

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.05.007

· 临床研究 ·

## ECT2 基因在人胰腺导管腺癌中的表达及对胰腺癌细胞生物学特性的影响

朱婕, 顾炎, 刘艳芳, 武健, 王紫欣, 曹雪涛(海军军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:** 探讨上皮细胞转化序列 2 (epithelial cell transforming 2, ECT2) 基因在人胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 中的表达及其对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响。**方法:** 采集 2018 年 7 月至 2019 年 3 月在海军军医大学附属长海医院病理科 PDAC 及相应癌旁样本各 35 例。通过 GEO 数据库中胰腺癌基因表达谱筛选差异表达基因, 采用 TCGA 数据分析该基因在 PDAC 中的表达及与患者生存的相关性。以 qPCR 及免疫组化在人 PDAC 样本中验证了 ECT2 mRNA 及蛋白的表达。以 siRNA 干扰人胰腺癌细胞系 PANC-1 中 ECT2 基因的表达, CCK-8 增殖实验检测肿瘤细胞增殖, 流式细胞术检测对胰腺癌细胞凋亡的影响, 最后 WB 检测凋亡相关蛋白的变化。**结果:** 生物信息学分析筛选出胰腺癌中差异表达基因 ECT2, TCGA 数据库分析发现其在癌组织中高表达 ( $t=4.005, P<0.05$ ) 并与生存显著相关 ( $P<0.01$ )。mRNA ( $1.01\pm 0.06$  vs  $4.25\pm 0.12, t=24.09, P<0.01$ ) 及蛋白水平验证其在人 PDAC 样本中高表达。干扰 ECT2 基因后, 其细胞增殖受到明显抑制 ( $P<0.01$ )、他莫昔芬诱导的细胞凋亡显著增加 ( $P<0.01$ ), 同时影响凋亡相关蛋白 BAX 及 BCL-2 的表达。**结论:** ECT2 基因在人 PDAC 中高表达并与患者生存相关, 其增加了胰腺癌细胞的增殖及抗凋亡能力。本结果为探讨 ECT2 作为胰腺癌预后判断及治疗新靶点提供了实验依据。

**[关键词]** 胰腺导管腺癌; 上皮细胞转化序列 2; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R735.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)05-0524-06

## Expression of ECT2 gene in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its effect on tumor biological characteristics

ZHU Jie, GU Yan, LIU Yanfang, WU Jian, WANG Zixin, CAO Xuetao (National Key Laboratory of Medical Immunology & Institute of Immunology, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the expression of ECT2 (epithelial Transforming sequence 2) gene in human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and its effect on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells. **Methods:** Carcinoma tissues and corresponding para-carcinoma tissues from 35 PDAC patients at Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University from July 2018 to March 2019 were collected for this study. The differentially expressed genes in pancreatic cancer were screened out by using Gene Expression Omnibus (GEO) Database. Then, the related gene expression in PDAC and its relation with patients' survival were analyzed by The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. QPCR and immunohistochemistry were used to verify the mRNA and protein expressions of ECT2 in human PDAC samples. To explore the effect of ECT2 on the biological behaviors of pancreatic cancer cells, si-RNA was used to silence the ECT2 gene in pancreatic cancer PANC-1 cells, and CCK-8 proliferation assay and Flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis rate of PANC-1 cells after ECT2 silence. Finally, the expressions of apoptosis-related proteins were detected by WB. **Results:** The differentially expressed gene-ECT2, was screened out by analyzing the gene expression profiles of human pancreatic cancer in GEO database. TCGA database analysis showed that ECT2 was highly expressed in pancreatic cancer tissues ( $t=4.005, P<0.05$ ) and significantly correlated with patients' survival ( $P<0.01$ ). Moreover, it is also verified that ECT2 was highly expressed in PDAC tissues at mRNA ( $1.01\pm 0.06$  vs  $4.25\pm 0.12; t=24.09, P<0.01$ ) and protein level. After ECT2 silence in PANC-1 cells, the proliferation rate was decreased ( $P<0.01$ ), while the Tamoxifen-induced apoptosis rate was increased ( $P<0.01$ ), and the expressions of apoptosis-related proteins (BAX and Bcl-2) were also affected. **Conclusion:** ECT2 is highly expressed in human pancreatic ductal adenocarcinoma and is related with patients' survival. ECT2 promotes the proliferation and apoptosis resistance of pancreatic cancer cells, providing the basis for exploring ECT2 as a new target for the prognostic judgment and treatment of pancreatic cancer.

