

S100A9蛋白在胃癌中的表达及其临床病理意义*

李秀娟^① 聂永梅^② 张志强^③ 张桂英^④ 李茂玉^⑤ 宋娜^⑥ 苏丽萍^⑥
倪自翔^⑥

摘要 目的:探讨胃癌(GC)中S100A9的表达及临床病理意义。**方法:**蛋白质组织学定量鉴定GC和癌旁胃黏膜(GM)组织的差异表达蛋白质;Western-blot验证蛋白S100A9的表达;免疫组织化学检测S100A9蛋白在GC、GM和原发性胃癌转移的淋巴结(LN)的表达;分析S100A9表达与GC临床病理参数的关系。**结果:**蛋白质组织学筛选的78个差异蛋白中,S100A9表达在GC中较正常GM中明显上调(1:0.09),Western-blot验证S100A9蛋白在GC表达上调($P<0.01$);免疫组织化学显示:70例正常GM中S100A9阳性表达23例(32.86%);118例GC中S100A9阳性表达72例(61.02%);35例LN中S100A9阳性表达29例(82.86%),与正常GM相比,GC和LN中S100A9的表达明显升高($P<0.01$);S100A9在LN的GC中上调($P<0.05$);S100A9表达与GC的淋巴结转移、分化程度、浸润深度和TNM分期相关($P<0.01$ 或 $P<0.05$),而与患者的年龄和性别无关($P>0.05$)。**结论:**S100A9高表达与GC发生发展、侵袭转移有关,可能是GC的一个促癌因子。

关键词 胃癌 S100A9蛋白 蛋白质组织学 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.16.014

Expression and Clinicopathologic Significance of S100A9 Protein in Gastric Carcinoma

Xiujuan LI¹, Yongmei NIE², Zhiqiang ZHANG³, Guiying ZHANG⁴, Maoyu LI⁵, Na SONG⁶, Liping SU⁶, Zixiang NI⁶

Correspondence to: Zhiqiang ZHANG, Email: zhiqiangzhang2011@hotmail.com

Department of ¹Pathophysiology, ²Physiology, ³Medical Jurisprudence 2007-2 in the Collage of Preclinical Medicine, ⁴Department of Gastroenterology in the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University Urumqi 830011, China

⁴Department of Gastroenterology, ⁵Key Laboratory of Cancer Proteomics of Ministry of Health of China Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81001101), the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (Grant No. 2010211B20), Start Funds for Young Teachers' Research Project in University Scientific Plans of Xinjiang Uygur Autonomous Region (Grant No. XJEDU2010S24), Funds of Special Research Project for Young Science and Technology Talents from the Health Department of Xinjiang Uygur Autonomous Region (Grant No. 2009Y06)

Abstract Objective: This study aims to investigate the expression and clinicopathologic significance of the S100A9 protein in gastric cancer (GC). **Methods:** Differential expression of proteins between GC and paraneoplastic gastric mucosa (GM) tissues was quantitatively determined using proteomics. The S100A9 protein level was examined using western blot analysis. The S100A9 protein expression in GC, GM, and lymph node (LN) of primarily gastric carcinomatous metastasis was determined using immunohistochemistry (IHC). The relationship between S100A9 protein expression and the clinicopathologic parameters of GC was analyzed. **Results:** Among the 78 differential proteins identified through proteomics, S100A9 protein expression was clearly upregulated in GC compared with the GM (1:0.09), which was confirmed through western blot analysis ($P<0.01$). The IHC assay showed the positive expression of 23 S100A9 proteins (32.86%) among 70 normal GC samples, 72 (61.02%) among 118 GM samples, and 29 (82.86%) among 35 LN samples. Compared with GM, S100A9 expression was significantly increased in GC and LN ($P<0.01$). S100A9 expression was upregulated in LN compared with GC ($P<0.05$). The S100A9 expression level in GC was correlated with LN metastasis, histologic differentiation, depth of invasion, and TNM stage ($P<0.01$ or $P<0.05$), but not correlated with the patient age and gender ($P>0.05$). **Conclusion:** S100A9 protein overexpression is correlated with GC carcinogenesis, invasion, and metastasis and it may promote GC.

