

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.007

过表达上皮膜蛋白 1 对结直肠癌 SW-480 细胞生物学行为的影响及其可能的机制

孙国贵¹, 刘青², 杨从容², 张钧² (1. 唐山市人民医院 放化疗科, 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 1 (epithelial membrane protein-1, EMP1) 在人结直肠癌 (colorectal carcinoma, CRC) 组织中的表达水平及其过表达对 CRC SW-480 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。**方法:**免疫组织化学、Western blotting 方法检测 63 例 CRC 组织及 31 例癌旁组织中 EMP1 的表达水平, 分析 EMP1 表达与 CRC 临床病理参数的关系。慢病毒介导将 pLenti6-EMP1 质粒转染 SW-480 细胞, 建立 EMP1 过表达细胞, 转染 pLenti6/V5-DEST 空白质粒为对照。Real-time PCR 及 Western blotting 检测转染后 SW-480 细胞株中 EMP1 的表达, MTT、流式细胞术及 Transwell 实验分别检测 EMP1 过表达对 SW-480 细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响。**结果:**EMP1 蛋白在人 CRC 组织的表达显著低于癌旁组织 (0.257 ± 0.022 vs 0.863 ± 0.086 , $P < 0.05$), 并且其表达水平在不同 T 分期、有无淋巴结转移、临床分期以及组织分级组间表达有显著差异 ($P < 0.05$), 而与患者年龄、性别、肿瘤部位无关 ($P > 0.05$)。成功构建 EMP1 过表达的 LeEMP1 细胞。与 LeEmpty 细胞相比, LeEMP1 细胞的增殖能力显著下降 [$(60.94 \pm 4.04)\%$ vs $(100.00 \pm 0.00)\%$, $P < 0.05$], 凋亡率显著升高 [$(12.10 \pm 1.30)\%$ vs $(3.10 \pm 0.60)\%$, $P < 0.05$], 侵袭转移能力显著降低 [穿膜细胞数: (87.00 ± 12.00) vs (178.00 ± 21.00) 个, $P < 0.05$]。LeEMP1 细胞 Caspase-9 表达显著高于 LeEmpty 细胞 (0.764 ± 0.073 vs 0.231 ± 0.029 , $P < 0.05$), VEGFC 表达显著降低 (0.185 ± 0.022 vs 0.663 ± 0.065 , $P < 0.05$)。**结论:**人 CRC 组织中 EMP1 蛋白表达明显减低, 过表达 EMP1 能够抑制 CRC SW-480 细胞的恶性生物学行为, 其可能通过调控 Caspase-9 和 VEGFC 的表达来发挥作用。

[关键词] 上皮膜蛋白 1; 结直肠肿瘤; SW-480 细胞; 基因转染; 肿瘤转移

[中图分类号] R735.3; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0396-06

Putative role of epithelial membrane protein-1 in the pathogenesis of colorectal carcinoma

Sun Guogui¹, Liu Qing², Yang Congrong², Zhang Jun² (1. Department of Chemoradiotherapy, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China; 2. Department of Radiotherapy, Hebei Medical University Affiliated Fourth Hospital, Shijiazhuang 050017, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the putative involvement of epithelial membrane protein-1 (EMP1) in the pathogenesis of colorectal carcinoma (CRC). **Methods:** Tumor ($n = 63$) and peri-tumor ($n = 31$) tissue specimens were collected from 63 patients with CRC. EMP1 protein content in these specimens was assessed by immunohistochemistry and Western blotting. The relationship between EMP1 protein content in the tumor tissue and the pathologic grade of the lesions was analyzed. To further evaluate the putative role for EMP1 in the development of CRC, we also performed analysis *in vitro*. To this end, CRC SW-480 cells were transfected with an EMP1 lentiviral vector pLenti6-EMP1 or a control vector pLenti6/V5-DEST. EMP1 mRNA abundance and protein content in transfected cells were determined by quantitative real-time PCR and Western blotting respectively. Effects of EMP1 overexpression on the proliferation, apoptosis and invasion of SW-480 cells were evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, flow cytometry (FCM) and transwell invasion assays, respectively. **Results:** EMP1 protein content was significantly lower in CRC tissue than in peritumor tissues ($P <$

