

EphrinA2 基因促进 MDA - MB - 231 乳腺癌细胞迁移的初步研究

史 钟 郝肖夫 王晓稼

摘 要 **目的** 在 MDA - MB - 231 人乳腺癌细胞系中过表达 EphrinA2 基因,研究其对肿瘤细胞迁移能力的影响,并初步探讨其可能的作用机制。**方法** 用脂质体法将 EphrinA2 真核表达质粒转染至 MDA - MB - 231 细胞中,用 Western blot 法检测转染前后细胞中 EphrinA2、E - Cadherin 及 p27/Kip1 蛋白的表达;并用细胞疏散、细胞划痕及 Transwell 小室试验检测转染前后细胞迁移能力的变化;用 Rac1 抑制剂 NSC23766 抑制 Rac1 活性后用细胞划痕试验检测细胞迁移能力变化。**结果** 转染 EphrinA2 后的细胞迁移能力更强,并且呈现出 E - Cadherin 及 p27/Kip1 蛋白表达下降;用 NSC23766 抑制 Rac1 活性能抑制 EphrinA2 介导的细胞迁移。**结论** EphrinA2 能促进 MDA - MB - 231 乳腺癌细胞的迁移,其机制可能与 E - Cadherin 和 p27/Kip1 蛋白下调及 Rac1 活性抑制有关。

关键词 EphrinA2 MDA - MB - 231 迁移

中图分类号 R73 - 3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.018

A Primary Study on EphrinA2 Promoted Migration of MDA - MB - 231 Breast Cancer Cells. Shi Zhong, Yu Xiaofu, Wang Xiaojia. Department of Medical Oncology, Zhejiang Provincial Cancer Hospital, Zhejiang 310027, China

Abstract Objective To investigate the effect of EphrinA2 on cancer cell migration by transfecting recombinant eukaryotic expressing vector containing EphrinA2 cDNA into MDA - MB - 231 human breast cancer cells and to explore its potential mechanism. **Methods** We transfected recombinant eukaryotic expressing vector containing EphrinA2 cDNA into MDA - MB - 231 cells by lipofectamine 2000. Expression levels of EphrinA2, E - Cadherin and p27/Kip1 protein were measured by Western blotting. Cell migration ability was evaluated by cell scattering, wound healing assay and Transwell migration assay. We used NSC23766 to inhibit Rac1 activity and the cell migration ability after Rac1 inhibition was tested by wound healing assay. **Results** Cells transfected with EphrinA2 showed enhanced migration ability accompanied with decreased E - Cadherin and p27/Kip1 protein expression. Inhibition of Rac1 by NSC23766 could inhibit EphrinA2 - mediated cell migration. **Conclusion** These results collectively suggest that EphrinA2 could promote MDA - MB - 231 breast cancer cell migration and this function possibly involves E - Cadherin and p27/Kip1 protein down - regulation and Rac1 activity inhibition.

Key words EphrinA2; MDA - MB - 231; Migration

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。随着乳腺癌在中国女性中发生率的逐年提高,已经开始成为中国女性广泛关注并惧怕的“健康杀手”之一。乳腺癌的发生、发展过程可能涉及一系列异常的信号转导。而近年来,Eph (erythropoitin producing hepatocellular carcinoma) 受体家族被发现与多种恶性肿瘤的发生、转移及血管生成相关,可作为潜在的肿瘤分子标志物及治疗靶点^[1-4]。Eph 作为已知最大的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族亚家

族,迄今为止已发现包含至少 16 个受体和 9 个配体。在乳腺癌中,Eph/ephrin 信号同样具有促进肿瘤进展和血管生成、调节肿瘤干细胞稳态、抑制肿瘤发展等多面作用,且 Eph/ephrin 表达谱与乳腺癌患者的临床结果相关^[5-7]。Fox BP 等通过系统分析 Eph/ephrin 基因表达谱发现 Eph 家族中受体 EphA2、A7、A10 和配体 EphrinA2 及 B3 的上调与乳腺癌细胞系的侵袭性相关^[8]。其中 EphrinA2 为 Eph 受体 EphA3、EphA4、EphA5 和 EphA7 的配体。EphrinA2 已被证明能通过 Rac1/Akt/NF - κ B 信号通路来抑制肝细胞凋亡,而在乳腺癌发生、发展中的作用还没有相关研究^[9]。本研究发现 EphrinA2 在转移性乳腺癌细胞株 MDA - MB - 231 中表达上调,过表达 EphrinA2 能促进乳腺癌细胞的迁移,并且涉及 E - 钙黏蛋白(E -

