

分类号：  
学 号：20222014104

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学 硕 士 学 位 论 文



## S100A8 基因对裸鼠膀胱癌增殖、侵袭、转移 功能影响

学 位 申 请 人	庞震
指 导 教 师	王勤章 教授 欧阳松 副教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科 、 专 业 名 称	临床医学
研 究 方 向	外科学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2025年05月

分类号：  
学 号：20222014104

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### S100A8 基因对裸鼠膀胱癌增殖、侵袭、转移 功能影响

学 位 申 请 人	庞震
指 导 教 师	王勤章 教授 欧阳松 副教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	临床医学
研 究 方 向	外科学
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2025年05月

**Effects of S100A8 gene on the proliferation, invasion and  
metastasis of bladder cancer in nude mice**

A Dissertation Submitted to  
**Shihezi University**  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
**Master of Medicine**

By  
**Zhen Pang**

**Surgery(Urology)**

Dissertation Supervisor: Prof. Qinzhang Wang  
Vice-Prof. Song Ou-Yang

May, 2025

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：



时间： 2025 年 5 月 25 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间： 2025 年 5 月 25 日

导师签名：



时间： 2025 年 5 月 25 日

## 摘要

**目的:** 探讨 S100A8 基因对裸鼠膀胱癌增殖、侵袭、转移功能的影响

**方法:** (1) 运用 TCGA 数据库评估 S100A8 在膀胱癌中的表达水平; 选用 CCLE 数据库筛选的 S100A8 表达较高的膀胱癌细胞 HT-1376 并与人正常尿路上皮细胞株 SV-HUC-1 对比验证其高表达; 收集来自石河子大学第一附属医院泌尿外科的 46 例膀胱癌患者的病理组织石蜡切片在免疫组化染色后与 HPA 数据库下载的 S100A8 蛋白的免疫组化成像进行对比分析不同组织学分级和病理学分期膀胱癌组织与癌旁组织中 S100A8 蛋白表达水平的差异。(2) 构建稳定过表达及敲低 S100A8 的 HT-1376 细胞系, 通过 CCK8、EdU 增殖实验、Transwell 实验验证细胞的增殖与侵袭能力。(3) 使用细胞悬液注射法将膀胱癌细胞分别接种于 BALB/C-NU 裸鼠膀胱外壁下层与后肢皮下构建原位移植瘤膀胱癌动物模型及异位皮下膀胱癌动物模型。通过 HE 染色、qRT-PCR、Western blot 和免疫组化验证 S100A8 基因对膀胱癌增殖能力的影响。(4) 通过生物数据库挖掘与高通量测序技术 (RNA Sequencing, RNA-seq) 探索 S100A8 的相关信号通路。

**结果:** (1) S100A8 在多种癌症中高表达, 其高表达与膀胱癌患者不良预后存在相关性; 临床样本及 HPA 数据库样本显示 S100A8 在膀胱癌中高表达。(2) 成功构建了稳定过表达及敲低 S100A8 的膀胱癌细胞系 HT-1376。CCK-8、EdU 增殖实验、Transwell 实验检测结果显示: S100A8 可促进膀胱癌细胞增殖、侵袭和迁移(3) 成功构建了原位移植瘤膀胱癌动物模型及异位皮下膀胱癌动物模型。HE 染色结果显示 S100A8 高表达细胞异质性更强; WB 与 qRT-PCR 实验显示: 与阴性对照组相比敲低组 S100A8 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低; 过表达组 S100A8 的 mRNA 及蛋白表达水平显著增高; IHC 实验显示: 与阴性对照组相比敲低组 E-cadherin 抗体表达水平显著增高, Ki67 抗体表达水平显著降低; 过表达组 E-cadherin 抗体表达水平显著降低, Ki67 抗体表达水平显著增高。(4) RNA-seq 结果提示 S100A8 的表达与 P38/MAPK 通路、癌症通路等通路相关, WB 实验证实与正常组相比敲低组可抑制该通路相关蛋白的表达; 过表达组可增强该通路相关蛋白的表达。

**结论:** 体内外实验证实 S100A8 可促进膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移作用。

**关键词:** S100A8; 膀胱癌; 增殖; 侵袭; 迁移

## Abstract

Objective: To investigate the effect of S100A8 gene on the proliferation, invasion and metastasis of bladder cancer in nude mice

