

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001700

人 ETV4 蛋白截短体的构建与其在结直肠中的功能分析

刘 浩, 刘 心, 王义涛, 张春冬, 卜友泉, 雷云龙, 易发平

(重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室、重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 ETV4 转录因子各保守结构在转录调节结直肠癌细胞增殖以及迁移过程中的作用以及机制。**方法:**利用 PCR 介导的克隆技术,在前期构建的 ETV4 载体基础上,构建含不同 ETV4 结构域的蛋白截短体 ETV4(1~339)(包含酸性结构域)与 ETV4(340~484)(含 DNA 结合结构域)。利用 CCK-8 试剂盒检测不同截短体对结直肠癌细胞增殖的影响,利用细胞划痕实验检测不同截短体对结直肠癌细胞迁移的影响。进一步利用定量 PCR 技术检测表达不同截短体过表达细胞中上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物的变化情况。**结果:**CCK-8 实验结果显示截短体 ETV4(1~339)无明显促进结直肠癌细胞增殖的作用,而截短体 ETV4(340~484)和全长蛋白都可明显促进结直肠癌细胞增殖($P<0.01$)。细胞划痕实验显示截短体 ETV4(340~484)和全长蛋白可促进结直肠癌细胞迁移而截短体 ETV4(1~339)却无此作用。进一步对 EMT 标志物检测发现 ETV4(340~484)和全长蛋白可导致 E-cadherin 表达下降, N-cadherin、Vimentin 和 Twist 表达上调($P<0.01$),而 ETV4(1~339)中 EMT 标志物无明显变化。**结论:**本实验首次证明,ETV4 促进结直肠癌细胞增殖和迁移主要是通过 ETV4 中的 ETS 结构域起作用,并且可能通过介导 EMT 标志物来调控结直肠癌细胞转移。

【关键词】ETV4; 转录因子; 结直肠癌; 细胞增殖; 迁移**【中图分类号】**R735.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-04-08

Construction and identification of human ETV4 deletion mutants

Liu Hao, Liu Xin, Wang Yitao, Zhang Chundong, Bu Youquan, Lei Yunlong, Yi Faping

(Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University;
Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct ETS Variant 4 (ETV4) truncated mutants and to investigate their role in colorectal cancer cell growth and migration. **Methods:** Based on our previous constructed ETV4 vector, ETV4 deletion mutants that containing different conserved domains were constructed: ETV4(1-339) and ETV4(340-484). Each mutant function was analyzed in colorectal cancer cell growth by CCK-8 kit. Each mutant function in colorectal cancer cell migration was detected with wound healing assay. Moreover, each mutant function in EMT was further measured by qRT-PCR. **Results:** CCK-8 assay showed that mutant ETV4(1-339) didn't promote cancer cell growth whereas mutant ETV4(340-484) and wide type ETV4 evidently promoted cancer cell growth. Wound healing assay revealed that mutant ETV4(340-484) and wide type ETV4 promoted colorectal cancer cell migration. Further qRT-PCR analysis showed that mutant ETV4(340-484) and wide type ETV4 were able to alter the expression of EMT markers whereas mutant ETV4(1-339) could not. **Conclusion:** ETS domain of ETV4 is indispensable in ETV4-induced colorectal cancer cell proliferation and migration, which is probably related with EMT.

【Key words】ETS Variant 4; transcription factor; colorectal cancer; cell proliferation; migration

结直肠癌作为现今世界高发肿瘤,严重威胁着人类的健康,不仅如此,结直肠癌的确诊年龄呈现

越来越年轻的趋势^[1]。实际上, Bailey 等^[2]学者研究发现除去老年人口,至 2030 年,50 岁以下的人口中将会有十分之一的人群检查出结肠癌,而同样人群中的四分之一将会检查出直肠癌。这提示现阶段与结直肠癌有关的检测与治疗手段还十分有限,实际上对于治疗结直肠癌,现有的治疗策略除放疗化疗就只剩下手术切除的方法^[3]。近年来靶向治疗在肿瘤治疗中显示出非常好的疗效以及极少的副作用,而

作者介绍:刘 浩, Email: 258745517@qq.com,

研究方向:分子肿瘤。

通信作者:易发平, Email: fazicq@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81401951);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2016jcyjA0227)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180530.1701.012.html>
(2018-05-31)

