

### 【临床研究】

Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO) 2001 标准<sup>[13]</sup>, 其中 I 期 9 例, II 期 8 例, III 期 12 例, IV 期 15 例; 有淋巴结转移 14 例, 无淋巴结转移 30 例。另取同期因子宫肌瘤行子宫切除患者的手术标本 34 例作为对照, 患者年龄 45 ~ 62 岁, 平均 (51.7 ± 3.2) 岁。标本离体后 30 min 内置液氮中速冻 10 min, 然后置 -70 °C 冰箱保存。

**1.2 主要试剂及仪器** TRIzol 试剂、Ripa 组织裂解液购自英国 Invitrogen 公司; RNA 反转录试剂盒、半定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 试剂盒、实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂盒 (SYBR<sup>®</sup> Green I) 购自日本 Takara 公司; 考马斯亮蓝、电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳购自美国 Bio-Rad 公司; 聚偏氟乙烯膜购自英国 Whatman 公司; 脱脂奶粉购自上海生工生物工程有限公司; 抗 flotillin-2 和  $\beta$ -actin 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; 兔抗鼠 IgG 购自美国 KPL 公司。Mx3000P 荧光定量 PCR 仪购自美国 Agilent 公司。

**1.3 半定量 PCR 和 qRT-PCR 法检测子宫内膜癌组织和子宫肌瘤组织中 flotillin-2 mRNA 表达** 采用 TRIzol 试剂一步法分别提取 44 例子宫内膜癌组织和 34 例子宫肌瘤组织的总 RNA, 具体步骤按 TRIzol 试剂说明书进行。RNA 反转录、半定量 PCR 及 qRT-PCR 扩增反应体系均按试剂盒说明书进行。flotillin-2 及内参 GAPDH 引物由日本 Takara 公司合成, flotillin-2 上游引物: 5'-CCCCAGATTGCTGCCAAA-3', 下游引物 5'-TCCACTGAGGACCA-CATCTCA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3', 下游引物: 5'-GAAGATGCTGATGGGATTTTC-3'。RNA 反转录反应条件为 30 °C 10 min, 42 °C 60 min, 70 °C 15 min; 半定量 PCR 反应条件为 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 循环 30 次, 72 °C 延时 5 min。qRT-PCR 反应体系: cDNA 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 0.6  $\mu$ L, SYBR Green 荧光染料 Mix 10  $\mu$ L, 无菌蒸馏水 7.6  $\mu$ L 及 ROX 0.4  $\mu$ L; 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 20 s, 循环 40 次, 72 °C 延时 5 min; 融解曲线分析, 95 °C 5 s, 65 °C 15 s, 95 °C 10 s。flotillin-2 mRNA 的相对表达量通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算。

**1.4 Western blot 法检测 flotillin-2 蛋白表达** 使用 Ripa 组织裂解液提取子宫肌瘤组织和子宫内膜癌组织总蛋白, 用考马斯亮蓝法测蛋白水平。20  $\mu$ g 总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 转膜 1 h,

5 g · L<sup>-1</sup> 脱脂奶粉封闭后 1 h, 经 flotillin-2 或  $\beta$ -actin 抗体孵育过夜, 漂洗后经兔抗鼠 IgG 二抗孵育 1 h, 漂洗后曝光。用 Image J 软件测定灰度值进行定量。在比较 flotillin-2 蛋白表达与临床指标的关系时, 以 flotillin-2 蛋白在每个子宫内膜癌组织中的相对表达量与 34 例子宫肌瘤组织相对平均表达量的比值  $\geq 2$  为该蛋白高表达,  $< 2$  为低表达。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 统计学软件进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准数 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用  $t$  检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验。相关性分析采用 Kaplan-Meier 曲线法和 Cox 回归分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 子宫内膜癌组织和子宫肌瘤组织中 flotillin-2 mRNA 的表达** 半定量 PCR 结果 (图 1) 显示, 子宫内膜癌组织中 flotillin-2 mRNA 的相对表达量显著高于子宫肌瘤组织 ( $P < 0.01$ )。qRT-PCR 结果显示, flotillin-2 mRNA 在子宫内膜癌组织中的相对表达水平为  $43.1 \pm 4.2$ , 在子宫肌瘤组织中的相对表达水平为  $12.3 \pm 2.1$ , 子宫内膜癌组织中 flotillin-2 mRNA 的相对表达水平显著高于子宫肌瘤组织 ( $P < 0.01$ )。

