

食管鳞癌组织中 EMP1 蛋白的表达及意义

Expression of EMP1 Protein in Esophageal Squamous Cell Cancer Tissue and Its Significance

ZHANG Li-xin, ZHANG Jie, MA Xiao-bing, et al.

张立新¹, 张洁¹, 马小兵¹, 杨从容², 刘青², 孙国贵¹

(1.唐山市人民医院, 河北唐山, 063000; 2.河北医科大学第四医院, 河北石家庄 050011)

摘要: [目的] 探讨上皮膜蛋白 (epithelial membrane protein 1, EMP1) 在食管鳞癌中的表达及意义。[方法] 采用免疫组织化学、Western blot 方法检测 64 例食管鳞癌组织及距其癌组织边缘 2cm 以上的镜下未见癌浸润的正常组织中 EMP1 蛋白的表达情况。[结果] 免疫组织化学结果表明, EMP1 蛋白在食管鳞癌组织表达阳性率明显低于正常食管组织 (48.4% vs 82.8%, $P < 0.05$)。Western blot 结果表明, EMP1 蛋白在食管鳞癌组织的相对表达量较正常食管组织的相对表达量明显降低, 二者比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。EMP1 蛋白表达与食管鳞癌患者年龄、性别及肿瘤大小无关 ($P > 0.05$); 而与有无淋巴结转移、肿瘤临床分期以及细胞分化程度有关 ($P < 0.05$)。[结论] 食管鳞癌组织中 EMP1 蛋白表达明显减低, 且与食管鳞癌有无淋巴结转移、临床分期及肿瘤细胞分化程度有关。

关键词: 上皮膜蛋白 (EMP1); 食管肿瘤; 预后; 肿瘤转移

中图分类号: R735.1

文献标识码: B

文章编号: 1671-170X (2014) 07-0603-03

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.07.B018

食管鳞癌是消化系统比较常见的恶性肿瘤之一, 目前其主要治疗手段为手术治疗, 生物学治疗手段急需提高。分析食管鳞癌的生物学特性, 探索其治疗的新途径成为临床关注的问题^[1]。近年研究发现上皮膜蛋白 (epithelial membrane protein 1, EMP1) 在某些肿瘤中表现出的生物学和遗传学特征具有肿瘤抑癌基因的特性, 由此推测 EMP1 在肿瘤的形成和发展中具有重要作用^[2]。我们采用免疫组织化学、Western blot 方法研究 EMP1 在食管鳞癌中的表达情况, 以期今后的临床治疗找到新的基因靶点。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2005 年 1 月至 2008 年 12 月期间 64 例新鲜食管鳞癌标本, 分别于肿瘤组织及距肿瘤边缘 2cm 以上 (镜下未见癌) 的正常食管鳞癌组织处取材。年龄 29~77 岁, 中位年龄 58 岁, 其中 ≤ 60 岁者 48 例, > 60 岁者 16 例; 男性 37 例, 女性 27 例; 肿瘤直径 ≤ 5 cm 者 26 例, > 5 cm 者 38 例; 无淋巴结转移者 19 例, 有淋巴结转移者 45 例; 临床分期 I + II 期 20 例, III + IV 期 44 例; 组织分级 I 级者 17 例, II ~ III 级者 47 例。所有患者术前均未经放疗、化疗, 标本均为术后立即取材, 于液氮中保存, 供免疫组织化学及 Western blot 检测。

通信作者: 孙国贵, 副主任医师, 博士后; 河北省唐山市人民医院放疗科, 河北省唐山市路南区胜利路 65 号 (063000); E-mail: guogui_sun2013@163.com

收稿日期: 2013-11-12; **修回日期:** 2014-01-16

1.2 免疫组织化学

将 4 μ m 石蜡切片脱蜡至水, 3%过氧化氢 10min 阻断内源性过氧化物酶, 胰酶修复 20min, 10%山羊血清室温封闭 20min, EMP1 抗体 (1:100) 湿盒中 4℃冰箱过夜, 滴加二抗、三抗室温湿盒内孵育各 20min, DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水, 封片。结果判定: EMP1 主要定位于细胞浆, 主要表现为细胞染成浅黄色、黄褐色或棕黄色。由两名病理科医生在未知患者临床资料的情况下采用双盲法进行计数。细胞计数在显微镜下, 每张切片上随机选择 5 个视野, 每个标本计数 3 张切片。EMP1 表达以细胞阳性百分率及细胞染色强度得分之和进行判定。细胞阳性百分率分为 4 个等级: $\leq 5\%$ 计 0 分, 5%~25% 计 1 分, 25%~50% 计 2 分, $> 50\%$ 计 3 分; 细胞染色强度分数标准: 无染色计 0 分, 弱染色 (浅黄色) 计 1 分, 中等染色 (棕黄色) 计 2 分, 强染色 (黄褐色) 计 3 分。两项标准相加: 0 分为阴性 (-), 1~2 分为弱阳性 (+), 3~4 分为中等阳性 (++), 5~6 分为强阳性 (+++), 1~6 分为阳性。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.3 Western blot

