

E2F1 在肾透明细胞癌中的表达及意义^{*}

高宇¹ 范阳¹ 陈伟浩¹ 黄庆波¹
倪栋¹ 艾青¹ 马鑫¹ 张旭¹

[摘要] 目的:探讨 E2F1 在肾透明细胞癌中的表达及意义。方法:通过实时定量 PCR 和 Western blot 方法检测 E2F1 在肾透明细胞癌及对应瘤旁组织中 mRNA 和蛋白的表达情况,并分析 E2F1 的 mRNA 水平与临床病理资料的关系及表达相关性。结果:与对应瘤旁组织相比,E2F1 的 mRNA 水平在肾透明细胞癌手术标本中表达明显升高($P=0.0002$),相应的蛋白水平对比与 mRNA 变化一致;E2F1 的 mRNA 水平在不同年龄、性别组间差异无统计学意义($P>0.05$),而在组织学分级、肿瘤直径大小、T 分期、临床分期和大血管浸润与否差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:E2F1 表达上调可能在肾透明细胞癌的肿瘤形成中发挥作用,且 E2F1 表达升高可能促进肾透明细胞癌的恶性进展。

[关键词] 肾透明细胞癌;E2F1;恶性进展

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)03-0177-04

Expression and significance of E2F1 in clear cell renal cell carcinoma

GAO Yu FAN Yang CHEN Weihao HUANG Qingbo
NI Dong AI Qing MA Xin ZHANG Xu

(Department of Urology, People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100853, China)

Corresponding author: ZHANG Xu, E-mail: xzhang@foxmail.com

Abstract Objective: To investigate the E2F1 expression and significance in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). **Methods:** Message RNA and protein levels of E2F1 in 52 cases of ccRCC surgical specimens and their corresponding adjacent normal renal tissue samples were detected by real-time PCR and Western blot respectively, the relationship between the mRNA levels of E2F1 and clinicopathological features were analyzed. **Results:** The mRNA levels of E2F1 were significantly up-regulated in ccRCC tissues compared to adjacent normal renal tissues ($P=0.0002$). The tendency of the protein levels alteration in ccRCC and Peritumoral tissues were correspond with that of the mRNA levels. The mRNA levels of E2F1 distinguished largely among different groups in terms of histological staging, tumor size, T staging, clinical stages and vascular infiltration ($P<0.05$), but not age and sex ($P>0.05$). **Conclusions:** E2F1 may be a key event in the carcinogenesis and development of ccRCC.

Key words clear cell renal cell carcinoma; E2F1; malignant progression

肾细胞癌(renal cell carcinoma)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。其发病率仅次于膀胱癌,约占成人恶性肿瘤的 2%~3%,起源于肾小管上皮细胞,其中 60%~85%为透明细胞癌^[1]。肾透明细胞癌恶性程度高,且容易发生远处转移,在临床综合治疗方面对放化疗不敏感。目前疗效较好的有针对血管内皮生长因子(VEGF)的分子靶向治疗,但远期疗效不佳^[2]。因此,探讨肾透明细胞癌发生和恶性进展机制对其早期诊断、早期治疗和评估预后等方面具有重要价值。

细胞周期转录因子 E2F1 是 E2F 家族最早被克隆的一员,调节细胞的增殖、分化、凋亡、死亡等^[3]。近年来研究发现 E2F1 表达水平及其活性

变化与肿瘤的发生和恶性进展密切相关。有学者研究表明:E2F1 在乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤等不同类型肿瘤中的表达异常^[4~6],但关于 E2F1 在肾透明细胞癌中的表达目前尚无报道。本文主要研究 E2F1 在肾透明细胞癌组织和对应瘤旁组织中的表达情况,对 E2F1 的 mRNA 相对表达量和临床病理资料进行相关分析,并探讨它在肾透明细胞癌发生和恶性进展中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

52 例肾透明细胞癌及其对应瘤旁组织标本均来自于解放军总医院泌尿外科 2009 年 1~3 月手术标本。标本采集后立即以液氮进行快速冷冻并保存在-80℃冰箱中。病例标本的一般资料、临床病理资料见表 1。

