

ZEB2 和 E-cadherin 在鼻咽癌中的表达及其临床意义*

易翔¹ 石书婧² 李晓雪¹ 赵利洁¹

[摘要] 目的:探讨 ZEB2 和 E-cadherin mRNA 和蛋白在鼻咽癌组织中的表达情况及其与鼻咽癌侵袭转移的关系。方法:应用荧光定量 PCR 和免疫组织化学方法检测 ZEB2 和 E-cadherin 在 39 例鼻咽癌和 12 例炎性鼻咽黏膜组织中的表达,分析 ZEB2 和 E-cadherin 表达与鼻咽癌患者临床病理参数之间的关系及两者的相关性。结果:ZEB2 mRNA 和蛋白在鼻咽癌中的表达水平均高于炎性鼻咽黏膜组织($P < 0.05$),ZEB2 mRNA 和蛋白的高表达均与肿瘤的 N 分级和临床分期有关($P < 0.05$),而与性别、年龄和 T 分级无相关性($P > 0.05$);E-cadherin mRNA 和蛋白在鼻咽癌中的表达水平均低于炎性鼻咽黏膜组织($P < 0.05$),E-cadherin mRNA 和蛋白的低表达均与肿瘤的 N 分级有关($P < 0.05$),而与性别、年龄、T 分级和临床分期无相关性($P > 0.05$);ZEB2 mRNA 与 E-cadherin mRNA 呈负相关($r = -0.367, P < 0.05$),ZEB2 蛋白与 E-cadherin 蛋白呈负相关($r = -0.322, P < 0.05$),均差异有统计学意义。结论:在鼻咽癌中 ZEB2 表达上调、E-cadherin 表达下调,其表达呈明显负相关,并与鼻咽癌转移有关,可能机制与 ZEB2 下调 E-cadherin 的表达促进细胞 EMT 有关。

[关键词] 鼻咽癌;上皮-间质转化;E 盒结合锌指蛋白

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.18.016

[中图分类号] R739.63 **[文献标志码]** A

Expression and clinical significance of ZEB2 and E-cadherin in nasopharyngeal carcinoma

YI Xiang¹ SHI Shujing² LI Xiaoxue¹ ZHAO Lijie¹

(¹Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, 530021, China; ²Department of Otolaryngology, Hebei Province Ophthalmology Hospital)

Corresponding author: YI Xiang, E-mail: yixiang16300@163.com

Abstract Objective: To investigate the expression and clinical significance of ZEB2 and E-cadherin mRNA and protein in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues. **Method:** The expressions of ZEB2 and E-cadherin in 39 cases of NPC tissue and 12 cases of nasopharyngeal inflammation tissue were detected by Real-time PCR method and immunohistochemical technique. To assess their correlations with clinicopathological parameters of NPC and the interrelationship between them. **Result:** Both the expression of ZEB2 mRNA and protein were higher in NPC tissues than that in inflammation tissues ($P < 0.05$). Abnormal expression of ZEB2 mRNA and protein in NPC were significantly associated to N stage and clinic stage ($P < 0.05$), but the difference in expression between the different gender, age and T stage were not statistically significant ($P > 0.05$). Both the expression of E-cadherin mRNA and protein were higher in NPC tissues than that in inflammation tissues ($P < 0.05$). Abnormal expression of E-cadherin mRNA and protein in NPC were significantly associated to N stage ($P < 0.05$), but the different expression between the different gender, age, T stage and clinic stage were not statistically significant ($P > 0.05$). In NPC tissues, the expression of ZEB2 mRNA was negative correlated with the expression of E-cadherin mRNA ($r = -0.367, P < 0.05$). The expression of ZEB2 protein was negative correlated with the expression of E-cadherin protein ($r = -0.322, P < 0.05$), the differences were both statistically significant. **Conclusion:** The expression of ZEB2 was up-regulated in NPC, while the expression of E-cadherin was down-regulated, their expression was significantly negative correlated, and might be associated with metastasis of NPC, ZEB2 may promote the invasion and metastasis of NPC by inhibiting the expression of E-cadherin.

