

S100A11 在结肠癌的表达及其与临床特征的关系

李春成 贺修胜 王 妍 陈苏琼 姚旭炯 李 丽

(南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的: 探讨 S100A11 在结肠癌和正常肠粘膜组织中的表达及其与患者临床特征的关系。方法: 采用 RT-PCR、Western Blotting 技术, 检测 S100A11 在 24 例结肠癌及正常肠粘膜中的表达, 并分析 S100A11 与患者年龄、性别、临床病理分型之间的关系。结果: S100A11 mRNA 在结肠癌组织的表达量(0.944 ± 0.032) 高于正常肠粘膜组织中的表达量(0.828 ± 0.079), 两组比较差异有统计学意义($p < 0.05$)。S100A11 蛋白在结肠癌组织中的表达量(0.951 ± 0.02) 高于在正常肠粘膜组织中的表达量(0.860 ± 0.05), 两组比较差异有统计学意义($p < 0.05$)。但与患者临床特征之间比较差异无统计学意义($p > 0.05$)。结论: S100A11 在结肠癌组织中表达量高于正常肠粘膜组织, 提示其与结肠癌的发生和发展有关, 是判断结肠癌生物学行为的有价值的参考指标。

关键词: S100A11; 结肠癌; RT-PCR; Western Blotting

中图分类号: R735.35 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2010)02-338-03

Expression and clinical features of S100A11 in colon carcinoma tissues

LI Chun-cheng, HE Xiu-sheng, WANG Yan, CHEN Su-qiong, YAO Xu-jiong, LI Li

(Cancer Research Institute of Central South University, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To study the expression of S100A11 in normal and carcinoma colon tissues and the correlation between the result and clinical feature. **Methods:** The expression of S100A11 in 24 colon carcinoma and normal colon tissue were examined by RT-PCR and Western Blotting. The relationship between S100A11 and clinical parameters including patient's age, sex, differentiation degree were analyzed. **Result:** Expression intensity value of S100A11 mRNA was 0.944 ± 0.032 in human colon cancer tissues, Which of human normal colon mucous membrane Tissue was 0.828 ± 0.079 ($p < 0.05$). Expression intensity value of S100A11 protein was 0.951 ± 0.02 in human colon cancer tissue, Which of human normal colon mucous membrane tissue was 0.860 ± 0.05 ($p < 0.05$). Results suggest the expression of S100A11 in colon cancer tissues was higher than that in normal colon tissues. **Conclusion:** Expression of S100A11 in colon cancer tissues was higher than that in normal colon tissue. Which indicates that S100A11 would play a significant role in the tumorigenesis and development of colon cancer, therefore, S100A11 could be regarded as a valuable prediction index that aims to judge biological behavior of colon cancer.

Key words: S100A11; colon carcinoma; RT-PCR; Western Blot

Chinese Library Classification(CLC): R735.33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2010)02-338-03

前言

S100A11 属 S100 蛋白家族成员之一, 最初由猪的心肌细胞和鸡砂囊平滑肌细胞中纯化出来, 称 S100C 或钙囊素^[1]。S100 蛋白属酸性蛋白, 分子量在 10~12kDa, 主要在脊椎动物中发现, 在人类 S100 蛋白的基因大部分在染色体 1q21 区, 肿瘤在此区的基因常频繁重组, 易引起 S100 基因表达失控^[2]。S100A11 与钙结合之后, 蛋白的构象发生改变, 暴露出疏水区, 然后与靶蛋白结合。其主要功能是转导钙依赖性的细胞调节信号, 参与细胞的增殖、分化、细胞凋亡和癌症的形成和进展^[3]。近年研究表明 S100A11 在胃癌^[4]、乳腺癌^[5]、膀胱癌^[6]等多种恶性肿瘤中有高表达。为了探讨 S100A11 与结肠癌发生发展的关系, 本研究采用 RT-PCR 和 Western blotting 技术, 拟从 mRNA 和蛋白两