1.2 研究方法

总 RNA 提取及实时定量 PCR:采用总 RNA 提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司),按试

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 30972982); 国家高技术研究发展计划(863 计划)泌尿外科 LESS 和 NOTES 关键技术与临床应用研究(编号 2012AA02101)

¹ 解放军总医院泌尿外科,肾脏疾病国家重点实验室(北京, 100853)

通信作者:张旭, E-mail: xzhang@foxmail.com

剂说明书抽提组织总 RNA。提取后经 NanoDrop 1000 Spectrophotometer 测定其纯度和浓度, A260/A280 比值在 1.8~2.0。然后逆转录合成 cDNA, 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司 (TransScript First-Strand cDNA Synthesis Super-Mix)。实时定量 PCR 使用 SYBR-Green 染料法 (北京全式金生物技术有限公司)。E2F1 引物序列为: 上游 5'-CAGAGCAGATGGTTATGG-3', 下游 5'-CTGAAAGTTCTCCGAAGA-3'; 内参 PPIA 的引物序列为: 上游 5'-ATGGTCAACCCCAACCGTGT-3' 下游 5'-TCTGCTGTCTTTGGGACCTTGTC-3'。通过琼脂糖凝胶电泳确定产物的特异性, 每个样品行 3 次重复, 最后采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量。

蛋白提取及 Western blot: 采用 RIPA 蛋白裂解液试剂盒分别提取细胞和组织总蛋白, 按 BCA 法 (北京艾德莱生物科技有限公司) 测定蛋白浓度。按总蛋白 50 μg /孔 (20 μl) 加样, 组织蛋白样品准备好后按照 Western blot 标准流程操作。E2F1 抗体购自美国 Abcam 公司, 工作滴度为 1:1000; 二抗购自北京中杉金桥公司, 为 1:3000 浓度稀释的羊抗兔抗体; 内参 GAPDH 为北京中杉金桥公司分装抗体, 二抗也来自于中杉金桥公司 (1:3000)。之后用 SuperECL Plus 超敏发光液 (北京普利莱公司) 显影于 X 线片, 每个样品行 3 次重复。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件, 相对 mRNA 表达水平以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 t 检验比较组间差异, 多组数据比较采用单因素方差分析及 SNK-q 检验。采用直线相关分析基因 mRNA 表达水平和临床病理资料的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 E2F1 在肾透明细胞癌及相应瘤旁组织中的表达

采用实时定量 PCR 检测 52 对肾透明细胞癌组织及瘤旁组织的 mRNA 表达。如图 1A 所示, 肿瘤组 E2F1 mRNA 水平明显高于对应瘤旁组 ($P=0.0002$), Western-blot 实验显示肿瘤组 E2F1 的蛋白水平也高于瘤旁组 (图 1B)。

2.2 E2F1 的 mRNA 水平与临床病理资料的关系

E2F1 mRNA 水平在不同年龄 ($P=0.241$)、性别 ($P=0.144$) 组间的表达差异无统计学意义, 在组织学分级 ($P=0.002$)、肿瘤直径大小 ($P<0.001$)、T 分期 ($P=0.003$)、临床分期 ($P=0.002$) 以及大血管 (肾静脉和下腔静脉) 浸润与否 ($P<0.001$) 组间差异有明显的统计学意义。肿瘤组织 E2F1 mRNA 表达水平在组织学分级 ($r=-0.470, P<0.001$)、肿瘤直径大小 ($r=0.443, P=0.$