Key words nasopharyngeal carcinoma; epithelial-to-mesenchymal transition; zinc finger E-box-binding protein

* 基金项目:广西医学科学实验中心开放基金(No: KFJJ2010-12)

¹ 广西医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科(南宁, 530021)

² 河北省眼科医院耳鼻咽喉科

通信作者:易翔, E-mail: yixiang16300@163.com

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国南方最常见的头颈部恶性肿瘤之一,恶性程度高,其具有早期发生转移等特点^[1],是 NPC 治疗失败的主要原因。上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤发生侵袭转移

的重要环节^[2],而 E-cadherin 可以调控 EMT 的发生。ZEB2 为 E 盒结合锌指蛋白(zinc finger E-box-binding protein,ZEB)家族中的一员,研究发现 ZEB2 可参与多种肿瘤细胞的侵袭和转移过程,如:卵巢癌、口腔鳞状细胞癌、唾腺腺样囊性癌。但是 ZEB2 在 NPC 中表达的情况鲜有报道,本研究旨在通过荧光定量 PCR 法和免疫组织化学法检测 NPC 组织及炎性鼻咽黏膜组织中 ZEB2 和 E-cadherin 的表达情况,探讨其与 NPC 临床病理参数之间的关系,并分析两者之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

39 例 NPC 及 12 例炎性鼻咽黏膜组织标本来自广西医科大学第一附属医院 2014-04-06 在耳鼻喉头颈外科门诊就诊,经病理组织学检查确诊的标本,所有标本来源患者均未行放、化疗。NPC 组,男 24 例,女 15 例,平均年龄(47.7±11.3)岁;炎性鼻咽黏膜组,男 6 例,女 6 例,平均年龄(41.1±10.1)岁,两组间性别、年龄差异无统计学意义。NPC 组的 TNM 分期按照 2010 版美国肿瘤联合会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)NPCT-NM 分期法进行临床分期分组。上述标本收集及实验进行均经我院伦理委员会批准,并签署了患者知情同意书。

主要试剂和仪器:FastStart Universal SYBR Green Master ROX (Roche),ZEB2 兔源多克隆抗体(Bioworld),E-cadherin 兔源单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 及 DAB(中杉金桥),7300 型定量 PCR 仪(ABI)。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取和 cDNA 的合成 严格按照 Trizol Reagent 试剂盒说明书所提供的步骤,提取各组织样本总 RNA,使用 Thermo 公司的微量分光光度计测定总 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA 参照 Thermo mRNA 逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,-20℃ 保存备用。

1.2.2 荧光定量 PCR 法检测 ZEB2 和 E-cadherin mRNA 的表达差异 在 ABI7300 系统以 SYBR Green I 作为荧光指示剂进行荧光定量 PCR 扩增反应,PCR 反应体系共 20 μl:SYBR Green I 10 μl,cDNA 模板 1 μl,上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,ddH₂O 7 μl。反应条件:预变性 95℃ 10 min;变性 95℃ 15 s,退火 60℃ 30 s,40 个循环。以 GAPDH 作为组织内参照,所有引物序列见表 1。应用 Livak(2^{-ΔΔCt})法分析基因的相对表达差异,2^{-ΔΔCt} 值表示目的基因表达差异的倍数,ΔΔCt=实验组(Ct_{目的基因}-Ct_{GAPDH})-对照组(Ct_{目的基因}-Ct_{GAPDH})。

表 1 引物序列

引物	序列(5'→3')
GAPDH-F	GACAACCTTTGGCATCGTGGA
GAPDH-R	ATGCAGGGATGATGTTCTGG
ZEB2-F	CAAGAGGCGCAAACAAGC
ZEB2-R	GGTTGGCAATACCGTCAT
E-cadherin-F	TTGCTACTGGAACAGGGACACT
E-cadherin-R	GGAGATATATTGGGAGGAAGGTC

1.2.3 免疫组织化学染色法检测 ZEB2 和 E-cadherin 蛋白的表达差异 严格按照试剂盒说明进行染色。以 PBS 缓冲液代替一抗作为空白对照。切片进行常规烤片、脱蜡,pH6.0 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液高压修复,3%过氧化氢甲醇避光处理 10 min 灭活内源性过氧化物酶,10%山羊血清封闭 10 min,加 ZEB2 及 E-cadherin 一抗 4℃ 冰箱过夜,复温 30 min,加二抗 37℃ 孵育 30 min,DAB 显微镜下显色,苏木精-伊红复染,盐酸乙醇分化,蒸馏水返蓝,常规脱水、透明、中性树脂封片。结果判定:以染色强度和阳性细胞所占的百分比例进行分级。染色强度:无着色(0 分),淡黄色(1 分),棕黄色(2 分),棕褐色(3 分)。阳性细胞比例:≤10% (1 分),>10% 且 ≤50% (2 分),>50% (3 分);依据染色强度和阳性细胞比例两项得分的乘积将组织标本分为两组:0~4 分为阴性表达组,6、9 分为阳性表达组。