**[基金项目]** 上海市青年科技启明星计划资助(No. 19QA1411300)。Project supported by Shanghai Rising-Star Program (No. 19QA1411300)

**[作者简介]** 朱婕(1993-), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫及肿瘤微环境的基础研究, E-mail: zhujieqq@yeah.net

**[通信作者]** 曹雪涛(CAO Xuetao, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事天然免疫及肿瘤免疫研究, E-mail: caoxt@immunol.org

**[Key words]** pancreatic ductal adenocarcinoma(PDAC); epithelial Transforming sequence 2(ECT2); proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(5): 524-529. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.05.006]

胰腺癌是恶性程度较高的消化道肿瘤,其中约90%是起源于胰腺导管上皮的胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC),其发病率与病死率逐年上升,五年生存率只有不到4%<sup>[1]</sup>。目前,手术依然是PDAC的主要治疗方式,但研究表明切除原发灶并不能显著提高PDAC患者的生存率,因此迫切需要有效的生物学标志物进行早期诊断及评估治疗疗效<sup>[2]</sup>。上皮细胞转化序列2(epithelial cell transforming 2, ECT2)基因编码蛋白为鸟嘌呤核苷酸交换因子和转化蛋白,其可催化GDP转换为GTP,该基因的表达随着DNA合成而升高,并在细胞周期G2及M期有较高水平的表达,在胞质分裂的调节中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。已有研究<sup>[4-6]</sup>报道,ECT2在多种恶性肿瘤中异常表达,其可促进肺腺癌、乳腺癌、骨肉瘤的增殖、侵袭及转移,因此ECT2的表达水平可作为肿瘤患者诊断、干预复发及评估放化疗疗效的重要生物标志

物。而关于ECT2在PDAC中的作用研究得较少,本研究通过结合生物信息学分析,筛选出ECT2在人PDAC中高表达,与患者较差的预后显著相关,并探究了其在肿瘤细胞增殖、抗凋亡中的作用及其具体的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物信息学分析

1.1.1 数据获取与基因筛选 GEO数据库下载基因表达谱数据 GSE15471<sup>[7]</sup>、GSE16515<sup>[8]</sup>、GSE28735<sup>[9]</sup>、GSE62452<sup>[10]</sup>。芯片数据和样本分类见表1。利用在线分析工具 GEO2R 对表达谱芯片差异基因进行分析。筛选条件为  $\text{adj } P < 0.05$  和  $\text{logFC} > 1$ 。利用 Venny (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 分析4个数据集共同上调及下调差异基因。

表1 GEO数据库胰腺癌样本信息(n)

Tab. 1 Information of pancreatic cancer samples in GEO database(n)

Data set	Platform	Normal	Tumor	Sample source
GSE15471	GP570	39	36	Pancreatic ductal adenocarcinoma
GSE16515	GP570	16	36	Pancreatic ductal adenocarcinoma
GSE28735	GPL6244	45	45	Pancreatic ductal adenocarcinoma
GSE62452	GPL6244	61	69	Pancreatic ductal adenocarcinoma

1.1.2 TCGA数据库生存分析 下载TCGA数据中的胰腺癌患者二代测序数据以及临床信息,包括178例癌组织以及4例癌旁组织。利用R语言对基因表达数据进行处理、分析,并绘制患者生存曲线。

### 1.2 样本资料、细胞株及主要试剂

收集2018年7月至2019年3月在海军军医大学附属长海医院病理科胰腺导管腺癌组织标本35例,其中男性20例、女性15例,中位年龄47.2岁(41~67岁)。同时取距离癌灶边缘3~5 cm的相应癌旁组织标本作为对照。所选患者术前3个月内均未行任何抗肿瘤治疗,并术后病理学诊断均为胰腺导管腺癌。本课题全部研究方案及程序经医院伦理委员会审查批准,并均与患者签署知情同意书。

