

〔临床研究/论著〕

肝癌组织 EMP1 表达生物学意义

孙国贵¹ 张洁¹ 刘青² 杨从容² 张钧²

1. 唐山市人民医院(放化疗科:孙国贵;病理科:张洁),河北唐山 063000

2. 河北医科大学第四医院放疗科,河北石家庄,050017

【摘要】 目的 探讨上皮膜蛋白(epithelial membrane protein-1,EMP1)在肝癌组织中的表达水平及过表达对肝癌细胞生物表型的影响。方法 采用免疫组织化学方法、蛋白质印迹法检测唐山市人民医院 2008-01-01—2012-12-30 65 例肝癌组织及 35 例癌旁肝脏组织中的表达情况(距其癌组织边缘 ≥ 2 cm,镜下未见癌浸润)。采用慢病毒转染建立 EMP1 过量表达的肝癌 HepG2 细胞株。荧光定量 PCR 及蛋白质印迹法检测 EMP1 转染后肝癌 HepG2 细胞株中 EMP1 表达含量的变化。MTT 法、流式细胞术及 Transwell 检测 EMP1 过量表达对肝癌细胞增殖、细胞凋亡及细胞侵袭转移的影响。结果 免疫组织化学结果表明,EMP1 蛋白在肝癌组织中的表达阳性率为 32.3%(21/65),明显低于癌旁肝脏组织的 85.7%(30/35), $\chi^2=26.118, P<0.001$ 。蛋白质印迹法检测结果表明,EMP1 蛋白在肝癌组织的表达相对量(0.257 ± 0.022)较癌旁肝脏组织(0.863 ± 0.086)明显降低,两者比较差异有统计学意义, $t=11.824, P<0.001$ 。EMP1 蛋白表达水平与肝癌有无淋巴结转移、临床分期、组织分级以及血行转移有关($P<0.05$),而与肝癌患者年龄、性别、病理类型及 T 分期无关, P 值均 >0.05 。EMP1 高表达的肝癌细胞其增殖能力明显减弱,细胞凋亡及侵袭转移能力明显降低,Caspase-9 蛋白表达上调,而血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGFC)与基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)蛋白的表达量明显下调, $P<0.05$ 。结论 肝癌组织中 EMP1 蛋白表达减低,可能通过调控 Caspase-9 及 VEGFC 蛋白表达影响肝癌细胞增殖、凋亡与转移的生物学过程。

【关键词】: EMP1;肝肿瘤;基因转染;肿瘤转移

中华肿瘤防治杂志,2015,22(8):604-609

Expression and effect of EMP1 on cell biology in liver carcinoma

SUN Guo-gui¹, ZHANG Jie¹, LIU Qing², YANG Cong-rong², ZHANG Jun²

1. Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, P. R. China

2. Department of Radiotherapy, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, P. R. China

[ABSTRACT] **OBJECTIVE** To analyze the expression of epithelial membrane protein-1 (EMP1) in liver carcinoma and the biological effect in its cell line by EMP1 overexpression. **METHODS** Immunohistochemistry and western blot were used to analyze EMP1 protein expression in 65 cases of liver cancer and 35 cases of paraneoplastic tissues collected from our hospital before December 30, 2012. The relationship between EMP1 expression and clinical factors was studied. EMP1 lentiviral vector and empty vector were respectively transfected into liver cancer HepG2 cell line. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) and western blot were used to detect the mRNA level and protein of EMP1. MTT assay, cell apoptosis and invasion assays were also conducted to observe the biological influence of the up-regulated expression of EMP1 which might be found on HepG2 cell. **RESULTS** Immunohistochemistry: The level of EMP1 protein expression was found to be significantly lower in liver cancer tissue (32.3%, 21/65) than that in paraneoplastic tissues (85.7%, 30/35, $\chi^2=26.118, P<0.001$). Western blot: The relative amount of EMP1 protein in liver cancer tissue (0.257 ± 0.022) was found to be significantly lower than that in paraneoplastic tissues ($0.863 \pm 0.086, t=11.824, P<0.001$). The level of EMP1 protein expression was not correlated with gender, age, T stages and pathological types ($P>0.05$), but it was correlated with lymph node metastasis, clinic stage, histological grade and blood metastasis ($P<0.05$). The results of biological function shown that HepG2 cell transfected EMP1 had a lower survival fraction, higher cell apoptosis, and significant decrease in migration and invasion, and higher Caspase-9 and lower VEGFC protein expression compared with HepG2 cell untransfected EMP1 ($P<0.05$). **CONCLUSION** EMP1 expression decreased in liver cancer, suggesting that EMP1 may play important roles as negative regulator to liver cancer HepG2 cell by promoting degradation of Caspase-9, VEGFC.