[作者简介] 孙国贵 (1980 -), 男, 河北省唐山市人, 博士, 副主任医师, 主要从事腹部肿瘤的基础及临床研究

[通信作者] 孙国贵 (Sun Guogui, corresponding author), E-mail: suogui_sun2013@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.007.html>

0.05). The level of EMP1 protein was not correlated with gender, age, and tumor location ($P > 0.05$) but was positively correlated with lymph node metastasis, clinic stage and histological grade of the lesions ($P < 0.05$). Compared with SW-480 cells transfected with the control vector, SW-480 cells overexpressing *EMP1* had a lower survival fraction ($[60.94 \pm 4.04]\%$ vs $[100.00 \pm 0.00]\%$, $P < 0.05$), a higher cell apoptosis rate ($[12.10 \pm 1.30]\%$ vs $[3.10 \pm 0.60]\%$, $P < 0.05$), a decreased invasive capacity ($[178.00 \pm 21.00]$ vs $[87.00 \pm 12.00]$, $P < 0.05$), higher caspase-9 protein content (0.764 ± 0.073 vs 0.231 ± 0.029 , $P < 0.05$) and lower VEGFC protein content (0.663 ± 0.065 vs 0.185 ± 0.022 , $P < 0.05$). **Conclusion:** EMP1 protein content is significantly lower in the CRC tissue than in the non-CRC tissue. Overexpression of *EMP1* in CRC cells in vitro results in a significant inhibition of invasive activity through regulating the expression of caspase-9 and VEGF-C. These findings suggest that *EMP1* is involved in the pathogenesis of colorectal carcinoma.

[Key words] epithelial membrane protein-1; colorectal carcinoma; SW-480 cell; gene transfection; tumor metastasis
[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 396-401]

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是消化系统较常见的恶性肿瘤之一,目前其主要治疗手段为手术治疗,而生物学治疗手段急需提高疗效。因此分析CRC的生物学特性,探索其发病病因与治疗的新途径成为临床关注的问题。近年研究发现,上皮膜蛋白(epithelial membrane protein-1, EMP1)在食管癌等肿瘤中表现出的生物学和遗传学特征具有肿瘤抑癌基因的特性^[1-3],由此推测EMP1在肿瘤的形成和发展中具有重要作用^[4-6]。本研究探讨EMP1在人CRC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CRC细胞生物学行为的影响,以期对CRC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 材料

收集唐山市人民医院、河北医科大学第四人民医院2008年1月至12月间手术切除的63例新鲜CRC组织标本,并收集31例距肿瘤边缘2 cm以上(镜下未见癌浸润)的癌旁组织作为对照。其中男性37例,女性26例;中位年龄54岁(31~78岁), ≤ 60 岁者46例, > 60 岁者17例;肿瘤部位位于直肠者28例,结肠者35例;根据2002年美国肿瘤研究联合会直肠癌TNM分期标准,其中肿瘤直径T1+T2者27例,T3+T4者36例;淋巴结转移中N0者28例,N+者35例;临床分期I+II期25例,III+IV期38例;组织分级I级者20例,II~III级者43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Western blotting检测。

1.2 主要试剂

EMP1、VEGFC兔抗人多克隆抗体和Caspase-9

兔抗人单克隆抗体均购自Abcam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、慢病毒plenti6/V5-DEST表达质粒、LipofectamineTM 2000均购自Invitrogen公司。TRIzol RNA提取试剂盒购自索莱宝公司,SuperScript[®] III逆转录试剂盒购自Invitrogen公司。