人PDAC细胞株PANC-1购自美国模式培养物集存库(ATCC)。细胞用含10%胎牛血清的DMEM于37℃恒温恒湿孵箱中培养。

胎牛血清、DMEM培养基、转染试剂Lipofectamine RNAiMAX均购自Thermo Fisher Scientific公司,RNA

提取试剂盒购自飞捷公司,Real-time PCR试剂盒购自TaKaRa公司,免疫组织化学试剂盒及DAB显色试剂盒购自武汉谷歌生物公司,Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购自Biolegend公司,CCK-8增殖试剂盒购自东仁化学科技有限公司,ECT2小干扰RNA(siRNA)及相应阴性对照均由上海吉玛公司合成,鼠抗人ECT2单克隆抗体购自美国Abcam公司,蛋白裂解液、鼠抗人 $\beta$ -actin内参抗体、兔抗人BAX单克隆抗体及HRP标记抗鼠和兔的二抗均购自美国CST公司,兔抗人BCL-2单克隆抗体购自美国Bioworld公司。

### 1.3 qPCR检测人胰腺癌组织样本中ECT2 mRNA表达水平及ECT2干扰水平

取胰腺癌组织患者癌及相应癌旁组织,加入500  $\mu$ l RNA裂解液,于匀浆仪中匀浆2 min,4℃ 1 500 $\times$ g离心3 min,取上清提取总RNA。取2  $\mu$ g RNA根据RNA反转录试剂盒反转录为cDNA,以此为模板进行qPCR扩增,ECT2上游引物为5'-ACTACTGGGAGGAC-TAGCTTG-3',下游引物为5'-CACTCTTGTT

TCAATCTGAGGCA-3', 内参 GAPDH 上游引物为 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3', 下游引物为 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。qPCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 15 s, 56°C 退火 10 s, 72°C 延伸 20 s, 共 40 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值表示 ECT2 mRNA 的相对表达水平。

#### 1.4 免疫组织化学染色检测人胰腺癌样本中 ECT2 蛋白表达水平

选取人胰腺癌及癌旁组织标本石蜡切片进行免疫组织化学染色, 二甲苯脱蜡, 乙醇水化, 过氧化氢去除内源性过氧化物酶后使用柠檬酸盐溶液抗原修复, 羊血清工作液于室温下封闭 1 h, 滴加 1:200 鼠抗人 ECT2 单克隆抗体 4°C 过夜, 滴加抗鼠二抗室温孵育 1 h 后, 加入新鲜配置的 DAB 显色液, 苏木精进行细胞核染色, 乙醇梯度脱水后中性树脂封片观察染色情况。光镜下( $\times 200$ )随机选择 5 个视野进行拍照。结果判定综合染色强度和阳性细胞数的百分比进行半定量分析: 无染色(-)为 0 分, 染色弱(+)为 1 分, 染色强呈棕黄色(++)为 2 分, 染色极强呈深棕色(+++)为 3 分。阳性细胞数 0%~4.9% 为 0 分, 5.0%~24.9% 为 1 分, 25.0%~49.9% 为 2 分, 50.0%~74.9% 为 3 分,  $\geq 75.0\%$  为 4 分。两项积分的乘积  $< 4$  为 ECT2 蛋白阴性表达,  $\geq 4$  为 ECT2 蛋白阳性表达。

#### 1.5 PANC-1 细胞转染 siRNA

靶向 ECT2 及相应阴性对照的 siRNA 均由上海吉玛公司合成, 其序列为: 5'-CCUUGUAGUUGAAGAGAAUTT-3', 前一日铺细胞于相应孔板中, 按照说明书使用 Lipofectamine RNAiMAX 转染 siRNA, 转染 6 h 后更换新鲜培养基, 后将培养板置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 48 h, 收集孔板中的细胞提取总 RNA, 进行 qPCR 检测干扰效率。

#### 1.6 人 PDAC 组织匀浆

取组织块(0.2~1 g)在冷 PBS 中漂洗, 除去血液, 将组织置于 2 ml EP 管中, 加入相应 RNA 裂解液或蛋白裂解液, 并放入钢珠, 在预冷的匀浆仪中 10 000 r/min 上下研磨 100 s, 制成组织匀浆, 以备后续实验使用。