个水平上检测其在结肠癌中的表达情况, 进而阐述 S100 基因与临床特征的关系。

1 材料与方法

1.1 标本的收集和处理

24 例结肠癌组织及其配对的正常肠粘膜组织(距癌灶 10 cm 以上的结肠粘膜组织) 均从 2009 年 9 月至 2010 年 6 月取材于南华大学附一医院结肠癌手术切除标本, 术前均未经放化疗处理, 经病理学证实, 高分化腺癌 12 例, 中分化 9 例, 低分化 3 例。男性 16 例, 女性 8 例。年龄在 42-77 岁, 平均 56 岁。所有标本在获得后立即放入液氮或 -80℃ 超低温冰箱中保存。

1.2 试剂

提 RNA 试剂盒购自美国 Omega 公司, 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, PCR 引物序列由上海生工生物工程公司合成, 鼠抗人 S100A11 单克隆抗体购自 abnova 公司, 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自中杉金桥生物技术公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗购自 jacksonimmuno 公司, BCA 蛋白定量试剂盒和

作者简介: 李春成, (1977-), 男, 硕士研究生, 医师, 研究方向: 结肠癌易感性机制, E-mail: chunchengli.good@163.com

电话: 13875705373

(收稿日期: 2010-09-01 接受日期: 2010-09-24)

ECL 化学发光试剂盒均购自碧云天生物公司。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR 检测 将新鲜标本组织经液氮研磨后,按照美国 Omega 试剂盒提供的说明书操作,提取总 RNA,所得 RNA 沉淀用 20 μ l DEPC 水溶解,取 5 μ l 总 RNA 行琼脂糖凝胶电泳,采用紫外分光光度法测定总 RNA 含量和纯度。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录,得到 cDNA.S100A11 上游引物 5'-TTCATCATGCGGTCAAG-3',下游引物 5'-AAAATCTCC-AGCCCT ACA-3',扩增产物长度为 191 bp; β -actin 上游引物 5'-TGACCCAGATCATGTTTG-3',下游引物 5'-CTTTGCG-GATG TCCA CGTC-3',扩增长度为 519 bp(引物均由上海生工生物公司合成)。反应体系为 25 μ l:12.5 μ l PCR mix,上下游引物 10 μ mol/L 各 1 μ l,2 μ l cDNA,8.5 μ l ddH₂O。热循环参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52.8 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min 共 34 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 3 μ l 进行 1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统照相。应用 Alpha-magerTM2200 凝胶成像系统对条带进行扫描分析。

1.3.2 Western Blot 检测约 50 mg 组织加 500 μ l 蛋白裂解液,匀浆器匀浆提取总蛋白,BCA 法蛋白定量。取 100 μ g 总蛋白在 PCR 仪上变性 10 min 后,上样,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,以恒流 105mA 将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜。50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 4 h,适当浓度一抗(鼠抗人 S100A11 单克隆抗体 1:300,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 1:1000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 10min $\times$ 3 次。辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗鼠 1:5000)室温孵育 1 h,TBST 漂洗 10 min $\times$ 2 次;ECL 化学发光法显影定影。

1.4 统计学分析

各分组所得计量资料数据统计结果都采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件处理数据。Western blot 和 RT-PCR 结果采用配对 t 检验,S100A11 与病人临床病理因素间的关系采用独立样本 t 检验和完全随机设计资料的方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

电泳结果显示提取总 RNA 呈现 28S,18S,条带清晰,且 28S 亮度接近 18S 的两倍,未见降解现象(见图 1)。紫外分光光度计测定表明 A260/A280 > 1.8 ,表明提取的总 RNA 完整且纯度较高。

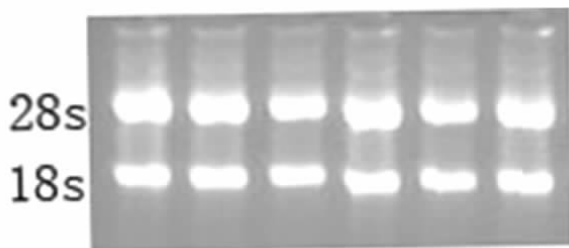


图 1 RNA 电泳图

Figure 1 Electrophoresis of RNA

2.2 RT-PCR 结果

24 例配对结肠癌组织和正常肠粘膜组织中,S100A11 和 β -actin 均有表达,表达率为 100%。结肠癌组织及相应正常肠粘膜组织中 S100A11mRNA 表达量相对值分别是 (0.944 $\pm$ 0.032) 和 (0.828 $\pm$ 0.079)(图 2,表 1),结肠癌组织中 S100A11 表达明显增强,两组差异比较有统计学意义($p < 0.05$)。