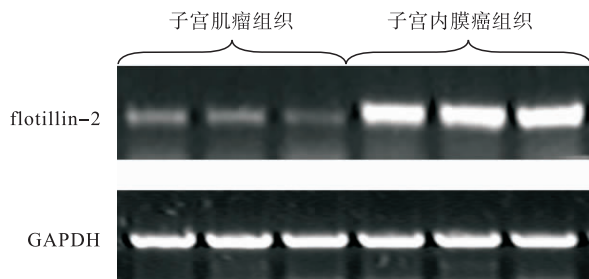


图 1 半定量 PCR 法检测子宫内膜癌组织和子宫肌瘤组织中 flotillin-2 mRNA 的表达

**Fig. 1 The mRNA expression of flotillin-2 gene in both endometrial carcinoma and uterine fibroid tissues examined by semi quantity PCR method**

**2.2 子宫内膜癌组织和子宫肌瘤组织中 flotillin-2 蛋白的表达** 结果见图 2。flotillin-2 蛋白在子宫内膜癌组织中的平均表达水平为  $0.54 \pm 0.26$ , 在子宫肌瘤组织中的平均表达水平为  $0.21 \pm 0.12$ , 子宫内膜癌组织中 flotillin-2 蛋白的表达显著高于子宫肌瘤组织 ( $P < 0.01$ )。

**2.3 flotillin-2 蛋白表达与临床病理特征的关系** 结果见表 1。子宫内膜癌组织中 flotillin-2 蛋白表达与 FIGO 分期、分化程度和淋巴结转移有关 ( $P < 0.05$ ), 而与患者年龄和肿瘤大小无关 ( $P > 0.05$ )。

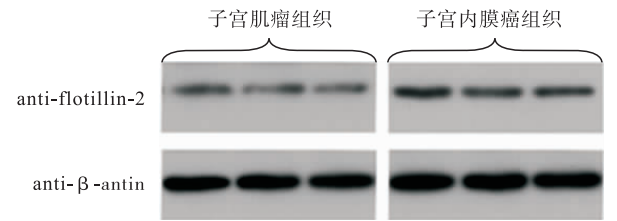


图 2 子宫内膜癌组织和子宫肌瘤组织中 flotillin-2 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of flotillin-2 protein in endometrial carcinoma tissues and uterine fibroids tissues

表 1 子宫内膜癌临床病理参数与 flotillin-2 蛋白表达的关系  
Tab. 1 Relationship between the expression of flotillin-2 protein and clinical pathological parameters of endometrial carcinoma

病理参数	n	flotillin-2 表达量		P
		<2	≥2	
年龄				
≤50 岁	24	10	14	>0.05
>50 岁	20	12	8	
FIGO 分期				
I 期/例	9	4	5	<0.05
II ~ IV 期/例	35	6	29	
肿瘤大小(直径)				
≤4 cm/例	23	10	13	>0.05
>4 cm/例	21	12	9	
分化程度				
低/例	12	5	7	<0.05
高/例	32	4	28	
淋巴结转移				
无/例	30	14	16	<0.05
有/例	14	3	11	

**2.4 子宫内膜癌患者 5 a 生存率与 flotillin-2 表达的关系** 通过预约患者到门诊就诊和电话追踪方式随机访问,子宫内膜癌 44 例患者中失访 3 例(6.8%),其中 flotillin-2 高表达患者的 5 a 生存率为 35.0%(7/20),中位生存时间为 32.3 个月;而 flotillin-2 低表达患者的 5 a 生存率为 52.4%(11/21),中位生存时间为 42.3 个月;子宫内膜癌组织中 flotillin-2 的表达水平与患者 5 a 生存率有相关性( $r = 21.6, P < 0.05$ ),flotillin-2 低表达患者的中位生存时间长于 flotillin-2 高表达患者( $P < 0.05$ )。

3 讨论

子宫内膜癌是指原发于子宫的一种上皮性恶性肿瘤,是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病率居女性生殖系统恶性肿瘤首位,且年轻患者有增多的趋势<sup>[4-6]</sup>。子宫内膜癌的发生与肥胖、雌激素水平、遗传和致癌基因突变等因素相关,多因素造成癌基因激

活和抑癌基因失活的过程,对肿瘤形成和发展起重要作用<sup>[14-16]</sup>。研究特定基因在子宫内膜癌发生、发展和转移中的作用,以及与子宫内膜癌各临床参数的相关性,可为分子靶向治疗提供新思路、新靶点。

flotillin 蛋白家族由 2 个同源性较高的蛋白 flotillin-1 和 flotillin-2 所构成。flotillin-2 在心、肺、胎盘等组织细胞中广泛表达<sup>[10]</sup>。Banning 等<sup>[11]</sup>研究发现,flotillin-2 能促进肿瘤形成因子受体酪氨酸激酶的降解。最新研究发现,flotillin-2 表达水平与肿瘤的发生和迁移相关,其结果证实 flotillin-2 在鼻咽癌组织中表达水平明显上调;干扰 flotillin-2 基因后,细胞内相关信号通路和分子发生明显变化,提示 flotillin-2 可能与鼻咽癌的发生及转移有关,其作用分子机制可能涉及 p53、转化生长因子-β 等信号通路<sup>[17-18]</sup>。