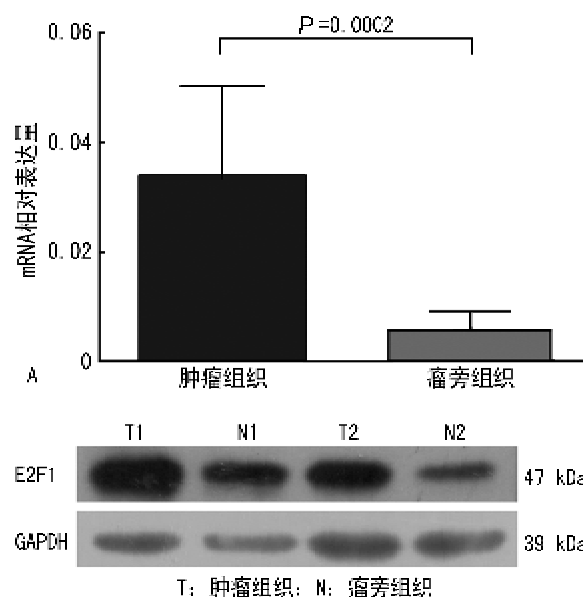


图 1 E2F1 在肾透明细胞癌组织和对应瘤旁组织中的表达 (mRNA 水平和蛋白水平)

001)、T 分期 ($r=-0.455, P=0.001$)、临床分期 ($r=-0.467, P<0.001$) 以及大血管 (肾静脉和下腔静脉) 浸润与否 ($r=-0.475, P<0.001$) 各组中呈显著直线相关性 (表 1)。

3 讨论

转录因子 E2F1 是 E2F 家族一员, 能诱导细胞快速进入 S 期, 是细胞周期网络中的关键环节, 在调控细胞增殖中处于核心地位。E2F 家族成员能结合人类约 7% 基因的启动子, 从而调控这些基因的转录和表达, 参与很多生命进程和疾病形成, 细胞损伤修复, 诱导细胞凋亡、增殖和细胞死亡等^[7]。近年来有学者研究发现 E2F1 在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 某些肿瘤组织中 E2F1 表达水平下调, 如乳腺癌、恶性胶质瘤^[8,9]等, 而某些肿瘤组织中 E2F1 表达水平上调, 如食管腺癌、黑色素瘤^[10,11]等。综上所述, E2F1 基因在不同的肿瘤中表达水平不一致, 甚至趋势相反。作为上游的转录因子, E2F1 在不同肿瘤的发生和恶性发展过程中扮演着不同的角色, 可能是 E2F1 在不同的肿瘤组织类型中与下游结合不同的靶基因, 导致不同的肿瘤转归。Shi 等发现, 在乳腺癌中, 肿瘤恶性程度越高, E2F1 的表达水平也越高, E2F1 与乳腺癌预后分子指标之间也有很强的关联性^[4]。在膀胱癌研究中, E2F1 的表达上调能够预测非肌层浸润性膀胱癌进展至肌层浸润性膀胱癌的危险度^[12]。

肾透明细胞癌作为泌尿系最常见的肿瘤之一, 目前缺乏早期诊断的分子指标, 恶性程度高, 易发生远处转移。本研究分别从 mRNA 水平以及蛋白水平检测了 E2F1 在肾透明细胞癌组织和对应瘤旁组织中的表达情况, 证实了 E2F1 在肾透明细胞

表1 E2F1 mRNA 表达水平与临床病理资料的关系

临床特征	例数	E2F1 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)	P 值
年龄/岁			
<40	7	9.036±4.001	=0.241
≥40;<60	37	9.164±4.301	
≥60	8	12.126±5.948	
性别			
男	33	8.896±4.971	=0.144
女	19	10.830±3.606	
组织学分级			
高分化	39	10.795±4.168	=0.002
中分化	7	7.102±4.895	
低分化	6	4.774±2.324	
		$r = -0.470$	<0.001
肿瘤直径大小/cm			
≤4	21	11.104±3.942	<0.001
>4,≤7	21	10.445±4.267	
>7	10	4.681±3.175	
		$r = 0.443$	<0.001
T 分期			
T ₁	41	10.695±4.088	=0.003
T ₂	3	5.912±4.532	
T ₃ +T ₄	8	5.391±4.290	
		$r = -0.455$	<0.001
临床分期			
I	41	10.695±4.088	=0.002
II	3	5.912±4.532	
III	4	7.765±4.817	
IV	4	3.016±2.168	
		$r = -0.467$	<0.001
大血管浸润(肾静脉和 下腔静脉)			
有	7	4.154±2.682	<0.001
无	45	10.451±4.229	
		$r = -0.475$	<0.001