1.3 免疫组织化学染色检测EMP1在CRC组织中的表达

将4 μ m石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢处理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,加入EMP1抗体(1:100)后置入湿盒中,4 $^{\circ}$ C过夜,滴加二抗、三抗,置湿盒内于室温下孵育各20 min,DAB显色,苏木精复染,常规脱水,封片^[7]。显微镜下计数细胞,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: $< 5\%$ 计0分,5%~25%计1分,26%~50%计2分, $> 50\%$ 计3分;细胞染色强度评分标准:无染色记0分,弱染色(浅黄色)计1分,中等染色(黄褐色)计2分,强染色(棕黄色)计3分。两项评分相加:0分为阴性(-),1~6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。

1.4 Western blotting检测EMP1在CRC组织中的表达

提取CRC组织及SW-480细胞总蛋白^[8],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,稳压冰浴电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h,加入一抗孵育4 $^{\circ}$ C过夜

(EMP1 抗体 1:1 000, MMP-9 抗体 1:1 000; β -actin 抗体 1:5 000), 加入兔抗人红外荧光标记的二抗 (1:20 000)。Odyssey 双色红外荧光扫描系统检测各条带光密度 (D) 值。EMP1 相对表达量 = DEMPI/DGAPDH。实验重复 3 次。分析 EMP1 表达与 CRC 临床病理参数的关系。

1.5 慢病毒介导 pLenti6-EMP1 转染 SW-480 细胞

SW-480 细胞常规培养于直径 10 cm 的培养皿中, 细胞密度达到 60% ~ 70% 时进行实验。设 3 孔, 分别加入 1 ml pLenti6-EMP1 和 pLenti6/V5-DEST 病毒液, 继续培养 24 h, 更换培养基后加入抗生素杀稻瘟素 (5 μ g/ml) 进行筛选。10 d 后挑取克隆接种到 24 孔板中, 细胞长满后细胞扩大培养, 筛选出 pLenti6/SW-480、pLenti6-EMP1/SW-480 细胞稳定转染株, 分别命名为 LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞。

1.6 Real-time PCR 检测 EMP1 在 LeEmpty、LeEMP1 细胞中的表达

按 TRIzol 试剂说明书提取 LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞中总 RNA, 按逆转录试剂盒说明将其逆转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板行 PCR 扩增^[9]。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'-AGCCATGCCAATCTGATCTTGT-3'。PCR 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 60 s, 退火 95 $^{\circ}$ C 15 s, 延伸 60 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环。按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量计算公式, 计算出各样品的目的基因相对定量结果, 即 $F = (\text{待测组目的基因平均 CT 值} - \text{待测组管家基因平均 CT 值}) - (\text{对照组目的基因平均 CT 值} - \text{对照组管家基因平均 CT 值})$ 。实验重复 3 次。

1.7 MTT 法检测过表达 EMP1 对 SW-480 细胞增殖的影响

取接种密度 70% ~ 80% LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞, 按 5 000 个/孔接种于 96 孔培养板内, 每孔接种 200 μ l。分别于 24、48、72、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^[10]。全自动酶标仪检测各孔光密度 (D) 值, 检测波长 490 nm, 参考波长 620 nm。肿瘤细胞存活率 (%) = 实验组 D /对照组 D \times 100%。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测过表达 EMP1 对 SW-480 细胞凋亡的影响

取接种密度 70% ~ 80% LeEmpty 细胞、Le-

EMP1 细胞, 消化、收集细胞, 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗 2 次, 加入 1 ml 结合缓冲液重悬细胞, 使其密度为 1×10^6 /ml, 取 100 μ l 的细胞悬液加入 5 ml 流式管中, 每管加入 10 μ l PI, 避光放置 15 min, 流式细胞仪检测凋亡率。实验重复 3 次。

1.9 Transwell 实验检测过表达 EMP1 对 SW-480 细胞侵袭能力的影响

聚碳酸酯微孔滤膜上铺 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 100 μ l 细胞悬液加入上室, 下室加入 800 μ l 10% 1640 完全培养基。12 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^[11]。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。临床组织样本之间率的比较采用 χ^2 检验, EMP1 蛋白表达量的比较采用 One-Way ANOVA 分析; LeEmpty 细胞、LeEMP1 细胞之间比较采用 Independent-Samples t 或 One-Way ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMP1 在 CRC 组织中的表达

