维普资讯 http://www.cqvip.com



论著 文章编号:0253-3626(2007)01-0036-03

# E2F3 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义

杨 洋,唐 伟

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过检测 E2F3 mRNA 在膀胱移行细胞癌组织及正常膀胱移行上皮组织中的表达,探讨其与膀胱移行细胞癌发生发展的关系。方法:通过 RT-PCR 方法检测 34 例膀胱移行细胞癌组织及 19 例正常膀胱移行上皮组织中 E2F3 mRNA 的表达情况。结果:E2F3 mRNA 在膀胱移行细胞癌及正常膀胱移行上皮组织中的阳性表达率分别为 47.1%(16/34)和 0%(0/19)。膀胱移行细胞癌组织中 E2F3 mRNA 的表达率明显高于正常膀胱移行上皮组织($P<0.005$)。其中膀胱移行细胞癌组织中 E2F3 mRNA 的表达率随肿瘤分级、分期增高而相应增高($P<0.05$)。结论:E2F3 基因可能通过参与细胞周期调控,在膀胱移行细胞癌的发生发展中起到促进作用。

【关键词】膀胱移行细胞癌;E2F3;RT-PCR

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-08-30

# Expression and significance of E2F3 in bladder urothelial carcinoma

*YANG Yang, et al*

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of E2F3 mRNA in bladder urothelial carcinoma and normal bladder urothelial tussue to explore its relationship with the genesis and progression of bladder urothelial carcinoma. *Methods*: The expression of E2F3 mRNA in 34 cases of bladder urothelial carcinoma and 19 cases of normal bladder urothelial tussue was examined by RT-PCR. *Result*: The positivity rates of E2F3 mRNA in bladder urothelial carcinomas and normal bladder urothelial tussues were 47.1%(16/34) and 0%(0/19) respectively. The expression level of E2F3 mRNA in bladder urothelial carcinomas was significantly higher than that in normal bladder urothelial tussues ($P<0.005$). The expression rate of E2F3 mRNA in bladder urothelial carcinoma was positively correlated with tumor grade and clinical stage ($P<0.05$). *Conclusion*: E2F3 might play a promoting role in the genesis and progression of bladder urothelial carcinoma by controlling cell cycle.

【Key words】Bladder urothelial carcinoma; E2F3; RT-PCR

E2F3 属于 E2F 家族,定位于染色体 6p22,全长 91.5kb,其编码的 E2F3 转录蛋白由 465 个氨基酸组成,分子量 49ku,它通过与细胞周期蛋白 D1 形成二聚体参与调控细胞周期与 DNA 复制。本研究采用 RT-PCR 检测 E2F3 mRNA 在膀胱移行细胞癌组织中的表达情况,并探讨其意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本组 34 例膀胱移行细胞癌,取材于 2005 年 6 月至 2006 年 3 月我院开放手术的患者,男 31 例,女 3 例,年龄 51~77 岁,平均 61.6 岁。按 UICC 标准分期,其中 pTa-pT1 8 例,pT2-pT4 26 例;按 WHO 标准分级,G1 12 例,G2 15 例,G3 7 例。对照组采用 19 例膀胱移行细胞癌开放手术患者术中所取癌旁正常膀胱移行上皮组织。以上实验组及对照组结果经病理证实。所取组织均在术中离体后立即放入 RNA-guard 专用保存液(上海华舜生物工程有限公司)并转移至 -70℃冰箱冻存备用。

### 1.2 方法

采用 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)严格按照说明书提取总 RNA。E2F3 和内参照 human actin 引物由上海生物工程技术服务有限公司根据 GeneBank 设计合成。E2F3 上游引物:5'-ACGTCTCTTGGTCTGCTCAC-3',下游引物:5'-TCTTAATGAGGTGGATG-CCT-3',产物长度为 155bp;human actin 上游引物:5'-CTCCATCCTGGC-

作者介绍:杨 洋(1979- ),男,硕士,
主要研究方向:泌尿系统肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com



CTCGTCGT-3', 下游引物:5'-GCTGTCACCTTCGTTCC-3', 产物长度为 268bp。RT-PCR 采用一步法 RT-PCR 试剂盒(Bio Basic 公司,MMLV Single Step RT-PCR Kit)。应用 BIO—RAD PCR 扩增仪,37℃ 逆转录 30min;94℃ 预变性 2min,94℃变性 30s,55℃复性 30s,72℃ 延伸 30s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 10min 后降至 4℃结束反应。

1.3 结果判定

MARKER 采用 DL2000(TAKARA 生物公司),与反应产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳 25min,经 BIO-RAD 数字化凝胶成像分析仪扫描成像,以出现条带为阳性表达,无明确条带形成为阴性表达(图 1)。

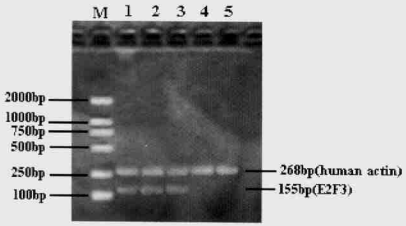



图 1 E2F3 mRNA 的表达情况

M:MARKER(DL2000)

