结合,并通过蛋白激酶 C 的作用抑制 p53 蛋白全长的磷酸化反应的发生;与野生型 p53 蛋白螯合,从而使 p53 蛋白丧失了其在细胞周期中的调控作用及 G_1/S 期的检查点功能,使 DNA 易发生突变的细胞进入 S 期,甚至导致细胞恶变。S100A4 与野生型 p53 蛋白的螯合,在细胞恶性转变早期有协同促细胞凋亡的作用,但随着野生型 p53 蛋白功能的逐渐丧失,细胞的恶性征象(如侵袭性、转移性)也随之越来越明显;(4)S100A4 蛋白在钙离子的介导下,与蛋氨酸氨基肽酶结合,调节其酶促过程,减少肿瘤组织血管生成抑制因子如烟曲霉素的产生,从而促进肿瘤组织的血管生成[10]。

本研究显示 S100A4 基因在正常膀胱组织中无表达,而在癌组织中呈高表达,其差别有显著性,提示其过度表达可能促进膀胱癌的发生、发展。在不同分期的肿瘤样本中,T_a~T_1 与 T_2~T_4 的 S100A4 基因阳性表达率统计差别有显著性,而不同分级的肿瘤样本中,S100A4 基因阳性表达率统计有显著性差异,且在发生淋巴结转移的病人中 S100A4 基因的表达明显高于未发生淋巴结转移的病人,可见 S100A4 基因的表达率随肿瘤分级、分期增高和淋巴结转移相应增高,提示 S100A4 基因的表达在肿瘤发展过程中可能促进了肿瘤细胞的恶性演进。北京协和医院苏雷[11]报道,肺癌组织中 S100A4 基因表达增强现象在低年龄、低分化肺癌、发生纵隔淋巴结转移和Ⅱa 期病人中表现得更为明显。国外也有研究发现[12],S100A4 蛋白的表达与膀胱癌组织细胞的分化程度呈负相关。因此,我们认为今后是否可能将 S100A4 基因作为一种预测肿瘤病情发展及指导临床治疗的标记物之一。而转染反义 S100A4 基因的肿瘤组织中其肿瘤的发展、转移被抑制[7,13],则可能为膀胱癌的治疗开辟新的途径。

综上所述,膀胱移行细胞癌中 S100A4 基因的表达率随肿瘤分级、分期增高和淋巴结转移相应增高可望成为膀胱移行细胞癌诊断和评估预后的指标,而反义 S100A4 基因则有望成为膀胱移行细胞癌治疗的新的靶目标。

参 考 文 献

[1] Taylor S, Herrington S, Prime W, et al. S100A4(p9Ka)protein in colon carcinoma and liver metastasis:associated with carcinoma cells and T-lymphocytes[J]. Br J cancer, 2002, 86(3):409-416.

[2] Mazzuccheli L.Protein S100A4:too long overlooked by pathologists [J]. Am J Pathol, 2002, 160:7-13.

[3] 刘 军,付 卫,张 波,等.结肠癌组织中 S100A4 基因的表达及意义[J]. 临床基础研究杂志,2007,14(22):1703-1706.

[4] Yao R, Davidson D D, Lopez-Beltran A, et al. The S100 proteins for screening and prognostic grading of bladder cancer[J]. Histol Histopat- hol, 2007, 22(9):1025-1032.

[5] Schafer B W, Heizmann C W. The S100 family of EF-hand calcium binding protein:functions and pathology[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 2 (1):134-140.

[6] Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, et al. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(6):1595-1603.

[7] Bjornland K, Winberg J O, Odegaard O T, et a1. S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhi-bitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an antr-S100A4 ribozyme[J]. Cancer Res, 1999, 59(18):4702-4708.

[8] Zhang S, Wang G, Fernig D G, et al. Interaction of metastasis-inducing S100A4 protein in vivo by fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. Eur Biophys J, 2005, 34(1):19-27.

[9] 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.

[10] Ambartsumian N, Klingethofer J, Grigorian M, et al.The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor[J]. Oncogene, 2001, 20(34):4685-4695.

[11] 苏 雷,李泽坚,丁 芳,等. S100A4 基因的差异表达与肺癌的分化和转移[J]. 中华胸心血管外科杂志,2003,19(2):98—99.

[12] Matsumoto K, Irie A, Satoh T, et al. M. Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer[J]. Urology, 2007, 70(3):602-607.

[13] Gao X N, tang S Q, Zhang X F. S100A4 antisense oligodeoxy nucleotide suppresses invasive potential of neuroblastoma cells[J]. J Pediatr Surg, 2005, 40(4):648-652.

(责任编辑:冉明会)