本研究检测了子宫内膜癌组织中 flotillin-2 mRNA 的表达水平,结果显示,子宫内膜癌组织中 flotillin-2 mRNA 的相对表达水平显著高于子宫肌瘤组织,Western blot 结果进一步显示,子宫内膜癌组织中 flotillin-2 蛋白相对表达水平显著高于子宫肌瘤组织,提示子宫内膜癌中 flotillin-2 mRNA 及其蛋白表达水平的升高在子宫内膜癌的发生和发展过程中起一定的促进作用。本研究还发现,子宫内膜癌组织中 flotillin-2 蛋白表达与 FIGO 分期、分化程度、淋巴结转移及 5 a 生存率有关,而与患者的年龄和肿瘤大小无关,提示 flotillin-2 在子宫内膜癌发病过程中起了一定作用,其表达水平可能与子宫内膜癌的发生和转移有密切关系。

综上所述,子宫内膜癌的发生、发展和转移是多因素共同参与的结果,flotillin-2 表达水平检测有助于子宫内膜癌的鉴别诊断,可以作为子宫内膜癌临床病理学标志物,为患者的临床治疗和预后评估提供参考。

参考文献:

[1] 左艳,邓鹏飞. 三叶因子 2 和 N-myc 下游调节基因 1 在不同子宫内膜组织中的表达[J]. 新乡医学院学报,2014,31(9):710-713.

[2] 王丽琴. 子宫内膜癌临床诊治的研究进展[J]. 中国肿瘤临床与康复,2012,19(5):472-474.

[3] Boyd J, Risinger J I. Analysis of oncogene alterations in human endometrial carcinoma: prevalence of ras mutations[J]. Mol Carcinog, 1991,4(3):189-195.

[4] Zagouri F, Sergentanis T N, Chrysikos D, et al. Molecularly targeted therapies in cervical cancer. A systematic review[J]. Gynecol Oncol, 2012,126(2):291-303.

程度增加。相关研究显示,当导入外源性 GST- $\pi$  基因诱发癌细胞系耐药,细胞表达 GST- $\pi$  时,其细胞内的化学治疗药物特别是铂类药物的蓄留量明显减少,并出现 MDR 表型而对顺铂类药物耐药<sup>[8-12]</sup>。因此,GST- $\pi$  高表达可能是肿瘤细胞 MDR 的机制之一。本研究结果显示,RCC 组织中 GST- $\pi$  及其 mRNA 表达与患者的年龄、性别无相关性,但与 RCC 的 TNM 分期有相关性;Ⅱ、Ⅲa、Ⅲb 和Ⅳ期 RCC 组织中 GST- $\pi$  及其 mRNA 表达显著高于Ⅰ期,Ⅲa、Ⅲb 和Ⅳ期 RCC 组织中 GST- $\pi$  及其 mRNA 表达显著高于Ⅱ期,Ⅳ期 RCC 组织中 GST- $\pi$  及其 mRNA 表达显著高于Ⅲa 期。

综上所述,GST- $\pi$  可作为诊断 RCC 的酶学指标,并可作为化学治疗药物使用前识别耐药个体的检测指标,从而有助于临床医师判断 RCC 患者的预后及选择有效的化学治疗药物,提高患者生存率。

参考文献:

[1] Jonasch E,Gao J,Rathmell W K. Renal cell carcinoma[J]. *BMJ*, 2014,349:g4797.

[2] Halabi S,Rini B,Escudier B, *et al*. Progression-free survival as a surrogate endpoint of overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *Cancer*,2014,120(1):52-60.

[3] Eisengart L J,MacVicar G R,Yang X J. Predictors of response to targeted therapy in renal cell carcinoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*,

[5] Diaz-Padilla I,Monk B J,Mackay H J, *et al*. Treatment of metastatic cervical cancer:future directions involving targeted agents[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*,2013,85(3):303-314.

[6] Hirte H,Kennedy E B,Elit L, *et al*. Systemic therapy for recurrent, persistent,or metastatic cervical cancer:a clinical practice guideline[J]. *Curr Oncol*,2015,22(3):211-219.

[7] 黎秀芳,洪淡华,卢秀兰,等. 雌、孕激素受体与子宫内膜癌相关性的研究[J]. *现代肿瘤医学*,2004,12(5):422-425.

[8] Liu Y,Lin L,Huang Z, *et al*. High expression of flotillin-2 is associated with poor clinical survival in cervical carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(1):622-628.

