

S100A4基因差异表达与肾癌细胞分化、转移的关系

周海宽¹,赵永斌²,郑少斌¹,陈彤¹,毛向明¹,齐桓¹,吴容娟¹(¹南方医科大学南方医院泌尿外科,广东广州510515;²广州军区广州总医院泌尿外科,广东广州510010)

摘要:目的 探讨 S100A4 基因 mRNA 表达与肾癌细胞分化、转移的关系。方法 提取 31 例肾癌及正常组织配对标本的总 RNA,用 RT-PCR 方法测定 S100A4 基因表达,并结合临床资料,对 S100A4 基因差异表达与肾癌病人临床表现的相关性进行分析研究。结果 31 例配对标本采用 RT-PCR 方法分别进行 S100A4 mRNA 荧光检测比较,29 例标本肿瘤组织中 S100A4 基因 mRNA 表达明显高于癌旁正常肾组织。其中低分化肿瘤组病人的 S100A4 指数高于高分化组(7.94 vs 5.06, $P < 0.001$);发生转移(包括淋巴结转移和远处转移)者高于无转移者(9.61 vs 5.53, $P < 0.001$);低年龄组病人(≤ 50 岁)S100A4 指数与高年龄组无明显差异(6.31 vs 6.66, $P > 0.05$);肾颗粒细胞癌组与透明细胞癌组无明显差异(6.98 vs 6.02, $P > 0.05$);肿瘤直径 ≤ 5 cm 组与 > 5 cm 组无明显差异(5.95 vs 6.93, $P > 0.05$)。结论 肾癌组织中 S100A4 基因 mRNA 可望作为肾细胞癌的病情发展及指导临床治疗的标记物之一;S100A4 基因表达与肾细胞癌分化有关,癌组织 S100A4 mRNA 测定有助于判定肿瘤的预后;S100A4 基因差异表达与肾细胞癌转移明显相关。

关键词:肾肿瘤;S100A4;基因表达;细胞分化;肿瘤转移

中图分类号:R394.2;R737.11 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)06-0712-03

Association of S100A4 mRNA expression with differentiation and metastasis of renal cell carcinoma

ZHOU Hai-kuan¹, ZHAO Yong-bin², ZHENG Shao-bin¹, CHEN Tong¹, MAO Xiang-ming¹, QI Huan¹, WU Rong-juan¹

¹Department of Urological Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

²Department of Urological Surgery, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: **Objective** To study the association of S100A4 mRNA expression level with the differentiation and metastasis of renal cell carcinoma (RCC). **Methods** Tissue specimens were obtained from 31 patients undergoing surgery for renal cell carcinomas between May 2001 and May 2004. Reverse transcriptional PCR was performed for amplification of S100A4 mRNA (212 bp) from 31 RCC tissues and matched normal kidney tissues besides the tumor, and the differential S100A4 mRNA expression was analyzed for its association with the clinical manifestations of the patients. **Results** S100A4 mRNA expression was detected in all the RCC tissues and normal tissues adjacent to the carcinoma using fluorescence method, and in 29 cases, S100A4 mRNA expression was significantly higher in the RCC tissues than in the matched adjacent tissues. One case had high expressions in both tissues. Patients with poorly differentiated RCC had significantly higher S100A4 expression index than those with well differentiated RCC (7.94 vs 5.06, $P < 0.001$), and patients with metastasis also had higher expression index (9.61 vs 5.53, $P < 0.001$). No obvious difference was noted in the expression index between granular cell tumor and clear cell carcinoma (6.98 vs 6.02, $P > 0.05$). **Conclusions** S100A4 may serve as a marker for assessing the progression of RCC and provide assistance for clinical therapeutic decisions. S100A4 mRNA expression is correlated to RCC differentiation and may facilitate prognostic evaluation of RCC. Differential expression of S100A4 mRNA is correlated to the metastasis of RCC.