免疫组织化学检测结果 (图 1, 表 1) 显示, EMP1 主要定位于细胞质, 其在 CRC 组织、癌旁组织的阳性表达率分别为 39.7% (25/63) 及 90.3% (28/31), 两组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blotting 检测结果 (图 2) 显示, EMP1 蛋白在 CRC 组织的表达量显著低于癌旁组织 (0.257 ± 0.022 vs 0.863 ± 0.086 , $P < 0.05$)。

2.2 EMP1 与 CRC 临床病理参数的关系

临床因素分析结果 (表 2) 表明, EMP1 蛋白在 CRC T 分期、有无淋巴结转移、临床分期及组织分级中的表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而在不同性别、年龄及肿瘤部位的 CRC 患者中的表达水平无明显差异 ($P > 0.05$, 表 2)。

2.3 稳定转染 pLenti6-EMP1 的 SW-480 细胞过表达 EMP1 mRNA 与蛋白

Real-time PCR 检测结果显示, EMP1 mRNA 在 LeEmpty 细胞中的相对表达量显著低于 LeEMP1 细胞 (0.305 ± 0.028 vs 0.729 ± 0.066 , $P < 0.05$)。

Western blotting 检测结果(图 3)显示,LeEmpty 细胞中 EMP1 蛋白相对表达量显著低于 LeEMP1 细胞 (0.213 ± 0.018 vs 0.631 ± 0.060 , $P < 0.05$)。

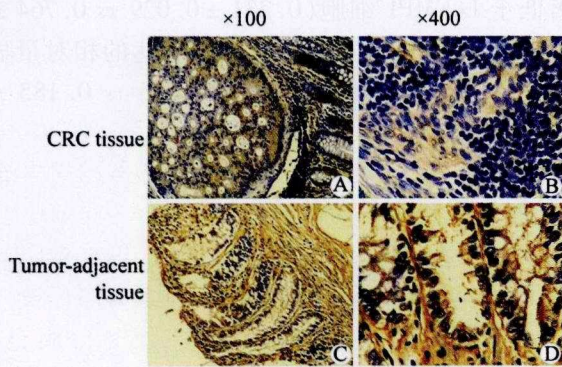


图 1 免疫组织化学检测 EMP1 在 CRC 组织及癌旁组织中的表达

Fig. 1 Expression of EMP1 in colorectal cancer tissues and in tumor-adjacent tissues by immunohistochemistry

表 1 EMP1 在 CRC 组织及癌旁组织中的表达 (n)
Tab. 1 Expression of EMP1 in colorectal cancer tissues and in tumor-adjacent tissues (n)

Group	N	EMP1				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Tumor-adjacent tissue	31	3	6	11	12	25.239	0.000
CRC tissue	63	38	10	8	7		

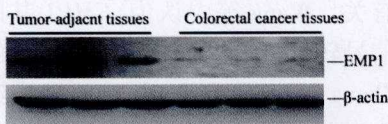


图 2 Western blotting 检测 EMP1 在 CRC 组织及癌旁组织中的表达

Fig. 2 Expression of EMP1 in colorectal cancer tissues and in tumor-adjacent tissues by Western blotting

2.4 EMP1 过表达抑制 SW-480 细胞的增殖

MTT 检测结果(图 4)显示,细胞接种培养 24 h 时 LeEMP1 细胞的存活率为 (60.94 ± 4.04)%, 显著低于 LeEmpty 细胞的 (100.00 ± 0.00)% ($P < 0.05$), 并且随培养时间延长, 差异逐渐增大。

表 2 EMP1 表达与 CRC 临床病理参数的关系 (n)
Tab. 2 Relation between EMP1 expression and clinic characteristics in CRC tissues (n)

