

# Egr-1 和 PTEN 蛋白的表达在食管上皮增生和癌变过程中的意义

# Significance of Egr-1 and PTEN Protein Expression in Esophageal Epitheliosis and Carcinogenesis

吴名耀/吴贤英/李乔山/郑瑞明  
(汕头大学医学院病理学教研室; 广东汕头 515041)

WU Ming-yao, Wu Xian-ying, LI Qiao-shan, ZHENG Rui-ming  
(Department of Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou, 515041, Guangdong, China)

**【摘要】**背景与目的: 研究食管粘膜上皮癌变过程早期生长反应基因(Early growth response gene-1, *Egr-1* gene)和与张力蛋白及辅助蛋白同源、第 10 号染色体丢失的磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN) 蛋白的表达, 并探讨其与食管癌发生的关系。材料与方法: 应用免疫组化 EnVision 二步法, 对 86 例食管癌切除新鲜标本的上切缘正常粘膜、癌旁粘膜上皮和原位癌进行 Egr-1 和 PTEN 蛋白表达的检测。结果: Egr-1 和 PTEN 在正常、增生和恶变的食管粘膜上皮细胞均有表达, 两者在食管癌变过程显示不同的分布模式, 即 Egr-1 蛋白表达逐渐升高, 而 PTEN 蛋白表达则逐渐下降。结论: Egr-1 和 PTEN 蛋白表达的改变与食管粘膜上皮的恶性转化密切相关, Egr-1 表达上调和 PTEN 表达缺失可能是一个有用的生物学标志和食管癌病人早期诊断的指标。

**【关键词】**早期生长反应基因; 与张力蛋白第 10 号染色体同源缺失的磷酸酶基因; 食管上皮; 癌变过程

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)04-0320-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To investigate the expression of early growth response gene-1 (*Egr-1* gene) and PTEN in esophageal epitheliosis and carcinogenesis, and the relation with the development of esophageal carcinoma. MATERIAL AND METHODS: *Egr-1* and PTEN protein expression in 86 fresh tissue specimens, including esophageal mucosa above the upper surgical margin, carcinoma in situ and mucosa adjacent to tumor, were studied using immunohistochemical EnVision two step method. RESULTS: *Egr-1* and PTEN protein were expressed in normal, proliferating and transformed malignant cells of esophageal epithelium. The expression of PTEN protein showed a different distribution pattern to that of *Egr-1*. The *Egr-1* protein expression rose gradually and PTEN protein expression decreased gradually. CONCLUSION: *Egr-1* and PTEN protein expression changes were closely related to the malignant transformation of esophageal epithelium. *Egr-1* expression up-regulation and loss of PTEN expressions may be favorable markers and an early diagnostic indicator in patients with esophageal carcinoma.

**【KEY WORDS】** *Egr-1*; PTEN; esophageal epithelium; carcinogenesis

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发生和发展与一些癌基因及其产物的表达密切相关<sup>[1]</sup>。我们地区系食管癌高发区, 初诊患者多为中晚期病例; 尽管目前手术、放、化疗已广泛开展, 但术后 5 年生存率仍徘徊在 20% 左右, 故对食管早期癌变过程的研究和早期诊断殊为重要。*Egr-1* 基因是新近发现的抑癌基因, 参与调节正

常细胞的增殖与分化, 与某些肿瘤的发生有关<sup>[2]</sup>。PTEN 基因是迄今为止发现的第一个具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 其所表达的蛋白在生长发育、信号传导和细胞凋亡过程中起重要作用。PTEN 蛋白变化与人类多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[3]</sup>。但有关 *Egr-1* 和 PTEN 蛋白在食管上皮癌变过程中联合表达的组织

收稿日期: 2005-03-16; 修订日期: 2006-03-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39670298)

作者简介: 吴名耀 (1949-), 男, 广东省人, 副教授, 主要从事食管癌的基础理论研究。Tel: 86-754-8900486, E-mail: mywu@stu.edu.cn