靶向治疗的基础就是通过特异性的标志物来选择靶向药物,所以说筛选新的有效标志物越来越重要。

ETV4(ETS Variant 4)也叫做 PEA3 或 E1AF,是 ETS 转录因子 PEA3 亚家族的一员^[4]。ETV1 以及 ETV5 是 PEA3 亚家族的另外 2 名成员,现有研究发现,ETV5 的功能与 ETV4 类似,而 ETV1 的功能却与两者不同,ETV1 与运动协调能力十分相关^[5]。另外,根据现有研究报道,ETV4 氨基酸序列中包含有 1 个功能性的酸性结构域和 1 个 ETS 结构域,其中酸性结构域一般起着转录激活的作用,而 ETS 结构域的作用是在转录中连接 DNA^[5]。ETV4 作为转录因子参与体内多种生理过程,特别是在发育相关的生物过程中起着重要的作用;其中国内外大部分研究又集中于神经系统与肺部发育^[6]。ETV4 也参与调控肿瘤相关的生物进程^[7],有研究显示 ETV4 可以上调多种基质金属蛋白酶,促进癌细胞的迁移与侵袭从而诱导肿瘤的恶性转化^[8]。ETV4 作为转录因子,其蛋白结构以及转录激活调节的机制具有十分重要的意义,然而国内外研究主要聚集于 ETV4 分子机制调控的研究,而 ETV4 转录因子各结构功能研究与具体机制还鲜有报道。众所周知,肿瘤中的各种基因水平的改变最终都需通过合成蛋白质来影响肿瘤细胞的各种表型。转录因子中包含的不同结构域执行不同功能。所以,通过对转录因子结构域的研究,可以为肿瘤的早期检测与治疗提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞 HCT116 与人胚肾细胞 293Ta 购买自上海细胞库,均采用 DMEM 培养基(已添加 10%胎牛血清和 1×10⁵U/L 青霉素,100 mg/L 链霉素)培养,细胞置于含 5%的 CO₂ 细胞培养箱中培养。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购于 Hyclone 公司;转染试剂 Lipofectamine2000 购于 Invitrogen 公司;DNA 连接试剂盒购于 Takara 公司;DNA 聚合酶购于 Takara 公司;Ligation High 试剂盒购于 TOYOKA 公司,Dpn I 酶购于 New England Bio 公司。Trizol 购于 Invitrogen 公司;氨苄购于上海生工;PCR 引物由成都擎科生物合成;质粒小抽纯化回收试剂盒购自 OMEGA 公司,CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司,Ripa 蛋白裂解液购于碧云天公司,E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 与 Twist 引物由上海生工生物公司合成,Flag 抗体购于 Sigma Aldrich 公司,GAPDH 抗体购于 Santa cruz 公司,6 孔板、96 孔板购于美国 Corning 公司。总 RNA 提取试剂盒购于 OMEGA 公司,二抗兔抗购于 Thermo 公司,BCA 浓度试剂购于 Thermo 公司。

1.2 ETV4 转录因子截短体的构建

以前期构建的 ETV4 载体为模板,采用 PCR 介导的基因克隆技术,构建 2 个不同大小的系列蛋白截短体,分别命名为 ETV4(1~339)和 ETV4(340~484)。构建方法具体操作如下。

1.2.1 ETV4 截短体引物设计 采用 Primer Premier5.0 等引物设计软件设计引物,ETV4 截短体引物的具体名称和序列参见表 1。

表 1 ETV4 截短体引物

引物名字	引物序列
1-339	F:5'-GACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTG-3' R:5'-ACCCCGCGCTGCTAG-3'
340-484	F:5'-GCCCTGCAGCTGTGCAATTTTC-3' R:5'-CTTATCGTCGTCGTCCTGTGAATCCA-3'

1.2.2 PCR 反应 PCR 反应体系组成成分:5×primer STAR 4 μL;dNTP 1.6 μL;primer F 0.4 μL;primer R 0.4 μL;模板 DNA 50 ng;primer STAR 0.2 μL;灭菌双蒸水加足至 20 μL。PCR 反应程序为:98℃预变性 2 min;98℃变性 15 s;62℃退火 5 s;72℃延伸 10 min;总延伸 72℃10 min,8 个循环。