Group	N	EMP1			χ^2	P
		-	+	~+++		
Sex						
Male	37	21	16	0.199	0.656	
Female	26	15	9			
Age (t/a)						
≤ 60	46	27	19	0.187	0.665	
> 60	17	11	6			
Tumor location						
Colon Cancer	35	19	16	1.197	0.274	
Rectal Cancer	28	19	9			
Tumor invasion						
T1 + T2	27	11	16	7.566	0.006	
T3 + T4	36	27	9			
Lymph node metastasis						
N0	28	11	17	9.314	0.002	
N+	35	27	8			
Clinic stages						
I ~ II	25	9	16	10.240	0.001	
III ~ IV	38	29	9			
Histological grade						
I	20	8	12	5.054	0.025	
II ~ III	43	30	13			

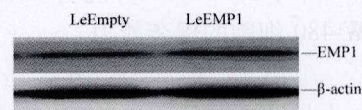


图 3 Western blotting 检测 EMP1 在 LeEmpty、LeEMP1 细胞中的表达

Fig. 3 Expression and identification of the EMP1 detected by Western blotting

2.5 EMP1 过表达促进 SW-480 细胞的凋亡

流式细胞术检测结果(图 5)表明,LeEmpty 细胞的早期凋亡率显著低于 LeEMP1 细胞 [(3.1 ± 0.6)% vs (12.1 ± 1.3)% , $P < 0.05$]。

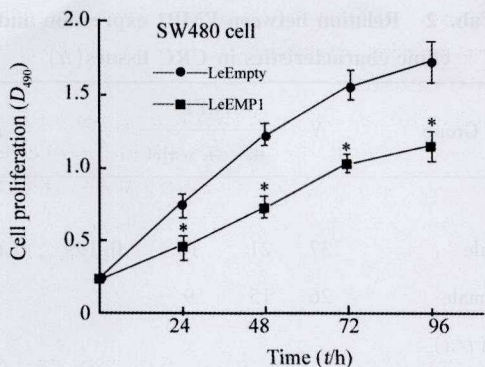


图 4 EMP1 过表达抑制 SW-480 细胞的增殖
Fig. 4 EMP1 overexpression inhibited the proliferation of SW-480 cells
* $P < 0.05$ vs LeEmpty

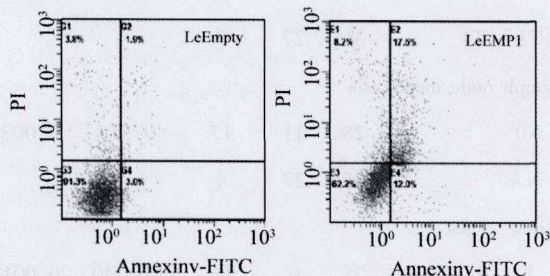


图 5 EMP1 过表达促进 SW-480 细胞的凋亡
Fig. 5 EMP1 overexpression promoted the apoptosis of SW-480 cells

2.6 EMP1 过表达抑制 SW-480 细胞的侵袭能力

Transwell 实验结果 (图 6) 表明, LeEmpty 细胞的穿膜数显著高于 LeEMP1 细胞 [(178.0 ± 21.0) vs (87.0 ± 12.0) 个, $P < 0.05$], 说明 EMP1 过表达能够抑制 SW-480 细胞的侵袭能力。

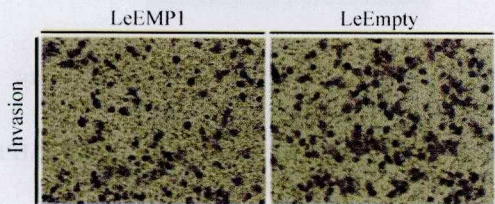


图 6 EMP1 过表达抑制 SW-480 细胞的侵袭能力 (×100)
Fig. 6 EMP1 overexpression inhibited the invasion ability of SW-480 cells (×100)