[9] Zhu Z,Wang J,Sun Z, *et al*. Flotillin-2 expression correlates with HER2 levels and poor prognosis in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2013,8(5):e62365.

[10] Edgar A J,Polak J M. Flotillin-1: gene structure;cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2001,33(1):53-64.

[11] Banning A,Ockenga W,Finger F, *et al*. Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e45514.

[12] Rickman D S,Millon R,De Reynies A, *et al*. Prediction of future

2012,136(5):490-495.

[4] Shen Y H,Chen S,Peng Y F, *et al*. Quantitative assessment of the effect of glutathione S-transferase genes GSTM1 and GSTT1 on hepatocellular carcinoma risk[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(5): 4007-4015.

[5] Sun W,Yao L,Jiang B. Meta-analysis:glutathione S-transferase T1 null allele is associated with gastric cancer risk[J]. *Tumour Biol*, 2014,35(1):239-245.

[6] 黎骋. 结直肠癌组织中耐药基因 P-gp、GST、TopoⅡ的表达[J]. *胃肠病学和肝病杂志*,2014,23(7):779-782.

[7] 王光辉,汤文涛,周辉,等. 谷胱甘肽巯基转移酶在黏液性大肠癌中的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*,2012, 19(6):639-642.

[8] 郭海珍. 耐药基因 P-gp GST ToPo-Ⅱ在肺癌组织中的表达及意义[J]. *河北医学*,2014,20(5):735-738.

[9] Zhang D,Fan D. New insights into the meechanisms of gastric cancer multidrug rsistance and future perspectives[J]. *Future Oncol*, 2010,6(4):527-537.

[10] 孔易,郑纪宁. GST- $\pi$  和 P-gp 在大肠癌中的表达及意义[J]. *承德医学院学报*,2013,30(6):453-455.

[11] 梁梦,周英琼,郭芳,等. GST- $\pi$ 、ERCC1、MRP 和 LRP 在卵巢癌组织中的表达及意义[J]. *中国现代医学*,2012,22(5):10-14.

[12] 郭晶晶,肖秀丽,王洪飞,等. 四种耐药基因蛋白在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. *泸州医学院学报*,2013,36(1): 18-22.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)

( 上接第 923 页)

[5] Diaz-Padilla I,Monk B J,Mackay H J, *et al*. Treatment of metastatic cervical cancer:future directions involving targeted agents[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*,2013,85(3):303-314.

[6] Hirte H,Kennedy E B,Elit L, *et al*. Systemic therapy for recurrent, persistent,or metastatic cervical cancer:a clinical practice guideline[J]. *Curr Oncol*,2015,22(3):211-219.

[7] 黎秀芳,洪淡华,卢秀兰,等. 雌、孕激素受体与子宫内膜癌相关性的研究[J]. *现代肿瘤医学*,2004,12(5):422-425.

[8] Liu Y,Lin L,Huang Z, *et al*. High expression of flotillin-2 is associated with poor clinical survival in cervical carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(1):622-628.

[9] Zhu Z,Wang J,Sun Z, *et al*. Flotillin-2 expression correlates with HER2 levels and poor prognosis in gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2013,8(5):e62365.

[10] Edgar A J,Polak J M. Flotillin-1: gene structure;cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2001,33(1):53-64.

[11] Banning A,Ockenga W,Finger F, *et al*. Transcriptional regulation of flotillins by the extracellularly regulated kinases and retinoid X receptor complexes[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e45514.

[12] Rickman D S,Millon R,De Reynies A, *et al*. Prediction of future

metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays[J]. *Oncogene*,2008,27(51):6607-6622.

[13] 林仲秋. FIGO/IGCS 妇癌分期和临床实践指南[J]. *中国实用妇科与产科杂志*,2004,20(6):381-382.

[14] Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma [J]. *Gynecologic Oncology*,1983,15(1):10-17.

[15] Nagy E,Gajjar K B,Patel I I, *et al*. MGMT promoter hypermethylation and K-RAS, PTEN and TP53 mutations in tamoxifen-exposed and non-exposed endometrial cancer cases[J]. *Br J Cancer*,2014,110(12):2874-2880.

[16] Djordjević B,Stanojević Z. Endometrial carcinoma and precursor lesions[J]. *Srp Arh Celok Lek*,2007,135(3/4):230-234.

[17] Loizzi V,Cormio G,Cuccovillo A, *et al*. Two cases of endometrial cancer diagnosis associated with bone metastasis[J]. *Gynecol Obstet Invest*,2006,61(1):49-52.

[18] Wang Y L,Yao W J,Guo L, *et al*. Expression of flotillin-2 in human non-small cell lung cancer and its correlation with tumor progression and patient survival[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(1):601-607.

( 本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)