Methods: (1) TCGA database was used to evaluate the expression level of S100A8 in bladder cancer; The bladder cancer cell line HT-1376 with high expression of S100A8 screened by CCLE database was compared with human normal urothelial cell line SV-HUC-1 to verify its high expression. The paraffin sections of pathological tissues of 46 patients with bladder cancer were collected from the Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University. After immunohistochemical staining, the immunohistochemical imaging of S100A8 protein downloaded from HPA database was compared to analyze the differences in the expression level of S100A8 protein in bladder cancer tissues and adjacent tissues with different histological grades and pathological stages. (2) S100A8 overexpression and knockdown HT-1376 cell lines were constructed, and CCK8, EdU proliferation assay, and Transwell assay were used to verify the cell proliferation and invasion ability. (3) Bladder cancer cells were inoculated into the lower bladder wall and hind limbs of BALB/C-NU nude mice by cell suspension injection to establish orthotopic transplanted tumor bladder cancer animal model and ectopic subcutaneous bladder cancer animal model. HE staining, qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to verify the effect of S100A8 gene on the proliferation of bladder cancer. (4) S100A8 related signaling pathway was explored by RNA Sequencing (Rna-Seq).

Results: (1) S100A8 was highly expressed in a variety of cancers, and its high expression was correlated with poor prognosis of bladder cancer patients; Clinical samples and HPA database samples showed that S100A8 was highly expressed in bladder cancer. (2) S100A8 overexpression and knockdown in bladder cancer cell line HT-1376 were successfully established. CCK-8, EdU proliferation assay and Transwell assay showed that S100A8 could promote the proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells. (3) Orthotopic transplanted bladder cancer animal model and ectopic subcutaneous bladder cancer animal model were successfully constructed. HE staining showed that S100A8 high expression cells were more heterogeneous. WB and qRT-PCR showed that S100A8 mRNA and protein expression levels in the knockdown group were significantly lower than those in the negative control group. S100A8 mRNA and protein expression levels in the overexpression group were significantly increased. IHC experiments showed that compared with the negative control group, the expression level of E-cadherin antibody in the knockdown group was significantly increased, and the expression level of Ki67 antibody was significantly decreased. In the overexpression group, the expression level of E-cadherin antibody was significantly

decreased, and the expression level of Ki67 antibody was significantly increased. (4) The results of RNA-seq suggested that the expression of S100A8 was related to the P38/MAPK pathway, cancer pathway and other pathways. WB experiment confirmed that compared with the normal group, the expression of related proteins in the S100A8 pathway could be inhibited in the knockdown group. The overexpression group could enhance the expression of proteins related to this pathway.

Conclusions: S100A8 can promote the proliferation, invasion and migration of bladder cancer cells in vitro and in vivo.

**Key words:** S100A8; Bladder cancer; Proliferation; Invasion; Migration

# 目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
主要符号表.....	VI
前言.....	1
<b>第 1 章 材料与amp;方法.....</b>	<b>3</b>
1.1 数据库分析与临床样本验证.....	3
1.1.1 生物信息学分析.....	3
1.1.2 临床样本验证.....	3
1.2 实验试剂与耗材.....	3
1.2.1 实验动物.....	3
1.2.2 主要仪器设备与试剂耗材.....	3
1.2.3 主要仪器设备信息.....	3
1.3 实验方法.....	6
1.3.1 S100A8 在生物数据库的表达.....	6
1.3.2 免疫组织化学染色方法.....	6
1.3.3 IHC 染色结果的判读.....	7
1.3.4 膀胱癌细胞系的复苏, 传代, 冻存, 转染.....	7
1.3.5 CCK8 实验.....	9
1.3.6 EdU 实验.....	9
1.3.7 Transwell 迁移与侵袭实验.....	10
1.3.8 qRT-PCR 实验.....	10
1.3.9 肿瘤细胞注射液的制备.....	12
1.3.10 皮下异位模型的建立.....	12
1.3.11 原位移植瘤模型的建立.....	12
1.3.12 原位组模型活体显像.....	13
1.3.13 HE 染色.....	13
1.3.14 WB 实验.....	13
1.3.15 S100A8 促进膀胱癌增殖、侵袭和转移能力影响的机制研究.....	15
1.3.16 统计方法.....	15
<b>第 2 章 实验结果.....</b>	<b>16</b>
2.1 S100A8 在膀胱癌症中显著性高表达.....	16