Keywords Gastric cancer; S100A9 protein; Proteomics; Immunohistochemistry

作者单位:①新疆医科大学基础医学院病理生理学教研室(乌鲁木齐市830011);②新疆医科大学基础医学院生理学教研室;③新疆医科大学第一附属医院消化科;④中南大学湘雅医院消化科;⑤中南大学湘雅医院卫生部蛋白质组学重点实验室,⑥新疆医科大学基础医学院法医2007-2班

*本文课题受国家自然科学基金(编号:81001101);新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号:2010211B20);新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金(编号:XJEDU2010S24);自治区卫生厅青年科技人才专项科研基金项目(编号:2009Y06)资助

通信作者:张志强 zhiqiangzhang2011@hotmail.com

胃癌(gastric cancer, GC)的发生发展是多因素、多阶段和多基因/蛋白改变的过程,其发病机制不清是目前GC发病率高、早期诊断率低、治疗及预后差的主要原因。因此寻找GC的生物标记物,研究其发病机制,是GC早期诊断和防治的关键。S100A9是一种钙结合蛋白,与细胞的分化、转录、信号转导、迁徙和黏附过程有紧密联系,研究发现S100A9参与结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌等多种肿瘤的发生发展^[1-3]。本研究应用激光捕获显微切割(Laser capture microdissection, LCM)纯化GC细胞及对应的癌旁胃黏膜(gastric mucosa, GM)上皮细胞,¹⁸O标记结合纳升级反向液相色谱串联质谱(Nano-RPLC-MS/MS)定量蛋白质组技术鉴定纯化获得两种组织的差异蛋白,Western-blot验证S100A9蛋白质的差异表达;为了进一步研究该蛋白在GC中的作用,本研究扩大样本量,使用免疫组织化学S-P法检测S100A9在GC、GM及原发性GC转移的淋巴结(lymph node, LN)中的表达,分析其表达与患者的年龄和性别,GC的分化程度、浸润深度及淋巴结转移, TNM分期等临床病理参数的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 选择2009年6月至10月新疆医科大学第一附属医院普外科手术切除胃癌标本15例,男性9例,女性6例, TNM分期包括I~IV期。手术标本切除时间30min内,取GC组织及配对的癌旁(距原发肿瘤>5 cm) GM组织,80℃冰箱保存备用用于蛋白质组学和Western-blotting。档案记载临床病理参数完整的石蜡包埋组织标本包括:GC组织118例、GM组织70例和原发性GC转移的LN 35例。男性60例,女性58例;年龄35~81岁,平均59.6岁;肿瘤侵犯黏膜及黏膜下层、肌层、浆膜及浆膜外层分别为8、49、13和48例;无淋巴结转移者51例,有淋巴结转移者67例;高、中和低分化者分别为48、38和32例; TNM分期I、II、III和IV期分别为8、46、61和3例,用于免疫组织化学方法检测。所有样本均经新疆医科大学伦理委员会的审查认可。

1.1.2 主要试剂与仪器 LCM试剂:甲基绿染色剂(美国Sigma-Aldrich公司),苏木素、伊红染色剂(福州迈新生物技术开发公司);¹⁸O/¹⁶O标记试剂:98% H₂¹⁸O(江苏Huayi Isotope公司), Immobilized TPCK trypsin(美国Pierce公司);质谱鉴定试剂:TFA、NH₄HCO₃、甲酸、乙腈,(美国Sigma-Aldrich公司); Mascot MS/MS数据库查询软件(英国Matrixscience公司);兔抗人S100A9抗体(英国Abcam公司),辣根HRP标记羊抗鼠二抗(美国Santa Cruz公司)。West-

ern blot试剂(SDS, Tris, 甘氨酸, ECL试剂);免疫组织化学试剂:S-P试剂盒、DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。主要仪器:LCM切割仪、C1900冰冻切片机(德国Leica AS公司),Hofer SE 600垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司);ESI-Q-TOF-MS质谱仪(英国Micromass公司)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白样本制备及标记 GC及配对的癌旁GM组织(8~10 μm)连续冰冻切片,贴于LCM专用薄膜载片上,75%乙醇固定后,采用甲基绿染色;LCM仪分别切割捕获GC和GM上皮细胞;组织细胞裂解液裂解提取总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度。GC和GM两种样本蛋白分别平行上样到两个泳道,10%SDS-PAGE电泳对总蛋白预分离,上样量均为100 μg,泳毕,考马斯亮蓝R-250染色凝胶;按凝胶显示条带平行切割成36对配对的蛋白凝胶条带,经洗涤、脱色、脱水、二硫苏糖醇还原、碘乙酰胺烷基化和真空离心干燥处理后,加入胰蛋白酶溶液酶解,37℃孵育过夜后萃取,合并为多肽混合物提取液,冻干;8 μL H₂¹⁸O(或H₂¹⁶)和2 μL乙腈加入混有Immobilized trypsin的多肽混合物中,混匀后37℃孵育24 h行¹⁸O/¹⁶O标记,结束后1 μL甲酸终止反应。