1,2,3:膀胱移行细胞癌组织中 E2F3 mRNA 阳性表达

4,5:正常膀胱黏膜上皮组织中 E2F3 mRNA 阴性表达

1.4 统计分析

采用 SPSS 12.0 软件进行 $\chi^2$ 检验及 Fisher 精确概率计算。

## 2 结 果

2.1 E2F3 mRNA 在肿瘤组织与正常组织中的表达(表 1)

E2F3 mRNA 在膀胱移行细胞癌及正常膀胱移行上皮组织中的阳性表达率分别为 47.1% (16/34) 和 0(0/19)。膀胱移行细胞癌组织中 E2F3 mRNA 的表达率明显高于正常膀胱移行上皮组织($\chi^2$=10.672,$P$<0.005)。

2.2 E2F3mRNA 在不同分期、分级的膀胱移行细胞癌组织中的表达(表 1)

膀胱移行细胞癌组中分期为 pTa-pT1 与 pT2-pT4 的 E2F3 mRNA 阳性表达率分别为 12.5%(1/8)和 57.7%(26/15)。差别有显著性(精确概率计算:$P$=0.028 < 0.05)。膀胱移行细胞癌组中分级为 G1、G2、G3 的 E2F3 mRNA 阳性表达率分别为 15.38%(2/13),57.14%(8/14),85.71%(6/7)。其中 G1 组与 G2 组有显著性差异(精确概率计算:$P$=0.028 < 0.05),G1 组与 G3 组有显著性差异 ($P$=0.004 < 0.005),G2 组与 G3 组之间差异无显著性($P$=0.181 > 0.05)。

表 1 E2F3 在正常膀胱组织、膀胱移行细胞癌组织中的表达及与病理分级、临床分期的关系

| 类别 | $n$ | E2F3 − | | E2F3 + | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $n$ | % | $n$ | % |
| 组织标本 | | | | | |
| 正常膀胱组织 | 19 | 19 | 100.00 | 0 | 0.00 |
| 膀胱移行细胞癌组织 | 34 | 18 | 52.94 | 16 | 47.06 |
| WHO 标准分级 | | | | | |
| pTa-pT1 | 8 | 7 | 87.50 | 1 | 12.50 |
| pT2-pT4 | 26 | 11 | 42.31 | 15 | 57.69 |
| UICC 标准分期 | | | | | |
| G1 | 13 | 11 | 84.62 | 2 | 15.38 |
| G2 | 14 | 6 | 42.86 | 8 | 57.14 |
| G3 | 7 | 1 | 14.29 | 6 | 85.71 |

## 3 讨 论

p16(Ink4a)-cycD/cdk4-Rb-E2F 和 Arf-mdm2-p53 是体内两条主要的细胞增殖调控和肿瘤监控途径,E2F3 参与这两条途径的调控并和其中关键基因密切联系[1,2]。p16(Ink4a)-cycD/cdk4-Rb-E2F 途径中的 Rb 基因(视网膜母细胞瘤基因)是第一个被克隆的抑癌基因,位于染色体 13q14,其表达产物 Rb 核磷酸蛋白通过磷酸化与去磷酸化的转换调控细胞周期 G1 期向 S 期的正常转化。E2F 转录调节家族(主要是 E2F1-3)蛋白与细胞周期蛋白 D1 结合形成二聚体,可以激活一系列由 G1 期向 S 期转换过程中起关键作用的基因表达,促进细胞的分裂增殖。在 G1 期,去磷酸化状态的 Rb 蛋白能与 E2F 蛋白结合抑制其活化基因表达的功能,阻止 DNA 合成,使细胞不能进入 S 期。对 Rb 基因缺陷的胚胎细胞研究发现在 Rb 缺失条件下 E2F3 促进细胞异常增生[3]。Wu[4]等对 E2F 缺陷小鼠的胚胎成纤维细胞(MEFs)的研究还发现 E2F 缺陷会引起 p21Cip1

