

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221306

· 论 著 ·

# ECRG4 基因甲基化在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义

刘彬<sup>1</sup>, 彭正加<sup>2</sup>, 梁分凤<sup>2</sup>, 廖俊<sup>2</sup>

(1. 湘潭医卫职业技术学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南湘潭 411104; 2. 湘潭市中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南湘潭 411100)

**摘要:** **目的** 探讨喉鳞状细胞癌(LSCC)中 ECRG4 的 mRNA 和蛋白表达以及其在 LSCC 肿瘤组织中的甲基化水平, 分析其临床意义。**方法** 从人类蛋白图谱(HPA)以及基因表达谱交互分析(GEPIA)数据库分析 ECRG4 在头颈部肿瘤中的表达, 收集 15 例原发 LSCC 患者的组织样本及癌旁正常组织样本, 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测样本中的 ECRG4 mRNA 表达, Western blot 检测组织中的蛋白表达, 甲基化特异性 PCR(MSP)及测序分析检测 ECRG4 启动子甲基化水平, 比较 ECRG4 mRNA 表达及甲基化水平与 LSCC 患者临床病理特征之间的相关性。**结果** HPA 和 GEPIA 分析结果发现 ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌中表达下降。与癌旁正常组织相比, RT-qPCR 和 Western blot 实验结果表明 LSCC 患者肿瘤组织中的 ECRG4 mRNA 和蛋白表达较低( $P < 0.001$ ), 测序分析结果指出 LSCC 肿瘤组织中 ECRG4 启动子甲基化水平明显升高( $P < 0.001$ )。ECRG4 mRNA 高表达水平与 LSCC 患者Ⅲ、Ⅳ期、存在淋巴转移、复发以及 G2、G3 期相关( $P < 0.05$ ), 而Ⅲ、Ⅳ期、复发以及 G2、G3 期的 LSCC 患者肿瘤组织中的 ECRG4 启动子甲基化水平升高更明显( $P < 0.05$ )。**结论** ECRG4 在 LSCC 中表达水平下降, 甲基化水平升高, 在Ⅲ、Ⅳ期、复发以及 G2、G3 期的患者中变化更明显, 为 LSCC 后续研究提供理论基础。

**关键词:** 喉鳞状细胞癌; ECRG4; 甲基化  
中图分类号: R739.65

## Expression and clinical significance of *ECRG4* methylation in laryngeal squamous cell carcinoma

LIU Bin<sup>1</sup>, PENG Zhengjia<sup>2</sup>, LIANG Fenfeng<sup>2</sup>, LIAO Jun<sup>2</sup>

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Xiangtan Medicine and Health Vocational College, Xiangtan 411104, China; 2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the mRNA and protein expression of ECRG4 in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and its methylation level in LSCC tumor tissue, and to analyze its clinical significance. **Methods** The expression of ECRG4 in head and neck tumors was analyzed from the Human Protein Atlas (HPA) and Gene Expression Profile Interactive Analysis (GEPIA) databases. Tissue samples of 15 patients with primary LSCC and adjacent normal tissue samples were collected. Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of ECRG4 mRNA in the samples, and Western Blot was used to detect the protein expression in the tissues. Methylation-specific PCR (MSP) and sequencing analysis were used to detect the methylation level of ECRG4 promoter. Compare the correlation between ECRG4 mRNA expression and methylation level and clinicopathological characteristics of LSCC patients. **Results** HPA and GEPIA analysis showed that ECRG4 expression was decreased in head and neck squamous cell carcinoma. The results of RT-qPCR and Western Blot showed that ECRG4 mRNA and protein expression in LSCC patients were lower than those in adjacent normal tissues ( $P < 0.001$ ). And the results of sequencing analysis indicated that the methylation level of ECRG4 promoter was significantly increased in LSCC tumor tissues ( $P < 0.001$ ). The high expression