Key words: kidney neoplasms; S100A4; gene expression; cell differentiation; neoplasm metastasis

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。

收稿日期:2004-09-25

作者简介:周海宽(1963-),男,博士,电话:020-61641799

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 GATTTTC-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。

1.3 统计学处理

采用 *t* 检验进行显著性检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

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	<i>n</i>	S100A4 index (average)
Sex		
Male	24	6.63
Female	7	5.88
Age		
>50 y	13	6.66
\leq 50 y	18	6.31
Tumor size		
>5 cm	16	6.93
\leq 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。

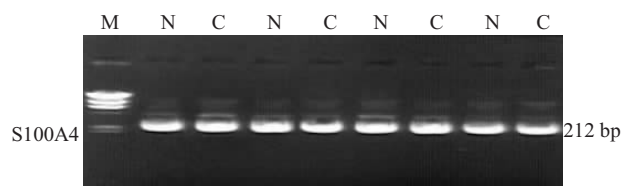


图 1 肾癌及配对组织 S100A4 基因的 PCR 产物

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^[2,5,6,8,12-14]。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 $\beta 1$ -liprin 结合, 抑制 $\beta 1$ -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 蛋白的螯合, 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; (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 II a 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.

(下转 717 页)

续静注半衰期短,长时间输注 10 min 内自主呼吸便可恢复,不影响术后苏醒,而且其代谢不受肝肾功能的影响^[2-4]。多数文献认为瑞芬太尼麻醉术后病人苏醒快,定向力恢复快,神经认知测试优于芬太尼^[5-7]。特别适用于门诊麻醉手术,尤其适用老年患者门诊手术麻醉。本研究中 R 组病人的诱导时间、清醒时间及术后的留观时间都明显少于 F 组。微量泵注瑞芬太尼可使诱导与维持平稳,有助于保持病人血液动力学稳定并减少瑞芬太尼的用量。联合丙泊酚可以利用两者间的协同作用,减少各自用量与不良反应^[8],提高病人的满意度。本研究 R 组病人的丙泊酚用量明显少于 F 组,且个体间丙泊酚剂量变化更小,这有利于麻醉管理和镇静水平的稳定,使病人的满意度明显高于 F 组。呼吸抑制是阿片类药物常见不良反应之一, R 组用微量泵输注瑞芬太尼 0.05 μg/kg·min 结合丙泊酚镇静,呼吸抑制作用似仍大于 F 组,但因瑞芬太尼停止给药后,作用迅速消失,体内无积蓄,呼吸抑制和镇痛反应消失快。在持续鼻吸氧的条件下,两组 SPO₂ 无显著性差异。

虽然瑞芬太尼价格昂贵,但用量较小,且可减少丙泊酚的药量,同时恢复迅速,无后遗症,缩短了病人在院停留时间,也减少了患者的住院费用,提高了老年病人的安全性。因此,我们认为,静脉微量泵注瑞芬太尼联合应用丙泊酚镇静可能是门诊麻醉更可取的方法,安全、可靠,且并发症少,特别是老年患者的

门诊麻醉。但需注意静注瑞芬太尼的速度,必须随时备用复苏及气管插管装置、吸氧及阿片受体拮抗剂,加强呼吸监护和管理。

参考文献:

- [1] 庄心良,曾因明,陈伯銮主编.现代麻醉学[M].第3版,北京:人民卫生出版社,2003.1450-1.
- [2] Reves JG. Educational considerations for the clinical introduction and use of remifentanyl[J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(Suppl): S4-6.
- [3] Glass PS, Gan TJ, Howell S. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl [J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(Suppl): S7-14.
- [4] Glass PS, Shafer SL, Reves JG. Intravenous drug delivery system [A]. In: Miller RD. *Anesthesia* [M]. 5th ed., New York: Churchill Livingstone, 2001. 377-411.
- [5] Vuyk J, Mertens MJ, Olofsen E, et al. Propofol anesthesia and rational opioid selection [J]. *Anesthesiology*, 1997, 87 (12): 1549-62.
- [6] Wilhelm W, Schlaich N, Harrer J, et al. Recovery and neurological examination after remifentanyl-desflurane of fenanyl-desflurane anaesthesia for carotid artery surgery[J]. *Br J Anaesth*, 2001, 86(1): 44-9.
- [7] Fleisher LA, Hogue S, Colopy M, et al. Does functional ability in the postoperative period differ between remifentanyl-and fetanyl-based anesthesia[J]? *J Clin Anesth*, 2001, 13(6): 401-6.
- [8] Mertens MJ, Olofsen E, Engbers FH, et al. Propofol reduces perioperative remifentanyl requirements in a synergistic manner: response surface modeling of perioperative remifentanyl-propofol interactions [J]. *Anesthesiology*, 2003, 99(8): 347-59.

(上接 714 页)

- [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] Mazzucchi 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 Mtsl/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 Mtsl (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.