1.2.3 Dpn I 酶切 向 20 μL PCR 反应液中加入 1 μL Dpn I 酶,37℃水浴锅温浴 1 h。

1.2.4 连接 采用 Ligation high 连接试剂盒,反应体系共 15 μL,包括:Ligation high 5 μL;T4 kinase 1 μL;Dpn I 消化后的模板 2 μL;ddH₂O 7 μL。反应条件为 16℃1 h。

1.2.5 转化 将连接好的反应液使用 DH5α 感受态细胞进行转化。然后将转化后的液体均匀涂于氨苄抗性的琼脂平板上,将平板倒置于 37℃培养箱过夜培养。

1.2.6 阳性克隆鉴定 随机挑取几个平板上的克隆,利用质粒提取试剂盒提取质粒,具体操作步骤参见说明书,质粒经过 DNA 测序确认。

1.3 EMT 标志物引物设计

采用 Primer Premier 5.0 等引物设计软件设计引物,EMT 标志物引物具体名称和序列参见表 2。

表 2 EMT 标志物引物

基因名字	引物序列
E-cadherin	F764:5'-TGAAGGTGACAGACCTCTGGAT-3' R915:5'-TGGGTGAATTCGGGCTTGTT-3'
N-cadherin	F1685:5'-ATCAACCCCATACACCAGCC-3' R1790:5'-ACTAACCCGTCGTTGCTGTT-3'
Vimentin	F1369:5'-CCAAACTTTTCCTCCTGAACC-3' R1510:5'-GTGATGCTGAGAAGTTTCGTTGA-3'
Twist	F1315:5'-TCTCAAGAGGTCGTGCCAAT-3' R1457:5'-ATGGTTTTGCAGGCCAGTTT-3'

1.4 瞬时转染与稳定细胞系的建立

提前培养 HCT116 细胞,待细胞生长至对数期时进行铺板,待铺好的细胞密度为 80%左右时,利用 Lipofectamine 2000 试剂,将构建好的系列截短体质粒转入 HCT116 细胞,其中 ETV4 全长质粒为对照,其余截短体质粒为实验组,操

作为取对数生长期细胞以 5×10^5 个/mL 铺于 6 孔板中用于转染,转染前将培养基换为无血清培养基,利用 Lipofectamine 2000 转染试剂将截短体质粒转入细胞,6~8 h 后换为正常含血清的培养基培养,然后将转染后的细胞进行培养,48 h 后向细胞中加入 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选 7 d,获得稳定表达载体蛋白的 HCT116 细胞株。

1.5 Western blot 检测截短体蛋白表达

将细胞取出,用 PBS 洗 3 次,准备 RIPA 细胞裂解液(根据细胞数量提前准备好加入了蛋白酶抑制剂 PMSF 的细胞蛋白裂解液),加入细胞裂解液混匀,冰上裂解 2 h(每 30 min 涡旋 1 次),裂解结束后 $13\ 000\ \text{g}$ $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 10 min,取出后取上清液即为蛋白裂解液。利用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测提取的蛋白裂解液浓度。采用 Western blot 技术检测细胞蛋白表达情况。

1.6 检测系截短体对细胞增殖的影响

将稳定表达细胞提前铺于 96 孔板中,细胞数量为 2 000 个每孔,4 h 后采用 CCK-8 试剂盒检测细胞 $450\ \text{nm}$ 吸光度(absorbance, A)值。操作步骤为:提前配置好 CCK-8 检测溶液;比例为 $100\ \mu\text{L}$ 培养基中加 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,将 96 孔板中的培养基吸出,加入每孔 $100\ \mu\text{L}$ 提前配好的 CCK-8 检测液,放入细胞培养箱中 1 h,于紫外分光光度计检测 $A_{450\ \text{nm}}$ 值。后每 48 h 测 1 次,共 4 次(实验共重复 3 次)。

1.7 检测不同截短体对细胞迁移能力的影响

6 孔板接种细胞前,先用记号笔在平板背面划横线标记(方便拍照时定位)。将稳定表达细胞铺于 6 孔板中,待细胞密度长至 80%时,利用 $100\ \mu\text{L}$ 枪头垂直于平板进行划痕,划痕时尽量保证划痕宽度一致,吸取培养基,用 PBS 洗 3 次,吸取划痕产生的细胞碎片,加入无血清培养基培养。划痕后每次在同一位置拍照,每天拍照 1 次,共拍 3 d。

