



S100A4基因差异表达与肾癌细胞分化、转移的关系

原发性肾细胞癌是仅次于膀胱癌的泌尿生殖系恶性肿瘤，也是成人肾脏最常见的实性恶性肿瘤[1]。肾细胞癌的分化程度与发生转移是影响其预后的重要因素，肿瘤细胞的某些基因活性的改变及其表达产物在肿瘤中的侵袭、转移等一系列病理过程中发挥着重要作用[2]。S100A4是从转移性小鼠乳腺癌细胞中克隆出的一种重要的转移相关基因，该基因又被称为metastasin[3]、pEL98[4]、18A2[4]、42A[2]和成纤维细胞特异蛋白(fibroblast-specific protein)[5]等。S100A4基因编码产物是Ca²⁺结合蛋白S100家族成员，其表达水平与小鼠乳腺癌细胞侵袭转移能力呈正相关。近年研究表明，它的表达也可以促进肺癌、胃癌细胞的侵袭和转移。目前国内外尚未见有关S100A4表达与肾细胞癌侵袭转移能力关系的报道。本研究初步探讨了S100A4基因差异表达与肾细胞癌分化、转移的关系，旨在为肾癌侵袭转移的诊断及预后的判断提供理论与实验依据，并进一步为针对S100A4的基因治疗及单克隆抗体治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料

1.1.1 材料 取2001~2004年我科肾细胞癌根治手术切除标本，其中肾细胞癌组织31例、癌旁正常肾组织31例。标本切取后迅速置入液氮中保存。每例标本有明确的病理诊断、病理分级，病历及随访资料记录完整，所有患者术前均未接受放疗或化疗。

1.1.2 实验试剂及用品 Trizol 裂解液为上海申能博采生物科技有限公司产品，S100A4基因引物及荧光探针为上海博亚生物有限公司产品，Hema8000 基因扩增仪为珠海黑马医学仪器有限公司产品。以上所有材料均由广州蓝星生物公司实验室提供。

1.2 实验方法

RT-PCR方法检测肾细胞癌组织及其配对癌旁正常肾组织S100A4 mRNA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 eppendorf管中。每100 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：采用华美生物工程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40 μ l。S100A4引物(Genbank: MN174595)及探针序列如下，正向引物：5'-GATGTGATGGTGTCCACCTT-3'(nt28-47)；反向引物：5'-GACAGGAAGACGCAGTCTC-3'(nt239-220)；荧光探针：5'-FAM TGGGGAAA AGGACGGATGAAAC TAMRA-3'，产物长度212 bp。 β -actin引物(Genbank: M10277)及探针序列如下，正向引物：5'-GTGGGGCGCCCCAGGCAC CA-3'；反向引物：5'-CTCCTTAATGTCACGCAC GATTTC-3'；荧光探针：5'-ROX CCACTGGCATCGT GATGGACT CTAMRA -3'，产物长度513 bp。S100A4、 β -actin PCR反应条件：94 $^{\circ}$ C预变性5 min后，以94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 40 s循环40次，最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。S100A4 mRNA定量方法采用S100A4指数=S100A4荧光值(FAM)/ β -actin荧光值(ROX)，从细胞总RNA提取至RT-PCR，每种细胞重复实验5次，S100A4基因mRNA表达水平取该5次的平均值。

2 结果

2.1 S100A4 mRNA表达特征

31例配对标本S100A4 mRNA荧光检测比较, 29对标本肿瘤组织中S100A4基因mRNA表达明显高于癌旁正常组织。

2.2 肾癌组织S100A4差异表达与病理生物学行为的关系

低分化型(II级)肾细胞癌的S100A4基因差异表达明显高于高分化型(I级)肾细胞癌, 但S100A4基因差异表达与性别、年龄、肿瘤大小、病理分型无明显关系(表1)。

表1 S100A4表达与肾癌临床病理的关系
Tab.1 Association of S100A4 mRNA level with clinicopathology of RCC

Description	n	S100A4 index (average)
Sex		
Male	24	6.63
Female	7	5.88
Age		
>50 y	13	6.66
≤ 50 y	18	6.31
Tumor size		
>5 cm	16	6.93
≤ 5 cm	15	5.95
Pathology		
Clear cell carcinoma	17	6.03
Granular cell tumor	14	6.98
Histology		
High-differentiation	16	5.07
Low-differentiation	15	7.94*