#### 1.7 CCK-8 实验检测干扰 ECT2 对 PANC-1 细胞增殖的影响

分别将实验组与对照组细胞  $1 \times 10^4$  种植于 96 孔板中, 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中分别培养 1、2、3、4 d, 每个时间点每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 2 h 后用酶标仪检测波长 450 nm 处光密度(D)值, 以 D 值代表细胞增殖水平。实验重复 3 次。

#### 1.8 流式细胞术检测干扰 ECT2 对 PANC-1 细胞凋亡的影响

实验组及对照组细胞用 15  $\mu$ mol/L 他莫昔芬诱导

凋亡 24 h 后收集各组待测细胞, 冷 PBS 洗涤后, 用结合缓冲液将细胞制成  $1 \times 10^6$  个/ml 的悬液, 然后加入 Annexin V-FITC 抗体, 避光室温孵育 10 min, 再加入碘化丙啶(Propidium iodide, PI), 避光室温孵育 5 min, 流式细胞术检测。

#### 1.9 WB 检测干扰 ECT2 对 PANC-1 细胞中凋亡相关蛋白 BAX 及 BCL-2 表达的影响

使用 SDS-PAGE 分离总蛋白, 并将其转移到硝酸纤维素膜。使用 5% 牛血清白蛋白(BSA)充分封闭纤维素膜, 并与 BAX 及 BCL-2 抗体 4°C 孵育过夜。次日, TBST 洗 3 遍后, 使用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)孵育 1 h, TBST 洗 3 遍后, 使用增强的化学发光试剂显影液检测目标蛋白的表达水平。

#### 1.10 统计学处理

本实验数据采用 GraphPad Prism 软件处理, 所有实验结果均由 3 次独立重复实验得出, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 利用 GEO 数据库筛选胰腺癌关键差异基因 ECT2

选取 GEO 数据库中 GSE15471、GSE16515、GSE28735、GSE62452 这 4 个胰腺癌数据集, 分析肿瘤和癌旁组织的差异基因, 分别得到 2 058、2 363、428、292 个差异基因。并利用 Venny 得到 4 个数据集共同上调基因 129 个, 共同下调基因 27 个(图 1A)。String 数据库包含大量的已知蛋白相互作用关系, 可以帮助确定位于分子网络节点的一些关键基因。利用 Cytoscape 中 MCODE 插件筛选到 3 个关键基因模块(图 1B)。其中 ECT2 分子处于关键节点基因, 其在肺癌、肝癌等发生发展中起关键作用, 而胰腺癌中还鲜有报道, 有待进一步的探究。

