

- mans transmit dengue virus to mosquitoes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112 (47): 14688-14693.
- [5] 张拥军, 吴生根, 王金章, 等. 福建省 2015 年本地登革热病例的病原学特征 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35 (1): 28-33.
- [6] 欧剑鸣, 谢忠杭, 林嘉威, 等. 福建省 2008—2017 年登革热疫情流行特征 [J]. 海峡预防医学杂志, 2018, 24 (6): 18-20.
- [7] Gupta N, Garg A, Chhabra P. Dengue infection presenting as acute hypokalemic quadriplegia [J]. J Postgrad Med, 2014, 60 (3): 327-328.
- [8] 陈燕清, 唐小平, 关玉娟, 等. 484 例登革热临床实验诊断的分析 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31 (1): 82-85.
- [9] 林萃才. 潮州市人民医院登革热患者年龄分布及临床检验分析 [J]. 医学信息, 2018, 31 (18): 88-90.
- [10] Widodo D, Setiawan B, Chen K, et al. The prevalence of hypokalemia in hospitalized patients with infectious diseases problem at Cipto Mangunkusumo Hospital, Jakarta [J]. Acta Med Indones, 2006, 38 (4): 202-205.
- [11] Malhotra H S, Garg R K. Dengue-associated hypokalemic paralysis: causal or incidental? [J]. J Neurol Sci, 2014, 340 (1-2): 19-25.
- [12] Jha S, Ansari M K. Dengue infection causing acute hypokalemic quadriplegia [J]. Neurol India, 2010, 58 (4): 592-594.
- [13] Ahlawat S K, Sachdev A. Hypokalaemic paralysis [J]. Postgrad Med J, 1999, 75 (882): 193-197.
- [14] 邹林, 陈绍森, 黄泽棋, 等. 广东佛山地区新发登革热流行的临床特征 [J]. 中国热带医学, 2015, 15 (11): 1396-1398.
- [15] Md-Sani S S, Md-Noor J, Han W H, et al. Prediction of mortality in severe dengue cases [J]. BMC Infect Dis, 2018, 18 (1): 232.
- [16] Bardak S, Turgutalp K, Koyuncu M B, et al. Community-acquired hypokalemia in elderly patients: related factors and clinical outcomes [J]. Int Urol Nephrol, 2017, 49 (3): 483-489.
- [17] Liamis G, Rodenburg E M, Hofman A, et al. Electrolyte disorders in community subjects: prevalence and risk factors [J]. Am J Med, 2013, 126 (3): 256-263.
- [18] 丁霞, 何青. 高血压合并低钾血症疾病的病因综述 [J]. 中华全科医师杂志, 2015, 14 (1): 70-73.
- [19] Liamis G, Milionis H, Elisaf M. Blood pressure drug therapy and electrolyte disturbances [J]. Int J Clin Pract, 2008, 62 (10): 1572-1580.

• 临床研究 •

上皮膜蛋白 1 在鼻咽癌组织中的表达特征

厦门大学附属福州市第二医院耳鼻咽喉头颈外科 (福州 350007) 张虹 张春¹ 肖志勇

【摘要】 目的 探讨上皮膜蛋白 1 (EMP1) 在鼻咽癌组织与正常鼻黏膜组织中的表达差异及其与疾病发展的关系。方法 收集 40 例鼻咽癌患者的癌组织 (实验组) 与正常鼻黏膜组织 (对照组) 各 40 份标本, RT-qPCR、免疫荧光染色和免疫印记技术检测 EMP1 在两种组织中的表达情况; 40 例鼻咽癌标本免疫印迹测定 EMP1 灰度值与其对应的肿瘤分化程度、临床分期进行二元线性回归分析。结果 与正常鼻黏膜上皮对比, 鼻咽癌上皮细胞的 EMP1 表达明显降低 ($P < 0.05$), 肿瘤细胞 EMP1 的表达与肿瘤分化程度呈正相关 ($P < 0.05$), 与临床分期不存在线性关系 ($P > 0.05$)。结论 EMP1 在鼻咽癌细胞和正常鼻黏膜细胞表达有差异, 其值可能预示肿瘤分化程度。

【关键词】 上皮膜蛋白 1 (EMP1); 鼻咽癌; 紧密连接

【中图分类号】 R739.63 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)03-0014-05

Expressive features of epithelial membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma ZHANG Hong, ZHANG Chun, XIAO Zhiyong. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the Affiliated Fuzhou Municipal Second Hospital, Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the expressive differences of epithelial membrane protein 1 (EMP1) between nasopharyngeal carcinoma tissues and normal nasal mucosa tissues and its relationship with disease development. **Methods** The expression of EMP1 in 40 nasopharyngeal carcinoma tissues (experimental group) and normal nasal mucosa tissues (control group) were detected by RT-qPCR, immunofluorescence staining and immunoblotting. The gray value of EMP1 was determined by Western blot in 40 nasopharyngeal carcinoma specimens, and the binary linear regression analysis was performed with tumor differentiation degree and clinical stage. **Results** Compared with normal nasal mucosa epithelium cells, the expression of EMP1 in

¹ 福建医科大学附属福建省肿瘤医院头颈放疗科

nasopharyngeal carcinoma epithelial cells was significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of EMP1 in tumor cells was positively correlated with the degree of tumor differentiation ($P < 0.05$), but there was no significant linear relationship between EMP1 expression and clinical stage ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of EMP1 in nasopharyngeal carcinoma cells is different from that in normal nasal mucosa cells, which may predict the degree of tumor differentiations.

【Key words】 epithelial membrane protein 1 (EMP1); nasopharyngeal carcinoma; tight junction

鼻咽癌是头颈部的好发肿瘤之一,其发病率有明显的地区差异性。全球每年鼻咽癌的新发病例约 8 万人,以欠发达国家或地区的发病率相对较高(1.4/10 万),尤其是东南亚(4.3/10 万)、东亚(1.8/10 万)等热带和亚热带国家或地区,而欧美等发达国家或地区的发病率则相对较低(0.4/10 万)^[1]。在我国,鼻咽癌发病以南方地区为主,两广为甚,即使这部分人移民至北美依然发病率很高^[2]。鼻咽癌的生存率不一,与肿瘤的临床分期相关,Ⅳ期较低,3 年生存率 $T_{1-4}N_0-3$ 、 T_4N_{0-2} 分别为 84.1%、89.2%,5 年生存率分别为 77%、79.7%^[3]。

上皮膜蛋白 1 (EMP1) 是一种跨膜糖蛋白,又称为 CL-40、肿瘤相关膜蛋白 (TMP)、B4B^[4]。EMP1 由 157 个氨基酸组成,含有 4 个高度保守的疏水跨膜结构域^[5],是细胞间维持紧密连接的主要蛋白之一,发挥细胞栅栏和屏障功能^[6]。本文围绕 EMP1 在鼻咽癌细胞与正常鼻黏膜细胞的表达差异,来探讨其与肿瘤分化、分期的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象: 本研究均已取得所有患者同意并签署知情同意书。收集 2018 年 10 月至 2020 年 4 月在我科及福建省肿瘤医院头颈放疗科经鼻咽镜取活检病理证实为鼻咽鳞状细胞癌的病例 40 例入组研究,男 34 例,女 6 例,平均年龄 (53.07 ± 14.18) 岁,详细临床资料见表 1。诊断标准、肿瘤分化程度判定均以病理为准,临床分期参照《常见肿瘤 AJCC 分期手册》(第 8 版)。纳入标准:原发性、病理证实为鼻咽癌患者。排除标准:转移癌、鼻咽部除鳞状细胞癌以外的其他恶性肿瘤、既往病史提供不详、不同意入组、伴发鼻腔鼻窦特异性感染或其他肿瘤。

每位患者均钳取 2 处标本:一为鼻咽癌组织(实验组,简称 NPC),病理证实为鼻咽鳞状细胞癌;二为距离癌组织 ≥ 2 cm 以上的鼻咽或鼻腔黏膜组织(对照组,简称 Normal),病理证实为正常上皮组织。取好标本后,两种性质标本各分为 3 份,一份浸没于 RNA 储存夜中,4 °C 过夜后,−80 °C 超低温冰箱中保存;一份以 10% 中性缓冲福尔马林固定,4 °C 保存;一份存放于液氮或 −80

°C 超低温冰箱中保存。

表 1 40 例鼻咽癌患者临床资料

	例数	率/%
性别		
女	6	15.0
男	34	85.0
年龄/岁		
<20	1	2.5
20~30	2	5.0
30~40	5	12.5
>40	32	80.0
分化		
中分化	1	2.5
低分化	10	25.0
未分化	29	72.5
分期		
I 期	1	2.5
II 期	6	15.0
III 期	13	32.5
IV a 期	17	42.5
IV b 期	3	7.5

1.2 RT-qPCR 检测 EMP1 的表达: 采用 Trizol 法提取总 RNA,按照 SuperScript III 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明,将 1 g RNA 反转录成 cDNA,产物置于 −20 °C 保存。使用 Sybrqpcrmix(美国 Invitrogen 公司)试剂盒检测各基因 mRNA 表达情况。扩增程序:95 °C 5 min, (95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s) × 40 个循环。以肌动蛋白 actin 为内参对照,相对表达量 $RQ = 2^{-\Delta Ct}$,每例样品重复 3 次,取平均值,并绘制扩增曲线和溶解曲线。引物序列为:actin 上游引物 5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCC-3',下游引物 5'-CATACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'; EMP1 上游引物 5'-CTACACTAGTCATTATGCGAA-3',下游引物 5'-CAGATAGAGAACGCCGAT-3'。

1.3 免疫荧光染色检测细胞内 EMP1 表达: 10% 中性缓冲福尔马林固定鼻咽癌上皮细胞及正常鼻黏膜上皮细胞,PBS 缓冲液(北京中杉金桥)冲洗,山羊血清(北京元亨)封闭。2 种上皮细胞均用兔抗人 EMP1 多克隆一抗(1:100,英国 Abcam 公司)孵育过夜后,加入 FITC 标记的山羊抗兔二抗

(1:200, 英国 Abcam 公司)。DAPI 复染后甘油封片, 正置荧光显微镜 (LeicaDM3000, 德国) 下观察。应用 ImageJ 软件进行平均荧光强度分析, 计算公式为平均荧光强度 (Mean) = 该区域荧光强度总和 (IOD) / 该区域面积 (Area)。

1.4 免疫印迹检测 EMP1 表达: 2 组细胞经 RIPA 裂解液冰浴中以最大功率裂解 30 s。4 ℃、12 000 rpm 离心 15 min, 收集上清, 采用 BCA 法检测蛋白浓度。每孔上样量为 10 g 行 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转膜至 0.22 m PVDF 膜上, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温摇床封闭 1 h; 在兔抗人 EMP1 多克隆一抗 (1:1 000, 英国 Abcam 公司) 液中 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后, 加入山羊抗兔二抗 (1:4 000, 英国 Abcam 公司) 液室温下孵育 1 h, TBST 再次洗膜 3 次, ECL 化学发光法、凝胶成像系统分析蛋白条带灰度值。以 β -actin 为内参, 分析不同样本之间目的蛋白表达差异。

1.5 统计学方法: 采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析及绘图。各组样本数据均以均数 \pm 标准差表示。两组间非正态分布计量资料比较采用 Mann-Whitney *U* 检验; 正态分布计量资料比较采用独立样本 *t* 检验。40 例鼻咽癌标本 Western blot 测定 EMP1 灰度值/内参蛋白灰度值与肿瘤分化程度、临床分期进行线性回归预测及分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌细胞与正常鼻黏膜细胞 EMP1 mRNA 表达: 鼻咽癌细胞 (NPC) 和正常鼻黏膜细胞 (Normal) 均存在 EMP1 mRNA 的表达, 正常鼻腔黏膜细胞 mRNA 的相对表达量明显高于鼻咽癌细胞 ($P < 0.05$), 见图 1。

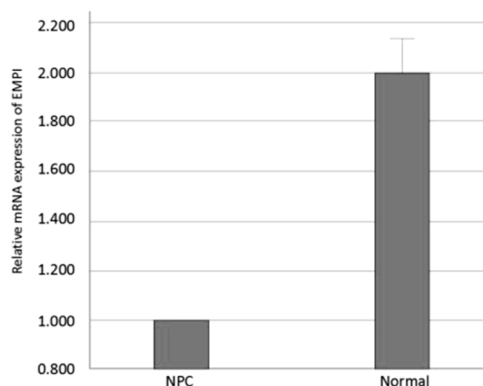


图 1 NPC 和 Normal 中 EMP1 mRNA 的表达水平

2.2 免疫荧光染色检测鼻咽癌细胞与正常鼻腔黏膜细胞内的 EMP1 分布: 从免疫荧光图片分析, 鼻咽癌细胞单位面积下 EMP1 的分布面积 (绿染部分) 明显少于正常鼻黏膜细胞; 平均荧光强度对比, 鼻咽癌细胞组较正常鼻黏膜细胞组明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2、图 3、表 2。

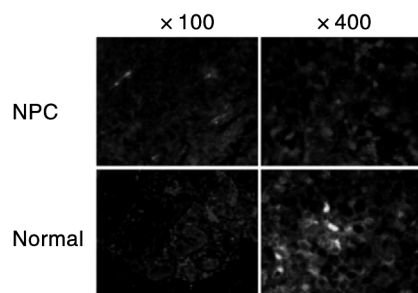


图 2 NPC 和 Normal 免疫荧光染色图片 (×100、×400)

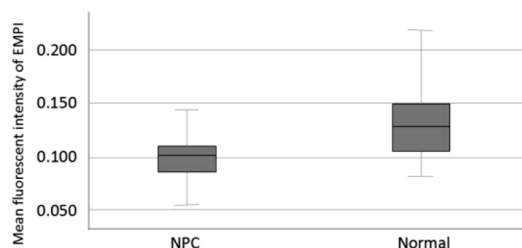


图 3 NPC 和 Normal 中 EMP1 平均荧光强度对比

表 2 平均荧光强度

组别	例数 (n)	平均数 (Mean)	标准差 (SD)	正态检验 (P)
NPC	40	0.101	0.019	0.200
Normal	40	0.129	0.032	0.200

2.3 Western blot 检测鼻咽癌细胞与正常鼻腔黏膜细胞 EMP1 表达: 鼻咽癌细胞与正常鼻黏膜细胞的 EMP1 表达量统计数据见表 3, EMP1/ β -actin 比值鼻咽癌细胞明显低于正常鼻黏膜细胞 ($P < 0.05$, 图 4)。

表 3 EMP1/ β -actin

组别	例数 (n)	平均数 (Mean)	标准差 (SD)	正态检验 (P)
NPC	40	0.625	0.265	0.200
Normal	40	0.810	0.301	0.200

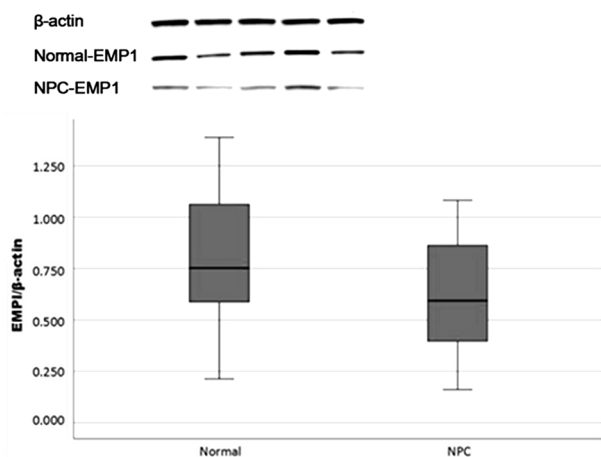


图 4 NPC 和 Normal 中 EMP1 的表达水平

2.4 40 例鼻咽癌 Western blot 灰度值与肿瘤分化程度、临床分期线性回归分析：设置灰度值为因变量 (Y)，肿瘤分化程度 (X_1) 及临床分期 (X_2) 为虚拟自变量，导入 SPSS 27.0 进行线性回归分析及散点图绘制，因变量 X_1 与自变量 Y 之间存在正相关 ($R=0.490$, $P<0.05$)，因变量 X_2 与自变量 Y 之间不存在线性关系 ($R=0.055$, $P>0.05$)，回归方程 $Y=0.550+0.251X_1$ ，说明肿瘤分化越好，则癌细胞 EMP1 表达量越高，见图 5、图 6。

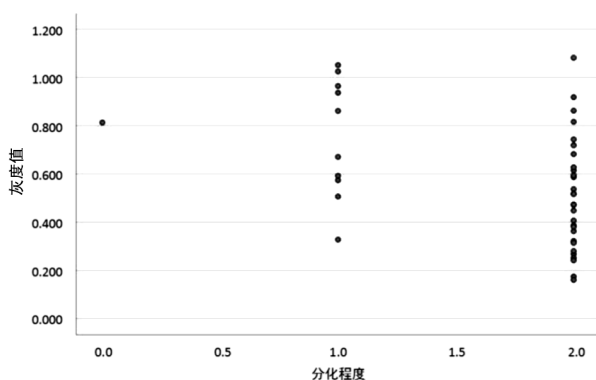


图 5 肿瘤分化程度散点图

3 讨论

上皮膜蛋白家族 (EMPs) 有 3 个成员，分别为 EMP1、EMP2 和 EMP3，化学结构上都有 4 段跨膜结构，其 N-端和 C-端均位于胞浆内，形成 2 个长度不等的胞外环和 1 个短的胞内环。EMPs 由生长阻滞特异性 3 (GAS3)/外周髓鞘蛋白 22 kDa (PMP22) 基因家族编码，GAS3/PMP22 基因目前已知至少编码 7 种蛋白：外周髓鞘蛋白 (PMP22)、EMP1、EMP2、EMP3、PMP22 相关的 P53 凋亡效应因子 (PERP)、脑膜蛋白 1 和膜蛋白 20

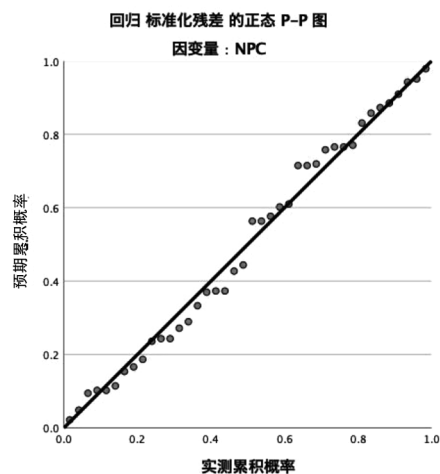


图 6 回归标准化残差的正态 P-P 图

(mp20)^[5]。

近几年来，针对 EMPs 在不同肿瘤中的表达情况及其介导的生物学效应，有很多不同的研究成果，总结即分布不同，效应不一。EMP1 广泛分布于全身各器官、各组织的上皮细胞、内皮细胞，但其分布有一定的器官、组织特异性，在食管、胃、中枢和周围神经系统中含量较高^[7-8]。其对不同器官、组织发生的上皮源性肿瘤具有促进或抑制的作用。有研究表明，胃癌^[9]、喉癌^[10]、舌癌^[11]，肿瘤细胞相较于非癌细胞 EMP1 表达明显下降，且其与患者预后呈正相关。另一些研究表明，卵巢癌^[12]、膀胱癌^[13]、前列腺癌^[14]，EMP1 高表达与肿瘤临床分期高、预后不良有关。

本项针对 40 例鼻咽癌患者癌细胞与正常鼻黏膜细胞的 EMP1 表达进行对比，总结出癌细胞明显下降，由此探讨 EMP1 的作用机制。EMP1 作为上皮细胞膜上的跨膜疏水性糖蛋白，是上皮细胞间形成紧密连接的重要组成部分之一，有研究在血脑屏障得到证实^[15]。紧密连接的主要功能在于屏障和栅栏，前者维持上皮的完整性、严密性、极性，后者维持细胞功能的选择性、通透性。呼吸道上皮充当空气的导管，并对吸入的病原体、过敏原和其他外来物质形成关键屏障。适当的屏障功能依赖于细胞顶端紧密连接的形成和维持，其赋予选择性、通透性并分离顶端和基底外侧膜域极性^[6]。上皮间质转化 (EMT) 是机体组织修复、慢性炎症、肿瘤发生的重要生理病理机制。紧密连接充当上皮形态、功能完整的守护使者，并是细胞内信号转导通路的枢纽，其功能失调是 EMT 的标志，上皮细胞失去极性和黏附能力，并获得了移动的特性，通过

细胞外基质迁移, 具有侵入性, 并最终成为间充质干细胞^[16]。有研究表明, SOS1 (一组调控细胞连接形成的基因) 和 Ras (一组癌基因家族) 正是通过 EMP1 来调节人体呼吸道紧密连接的形式, 由此可以介导某些疾病的发生, 如慢性阻塞性肺部疾病、支气管哮喘和肺癌^[17]。

本研究对 40 例鼻咽癌标本 EMP1/内参蛋白的比值与肿瘤的分化程度、临床分期进行回归预测及分析, 结果为前两者符合线性正相关, 临床分期的回归方程 $R=0.055$, 方差分析 $P>0.05$, 不符合线性关系, 与 Li 等^[10]对喉癌研究一致。分化程度取决于肿瘤细胞的异型性, 细胞形态越紊乱、极性越丧失, 则分化程度越低, 上皮膜蛋白 1 含量也越低。Sun 等^[9]对胃癌的研究表明, 癌细胞 EMP1 表达与细胞分化、临床分期显著相关, 针对本文有可能增加样本量进一步验证。

癌症是人类医学进程中一大类亟需攻克的难题, 本文旨在探讨 EMP1 在鼻咽癌的表达及其与临床的关系。在诊断方面, EMP1 的减少或缺失往往提示肿瘤分化差; 治疗方面, 目前靶向治疗是肿瘤研究领域的热点, EMP1 在不同组织器官中有不同的表达, 未来治疗方面设想在不同肿瘤作用不尽相同^[5], 是否能开拓鼻咽癌的另一个治疗方向, 值得思考。

参考文献

- [1] 梁铨, 杨剑, 高婷, 等. 中国鼻咽癌流行情况 [J]. 中国肿瘤, 2016, 25 (11): 835-840.
- [2] Petersson F. Nasopharyngeal carcinoma: a review [J]. Semin Diagn Pathol, 2015, 32 (1): 54-73.
- [3] Huang C L, Guo R, Li J Y, et al. Nasopharyngeal carcinoma treated with intensity-modulated radiotherapy: clinical outcomes and patterns of failure among subsets of 8th AJCC stage IVa [J]. Eur Radiol, 2020, 30 (2): 816-822.
- [4] Busch M, Klein S, Große-kreul J, et al. p53, miR-34a and EMP1-newly identified targets of TFF3 signaling in Y79 retinoblastoma cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20 (17): E4129.
- [5] Wang Y W, Cheng H L, Ding Y R, et al. EMP1, EMP 2, and EMP3 as novel therapeutic targets in human cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2017, 1868 (1): 199-211.
- [6] 丛馨, 张艳, 俞光岩, 等. 上皮细胞间紧密连接的研究进展 [J]. 生理学报, 2016, 68 (4): 492-504.
- [7] Taylor V, Welcher A A, Program A E, et al. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family [J]. Biol Chem, 1995, 270 (48): 28824-28833.
- [8] 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.
- [9] Sun G G, Zhao G, Lu Y F, et al. Association of EMP1 with gastric carcinoma invasion, survival and prognosis [J]. Int J Oncol, 2014, 45 (3): 1091-1098.
- [10] Li H, Zhang X, Jiang X, et al. The expression and function of epithelial membrane protein 1 in laryngeal carcinoma [J]. Int J Oncol, 2017, 50 (1): 141-148.
- [11] 代晓华, 张军, 邹慧儒, 等. 上皮膜蛋白 1 真核表达载体的构建及其对人舌鳞状细胞癌细胞迁移和侵袭的影响 [J]. 华西口腔医学杂志, 2016, 34 (4): 398-403.
- [12] Liu Y, Ding Y L, Nie Y T, et al. EMP1 promotes the proliferation and invasion of ovarian cancer cells through activating the MAPK pathway [J]. Onco Targets and Therapy, 2020, 13: 2047-2055.
- [13] Lin B, Zhang T, Ye X, et al. High expression of EMP1 predicts a poor prognosis and correlates with immune infiltrates in bladder urothelial carcinoma [J]. ONcol Lett, 2020, 20 (3): 2840-2854.
- [14] Echevarria M I, Awasthi S, Cheng C H, et al. African American specific gene panel predictive of poor prostate cancer outcome [J]. J Urol, 2019, 202 (2): 247-255.
- [15] Bangsow T, Baumann E, Bangsow C, et al. The epithelial membrane protein 1 is a novel tight junction protein of the blood-brain barrier [J]. J Cereb Flow Metab, 2008, 28 (6): 1249-1260.
- [16] Tzanakakis G, Kavasi R M, Voudouri K, et al. Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon [J]. Developmental Dynamics, 2018, 247 (3): 368-381.
- [17] Durgan J, Tao G B, Walters M S, et al. SOS1 and Ras regulate epithelial tight junction formation in the human airway through EMP1 [J]. EMBO Rep, 2015, 16 (1): 87-96.