1.8 检测系列截短体细胞 EMT 标志物的变化情况

利用总 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA,然后利用核酸浓度测定仪测定 RNA 浓度,利用 Takara 逆转录试剂盒逆转录所得 RNA,具体步骤参见 Takara 逆转录试剂盒。将所得 cDNA 稀释 20 倍为模板,以 GAPDH 为内参,反应体系为 $10\ \mu\text{L}$,采用 SYBR PremixEx Taq™ 荧光试剂进行 qRT-PCR,反应程序为: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 10 s, $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火 15 s, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 15 s,一共 39 个循环;结束后建立溶解曲线。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析定量结果(实验共重复 3 次)。

1.9 数据处理与统计分析

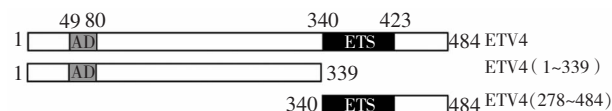
数据采用 Excel 软件进行初步处理,数据统一以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件对数据进行 t 检验。双侧检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 ETV4 蛋白系列截短体构建

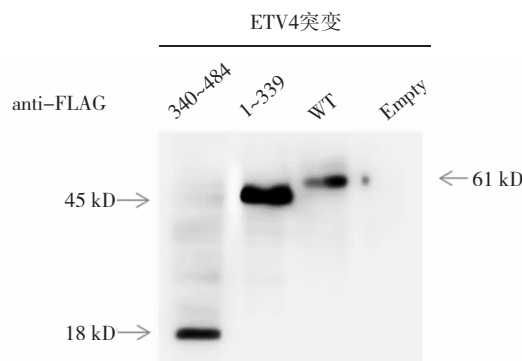
基于 ETV4 蛋白结构分析,ETV4 主要包含酸性结构域(AD 结构域)与 DNA 结合结构域(ETS 结构域)。在此基础

上,将 ETV4 结构依次删除,构建了截短体 ETV4(1~339)和 ETV4(340~484),构建示意图如图 1 所示。重组质粒经测序确认无误,转染 HCT116 细胞后经过嘌呤霉素筛选获得稳定表达细胞株,然后提取细胞总蛋白,总蛋白经过 Western blot 鉴定,截短体蛋白大小符合预期(图 2),其中空载 Empty 为阴性对照,WT 为 ETV4 全长。



数字表示氨基酸序号,灰色阴影为富氨基酸结构域;黑色阴影为 DNA 结合结构域 ETS。ETV4(1~339)表示将氨基酸序号 340 到 484 处删除,保留 AD 结构域的截短体;ETV4(278~484)表示将氨基酸序号 1 到 276 处删除,保留 ETS 结构域的截短体

图 1 ETV4 蛋白系列截短体构建示意图



其中 ETV4(340~484)大小为 18 kD;ETV4(1~339)为 45 kD; ETV4 全长为 61 kD,Empty:空载体阴性对照;WT:ETV4 全长

图 2 ETV4 不同截短体蛋白表达 Western blot 检测

2.2 ETV4 蛋白系列截短体对细胞增殖能力的影响检测

将之前获得的稳定表达细胞株以及阴性对照组细胞分别铺于 96 孔板中,分为阴性对照组 Empty、全长组 ETV4、截短体组(1~339)和截短体组(340~484),利用 CCK-8 试剂盒每 2 d 检测各组 $A_{450\ \text{nm}}$ 值,共检测 6 d。如图 3 所示,在 HCT116 细胞中,与阴性对照组相比,截短体组 ETV4(1~339) $A_{450\ \text{nm}}$ 值无明显变化(图 3B),全长组 ETV4(图 3A)与截短体组 ETV4(340~484)(图 3C) A 值明显升高。其中第 6 天,Empty 组: 1.276 ± 0.016 ;全长 ETV4 组: 2.209 ± 0.102 ($P=0.000$)。而剪接体组中,Empty 组: 1.276 ± 0.016 ;ETV4(340~484): 2.209 ± 0.102 ($P=0.000$)。一般来说, A 值越高表示活细胞数量越多,也就是代表细胞增殖越快。以上结果结合之前的 ETV4 结构分析表明,ETV4 中的 ETS 结构域在 ETV4 促结直肠癌细胞增长中起着主要作用。