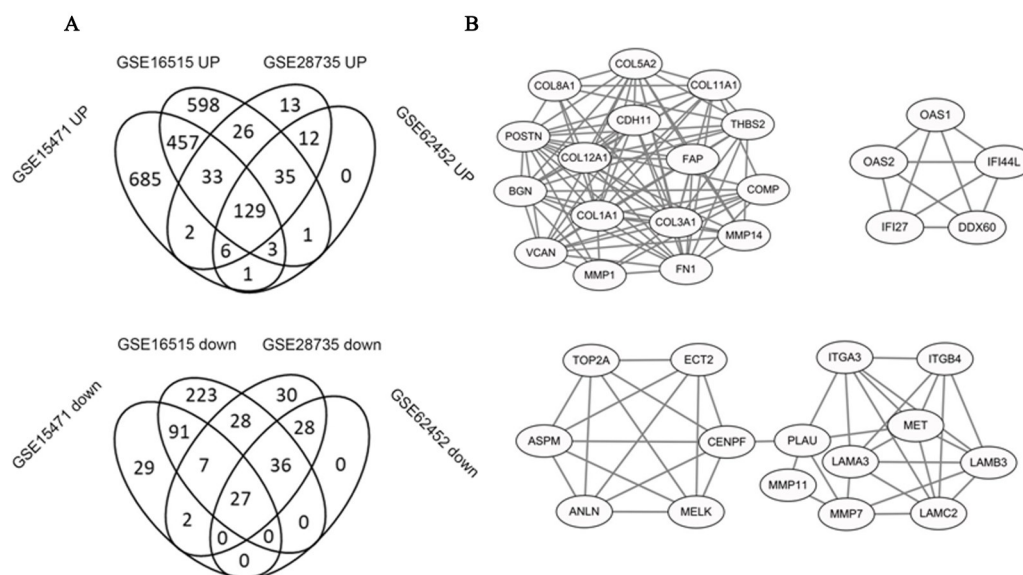
### 2.2 TCGA 数据库验证 ECT2 基因及与患者预后的相关性

利用 TCGA 数据库中包含的 178 例癌组织以及 4 例癌旁组织的 PDAC 患者的测序数据对 ECT2 分子的临床意义进行分析。结果表明, 癌组织的 ECT2 表达量显著高于癌旁组织( $t=4.005$ ,  $P < 0.05$ ; 图 2A), 并且癌组织中 ECT2 高表达患者生存期显著下降( $P < 0.01$ , 图 2B)。

### 2.3 人 PDAC 组织中 ECT2 mRNA 和蛋白呈高表达

qPCR 检测结果(图 3A)显示, 人 PDAC 组织中 ECT2 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织( $1.01 \pm 0.06$  vs  $4.25 \pm 0.12$ ,  $t=24.09$ ,  $P < 0.01$ )。免疫组织化学染色检测结果(图 3B)同样印证了 qPCR 的结果。



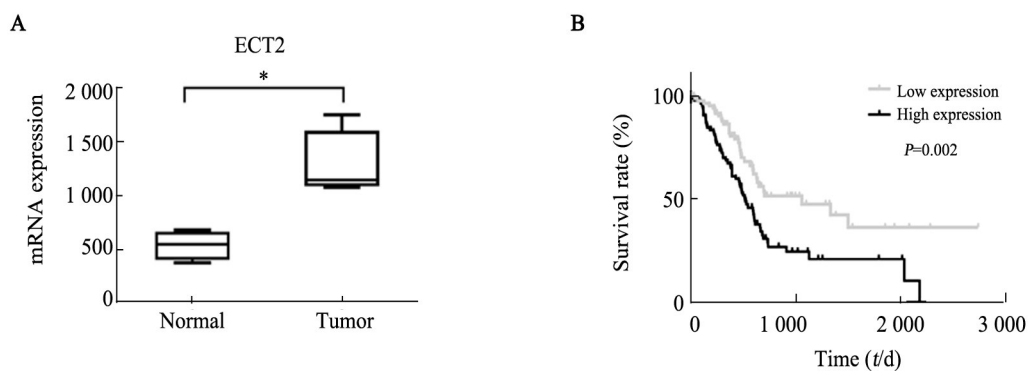


A: Venny diagrams of the differently expressed genes identified in four datasets;

B: Screening three key gene modules with MCODE plug-in in Cytoscape

图1 胰腺癌差异基因筛选

Fig. 1 Screening of differentially expressed genes in pancreatic cancer



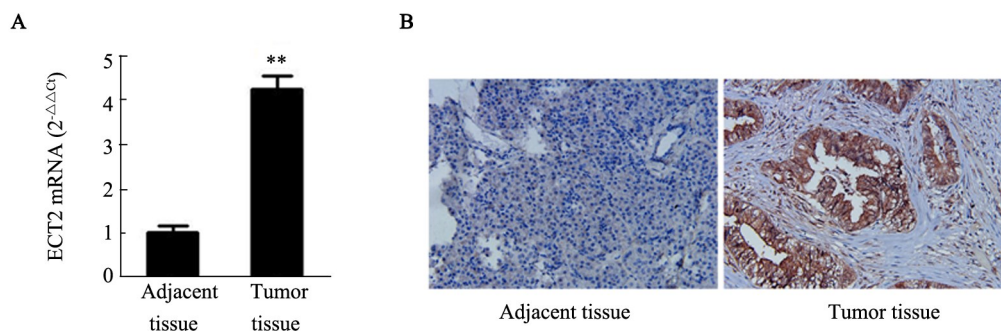
A: Analysis of ECT2 gene expression in TCGA database;

