论著

文章编号:1000-5404(2005)23-2314-03

ET-1及其受体ETAR在食管癌中的表达及意义

矫文捷[1],王天佑[2],丁 芳[3],孔建平[3],刘芝华[3],潘 浩[2] ([1]北京大学第一医院胸外科,北京 100034;[2]首都医科大学附属北京友谊医院胸外科,北京 100050;[3]中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室,北京 100021)

提 要:目的 研究内皮素-1(endothelin-1, ET-1)及其受体ETAR和食管癌生长转移的关系。**方法** 采用RT-PCR及Western blot检测观察食管癌及配对癌旁食管黏膜组织中的ET-1和ETAR的表达,并结合临床病理特征分析其意义。**结果** ET-1 mRNA在食管癌组织中的阳性表达率为82.7%(62/75),在癌旁食管黏膜组织的阳性表达率为60%(45/75),且其在癌组织中的过度表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移、临床分期有关系($P<0.05$);ETAR mRNA在食管癌组织中的阳性表达率为61.3%(46/75),在癌旁食管黏膜组织的阳性表达率为62.7%(47/75),两者比较无显著性差异($P>0.05$)。另外,Western blot检测显示在74.7%(56/75)的食管癌组织中有ET-1蛋白高表达。**结论** ET-1与食管癌生长转移有密切关系。

关键词: 食管肿瘤; 内皮素1; 逆转录多聚酶链式反应

中图法分类号: R341; R392.11; R735.1 **文献标识码:** A

Expression and clinical significance of endothelin-1 and endothelin type A receptor gene in esophageal cancer

JIAO Wen-jie[1], WANG Tian-you[2], DING Fang[3], KONG Jian-ping[3], LIU Zhi-hua[3], PAN Hao[2] ([1]Department of Thoracic Surgery, The First Hospital of Peking University, Beijing 100034, [2]Department of Thoracic Surgery, Beijing Friendship Hospital Affiliate of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, [3]Department of Molecular Oncology, Tumor Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the ET-1 and the oncogenesis, development of human esophageal cancer. **Methods** RT-PCR and Western blotting were employed to detect the expression of ET-1 and ETAR in the tissues of esophageal cancer and normal esophageal mucous membrane from 76 esophageal cancer patients admitted by our hospital from March to December in 2002. **Results** There was positive ET-1 mRNA expression in 82.7% (62/75) of the specimens of esophageal cancer and in 60% (45/75) of normal tissue and the ET-1 mRNA expression had a relation with histological grade, lymph node metastasis and clinical staging of esophageal cancer ($P<0.05$). The positive ETAR mRNA expression was found in 61.3% (46/75) of the specimens of esophageal cancer and in 62.7% (47/75) of normal tissue ($P<0.05$). Western blotting showed that 56 of 75 specimens of esophageal cancer had an overexpression of ET-1 protein. **Conclusion** ET-1 may play an important role in the oncogenesis, development of esophageal cancer.

Key words: esophageal neoplasm; endothelin-1; reverse transcription-polymerase chain reaction

内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是一种具有21个氨基酸的蛋白质。近几年发现,ET-1可以促进肿瘤新生血管生成、加快癌细胞运动,增强肿瘤的侵袭力和转移力,与某些上皮性肿瘤的演变转移密切相关。我们也曾经对ET-1与某些肿瘤的关系做过研究,但ET-1与食管癌的关系,目前尚少见报道。本实验采用半定量逆转录多聚酶链式反应及Western blot检测,研究在食管癌及癌旁食管黏膜组织中ET-1及其受体ETAR的表达情况,并分析其表达与临床病理特征的关系,探讨ET-1在食管癌发生发展中的意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

标本取自我院胸外科2002年3-12月食管癌手术标本,同时取配对癌旁正常食管黏膜组织,均经病理学检查确诊,共75例。男性53人,女性22人。年龄36~71岁,平均62.9岁。均

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170519)
Supported by the Natural National Science Foundation of China (30170519)