基金项目:浙江省医药卫生平台骨干人才计划(2011RCB009)

作者单位:310022 杭州,浙江省肿瘤医院化疗中心(史钟、王晓稼),放疗科(郝肖夫)

通讯作者:王晓稼,主任医师,硕士生导师,电子信箱:wxiaojia0803@163.com

Cadherin) 和 p27/Kip1 的下调及 Ras - related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) 活性的参与, 揭示其可能在乳腺癌细胞的转移中发挥重要作用, 从而为乳腺癌治疗提供一个潜在的药物靶点。

材料与方法

1. 主要材料及试剂: 人乳腺癌细胞系 MDA - MB - 231、正常乳腺组织、菌株 *E. coli* DH5 α 、真核表达质粒 pcDNA3.1/Myc - His 为浙江省肿瘤医院肿瘤研究所保存。各种限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司。TRIzol、Superscripts II、G418、Lipofectamine 2000、DMEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司。Murine anti - Myc 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, Mouse anti - E - Cadherin、Mouse anti - p27/Kip1 抗体购自美国 R&D Systems。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce Biotech 公司。孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室购自美国 Costar 公司。

2. 细胞培养: 人乳腺癌细胞系 MDA - MB - 231 培养于含 10% 小牛血清及 1% 青霉素 - 链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 的培养箱中培养。

3. RT - PCR 检测 EphrinA2 表达水平: 用 TRIzol 法提取 MDA - MB - 231 细胞及正常乳腺组织的总 RNA, 进行 RNA 完整性及纯度的鉴定。使用 SUPERScript II 反转录酶进行反转录成 cDNA, 稀释 10 倍用于 PCR 反应。以人类 β - actin 基因作为内参对照。基因的扩增采用 Touch - Down PCR: 94 $^{\circ}$ C 5min; 25 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30s, 64 $^{\circ}$ C (-2 $^{\circ}$ C/循环) 30s, 72 $^{\circ}$ C 40s; 5 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 40s; 72 $^{\circ}$ C 5min。引物序列: β - actin: 正向引物: 5' - CACCATGTACCCTGGCATT - 3', 反向引物: 5' - GGCCGGACTCGTCATACTC - 3'; EphrinA2: 正向引物: 5' - TGCGA CTGAAGGTGT ACG - 3', 反向引物: 5' - GATGCTG CTGAGGAAGA G - 3'。

4. 真核表达载体的构建及转染: 参考 Feng 等^[9]的方法, 将人类 EphrinA2 基因的 cDNA 全长克隆入 pcDNA3.1/Myc - His 载体的合适位点, 得到 pcDNA3.1/Myc - His - EphrinA2 质粒。通过 Lipofectamine2000 试剂将 pcDNA3.1/Myc - His - EphrinA2 质粒及未克隆入基因的 pcDNA3.1/Myc - His 空质粒转染入人乳腺癌 MDA - MB - 231 细胞。转染的细胞通过 G418 (新霉素) 筛选, 3 ~ 4 周后耐药克隆消化分离后用含 G418 的维持培养液进行扩增, 并进一步由 Western blot 法证实外源 EphrinA2 的表达。我们保留了 2 个稳定过表达 EphrinA2 基因的细胞克隆进行进一步实验研究, 并以稳定转染了 pcDNA3.1/Myc - His 空质粒的细胞克隆作为 Mock 对照。

5. Western blot 法检测: 培养细胞用 PBS 冲洗两遍后置于 RIPA 缓冲液中于冰上裂解 30min, 细胞裂解液离心后收集上清。各组细胞取 20 μ l 裂解液, 经 10% SDS - PAGE 电泳后, 转移到 PVDF 膜上, 封闭 1h 后用相应的抗体包被, 采用 ECL 显色方法进行显色。实验重复 2 次。

