

膀胱癌 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 的表达及其意义

The Expressions of EphA2 mRNA and EphrinA1 mRNA in Bladder Cancer and Their Significance
WANG Jin-qing, ZHAO Yu-bin, ZHANG Shao-hua, et al.

王金清¹, 赵玉斌², 张少华², 梁永强¹

(1. 诸城市人民医院, 山东 诸城 262200; 2. 即墨市人民医院, 山东 即墨 260000)

摘要: [目的] 研究 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 在膀胱癌中的表达及其意义。 [方法] 应用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 50 例膀胱癌冰冻标本中 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 的表达, 比较各自 mRNA 与其蛋白表达的相关性及与临床病理特征的关系。 [结果] 膀胱癌组织中 EphA2、EphrinA1 mRNA 的表达均与组织学分级、淋巴结转移及 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$); EphA2 和 EphrinA1 蛋白在膀胱癌的表达与各自 mRNA 的表达水平不完全一致。 [结论] EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 阳性表达与膀胱癌的恶性行为相关。

关键词: EphA2 mRNA; EphrinA1 mRNA; 膀胱癌; RT-PCR

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2012)09-0710-04

研究表明, EphA2 和 EphrinA1 蛋白在膀胱癌中高表达^[1], 具有一定的预后价值。为了解 EphA2 和 EphrinA1 在膀胱癌中能否正常转录和翻译, 我们应用 RT-PCR 方法检测 50 例不同级别 EphA2 和 EphrinA1 蛋白表达的膀胱癌冷冻组织中 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 的表达水平, 分析 EphA2 和 EphrinA1 蛋白表达与各自 mRNA 表达的关系, 为进一步了解膀胱癌的生物行为提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 实验标本

50 例膀胱癌标本取自山东省诸城市人民医院泌尿外科 2006 年 5 月至 2009 年 10 月间的手术切除标本(患者术前未接受任何治疗)。标本离体 0.5~1h 内, 冰上分离无明显出血、坏死的膀胱癌组织各 2 份。一份放入经灭活 RNA 酶处理的无菌冻存管, 液氮冷冻保存于 -82℃, 用于 RNA 提取, 做 RT-PCR;

另一份固定于 10% 中性福尔马林溶液, 石蜡包埋, 用于免疫组织化学染色和常规病理切片。

50 例膀胱癌标本按 WHO 标准分型、分级, 其中移行细胞癌 28 例, 鳞状细胞癌 14 例, 腺癌 8 例。50 例中伴淋巴结转移 26 例, 无淋巴结转移 24 例; 癌组织取自癌灶无明显坏死区、出血区, 病理证实均为膀胱癌, 且富集癌实质成分。50 例标本均重新做 HE 染色并分别对照免疫组化结果, 明确所选冰冻标本与免疫组化标本一致。

50 份标本均经过免疫组织化学证实有不同级别的 EphA2 蛋白和不同级别的 EphrinA1 蛋白表达。根据显微镜下计数, 5 个高倍镜视野下, 将细胞膜和细胞浆同时染成黄色或棕褐色的细胞 $\leq 20\%$ 为 0 级, 20%~30% 为 1 级, 30%~40% 为 2 级, $>40\%$ 为 3 级。其中 EphA2 蛋白表达: 0 级 11 例, 1 级 12 例, 2 级 13 例, 3 级 14 例; EphrinA1 蛋白表达: 0 级 10 例, 1 级 11 例, 2 级 14 例, 3 级 15 例。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒 (Trizol 法)、AMV 反转录酶 (美国 Promega 公司), Taq DNA 聚合酶、dNTP、Mg-Cl₂ (上海 Sangon 生物公司), DNA Marker (大连普肽

收稿日期: 2012-05-08; 修回稿件: 2012-06-16

通讯作者: 王金清, E-mail: 794017884@qq.com

生物有限公司)

1.3 引物序列

EphA2:上游 5'-GCCAGGCAGGCTACGAGAAG-GTG-3', 下游 5'-CTCCAGGAGACGCTAAGCGAG-GTG-3', 扩增基因片段长度为 221bp; EphrinA1:上游 5'-CGGAATGAGGACTACACCATACATGTGCAGC-3', 下游 5'-AAGCAGCGGTCTTCATGCTGGTGGATGGG-TT-3', 扩增基因片段长度为 325bp; 内参照基因 GAPDH: 上游:5'-AAGCCATCACCATCTTCCA-3', 下游:5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3', 扩增基因片段长度为 101bp。