作者简介: 矫文捷(1969-),男,山东省青岛市人,博士,主治医师,主要从事胸外科临床方面的研究,发表论文10余篇。电话:(010)66551122-2417

收稿日期: 2005-08-16; **修回日期:** 2005-09-15

为鳞癌，高分化 30 例，中分化 26 例，低分化 19 例。有淋巴结转移 43 例，无淋巴结转移 32 例。临床分期采用 1997 年 UICC 食管癌国际分期标准，Ⅰ期 21 例；Ⅱ期 18 例，Ⅲ期 36 例，Ⅳ期 0 例。

1.2　组织标本采集

全部标本于手术时收集，并立即放入液氮中冻存。癌组织取自原发癌灶，癌旁食管黏膜组织取自距癌灶边缘 5 cm 以上的食管黏膜组织，并经病理学检查未见癌细胞。

1.3　RT-PCR

实验中在低温下使用研钵将食管癌组织及癌旁正常食管黏膜组织磨成粉末状，加入 Trizol 试剂（美国 Invitrogen 公司）。分别提取食管癌及癌旁组织标本的总 RNA，用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度，$D(260)/D(280)>1.8$。分别取食管癌及癌旁组织的总 RNA 5 μg，用 Superscript™ 行逆转录制备 cDNA。然后行 PCR 扩增。根据基因 mRNA 序列并使用 Primer3.0 软件设计引物，ET1 上游引物 5′-CTCTGCTGTTTGTGGCTTG-3′，下游引物为 5′-CTGTTGCCTTTGTGGGAAGT- 3′，扩增的片段为 286 bp；ETAR 上游引物 5′-GGAATTGGGATTCCTTTGGT-3′，下游引物为 5′- TTCTCAAGCTGCCATTCCTT-3′，扩增的片段为 292 bp。并使用管家基因 GAPDH 作为内对照，GAPDH 上游引物 5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，下游引物为 5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，扩增的片段为 500 bp。反应体系为：10×PCR buffer 2.5 μl，50 mmol/L $MgCl_2$ 0.75 μl，2.5 mmol/L dNTP 2 μl，2 μmol/L GAPDH 1μl，10 μmol/L 2 μl，cDNA 模板 1 μl，*Taq* 酶（5 U/μl）0.25 μl，H_2O 15.5 μl，总体积 25 μl。将反应体系中混合物充分混匀，离心。在 PCR 仪中预变性 94 ℃，4 min；然后进入以下循环：变性 94 ℃ 30 s，退火 60 ℃ 30 s，延伸 72 ℃ 30 s，共 28 个循环；最后延伸 72 ℃，7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳。用 Multi-Analytist 显像系统测定并进行结果分析。

1.4　Western blotting

在低温下使用研钵将食管癌组织及配对癌旁食管黏膜组织磨成粉末状，加入蛋白质裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂，离心吸出上清，分装，置 -70℃ 冰箱保存。配制聚丙烯酰胺凝胶，将变性蛋白样品加入缓冲液，蛋白凝胶电泳，然后转膜（硝酸纤维素膜），用 5% 的脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜上的蛋白潜在结合位点，加入一抗（1∶500）4 ℃ 过夜，加入二抗后 ECL 试剂显色、照相。所用抗体购自美国 Santa 公司。

1.5　统计学方法

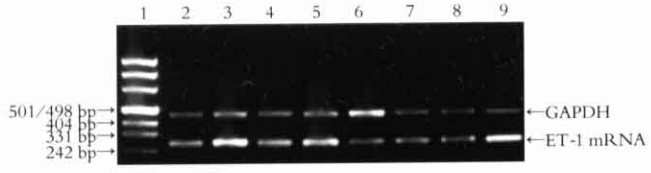
采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　ET-1 mRNA 及 ETAR mRNA 在食管癌及癌旁组织中的表达

1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1，ET-1 mRNA 在食管癌组织中的阳性表达率为 82.7%（62/75），在癌旁食管黏膜组织的阳性表达率为 60%（45/75），二者相比较有显著性差异（$P<0.05$）。ETAR mRNA 在食管癌组织中的阳性表达率为 61.3%（46/75），在癌旁食管黏膜组织的阳性表达率为 63.3%（62.7/75），统计学比较无显著性差异（$P>0.05$）。