2.2 成功构建 S100A8 膀胱癌稳转细胞系 .....	18
2.3 S100A8 可促进膀胱癌的增殖、侵袭与迁移 .....	19
2.4 成功构建异位皮下膀胱癌裸鼠模型 .....	20
2.5 成功构建原位移植瘤膀胱癌 .....	23
2.6 RNA-seq 测序结果 .....	25
<b>第 3 章 讨论</b> .....	<b>29</b>
<b>第 4 章 结论</b> .....	<b>33</b>
<b>第 5 章 综述</b> .....	<b>34</b>
5.1 尿液蛋白类标志物 .....	34
5.1.1 BTA .....	35
5.1.2 NMP22 .....	35
5.1.3 FDP .....	35
5.1.4 细胞学检测 .....	36
5.1.5 荧光原位杂交 .....	36
5.2 新型表观遗传标志物 .....	36
5.2.1 DNA 甲基化 .....	36
5.2.2 非编码 RNA 调控 .....	37
5.2.3 组蛋白修饰与染色体重塑 .....	37
5.3 多组学标志物整合 .....	38
5.4 人工智能辅助诊断 .....	38
5.5 展望 .....	39
参考文献 .....	40
致谢 .....	48
作者简介 .....	49
导师评阅表 .....	50

## 主要符号表

缩写词	英文全名	中文全名
AI	Artificial intelligence	人工智能
BC	Bladder Cancer	膀胱癌
BTA	Bladder Tumor Antigen	膀胱肿瘤抗原
CNV	Copy Number Variant	拷贝数变异
CSS	Cancer Specific Survival	肿瘤特异生存期
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization	荧光原位杂交
HDAC	Histone Deacetylase	组蛋白去乙酰化酶
HKMT	Histone lysine Methyltransferase	组蛋白赖氨酸甲基转移酶
IHC	Immunohistochemistry	免疫组织化学
OS	Ovarall Survival	总生存期
PRMT	Protein arginine Methyltransferase	组蛋白精氨酸甲基转移酶
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription-Pcr	实时定量逆转录 PCR
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
S100A8	S100 Calcium Binding Protein A8	S100 钙结合蛋白 A8
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase	编码端粒酶逆转录酶
UCA1	Urothelial Carcinoembryonic Antigen 1	尿路上皮癌抗原 1
NES	Normalized Enrichment Score	富集分析标准化值
WB	Western Blot	免疫印迹
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原活化蛋白激酶
Mkkk	Map Kinase Kinase Kinase	MAPK 激酶激酶
Mkk	Map Kinase Kinase	MAPK 激酶
WGD	Whole Genome Duplication	全基因组加倍

## 前言

膀胱癌 (Bladder Cancer, BC) 是全球第十大常见恶性肿瘤, 每年新发病例约 57 万例, 死亡病例 21 万例<sup>[1]</sup>, 其中肌层浸润性膀胱癌 (Muscle invasive bladder cancer, MIBC) 患者 5 年生存率不足 50%, 非肌层浸润性膀胱癌 (Non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC) 虽可通过经尿道切除术联合卡介苗灌注治疗, 但复发率高达 60%-70%, 且约 15%-30% 最终进展为转移性疾病<sup>[2]</sup>。传统化疗药物如顺铂和吉西他滨虽可短期内控制病情, 但肿瘤细胞通过激活 DNA 损伤修复 (如 ERCC1 过表达) 和抗凋亡通路 (如 Bcl-2 家族) 迅速产生耐药性, 导致治疗失败<sup>[3]</sup>。近年来, 免疫检查点抑制剂 (ICI) 如 PD-1/PD-L1 抗体虽为晚期患者带来希望, 但其响应率不足 30%, 且部分患者因免疫相关不良反应被迫停药<sup>[4]</sup>。这一困境提示, 解析膀胱癌耐药及免疫逃逸的核心分子机制, 尤其是肿瘤细胞与微环境交互作用中的关键调控因子, 是突破现有治疗瓶颈的重要方向。