【通讯作者简介】 孙国贵,男,河北唐山人,博士后,副主任医师,主要从事恶性肿瘤放疗及化学治疗的研究工作。

E-mail: guogui-sun2013@163.com

【KEYWORDS】 EMP1; liver carcinoma; gene transfection; tumor metastasis

Chin J Cancer Prev Treat, 2015, 22(8): 604-609

【中图分类号】 R735.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5269(2015)08-0604-06

近年来研究发现,上皮膜蛋白(epithelial membrane protein-1, EMP1)在食管癌中表现出的生物学特征具有肿瘤抑癌基因的特性,由此推测 EMP1 在肿瘤的形成和发展中具有重要作用^[1]。本研究采用免疫组织化学法、蛋白质印迹法检测 EMP1 在肝癌组织中的表达情况,并通过改变 EMP1 表达含量的方法来分析其对肝癌细胞生物学行为的影响,以期为肝癌的发病病因与临床治疗找到新的基因靶点。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集唐山市人民医院 2008-01-01-2012-12-30 手术切除 65 例新鲜肝癌组织标本及 35 例距肿瘤边缘 ≥ 2 cm(镜下未见癌)的癌旁肝脏组织作为对照。65 例患者,男 49 例,女 16 例。年龄 26~74 岁,中位年龄 43 岁。 ≤ 45 岁者 46 例, > 45 岁者 19 例。参照 2002 年 UICC 肝癌诊断与分期标准,肝细胞型 45 例,胆管细胞型 15 例,混合型 5 例;肿瘤直径 $T_1 + T_2$ 21 例, $T_3 + T_4$ 44 例;无淋巴结转移 24 例,有转移 41 例;临床分期 I + II 期 18 例,III + IV 47 例;组织分级 I 17 例,II~III 48 例;有血行转移者 45 例,无血行转移者 20 例。所有患者术前均未经放、化疗,标本均为术后立即取材,于液氮中保存,供免疫组织化学及蛋白质印迹法检测。

1.2 主要试剂

EMP1、血管内皮生长因子-C(Vascular endothelial growth factor C, VEGFC)兔抗人多克隆抗体(Abcam Inc., USA)。Caspase-9 及基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)兔抗人单克隆抗体购自美国 Abcam Inc. 公司, β -actin 鼠抗人单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司,pMD-18T 质粒购自 Takara 公司。pDONR221、线性 attB 表达克隆、 $5 \times$ BP Clonase Reaction Buffer、BP Clonase enzyme mix、 $5 \times$ LR Clonase Reaction Buffer、LR Clonase enzyme mix plenti6/V5-DEST 表达质粒、包装质粒 ViraPower Lentiviral Packaging Mix 和 Opti-MEM、LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司。RNAT-*Trizol* 提取试剂盒购自中国索莱宝公司,Superscript III 逆转录试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 免疫组织化学

将 4 μ m 石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢 10 min

阻断内源性过氧化物酶,胰酶修复 20 min,10%山羊血清室温封闭 20 min,EMP1 抗体(1:100)湿盒中 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,滴加二抗、三抗室温湿盒内孵育各 20 min,DAB 显色,苏木精复染,常规脱水,封片。

1.4 结果判定标准

细胞计数在显微镜下,每张切片上随机选择 5 个视野,每个标本计数 3 张切片。EMP1 表达以细胞阳性百分率及细胞染色强度得分之和进行判定。细胞阳性百分率分为 4 个等级: $\leq 5\%$ 为 0 分, $> 5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $> 25\% \sim 50\%$ 为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分;细胞染色强度分数标准:无染色为 0 分,弱染色(浅黄色)为 1 分,中等染色(黄褐色)为 2 分,强染色(棕黄色)为 3 分。两项标准相加:0 分为阴性(-),1~6 分为阳性;包括 1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.5 蛋白质印迹法检测

提取肝癌组织及 HepG2 细胞总蛋白。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 20 min ($r = 8.5$ cm),取上清,-20 $^{\circ}$ C 备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,稳压冰浴电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 h,一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜(EMP1 1:1 000, MMP-9 1:1 000; β -actin 1:5 000),兔抗人红外荧光标记二抗(1:20 000),Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测,计算蛋白相对值。

$$\text{相对值} = \frac{\text{蛋白 A 值}}{\text{GAPDH A 值}}$$

1.6 建立 EMP1 过量表达的细胞株

人肝癌 HepG2 细胞置于直径 10 cm 的培养皿中,用含 10%胎牛血清的 1640 培养液,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,细胞密度达到 60%~70%时进行实验。设 3 孔,分别加入 1 mL 含有 EMP1 基因的 pLenti6-EMP1 质粒的病毒液及 1 mL 含有 plenti6/V5-DEST 对照质粒的病毒液,继续培养 24 h,更换培养基后加入抗生素 Blastidicin(5 μ g/mL)进行筛选。10 d 后挑取克隆接种到 24 孔板中,细胞长满后扩大培养,筛选出 pLenti6/HepG2、pLenti6-EMP1/HepG2 细胞稳定转染株,分别命名为 LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞。

1.7 实时荧光定量 PCR

按 *Trizol* 和反转录试剂说明书要求提取 LeEmp-

ty 细胞、LeEMP1 细胞中总 RNA,反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板行 PCR 扩增。EMP1 基因上游引物为 5'-CCCTCCTGGTCTTCGTGT-3',下游引物为 5'-AATAGCCGTGGTGATA-3'; β -actin 为内参照,上游引物为 5'-ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA-3',下游引物为 5'-AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT-3'。PCR 反应条件:预变性 95 °C 3 min;变性 95 °C 60 s,退火 95 °C 15 s,延伸 60 °C 60 s,35 个循环。

1.8 MTT 实验

取接种密度 70%~80% LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞,按 5 000 个/孔细胞,每孔体积 200 μ L 接种于 96 孔培养板内。分别于 24、48、72 和 96 h 分别终止培养。终止培养前 4 h,加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4 h,除去每孔中培养基,加入 DMSO 200 μ L/孔,振荡至结晶溶解。全自动酶标仪检测各孔吸光度 A 值,检测波长 490 nm,参考波长 620 nm。实验结果重复 3 次。

$$\text{肿瘤细胞存活率(\%)} = \frac{\text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