癌中的表达是升高的(mRNA 表达差异 $P = 0.0002$, 对应的蛋白水平组间差异也是一致的)。

综上所述,本研究首次证实了 E2F1 在肾透明细胞癌中的表达是升高的,并且 E2F1 的高表达与肾癌的恶性程度相关,E2F1 表达越高,肿瘤病理组织学分化程度越低($P = 0.002$),肿瘤直径越大($P < 0.001$),T 分期越高($P = 0.003$),临床分期越高($P = 0.002$)以及大血管(肾静脉和下腔静脉)浸润可能性越大($P < 0.001$)。有文献报道,E2F1 能够驱使静止期或生长受阻的细胞通过“限制点”进入到 S 期,从而促进细胞增殖。因此,E2F1 的表达与肿瘤大小、分期、临床分期有很高的相关性^[13]。在肿瘤的侵袭力方面,有研究表明:在非小细胞肺癌中,E2F1 能够启动下游基质金属蛋白酶 9、14、15(MMP9, MMP14, MMP15)的转录和激活,促进肿瘤的恶性进展^[14],并且与血管浸润有关。综上所

述,在肾透明细胞癌的发生和恶性发展中可能起到原癌基因的作用,为探讨肾癌发病机制和新的靶向治疗提供了新的探索思路。对于 E2F1 在肾癌中表达变化的原因和如何促进肾癌发生发展的机制,以及寻找下游结合的靶基因,我们将在后续研究中作进一步探讨。

[参考文献]

- 1 Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108.
- 2 TAKEUCHI A, et al. Sorafenib augments cytotoxic effect of S-1 in vitro and in vivo through TS suppression[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 68: 1557-1564.
- 3 Takeuchi A, Shiota M, Tatsugami K, et al. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis[J]. Genes Dev, 2001, 15: 267-285.
- 4 Zhang S Y, Liu S C, Al-Saleem L F, et al. E2F-1: a proliferative marker of breast neoplasia[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000, 9: 395-401.
- 5 Iwamoto M, Banerjee D, Menon L G, et al. Overexpression of E2F1 in lung and liver metastases of human colon cancer is associated with gene amplification[J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3: 395-399.
- 6 Alla V, Engelmann D, Niemetz A, et al. E2F1 in melanoma progression and metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2010, 102: 127-133.
- 7 Bieda M, Xu X, Singer M A, et al. Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome[J]. Genome Res, 2006, 16: 595-605.
- 8 Kwon M J, Nam E S, Cho S J, et al. E2F1 expression predicts outcome in Korean women who undergo surgery for breast carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17: 564-571.
- 9 Chakravarti A, Delaney M A, Noll E, et al. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 2387-2395.
- 10 Evangelou K, Kotsinas A, Mariolis-Sapsakos T, et al. E2F1 overexpression correlates with decreased proliferation and better prognosis in adenocarcinomas of Barrett oesophagus[J]. J Clin Pathol, 2008, 61: 601-605.
- 11 Pützer B M, Steder M, Alla V. Predicting and preventing melanoma invasiveness: advances in clarifying E2F1 function[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10: 1707-1720.
- 12 Lee J S, Leem S H, Lee S Y, et al. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors[J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 2660-2667.

(下转第 181 页)

如有狭窄环及息肉,用钬激光一并处理。碎石完毕,继续向上进镜,尽可能到达肾盂,观察有无其他病变或较大结石块残留。术后常规留置双J管4周,留置20号气囊导尿管5~7天,经复查KUB或CT证实无结石残留后拔除双J管。

2 结果

本组手术时间20~75 min,平均38 min。154例(160侧)均顺利完成输尿管镜钬激光碎石术;2例因输尿管扭曲严重、1例因输尿管腔严重狭窄,输尿管镜无法到达结石部位,改行开放手术。1例结石被冲回肾内,3例有部分结石碎块冲回肾内,留置双J管后,术后1周行ESWL治疗1~2次,半月后复查KUB或B超,显示结石排净。术后所有患者肾积水情况明显减轻或消失,无严重并发症发生。本组一次性完全碎石150例,一期成功碎石率为95.5%。2例合并急性肾功能衰竭患者术后1周复查BUN、Cr均恢复正常。本组发生输尿管穿孔2例,无输尿管断裂、输尿管黏膜撕脱等严重并发症发生。