第一作者简介: 刘彬, 男, 硕士, 副主任医师。  
通信作者: 彭正加, Email: modo3222@163.com

level of ECRG4 mRNA was correlated with stage III、IV, lymphatic metastasis, recurrence, and G2、G3 grade in LSCC patients ( $P<0.05$ ), while the methylation level of ECRG4 promoter in LSCC patients with stage III、IV, recurrence and G2、G3 grade was significantly increased ( $P<0.05$ ). **Conclusions** The expression level of ECRG4 is decreased, and the methylation level of ECRG4 increased in LSCC. The changes of ECRG4 are more obvious in patients with stage III、IV, recurrence and G2、G3 stage, which provides a theoretical basis for the subsequent study of LSCC.

**Keywords:**Laryngeal squamous cell carcinoma; ECRG4; Methylation

喉癌是最常见的一种头颈部肿瘤,约占头颈部肿瘤总数的四分之一<sup>[1]</sup>,其中喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)又占喉部恶性肿瘤的90%,在男性中多见<sup>[2-3]</sup>。目前临床主要的治疗策略是手术切除联合放/化疗,但是大多数的LSCC患者仍存在再次复发的风险,5年生存率不超过60%<sup>[1,4]</sup>,治疗效果不及预期,因此迫切需要寻找喉癌中新的分子机制以期对LSCC的治疗提供新的见解。ECRG4是一种高度保守的抑癌基因,能够编码Gaurin、ECLIN等多种生物肽,参与肿瘤抑制、细胞衰老和免疫反应等许多生理现象<sup>[5]</sup>。ECRG4被激活后从细胞膜上释放出来,并能在体液中检测到,是精准医学中一个绝佳的候选基因<sup>[6]</sup>。研究发现ECRG4的异常表达常受启动子区域的甲基化所抑制,ECRG4甲基化水平可能成为胃癌、肾细胞癌诊断或预后评估中的分子标记物<sup>[7-8]</sup>。而遗憾的是,ECRG4目前鲜有在LSCC中的报道,本次研究通过分析LSCC中ECRG4 mRNA、蛋白以及启动子甲基化水平,探讨ECRG4在LSCC中的临床意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 人类蛋白图谱(human protein atlas, HPA)数据库分析

HPA是人类组织和细胞蛋白质分布的最大最全面的数据库(<https://www.proteinatlas.org/>)<sup>[9]</sup>,可以运用于肿瘤组织样本中的蛋白表达分析,本次研究主要通过HPA数据观察ECRG4在不同头颈部肿瘤组织中的表达情况。

1.2 基因表达谱交互分析(gene expression profiling interactive analysis, GEPIA)数据库

GEPIA是一个基于基因型组织表达(genotype-tissue expression, GTEx)数据进行分析的在线工具(<http://gepia.cancer-pku.cn>),可以对提交的基因进行差异表达分析、轮廓图绘制、相关性分析、患者生存分析、相似基因检测和降维分析等在内的全面表达分析<sup>[10]</sup>,本次研究中主要通过GEPIA数据库

分析ECRG4在头颈部鳞状细胞癌中的表达情况。

1.3 患者样本

收集湘潭市中心医院2017年12月—2018年12月收治的15例原发LSCC患者的组织样本及对应的癌旁正常组织样本(距离病灶>2 cm),以上患者均经过病理学确诊。组织样本经生理盐水清洗后,立即剪切成2~5 mm薄片放入RNALater(SIGMA, R0901)中,4℃过夜后转至-80℃冰箱中冻存;剩余组织进行病理分析。一般临床资料见表1,所有患者术前6个月未接触过放/化疗,经病理科确诊,且签署了完整的知情同意书。

表1 15例LSCC患者的一般临床资料 (例, %)

临床因素	例数	百分比
年龄(岁)		
≤60	6	40.00
>60	9	60.00
性别		
男	14	93.33
女	1	6.67
原发部位		
声门上型	4	26.67
声门型	11	73.33
临床分期		
I、II	9	60.00
III、IV	6	40.00
淋巴转移		
无	12	80.00
有	3	20.00
复发		
无	9	60.00
有	6	40.00
病理学分期		
G1	9	60.00
G2、G3	6	40.00
吸烟史		
无	0	0.00
有	15	100.00
饮酒史		
无	2	13.33
有	13	86.67