1.2.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验或校正 *t* 检验(方差不齐),计数资料率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法(总例数小于 40 例),相关性分析采用 Pearson 相关分析(双变量)或 Spearman 等级相关(2 个分类变量)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZEB2 和 E-cadherin 在 NPC 组和炎性鼻咽黏膜组中的表达

应用荧光定量 PCR 方法检测 ZEB2 和 E-cadherin mRNA 表达量的变化,结果显示:ZEB2 在 NPC 中的表达水平高于炎性鼻咽黏膜组织($P < 0.05$,图 1a),E-cadherin 在 NPC 组中的表达下调($P < 0.05$,图 1b)。

免疫组织化学染色结果显示:ZEB2 阳性表达主要位于细胞质,NPC 组 ZEB2 阳性表达率 NPC 组 56.4%,明显高于炎性鼻咽黏膜组(16.7%),差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2a、2b)。E-cadherin 阳性表达主要位于细胞膜和细胞质,NPC 组的阳性表达率为 20.5%,低于炎性鼻咽黏膜组(83.3%),差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 2c、2d)。

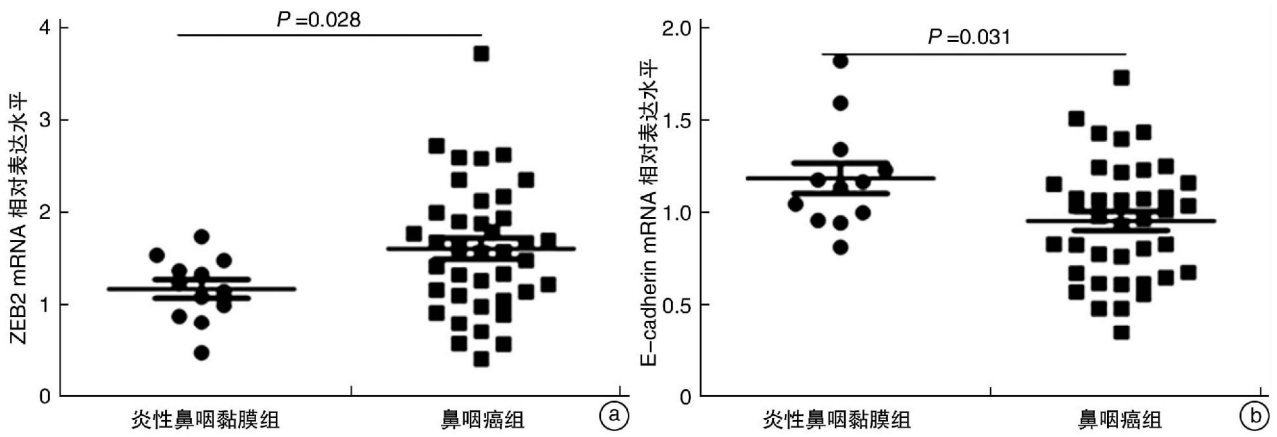
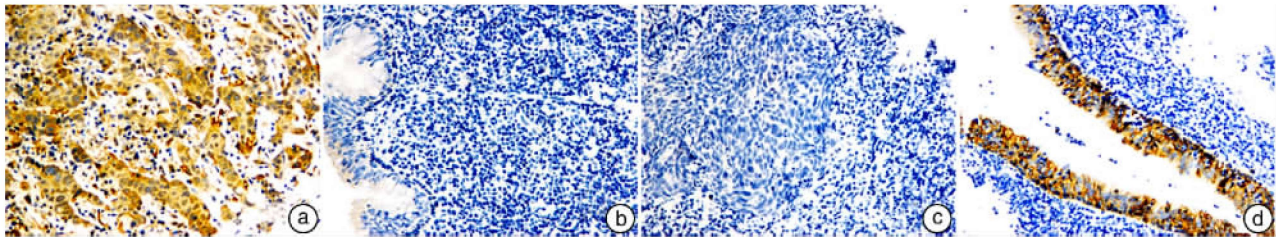