S100 蛋白家族是一类钙结合蛋白, 因其中性饱和硫酸铵中 100% 溶解而得名, 其成员通过结合  $\text{Ca}^{2+}$  调控靶蛋白活性, 参与细胞增殖、分化、迁移等多种生物学过程<sup>[5]</sup>。研究表明, S100 家族在多种癌症中表达异常, 并与肿瘤发生、转移、耐药性及预后密切相关。S100 蛋白分子量小 (9-13 kDa), 具有两个 EF 手型钙结合结构域 (N 端为 S100 特异性, C 端为经典结构), 通过构象变化暴露疏水区, 与靶蛋白结合发挥功能<sup>[6]</sup>。成员包括 S100A1-A15、S100B、S100P 等, 以同源/异源二聚体形式存在。S100 蛋白可调控细胞周期 (如 S100A1、S100A11)、酶活性 (如 S100A4)、钙稳态 (如 S100B)、细胞骨架重塑 (如 S100A6) 等, 同时通过 RAGE 受体介导细胞外信号传导 (如激活 MAPK/NF- $\kappa$ B 通路)<sup>[7]</sup>。已有研究证实 S100A4 能够促进肿瘤转移, 与乳腺癌<sup>[8]</sup>、肺癌<sup>[9]</sup>、前列腺癌<sup>[10]</sup> 的侵袭性相关, 通过激活基质金属蛋白酶 (MMPs) 和上皮-间质转化 (EMT) 增强转移能力<sup>[11]</sup>; S100P 在胰腺癌<sup>[12]</sup>、肝癌<sup>[13]</sup>、结直肠癌<sup>[14]</sup> 中高表达, 促进细胞增殖和耐药性, 通过 RAB5C-P62-ACC1 轴抑制铁死亡<sup>[15]</sup>, 加速肿瘤进展; S100A8/9 可在结直肠癌<sup>[16]</sup>、胃癌<sup>[17]</sup> 中富集于肿瘤边缘, 通过炎症微环境促进血管生成和免疫逃逸<sup>[18]</sup>。

S100A8 (又称 MRP8 或 Calgranulin A) 及其异源二聚体伴侣 S100A9 (MRP14) 在多种恶性肿瘤中异常高表达<sup>[19]</sup>, 其功能具有双重性: 一方面, S100A8/A9 通过结合 Toll 样受体 (TLR4) 和晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 激活下游 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路, 直接促进肿瘤细胞增殖、迁移及血管生成<sup>[20]</sup>; 另一方面, S100A8 作为损伤相关分子模式 (DAMP) 分子, 可招募髓系来源抑制细胞 (MDSCs)、调节性 T 细胞 (Tregs) 和肿瘤相关巨噬细胞 (TAMs), 诱导免疫抑制微环境形成<sup>[21]</sup>。例如, 在结直肠癌中, S100A8 通过 CXCL5/CXCR2 生物轴促进结肠癌细胞增殖、侵袭和转移<sup>[22]</sup>; 在胰腺癌中,

S100A8/A9 复合体通过调控 CXCL1/CXCL2 趋化因子网络，驱动中性粒细胞浸润并加速转移<sup>[23]</sup>。然而，在膀胱癌中，S100A8 是否通过类似机制影响肿瘤进展，其表达是否与临床分期、病理分级及预后相关，目前尚未系统阐明。

E-cadherin 是一种钙依赖性跨膜糖蛋白，其作为上皮稳态的核心调控因子通过介导同型细胞间黏附维持组织结构的完整性<sup>[24]</sup>。在一些肿瘤中，E-cadherin 的表达下降或缺失使得细胞间的黏附能力减弱以促进肿瘤细胞的侵袭<sup>[25]</sup>。机制研究显示，过程 E-cadherin 表达衰减常与上皮-间质转化（EMT）相关，其在膀胱癌组织中的表达显著低于正常组织，且低表达与肿瘤分期、淋巴结转移及预后不良相关<sup>[26]</sup>。Ki67 是一种核增殖标志物，仅在细胞周期的 G1 后期至 M 期表达，它的表达水平直接反映肿瘤细胞的增殖活性，Ki67 的高表达通常提示肿瘤恶性程度高、增殖速度快，并与侵袭性、复发风险及生存率下降相关<sup>[27]</sup>。Ki67 的高表达与膀胱癌病理分级、临床分期（如 T1-T4 期）及复发风险显著相关，例如，Ki67 $\geq$ 20%可作为非肌层浸润性膀胱癌（NMIBC）进展的独立危险因素<sup>[28]</sup>，在膀胱癌中，E-cadherin 低表达常伴随 Ki67 高表达，两者共同反映肿瘤的侵袭性和增殖活性联合检测 E-cadherin 和 Ki67 可更全面评估肿瘤的恶性程度<sup>[29]</sup>。因此了解 E-cadherin 与 Ki67 蛋白在膀胱癌中的表达情况可以更好的评估 S100A8 基因对肿瘤侵袭性和增殖活性的影响。