学定位的研究和意义目前尚未见报道。为此,我们应用免疫组化 EnVision 二步法,观察 Egr-1 和 PTEN 蛋白在食管粘膜上皮癌变过程中的表达情况,并探讨其与食管癌发生的联系。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 采用我们研究室 2004 - 01 ~ 2004 - 06 收检的食管癌手术切除新鲜标本 86 例 (术前均未接受过放、化疗),在直视下于上切缘取正常食管粘膜,沿食管纵轴切取癌旁粘膜 (距癌 1.5 cm 内) 组织块,全部标本均经 10% 中性福尔马林液固定,石蜡包埋,连续切片,片厚 4 μm,常规 HE 染色。

**1.2 方法** 切片经脱蜡、水化后,用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除内源性过氧化物酶,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液微波炉抗原修复。一抗兔抗 Egr-1 多克隆抗体 (SC-110, Santa Cruz Biot Co, USA),鼠抗人 PTEN 单克隆抗体 (28H6) 和 EnVision 二步法试剂购自美国抗体诊断公司 (Antibody Diagnostica Inc, USA)。用已知阳性的切片作阳性对照,正常兔、小鼠非免疫血清和 PBS 代替一抗作阴性对照;DAB 显色,苏木素复染,光镜观察。

**1.3 结果判断** 食管粘膜鳞状上皮细胞核、癌细胞核染成棕褐色为 Egr-1 和 PTEN 表达阳性。癌旁上皮根据其形态特征分为正常、单纯性增生、非典型性增生和原位癌 4 种。阳性细胞在上皮层下 1/3 者为“+”,阳性细胞超过下 1/3、但不超过下 2/3 者为“++”,阳性细胞超过下 2/3 者为“+++”。

**1.4 统计学方法** Egr-1 和 PTEN 表达情况的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结 果

**2.1 病理组织形态** 本组食管组织标本中,上切缘食管粘膜仅 20 例为基本正常的食管粘膜,粘膜上皮细胞在 20 ~ 25 层范围内,细胞无增生现象;癌旁粘膜上皮可见程度不等的细胞增生,其中单纯性增生 35 例,不典型增生 43 例,原位癌 8 例。食管粘膜上皮有时可见数量不等的淋巴细胞浸润。

**2.2 食管粘膜上皮癌变过程中 Egr-1 和 PTEN 定位及表达** 上切缘食管粘膜及癌旁粘膜经免疫组化染色后,两种蛋白阳性颗粒呈浅棕色至深棕色,位于上皮细胞核内,少数位于胞浆。Egr-1 蛋白在正常食管粘膜上皮表达极少,癌旁单纯性增生粘膜于基底层开始出现较多的阳性表达,在重度不典型增生时表达最强,癌变后表达锐减。PTEN 蛋白在正常粘膜呈强表达,从正常、轻度不典型增生到重度不典型增生至癌

变,PTEN 蛋白表达的程度和强度逐渐减少,部分病例粘膜下淋巴细胞核也见 Egr-1 和 PTEN 阳性反应。见图 1, 2。

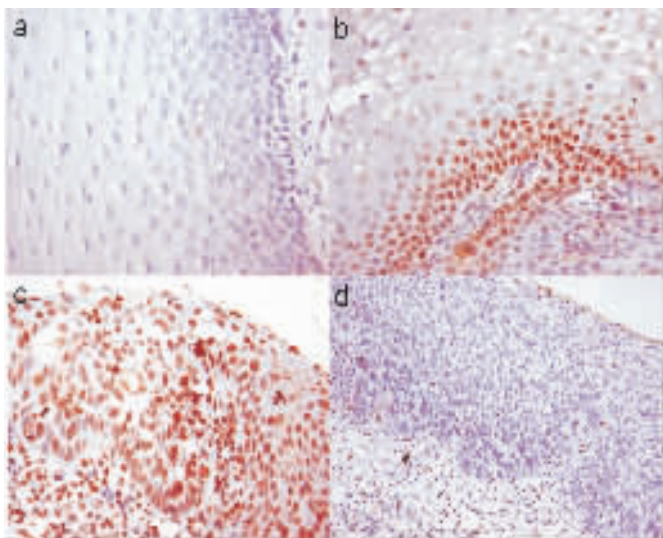


图 1 Egr-1 蛋白在 4 种类型组织的免疫组化染色  
Figure 1 IHC staining of Egr-1 protein in four tissues types. a: Normal epithelium  $\times 400$ ; b: Simple hyperplasia  $\times 400$ ; c: Atypical hyperplasia  $\times 400$ ; d: Carcinoma in situ  $\times 200$ .