N1,N2:正常肠粘膜组织

C1,C2:结肠癌组织 M:Marker

图 2 S100A11 基因的 mRNA 表达

Figure2 The mRNA Expression of S100A11

2.3 western Blot 结果

S100A11 蛋白在 24 例结肠癌组织中均有表达,表达率 100%。结肠癌组织及相应正常肠粘膜组织中 S100A11 蛋白表达量相对值分别是(0.951 $\pm$ 0.02)和(0.860 $\pm$ 0.05)(图 3,表 1),结肠癌组织中 S100A11 表达明显增强,两组差异有统计学意义($p < 0.05$)。

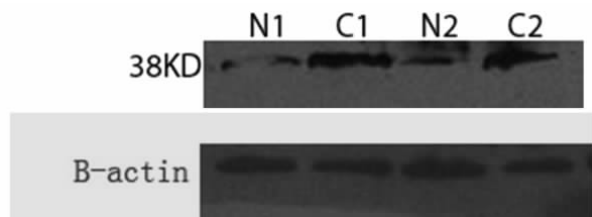


图 3 S100A11 蛋白在结肠癌和正常肠粘膜组织中的表达

N1,N2:正常肠粘膜组织 C1,C2:结肠癌组织

Fig 3 Expression of S100A11 protein in normal and carcinoma colon tissue

2.4 S100A11 的表达与结肠癌临床病理特征的关系

将结肠癌按不同的临床病理特征进行分组比较 S100A11 的 mRNA 和蛋白表达水平,统计结果显示,差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

3 讨论

S100A11 基因属 S100 基因家族成员之一,S100 基因家族共有 20 个成员,其编码的蛋白均为钙结合蛋白,蛋白结构均由两个与钙离子有高亲和力的 EF-手型结构组成^[7]。该蛋白并不是普遍存在的,在胎盘中表达丰富,在心脏、肺、肾脏、骨骼肌和平滑肌中表达中等,在其他组织中表达较弱^[8]。S100A11 与其他 S100 蛋白在细胞内的分布不同,主要是分布在细胞核中。TORRES-CABALA 等发现 S100C 在良性病变中是定位在细胞

表 1 S100A11 在结肠癌和正常肠粘膜组织中的表达

Table1 Expression of S100A11 in normal and carcinoma colon tissue

Group	n	S100A11mRNA(Rv)	P	S100A11protein(Rv)	P
Normal	24	0.828+0.07	<0.05	0.860+0.05	<0.05
Cancerous	24	0.944+0.032	<0.05	0.951+0.02	<0.05

表 2 S100A11 与结肠癌临床病理的关系

Table 2 the relation of S100A11 and clinicopathologic characteristics of colon cancer

Variable	N	S100A11 mRNA(Rv)	S100A11protein(Rv)
Sex			
Male	16	0.938+0.035	0.953+0.02
Female	8	0.955+0.023	0.947+0.02
Age			
<50	7	0.939+0.030	0.952+0.023
50	17	0.946+0.033	0.950+0.019
Differentiation degree			
High	12	0.932+0.034	0.954+0.02
Moderate	9	0.956+0.025	0.947+0.023
Low	3	0.952+0.035	0.951+0.02

