

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.04.014

# S100A4 在卵巢癌组织中的表达与铂类化疗耐药的关系

高 静,辛晓燕,张琳琳

## Correlation between Expression of S100A4 and Cisplatin-based Chemotherapy Resistance in Ovarian Cancer Tissues

Gao Jing, Xin Xiaoyan, Zhang Linlin

Department of Gynecology and Obstetrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding Author: Xin Xiaoyan, E-mail: XY\_xin@yeah.net

**Abstract: Objective** To investigate the correlation between S100 calcium-binding protein A4(S100A4) and cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer. **Methods** The expression of S100A4 in 60 ovarian cancer tissues was identified by immunohistochemistry method. RT-PCR and Western blot were used to evaluate the S100A4 mRNA and protein level respectively in platinum sensitive A2780 cell line and platinum resistant CP70 cell line. MTT assay was performed to determine the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) to cisplatin in A2780 and CP70 cells. MTT assay was performed to determine the 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) to cisplatin in A2780 and CP70 cells. **Results** S100A4 was located in the cytoplasm and nucleus. The positive rate of S100A4 protein in platinum resistant cases was higher than that in patients sensitive to platinum chemotherapy. The expression of S100A4 mRNA and protein were significantly higher in CP70 cells than that in A2780 cells. The  $IC_{50}$  was 20.54  $\mu\text{mol/ml}$  in A2780 cells and 56.23  $\mu\text{mol/ml}$  in CP70 cells, respectively. **Conclusion** High S100A4 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance in ovarian cancer.

**Key words:** Ovarian cancer; Cisplatin; S100A4; Chemotherapy resistance

**摘要:目的** 探讨钙结合蛋白 S100A4 与卵巢癌铂类化疗耐药之间的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 60 例卵巢上皮性癌组织中 S100A4 的表达情况;采用 Western blot 和实时荧光定量 PCR 法检测不同顺铂化疗敏感度的卵巢癌细胞 A2780 及 CP70 中 S100A4 的差异表达,MTT 法测定顺铂对细胞的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )。 **结果** (1) S100A4 在卵巢癌组织中呈胞核表达、单纯胞质表达及核浆共同表达。铂类化疗耐药组中 S100A4 阳性表达率为 66.67%(16/24),高于敏感组 33.33%(12/36)( $P < 0.05$ )。 (2) 耐药株 CP70 中 S100A4 mRNA 和蛋白表达均显著高于敏感株 A2780。 (3) 顺铂对 A2780 和 CP70 细胞的  $IC_{50}$  分别为 20.54  $\mu\text{mol/ml}$  和 56.23  $\mu\text{mol/ml}$ 。 **结论** S100A4 的高表达参与卵巢癌铂类化疗耐药过程。

**关键词:** 卵巢肿瘤; 顺铂; S100A4; 化疗耐药

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2012)04-0425-03

## 0 引言

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,死亡率最高,5 年存活率仅为 30%~40%。目前标准的治疗方案是肿瘤细胞减灭术以及以铂类为基础的辅助性化疗。耐药是导致其化疗失败的主要原因。S100A4 蛋白是一种钙传感器蛋白,通过钙离子信号转导途径在细胞周期调控、细胞黏附和运动、细胞增殖分化、基因表达、酶的激活及细胞凋亡中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。研究证实 S100A4 蛋白在乳腺癌、食管癌、肺癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌等中高表达<sup>[2]</sup>,且与浸润转移及预后密切相关<sup>[3]</sup>。本研究检测卵巢癌组织及细胞中 S100A4 的表达情况,旨在进一步探讨 S100A4 与卵巢癌铂类化疗耐药之间的关系。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

1.1.1 标本 选取第四军医大学西京医院 2004—2005 年经手术确诊的卵巢癌初治患者 60 例。所选患者术前均未行化疗、放疗或生物治疗,术后病理确诊为上皮性卵巢癌,有完整临床病理资料,且在病理科有存档蜡块标本。根据 GOG(美国妇科肿瘤学组)建议的分型,并参照 2010 年版 NCCN(national comprehensive cancer network) 卵巢癌临床实践指南对铂类耐药和铂类敏感的定义,60 例患者中 24 例为铂耐药患者(即在初次接受含铂化疗停药 6 个月内出现复发),36 例为铂敏感患者(即初次接受含铂化疗停药 6 月及以上出现复发)。