另外，在食管癌组织中 ET-1 mRNA 表达率明显高于 ETAR mRNA（$P<0.05$），但在癌旁正常食管黏膜中，二者表达相似（$P>0.05$）。



1：PUC；2：N1；3：C1；4：N2；5：C2；6：N3；7：C3；8：N4；9：C4

图 1　ET-1 mRNA 在食管癌（C）及配对癌旁食管黏膜（N）组织中的表达

Fig 1　Expression of ET-1 mRNA in the tissue of esophageal cancer and normal esophageal mucous membrane

2.2　ET-1 及 ETAR mRNA 在食管癌中的表达与临床病理学之间的关系

结果见表 1，ET-1 mRNA 的表达与年龄、性别无关（$P>0.05$）。在淋巴结转移阳性组中 ET-1 mRNA 表达率高于淋巴结转移阴性组（$P<0.05$）。另外，ET-1 mRNA 的表达随肿瘤分化程度降低而升高，在中低分化组的表达率高于高分化组的表达率（$P<0.05$）；随临床分期升高表达率升高，在Ⅲ期病人中的表达高于Ⅰ～Ⅱ期（$P<0.05$）。而 ETAR mRNA 的表达与年龄、性别、肿瘤分化程度、淋巴结转移及临床分期均无明显关系（$P>0.05$）。

表 1　ET-1 mRNA 和 ETAR mRNA 在食管癌组织中的表达与临床病理的关系

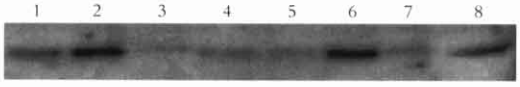
Tab 1　Relationship between ET-1 and ETAR mRNA expression and clinicopathologic factors

Items	*n*	ET-1 mRNA		*P*	ETAR mRNA		*P*
		Positive (*n*)	Positive rate (%)		Positive (*n*)	Positive rate (%)	
Esophageal cancer	75	62	82.7		46	61.3	
Gender							
Male	53	45	84.9	0.645	31	58.5	0.433
Female	22	17	77.3		15	68.2	
Age							
<60 years	29	24	82.8	0.987	18	62.1	0.917
>60 years	46	38	82.6		28	60.9	
Degree of differentiation							
Well	30	21	70.0	<0.01	17	56.7	0.498
Moderate	26	22	88.5		16	61.5	
Poor	19	19	94.7		13	68.4	
Metastasis of lymph node							
No	32	23	71.9	<0.05	20	62.5	0.858
Yes	43	39	90.7		26	60.5	
Staging							
Ⅰ	21	14	66.7	<0.01	13	61.9	0.970
Ⅱ	18	14	77.7		11	61.1	
Ⅲ	36	34	94.4		22	61.1	

2.3　ET-1 及 ETAR 蛋白在食管癌中的表达情况

Western blot 检测结果见图 2，ET-1 及 ETAR 蛋白在食管

癌及癌旁食管黏膜组织中均有不同程度的表达。其中,ET-1 蛋白在食管癌组织中表达明显高于配对癌旁食管黏膜上皮组织的占 74.7%(56/75),而 ETAR 蛋白在 80.0%(60/75)的配对食管癌及癌旁黏膜组织中表达一致。



1:N1;2:C1;3:N2;4:C2;5:N3;6:C3;7:N4;8:C4

图 2 ET-1 蛋白在食管癌(C)与配对癌旁食管黏膜组织(N)中的表达差异

Fig 2 Expression of ET1 protein in the tissue of esophageal cancer and normal esophageal mucous membrane

3 讨论

内皮素-1 是一种有丝分裂原,可以刺激多种人类癌细胞的生长,与肿瘤有着密切关系。ET-1 的信号传递属于受体后信号传递,即 ET-1 是通过与其特异受体(多为 ETA 受体)结合后发挥作用。研究表明:①ET-1 在肝癌、胃癌、前列腺癌、结肠直肠癌等肿瘤患者的血浆中水平升高[1,2],而且在有癌远处转移的患者中更高。②可以作为抗细胞凋亡因子[3],通过保护瘤细胞免于凋亡从而促进肿瘤生长。③ET-1 可使 c-fos/c-myc/c-sis 等原癌基因相关抗原蛋白及 mRNA 表达增强,而使野生型 p53 等抑癌基因相关抗原蛋白及 mRNA 表达下调。④ET-1 结合受体后可激活鸟苷酸环化酶使 cGMP 升高,并抑制腺苷酸环化酶使 cAMP 减少,促进肿瘤生长。

本实验在 75 例食管癌新鲜标本和癌旁食管黏膜组织中,通过逆转录多聚酶链式反应法发现,ET-1 mRNA在食管癌组织中表达率为82.7%(62/75),明显高于在癌旁食管黏膜的 60%(45/75),二者有显著性差异($P<0.05$)。提示 ET-1 mRNA 与食管癌有关。

而且通过分析 ET-1 mRNA 表达与食管癌临床病理学的关系表明,ET-1 的差异表达与肿瘤分化程度、淋巴结转移与否、临床分期有关($P<0.05$)。在低分化程度、高临床分期、淋巴结有转移的病例中,ET-1 mRNA 的表达更明显。另外,本实验数据显示 ET-1 mRNA 的差异表达与年龄、性别、病理类型无关($P>0.05$)。这一实验结果提示 ET-1 mRNA 的增强表达与食管癌的侵袭性和转移有关。

研究表明,ET-1 可以促进肿瘤新生血管生成、加快癌细胞运动,增强肿瘤的侵袭性和转移[4-6]:①ET-1 作为有丝分裂原可直接促进血管内皮细胞和血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖。②ET-1 可以刺激血管内皮生长因子(VEGF)生成,从而间接促进血管内皮形成。③可以刺激内皮细胞产生更多的基质金属蛋白酶-2(MMP-2),并使组织基质金属蛋白酶抑制因子(TIMP)减少,加快癌细胞运动。④可使几种血管生成前体因子如 PDGF 等增加。

另外,本实验研究表明 ETAR 在食管癌及癌旁食管黏膜上皮组织中表达相似,分别为 61.3%(46/75)和 62.7%(47/75);且其在食管癌中的表达与组织分化、淋巴结转移、临床分期均无关。而在食管癌组织中 ET-1 mRNA 表达率明显高于 ETAR mRNA($P<0.05$),但在癌旁正常食管黏膜中,二者表达相似($P>0.05$)。此外,Western blot 检测结果显示 ET-1 在大多食管癌组织中高表达,而 ETAR 却在大多癌及癌旁组织中表达相似。以上证据均说明受体 ETAR 在食管癌的侵袭转移中未发生明显变化,与之没有直接关系;而 ET-1 分泌增加,可通过自分泌和/或旁分泌的方式释放并调节细胞生长,并通过影响 VEGF、MMP 等因子,发挥直接或间接的促进肿瘤细胞浸润转移的作用。

ET-1 是一种内源性生长因子,通过与其受体的相互作用,在多种肿瘤的侵袭转移过程中发挥重要作用。控制 ET1 与其受体过度结合,可以成为阻遏肿瘤演进的新靶点[7,8]。

参考文献:

[1] Ali H, Loizidou M, Dashwood M, *et al*. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET(A) antagonists [J]. Gut, 2000, 47(5): 685-688.

[2] Lissoni P, Malugani F, Bonfanti A. Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2001, 15(2): 140-144.

[3] Peduto-Eberl L, Valdenaire O, Saintgiorgio V, *et al*. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2000, 86(2): 182-187.

[4] Salani D, Di Castro V, Nicotra M R, *et al*. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma[J]. Am J Pathol, 2000, 157(5): 1537-1547.

[5] Spinella F, Rosano L, Di Castro V, *et al*. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(31): 27850-27855.

[6] Yang Z, Krasnici N, Luscher T F. Endothelin-1 potentiates human smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade[J]. Circulation, 1999, 100(1): 5-8.

[7] Bhargava S, Stummeyer T, Hotz B, *et al*. Selective Inhibition of Endothelin Receptor A as an Anti-angiogenic and Anti-proliferative Strategy for Human Pancreatic Cancer[J]. J Gastrointest Surg, 2005, 9(5): 703-709.

[8] Bagnato A, Natali P G. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy[J]. J Transl Med, 2004, 2(1): 16.

(编辑 汪勤俭)