注:LSCC(喉鳞状细胞癌)。下同。

1.4 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

使用RT-qPCR检测肿瘤组织和癌旁正常组织

中 ECRG4 mRNA 的相对表达水平,使用 Trizol 提取组织和细胞中的总 RNA,使用琼脂凝胶电泳以及 NanoDrop( Thermo, One ) 检测 RNA 的完整性、纯度以及浓度,使用 HiFiScriptgDNA Removal cDNA Synthesis Kit( 康为世纪,CW2582M)合成 cDNA 文库,使用 TB Green™ Premix DimerEraser™ ( TaKaRa, RR091B) 在荧光定量 PCR 仪( AppliedBiosystems, QuantStudioDx) 上检测 ECRG4 mRNA 的相对表达量,98 ℃ 预变性 2 min 后,98 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火/延伸 30 s,重复 40 个循环。以 ACTB 为内参基因,引物序列见表 2,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  进行计算。

表 2 引物序列

引物名称	序列(5'-3')
ECRG4-forward	GTTCTCCTCGCAGCACC
ECRG4-reverse	TTCCACTTATGCCACCTGGG
ACTB-forward	CTCGCCTTTGCCGATCC
ACTB-reverse	GGGGTACTTCAGGGTGAGGA
ECRG4-MSP-forward	AGTGGGGGAGTTAAGGAGATATTTT
ECRG4-MSP-reverse	CTAAACTCCAAAACCAAAATACTTAA

1.5 甲基化特异性 PCR(MSP)及 ECRG4 启动子甲基化核心区域测序

首先使用 QIAamp DNA 试剂盒( qiagen,51304) 提取样本中的 DNA,使用荧光定量仪( Thermo Fisher Scientific, Qubit 3.0) 和 Nanodrop( 进行定量和纯度检验。使用 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit( Qiagen, 59824) 对两组样品分别进行重亚硫酸盐转化,60 ℃ 15 min。使用 TaKaRaEpiTaq™ HS( TaKara, R110A) 对 ECRG4 启动子核心区域( Chr2: 106065304-106065523) 进行扩增,扩增引物序列如表 2 所示,98 ℃ 预变性 2 min 后,98 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 30 s,重复 30 cycles),72 ℃ 5 min。使用 AMPure XP Beads( Beckman, A63881) 回收 PCR 产物。使用 Ion Plus Fragment Library Kit( Thermo Fisher Scientific, 4471252) 对扩增产物进行文库构建。经 Agilent2100 和 KAPA Library Quantification Kit( KAPABiosystems, KK4827) 进行文库质检和精确定量后,使用 Ion PI Hi-Q OT2 Kit( Thermo Fisher Scientific, A26434) 制备模板。使用 Ion PI Hi-Q Sequencing200 Kit( Thermo Fisher Scientific, A26433) 和 Ion PI V3 芯片在 Ion Torrent Proton 平台进行测序并读取 ECRG4 启动子甲基化水平。

1.6 Western blot

使用蛋白提取试剂盒( Solarbio, BC3790) 抽提

组织中的总蛋白,经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒( Gbcbio, G3522) 对蛋白进行定量,12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,常规转移至 PVDF 膜上,室温下使用 5% BSA( Solarbio, A8010) 进行封闭 2 h, TBST( Solarbio, T1081) 洗涤,加入稀释好的一抗( abcam, ab224077), 4 ℃ 孵育过夜, TBST 再次洗涤,加入相应二抗( ab205719) 进行孵育,冲洗 3 次,每次 10 min,最后使用 ECL 化学发光试剂盒( Solarbio, SW2010) 进行检测。使用 GAPDH( ab8245) 为内参。