1.9 细胞凋亡实验

取接种密度 70%~80% LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞。消化、收集细胞,用 4 °C 预冷的 PBS 洗细胞 2 次,以 1 mL 结合缓冲液重新悬浮细胞,使其浓度为 1×10^6 ,将 100 μ L 的细胞悬液加入 5 mL 流式管中,每管加入 10 μ L 的碘化丙啶,避光均匀 15 min,采用流式细胞仪上机检测。实验结果重复 3 次。

1.10 Transwell 细胞迁移实验

聚碳酸脂微孔滤膜上铺 Matrigel 凝胶(8.4 g/L) 50 μ L,LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞均以无血清培养基制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液;各取 50 μ L 移入小室,下室加入 800 μ L 10% 1640 完全培养基;培养 13 h 后,用棉签刮除滤膜上室面的细胞,侵袭并黏附至下室面的细胞以 4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色 20 min。每张膜中央部分和周围部分各随机取 5 个视野。计数每个视野内穿过 8 μ m 微孔的细胞数,以每个视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。实验结果重复 3 次。

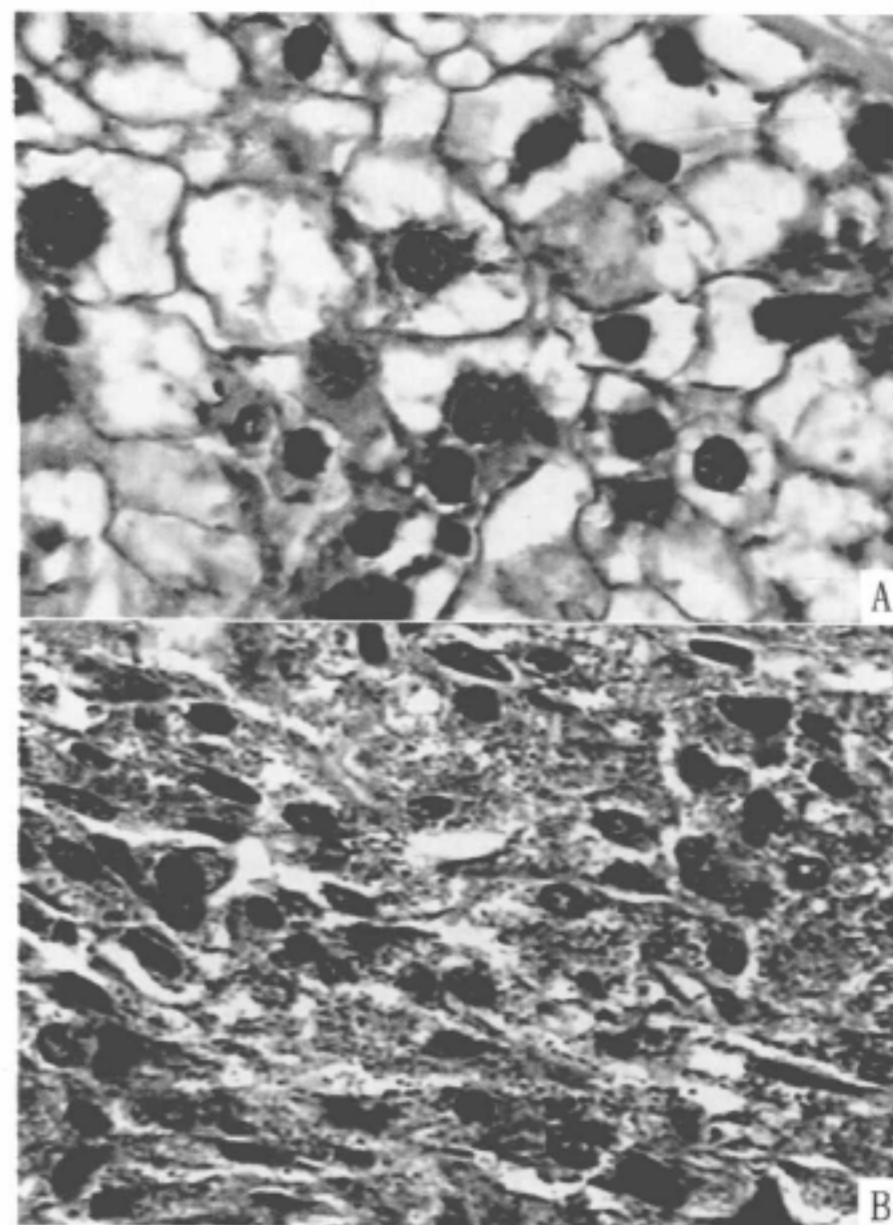
1.11 统计学方法

采用 SPSS 16.0 进行统计学分析,所有均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示。临床组织样本之间率的比较采用 χ^2 检验,定量数据经 Shapiro-Wilk 检验,各项观察指标符合正态分布,组间均值差异比较采用独立样本的 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 肝癌组织中 EMP1 的表达

免疫组织化学结果表明,EMP1 主要定位于细胞质,阳性表达主要为染成浅黄色、黄褐色或棕黄色(图 1)。EMP1 在肝癌组织和癌旁肝组织的阳性表达率分别为 32.3% (21/65) 及 85.7% (30/35),差异有统计学意义, $\chi^2 = 26.118, P < 0.001$ 。蛋白质印迹法检测结果如图 2 所示,EMP1 蛋白在肝癌组织的表达量为 0.257 ± 0.022 ,明显低于癌旁肝组织的相对表达量(0.863 ± 0.086),两组比较差异有统计学意义, $t = 11.824, P < 0.001$ 。