膀胱癌相关动物模型的研究近年来在病理机制探索、药物筛选及个体化治疗中发挥了重要作用，主要分为原位致癌物诱发性膀胱癌动物模型、原位移植瘤膀胱癌动物模型、原位自发性膀胱癌动物模型、原位基因工程膀胱癌动物模型、异位膀胱癌动物模型<sup>[30]</sup>。

我们课题组在前期的研究中基于多组学数据挖掘平台分析了 S100A8 在膀胱癌中的表达情况，为了进一步验证 S100A8 在膀胱癌增殖、侵袭中的作用，我们完善了 CCK8、EdU 增殖与 Transwell 侵袭与迁移等细胞实验；再经体内动物实验探讨 S100A8 的表达在膀胱癌恶性生物学行为中的作用，最后进行 RNA-seq 分析其潜在的分子机制，为膀胱癌的治疗提供新的靶点。

## 第 1 章 材料与amp;方法

### 1.1 数据库分析与临床样本验证

#### 1.1.1 生物信息学分析

通过 TCGA 数据库获取膀胱癌患者的转录组数据，评估 S100A8 的 mRNA 表达水平及其与患者预后的相关性。同时，利用 CCLE 数据库筛选出 S100A8 高表达的膀胱癌细胞系，并以人正常尿路上皮细胞 SV-HUC-1 作为对照，通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证其表达差异。

#### 1.1.2 临床样本验证

收集 2021 年 1 月至 2023 年 1 月石河子大学第一附属医院 46 例经病理学确诊的膀胱癌患者的石蜡包埋组织切片，通过免疫组化检测 S100A8 蛋白的表达水平。同时调用 HPA 数据库中的正常膀胱组织与膀胱癌样本的免疫组化数据进行对比分析。本研究所涉及的人体标本试验已通过石河子大学第一附属医院伦理委员会审核批准（批件号：KJ2021-277-01）

### 1.2 实验试剂与耗材

#### 1.2.1 实验动物

BALB/C-NU 裸鼠购买自武汉贝恩特生物有限公司。雌鼠，周龄 4~6 周，体重 16~20 g，均经石河子大学动物管理和伦理委员会的批准下于石河子大学实验动物中心（SPF 级）饲养。（批件号：A2023-209-01）。

#### 1.2.2 主要仪器设备与试剂耗材

#### 1.2.3 主要仪器设备信息如下表 1-1 所示

表 1-1 主要仪器设备信息

仪器名称	厂家名称
病理切片机	德国 Leica RM 2016 轮转式切片机
冻台	武汉俊杰电子有限公司

切片刀	日本羽毛 R35 一次性刀片
组织摊烤片机	武汉俊杰 JK-6 生物组织摊烤片机
显微镜	奥林巴斯 BX53 型生物显微镜
微量移液器	Eppendorf
电热恒温鼓风干燥箱	上海精宏实验设备有限公司
实时荧光定量 PCR 仪	ABI
微量分光光度计	杭州奥盛仪器有限公司
电热恒温水浴锅	北京市长风仪器仪表有限公司
PCR 仪	东胜创新生物科技有限公司
电泳仪电源	北京六一仪器厂
垂直电泳槽	北京六一仪器厂
电转仪	北京六一仪器厂
酶标仪	BioTek
微量移液器	Eppendorf
IVIS Lumina XRMS	珀金埃尔默仪器（上海）有限公司

## 1.2.3.1 主要实验所需耗材如下表 1-2 所示

表 1-2 主要所用的实验耗材的信息

实验耗材信息名称	厂家名称	货号
苏木素	Sigma	H9627
无水乙醇	国药集团	10009218
二甲苯	国药集团	10023418
盐酸	国药集团	10011018
包埋石蜡	国药集团	69019361
中性树脂	国药集团	10004160
蛋白酶 K	Bbiofroxx	
3%双氧水	国药集团	
Tunel 试剂盒	Roche	11684817910
DAB 显色剂	Doka	K3468
HRP 标记二抗(抗兔/抗小鼠)	Aabcam	ab205718/ab205719
细胞/动物组织/植物组织	赛维尔	G3640-50T
RNA 提取试剂盒		
SweScript RT I First Strand	赛维尔	G3333-50
cDNA Synthesis Kit		