CK-8 检测表达全长 ETV4 与对照 Empty 的 HCT116 细胞增殖情况和 CCK-8 检测表达 ETV4(1~339)截短体与对照 Empty 的 HCT116 细胞增殖情况以及 CCK-8 检测表达 ETV4(340~484)与对照 Empty 的 HCT116 细胞增殖情况。

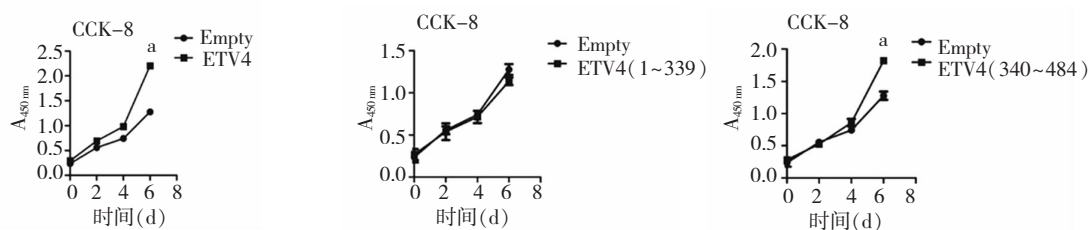
2.3 ETV4 蛋白系列截短体对细胞迁移能力的影响检测

鉴于 ETS 结构域在 ETV4 促增殖中所起到的重要作用, 为了进一步检测此结构对结直肠癌细胞迁移能力的影响, 将各稳定表达细胞分为 Empty 组、ETV4 组、截短体(1~339)组和截短体(340~484)组, 采用细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力。如图 4 所示, 与对照组 Empty 相比, 截短体(340~484)组与全长 ETV4 组明显促进结直肠癌细胞迁移, 而截短体(1~339)组迁移速度与对照差异不大。结果提示, ETS 结构域在 ETV4 促进的癌细胞转移中起重要作用。

2.4 ETV4 蛋白系列截短体对 EMT 的影响

考虑到 EMT 是肿瘤转移中的一个重要过程, 因此本课题组想进一步检测 ETV4 对结直肠癌 EMT 的影响。所以设计了 EMT 标志物引物, 利用定量 PCR 检测了 EMT 标志物的变化情况。如图 5 所示, 与对照组相比, ETV4 全长过表达后上皮细胞标志物 E-钙粘附蛋白(E-cadherin)的表达明显下降, Empty 组: 1.005 ± 0.013 ; 全长 ETV4 组: 0.318 ± 0.049 ($P=0.001$)。而间质标志物都明显升高(图 5A), 其中神经钙黏素(N-cadherin)表达量 Empty 组: 1.022 ± 0.260 ; 全长 ETV4 组:

3.469 ± 0.821 ($P=0.000$); 波形蛋白 Vimentin 表达量 Empty 组: 1.012 ± 0.019 ; 全长 ETV4 组: 2.492 ± 0.228 ($P=0.002$) 以及 Twist(转录因子)表达量 Empty 组: 1.001 ± 0.060 ; 全长 ETV4 组: 2.422 ± 0.324 ($P=0.000$), 这些结果显示 ETV4 可以促进 HCT116 细胞 EMT 转变。与全长组相似, 截短体组 ETV4 (340~484)中 E-cadherin 下降, N-cadherin、Vimentin 和 Twist 表达则上升(图 5C), 其中 E-cadherin 表达量为 Empty 组: 1.005 ± 0.013 ; ETV4 (340~484) 组: 0.479 ± 0.070 ($P=0.003$), N-cadherin 表达量为 Empty 组: 1.022 ± 0.260 ; ETV4 (340~484) 组: 2.374 ± 0.068 ($P=0.008$), Vimentin 表达量为 Empty 组: 1.012 ± 0.019 ; ETV4 (340~484) 组: 2.318 ± 0.152 ($P=0.003$), Twist 表达量为 Empty 组: 1.001 ± 0.060 ; ETV4 (340~484) 组: 1.836 ± 0.184 ($P=0.002$)。而截短体组 ETV4 (1~339)各种 EMT 标志物变化不明显(图 5B)。这与本课题组之前结果以及预测一致, 删除了 ETS 结构域的截短体 EMT 标志物变化不明显, 而保留了 ETS 结构域的截短体 EMT 标志物变化则和全长 ETV4 类似, 以上结果提示, 在 ETV4 通过 EMT 调节细胞转移能力的过程中, ETS 结构域起着重要的作用。