6. 细胞疏散 (cell scattering) 实验: 把各组细胞以 1×10^5 个/培养皿的密度种入 3.5cm 培养皿, 生长 7 天后, 用结晶紫

染色, 观察形态。每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。

7. 细胞划痕实验: 接种细胞前用记号笔在 12 孔板背面画横线标记, 各组细胞消化后接种入 12 孔板。细胞贴壁并达到完全融合后, 用 200 μ l 枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 尽量保证各个划痕宽度一致。吸去培养液, 用 PBS 冲洗孔板 3 次, 洗去划痕产生的细胞碎片。加入无血清 DMEM 培养基, 拍照记录。将培养板放入培养箱培养, 20h 后取出, 置于倒置显微镜下观察划痕愈合程度并拍照。测量细胞越过 0h 划痕边界的迁移距离, 计算相对迁移率。以转染 pcDNA3.1/Myc - His 空载体并且未进行药物处理的 MDA - MB - 231 细胞作为对照组, 以对照组细胞越过 0h 划痕边界的迁移距离作为 100%, 相对迁移率 (%) = 实验组细胞越过 0h 划痕边界的迁移距离 / 对照组细胞越过 0h 划痕边界的迁移距离 $\times$ 100%。每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。

8. Transwell 小室实验: 于 Transwell 培养板上室加入 200 μ l 含 0.5% BSA 的无血清 DMEM 培养基制备的各组细胞悬液 (3×10^4 个), 下室加入含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 600 μ l, 置于培养箱中培养 24h。取出上室, 做好标记, PBS 洗 3 次, 用预冷的甲醛固定 30min, 伊红染色 1min, PBS 清洗后棉签擦去上室未转移的细胞。倒置显微镜下观察移至微孔膜下层的细胞并拍照。每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。

9. 统计学方法: 采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 所有的数据都用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。不同组之间的比较用 *t* 检验进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RT - PCR 检测 EphrinA2 的表达: 如图 1 所示, EphrinA2 在正常乳腺组织中未见表达, 而在转移性乳腺癌细胞 MDA - MB - 231 细胞中 mRNA 表达明显上调, 这与 Fox 等^[8]的结果一致。

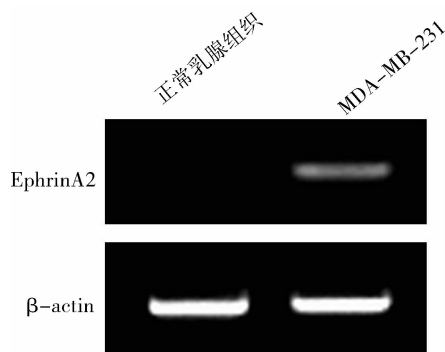


图 1 EphrinA2 mRNA 在 MDA - MB - 231 细胞中表达

2. EphrinA2 过表达能抑制 E - Cadherin 和 p27/Kip1 蛋白表达: 我们把稳定转染了 pcDNA3.1/Myc - His 空质粒的细胞克隆命名为 MDA231 - Mock, 把稳定表达 EphrinA2 基因的 2 个细胞克隆分别命名为 MDA231 - EfnA2 - c1 和 MDA231 - EfnA2 - c2。由于

过表达载体中具有 Myc - His 标签,用 anti - Myc 抗体即可检测外源 EphrinA2 的表达,如图 2 所示,Western blot 法检测结果显示,MDA231 - EfnA2 - c1 和 c2 能稳定表达外源 EphrinA2 蛋白,而 MDA231 - Mock 未检测到外源 EphrinA2 表达。