B: Analysis of the correlation between ECT2 gene and survival of patients in TCGA database

\* $P < 0.05$

图2 TCGA数据库分析ECT2基因表达(A)及与患者预后(B)的相关性

Fig. 2 Analysis of ECT2 expression (A) and its relation with patients' survival (B) by TCGA database



A: Expression of ECT2 mRNA in human PDAC tissues;

B: Expression of ECT2 protein in human PDAC tissues

\*\* $P < 0.01$  vs adjacent tissue group

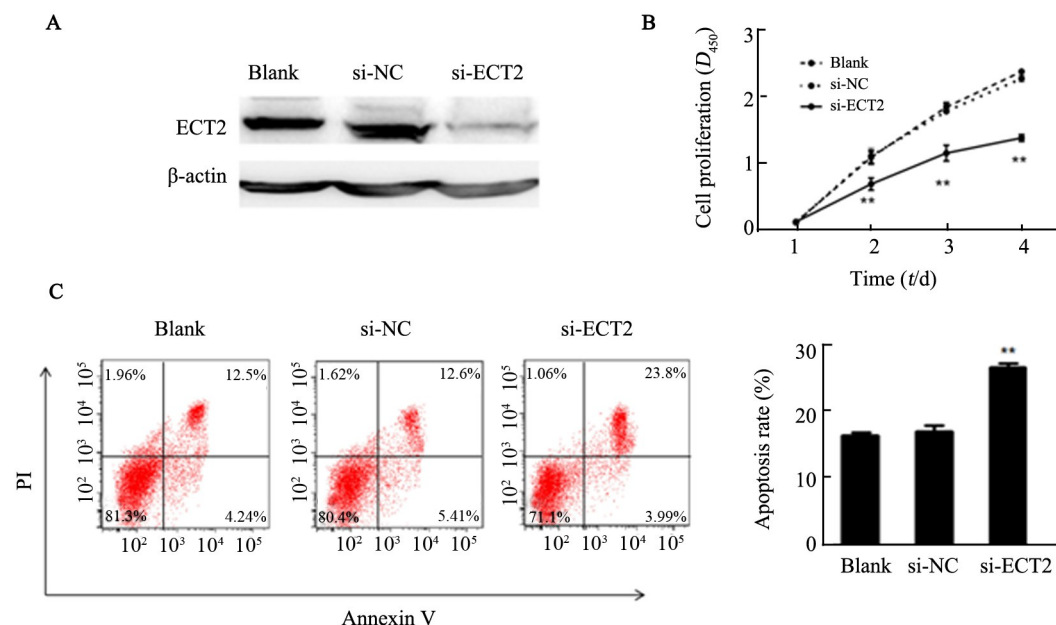
图3 人PDAC组织中ECT2 mRNA(A)和蛋白(B)水平的表达

Fig. 3 The mRNA (A) and protein (B) levels of ECT2 in human PDAC tissues

### 2.4 ECT2对PANC-1细胞增殖、凋亡的影响

siRNA成功敲降PANC-1细胞中ECT2基因的表达,干扰组ECT2蛋白表达明显降低(图4A)。肿瘤细胞CCK-8增殖实验结果(图4B)表明,干扰ECT2表

达24 h后,肿瘤细胞的增殖受到明显抑制(均  $P < 0.01$ )。流式细胞术检测凋亡结果(图4C)表明,干扰ECT2表达24 h后,他莫昔芬诱导的细胞凋亡率显著升高(0.059 vs 10.71 vs 10.11,  $P < 0.01$ )。



A: Interfering ECT2 gene in PANC-1 cell; B: Suppression of ECT2 decreased the proliferation rate of PANC-1 cell; C: Suppression of ECT2 promoted the apoptosis rate of PANC-1 cell  
\*\* $P < 0.01$  vs si-NC group

图4 ECT2对PDAC细胞增殖、凋亡的影响

Fig. 4 Effect of ECT2 on the proliferation and apoptosis of PDAC cells

### 2.5 干扰ECT2影响PANC-1细胞中BAX及BCL-2蛋白表达

WB检测结果(图5)显示,在PANC-1细胞中干扰ECT2后,其促凋亡蛋白BAX表达上调,而抗凋亡蛋白BCL-2表达下调。表明ECT2可能通过调节BAX及BCL-2蛋白表达发挥抗凋亡作用。