EphA2 和 EphrinA1 的引物设计参阅文献^[1]并用 Oligo6.65 引物设计软件进行评价, 选择最佳引物, 由上海生工生物公司设计合成。

1.4 实验方法

1.4.1 组织总 RNA 提取

微量天平称取液氮冷冻保存的组织 100mg 按 50~100mg/ml Trizol 加入 Trizol 试剂, 按说明书进行组织总 RNA 的提取, 用 GeneQuant RNA/DNA 定量仪进行 RNA 纯度测定和定量, 保证 A260/A280 值在 1.8~2.0 之间。根据 RNA 实测浓度, 用 DEPC 水调整 RNA 浓度为 1 μ g/ μ l。用高压(20V/cm)快速(15min)琼脂糖凝胶(1.4%)电泳检验 RNA 的完整性。提取的 RNA 立即用于逆转录或分装成小份保存于-70 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.4.2 RT-PCR

采用 AMV 反转录酶合成第一链 cDNA, 按 20 μ l 体系 42 $^{\circ}$ C 孵育 60min; 95 $^{\circ}$ C 加热 15min, 灭活 AMV 反转录酶, 4 $^{\circ}$ C 终止反应; 逆转录产物置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。PCR 反应条件(EphA2, EphrinA1, GAPDH): 预变性 95 $^{\circ}$ C 3min, 变性 95 $^{\circ}$ C 30s, 退火 60 $^{\circ}$ C 30s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30s, 30 个循环; 终延伸 72 $^{\circ}$ C 7min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

1.4.3 PCR 产物半定量

琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后将凝胶置于凝胶成像分析系统照相, 利用分析软件对图像进行分析。通过测量 EphA2、EphrinA1 和各自的内参照基因 GAPDH 的扩增片段密度的比值, 计算出 EphA2 mRNA、EphrinA1 mRNA 的相对含量(半定量), 即 EphA2 mRNA 的相对含量 = EphA2 OD 值/GAPDH OD 值; EphrinA1 mRNA 的相对含量 = EphrinA1 OD

值/GAPDH OD 值。

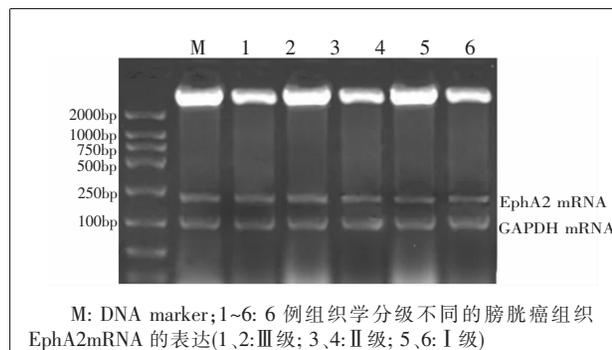
1.5 统计学处理

数据均应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 完全随机设计的两个样本均数的比较采用 *t* 检验。完全随机设计的多个样本均数之间的比较: 方差齐性时用方差分析, 多个样本均数之间的两两比较采用最小显著差法(LSD); 方差不齐时采用非参数检验, 多个样本均数之间两两比较采用 Tamhane's T_2 法。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

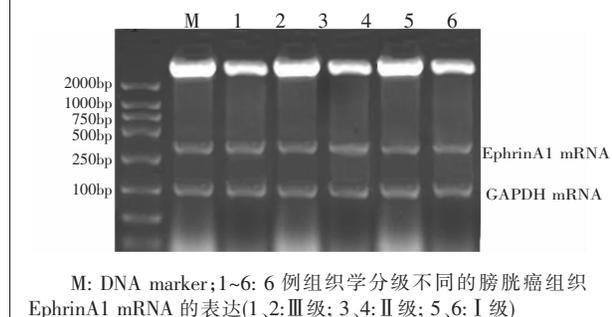
2.1 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 电泳结果

经 RT-PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳 50 例 EphA2 蛋白表达级别不同的膀胱癌标本在紫外灯下均出现两条特异带, 即 221bp 的目的条带和 101bp 的 GAPDH 内参条带; 50 例 EphrinA1 蛋白表达级别不同的膀胱癌标本在紫外灯下均出现两条特异带, 即 325bp 的目的条带和 101bp 的 GAPDH 内参条带, 详见图 1、2。



M: DNA marker; 1~6: 6 例组织学分级不同的膀胱癌组织 EphA2 mRNA 的表达(1、2: III 级; 3、4: II 级; 5、6: I 级)

图 1 膀胱癌组织中 EphA2 mRNA 的 RT-PCR 检测结果



M: DNA marker; 1~6: 6 例组织学分级不同的膀胱癌组织 EphrinA1 mRNA 的表达(1、2: III 级; 3、4: II 级; 5、6: I 级)

图 2 膀胱癌组织中 EphrinA1 mRNA 的 RT-PCR 检测结果

2.2 EphA2/EphrinA1 mRNA 表达与膀胱癌临床病理特征的关系

50 例膀胱癌组织中 EphA2 mRNA 的表达与淋巴结转移、组织学分级及 TNM 分期相关($P<0.05$);与患者发病年龄、病理类型、肿瘤大小无显著性相关($P>0.05$)。50 例膀胱癌组织中 EphrinA1 mRNA 的表达与淋巴结转移、TNM 分期及组织学分级显著性相关($P<0.05$);与患者发病年龄、病理类型、肿瘤大小无关($P>0.05$)。见表 1。

2.3 EphA2 mRNA 表达与蛋白表达的关系

EphA2 蛋白 0 级表达的膀胱癌组织中 EphA2 mRNA 水平低于 EphA2 蛋白 1~3 级表达的膀胱癌组织中的 EphA2 mRNA 水平(P 均 <0.001),EphA2 蛋

白 1 级表达的膀胱癌组织中 EphA2 mRNA 水平低于 EphA2 蛋白 2~3 级表达的膀胱癌组织中的 EphA2 mRNA 水平(P 均 <0.001);EphA2 蛋白 2、3 级表达的膀胱癌标本间 EphA2 mRNA 的表达水平无显著性差异 ($P=0.061$) (表 2)。EphA2 蛋白表达和 EphA2 mRNA 表达水平不完全一致。

2.4 EphrinA1 mRNA 表达与蛋白表达的关系

EphrinA1 蛋白 0 级表达的膀胱癌组织中 EphrinA1 mRNA 水平低于 EphrinA1 蛋白 1~3 级表达的膀胱癌组织中的 EphrinA1 mRNA 水平 (P 均 <0.001); EphrinA1 蛋白 1 级表达的膀胱癌组织中 EphrinA1 mRNA 水平低于 EphrinA1 蛋白 3 级表达的膀胱癌组织中的 EphA2 mRNA 水平 ($P=0.023$);

EphrinA1 蛋白 1 级表达的膀胱癌组织中 EphrinA1 mRNA 水平与 EphrinA1 蛋白 2 级表达的膀胱癌组织中的 EphA2 mRNA 水平相比差异无统计学意义 ($P=0.067$);EphrinA1 蛋白 2 级表达的膀胱癌组织中的 EphA2 mRNA 水平与 EphrinA1 蛋白 3 级表达的膀胱癌组织中的 EphA2 mRNA 水平相比差异无统计学意义 ($P=0.511$)(表 2)。EphrinA1 蛋白表达和 EphrinA1 mRNA 表达水平不完全一致。

表 1 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 表达与膀胱癌临床病理特征的关系

临床病理特征	例数	EphA2mRNA			EphrinA1mRNA		
		EphA2/GAPDH	t/F	P 值	EphrinA1/GAPDH	t/F	P 值
年龄(岁)							
≤45	15	1.27±0.51	0.653	0.353	1.28±0.46	-0.793	0.513
>45	35	1.35±0.48			1.36±0.47		
肿瘤大小(cm)							
≤3	27	1.23±0.69	-1.420	0.112	1.30±0.46	-1.440	0.148
>3	23	1.39±0.40			1.51±0.51		
病理类型							
移行细胞癌	28	1.34±0.48	0.629	0.599	1.44±0.47	0.109	0.866
鳞状细胞癌	14	1.25±0.58			1.38±0.46		
腺癌	8	1.33±0.46			1.43±0.58		
TNM 分期							
0~I 期	10	0.33±0.07	235.653	<0.001	0.55±0.44	19.599	<0.001
II 期	19	1.26±0.22			1.35±0.33		
III~IV 期	21	1.94±0.16			1.78±0.20		
淋巴结转移							
+	26	1.63±0.22	5.559	<0.001	0.89±0.61	-4.112	0.002
-	24	0.66±0.48			1.61±0.29		
组织学分级							
I 级	9	0.46±0.35	50.10	<0.001	0.77±0.30	18.612	<0.001
II 级	20	1.28±0.40			1.51±0.33		
III 级	21	1.85±0.23			1.820±0.19		

表 2 不同级别 EphA2/EphrinA1 蛋白表达的膀胱癌中 EphA2 /EphrinA1 mRNA 表达

EphA2			EphrinA1		
蛋白表达分级	例数	EphA2/GAPDH	蛋白表达分级	例数	EphrinA1/GAPDH
0	11	0.35±0.26	0	10	0.39±0.13
1	12	1.40±0.30	1	11	1.40±0.35
2	13	1.60±0.22	2	14	1.60±0.33
3	14	1.83±0.23	3	15	1.87±0.23
F		130.48			40.31
P		<0.001			<0.001

3 讨论

赵玉斌等^[2]发现 EphA2 和 EphrinA1 共表达于乳腺癌组织中,且两者的表达与肿瘤大小、淋巴结转移、临床分期相关;EphA2 过度表达更常见于肉眼分型为 III/IV 型的晚期胃癌组织。膀胱癌中 EphA2 和 EphrinA1 mRNA 表达的研

究国内外少见报道,我们的研究表明,膀胱癌组织中 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 的表达与淋巴结转移、组织学分级及 TNM 分期均显著相关 ($P < 0.05$)。提示 EphA2 和 EphrinA1 各自 mRNA 的阳性表达都在一定程度上与膀胱癌的恶性行为有关。

研究表明,Eph 高表达会改变细胞侵袭性,但不影响细胞增殖,高表达 EphA2 的恶性肿瘤细胞,发生错误的受体定位,结合 Ephrin 配体困难,因而难以磷酸化,结果致肿瘤与胞外基质黏附性增加,侵袭性提高^[3]。对于宫颈鳞癌的研究发现 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 的表达水平与蛋白表达水平不完全一致^[4]。EphA2 mRNA 在食管癌细胞中的表达相对稳定,但是其表达水平总是与蛋白表达水平不完全一致^[5]。EphA2 蛋白在转化的乳腺癌细胞中高表达,EphA2 蛋白水平的增加不成比例地高于其 mRNA 水平,其 mRNA 水平在转化和非转化的乳腺上皮细胞无差异^[6]。Easty 等^[7]发现 EphA2 mRNA 在黑色素瘤中高表达,尤其在转移性和侵袭性细胞系中的表达水平显著高于原发性黑色素瘤,但是在正常黑色素细胞中未见 EphA2 mRNA 表达。有研究者指出,当肿瘤细胞向更加恶性表型进展或者随着细胞侵袭性的增加,EphA2 蛋白水平的增加不成比例地高于其 mRNA 水平,在某些恶性细胞模型中,EphA2 蛋白是相应的 mRNA 水平的 50~500 倍。

在膀胱癌中 EphA2 蛋白和 EphrinA1 蛋白分别与其 mRNA 表达水平不完全一致,本研究的结果与文献报道基本吻合。这可能是由于 EphA2 和 EphrinA1 的蛋白质在膀胱癌中发生积聚或降解通路障碍;而 EphA2 mRNA 和 EphrinA1 mRNA 在膀胱癌的

表达并不完全在转录水平调节,可能存在着某种转录后翻译水平的调控机制。目前这种现象的确切机制还不清楚,这些基因在膀胱癌转录后翻译水平调控的参与机制和参与程度需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王金清,赵玉斌,张少华,等. EphA2、EphrinA1 在膀胱癌组织中的表达及其临床意义 [J]. 中国医师进修杂志, 2010,33(35):25-27.
- [2] 赵玉斌,张少华,王金清,等. 乳腺癌组织 EphA2 和 EphrinA1 蛋白表达及其临床意义的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011,18(7): 513-516.
- [3] Fox BP, Kandpal RP. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,318(4): 882-892.
- [4] Wu D, Suo Z, Kristensen GB, et al. Prognostic value of EphA2 and EphrinA1 squamous cell cervical carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2004,92(4): 312-319.
- [5] Miyazaki T, Kato H, Fukuchi M. et al. EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2003,103(5): 657-663.
- [6] Walker-Daniels J, Hess AR, Hendrix MJ, et al. Differential regulation of EphA2 in normal and malignant cells[J]. Am J Pathol, 2003,162(4): 1037-1042.
- [7] Easty DJ, Guthrie BA, Maung K, et al. Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression[J]. Cancer Res, 1995,55(12): 2528-2532.