核中的,而在恶性中是定位在细胞质中的^[9]。

随着对 S100C 蛋白的进一步研究,发现它与许多恶性肿瘤的发生、发展和转移密切相关。近年研究表明,S100A11 在多种恶性肿瘤中存在高表达。Rehman I 等^[10]报道在良性的前列腺组织基底细胞层中 S100A11 的免疫反应缺失 / 下降表达,而 24 / 30 (80%) 前列腺癌病例中的腺癌细胞该蛋白表达升高,在平滑肌细胞及某些炎细胞中也见表达升高。Julia D1 Wulfkühle 等^[11]利用蛋白质组学方法对乳腺导管原位癌及相匹配的正常腺体组织进行分析,发现在癌组织中 S100A11 高表达。GuiYuWang^[12]等应用蛋白质组学方法发现 S100A11 在直结肠癌中高表达,并且随着疾病的进展表达量增加。本研究也证实,发现 S100A11 在结肠癌中的表达明显高于正常组织。但与其临床特征的相关分析时,结果显示差异无统计学意义($P>0.05$),可能还需扩大样本量再验证。从以上研究结果都显示,S100A11 呈现癌基因功能。然而,还有部分报道表明 S100A11 在某些肿瘤组织中,如胰腺癌^[13]、膀胱癌^[14]中表达下调,可能是一种潜在的抑癌基因。Ohuchida 等^[15]发现 S100C 的表达在胰腺癌的早期致癌阶段是上升的但随着发展在后期是下降的,也可能部分的解释了这个问题。这些研究结果表明,S100A11 蛋白在肿瘤发生和发展,其功能的复杂性。然而,对于 S100A11 蛋白在什么情况下发挥癌基因和抑癌基因功能?它又是如何调节肿瘤的形成和进展?其具体发病机制都还不清楚。因此,显示 S100A11 蛋白研究的价值性和临床意义。

本课题组前期采用蛋白质组学方法筛选出 S100A11 蛋白,并研究证实 S100A11 在胃癌和正常胃粘膜组织中存在差异表达。为了进一步弄清 S100A11 基因相关功能,本课题在前期工作基础上,进一步验证 S100A11 在结肠癌组织中的差异表达,

发现 S100A11 在结肠癌中的表达明显高于正常肠粘膜组织。因此,研究结果表明,S100A11 可能在结肠癌、胃癌中促进肿瘤的形成。然而,关于它的具体作用机理还有待进一步深入研究。

参考文献(Reference)

- [1] Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R et al. Subcellular localization of S100A11 (S100C, calgizzarin) in developing and adult avian skeletal muscle [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1600 1-2: 12-84
- [2] Salama I, Malone PS, Mihaimeed F et al. A review of the S100 proteins in cancer [J]. J Cancer Surg, 2008, 34 4: 357
- [3] 邵凤娟, 成军, 马英骥, 等. 人肝再生增强因子下调钙结合蛋白 S100A11 基因表达的研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15 (1): 42
- [4] Feng Juan Shao, Jun Cheng, Ying Jing Ma, et al. Human Liver regeneration increasing gene down-regulate gene expression of S100A11 [J]. Magazine of stomach-enterology and liver disease, 2006, 15 (1): 42
- [5] 王妍, 贺修胜, 董娟慧, 等. S100A11 的表达及其与胃癌的关系 [J]. 现代生物医学进展杂志, 2009, 22 4303-05
- [6] Yan Wan, Xiu Sheng He, Qiong Su Chen, et al. Expression and relation with stomach cancer of S100A11 [J]. progress in modern biomedicine, 2009, 22(9): 4303-05
- [7] 李万锋, 张彬, 贾泓瑶, 等. S100A11 在乳腺癌和癌旁组织中的表达及其与临床特征的关系 [J]. 中国妇幼保健杂志, 2009, 24 539-541
- [8] Wang Feng Li, Bing Zhang, Hong Yan Jia, Shi Fu Zhang, et al. Expression and relation of clinical character of S100A11 in Galactophore cancer and cancer side tissues [J]. Magazine of Chinese women-children health care, 2009, 24: 539-541
- [9] Yao R, Davidson DD, Lopez-Beltran A, et al. The S100 proteins: for screening and prognostic grading of bladder cancer [J]. Histol-Histopathol, 2007, 22(9): 1025-1032

(下转第 331 页)