1.7 统计学方法

实验数据使用 GraphPad Prism 8.0 计算并绘制所需图片,计量资料拟先行 Kolmogorov-Smirnov 检验判断是否符合正态分布,其中正态分布数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较使用独立样本 *t* 检验,不符合正态分布数据使用四分位数表示[ *M*( *P*<sub>25</sub>, *P*<sub>75</sub> ) ],使用 Mann-Whitney *U* 检验进行分析, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌中低表达

通过 HPA 数据库观察 ECRG4 的表达情况,如图 1A 所示,在病理模块中,头颈部鳞状细胞癌中几乎检测不到 ECRG4 的表达,而在头颈部腺癌中, ECRG4 表现出中等强度的信号(图 1B)。进一步使用 GEPIA 在线工具分析 ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌中的表达(图 1C),结果表明, ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌肿瘤组织中的表达明显较正常组织中低( *P* < 0.05)。

2.2 ECRG4 在 LSCC 中表达下调

使用 RT-qPCR 检测 ECRG4 mRNA 在 LSCC 患者肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达,与癌旁正常组织相比, ECRG4 在肿瘤组织中的表达下调( *P* < 0.05),进一步使用 Western blot 检测组织中的蛋白表达,结果表明 ECRG 蛋白在肿瘤组织的表达较癌旁正常组织中低,详见图 2。

2.3 LSCC 中 ECRG4 启动子甲基化水平升高

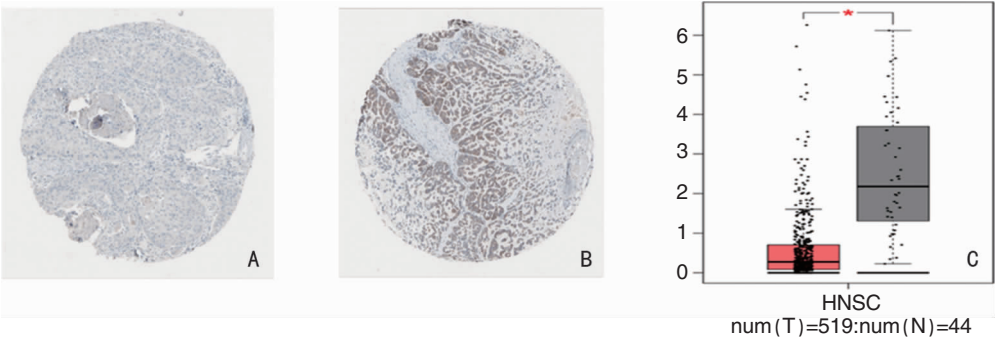
使用 MSP 及核心区域测序检测 ECRG4 启动子甲基化水平,如图 3 中所示, LSCC 肿瘤组织中的甲基化水平明显高于癌旁正常组织中,差异具有统计学意义( *P* < 0.05)。

2.4 ECRG4 的 mRNA 表达及甲基化水平与患者临床病理特征之间的关系

综合 15 例 LSCC 患者的一般临床资料,总结

ECRG4 的 mRNA 表达及甲基化水平与患者临床病理特征之间的相关性,结果发现,ECRG4 mRNA 表达与患者的临床分期、淋巴转移、复发、病理学之间存在相关性,Ⅲ、Ⅳ期、存在淋巴转移、复发以及 G2、

G3 期的患者肿瘤组织中 ECRG4 mRNA 表达更低 ( $P<0.05$ )。而Ⅲ、Ⅳ期、复发以及 G2、G3 期的患者肿瘤组织中的 ECRG4 启动子甲基化水平升高更明显 ( $P<0.05$ ),详见表 3。



**图 1** ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌中低表达 A:HPA 数据库分析 ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌中组织的表达; B:HPA 数据库分析 ECRG4 在头颈部腺癌组织中的表达; C:GEPIA 数据库分析 ECRG4 在头颈部鳞状细胞癌肿瘤组织以及正常组织中的表达 注:HNSC(头颈部鳞状细胞癌)。