CCK-8 检测表达全长 ETV4 与对照 Empty 的 HCT116 细胞增殖情况和 CCK-8 检测表达 ETV4(1~339)截短体与对照 Empty 的 HCT116 细胞增殖情况以及 CCK-8 检测表达 ETV4(340~484)与对照 Empty 的 HCT116 细胞增殖情况

a; $P < 0.01$

图 3 不同截短体稳定表达细胞株 CCK-8 检测细胞吸光度值

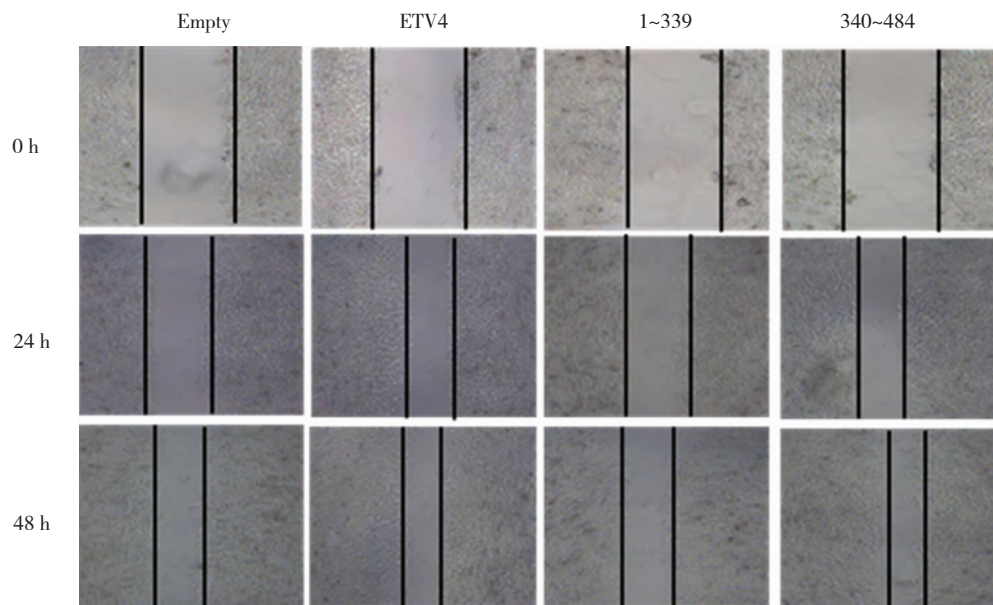
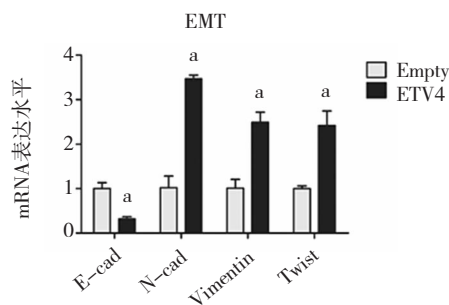
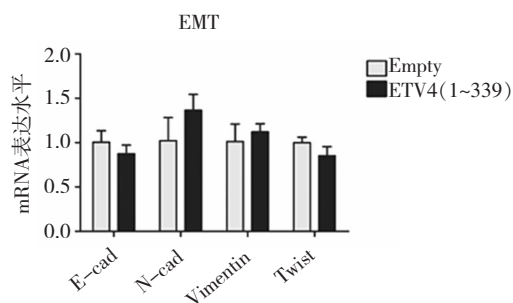