- [4] Chi HJ, Zhang DP, Yang XC, et al. Hyperglycemia at admission and outcome in elderly patients with acute ST segment elevation myocardial infarction underwent primary percutaneous coronary intervention [J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2009,37(7):595-598
- [5] 廖二元,超楚生.内分泌学[M].人民卫生出版社,2001
Liao Er-yuan, Chao Chu-sheng. Endocrinology[M]. People's medical publishing house, 2001
- [6] Ceriello A. Cardiovascular effects of acute hyperglycaemia: pathophysiological underpinnings[J]. Diab Vasc Dis Res, 2008,5(4):260-268
- [7] Gasior M, Stasik-Pres G, Pres D, et al. Relationship between blood glucose on admission and prognosis in patients with acute myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention[J]. Kardiologia Pol, 2007,65(9):1031-1038
- [8] Capes SE, Hunt D, Malmberg K, et al. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes : a systematic overview [J]. Lancet, 2000,355: 733-778
- [9] 娄国忠,夏志荣.急性心肌梗死与应激性高血糖关系的探讨[J].心脑血管病防治,2004,4(3): 32-34
- Lou Guo-zhong, Xia Zhi-rong. To investigate the relationship between acute myocardial infarction and stress hyperglycaemia [J]. Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral-Vascular Disease, 2004,4(3): 32-34
- [10] Malberg K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus :DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study [J]. BMJ, 1997,314(7093):1512-1515
- [11] Mü despacher D, Radovanovic D, Camenzind E, et al. Admission glycaemia and outcome in patients with acute coronary syndrome[J]. Diab Vasc Dis Res, 2007,4(4):346-352
- [12] 韩佳琳,马山英,陈月华,等.糖尿病心血管并发症研究现状[J].国外医学内分泌学分册,2005,25(3):213
Han Jialin, Ma Shanying, Chen Yuehua, et al. Current situation of diabetes and angiocardopathy. complications [J]. Foreign Medical Sciences Section of Endocrine, 2005,25(3):213
- [13] Sawin G, Shaughnessy AF. Glucose control in hospitalized patients [J]. Am Fam Physician, 2010,81(9):1121-1124

(上接第 340 页)

- [7] Nakayama S, Kretsinger RH. Evolution of the EF -hand family of protein[J]. Biophys Biomol Struct, 1994 ,23 :473 - 507
- [8] Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, et al. Subcellular localization of S100A11 (S100C, calgizzarin) in developing and adult avian skeletal muscles[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1600 (1 -2) :84
- [9] TORRES2CABALAC,BIBBOM,PANIZO2SANTOSA, et al. Proteomic identification of new biomarkers and application in thyroid cytology[J]. Acta Cytologica , 2006 , 50(5) : 51825281
- [10] Rehman I, Azzouzi AR, Cross SS, et al. Dysregulated expression of S100A11(calgizzarin) in prostate cancer and precursor lesions[J]. Hum Pathol, 2004, 35 (11) : 1385
- [11] Wulfschle JD, Sgroi DC, Krutzsch H et al. Proteomics of Human breast ductal carcinoma in situ[J]. Cancer Res, 2002, 62 (22) : 6740
- [12] Wang GY, Wang XS, Wang SH, et al. Colorectal cancer progression correlates with upregulation of S100A11 expression in tumor tissues [J]. Int J Colorectal Dis, 2008, 23 (7) : 675
- [13] 狄扬,陈耀辉,龙江,等.胰腺癌组织中差异表达蛋白的筛选与鉴定[J]. 外科理论与实践, 200712(5):429-433
Di Yang, Chen Yao-hui, Long Jiang, et al. Screening and identification expression proteins from pancreatic carcinoma and neighboring normal pancreatic tissues [J]. Journal of Surgery Concepts & Practice, 2007, 12(5):429-433(In Chinese)
- [14] Memon AA, Sorensen BS, Meldgaard P, et al. Down-regulation of S100C is associated with bladder cancer progression and poor survival [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11:606-611
- [15] Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, et al. S100A11, a putative tumor suppressor gene, is overexpressed in pancreatic carcinogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12 (18) : 5417