1.2.2 差异蛋白质鉴定和质谱数据分析 Nano-RPLC-MS/MS在不同含有多肽混合物的Eppendorf管中加入流动相A液(2%乙腈水溶液,含0.1%甲酸)。用辅助泵,以流动相A液,在流速为20 μL/min,10 min,将样品上样至预柱上并脱盐,后将预柱切换到与毛细管分析柱相连,梯度洗脱。溶剂梯度为:B液(水/乙腈,v/v,并加入0.1%甲酸),5%B:0~10 min;5%~90%B:55 min;90%B:5 min;90%~100%B:10 min;15 min平衡后,行下一次分离。

洗脱液直接通过ESI源离子化进入Q-TOF质谱仪进行分析。Glu-Fibrino peptide B标准肽段对质谱仪外标校正,质谱数据经Masslynx4.0处理产生peaklist(pk1)文件,使用Mascot 2.0查询IPI数据库鉴定蛋白质。采用Masslynx软件从总离子流(TIC)图中提取包含待定量肽段的一级质谱Survey Scan,整合后产生用于定量分析的质谱图,参考文献[4]用Equation计算出¹⁶O/¹⁸O比值。

1.2.3 Western-blot检测S100A9蛋白的表达 经LCM捕获的15对GC和GM细胞为样本,经裂解和蛋白浓度测定后,10%SDS-PAGE分离样本种蛋白,上样量40 μg,100V,2 h,电泳完毕转移至PVDF膜上,兔抗人S100A9抗体(1:500)4℃孵育10~14 h,辣根HRP标记羊抗鼠二抗(1:2000)室温孵育1~2 h。ECL发光、显影、定影和曝光。

1.2.4 IHC 严格按照试剂盒说明书操作,SP法检测S100A9蛋白在石蜡包埋标本中的表达。已知的阳性片作阳性对照;PBS液代替一抗作阴性对照。S100A9一抗的稀释浓度为1:400。IHC评分:随机选取至少10个高倍镜视野($\times 200$),至少计数1000个细胞,据染色强度和阳性细胞比例计分。着色强度:无色0分;浅黄色1分;棕黄色2分;棕褐色3分。着色细胞比例:无着色0分,1分($<10\%$),2分($10\% \sim 50\%$),3分($51\% \sim 80\%$),4分($>80\%$)。两者相乘 <8 分为阴性, ≥ 8 分为阳性。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件分析:不同组织间S100A9蛋白差异表达及与GC临床病理参数间关系采用 χ^2 检验及Fisher确切概率法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GC和GM的差异蛋白质的分离鉴定和质谱数据分析结果

标准 $^{18}O/^{16}O > 2$ 或 $^{18}O/^{16}O < 0.5$ 视为差异蛋白,经Nano-RPLC-MS/MS鉴定及ESI-Q-TOF-MS质谱数据分析,共发现78个差异蛋白质,与GM相比,在GC高表达蛋白质42个,而低表达蛋白质36个;它们涉及多方面功能,如作为代谢酶、参与酶解和细胞信号转导、发挥细胞骨架作用等。其中S100A9在GC和GM表达的比值为1:0.09。

2.2 Western-blot检测S100A9蛋白的表达

GAPDH为内参照,测定条带灰度值,以最大者为1,其它与之相除所得比值为相对表达水平。与GM相比,S100A9蛋白在GC组表达上调($P < 0.01$),据灰度分析的差异蛋白的定量关系,Western-blot的结果与定量蛋白质组学基本一致(表1)。

表1 Western blotting检测S100A9蛋白在GM和GC的表达

Table 1 S100A9 protein expression in GM and GC under western blot analysis

组别	n	S100A9	t	P
GM	15	0.080 ± 0.006	34.179	<0.001
GC	15	0.886 ± 0.090		

2.3 免疫组织化学检测S100A9蛋白在各组的表达

免疫组织化学检测S100A9蛋白主要在胞质表达,结果显示:S100A9蛋白在GM、GC及LN中表达逐渐上调,阳性率分别依次为32.86%(23/70)、61.02%(72/118)、82.86%(29/35)($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表2)。分析其与GC临床病理参数的关系:S100A9蛋白表达与GC浸润深度、TNM分期和分化程度相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);在有淋巴结转移的GC中较无转移的表