提取食管鳞癌及正常组织总蛋白。4℃, 12 000r/min 离心 20min, 取上清, -20℃备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 按每孔上样量 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳, 稳压冰浴电转至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂牛奶封闭 2h, 一抗孵育 4℃过夜 (EMP1 1:1000, β -actin 1:5000), 兔抗人红外荧光标记二抗 (1:20000), Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测, 计算蛋白相对值 = EMP1 蛋白 A 值 / GAPDH A 值。

1.4 统计学处理

本实验结果均应用 SPSS16.0 统计软件处理数据。免疫组织化学结果构成比之间的比较采用 χ^2 检验, Western blot 结果组间均数的比较采用 t 检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMP1 在食管鳞癌组织中的表达

EMP1 在食管鳞癌组织、正常食管组织的阳性表达率分别为 48.4% (31/64) 及 82.8% (53/64), 两组之间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (Table 1, Figure 1)。Western blot 结果

显示:EMP1 蛋白在食管鳞癌组织的表达量为 0.421 ± 0.053 , 明显低于正常食管组织 0.887 ± 0.091 , 两组之间比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 2)。

2.2 EMP1 与食管癌临床病理参数的关系

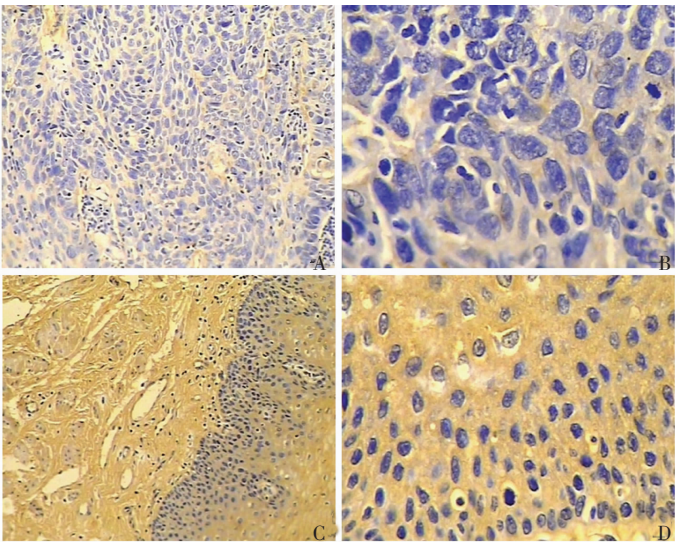
临床因素分析表明,EMP1 蛋白表达与食管鳞癌患者年龄、性别、肿瘤大小无关 ($P>0.05$);而在食管鳞癌有无淋巴结转移中、I+II 期、III+IV 期的临床分期中及不同组织分级中的表达差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 2)。

3 讨论

食管癌是我国常见恶性肿瘤,早期不易发现,死亡率高。目前的 TNM 分期不能有效预测非手术治疗食管癌的预后,因此,探讨新的生物学指标指导治疗策略与治疗方法的制定并准确地预测食管癌预后显得十分必要。对 EMP1 基因的初步研究结果显示,EMP1 与肿瘤的发生与发展关系密切^[3],特别是 EMP1 基因可阻止肿瘤进一步扩增,这有可能为肿瘤的治疗提供新的途径。

EMP1 基因是在 1995 年由瑞士学者 Taylor 等^[4]从胎鼠肠 cDNA 文库中克隆出并命名的,其编码 4 个跨膜结构域,分子质量约 18 kD。EMP 约由 160 个氨基酸残基组成,依据其所含疏水基团的不同又分为 EMP 1、EMP 2、EMP 3 等 3 亚种,同时认为 EMP1 与周围髓磷脂蛋白 22 (peripheral myelin protein 22, PMP22),同属于一类生物学功能特异的蛋白家族,约有 40% 与 PMP22 具有高度同源性^[5,6]。PMP22 主要集中于周围神经系统的神经膜细胞中,参与神经膜细胞的生长和分化,而 EMP1 在神经元的分化及轴突的生长方面也起到了一定的作用^[7]。随后又有研究^[8]表明,在未分化的胚胎干细胞中发现 EMP1 高表达,在已分化成体细胞的组织中低表达,延长了神经膜细胞的 G₁ 至 S+G₂/M 期的进程,并认为这类膜糖蛋白家族与细胞增殖、分化密切相关。

本研究采用免疫组织化学及 Western blot 技术对食管癌组织及正常食管组织进行定量检测,结果显示 EMP1 蛋白在食管癌组织中的表达水平均显著低于正常组织。本研究结果的单因素分析也显示,EMP1 蛋白的表达水平与食管癌组织有无淋巴结转移,临床分期及分化程度有关,而与食管癌患者性别、年龄、肿瘤大小无关。结果提示,EMP1 的缺失是食管癌发生发展的主要促使因素之一,去分化是肿瘤细胞的重要生物学特性之一,本研究显示,食管癌中 EMP1 与组织分化



A:Esophageal cancer(×100);B:Esophageal cancer(×400);
C:Normal esophageal tissue(×100);D:Normal esophageal tissue(×400).