**表 3** ECRG4 的 mRNA 表达及甲基化水平与患者临床因素之间的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

临床因素	例数	ECRG4[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]	$t(U)$	$P$	甲基化水平	$t$	$P$
年龄(岁)							
≤60	6	0.03(0.01,0.08)	26.000	0.955	26.49±3.32	0.154	0.880
>60	9	0.05±0.07			27.02±8.00		
性别							
男	14	0.03(0.2,0.4)	—	—	26.62±6.57	—	—
女	1	0.02			29.38		
原发部位							
声门上型	4	0.03±0.02	(20.000)	0.851	26.54±6.51	0.261	0.798
声门型	11	0.07±0.08			27.55±6.86		
临床分期							
I、Ⅱ	9	0.04(0.03,0.05)	2.000	0.002	23.38±5.147	3.370	0.005
Ⅲ、Ⅳ	6	0.02±0.01			31.95±4.268		
淋巴转移							
无	12	0.03(0.03,0.04)	(0.000)	0.004	26.30±7.08	0.607	0.555
有	3	0.01(0.00,0.02)			28.85±0.57		
复发							
无	9	0.04(0.03,0.05)	2.000	0.001	23.99±6.20	9.000	0.036
有	6	0.02±0.01			29.46(28.75,33.03)		
病理学分期							
G1	9	0.04(0.03,0.05)	9.000	0.036	23.86±5.47	2.609	0.021
G2、G3	6	0.02±0.01			31.23±5.17		
吸烟史							
无	0	—	—	—	—	—	—
有	15	0.03(0.02,0.04)			26.81±6.37		
饮酒史							
无	2	0.03(0.02,0.04)	(7.000)	0.136	25.56±6.44	1.608	0.132
有	13	0.02(0.02,0.02)			31.82±2.93		

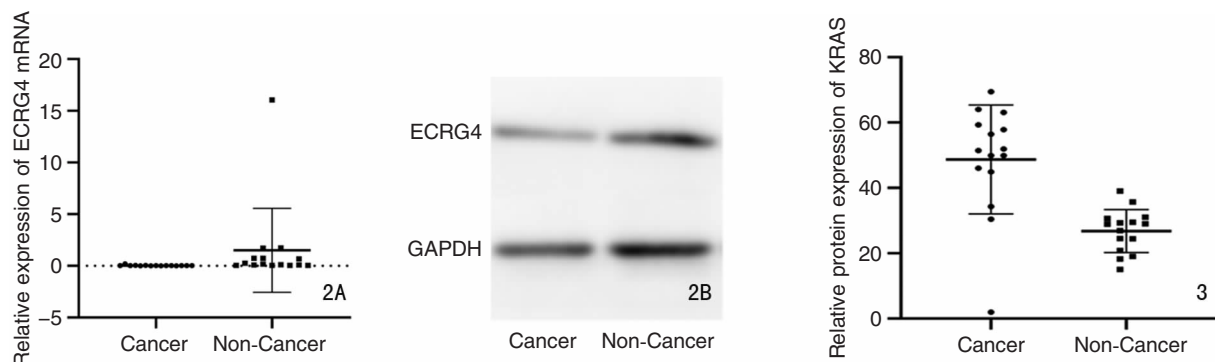


图 2 ECRG4 在 LSCC 中表达下调 2A:RT-qPCR 检测 ECRG4 mRNA 在 LSCC 患者肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达; 2B: Western blot 检测 ECRG4 蛋白在 LSCC 患者肿瘤组织和癌旁正常组织中的表达 图 3 LSCC 中 ECRG4 启动子甲基化水平升高

### 3 讨论

我们本次研究首先通过 HPA 和 GEPIA 数据库确定了 ECRG4 在头颈部肿瘤中的表达,发现其在头颈部鳞状细胞癌中表达较其他组织类型和正常组织中下降明显。然后对收集来的 LSCC 患者的肿瘤组织和正常组织进行 RT-qPCR 检测,发现 ECRG4 mRNA 在肿瘤组织中低表达,Western blot 实验结果进一步在蛋白水平上证明了这一点。