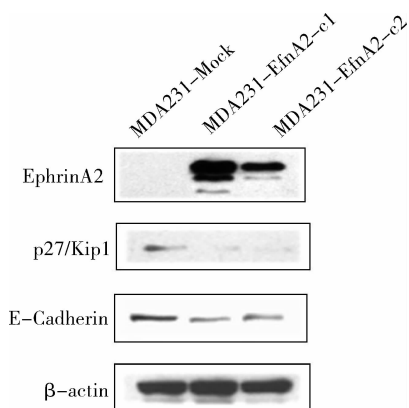


图 2 过表达 EphrinA2 抑制 E - Cadherin 和 p27/Kip1 蛋白表达

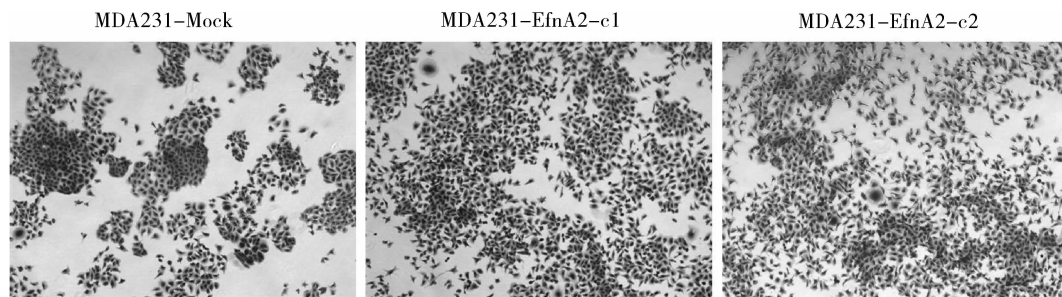


图 3 过表达 EphrinA2 促进细胞疏散(结晶紫染色, ×200)

4. 过表达 EphrinA2 能促进细胞迁移:(1)细胞划痕试验(wound healing assay)结果:体外细胞划痕试验是二维水平评估细胞定向运动能力的一种手段,能反映细胞侧向爬行迁移能力。如图 4 所示,对 MDA - MB - 231 细胞进行划痕试验的定性分析结果表明,MDA231 - EfnA2 - c1 和 c2 细胞向划痕边缘爬行速度更快,划痕宽度明显变窄,部分细胞已达划痕中央;而 MDA231 - Mock 细胞爬行速度较慢,划痕修复较少。说明 EphrinA2 能促进 MDA - MB - 231 乳腺癌细胞的侧向爬行迁移能力。(2)Transwell 结果:Transwell 小室试验能反映肿瘤细胞纵向运动能力,我们用 Transwell 试验来进一步检测 EphrinA2 基因过表达对 MDA - MB - 231 乳腺癌细胞迁移能力的影响。如图 5 所示,MDA231 - EfnA2 - c1 和 c2 与 MDA231 - Mock 组相比,穿到 Transwell 小室下面的细胞数明显增加。

笔者同时检测了与抑制细胞迁移相关的蛋白 E - Cadherin 和 p27/Kip1。结果发现,在过表达 EphrinA2 基因的细胞株中,E - Cadherin 和 p27/Kip1 相比对照组下调,提示 EphrinA2 有可能通过抑制 E - Cadherin 和 p27/Kip1 蛋白来促进 MDA - MB - 231 乳腺癌细胞迁移(图 2)。

3. EphrinA2 基因过表达能促进 MDA - MB - 231 细胞疏散:细胞疏散能力是反应肿瘤细胞转移能力的指标之一。如图 3 所示,MDA231 - Mock 细胞株具有典型的上皮细胞多边形特征,细胞与细胞紧密连接,形成致密的集落;仅有少量的集落边缘的细胞表现出成纤维细胞样的形态并游离出集落。而 MDA231 - EfnA2 - c1 和 c2 细胞株形成的集落较为松散,邻近细胞间接触不紧密,并有许多单个或成组的细胞游离出母集落,并表现为成纤维细胞样形态。这些结果表明,EphrinA2 基因过表达能促进 MDA - MB - 231 细胞疏散。

5. Rac1 活性可能对 EphrinA2 介导的细胞迁移至关重要:NSC23766 是一种通用的 Rac1 活性抑制剂,能在体外有效抑制细胞中 Rac1 活性,并呈剂量依赖模式^[10]。笔者分别用含 50、100、200nmol/L 浓度的 NSC 23766 的培养基预处理受试细胞 24h,再对处理过的细胞进行划痕试验(wound healing assay),研究 Rac1 活性对细胞迁移的影响。测量细胞越过 0h 划痕边界的迁移距离,计算相对迁移率。以未进行药物处理的 MDA 231 - Mock 细胞作为对照组,以对照组细胞越过 0h 划痕边界的距离作为 100%,相对迁移率(%) = 实验组细胞越过 0h 划痕的迁移距离/对照组细胞越过 0h 划痕的迁移距离 × 100%。笔者用(1 - NSC23766 抑制后的相对迁移率/未加抑制剂的相对迁移率) × 100% 来计算 NSC 23766 对细胞迁移的抑制率。

如图 6、表 1 所示,Rac1 活性抑制剂 NSC23766

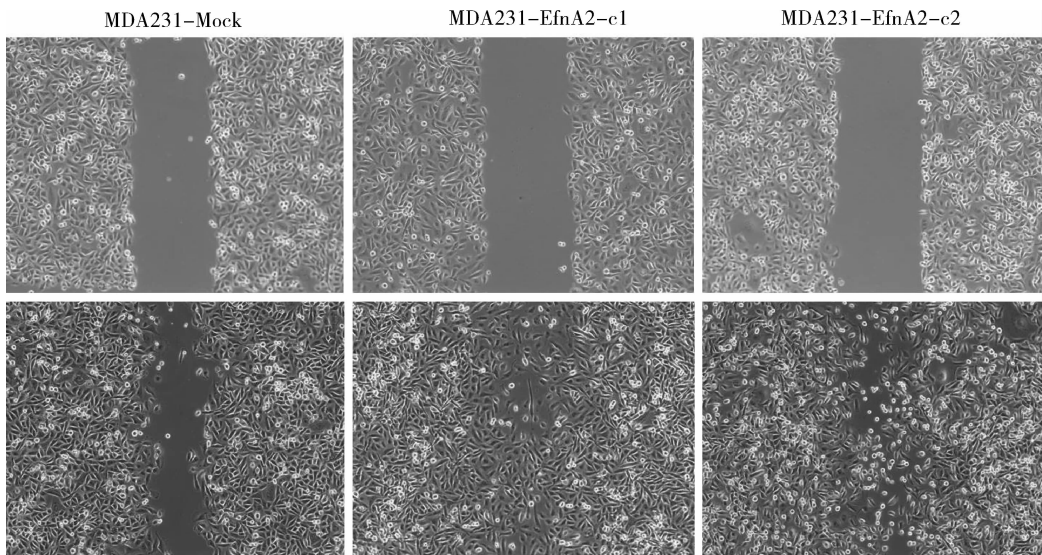


图 4 过表达 EphrinA2 促进细胞迁移(划痕试验)(伊红染色, ×200)

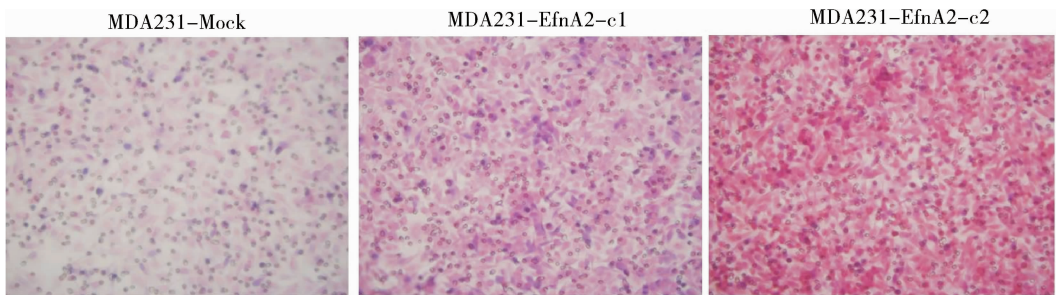


图 5 过表达 EphrinA2 促进细胞迁移(Transwell 小室试验,伊红染色, ×100)

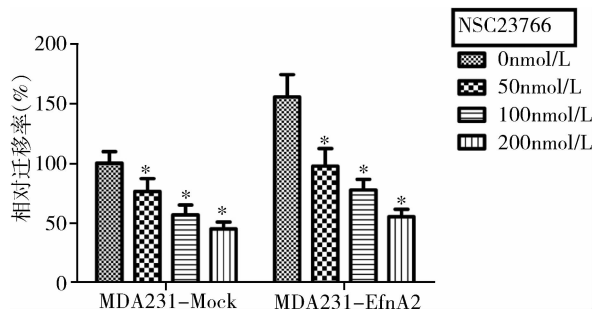


图 6 Rac1 活性可能对 EphrinA2 介导的细胞迁移至关重要(划痕试验)

以转染 PCDNA3.1/Myc-His 空载体并且未进行药物处理的 MDA-MB-231 细胞作为对照组,以对照组细胞越过 0h 划痕边界的迁移距离为 100%;与 0nmol/L 相比, * $P < 0.05$

比较亦均有统计学意义($P < 0.05$)。其中,50、100 及 200nmol/L 对 EphrinA2 过表达组的抑制率分别为 23.41%、43.41% 和 55.12%;而对普通 MDA231-Mock 细胞组的抑制率分别为 37.30%、50.16% 和 64.58%,说明 NSC23766 对 MDA231-EfnA2 组抑制更明显($P < 0.05$)。

表 1 NSC23766 能抑制 MDA231-Mock 和 MDA231-EfnA2 细胞迁移

组别	NSC23766 抑制率(%)		
	50nmol/L	100nmol/L	200nmol/L
MDA231-Mock	23.41	43.41	55.12
MDA231-EfnA2	37.30 *	50.16 *	64.58 *

与 MDA231-Mock 相比较, * $P < 0.05$

讨 论

三阴性乳腺癌恶性程度高,易侵袭、转移,对内分泌治疗和曲妥珠单抗均不敏感,是近几年乳腺癌治疗领域的难点。MDA-MB-231 细胞是从三阴性乳腺

处理细胞后 MDA231-Mock 组和 MDA231-EfnA2 组迁移率均下降,说明抑制 Rac1 活性能明显抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移,并呈剂量依赖模式。NSC23766 抑制剂对 MDA231-Mock 和 MDA231-EfnA2 两种细胞处理后各自 3 个浓度组间

癌患者癌性胸水分离出的细胞株,可作为一个很好的转移性三阴性乳腺癌研究模型^[11]。

本研究发现,EphrinA2 基因在转移性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 中较正常乳腺组织表达上调。在 MDA-MB-231 细胞系中进一步过表达 EphrinA2 蛋白后能促进肿瘤细胞疏散、迁移。细胞疏散能反映肿瘤细胞的平面扩散能力,而细胞划痕实验、Transwell 小室实验分别反映肿瘤细胞的平面侧向爬行能力及纵向运动能力,这些结果综合起来表明 EphrinA2 过表达之后细胞的迁移能力提高,提示 EphrinA2 能潜在地促进 MDA-MB-231 细胞的转移能力。

EphrinA2 作为 Eph 受体酪氨酸激酶家族的一个配体,可能通过调节一系列下游分子来发挥其促进细胞迁移的作用,我们对此进行了一些初步研究。首先,笔者研究发现,过表达 EphrinA2 能抑制 E-Cadherin 和 p27/Kip1 蛋白表达。E-Cadherin 是一种跨膜糖蛋白,介导细胞间黏附,参与细胞间连接的形成和维护。E-Cadherin 在转移性乳腺癌细胞中常常下调,被认为是乳腺癌的转移抑制基因,且其下调往往与乳腺癌的临床恶性程度与不良预后相关^[12];E-Cadherin 下调也是肿瘤转移进展过程中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)发生的重要标志事件^[13]。E-Cadherin 下调可能是过表达 EphrinA2 促进 MDA-MB-231 细胞迁移的原因之一,而 EphrinA2 抑制 E-Cadherin 的机制有待进一步研究。已知 E-Cadherin 上游的抑制因子包括 Snail、zinc finger protein SIP1、TGF- β 等,EphrinA2 亦可能通过干扰这些信号通路来下调 E-Cadherin,其具体机制还有待进一步研究。

p27/Kip1 蛋白属于细胞周期调控蛋白 Cip/Kip 家族,它不仅在多种恶性肿瘤中能通过负性调节细胞周期来抑制肿瘤,还能影响肿瘤细胞迁移和侵袭能力^[14]。最近还有研究表明 p27/Kip1 能以 STAT3 依赖模式通过抑制 MnSOD 来抑制小鼠 MEF 细胞迁移^[15]。EphrinA2 过表达引起的 p27/Kip1 下调可能是促进 MDA-MB-231 细胞迁移的另一原因。