图 1 ZEB2 和 E-cadherin mRNA 在 NPC 组和炎性鼻咽黏膜组中的表达



a:ZEB2 在 NPC 组织中的阳性表达 ×200;b:ZEB2 在炎性组织中的阴性表达 ×200;c:E-cadherin 在 NPC 组织中的阴性表达 ×200;d:E-cadherin 在炎性组织中的阳性表达 ×200。

图 2 ZEB2 和 E-cadherin 蛋白在 NPC 和炎性鼻咽黏膜中的表达

2.2 ZEB2 和 E-cadherin 与 NPC 临床病理参数之间的关系

荧光定量 PCR 分析 ZEB2 和 E-cadherin mRNA 表达量与 NPC 临床病理参数之间的关系,结果显示 ZEB2 mRNA 的高表达与肿瘤的 N 分级 ($P < 0.01$)和临床分期有关 ($P < 0.05$),而与性别、年龄和 T 分级无相关性 ($P > 0.05$)。E-cadherin mRNA 的表达水平与 NPC 组织的 N 分级有关 ($P < 0.05$),与性别、年龄和 T 分级和临床分期无相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

同时我们利用免疫组织化学结果从蛋白水平分析了 ZEB2 和 E-cadherin 的表达与 NPC 各临床病理参数之间的关系。结果显示:ZEB2 蛋白表达水平与肿瘤的 N 分级 ($P < 0.01$)和临床分期 ($P < 0.01$)有关,与 NPC 患者年龄、性别和 T 分级无明显相关性 ($P > 0.05$)。E-cadherin 蛋白的表达水平与 NPC 组织的 N 分级有关 ($P < 0.01$),与性别、年龄和 T 分级和临床分期无相关性 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3 ZEB2 与 E-cadherin 在 NPC 组织中表达的相关性

我们采用 Pearson 相关、Spearman 等级相关从 mRNA 水平和蛋白水平对探讨了 ZEB2 与 E-cadherin 在 NPC 组织中表达的相关性。Pearson 相关分析结果显示 ZEB2 与 E-cadherin mRNA 表达呈负相关 ($r = -0.367, P < 0.05$)。在蛋白水平,

Spearman 等级相关分析也发现 ZEB2 与 E-cadherin 其表达也呈负相关 ($r = -0.322, P < 0.05$),见表 4。同样显示。

3 讨论

EMT 是 NPC 等恶性肿瘤发生侵袭转移的关键步骤,其中 E-cadherin 在此过程中发挥着重要的

表 2 ZEB2 和 E-cadherin mRNA 表达与 NPC 临床病理参数之间的关系

临床特征	例数	ZEB2/ $2^{-\Delta\Delta ct}$	E-cadherin/ $2^{-\Delta\Delta ct}$
年龄/岁			
≤50	30	1.551±0.551	0.943±0.335
>50	9	1.822±1.088	0.978±0.307
性别			
男	24	1.705±0.781	0.936±0.278
女	15	1.467±0.550	1.024±0.449
T 分级			
T ₁ ~T ₂	10	1.305±0.616	1.036±0.277
T ₃ ~T ₄	29	1.719±0.710	0.929±0.335
N 分级			
N ₀ ~N ₁	11	1.128±0.588	1.151±0.280
N ₂ ~N ₃	28	1.804±0.659	0.880±0.307
临床分期			
I~II	5	1.038±0.441	1.069±0.287
III~IV	34	1.698±0.699	0.940±0.326

表 3 ZEB2 和 E-cadherin 蛋白表达与 NPC 临床病理参数之间的关系

临床特征	例数	ZEB2		E-cadherin	
		阴性	阳性	阴性	阳性
标本类型					
慢性炎症	12	10(83.3)	2(16.7)	2(16.7)	10(83.3)
NPC	39	17(43.6)	22(56.4)	31(79.5)	8(20.5)
年龄/岁					
≤50	24	12(50.0)	12(50.0)	20(83.3)	4(16.7)
>50	15	5(33.3)	10(66.7)	11(73.3)	4(26.7)
性别					
男	30	14(46.7)	16(53.3)	25(83.3)	5(16.7)
女	9	3(33.3)	6(66.7)	6(66.7)	3(33.3)
T 分级					
T ₁ ~T ₂	10	7(70.0)	3(30.0)	6(60.0)	4(40.0)
T ₃ ~T ₄	29	10(34.5)	19(65.5)	25(86.2)	4(13.8)
N 分级					
N ₀ ~N ₁	11	10(90.9)	1(9.1)	6(54.5)	5(45.5)
N ₂ ~N ₃	28	7(25.0)	21(75.0)	25(89.3)	3(10.7)
临床分期					
I~II	5	5(100.0)	0(0)	3(60.0)	2(40.0)
III~IV	34	12(35.3)	22(64.7)	28(82.4)	6(17.6)