2×Universal Blue SYBR Green		赛维尔	G3326-01
qPCR Master Mix			
ddH <sub>2</sub> O (DNase/RNase Free)		Ggenecopoeia	C1D230A
引物合成		擎科	
磷酸酶抑制剂		碧云天	S1873
PMSF		碧云天	ST506
RIPA		碧云天	P0013B
BCA 试剂盒		碧云天	P0010
TEMED		Amresco	Amresc00761
SDS 上样缓冲液		碧云天	P0015L
30%丙烯酰胺		Solarbio	A1010
	Tris-base	Biofroxx	1115
TG	甘氨酸	Biofroxx	12751
	SDS	Biofroxx	3250
	Tris-base	Biofroxx	1115
电转液	甘氨酸	Biofroxx	12751
	甲醇	国药集团化学试剂有限公司	10014118
蛋白 marker(10-180KD)	赛默飞	26616	蛋白 marker(10-180KD)
NC 膜	Pall	66485	NC 膜
ECL 底物液	Thermo	NCI5079	ECL 底物液

### 1.2.3.2 免疫组织化学 (Immunohistochemistry, IHC) 实验所用抗体如表 1-3 所示

表 1-3 IHC 抗体信息表

抗体名称	厂家	货号	稀释比
Ki67	Proteintech	27309-1-AP	1:2000
E-cadherin	Proteintech	20874-1-AP	1:8000
S100A8	Abcam	Ab92331	1:500

### 1.2.3.3 蛋白免疫印迹 (Western Blot, WB) 实验所用抗体表 1-4

表 1-4 WB 抗体信息表

指标	抗体货号	厂家	抗体稀释比	宿主	分子量
S100A8	Ab92331	Abcam	1:1000	Rabbit	11kDa

---

$\beta$ -actin	66009-1-Ig	三鹰	1:20000	Mouse	42kDa
----------------	------------	----	---------	-------	-------

---

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 S100A8 在生物数据库的表达

通过 Timer2.0 数据库（该数据库的数据来源于 TCGA 数据库）调取 S100A8 在泛癌中的表达情况，在 TCGA 数据库中获得选择总生存期（OS）、肿瘤特异生存期（CSS）两个指标研究 S100A8 表达与膀胱癌患者预后的关系。通过 CCLE 数据库筛选基因表达量较高的细胞系用于后续实验。通过 HPA 数据库下载膀胱癌患者组织与正常膀胱组织 S100A8 蛋白的免疫组化成像。

### 1.3.2 免疫组织化学染色方法

（1）切片与烤片：切片完成后进行组织切片烘烤，温度条件为 60-65℃，时间为烘烤 1 h。

（2）脱蜡：依次进行二甲苯透明处理（两次置换，每次 5 分钟），随后通过无水乙醇梯度脱水（两次置换，每次 5 分钟）。继而采用梯度酒精体系复水：依次使用 95%、90%、80%、70%乙醇溶液，每种浓度处理 5 分钟，最终以蒸馏水终止清洗。

（3）修复抗原：在盛满柠檬酸抗原修复缓冲液（pH=6.0）中放入切片后实施阶梯式热激处理：初始中火 8 min 的时间至缓冲液沸腾，随后停火 8min 的时间去保温，最后选择中低火 7 min 的时间，全程防止缓冲液过于蒸发，不要干片。自然冷却后将玻片放在 PBS（pH=7.4）中脱色摇床摇晃 3 次。

（4）内源性过氧化物酶的阻断：向其中加入 3%双氧水，避光孵育 25 min 的时间温度条件为室温，将玻片放到 PBS（pH=7.4）中脱色摇床摇晃 3 次。

（5）封闭血清：轻轻地进行甩片后用免疫组化阻水笔沿组织边缘描画疏水屏障，足量的 3%牛血清白蛋白封闭液至完全浸润。

（6）一抗的加入：将切片放在 PBS（pH=7.4）中，在脱色摇床摇晃 3 次。甩干组织切片上多余的水分后滴加预先确定好的比例加入一抗，一抗孵育结束后在 37℃温箱进行 30 min 的复温。

（7）二抗的加入：复温后将切片放在 PBS（pH=7.4）中，在脱色摇床摇晃 3 次。甩干后加二抗，在 37℃温箱孵育 30 min。

（8）DAB 显色：切片置于 PBS（pH=7.4）中，在脱色摇床摇晃 3 次。通过离心去除表面残留缓冲液后，于疏水屏障限定区域内精准滴注新制备的二氨基联苯胺（DAB）