注:A. 肝癌组织;B. 癌旁肝组织

图 1 EMP1 在肝癌组织及癌旁肝组织中的表达(SP $\times 400$)

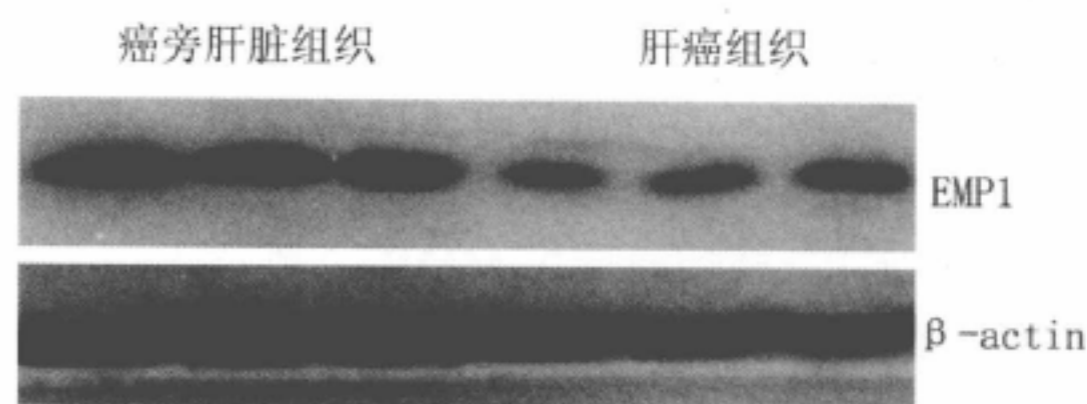


图 2 蛋白质印迹法检测 EMP1 在肝癌组织及癌旁肝组织中的表达

2.2 EMP1 与肝癌临床病理参数的关系

表 2 所示,EMP1 蛋白在肝癌有无淋巴结转移、临床分期、组织分级以及血行转移中的表达差异有统计学意义, $P < 0.05$;而与肝癌患者性别、年龄及病理分型及 T 分期无关, P 值均 > 0.05 。

2.3 稳定转染肝癌细胞中 EMP1 过量表达的鉴定

qRT-PCR 结果显示,EMP1 mRNA 在 LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞中的相对表达量分别为 $0.186 \pm$

0.021、 0.912 ± 0.121 ，两细胞之间比较差异有统计学意义， $t=10.708, P<0.001$ 。蛋白质印迹法检测结果如图 3 所示，EMP1 蛋白相对表达量分别为 0.135 ± 0.016 、 0.933 ± 0.092 ，两细胞比较差异有统计学意义， $t=10.797, P<0.001$ 。

表 2 EMP1 表达与肝癌临床参数的关系

组别	n	EMP1 蛋白的表达		χ^2 值	P 值
		-	+~++++		
性别					
男	49	35	14	1.271	0.260
女	16	9	7		
年龄(岁)					
≤45	46	33	13	1.178	0.278
>45	19	11	8		
病理分型					
肝细胞型	45	31	14	0.799	0.671
胆管型	15	9	6		
混合型	5	4	1		
肿瘤浸润					
T ₁ +T ₂	21	12	9	1.579	0.209
T ₃ +T ₄	44	32	12		
淋巴结转移					
无	24	11	13	5.123	0.024
有	41	33	8		
临床分期					
I~II	18	8	10	6.152	0.013
III~IV	47	36	11		
组织分级					
I	17	7	10	7.401	0.007
II~III	48	37	11		
血行转移					
有	45	36	9	10.130	0.001
无	20	8	12		

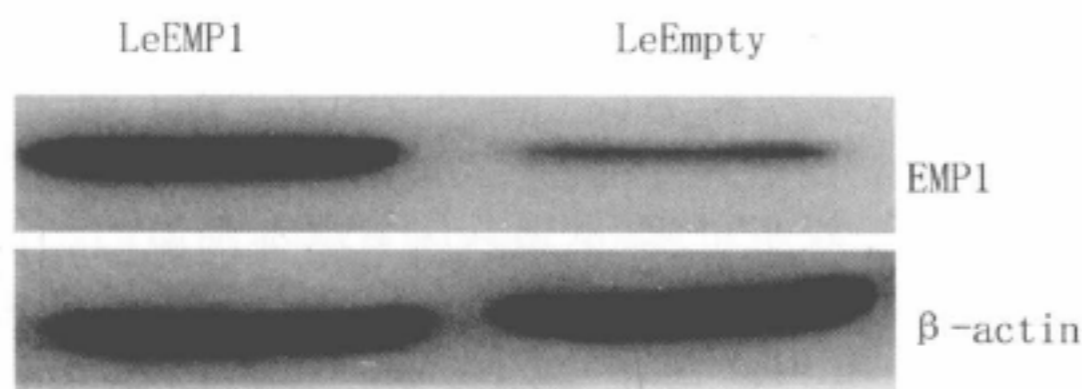


图 3 蛋白质印迹法检测 EMP1 蛋白的表达

2.4 对 HepG2 细胞株增殖的影响

MTT 检测结果如图 4 所示，细胞接种培养 24、48、72 和 96 h，与 LeEmpty 细胞的细胞存活率相比，LeEMP1 细胞的存活率下调，分别为 $(63.5 \pm 3.7)\%$ 、 $(58.2 \pm 6.6)\%$ 、 $(62.8 \pm 11.7)\%$ 和 $(64.8 \pm 13.6)\%$ ，两组细胞存活率在各时间点之间比较，差异有统计学意义， $P<0.05$ 。