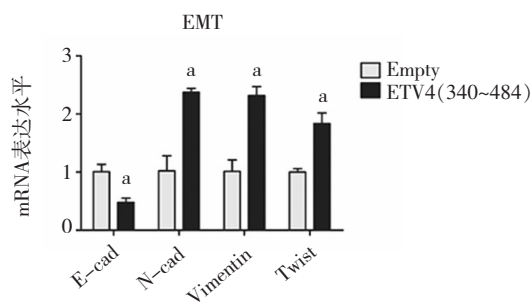
图 4 不同截短体稳定表达细胞株划痕实验



A. qRT-PCR 检测 E-cad、N-cad、Vimentin、Twist 在对照组 Empty 与 ETV4 全长组细胞中的 mRNA 表达水平



B. qRT-PCR 检测 E-cad、N-cad、Vimentin、Twist 在对照组 Empty 与截短体 ETV4(1~339)组细胞中的 mRNA 表达水平



C. qRT-PCR 检测 E-cad、N-cad、Vimentin、Twist 在对照组 Empty 与截短体 ETV4(340~484)组细胞中的 mRNA 表达水平

E-cad 表示 E-cadherin, N-cad 表示 N-cadherin

a: $P < 0.01$

图 5 系列截短体稳定表达细胞定量检测 EMT 标志物

瘤^[11-13]。然而,该转录因子促癌的分子机制尚不明确。因此,根据 ETV4 蛋白结构构建了带有不同结构域的蛋白截短体,然后对不同结构进行功能检测。结果显示,ETV4 可以促进结直肠癌细胞增殖和迁移,而 ETV4 的 DNA 结合结构域(ETS 结构域)在 ETV4 介导的促癌生长与转移中起不可或缺的作用。实际上 ETV4 作为转录因子,一般参与生长调控都依赖于其作为转录因子靶向下游基因进而影响肿瘤的生长与转移^[14]。一般来说,转录因子 DNA 结合结构域与下游靶基因启动子区域结合,通过转录因子自身激活结构域或其它激活因子激活下游靶基因^[15]。本研究结果显示,ETV4 转录因子中 ETS 结构域即可起到与 ETV4 全长类似的作用,而自身 AD 区并未起到激活转录的作用。这种现象说明 ETV4 可能存在其它蛋白互作,由其他蛋白来行使激活转录的作用,这些结果为进一步阐明 ETV4 促癌增殖转移的机制提供了分子基础。

癌症转移一般是指原位肿瘤细胞由原来的部位向其他器官转移的过程,这一过程是造成结直肠癌难以治愈的原因之一。实际上,结直肠癌导致的死亡有 90% 都与转移有关^[16]。现有研究表明,上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)对肿瘤细胞的转移有强烈的促进作用^[17]。并且人类癌症基因表达模式也表明肿瘤的转移与 EMT 有关系^[18]。鉴于本研究发现了 ETV4 中的 ETS 结构域可以促进肿瘤细胞迁移,课题组又进一步检测了 EMT 标志物的表达情况,结果从侧向证实了早前的猜想。在下一步的工作研究中,有必要通过基因芯片分析出下游关键靶基因,并通过双荧光素酶报告系统检测其启动子活性,并利用染色质免疫共沉淀技术确定 ETV4 的结合位点。总之,本研究对 ETV4 蛋白结构与功能进行了初步鉴定与分析,为进一步阐明 ETV4 促癌生长与转移提供了必要的理论基础。

3 讨论

ETV4 是 ETS 转录因子家族中的一种,又可以叫做 Pea3 或 E1AF。目前研究发现,ETV4 与生长发育中肺部气管分支发育有关系,在这一过程中,ETV4 通过促进原始上皮发育形成分支小管或腺泡结构^[5]。另外也有研究表明 ETV4 在肾小球分化结束后表达量急剧减少,说明 ETV4 也参与肾脏的发育^[10]。近年来越来越多的研究发现 ETV4 也在多种肿瘤中呈现高表达,如前列腺癌、乳腺癌、食管癌以及消化道肿

参 考 文 献

- [1] Wong MC, Ching JY, Chan VC, et al. Colorectal cancer screening based on age and gender: a cost-effectiveness analysis[J]. *Medicine*, 2016, 95(10): e2739.
- [2] Bailey CE, Hu CY, You YN, et al. Increasing disparities in the age-related incidences of colon and rectal cancers in the United States, 1975-2010[J]. *JAMA Surg*, 2015, 150(1): 17-22.
- [3] Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer[J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(5): 476-487.
- [4] Tyagi N, Deshmukh SK, Srivastava SK, et al. ETV4 facilitates cell-