2.7 EMP1 过表达对 SW-480 细胞 Caspase-9、VEGFC 蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果 (图 7) 显示, EMP1 转染后, LeEmpty 细胞中 Caspase-9 蛋白表达的相对量显著低于 LeEMP1 细胞 (0.231 ± 0.029 vs 0.764 ± 0.073, $P < 0.05$), 而 VEGFC 蛋白表达的相对量显著高于 LeEMP1 细胞 (0.663 ± 0.065 vs 0.185 ± 0.022, $P < 0.05$)。

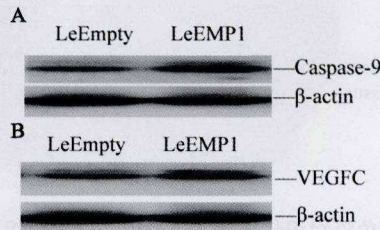


图 7 EMP1 过表达对 SW-480 细胞中 Caspase-9、VEGFC 蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of EMP1 overexpression on the expression of Caspase-9 and VEGFC in SW-480 cells

3 讨论

本研究首先用免疫组织化学及 Western blotting 技术对人 CRC 组织及癌旁组织进行定量检测, 结果显示 EMP1 蛋白在 CRC 组织中的表达水平显著低于癌旁组织。单因素分析显示, EMP1 蛋白的表达水平与 CRC 组织 T 分期、有无淋巴结转移、临床分期及分化程度有关, 而与 CRC 患者性别、年龄、肿瘤部位无关。Gnrke 等^[12] 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^[1] 认为, EMP1 基因可能是参与细胞信号转导、细胞通信及黏附调节的调节因子之一。Zhang 等^[13] 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^[14] 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, 而且 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。

进一步体外实验发现, EMP1 高表达的 CRC 细胞其增殖能力明显减弱、细胞凋亡明显升高, Caspase-3 及 VEGFC 蛋白的表达量明显下调。Wang 等^[1] 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, 从而推测 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,也是细胞凋亡调控中心。研究^[15-16]证明,细胞色素C从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。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,诱导二个Caspase-9酶原合并,导致Caspase-9自身激活,活化的Caspase-9能激活其他的Caspase分子,如Caspase-3、Caspase-7,并依次激活下游的Caspase分子,通过信号级联放大诱导凋亡^[17-18]。本研究发现,SW-480细胞高表达EMP1后Caspase-9的蛋白表达明显提高,由此推测,线粒体依赖的细胞凋亡途径参与了EMP1诱导的细胞凋亡。VEGF是PDGF家族成员,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^[19]。本研究发现,在转入EMP1基因后,SW-480细胞的VEGFC表达量明显下调,提示EMP-1可能通过抑制VEGFC来抑制肿瘤的血管生成,进而抑制肿瘤的转移。

本研究结果提示,人CRC组织中EMP1的蛋白表达水平明显降低,且与CRC的T分期、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CRC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] Lobsiger CS, Magyar JP, Taylor V, et al. Identification and characterization of a cDNA and the structural gene encoding the mouse epithelial membrane protein-1 [J]. Genomics, 1996, 36(3): 379-387.
- [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): 3347-3354.
- [5] 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.
- [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] Turashvili G, Bouchal J, Ehrmann J, et al. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2007, 151(1): 59-64.
- [8] Ranganathan V, De PK. Western blot of proteins from Coomassie-stained polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1996, 234(1): 102-104.
- [9] Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR [J]. Biotechniques, 2002, 32(6): 1372-1374.
- [10] van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay [J]. Methods Mol Biol, 2011, 731(1): 237-245.
- [11] Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. In vitro cell migration and invasion assays [J]. Mutat Res, 2013, 752(1): 10-24.
- [12] Gnirke AU, Weidle UH. Investigation of prevalence and regulation of expression of progression associated protein (PAP) [J]. Anti-cancer Res, 1998, 18(6A): 4363-4369.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Fu L, Chen W, Guo W, et al. Berberine targets AP-2/hTERT, NF- κ B/COX-2, HIF-1 α /VEGF and cytochrome-c/caspase signaling to suppress human cancer cell growth [J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e69240.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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] 2014-03-13

[修回日期] 2014-05-21

[本文编辑] 黄静怡