维普资讯 http://www.cqvip.com



蛋白水平升高，从而降低细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs)的活性，并阻碍 Rb 蛋白的磷酸化，使 Rb 处于抑制细胞进入 S 期的非磷酸化状态，细胞不能进入 S 期完成正常有丝分裂过程。由此可见，在 p16(Ink4a)-cycD/cdk4-Rb-E2F 途径，E2F 是通过反馈抑制 p21Cip1 蛋白使 Rb 蛋白磷酸化，抑制其限制性调控细胞有丝分裂进入 S 期的功能，E2F 的水平决定了细胞周期中 G1 期转化的时间和 DNA 的合成率[4,5]。Arf-mdm2-p53 抑癌途径的关键基因 p53 是研究最广泛的抑癌基因，其编码的 p53 蛋白也是一种核磷酸蛋白，它能使细胞停留于 G1 期，并参与细胞对受损 DNA 的修复，或是在无法修复时诱导受损细胞凋亡。p53 的功能主要受 mdm2 和 Arf 基因调控，mdm2 的主要作用是抑制野生型 p53 基因的激活转录功能和抗肿瘤活性，mdm2 与 p53 相互调节，形成负反馈环[6]。Arf 基因是 p53 抑癌途径的一种重要正调节因子，在细胞异常增生时被激活并表达 ARF 蛋白，ARF 蛋白与 Mdm2 蛋白结合，阻止 Mdm2 介导的p53 降解并还原p53介导的转录活性[7]，此外，ARF 蛋白还可使体内 p53 水平升高。而 E2F3 在正常细胞中是 Arf-mdm2-p53 抑癌途径的负调节因子，在 E2F3 缺失条件下 p53 活性增强[3]。E2F3 的调节作用的主要机理是抑制 Arf 基因表达，研究发现在普通小鼠的胚胎成纤维细胞（MEFs）中 E2F3 可以抑制 Arf 基因的表达对其进行调控[1,2,8]。而基于 E2F3 基因缺陷小鼠的胚胎成纤维细胞的研究发现其中 Arf 基因上调，并导致细胞周期蛋白 E 依赖激酶活性失调，中心小体核磷蛋白 B 缺乏，中心粒分离复制提前以及因此出现的中心体扩增，纺锤体缺陷和非整倍体等情况[8]。可见，E2F3 对 p53 起抑制作用，E2F3 基因或其表达的蛋白如果出现异常，就可能导致 p53 抑癌途径功能失调，促进肿瘤发生发展。

本研究显示 E2F3 mRNA 在正常膀胱组织中无表达，而在癌组织中频繁出现表达，其差别有显著性，提示其过度表达可能促进膀胱癌的发生。在不同分期的肿瘤样本中，pTa-pT1 与 pT2-pT4 的 E2F3 mRNA 阳性表达率统计差别有显著性，而不同分级的肿瘤样本中，G1 组与 G2 组 mRNA 阳性表达率统计有显著性差异，G1 组与 G3 组 mRNA 阳性表达率也有显著性差异，G2 组与 G3 组 E2F3 mRNA 表达率均处于较高水平而致差异无显著性。可见 E2F3 mRNA 的表达率随肿瘤分级、分期增高相应增高，提示 E2F3 的表达在肿瘤发展过程中可能促进了肿瘤细胞的恶性演进。一方面，由于 E2F3 具有通过反馈抑制 p21Cip1 蛋白使 Rb 蛋白磷酸化，抑制其限制性调控细胞有丝分裂进入 S 期的功能，所以当 E2F3 过度表达时便限制了 Rb 蛋白的抑癌作用。另一方面，E2F3 在正常细胞中是 Arf-mdm2-p53 抑癌途径的负调控因子，过度表达的 E2F3 也限制了 p53 的抑癌作用。可见 E2F3 的过度表达在细胞周期调控过程中限制 p16(Ink4a)-cycD/cdk4-Rb-E2F 和 Arf-mdm2-p53 的正常调控功能，特别是 Rb 和 p53 的抑癌作用，从而促进了肿瘤的发生发展和恶性演进过程，由此导致 E2F3 mRNA 在正常膀胱组织中无表达，而在癌组织中频繁出现表达，表达率随肿瘤分级、分期增高相应增高。综上所述，E2F3 不仅可望成为膀胱移行细胞癌诊断和评估预后的指标，而且有望成为膀胱移行细胞癌治疗的新的靶目标。

## 参 考 文 献


[1] Aslanian A, Iaquinta PJ, Verona R, et al. Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics [J]. Genes Dev, 2004; 18(12): 1413-1422.

[2] Doron Ginsberg. E2F3-a novel repressor of the ARF/p53 pathway [J]. Dev Cell, 2004; 6(6): 742-743.

[3] Ziebold U, Lee EY, Bronson RT, et al. E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas[J]. Mol Cell Biol, 2003; 23(18): 6542-6552.

[4] Wu L, Timmers C, Maiti B, et al. The E2F1-3transcription factors are essential for cellular proliferation [J]. Nature, 2001; 414 (6862): 457-462.

[5] Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, et al. E2f3 is critical for normal cellular proliferation[J]. Genes Dev, 2000; 14(6): 690-703.

[6] Zhang R, Mayhood T, Lipari P, et al. Fluorescence polarization assay and inhibitor design for MDM2/p53 interaction[J]. Anal Biochem, 2004; 331(1): 138-146.

[7] Le Frere-Belda MA, Gil Diez de Medina S, Daher A, et al. Profiles of the 2 INK4a gene products, p16 and p14ARF, in human reference urothelium and bladder carcinomas, according to pRb and p53 protein status[J]. Hum Pathol, 2004; 35(7): 817-824.

[8] Saavedra HI, Maiti B, Timmers C, et al. Inactivation of E2F3 results in centrosome amplification[J]. Cancer Cell, 2003; 3(4): 333-346.