表 4 NPC 中 ZEB2 与 E-cadherin 蛋白表达的关系

ZEB2	E-cadherin		r	P
	阴性	阳性		
阴性	11	6	-0.322	0.046
阳性	20	2		

作用, E-cadherin 属于 Ca²⁺ 依赖性跨膜糖蛋白, 起着调节细胞间黏附反应、维持细胞极性、形态和组织结构完整性等作用^[4]。研究表明, 在正常上皮细胞中 E-cadherin 表达稳定, 然而在很多上皮源性肿瘤中其表达水平常常下调^[5]。E-cadherin 的表达减少或者缺失, 可引起细胞间黏附作用降低, 使肿瘤细胞容易发生侵袭和转移^[6]。本实验通过荧光定量 PCR 及免疫组织化学法分别在 mRNA 及蛋白水平上观察 E-cadherin 的表达变化, 结果显示: E-cadherin 的 mRNA 和蛋白的表达水平在 NPC 组织中表达下调, E-cadherin 在 NPC 组织中的低表达与淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 而与性别、年龄、原发灶大小和临床分期无相关性 ($P > 0.05$), 与莫武宁等^[7]的研究结果相似, 该结果提示 E-cadherin 表达下调在 NPC 的侵袭转移过程中可能发挥着一定作用。

ZEB2 是一种锌指结构转录因子, 其可调控细胞生长、凋亡和炎症反应等多种生命活动过程。研究发现, ZEB2 可通过抑制 E-cadherin 的表达水平,

进而激活 MMP1、MMP2、MMP14 等多种基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP), 从而导致细胞发生 EMT, 促进细胞的侵袭和转移^[8]。本实验分别在 mRNA 及蛋白水平上测定 ZEB2 的表达水平, 结果显示: ZEB2 的 mRNA 和蛋白在 NPC 组织中的表达水平明显高于炎性组织, 其高表达与肿瘤的 N 分级和临床分期有关 ($P < 0.05$), 该结果表明 ZEB2 表达上调可能与 NPC 的侵袭转移有关。

另外, 本实验中我们还进行了 ZEB2 与 E-cadherin 的相关性分析, 结果显示: ZEB2 mRNA 与 E-cadherin mRNA 及 ZEB2 蛋白与 E-cadherin 蛋白均呈负相关, 两者均差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。该结果提示: NPC 中 ZEB2 的上调可能导致 E-cadherin 的下调, 从而促进 EMT 发生, 进而推进 NPC 的侵袭转移过程。ZEB2 和 E-cadherin 有望成为评估 NPC 恶性程度的重要指标。

参考文献

- [1] MA B B, CHN A T. Recent perspectives in the role of chemotherapy in the management of advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer, 2006, 103: 22-31.
- [2] LIU Y, DEAN D C. Tumor initiation via loss of cell contact inhibition versus Ras mutation: do all roads lead to EMT[J]? Cell Cycle, 2010, 9: 897-900.
- [3] ZHOU C, J LIU, Y TANG, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factor-2alpha, TWIST₂, and SIP1 may correlate with invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma [J]. J Oral Pathol Med, 2012, 41: 424-431.
- [4] WHEELOCK M J and K R JOHNSON. Cadherins as modulators of cellular phenotype[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003, 19: 207-235.
- [5] GUO D, XU B L, ZHANG X H, et al. Cancer stem-like side population cells in the human nasopharyngeal carcinoma cell line cne-2 possess epithelial mesenchymal transition properties in association with metastasis [J]. Oncol Rep, 2012, 28: 241-247.
- [6] RACHAGANI S, S SENAPATI, S CHAKRABORTY, et al. Activated KrasG(1)(2)D is associated with invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through inhibition of E-cadherin [J]. Br J Cancer, 2011, 104: 1038-1048.
- [7] 莫武宁, 黄光武, 邝国乾, 等. E-cadherin 和 p16 基因蛋白在鼻咽癌中的表达及意义 [J]. 癌症, 2000, 19 (1): 37-39.
- [8] SANCHEZ-TILLO E, L SILES, O DE BARRIOS, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression [J]. Am J Cancer Res, 2011, 1: 897-912.

(收稿日期: 2015-06-11)