

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2011. 01. 014

食管癌组织中 Ebp1 基因的表达及意义

崔玲玲¹, 胡同宇², 朱明宇¹, 陈慕华³, 陈萍萍¹, 谢 东¹, 李文杰¹

Expression and Significance of Ebp1 Gene in Human Esophageal Cancer Tissues

CUI Ling-ling¹, HU Tong-yu², ZHU Ming-yu¹, CHEN Mu-hua³, CHEN Ping-ping¹, XIE Dong¹, LI Wen-jie¹

1. College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Department of Maternal and Child Health Care and Community Health; 3. Kaifeng Municipal Centers for Disease Control

Corresponding Author: LI Wen-jie, E-mail: lwj@zzu.edu.cn

Abstract: Objective To study mRNA expression levels of Ebp1 and their relations to clinical and pathological features in human esophageal cancer. **Methods** Ebp1 expression levels were quantified by real-time PCR assay from two hundred and twenty esophageal cancer tissues and from their matched adjacent normal esophageal tissues. **Results** One hundred and fifty (68. 18%) samples were found up-regulation of Ebp1 in esophageal cancer comparing to the matched normal esophageal tissues. Univariate analysis showed that the Ebp1 mRNA expression levels were significantly associated with age, family history, lymph node metastasis, tumor size, differentiation, infiltrating depth and TNM stage. In contrast, the Ebp1 mRNA expression levels had to association with other clinical parameters (gender, pathological type and tumor position). Multiple factor analysis showed that family history, tumor size, differentiation, infiltrating depth and TNM stage were risk factors for Ebp1 however, pathological type was a protective factor as shown that Ebp1 mRNA expression levels in medullary type were higher than that in ulcerative type and fungating type. **Conclusion** Ebp1 plays an important role in the procession of esophageal cancer and might serve as a valuable target in monitoring of esophageal disease, metastatic potential and prognosis.

Key words: Ebp1; Esophageal cancer; Real-time PCR

摘要:目的 研究人食管癌组织中 Ebp1 mRNA 表达水平及其与临床参数的关系。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 对 220 例食管癌组织和癌旁正常食管组织中 Ebp1 mRNA 表达水平进行测定。**结果** 150 (68. 18%) 例食管癌样本中 Ebp1 mRNA 表达上调, 单因素分析显示, 与 Ebp1 mRNA 表达高度相关的临床参数包括年龄、家族史、淋巴结转移、肿瘤体积、分化程度、浸润深度和临床分期。而性别、病理类型和肿瘤位置与 Ebp1 mRNA 的表达无关。多因素分析结果表明: 家族史、肿瘤体积、分化程度、浸润深度和临床分期均是 Ebp1 mRNA 表达的危险因素, 而病理类型是 Ebp1 mRNA 表达的保护因素, 髓质型的 Ebp1 mRNA 表达比溃疡型和蕈伞型高。**结论** Ebp1 在食管癌发展过程中起重要作用, 可能作为食管癌病情进展的监测、转移潜能及预后评估方面的一个靶基因。

关键词: Ebp1; 食管癌; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R735. 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)01-0048-03

0 引言

Ebp1 是近年发现的一种新型蛋白质, 为表皮生长因子受体 ErbB-3 胞内近膜区结合蛋白, 是增殖相

关 PA2G4 家族中的一员, 与细胞周期、蛋白质翻译相关, 参与多个信号转导通路, 影响细胞增殖、分化^[1-3]。本研究采用实时荧光定量 PCR 研究 Ebp1 基因在食管癌原发灶及其配对的正常食管组织中的 mRNA 水平及其与临床病理参数的关系, 以探讨其临床意义。

1 资料与方法

1. 1 样本采集

选取 2005—2006 年郑州大学第一附属医院和

收稿日期: 2009-10-15; 修回日期: 2010-04-26
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30725010)
作者单位: 1. 450001 郑州, 郑州大学公共卫生学院; 2. 卫生部妇幼保健与社区卫生司; 3. 开封市疾病预防控制中心
通信作者: 李文杰, E-mail: lwj@zzu.edu.cn
作者简介: 崔玲玲 (1979-), 女, 博士, 助教, 主要从事肿瘤分子生物学研究

林州市肿瘤医院就医的食管癌患者作为研究对象,经患者同意后,采集手术后食管癌原发灶及其配对的癌旁正常食管组织有效标本 220 对。肿瘤标本和配对的正常组织标本均通过组织学诊断,以具有食管癌原发灶及配对正常食管组织标本作为有效标本。标本离体后立即放在液氮罐中,后转移到-80℃冰箱中冷冻保存。收集患者相关临床资料。

1.2 仪器与试剂

实时荧光定量 PCR 仪 (Stratagene Mx3000P, Genetimes Technology, Inc.); Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司); AMV 逆转录系统(美国 Promega 公司); 荧光定量 PCR 试剂盒 (德国 Roche 诊断有限公司)。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 Trizol 试剂盒从食管癌标本中提取完整的 RNA,通过 1%的琼脂糖凝胶电泳及 RNA 的 OD 值评估 RNA 含量和纯度。在紫外光下可见 18S 和 28S RNA 条带。用 50 μl SuPerscriPt II 试剂将 2 μg RNA 反转录成 cDNA。

1.4 实时荧光定量 PCR 的理论基础

参数循环阈值(Cycle threshold),简称 Ct,是指产生的荧光量超过一个固定的阈值时的循环次数。通过制作标准曲线对实验进行质量控制,用内参基因 β-actin 对 RNA 含量的变异进行校正。 $\Delta\text{NCt} = (\text{Ct}_{\text{Normal Ebp1}} - \text{Ct}_{\text{Normal } \beta\text{-actin}})$, $\Delta\text{CCt} = (\text{Ct}_{\text{Cancer Ebp1}} - \text{Ct}_{\text{cancer } \beta\text{-actin}})$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{NCt} - \Delta\text{CCt}$, 以扩增倍数作为结果,扩增倍数 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

1.5 PCR 扩增

采用 primer premier 5.0 软件设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。β-actin 引物序列为: 5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3' (上游) 和 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3' (下游),扩增片段长度为 101bp, Ebp1 引物序列为 5'-GCACGCCAATAGAAGG-3' (上游) 和 RP: 5'-GTAAACGGCATGGCATC-3(下游),扩增片段长度为 300 bp。将 cDNA 1:20 稀释后作为 PCR 模板,反应体积为 15 μl,所有的反应都在 PCR 仪上重复 3 次,95℃ 3 min, 95℃ 20s,55℃ 20s,然后 72℃ 延伸 30 s,84℃ 15 s 采集荧光,40 个循环,最后在 72℃温度下延伸 7 min。

1.6 统计学方法

试验结果输入 SPSS12.0 软件,扩增倍数取以 2 为底对数转换后,经正态性检验数据呈正态分布, $\Delta(\Delta\text{Ct}) \geq 1$ 定义为阳性, $\Delta(\Delta\text{Ct}) < 1$ 定义为阴性。采用配对 *t* 检验和 χ^2 检验进行统计分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 Ebp1 在食管癌组织中的表达水平

在 220 例食管癌样品中, Ebp1 在 150(68.18%) 例的表达上调,见图 1。配对 *t* 检验显示: Ebp1 基因 mRNA 的表达在食管癌组织中与配对的正常食管组织中差异有统计学意义($t = 11.065, P = 0.000$)。

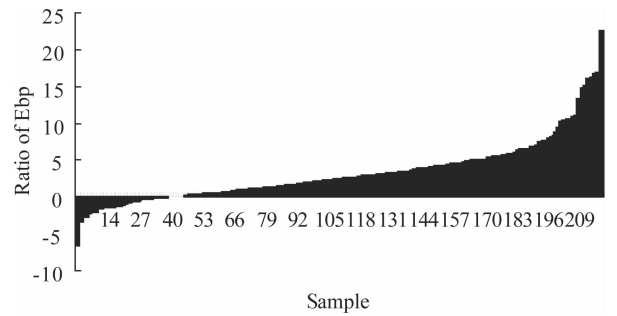


图 1 食管癌和正常食管组织中 Ebp1 mRNA 的表达水平

Figure 1 Ebp1 mRNA expression levels in cardiac cancer tissues and in the matched normal tissues

2.2 Ebp1 的表达水平与临床参数的单因素分析

单变量分析显示: Ebp1 mRNA 的表达与食管癌的临床参数高度相关,包括年龄、家族史、淋巴结转移、肿瘤体积、分化程度、浸润深度和临床分期。而性别、病理类型和肿瘤位置与 Ebp1 mRNA 的表达无关,见表 1。

2.3 Ebp1 表达水平与临床参数的多因素分析

将各因素引入非条件 Logistic 回归分析模型进行多因素分析,结果表明:家族史、肿瘤体积、分化程度、浸润深度和临床分期均是 Ebp1 mRNA 表达的危险因素,即有家族史的食管癌患者 Ebp1 mRNA 表达要比无家族史的高,肿瘤体积越大、病理分级越高、浸润深度越深、临床分期越高,食管癌组织中 Ebp1 mRNA 表达越高。而病理类型是 Ebp1 mRNA 表达的保护因素,95%CI 为 0.093(0.031~0.278),髓质型的 Ebp1 mRNA 表达比溃疡型和蕈伞型高,见表 2。

3 讨论

过去对 Ebp1 的体外研究较多,在外界刺激作用下 Ebp1 与 erbB-3 分离到达核内,异位表达可抑制 ErbB-2/ ErbB-3 阳性表达的乳腺癌、前列腺癌细胞的生长增殖并诱导细胞分化^[4-5]。口腔鳞状细胞癌 Tca 8113 中共表达 ErbB-2/ ErbB-3,转染 Ebp1 基因到该细胞中,能明显抑制其生长、分裂、增殖水平,表明肿瘤细胞在体外的生长增殖受到明显抑制^[6]。该研究结果中食管癌组织中 Ebp1 基因表达水平与配对的正常食管组织相比,其表达水平显著上调,最近也有研究显示在前列腺癌和大肠癌组织中

表 1 Ebp1 的表达水平与临床参数的关系
Table 1 Correlation between Ebp1 expression level and clinical pathological features

Clinical characteristics	Positive	Negative	χ^2	P
Gender			0.002	0.967
Male	91	50		
Female	59	20		
Age (years)			16.933	0.000**
≤45	3	10		
45~60	51	30		
≥60	96	30		
Family history			12.767	0.000**
Yes	77	18		
No	73	52		
Lymph node Metastasis			11.196	0.001**
Yes	94	27		
No	56	43		
Pathological			0.409	0.815
Medullary	68	29		
Ulcerative	68	33		
Fungating type	14	8		
Tumor position			2.103	0.349
Upper	42	26		
Middle	78	30		
Down	30	14		
Tumor size(cm ³)			34.315	0.000**
≤50	30	39		
50~100	63	25		
≥100	57	6		
Differentiation			74.165	0.000**
well	1	29		
moderate	74	31		
Poor or unknown	75	10		
Infiltrating depth			54.215	0.000**
Simple muscular layer	25	46		
Deep muscular layer	36	11		
Fibrous membrane	89	13		
TNM stage			13.785	0.001**
I , II	68	49		
III	72	21		
IV	10	0		

Note: * : P<0.05; ** : P<0.01

表 2 Ebp1 表达水平与临床参数的多因素 Logistic 回归分析
Table 2 Multiple factor Logistic Regression of Ebp1 expression levels with clinical pathological features

Variables	B	Hazard Ratio	95%CI	P
Constant	-12.464	0.000		0.000**
Family history	1.312	3.714	1.245 to 11.079	0.019*
Pathological type	-2.372	0.093	0.031 to 0.278	0.000**
Tumor size	1.747	5.737	2.567 to 12.822	0.000**
Differentiation	3.452	31.577	9.268 to 107.592	0.000**
Infiltrating depth	1.672	5.324	2.648 to 10.703	0.000**
TNM stage	2.099	8.159	2.635 to 25.258	0.000**

Ebp1 的表达水平也是上调的^[7-8],均提示 Ebp1 能促进肿瘤细胞的生长,与上述在细胞中的结果相反。Ebp1 有两个亚型 p42 和 p48, p42 抑制细胞增殖,而 p48 是促进细胞增殖和细胞生存,可能由于组织类型不同,两个亚型的表达量不同,在调节肿瘤细胞的生长与分化方面所起的作用不同^[9-10],也可能是因为体内外环境的差异造成的。

该研究结果显示年龄、家族史、淋巴结转移、肿瘤体积、分化程度、浸润深度和临床分期与 Ebp1 mRNA 的表达水平相关,肿瘤体积越大、分化程度越低、浸润深度越深、临床分期越高,Ebp1 表达水平就越高,提示 Ebp1 有促进肿瘤增殖,抑制细胞分化的作用。淋巴结转移组 Ebp1 表达水平显著高于淋巴结未转移组,提示 Ebp1 具有促进肿瘤细胞转移的能力。因此 Ebp1 的表达水平可用来评价食管癌病人的病情和预后情况,并可作为一种新的治疗肿瘤的基因作用靶点。

参考文献:

[1] Lamartine J, Seri M, Cinti R, et al. Molecular cloning and mapping of a human cDNA (PA2G4) that encodes a protein highly homologous to the mouse cell cycle protein p38-2G4[J]. Cytogenet Cell Genet, 1997, 78(1): 31-35.

[2] Zhang Y, Woodford N, Xia X, et al. Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1. involves histonedacetylases[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(8): 2 168-2 177.

[3] Lessor TJ, Hamburger AW. Regulation of the ErbB3 binding protein Ebp1 by protein kinase C[J]. Mol Cell Endocrinol, 2001, 175(1-2): 185-191.

[4] Zhang Y, Fondell JD, Wang Q, et al. Repression of androgen receptor mediated transcription by the ErbB-3 binding protein, Ebp1[J]. Oncogene, 2002, 21 (36): 5 609-5 618.

[5] Lessor TJ, Yoo J Y, Xia X, et al. Ectopic expression of the ErbB-3 binding protein Ebp1 inhibits growth and induces differentiation of human breast cancer cell lines[J]. J Cell Physiol, 2000, 183(3): 321-329.

[6] 余优成,张志愿,陈万涛,等. ErbB-3 结合蛋白-Ebp1 对 ACC2M 细胞生长的影响[J]. 中国临床医学,2005,12(2):324-326.

[7] Gannon PO, Koumakpayi IH, Le Page C,et al. Ebp1 expression in benign and malignant prostate[J]. Cancer Cell Int, 2008,8: 18.

[8] Santegoets SJ, Schreurs MW, Reurs AW, et al. Identification and Characterization of erbB-3-Binding Protein-1 as a Target for Immunotherapy[J]. J Immunol, 2007, 179(3): 2 005-2 012.

[9] 余优成,张志愿,陈万涛,等. erbB-3 结合蛋白 Ebp1 Tca 8113 细胞生长增殖的影响[J]. 上海第二医科大学学报,2005,12(2):334-355.

[10] Yu Y, Chen W, Zhang Y, et al. Suppression of salivary adenoid cystic carcinoma growth and metastasis by ErbB3 binding protein Ebp1 gene transfer[J]. Int J Cancer, 2007, 120(9): 1 909-1 913.

[编辑:杨 卉;校对:贺 文]