* $P < 0.001$ vs high-differentiation. RCC: Renal cell carcinoma

2.3 S100A4差异表达与肾癌转移的关系

31例标本中, 7例有淋巴结转移或远处转移, 其余24例无明显转移。有转移组S100A4指数平均值为9.61, 而无转移组为5.54, 两者比较有显著性差异($P < 0.05$)。S100A4基因差异表达与肾细胞癌转移明显相关, 发生转移患者mRNA阳性表达率明显高于无转移患者($P < 0.05$)。

2.4 S100A4基因产物鉴定

RT-PCR后产物在1%琼脂糖凝胶电泳(图1), S100A4产物在肾癌与癌旁正常肾组织中均有表达, 产物长度212 bp。

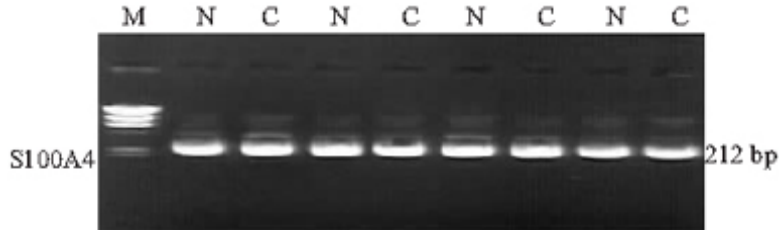


图1 肾癌及配对组织S100A4基因的PCR产物

Fig.1 S100A4 gene fragments in RCC tissues and matched adjacent normal tissues
C: RCC tissues; N: Matched adjacent normal kidney tissues; M: Marker

3 讨论

实验证明, S100蛋白类可调节细胞各种功能, 包括细胞生长、细胞间通讯联系、细胞收缩及细胞信号传导等。由于它具有EF臂型钙离子结合区, 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。因此S100蛋白被认为是一种钙传感器蛋白, 通过钙离子信号转导途径在细胞增殖、分化、肌肉收缩、基因表达、分泌及细胞凋亡中发挥重要作用[4][15]。S100A4蛋白与非肌肉的肌球蛋白相互作用, 可增加细胞的运动能力, 促进肿瘤细胞的侵袭转移; 另外它也可影响细胞骨架动力促进细胞运动, 引起E钙粘素表达下调, 使其不能正常介导同型细胞的粘附, 使肿瘤细胞易脱离母体肿瘤而发生转移[2][5][6][8][12][13][14]。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并能使其发生转移[11]; 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[11]; 而转染S100A4反义基因, 则可以明显降低具有高转移特性恶性肿瘤细胞系的转移率[12]。有研究表明, 人乳腺癌中S100A4表达水平与尿激酶型纤溶酶原激活物(UPA)的表达成显著性正相关, 而UPA是乳腺癌高侵袭性的标志, 可见S100A4与乳腺癌的高侵袭性有关[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蛋白与细胞一种跨膜酪氨酸磷酸酶作用蛋白 β 1-liprin结合, 抑制 β 1-liprin蛋白的磷酸化, 影响细胞骨架动力而促进细胞运动[2][3]; (2)S100A4蛋白能够与非骨骼肌肌浆球蛋白的重链、原肌球蛋白等细胞骨架结构发生相互作用, 使细胞的骨架结构发生改变, 增加了肿瘤细胞的活动性, 促进了肿瘤细胞的侵袭转移[5][6]; (3)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, 使其不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[5][8][12]; (4)S100A4蛋白与野生型p53蛋白的整合, 抑制细胞的凋亡, 促进细胞异常增生。S100A4蛋白可以通过与p53蛋白C终端的调控区结合, 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, 从而使p53蛋白丧失其在细胞周期中的调控作用及G1/S期的检查点功能, 使DNA易发生突变的细胞进入S期。S100A4与野生型p53蛋白的整合, 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; (5)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[14]。

本研究首次检测了肾癌标本及癌旁正常肾组织中S100A4基因的表达情况, 结果显示, 肾癌组织中S100A4基因的表达显著高于癌旁正常肾组织, 提示肾细胞癌变后S100A4基因表达上调。对于肺癌[8]、乳腺癌[11]的研究也证实, 癌组织中S100A4基因表达高于癌旁正常组织。本课题的研究还发现, 肾癌组织S100A4基因的表达增强在低分化组肾癌和发生淋巴结转移或远处转移的病人中表现得更加显著, 从而也反映了恶性程度越高的肾癌, 其侵袭性强、浸润扩散严重, 可能与S100A4功能增强有关。国内北京协和医院苏雷[16]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, S100A4蛋白的表达与肿瘤组织细胞的分化程度呈负相关[3][5][9][10]。因此, 我们认