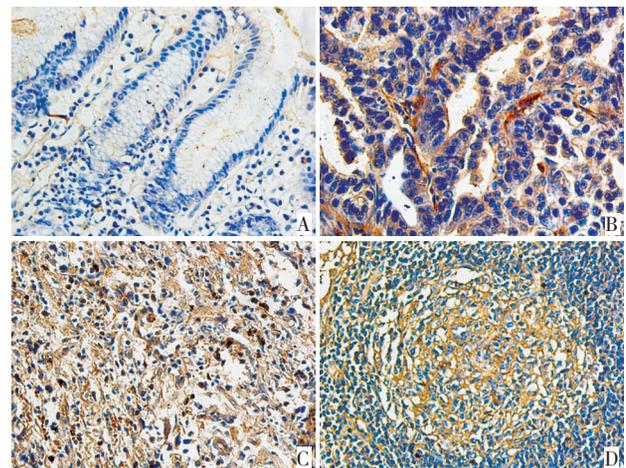
达上调($P < 0.01$);而与患者的年龄和性别无关($P > 0.05$)(图1,表3)。

表2 IHC检测S100A9蛋白在GM、GC和LN中的表达

Table 2 S100A9 protein expression in GM, GC, and LN under immunohistochemistry

组织类型	n	S100A9		χ^2	P
		阳性例数	阳性率%		
GM	70	23	32.86	13.937 ^a	0.000 ^a
GC	118	72	61.02	5.739 ^b	0.017 ^b
LN	35	29	82.86	23.335 ^c	<0.001

^a:GM与GC组比较;^b:GC与LN组比较;^c:LN与GM比较



A: S100A9蛋白正常胃黏膜(GM)中呈阴性;B:在高分化GC中呈阳性表达;C:低分化GC中呈阳性表达;D:在转移的淋巴结(LN)中呈阳性表达

图1 IHC检测S100A9蛋白在GM、GC和LN中的表达(S-P $\times 400$)

Figure 1 Validation of S100A9 expression in GM, GC and LN by IHC

表3 GC中S100A9蛋白的表达与其临床病理参数的关系

Table 3 Relationship between S100A9 protein expression in GC and clinicopathologic parameters

临床病理参数	n	S100A9表达		χ^2	P
		阳性例数	阳性率%		
性别	男	60	34	0.971	0.324
	女	58	38		
年龄(岁)	≤ 55	52	32	0.011	0.918
	> 55	66	40		
淋巴结转移	无	51	25	5.435	0.020
	有	67	47		
分化程度	高分化	48	22	7.842	0.005
	中/低分化	70	50		
浸润深度	黏膜+肌层	57	29	4.766	0.029
	浆膜+浆膜外	61	43		
TNM分期	I/II	54	26	6.932	0.009
	III/IV	64	46		

3 讨论

S100A9蛋白是钙结合蛋白S100家族的重要成

员之一,可高选择性高亲和性与Ca²⁺、Zn²⁺结合,兼具细胞内、外调节活性,具有多种功能。S100A9主要表达于中性粒细胞、单核巨噬细胞,参与多种炎症性疾病^[5],而炎症与肿瘤密切相关^[6];S100A9在细胞的增殖、分化、凋亡和迁移中也发挥重要生物学作用。近年来,越来越多的研究表明S100A9与多种肿瘤的病理生理进展相关,这为肿瘤的发病机制探讨、早期诊断、预测预后及治疗靶标提供了新思路。

目前认为胃癌是多基因多蛋白质疾病,蛋白质组学技术在寻找胃癌发生发展、浸润转移等相关生物学行为的肿瘤标记物具有重要作用。但目前没有一种标志物用于临床胃癌的诊断、检测进展及预后评估。所以,胃癌的蛋白质组学仍需不断深入。本研究采用¹⁸O标记联合Nano-RPLC-MS/MS这一先进的定量蛋白质组学技术,对LCM获得同质性>90%的GC和GM细胞进行差异蛋白质筛选鉴定。结果筛选出GC高表达蛋白质42个,低表达蛋白质36个,其功能涉及多方面,这对胃癌蛋白质组学的深入研究、发病机制的探讨及生物学标志物的寻找具有重要意义。