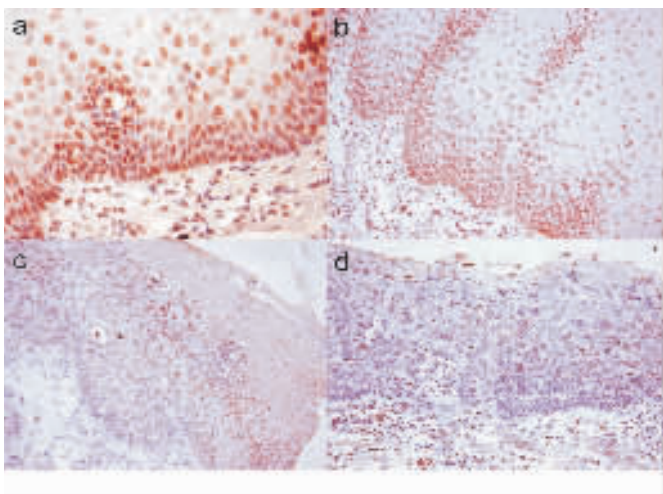


图 2 PTEN 蛋白在 4 种类型组织的免疫组化染色  
Figure 2 IHC staining of PTEN protein in four tissues types. a: Normal epithelium  $\times 400$ ; b: Simple hyperplasia  $\times 200$ ; c: Atypical hyperplasia  $\times 200$ ; d: Carcinoma in situ  $\times 200$ .

两种蛋白在不同类型食管组织的表达强度和阳性率见表 1 和表 2。从表中可以看出,在食管上皮癌变过程中,Egr-1 和 PTEN 蛋白显示不同的分布模式,即 Egr-1 蛋白表达逐渐升高,而 PTEN 蛋白表达则逐渐下降。

表 1 食管癌变过程中 Egr-1 的表达

Histological types	n	+	++	+++	Positive rate ( $\times 10^{-2}$ )
Normal	20	2	0	0	10.0
Simple hyperplasia	35	12	2	0	40.0
Atypical hyperplasia	43	7	13	18	88.4 <sup>*</sup>
Carcinoma in situ	8	1	1	0	25.0

Compared with the simple hyperplasia group,  $\chi^2$  test, \*  $P < 0.01$ .



表 2 食管癌变过程中PTEN的表达

Table 2 Expression of PTEN in esophageal carcinogenesis

Histological types	n	+	++	+++	Positive rate( $\times 10^{-2}$ )
Normal	20	2	5	11	90.0
Simple hyperplasia	35	3	8	16	77.1
Atypical hyperplasia	43	9	7	2	41.9*
Carcinoma <i>in situ</i>	8	2	1	0	37.5

Compared with the simple hyperplasia group,  $\chi^2$  test, \*  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

*Egr-1* 是即刻早期基因家族中的一种, 定位于人染色体 5q31.1, *Egr-1* 核蛋白是含有 3 个锌指结构的转录因子, 能激活 *CyclinD1*, 促进细胞由静止期进入增殖期, 起调节细胞生长和分化的作用<sup>[4]</sup>。我们对 86 例食管癌旁粘膜上皮组织进行检测发现, 在单纯性增生的食管粘膜基层上皮首先出现 *Egr-1* 蛋白阳性, 随着癌旁食管粘膜上皮增生的加重阳性细胞数和阳性率明显升高, 但发展为癌后, *Egr-1* 蛋白的表达锐减。非典型增生上皮 *Egr-1* 蛋白表达显著高于单纯性增生食管上皮和原位癌组织 ( $\chi^2 = 20.722, P < 0.01$ ), 这可能是由于癌旁组织受到较多的刺激所致, 与许多因子能激活 *Egr-1* 表达是一致的。*Egr-1* 的高表达可能有维持染色体稳定性、抑制细胞增殖、促进细胞分化和凋亡的作用。随着非典型增生进展为癌, *Egr-1* 表达显著减少。