2.5 对 HepG2 细胞株凋亡的影响

如图 5 所示，LeEmpty 早期细胞的凋亡数为 $(2.9 \pm 0.6)\%$ ，LeEMP1 早期细胞凋亡数为 $(16.9 \pm$

$1.7)\%$ ，两组细胞早期凋亡数比较差异有统计学意义， $t=13.451, P<0.001$ 。

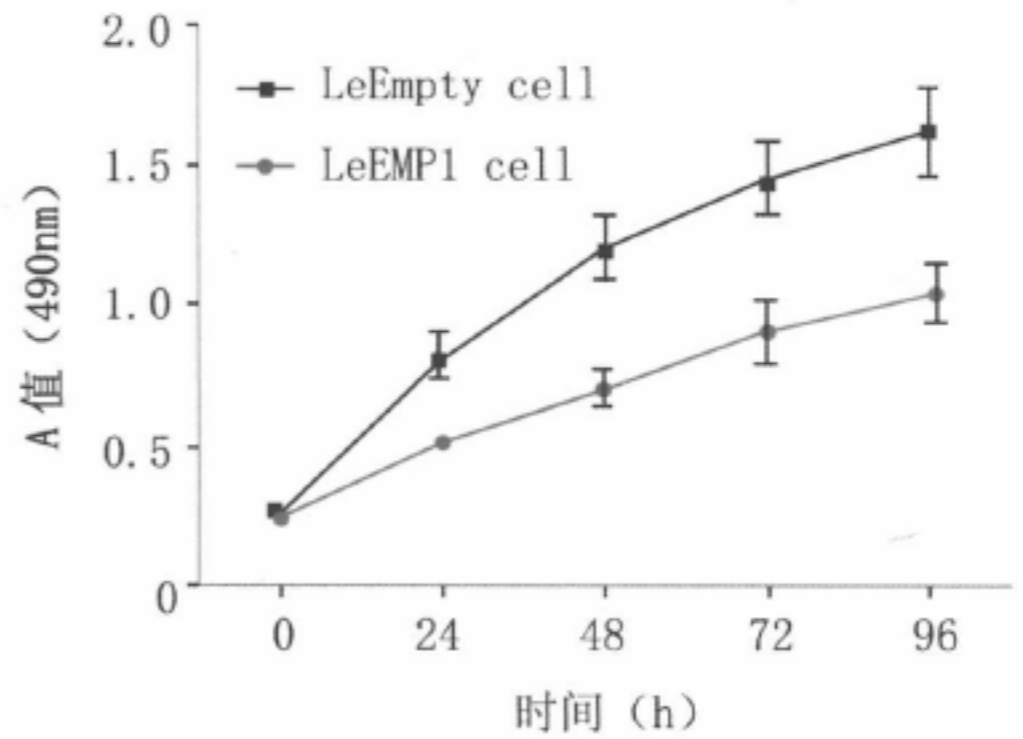


图 4 MTT 检测 EMP1 转染对 HepG2 细胞存活率的影响

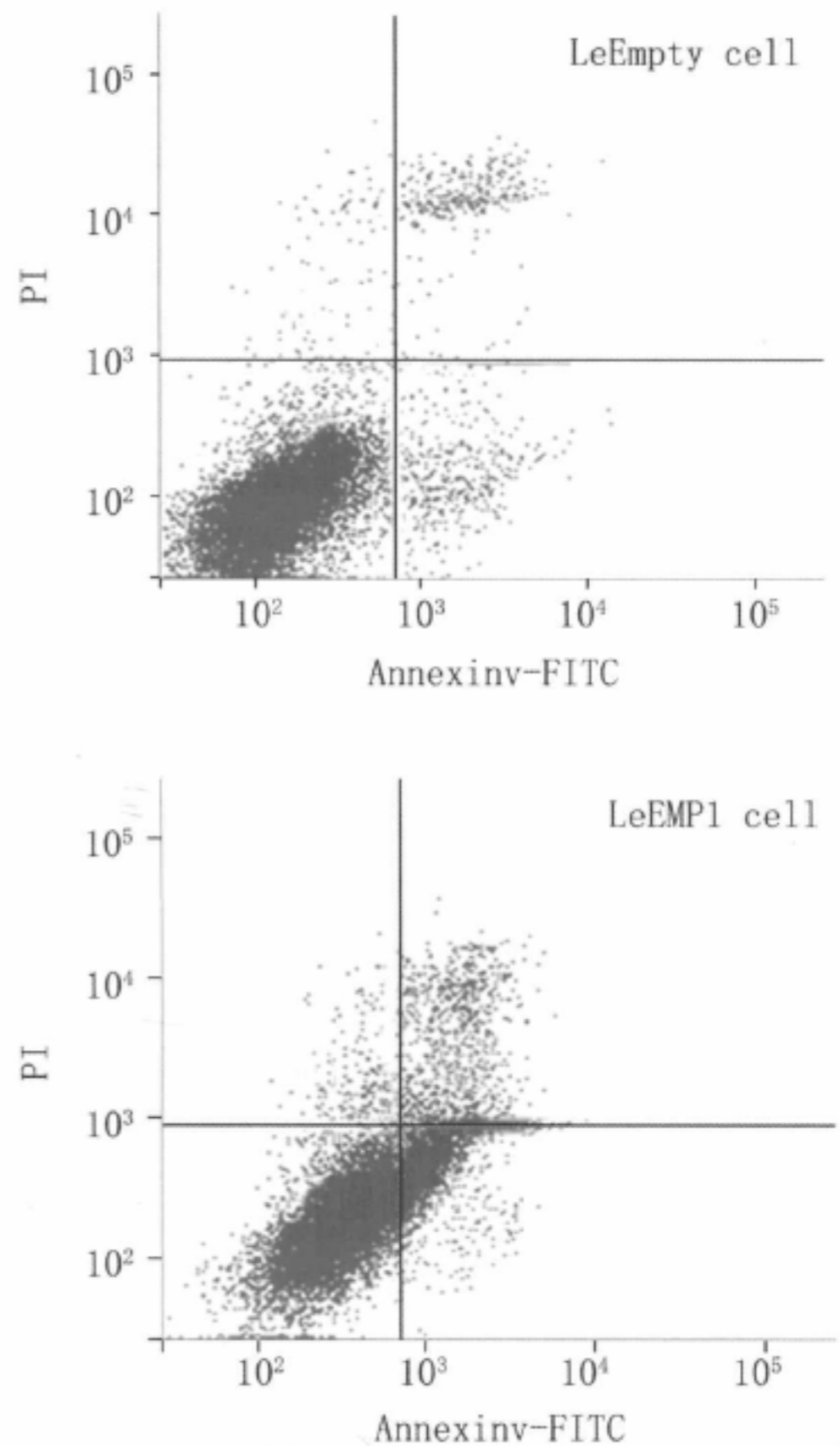


图 5 流式细胞术检测 EMP1 转染对 HepG2 细胞株凋亡的影响

2.6 对 HepG2 细胞株侵袭转移的影响

Transwell 侵袭实验结果表明，LeEmpty 细胞的穿膜数为 123.0 ± 22.0 ，LeEMP1 细胞的细胞的穿膜数为 77.0 ± 13.0 ，两组比较差异有统计学意义， $t=$