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001534

小婴儿嵌顿性腹股沟斜疝临床分析及肠坏死高危因素研究

王至立,谷成超,孙 静,侯金平,毕 杨,李晓庆,金先庆,王 佚

(重庆医科大学附属儿童医院胃肠新生儿外科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,重庆 400014)

【摘要】目的:探讨小婴儿嵌顿性腹股沟斜疝临床特点及发生肠坏死的高危因素。**方法:**回顾性研究 2013 年 1 月到 2017 年 1 月于重庆医科大学附属儿童医院行手术治疗的 246 例小婴儿嵌顿性腹股沟斜疝的病历资料,分析其临床特点,并依据单因素及多因素 logistic 回归分析患儿临床资料及实验室检查结果,探究肠坏死发生的高危因素。**结果:**本组患儿肠坏死发生率为 10.2% (25/246),未发生卵巢坏死;多因素 logistic 回归分析显示,C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)异常($OR=26.933$, $95\%CI=6.396\sim 113.894$, $P=0.000$)为小婴儿嵌顿性腹股沟斜疝肠坏死发生的独立危险因素,ROC 曲线分析显示在肠坏死的诊断中,CRP 灵敏度和特异度分别为 80.0%、93.7%,曲线下面积为 0.868($95\%CI=0.820\sim 0.908$)。**结论:**小婴儿嵌顿性腹股沟斜疝临床表现不典型,易发生肠坏死;CRP 对诊断小婴儿嵌顿性腹股沟斜疝致肠坏死有较好的诊断价值。

【关键词】腹股沟疝;肠坏死;危险因素;C 反应蛋白**【中图分类号】**R726.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-07**作者简介:**王至立,Email:563188298@qq.com,

研究方向:小儿消化道疾病的诊治。

通信作者:王 佚,Email:wy757311@hotmail.com。**基金项目:**重庆市卫计委医学科研重点资助项目(编号:20141010)。**优先出版:**<http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180321.1031.032.html>
(2018-03-21)

cycle progression in pancreatic cells through transcriptional regulation of cyclin D1[J]. Molecular Cancer Research, 2018, 16(2): 187-196.

[5] Oh S, Shin S, Janknecht R. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826(1): 1-12.

[6] Livet J, Sigrist M, Stroebel S, et al. ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools[J]. Neuron, 2002, 35(5): 877-892.

[7] Bièche I, Tozlu S, Girault I, et al. Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(3): 405-411.

[8] Qi M, Liu Z, Shen C, et al. Overexpression of ETV4 is associated with poor prognosis in prostate cancer: involvement of uPA/uPAR and MMPs[J]. Tumor Biology, 2015, 36(5): 3565-3572.

[9] 李红霞, 封雪飞, 卜友泉, 等. 沉默 DEPDC1 抑制鼻咽癌细胞 HNE-1 和 CNE-1 侵袭迁移[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6): 665-671.

[10] Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, et al. PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro[J]. Developmental Biology, 2003, 259(2): 241-257.

[11] Yuan ZY, Dai T, Wang SS, et al. Overexpression of ETV4 protein

in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis[J]. Oncotargets & Therapy, 2014, 7: 1733-1742.

[12] Aytes A, Mitrofanova A, Kinkade CW, et al. ETV4 promotes metastasis in response to activation of PI3-kinase and Ras signaling in a mouse model of advanced prostate cancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(37): 3506-3515.

[13] Keld R, Guo B, Downey P, et al. PEA3/ETV4-related transcription factors coupled with active ERK signalling are associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma[J]. British Journal of Cancer, 2011, 105(1): 124-130.

[14] Redell MS, Tweardy DJ. Targeting transcription factors for cancer therapy[J]. Current Pharmaceutical Design, 2005, 11(22): 2873-2887.

[15] Introna M, Golay J. How can oncogenic transcription factors cause cancer: a critical review of the myb story[J]. Leukemia, 1999, 13(9): 1301-1306.

[16] Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells?[J]. Cancer Cell, 2012, 22(6): 699-701.

[17] Acloque H, Adams MS, Fishwick K, et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1438-1449.

[18] Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2009, 28(1-2): 15-33.

(责任编辑:张辉洁)