为S100A4基因可作为一个能够预测肿瘤病情发展及指导临床治疗的标记物之一。

随着医学影像学的进一步发展,肾癌的早期定位诊断率有了明显的提高,但在临床上不仅应注重早期诊断,还应关注是否有淋巴结转移及转移的严重程度,以便客观判断患者的预后。本研究就S100A4表达与肾癌细胞分化程度及淋巴结或远处转移作了初步的探讨。分析表明,肾细胞癌病理Ⅱ级(低分化组)病人S100A4基因mRNA阳性表达高于肾细胞癌病理Ⅰ级(高分化组)病人,即S100A4基因表达与肾细胞癌分化程度有关;发生转移患者S100A4 mRNA阳性表达率明显高于无转移患者,即S100A4基因差异表达与肾细胞癌转移明显相关。肾癌组织S100A4 mRNA测定有助于判定肾肿瘤的预后。

综上所述,S100A4基因及其表达蛋白的发现为肾癌等恶性肿瘤的病因学和病理学研究提供了新的线索。S100A4基因有可能作为一个评估肾癌病人预后的重要指标,而该反义基因有效降低瘤细胞转移发生率的成功试验,则可能为肾癌及其他恶性肿瘤的治疗开辟一条新的途径。

参考文献:

- [1] 何志嵩, 郭应禄. 肾癌的诊断与鉴别诊断[A]. 见: 泌尿、男生殖系肿瘤[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 228-36.
- [2] Taylor S, Herrington S, Prime W, et al. S100A4 (p9ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes[J]. Br J Cancer, 2002, 86(3): 409-16.
- [3] Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4(MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis[J]. Anticancer Res, 1998, 18(4A): 2415-21.
- [4] Schefer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(1): 134-40.
- [5] Mazzuccheli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists[J]? Am J Pathol, 2002, 160(1): 7-13.
- [6] Gribenko AV, Hopper JE, Makhatadze GI. Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins[J]. Biochemistry, 2001, 40(51): 15538-48.
- [7] Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding and S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells[J]. Oncogene, 1997, 14(3): 331-7.
- [8] Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, et al. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in nonsmall cell lung cancer[J]. Int J Oncol, 2000, 16(6): 1125-31.
- [9] Rosty C, Ueki T, Argani P, et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation[J]. Am J Pathol, 2002, 160(1): 45-50.
- [10] Ninomiya I, Ohta T, Fusbida S, et al. Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2001, 18(4): 715-20.
- [11] 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): 1595-603.
- [12] Bjornland 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): 4702-8.
- [13] 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): 22699-708.

[14] Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, et al. The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor[J]. *Oncogene*, 2001, 20(34): 4685-95.

[15] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(7): 637-68.

[16] 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 (Chin J Thorac Cardiovasc Surg)*, 2003, 19(2): 98-9.

参考文献:

[1] 何志嵩, 郭应禄. 肾癌的诊断与鉴别诊断[A]. 见: 泌尿、男生殖系肿瘤[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 228-36.

[2] Taylor S, Herrington S, Prime W, et al. S100A4 (p9ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes[J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(3): 409-16.

[3] Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4(MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis[J]. *Anticancer Res*, 1998, 18(4A): 2415-21.

[4] Schefer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(1): 134-40.

[5] Mazzuccheli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists[J]? *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 7-13.

[6] Gribenko AV, Hopper JE, Makhatadze GI. Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(51): 15538-48.

[7] Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding and S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 1997, 14(3): 331-7.

[8] Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, et al. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in nonsmall cell lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(6): 1125-31.

[9] Rosty C, Ueki T, Argani P, et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(1): 45-50.

[10] Ninomiya I, Ohta T, Fusbida S, et al. Increased expression of S100A4 and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2001, 18(4): 715-20.

[11] 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): 1595-603.

[12] Bjornland 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): 4702-8.

[13] 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): 22699-708.

[14] Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, et al. The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor[J]. Oncogene, 2001, 20(34): 4685-95.

[15] Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(7): 637-68.

[16] 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 (Chin J Thorac Cardiovasc Surg), 2003, 19(2): 98-9.

[回结果列表](#)