3 讨论

输尿管结石占尿石症的33%~54%,70%输尿管结石位于输尿管下段。输尿管结石90%以上是在肾内形成而降入输尿管,原发于输尿管的结石临床很少见^[1,2]。因输尿管管腔较小,输尿管结石容易造成梗阻,常常引起不同程度肾积水和感染,严重的会影响肾功能,因此,积极处理输尿管结石是必要的。

钬激光是目前医用激光中较为常用的一种,是一种高能脉冲式激光,波长为2100 nm,发射时间短,瞬间功率大,光纤末端与结石表面的水被气化,形成微小气泡,将能量传至结石,使其粉碎^[3]。目前治疗输尿管结石的方法主要有ESWL、经输尿管镜碎石、经后腹腔镜切开取石及开放手术。有人认为,对于输尿管中下段结石,采用ESWL治疗效果较差,疗效不确切,也可能需要多次治疗;经后腹腔镜行输尿管切开取石术则主要适用于中上段较大的输尿管结石,且要求术者有良好的腹腔镜操作技术和相应的手术器材、设备,一般基层医院开展较为困难;而开放手术则创伤较大,手术瘢痕影响美观,多数患者不太愿意接受。结合我们的现状,随着腔道泌尿外科技术的发展,输尿管镜技术已在国

内得到了普遍应用^[4]。因此,经输尿管镜钬激光碎石已成为输尿管结石治疗的主要手段,尤其是中下段输尿管结石。而双侧输尿管中下段结石更是输尿管镜治疗的绝佳适应证,可以同期手术。经输尿管镜碎石创伤小,操作简单,效果确切,甚至可以说是立竿见影。

为了提高输尿管镜碎石的成功率,避免严重并发症的发生,我们有以下几点体会:①术前需明确输尿管结石的大小和位置,了解结石下方输尿管情况,有无扭曲、梗阻及狭窄,充分评估手术难度,并作相应准备。②成功置入输尿管镜是手术成功的前提,在输尿管导管引导下进镜,动作要轻柔,严格遵守“循腔进镜”的原则。③术中防止结石移位,保证手术顺利完成。进镜成功后立即调小灌注压力,在保证视野清晰的情况下甚至可关闭灌注;对于活动度大的结石,宜采用小功率(<1.0 J/8~10 Hz,功率过大可能产生较大碎石块,不利于结石粉碎,而且易造成结石移位)、细光纤、“虫噬法”碎石^[5]。必要时用“三爪钳”或套石篮将结石固定,防止其移位。④有输尿管狭窄者,先用钬激光将狭窄切开;合并息肉者,用钬激光先将息肉切除,然后再碎石。⑤术后常规留置双J管引流。

综上所述,经输尿管镜钬激光碎石术治疗输尿管中下段结石具有操作简单、安全有效、创伤小、术后恢复快等特点,可以作为治疗输尿管中下段结石的首选方法。

【参考文献】

- 1 Marberger M, Hofbauer J, Turk C H, et al. Management of ureteric stones[J]. Eur Urol, 1994, 25:265-272.
- 2 吴阶平主编. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南:山东科学技术出版社,2004:784-786.
- 3 熊林,邹茜,余书勇,等. 输尿管镜钬激光碎石术治疗输尿管结石120例[J]. 中国内镜杂志, 2012,18(5):533-535.
- 4 周建华,陈楚义,郑锦标,等. 输尿管硬镜钬激光治疗输尿管结石139例临床分析[J]. 广东医学院学报, 2012, 30(2):153-155.
- 5 那彦群,郭震华主编. 实用泌尿外科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:248-250.

(收稿日期:2012-12-27)

(上接第179页)

- 13 Johnson D G, Schwarz J K, Cress W D, et al. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase[J]. Nature, 1993, 365:349-352.
- 14 Johnson J L, Pillai S, Pernazza D, et al. Regulation of

matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors; Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease[J]. Cancer Res, 2012, 72:516-526.

(收稿日期:2012-11-24)