ECRG4, 又称 C2orf40, 其长度为 12.5kb, 位于染色体 2q12.2 上, 由 4 个外显子组成, 编码 148 个氨基酸残基的多肽, 大量研究报道, ECRG4 在食管鳞癌, 神经胶质瘤以及结直肠癌等恶性肿瘤中表达下调<sup>[11]</sup>。而 ECRG4 编码的蛋白前体也在各种上皮恶性肿瘤中表观遗传沉默, 其组成性分泌并束缚在上皮细胞或循环白细胞的细胞表面<sup>[12]</sup>。Cai 等<sup>[13]</sup>将 ECRG4 转染至结直肠癌细胞中后, 使用 MTT、平板克隆和 Annexin/PI 双染法观察细胞的生物学功能变化, 并在裸鼠体内进行致瘤效应检测, 结果表明, ECRG4 的过表达通过减少肿瘤体积和重量以及诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤的发生, 其可能是结直肠癌患者治疗的潜在靶点。除此之外, 另有研究发现在人 LSCC 细胞 Hep-2 中过表达 ECRG4 后, 细胞的迁移和侵袭能力明显受到抑制, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达下调, ECRG4 通过 NF- $\kappa$ B 信号通路介导 Hep-2 EMT 进程, 抑制 LSCC 的转移<sup>[14]</sup>。这也从侧面辅证了我们的研究结果: ECRG4 在 LSCC 中表达下调。

DNA 甲基化是一个可以通过细胞分裂遗传的稳定表观遗传标记, 但是在癌症的发生和发展过程

中, 由于染色质调节因子突变或解除管制, 特定 DNA 会发生甲基化水平的变化, 甲基化水平的差异也可以作为肿瘤诊断和药物治疗的有力分子标记<sup>[15]</sup>。ECRG4 基因表达下调主要归因于 ECRG4 启动子的 5 个非翻译区中 CpG 岛的甲基化, 其核心启动子序列包含几个 CpG 岛、多个重叠的 Sp1 共有结合序列和一个假定的核转录因子- $\kappa$ B (nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 激活结合位点。ECRG4 转录从 ECRG4 开放阅读框起始 ATG 的 11 位胍基起始。虽然在此翻译起始位点的 5' UTR 中有一个远端 TATA 序列, 这也被确定为超甲基化的目标序列, 因为编码 ECRG4 启动子的质粒的体外甲基化消除了启动子的活性, 用甲基化抑制剂 5-AzaC 处理后会增加内源性 ECRG4 的表达<sup>[16]</sup>。我们在研究中也发现 LSCC 肿瘤组织中启动子甲基化水平较正常组织中升高, 这也说明可能正是由于 ECRG4 启动子导致 ECRG4 表达下降。

另外通过比较不同临床病理特征的患者中的 ECRG4 mRNA 表达及甲基化水平, ECRG4 mRNA 低表达与患者的临床分期、淋巴转移、复发、病理学之间存在相关性, 而 III、IV 期、复发以及 G2、G3 期的患者肿瘤组织中的 ECRG4 启动子甲基化水平升高更明显。研究发现 ECRG4 也是鼻咽癌患者的独立预后因素, ECRG4 在鼻咽癌患者血清中的低表达与 TNM 高分期、转移、淋巴转移等临床特征之间具有显著的相关性<sup>[17]</sup>。另外在卵巢癌、食管癌、胃癌等相关 ECRG4 基因启动子甲基化的研究中发现, 正常组织中 ECRG4 甲基化水平往往较低<sup>[18-20]</sup>, 并且 ECRG4 基因甲基化检出率与胃癌患者的病理分期相关, 与患者的年龄、性别及淋巴转移无关<sup>[20]</sup>, 暗示 ECRG4 表达及甲基化水平能够反映一定的疾病进展。