1.1.2 卵巢癌细胞系 人上皮性卵巢癌顺铂敏感细胞株 A2780 及耐药株 CP70 为第四军医大学西京医院妇产科实验室传代保存。经复苏后,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,置于 37℃、饱和湿度、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养。当细胞生长至 80%~90%

收稿日期:2011-09-29;修回日期:2011-11-05

作者单位:710032 陕西西安,第四军医大学西京医院妇产科

通信作者:辛晓燕, E-mail: xy\_xin@yeah.net

作者简介:高静(1986-),女,硕士在读,主要从事妇科肿瘤研究工作

汇合时,用 0.25%胰蛋白酶进行消化传代。当细胞生长状态稳定,呈对数生长期时用于实验。

1.1.3 试剂 兔抗 S100A4 单克隆抗体、兔抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体均为美国 Epitomics 公司产品,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自 Beyotime 公司;SP 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司。Trizol 试剂、反转录合成 cDNA 试剂盒、Real time PCR 反应试剂盒均由 Takara 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 SP 法 所有组织标本均经甲醛固定,石蜡包埋,片厚 4  $\mu$ m,60 $^{\circ}$ C 烤片过夜,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去离子水灭活过氧化物酶 10 min、微波抗原修复 15 min,正常山羊血清封闭 30 min、一抗(工作浓度为 1:500)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入生物素标记山羊抗兔 IgG,辣根酶标记链霉卵白素工作液、DAB 显色、自来水冲洗,苏木精衬染胞核,氨水返蓝,常规脱水透明,中性树胶封片。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,已知 S100A4 阳性的扁桃体标本作为阳性对照。参照文献采用半定量积分法,即对每张切片的阳性细胞率及阳性细胞着色强度进行分级计分,然后根据两项之和确定其阳性强度。无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞率即阳性细胞占计数细胞的比例,以随机计数 10 个高倍视野细胞为准,阳性细胞 <5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分,两项之和 1~3 分为弱阳性,3~5 分为中度阳性,5~7 分为强阳性。

1.2.2 Western blot 检测细胞内 S100A4 的表达

取对数生长期的卵巢癌细胞,用加入蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量后进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳,湿转至 PVDF 膜上 1 h,用含 50 g/L 的脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 2 h 后,与兔抗 S100A4 单克隆抗体(工作浓度为 1:3 000)、兔抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(工作浓度为 1:3 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(工作浓度为 1:3 000)室温孵育 1 h,经 ECL 底物化学发光显影、扫描、用 Alpha Innotech 软件测量胶片中条带灰度值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测细胞内 S100A4 的

表达 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,通过紫外分光光度仪测量 RNA 的浓度和纯度,将 RNA 反转录成 cDNA,反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C。将得到的 cDNA 反应液加入到下一步的 Real Time PCR 反应中, $\beta$ -actin 作为内参基因。引物由上海生物工程设计合成:S100A4 上游 5'-GAGAAGGCCCTG-GATGTGAT-3',下游 5'-ACCTCGTTGTCCCT-GTTGCTG-3'; $\beta$ -actin 上游 5'-CCTGGGCATG-GAGTCCTGTG -3',下游 5'-TCTTCATTGT-GCTGGGTGCC-3'。反应体系为 25  $\mu$ l,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。设立空白对照,每个样品设置 3 个平行对照。当荧光信号强度超过基线时,其域值循环数(Ct 值)被记录下来。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  数据分析方法进行相对基因表达分析。

1.2.4 MTT 法检测细胞对顺铂的敏感度 常规胰酶消化制备单细胞悬液,以  $1 \times 10^4$ /ml 细胞浓度接种至 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵育过夜,依次加入 100  $\mu$ l 终浓度为 0、2.5、5、10、20、40、80、160  $\mu$ mol/ml 的顺铂,以只加培养液为调零孔、不加顺铂为阴性对照孔,每组设 5 个平行孔,实验重复 3 次。继续培养 48 h 后,每孔加入 (5 mg/ml) MTT 溶液 20  $\mu$ l 作用 4 h,吸弃上清,每孔滴加 150  $\mu$ l 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min。在酶联免疫测定仪上选择 492 nm 波长测定各孔吸光值(OD 值),按下式计算细胞存活率及顺铂对细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>),细胞存活率(%) = 试验组 OD 值/对照组 OD 值  $\times$  100%。以细胞存活率对剂量对数作图并按作图法求出 IC<sub>50</sub> 值。

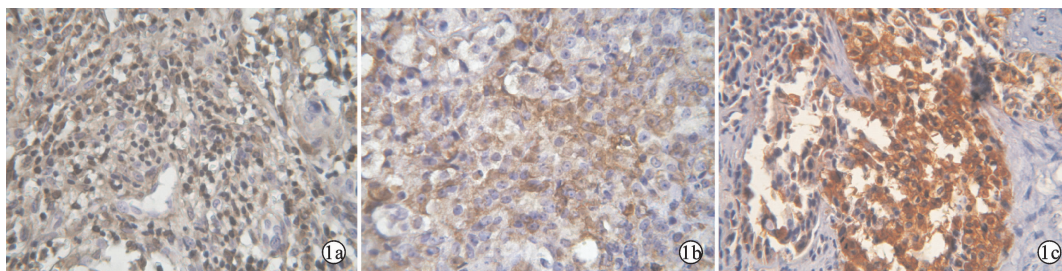
1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  标准差表示,各组均数之间比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢癌组织中 S100A4 蛋白的表达

S100A4 在卵巢癌组织中呈胞核表达、单纯胞质表达及核浆共同表达,见图 1。铂类化疗耐药组中 S100A4 阳性表达率为 66.67%(16/24),高于敏感组(33.33%,12/36),差异有统计学意义(*P* < 0.05)。



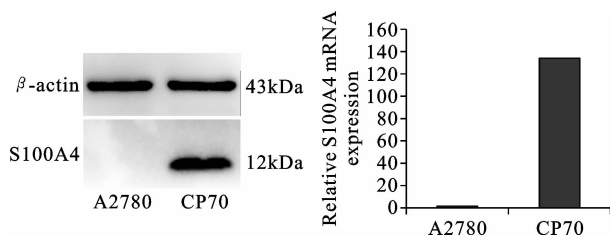
1a: nuclear reactivity; 1b: cytoplasmic reactivity; 1c: both nuclear and cytoplasmic reactivity

图 1 卵巢癌组织中 S100A4 的表达(SP  $\times$  400)

Figure 1 Analysis of S100A4 expression in ovarian cancer tissues(SP  $\times$  400)

### 2.2 卵巢癌细胞中 S100A4 的表达

Western blot 结果显示,耐药株 CP70 细胞中 S100A4 蛋白的表达明显高于敏感株 A2780( $P < 0.01$ )。实时荧光定量 PCR 结果显示耐药株中 S100A4 mRNA 的表达水平是敏感株的 134.36 倍,见图 2。



2a: Western blot; 2b: RT-PCR

图 2 卵巢癌细胞中 S100A4 的蛋白及 mRNA 表达情况

Figure 2 Analysis of S100A4 protein and mRNA expression in ovarian cancer cells

### 2.3 MTT 法检测细胞对顺铂的敏感度

顺铂对 A2780 组和 CP70 组的  $IC_{50}$  分别为  $20.54 \mu\text{mol/ml}$  和  $56.23 \mu\text{mol/ml}$ ,故 CP70 对顺铂的耐药指数(RI)为 2.74,见图 3。

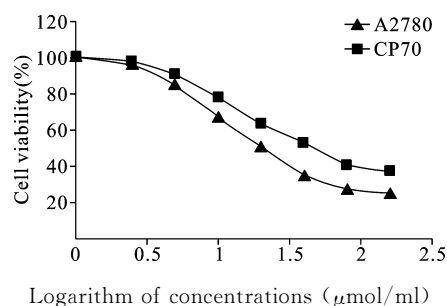


图 3 MTT 法检测不同浓度顺铂作用后各组细胞存活率

Figure 3 MTT assay was performed to detect cell viability in different concentrations of cisplatin

## 3 讨论

以铂类为基础的联合化疗作为一线化疗方案明显改善了卵巢上皮性癌的预后。铂类药物通过与细胞内 DNA 结合,导致 DNA 链间交链或链内交链,造成 DNA 损伤,从而引起细胞死亡。但经过标准治疗后,70%患者最终将复发或表现为疾病进展,即使二次探查手术阴性的患者复发率仍高达 30%~50%。晚期卵巢上皮癌患者 5 年生存率低于 25%<sup>[4]</sup>。

S100A4 是 S100 家族的成员之一,基因定位于 1q21,而该区域是与多种恶性肿瘤发生有关的不稳定区。S100A4 基因表达产物 S100 A4 蛋白是由 101 个氨基酸组成的多肽,相对分子质量为 11.5 kD<sup>[5]</sup>。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,这一手型结构含有能与钙离子高亲和性、高选择性结合的 14 个氨基酸序列,当其与钙离子结合后,其构象发生改变,暴露出其与靶蛋白结合的位点,进而通过参与细胞周期调控、细胞增殖分化、酶

的激活和肌肉收缩等多种生命活动<sup>[6]</sup>。Mencia 等<sup>[2]</sup>研究证实,S100A4 在甲氨喋呤耐药细胞系中高表达,与结肠癌甲氨喋呤化疗敏感度相关。有国外研究报道证实 S100A4 与阿霉素<sup>[7]</sup>、氟尿嘧啶<sup>[8]</sup>化疗耐药相关。但 S100A4 与铂类化疗耐药的相关性尚未见报道。

本研究结果显示,铂类化疗耐药患者中 S100A4 阳性表达率高于敏感患者的阳性率,这提示 S100A4 可能是导致卵巢癌铂类化疗耐药的原因之一。S100A4 在卵巢癌组织中呈胞核表达、单纯胞质表达及核浆共同表达。Boye 等<sup>[9]</sup>2010 年报道证实,S100A4 在结肠癌中的核表达与肿瘤 TNM 分期相关,是预后评价指标。然而 S100A4 与铂类化疗耐药之间的关系仍需进一步探讨。

为了进一步明确 S100A4 与卵巢癌铂类化疗的关系,本研究选取了卵巢癌耐药配对细胞株 A2780 和 A2780/CP70 作为研究对象。A2780 为亲本细胞系,对顺铂极为敏感。CP70 是由 A2780 经过长期小剂量顺铂逐步诱导、经耐药筛选后获得稳定耐药性的细胞。因此,两者遗传背景相同,是目前研究卵巢癌耐药机制的标准细胞株。Western blot 和 RT-PCR 结果表明,耐药株 CP70 中出现 S100A4 表达水平较敏感株显著增加,提示 S100A4 可能是卵巢癌顺铂敏感细胞株 A2780 与耐药株 CP70 耐药性差异的重要因素。

综上所述,S100A4 有望作为一个分子指标,对预测铂类化疗药物敏感度和判断化疗疗效具有一定的临床指导价值。

### 参考文献:

- [1] Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21(4): 134-140.
- [2] Mencia N, Selga E, Rico I, et al. Overexpression of S100A4 in human cancer cell lines resistant to methotrexate[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 250.
- [3] Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, et al. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis[J]. Br J Cancer, 2005, 92(11): 1955-1958.
- [4] Matei DE, Nephew KP. Epigenetic therapies for chemoresensitization of epithelial ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2010, 116(2): 195-201.
- [5] Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, et al. S100A4, a mediator of metastasis[J]. J Biol Chem, 2006, 281(2): 677-680.
- [6] Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins[J]. Microsc Res Tech, 2003, 60(6): 540-551.
- [7] Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, et al. Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression[J]. Anticancer Drugs, 1998, 9(4): 311-317.
- [8] Kim Y J, Kim M A, Im S A, et al. Metastasis-associated protein S100A4 and p53 predict relapse in curatively resected stage III and IV (M0) gastric cancer[J]. Cancer Invest, 2008, 26(2): 152-158.
- [9] Boye K, Nesland JM, Sandstad B, et al. Nuclear S100A4 is a novel prognostic marker in colorectal cancer[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(16): 2919-2925.

[编辑校对:安 凤]