3.183, $P=0.033$ (图 6)。Transwell 转移实验结果如图 6 所示, LeEmpty 细胞的穿膜数为 113.0 ± 14.0 ,

LeEMP1 细胞的细胞的穿膜数为 62.0 ± 11.0 , 两组细胞比较差异有统计学意义, $t=4.961, P=0.008$ 。

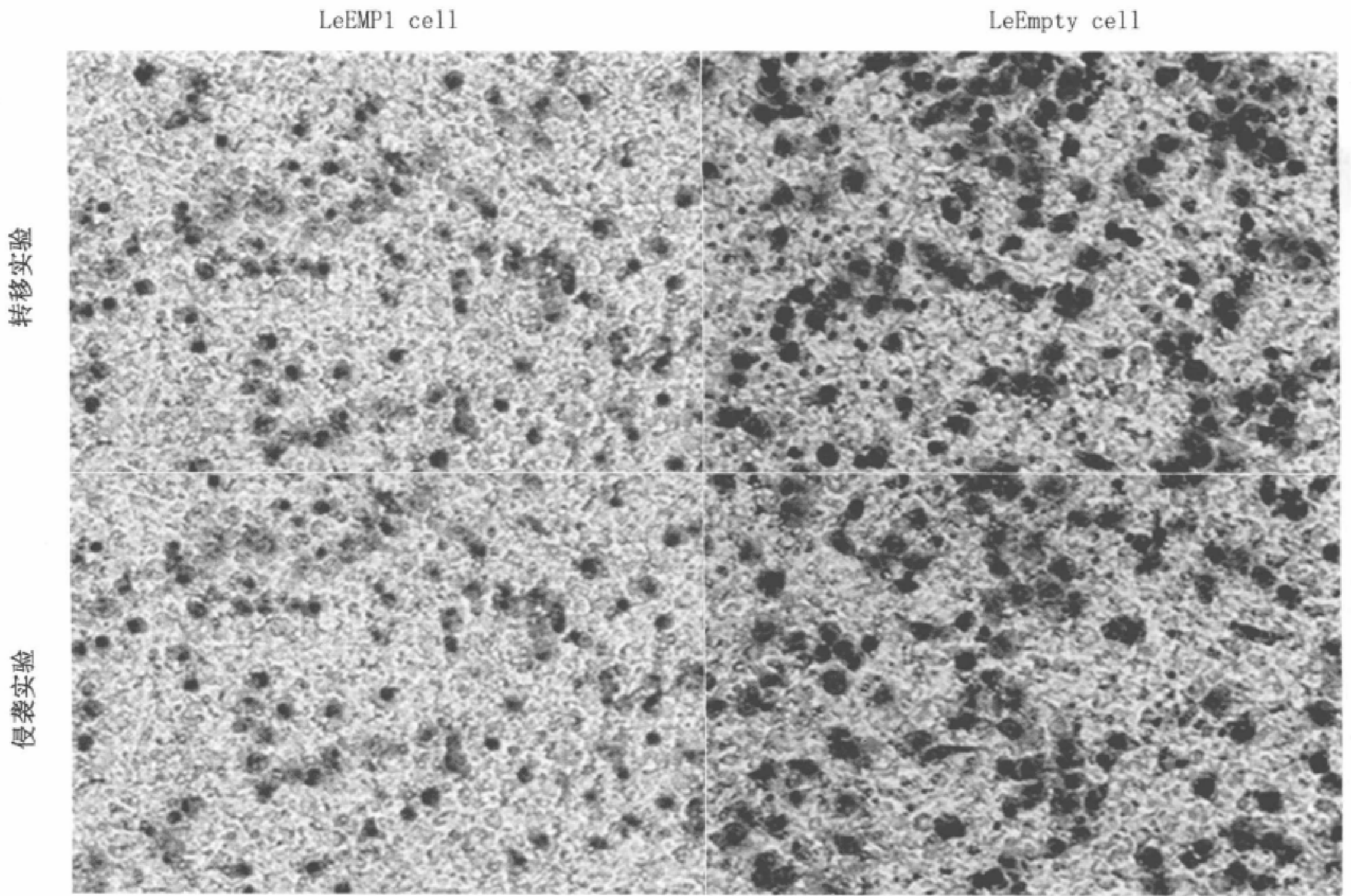


图 6 Transwell 检测 EMP1 转染对 Hep2 细胞侵袭转移的影响($\times 100$)

2.7 对 Caspase-9 和 VEGFC 蛋白表达的影响

图 7 蛋白质印迹法检测结果显示, EMP1 转染后, LeEmpty 细胞中 Caspase-9 蛋白表达的相对表达量为 0.231 ± 0.029 , LeEMP1 细胞中 Caspase-9 蛋白表达的相对量为 0.764 ± 0.073 , 两细胞之间比较差异有统计学意义, $t=11.753, P<0.001$ 。EMP1 转染后, LeEmpty 细胞中 VEGFC 蛋白表达的相对表达量为 0.663 ± 0.065 , LeEMP1 细胞中 VEGFC 蛋白表达的相对量为 0.185 ± 0.022 , 两细胞之间比较差异有统计学意义, $t=12.065, P<0.001$ 。

3 讨论

EMP1 基因是 1995 年由瑞士学者 Taylor 等^[2]从胎鼠肠 cDNA 文库中克隆出并命名的, 其编码 4 个跨膜结构域, 相对分子质量约 18×10^3 。