综上所述, *ECRG4* 在 LSCC 肿瘤组织中 mRNA 和蛋白表达水平下降, 而甲基化水平升高, 其表达及甲基化水平与患者的 III、IV 期、复发以及 G2、G3 期的患者相关, 有望为 LSCC 的治疗和研究提出新的分子靶点。

## 参考文献:

- [1] Shuang Y, Li C, Zhou X, et al. MicroRNA-195 inhibits growth and invasion of laryngeal carcinoma cells by directly targeting DCUN1D1[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(4): 2155–2165.
- [2] 邓陈虎, 马俭, 张丙文, 等. LncRNA 在喉癌发病机制中的作用及其研究进展[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(1): 99–103.
- [3] Li P, Yang Y, Liu H, et al. MiR-194 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting weel[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 1–4.
- [4] South AP, den Breems NY, Richa T, et al. Mutation signature analysis identifies increased mutation caused by tobacco smoke associated DNA adducts in larynx squamous cell carcinoma compared with oral cavity and oropharynx[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1–9.
- [5] Moriguchi T, Takeda S, Iwashita S, et al. EcrG4 peptide is the ligand of multiple scavenger receptors[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1–9.
- [6] Qin X, Zhang P. *ECRG4*: a new potential target in precision medicine[J]. *Front Med*, 2019, 13(5): 540–546.
- [7] Deng P, Chang XJ, Gao ZM, et al. Downregulation and DNA methylation of *ECRG4* in gastric cancer[J]. *OncoTargets Ther*, 2018, 11: 4019.
- [8] Luo L, Wu J, Xie J, et al. Downregulated *ECRG4* is associated with poor prognosis in renal cell cancer and is regulated by promoter DNA methylation[J]. *Tumor Bio*, 2016, 37(1): 1121–1129.
- [9] Thul PJ, Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome[J]. *Protein Sci*, 2018; 27(1): 233–244.
- [10] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98–W102.

- [11] 晁臣. *ECRG4* 在乳腺癌中的表达与调控机制及其抗肿瘤作用的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [12] Podvin S, Miller MC, Rossi R, et al. The orphan C2orf40 gene is a neuroimmune factor in Alzheimer's Disease[J]. *JSM Alzheimer's Dis Relat Dement*, 2016, 3(1): 1020.
- [13] Cai Z, Liang P, Xuan J, et al. *ECRG4* as a novel tumor suppressor gene inhibits colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. *Tumor Bio*, 2016, 37(7): 9111–9120.
- [14] 贾建平, 孙晓慧. *ECRG4* 对人喉鳞癌细胞 Hep-2 侵袭转移的影响及其分子机制[J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44(2): 178–183, 189.
- [15] Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(4): e322.
- [16] Dang X, Zeng X, Coimbra R, et al. Counter regulation of *ECRG4* gene expression by hypermethylation-dependent inhibition and the Sp1 transcription factor-dependent stimulation of the c2orf40 promoter[J]. *Gene*, 2017, 636: 103–111.
- [17] Zang Y, Wan B, Jia X, et al. Decreased expression of *ECRG4* in serum predicts poor prognosis for patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(2): 2039–2043.
- [18] 马尚林, 李文梅, 游颜杰. 卵巢癌中 *ECRG4* 基因启动子甲基化的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(10): 1623–1625.
- [19] 游颜杰, 郭凤琴, 李文梅, 等. *ECRG4* 基因甲基化在食管癌中的检测及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(4): 811–813.
- [20] 王玉彬, 巴彩凤. 胃癌组织中食管癌相关基因 4 启动子区的甲基化及其临床意义[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(3): 353–356.

(收稿日期: 2021–08–14)

**本文引用格式:** 刘彬, 彭正加, 梁分凤, 等. *ECRG4* 基因甲基化在喉鳞状细胞癌中的表达及其临床意义[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2022, 28(6): 101–106. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221306

**Cite this article as:** LIU Bin, PENG Zhengjia, LIANG Fenfeng, et al. Expression and clinical significance of *ECRG4* methylation in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2022, 28(6): 101–106. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202221306