S100A9是胃癌蛋白质组学发现的GC上调表达的蛋白质之一,研究表明^[3]其在多种肿瘤异常表达并与其发生发展、侵袭转移和预后密切相关;S100A9在口腔舌癌、甲状腺癌、肺癌、乳腺癌、肝癌和膀胱癌等上调表达,而其在食管鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌等则呈下调表达。Arai等^[7]发现S100A9在乳腺癌的阳性表达率不仅与低分化相关,而且和核分裂数、MIB-1指数、HER-2表达、淋巴结转移及临床期别均呈正相关;Kawai等^[8]发现S100A9可作为一个独立的高风险因子,通过S100A9的高表达可预测非小细胞性肺癌患者的不良预后。本研究在定量蛋白质组学和Western-blot的基础上,扩大了样本含量,采用免疫组化对118例GC和原发性GC转移的LN 35例进行研究,以70例正常GM为对照。结果验证了蛋白质组学和Western-blot的结果;分析S100A9表达与GC临床病理参数的关系表明:S100A9的表达与患者的年龄、性别无关;而与有无淋巴结转移、GC的分化程度、浸润深度和TNM分期均有关,S100A9在有淋巴结转移者较无淋巴结转移的GC中上调;GC的浸润深度深者、TNM分期高者,S100A9升高表达;而GC分化程度高者,S100A9则降低表达。上述结果说明:S100A9参与了GC的病理生理过程,通过S100A9的表达水平可初步预测GC的进展及预后。

目前S100A9参与GC发生发展、浸润转移的机制尚不清楚,Yong等^[9]用小干扰RNA技术抑制浸润型的人胃癌细胞系SNU484表达的S100A9时,SNU484的浸润和迁移能力明显被抑制,同时发现SNU484细

胞表达的基质金属蛋白酶-2明显下降,因此认为S100A9参与浸润和迁移与基质金属蛋白酶-2下调表达相关。乳腺癌中S100A8/A9表达与H-Ras介导的细胞入侵和迁移的细胞分裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号路径产生相互干扰。Ichikawa等^[10]的研究发现S100A8/A9通过激活MAPK和NF-κB两条信号转导通路,而参与结肠癌的发生、发展和转移。S100A8/A9可通过线粒体-细胞色素C旁路或S100A8/A9-Zn²⁺-casepase-3途径导致细胞凋亡。此外,S100A9在肿瘤中的作用可能与氧化应激、血清淀粉样蛋白A3和Bcl-2等因素相关,上述研究从某些方面一定程度上解释S100A9参与肿瘤的可能机制,为深入研究S100A9在GC中的作用机制提供了帮助和思考。

本研究结果提示:S100A9上调在GC的发生发展、浸润转移中发挥重要作用,其参与GC的机制是否与上述因素有关值得进一步研究;随着对S100A9的深入了解,其在GC中作用机制的确定,S100A9有望成为GC预后预测、药物治疗的靶标。

参考文献

- O'Dwyer D, Ralton LD, O'Shea A, et al. The proteomics of colorectal cancer: identification of a protein signature associated with prognosis [J]. PLoS One. 2011, 6(11): e27718.
- Yan X, Lan-Qin C, Long-Yu J, et al. Quantitative proteomic study of human lung squamous carcinoma and normal bronchial epithelial acquired by laser capture microdissection [J]. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012: 510418.
- 朱雪洁,郑飞,云朱雪琼.S100A9在癌症中的研究进展[J].医学研究杂志,2011,40(6):164-167.
- Qian WJ, Monroe ME, Liu T, et al. Quantitative proteome analysis of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using 16O/18O labeling and the accurate mass and time tag approach [J]. Mol Cell Proteomics, 2005, 4(5): 700-709.
- Källberg E, Vogl T, Liberg D, et al. S100A9 Interaction with TLR4 Promotes Tumor Growth [J]. PLoS One. 2012, 7(3): e34207.
- Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer [J]. World J Gastrointest Surg. 2012, 27, 4(3): 62-72.
- Arai K, Takano S, Teratani T, et al. S100A8 and S100A9 overexpression is associated with poor pathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8 (4): 243-252.
- Kawai H, Minamiya Y, Takahashi N. Prognostic impact of S100A9 overexpression in non-small cell lung cancer [J]. Tumour Biol, 2011, 32(4): 641-646.
- Yong HY, Moon A. Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells [J]. Arch Pharm Res, 2007, 30(1): 75-81.
- Ichikawa M, Williams R, Wang L, et al. S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(2): 133-148.

(2012-03-29收稿)(2012-04-29修回)

(本文编辑:贾树明)