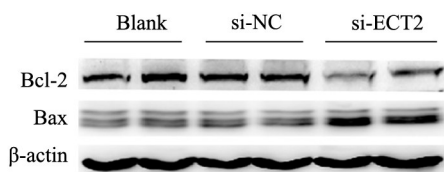


图5 干扰ECT2对PANC-1细胞BAX及BCL-2蛋白的影响  
Fig. 5 The effect of si-ECT2 on protein expressions of BAX and Bcl-2 in PANC-1 cells

## 3 讨论

肿瘤是威胁人类健康的重大疾病,胰腺癌更是恶性程度较高、预后较差的肿瘤之一<sup>[11]</sup>。胰腺癌主要

分为两种病理类型,即PDAC(约占90%)和胰腺内分泌肿瘤(少于5%)<sup>[12]</sup>。目前对于PDAC的治疗手段主要包括手术治疗、传统放化疗、新辅助治疗及免疫疗法,但仍未显著提高患者的生存率。同时由于其早期临床症状不明显,多数患者就诊时已进入胰腺癌中晚期,并且5年生存率极低<sup>[13]</sup>。因此,迫切需要有效的诊断及预测治疗效果的生物学标志物,对提高患者的生存率至关重要。

为筛选胰腺癌中影响肿瘤性状及患者预后的关键基因,本研究通过GEO数据库中表达谱数据GSE15471、GSE16515、GSE28735、GSE62452分析筛选胰腺癌中差异表达基因,发现ECT2基因与人PDAC密切相关。ECT2基因位于人类肿瘤较易发生突变的染色体3q26区域,属于Rho家族鸟嘌呤核苷酸交换因子<sup>[14]</sup>,其N端包含两个与XCCR1和Clb6同源的区域,在DNA损伤应答和细胞周期调控中发挥作用<sup>[15]</sup>,并可通过调节RhoA调控胞质分裂过程<sup>[16]</sup>。同时ECT2可引起RAS同源(RHO)家族小GTP酶的异常激活,与肿瘤及多种疾病密切相关<sup>[17]</sup>。其在非小细胞肺癌<sup>[18]</sup>、恶性胶质瘤<sup>[19-20]</sup>、结肠直肠癌<sup>[21]</sup>等多种恶性

肿瘤中高表达,并可促进肿瘤增殖、侵袭及转移。

为进一步分析ECT2与患者预后的相关性,使用TCGA数据库分析其在PDAC中的表达及与生存的关系,结果表明ECT2基因在人PDAC组织中高表达,且与较短的生存时间密切相关,并从mRNA及蛋白水平进行了验证。肿瘤细胞的凋亡抵抗是影响肿瘤恶性程度及耐药的关键因素,以往关于ECT2的研究集中在其对肿瘤细胞增殖及侵袭的影响,而在凋亡中的作用研究较少。使用流式细胞术检测干扰人胰腺癌细胞系PANC-1 ECT2后发现细胞凋亡率增加。而BAX及BCL-2是以往报道的影响凋亡通路的关键蛋白,因此本实验通过WB检测干扰ECT2后对BAX及BCL-2的影响,结果表明ECT2可通过影响BAX及BCL-2的表达发挥抗凋亡作用。

目前关于PDAC的研究较多,发现多种生物标志物可预测其发生、发展、转移及复发,但仍缺乏有效指标评估治疗效果及患者预后。本研究结合生物信息学分析及相关实验进行探讨,发现ECT2与PDAC患者预后密切相关,且在人胰腺癌细胞中发挥促增殖、抗凋亡作用,以期为PDAC的治疗和预后判断提供新的靶点。