*PTEN* 基因定位于 10q23, 编码分子量为 47 kD 的蛋白。目前被认为是继 *p53* 基因后, 改变广泛, 与肿瘤发生关系密切的抑癌基因。研究显示 *PTEN* 在恶性肿瘤主要通过基因的突变、缺失或甲基化而失活, *PTEN* mRNA 或蛋白表达减低, 甚至不表达<sup>[5]</sup>。本实验通过免疫组化方法检测抑癌基因 *PTEN* 蛋白在食管粘膜上皮癌变过程中的改变, 发现从正常食管上皮、单纯性增生、非典型增生至原位癌, *PTEN* 蛋白的阳性表达率逐渐下降, 非典型增生上皮和原位癌组织 *PTEN* 蛋白表达显著低于正常和单纯性增生上皮 ( $\chi^2 = 12.659, P < 0.01$ ), 提示 *PTEN* 在食管癌变过程中有表达缺失现象, 使细胞在增殖过程中丧失负调控作用而过度增殖, 以致细胞发生癌变。这与霍霞等<sup>[6]</sup>的实验结果基本一致。

有关食管癌的 *Egr-1* 和 *PTEN* 蛋白的表达, 已有报告。关于 *Egr-1* 和 *PTEN* 蛋白在细胞内的定位, 其中 *Egr-1* 蛋白报道较少, 均定位于细胞核; 而 *PTEN* 在细胞表达的定位则各家的实验报告不一, 有位于细胞浆和/或细胞核。Tachibana 等<sup>[7]</sup>将食管癌细胞浆 *PTEN* 和核 *PTEN* 表达进行对比研究, 结果发现, 核 *PTEN* 蛋白的表达与肿瘤的肉眼分类和临床分期及预后有关系 ( $P < 0.01$ ), 且核 *PTEN* 表达与细胞浆 *PTEN* 表达的强度和程度之间无统计学意义。本实验结果仅认可细胞核区

域内的 *PTEN* 蛋白表达, 与最新的文献报道一致。究其原因, 可能与组织未及时固定或所使用的抗体不同有关。

*Egr-1* 和 *PTEN* 虽同为抑癌基因, 但两者在食管上皮癌变过程中显示不同的分布模式, 提示两者在基因表达调控和转录方面应有所不同。本研究结果显示: 在食管粘膜上皮癌变过程中, 癌旁粘膜上皮 *Egr-1* 蛋白表达的增强和 *PTEN* 蛋白表达的减少与食管癌的发生有着极为密切的联系。

食管癌的发生一般都表现为单纯性增生→不典型增生→原位癌的动态变化, 其中涉及 *Egr-1* 和 *PTEN* 等多个基因的变化<sup>[8]</sup>。用免疫组织化学方法检测 *Egr-1* 和 *PTEN* 蛋白表达不仅能精确定位, 而且具有方法简便, 可进行回顾性研究和检测等特点。本组实验结果提示: 食管粘膜上皮免疫组化检测如 *Egr-1* 阳性, *PTEN* 阴性, 则提示癌变的可能性大。所以, 联合检测食管粘膜上皮 *Egr-1* 和 *PTEN* 蛋白的表达可望成为食管癌客观而有价值的早期诊断指标。至于其作用机制及与其它癌基因、抑癌基因的关系, 尚有待进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] 李超霞, 吴名耀. 慢性食管炎和食管癌旁粘膜上皮癌基因蛋白表达的比较 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(6): 332-334.
- [2] Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K. Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells [J]. *Int Rev Immunol*, 2001, 20(1): 83-105.
- [3] Ding Y, Shimada Y, Kano M, et al. PTEN/MMAC1 expression in esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(4): 695-699.
- [4] Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1 [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 193(3): 287-292.
- [5] 常青, 郭丽娜. *PTEN/MMAC1/TEP1* 基因研究新进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27(4): 193-195.
- [6] 霍霞, 许险峰, 徐锡金, 等. 抑癌基因 *PTEN* 在食管癌中的表达 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2003, 12(4): 339-342.
- [7] Tachibana M, Shibakita M, Ohno S, et al. Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 94(7): 1955-1960.
- [8] Wu MY, Zhuang CX, Yang HX, et al. Expression of Egr-1, c-fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(4): 476-480.