Figure 1 Expression of EMP1 in esophageal cancer tissue and normal esophageal tissue

Table 1 Expression of EMP1 in esophageal cancer tissue and normal esophageal tissue

Groups	N	-	+	++	+++	χ ²	P
Normal tissue	64	11	14	17	21	21.702	0.000
Cancer tissue	64	33	14	12	5		

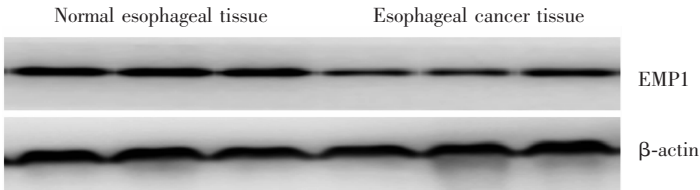


Figure 2 Expression of EMP1 in esophageal cancer tissue and normal esophageal tissue by Western blot method

呈负相关,分化越低,表达越少。Gnirke 等^[9]观察几种有不同转移特点的人乳腺癌细胞发现,该基因表达与细胞的浸润和转移特性有关。Wang 等^[10]认为 EMP1 基因可能是参与细胞信号传导、细胞通信及黏附调节的调节因子之一。Zhang 等^[11]研究发现口腔鳞癌组织中的 EMP1 基因表达下调,且其下调与淋巴结转移有关。Sun 等^[12]研究发现 EMP1 蛋白在鼻咽癌组织中的表达水平均显著低于正常组织,而且 EMP1 蛋白的表达水平与鼻咽癌组织有无淋巴结转移,临床分期及分化程度有关。

本研究结果提示,食管癌组织中 EMP1 蛋白表达水平明

Table 2 Relation between EMP1 expression and clinical characteristics in esophageal cancer tissue

Characteristics	N	Imunohistochemical results				Western blot results		
		-	+~+++	χ^2	P	$\bar{x}\pm s$	t	P
Gender								
Male	37	18	19	0.298	0.585	0.423±0.053	0.257	0.810
Female	27	15	12			0.432±0.035		
Age (year old)								
≤60	48	26	22	0.918	0.338	0.418±0.040	0.567	0.601
>60	16	6	9			0.437±0.046		
Tumor length (cm)								
≤5	26	15	11	0.659	0.417	0.431±0.028	0.820	0.458
>5	38	18	20			0.417±0.018		
Lymph node metastasis								
No	19	6	13	4.321	0.038	0.471±0.052	5.535	0.005
Yes	45	27	18			0.261±0.041		
Clinical stage								
I ~ II	20	6	14	5.416	0.020	0.478±0.048	5.048	0.007
III ~ IV	44	27	17			0.284±0.046		
Histological grade								
I	17	5	12	4.548	0.033	0.512±0.051	4.769	0.009
II ~ III	47	28	19			0.335±0.040		

显降低,且与食管癌淋巴结转移、临床分期及细胞分化有关。EMP1 参与食管癌细胞增殖、凋亡、侵袭转移这一生物学过程。然而,细胞癌变为一个纷繁复杂的综合过程,EMP1 涉及癌变的信号转导机制尚需进一步明确。

参考文献

- [1] Umar SB, Fleischer DE. Esophageal cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2008, 5: 517-526.
- [2] Wang HT, Kong JP, Ding F, et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA microarray [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 392-398.
- [3] Lai S, Wang G, Cao X, et al. EMP-1 promotes tumorigenesis of NSCLC through PI3K/AKT pathway [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2012, 32: 834-838.
- [4] Taylor V, Welcher AA, Program AE, et al. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family [J]. J Biol Chem, 1995, 270(48): 28824-28833.
- [5] Lobsiger CS, Magyar JP, Taylor V, et al. Identification and characterization of a cDNA and the structural gene encoding the mouse epithelial membrane protein-1 [J]. Genomics, 1996, 36(3): 379-387.
- [6] Sun GG, Wang YD, Lu YF, et al. EMP1, a member of a new family of antiproliferative genes in breast carcinoma [J]. Tumour Biol, 2014, 35(4): 3347-3354.
- [7] Wulf P, Suter U. Embryonic expression of epithelial membrane protein 1 in early neurons [J]. Brain Res Dev Brain Res, 1999, 116(2): 169-180.
- [8] Zoidl G, Blass-Kampmann S, Durso D, et al. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth [J]. EMBO J, 1995, 14(6): 1122-1128.
- [9] Gnirke AU, Weidle UH. Investigation of prevalence and regulation of expression of progression associated protein (PAP) [J]. Anticancer Res, 1998, 18(6A): 4363-4369.
- [10] Wang HT, Kong JP, Ding F, et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 392-398.
- [11] Zhang J, Cao W, Xu Q, et al. The expression of EMP1 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and possibly associated with tumour metastasis [J]. J Clin Pathol, 2011, 64(1): 25-29.
- [12] Sun GG, Lu YF, Fu ZZ, et al. EMP1 inhibits nasopharyngeal cancer cell growth and metastasis through induction apoptosis and angiogenesis [J]. Tumour Biol, 2014, 35(4): 3185-3193.