## [参考文献]

- [1] MCGUIGAN A, KELLY P, TURKINGTON R C, et al. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(43): 4846-4861 [2019-03-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6250924/>. DOI:10.3748/wjg.v24.i43.4846.
- [2] MANGGE H, NIEDRIST T, RENNER W, et al. New diagnostic and therapeutic aspects of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(28): 3012-3024. DOI: 10.2174/0929867324666170510150124.
- [3] HUFF L P, KIKUCHI D S, FAIDLEY E, et al. Polymerase- $\delta$ -interacting protein 2 activates the RhoGEF epithelial cell transforming sequence 2 in vascular smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol*, 2019, 316(5): C621-C631. DOI:10.1152/ajpcell.00208.2018.
- [4] SHI Y X, YIN J Y, SHEN Y, et al. Genome-scale analysis identifies NEK2, DLGAP5 and ECT2 as promising diagnostic and prognostic biomarkers in human lung cancer[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8072 [2019-03-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5556079/>. DOI:10.1038/s41598-017-08615-5.
- [5] CHEN Z G, LIU J T, ZHANG Y H. Role of epithelial cell transforming sequence 2 (ECT2) in predicting prognosis of osteosarcoma[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3861-3868[2019-03-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5562183/>.
- [6] WANG H K, LIANG J F, ZHENG H X, et al. Expression and prognostic significance of ECT2 in invasive breast cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2018, 71(5): 442-445. DOI:10.1136/jclinpath-2017-204569.
- [7] BADEA L, HERLEA V, DIMA S O, et al. Combined gene expression analysis of whole-tissue and microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma identifies genes specifically overexpressed in tumor epithelia[J]. *Hepatogastroenterology*, 2008, 55(88): 2016-2027. DOI:10.1136/gut.2007.142497corr1.
- [8] PEI H, LI L, FRIDLEY B L, et al. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(3): 259-266. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.07.016.
- [9] ZHANG G, HE P, TAN H, et al. Integration of metabolomics and transcriptomics revealed a fatty acid network exerting growth inhibitory effects in human pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(18): 4983-4993. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0209.
- [10] YANG S, HE P, WANG J, et al. A novel MIF signaling pathway drives the malignant character of pancreatic cancer by targeting NR3C2[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(13): 3838-3850. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2841.
- [11] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [12] CHIARAVALLI M, RENI M, O'REILLY E M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art 2017 and new therapeutic strategies[J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 60: 32-43. DOI:10.1016/j.ctrv.2017.08.007.
- [13] OETTL H, POST S, NEUHAUS P, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2007, 297(3): 267-277. DOI:10.1001/jama.297.3.267.
- [14] FIELDS A P, JUSTILIEN V. The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Ect2 is an oncogene in human cancer[J]. *Adv Enzyme Regul*, 2010, 50(1): 190-200. DOI: 10.1016/j.advenzreg.2009.10.010.
- [15] MIKI T, SMITH C L, LONG J E, et al. Oncogene ect2 is related to regulators of small GTP-binding proteins[J]. *Nature*, 1993, 362(6419): 462-465. DOI:10.1038/362462a0.
- [16] KIMURA K, TSUJI T, TAKADA Y, et al. Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(23): 17233-17236. DOI: 10.1074/jbc.C000212200.
- [17] COOK D R, ROSSMAN K L, DER C J. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease[J]. *Oncogene*, 2014, 33(31): 4021-4035. DOI: 10.1038/onc.2013.362.
- [18] JUSTILIEN V, FIELDS A P. Ect2 links the PKPKC $\zeta$ -Par6 $\alpha$  complex to Rac1 activation and cellular transformation[J]. *Oncogene*, 2009, 28(41): 3597-3607. DOI: 10.1038/onc.2009.217.
- [19] SALHIA B, TRAN N L, CHAN A, et al. The guanine nucleotide exchange factors trio, Ect2, and Vav3 mediate the invasive behavior of glioblastoma[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(6): 1828-1838. DOI: 10.2353/ajpath.2008.080043.
- [20] SANO M, GENKAI N, YAJIMA N, et al. Expression level of ECT2 proto-oncogene correlates with prognosis in glioma patients[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(5): 1093-1098. DOI: 10.3892/or.16.5.1093.
- [21] JUNG Y, LEE S, CHOI H S, et al. Clinical validation of colorectal cancer biomarkers identified from bioinformatics analysis of public expression data[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(4): 700-709. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1300.

[收稿日期] 2019-04-02

[修回日期] 2019-04-20

[本文编辑] 黄静怡