Rac1 是 Rho 家族成员之一,它参与细胞的运动与黏附,在肿瘤的侵袭与转移中发挥重要作用,Rac1 下调能抑制乳腺癌细胞迁移^[16,17]。某些 Eph/ephrin 成员能在一些细胞类型中调节 Rho 家族蛋白的活性,如 Ephrin-B3 能通过调节 Rac1 活性来影响神经胶质瘤的侵袭性^[18]。EphrinA2 在肝细胞癌细胞中过表达能刺激 Rac1 活性提高,通过 Rac1/Akt/NF- κ B

信号通路来抑制肝癌细胞凋亡,而用 Rac1 的特异抑制剂 NSC23766 阻断 Rac1 活性后则能废除 EphrinA2 介导的抗凋亡作用^[9]。假定 EphrinA2 在乳腺癌细胞也能刺激 Rac1 活性,通过上调 Rac1 来促进细胞迁移;而阻断 Rac1 活性后也能废除 EphrinA2 介导的促迁移作用。如前述结果所示,NSC23766 预处理 MDA-MB-231 细胞抑制 Rac1 活性后,MDA231-EfnA2 组和 MDA231-Mock 组细胞的迁移能力均下降。由于对照组 MDA231-Mock 细胞也有部分 EphrinA2 的表达,因此 NSC23766 也能抑制对照组细胞的迁移。但是 MDA231-EfnA2 组能更强烈地表达 EphrinA2,因而 NSC23766 对 MDA231-EfnA2 组的细胞迁移抑制更明显。这与笔者之前的假设一致,说明 EphrinA2 在乳腺癌细胞中也很可能通过调节 Rac1 活性来发挥作用。接下来的研究将着重于调查 Rac1 是否通过调节其下游分子发挥功能,并且如何调节?

综上所述,本研究结果表明,EphrinA2 能促进 MDA-MB-231 乳腺癌细胞迁移,这一功能可能与它能抑制 Rac1 活性及 E-Cadherin 和 p27/Kip1 蛋白表达相关;研究结果为转移性三阴性乳腺癌治疗提供了一个潜在的药物靶点。

参考文献

- Alonso-Colmenar LM. Eph/ephrin signaling in cancer: intricate, puzzling and... fascinating! [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(2): 100-101
- Xi HQ, Wu XS, Wei B, *et al*. Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(12): 2894-2909
- Li RX, Chen ZH, Chen ZK. The role of EPH receptors in cancer-related epithelial-mesenchymal transition [J]. *Chin J Cancer*, 2014, 33(5): 231-240
- Chen J, Song W, Amato K. Eph receptor tyrosine kinases in cancer stem cells [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(1): 1-6
- Vaught D, Brantley-Sieders DM, Chen J. Eph receptors in breast cancer: roles in tumor promotion and tumor suppression [J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(6): 217
- Kaenel P, Mosimann M, Andres AC. The multifaceted roles of Eph/ephrin signaling in breast cancer [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, 6(2): 138-147
- Brantley-Sieders DM, Jiang A, Sarma K, *et al*. Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24426
- Fox BP, Kandpal RP. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(4): 882-892

- 9 Feng YX, Zhao JS, Li JJ, *et al.* Liver cancer: EphrinA2 promotes tumorigenicity through Rac1/Akt/NF- κ B signaling pathway 120 [J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 535-544
- 10 Gao Y, Dickerson JB, Guo F, *et al.* Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(20): 7618-7623
- 11 Gazdar AF, Kurvari V, Virmani A, *et al.* Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 1998, 78(6): 766-774
- 12 Mohammadizadeh F, Ghasemibasis H, Rajabi P, *et al.* Correlation of E-cadherin expression and routine immunohistochemistry panel in breast invasive ductal carcinoma [J]. *Cancer Biomark*, 2009, 5(1): 1-8
- 13 Zhai X, Zhu H, Wang W, *et al.* Abnormal expression of EMT-related proteins, S100A4, vimentin and E-cadherin, is correlated with clinicopathological features and prognosis in HCC [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(6): 970
- 14 Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, *et al.* p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(1): 51-63
- 15 Zhang D, Wang Y, Liang Y, *et al.* Loss of p27 upregulates MnSOD in a STAT3-dependent manner, disrupts intracellular redox activity and enhances cell migration [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 13): 2920-2933
- 16 Koh MS, Moon A. Activation of H-Ras and Rac1 correlates with epidermal growth factor-induced invasion in Hs578T and MDA-MB-231 breast carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(1): 25-29
- 17 Lewis-Saravalli S, Campbell S, Claing A. ARF1 controls Rac1 signaling to regulate migration of MDA-MB-231 invasive breast cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(9): 1813-1819
- 18 Nakada M, Drake KL, Nakada S, *et al.* Ephrin-B3 ligand promotes glioma invasion through activation of Rac1 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8492-8500

(收稿日期:2015-09-05)

(修回日期:2015-09-29)

性别差异对 TWA 的影响

周纪宁 刘娟 刘炜 陈芳

摘要 目的 探讨性别差异对 TWA 的影响,旨在提高临床工作者对 TWA 的诊断率。**方法** 选择武汉大学人民医院 2012 年 8 月~2013 年 10 月行平板运动试验(treadmill exercise test, TET)的患者 140 例,其中,男性 62 例,女性 78 例,患者年龄 52.64 ± 9.69 岁。采用 GE 公司提供的 Marquette T 波电交替(microvolt T wave alternans, MTWA)分析程序,进行标准时域运动试验,并对其进行焦虑自评量表(SAS)的问卷调查。最后对患者的性别、年龄、MTWA、TET 等数据进行分析。**结果** 不同性别间焦虑评分存在差异(T 检验, $P=0.008$)。性别因素与 TWA 结果相关性(Logistic 回归分析, $P=0.824$, OR = 0.761, 95% CI: 0.068 ~ 8.500)不明显,运动平板试验结果与 TWA 结果相关性(Logistic 回归分析, $P=0.499$, OR = 0.492, 95% CI: 0.063 ~ 3.853)也不明显。**结论** 性别对 TWA 结果影响不大,但是临床工作者不能忽视性别差异,因为可能是性别差异对 TWA 的不同影响相互作用,导致性别对 TWA 的影响不明显。因此医生在下临床诊断时还应将性别纳入考虑之列,并结合患者的临床实际,实事求是的给患者一个准确的诊断,以此发挥 TWA 预测心脏性猝死和恶性心律失常的重要作用。

关键词 性别差异 T 波电交替 焦虑 运动平板试验 影响

中图分类号 R54 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.019

Influence of Gender Differences on TWA. Zhou Jining, Liu Juan, Liu Wei, *et al.* Renmin Hospital of Wuhan University, Department of Cardiology, Hubei 430060, China

Abstract Objective To discuss the influence of gender differences on TWA to improve the right diagnosis rate of clinical workers on TWA. **Methods** Totally 140 cases of patients who took the test of treadmill exercise were selected as the subjects, including 62 cases of men and 78 cases of women from August 2012 to August 2013 at Renmin Hospital of Wuhan University. Then standard time domain movement exercise was carried out through Marquette Microvolt T wave alternans (MTWA) analysis procedure provided by GE corporation. And the investigation of questionnaire of self-evaluation of anxiety scale (SAS) was take. Finally, each patient's gender, age, TET, MTWA and the score of SAS were analyzed. **Results** Anxiety score was different between different genders (t test, $P=0.008$). The corre-

基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(2012 JX6B61)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科

通讯作者:陈芳,主任护师,电子信箱:1196798958@qq.com