EMP1 约由 160 个氨基酸残基组成, 依据其所含疏水基团的不同又分为 EMP1、EMP2 和 EMP3 等亚种, 同时认为 EMP1 与周围髓磷脂蛋 22 (peripheral myelin protein22, PMP22), 同属于一类生物学功能特异的蛋白家族, 约有 40% 与 PMP22 具有高度同源性^[3-4]。PMP22 主要集中于周围神经系统的神经膜细胞中, 参与神经膜细胞的生长和分化, 而 EMP1 在神经元的分化及轴突的生长方面也起到了一定的作用^[5]。随后又有研究表明, 在未分化的胚胎干细胞中发现 EMP1 高表达, 在已分化成体细胞的组织中低表达, 延长了神经膜细胞的 G~S+G₂/M 期的进程, 并认为这类膜糖蛋白家族与细胞增殖、分化密切相关^[6]。

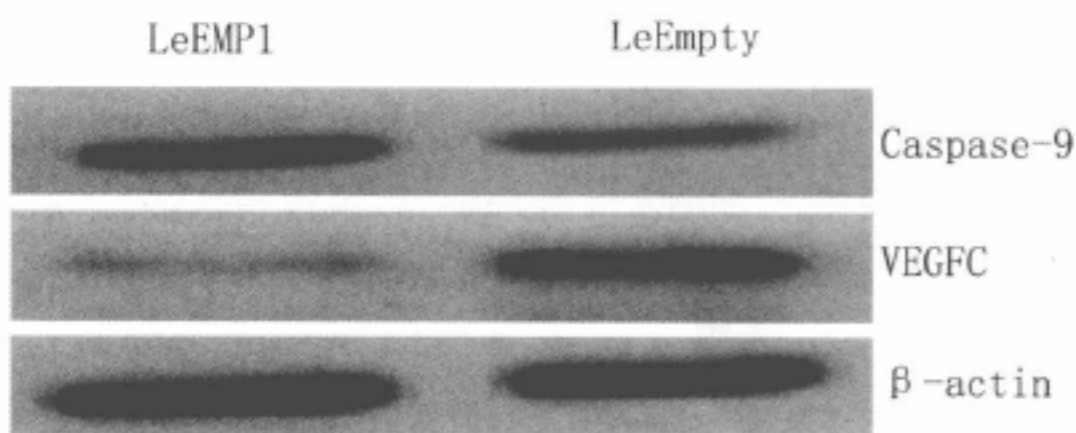


图 7 蛋白质印迹法检测 EMP1 转染对 HepG2 细胞中 Caspase-9 和 VEGFC 蛋白表达的影响

本研究结果显示, EMP1 蛋白在肝癌组织中的表达水平均显著低于癌旁组织。单因素分析也显示, EMP1 蛋白的表达水平与肝癌组织有无淋巴结转移、

临床分期及分化程度有关,而与肝癌患者性别、年龄、病理类型及 T 分期无关。Gnirke 等^[7]观察几种有不同转移特点的人乳腺癌细胞发现,该基因表达与细胞的浸润和转移特性有关。Wang 等研究^[8]认为,EMP1 基因可能是参与细胞信号传导、细胞通信及黏附调节的调节因子之一。Zhang 等^[9]研究发现,口腔鳞癌组织中的 EMP1 基因表达下调,且其下调与淋巴结转移有关。Sun 等^[10]研究发现,EMP1 蛋白在鼻咽癌组织中的表达水平均显著低于正常组织,且 EMP1 蛋白的表达水平与鼻咽癌组织有无淋巴结转移、临床分期及分化程度有关。

本研究进一步体外实验发现,EMP1 高表达的肝癌细胞其增殖能力明显减弱、细胞凋亡明显升高,细胞侵袭转移能力明显减弱,Caspase-9 蛋白的表达量明显上调,VEGFC 蛋白表达下调。Wang 等^[8]将 EMP1 转入食管癌细胞系,发现食管癌细胞生长减慢,S 期细胞减少,G₁ 期细胞增多,从而表明 EMP1 可能与食管癌发生有关。线粒体是细胞生命活动控制中心,它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心,而且是细胞凋亡调控中心。实验证明,细胞色素 c 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤^[11-12]。从线粒体释放到细胞质的细胞色素 c 在 dNTP 存在的条件下能与凋亡相关因子(apoptotic protease activating factor, Apaf-1)结合,使其形成多聚体,并与 Caspase-9 酶原结合形成凋亡小体复合物,诱导两个 Caspase-9 酶原合并,结果 Caspase-9 自身激活,活化的 Caspase-9 能激活其他的 Caspase,如 Caspase-3 和 Caspase-7 依次激活下游的 Caspase,通过信号级联放大诱导凋亡^[13-14]。VEGF 是血小板源性生长因子(PDGF)家族的一个成员,是肿瘤血管生成过程中最重要的血管内皮生长刺激因子。VEGFC 是近年来发现的 VEGF 家族新成员,可以促进内皮细胞增殖,增加血管通透性,是肿瘤血管生成及浸润转移的关键因素^[15]。本研究中发现转入 EMP1 基因后,VEGFC 的表达量明显下调,提示 EMP1 可通过抑制 VEGFC 来抑制肿瘤的血管生成,进而抑制肿瘤转移的过程。

总之,本研究结果提示,肝癌组织中 EMP1 的蛋白表达水平明显降低,且与肝癌淋巴结转移、临床分期及细胞分化有关。EMP1 可能通过调控 Caspase-9 及 VEGFC 蛋白表达影响肝癌细胞增殖、凋亡与转移。

参考文献

- [1] Wang HT, Kong JP, Ding F, et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 392-398.
- [2] Taylor V, Welcher AA, Program AE, et al. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family [J]. J Biol Chem, 1995, 270(48): 28824-28833.
- [3] 张立新, 张洁, 马小兵, 等. 食管鳞癌组织中 EMP1 蛋白的表达及意义 [J]. 肿瘤学杂志, 2014, 20(7): 603-605.
- [4] Sun GG, Wang YD, Lu YF, et al. EMP1, a member of a new family of antiproliferative genes in breast carcinoma [J]. Tumour Biol, 2014, 35(4): 3341-3354.
- [5] Sun GG, Wang YD, Cui DW, et al. Epithelial membrane protein 1 negatively regulates cell growth and metastasis in colorectal carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(14): 4001-4010.
- [6] Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, et al. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells; modulation of cell growth [J]. EMBO J, 1995, 14(6): 1122-1128.
- [7] Gnirke AU, Weidle UH. Investigation of prevalence and regulation of expression of progression associated protein (PAP) [J]. Anticancer Res, 1998, 18(6A): 4363-4369.
- [8] Wang HT, Kong JP, Ding F, et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 392-398.
- [9] Zhang J, Cao W, Xu Q, et al. The expression of EMP1 is down-regulated in oral squamous cell carcinoma and possibly associated with tumour metastasis [J]. J Clin Pathol, 2011, 64(1): 25-29.
- [10] Sun GG, Lu YF, Fu ZZ, et al. EMP1 inhibits nasopharyngeal cancer cell growth and metastasis through induction apoptosis and angiogenesis [J]. Tumour Biol, 2014, 35(4): 3185-3193.
- [11] Fu L, Chen W, Guo W, et al. Berberine Targets AP-2/hTERT, NF-κB/COX-2, HIF-1α/VEGF and cytochrome-c/Caspase signaling to suppress human cancer cell growth [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e69240.
- [12] Sen S, Kawahara B, Chaudhuri G. Mitochondrial-associated nitric oxide synthase activity inhibits cytochrome c oxidase; implications for breast Cancer [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 57(4): 210-220.
- [13] Zhang JM, Wang HC, Wang HX, et al. Oxidative stress and activities of caspase-8, -9, and -3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013, 166(1): 52-55.
- [14] Peng J, Shao N, Peng H, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in esophageal carcinoma: a meta-analysis [J]. J BUON, 2013, 18(2): 398-406.
- [15] Xie LX, Zhai TT, Yang LP, et al. Lymphangiogenesis and prognostic significance of vascular endothelial growth factor C in gastro-oesophageal junction adenocarcinoma [J]. Int J Exp Pathol, 2013, 94(1): 39-46.

收稿日期: 2014-12-27 修回日期: 2015-01-10

(编辑: 杨靖)

[1] Wang HT, Kong JP, Ding F, et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA