

## FBP1 在肾透明细胞癌组织中的表达变化及意义\*

洪正东,朱安义,王艳华,史子敏,胡映波<sup>△</sup>

(南昌大学第二附属医院泌尿外科,南昌 330006)

**[摘要]** **目的** 探讨果糖 1,6 二磷酸酶 1(FBP1)在人肾透明细胞癌(RCCC)及其癌旁组织中的表达,以及在肾癌发生、发展及预后中的作用和临床意义。**方法** 选取手术切除的 118 例 RCCC 患者的石蜡切片和 40 例 RCCC 患者的新鲜标本,分别采用免疫组织化学方法、Western blot 和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测肾癌及对应癌旁组织(阴性切缘)中 FBP1 蛋白及 mRNA 的表达,分析其与患者临床病理特征及预后的相关性。**结果** 免疫组织化学发现 78.81%(93/118)的癌旁组织中可见 FBP1 蛋白呈强阳性表达,仅 39.83%(47/118)的肾癌组织中 FBP1 蛋白表达阳性。Western blot 发现肾癌组织中 FBP1 的表达阳性率较其相应癌旁组织明显下降( $P<0.01$ )。RT-PCR 法发现癌旁组织 FBP1 mRNA 表达水平亦明显高于肾癌组织( $P<0.05$ )。FBP1 低表达与临床分期、病理分级、危险系数及是否复发明显相关( $P<0.05$ ),与年龄、性别、症状及肿瘤大小、部位、是否有坏死、是否有血管侵犯和肾上腺是否有累及无关( $P>0.05$ )。FBP1 阳性表达的肾癌患者的 5 年生存率高于 FBP1 阴性表达者( $P<0.05$ )。**结论** FBP1 及其蛋白在人肾癌组织中低表达,与肾癌的发生、发展相关,可能成为肾癌预后的候选标志物之一。

**[关键词]** 肾透明细胞癌;果糖 1,6 二磷酸酶 1;基因表达**[中图分类号]** R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)14-1878-04

## FBP1 expression change in renal clear cell carcinoma tissue and its significance\*

HONG Zhengdong, ZHU Anyi, WANG Yanhua, SHI Zimin, HU Yingbo<sup>△</sup>

(Department of Urological Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of FBP1 in human renal clear cell carcinoma and paracancerous tissue and its effect and clinical significance in the carcinogenesis, progression and prognosis of renal cancer. **Methods** The paraffin sections from 118 patients with renal clear cell carcinoma treated by surgical resection and fresh specimens from 40 patients with renal clear cell carcinoma were selected. The expressions of FBP1 protein and mRNA in renal cancer and paracancerous tissues(negative incisal edge) were detected by adopting the immunohistochemistry(IHC), Western blot and RT-PCR. Its correlation with clinicopathologic characteristics and prognosis of the patients was analyzed. **Results** The IHC result, found that strong positive expression of FBP1 protein could be seen in 78.81%(93/118) of cancer-adjacent tissues, while only 39.83%(47/118) of renal cancer tissues had positive expression. Western blot found that the expression positive rate of FBP1 in renal cancer tissue was significantly decreased compared with corresponding cancer-adjacent tissues ( $P<0.01$ ). RT-PCR found that the FBP1mRAN expression level in cancer-adjacent tissues was also significantly higher than that in renal cancer tissue( $P<0.05$ ). The FBP1 low expression was significantly correlated with the clinical stage, pathologic grade, UISS risk coefficient and recurrence( $P<0.05$ ), and had no relation with the age, gender, symptoms, tumor size, location, tumor necrosis, vascular invasion and adrenal involvement( $P>0.05$ ). The 5-year survival rate in renal cancer patients with FBP1 positive expression was higher than that in the patients with FBP1 negative expression( $P<0.05$ ). **Conclusion** FBP1 and protein are lowly expressed in renal cancer tissue, are correlated with occurrence and development of renal cancer, and may become one of candidate markers of renal cancer prognosis.

**[Key words]** renal clear cell carcinoma; fructose-1,6-bisphosphatase; gene expression

肾癌又称肾细胞癌(renal cell carcinoma,RCC),主要起源于肾小管上皮细胞,是最常见的泌尿系统致死性肿瘤之一,近年在世界各国均有发病率上升的趋势。果糖 1,6 二磷酸酶 1(fructose-1,6-bisphosphatase,FBP1)位于染色体 9q22 位上,广泛存在于人体多种组织和器官中,该基因的低表达或缺失与许多肿瘤密切相关,如胰腺癌<sup>[1]</sup>、肺癌<sup>[2-3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>等。它能抑制有氧糖酵解和肿瘤进展,其低表达常提示肿瘤预后差,是目前研究比较热的抑癌基因,但其在肾透明细胞癌(renal clear cell carcinoma,RCCC)组织内的表达国内尚少见文献报道。为此,本研究采用临床组织标本,应用 Western blot 和逆转转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,RT-PCR)方法观察 FBP1 在肾癌及癌旁组织中的表达情况,以期为临床上探讨 FBP1 蛋白在肾癌发生、发展中的作用及其表达水平的调控研究提供有益线索。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取南昌大学第二附属医院和南昌大学第一附属医院 2001 年 1 月至 2010 年 9 月 118 例病理诊断为 RCCC 患者的石蜡切片,收集南昌大学第二附属医院 2014 年 1 月至 2015 年 6 月 40 例 RCCC 患者的新鲜标本,所有患者均已行手术治疗,术后按照指南要求标准化随访,所有试验均得到南昌大学第二附属医院和第一附属医院伦理委员会的批准。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本收集方法** 在肾癌及其癌旁组织被切除离体后的 15 min 内对标本进行大体观察、测量,确认肿瘤的部位与范围;事先准备几只装有 RNA 保护液的灭菌 EP 管,然后将癌及癌旁(阴性切缘)组织切取直径约 2~5 mm 的组织块 3~4 块迅速放入这些 EP 管中并迅速将该管置于液氮罐内,2 h 内将液氮罐内的标本转移至-86℃的深低温冰箱中长期保存留作试验用。癌与癌旁的界定方法:根据泌尿外科诊疗指南要求只要位于肿瘤包膜外的即是癌旁正常组织,结合文献本研究在收集标本时统一于癌旁 0.5 cm 以外处切取组织作为癌旁正常组织。

**1.2.2 随访内容及方法** 常规随访内容包括:(1)病史询问;(2)体格检查;(3)血常规和血生化检查,如果碱性磷酸酶(ALP)异常升高或(和)有骨转移症状如骨痛,需要进行骨扫描检查;(4)X 线检查,首选胸部 CT 扫描检查,或正、侧位胸片;(5)腹部超声波检查,腹部超声波检查异常的患者、NSS 及 T<sub>3-4</sub> 期 RCCC 手术后患者需要行腹部 CT 检查,可每 6 个月 1 次,以后视具体情况而定。对于 T<sub>1-2</sub> 期患者:每 3~6 个月随访 1 次,连续 3 年,以后每年随访 1 次;T<sub>3</sub> 期患者:每 2 个月随访 1 次,连续 2 年,第 3 年每 6 个月随访 1

次,以后每年随访 1 次。

**1.2.3 免疫组织化学法** FBP1 鼠抗人单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,免疫组织化学法试剂盒购自北京中杉金桥公司,按照试剂盒说明进行操作。检测对象均为新鲜的 RCCC 及癌旁组织标本,标本大小为 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm。

**1.2.4 Western blot 检测** 将新鲜标本剪成 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm 大小,再将其制备组织裂解液,取 50 μg 总蛋白进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),蛋白转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(100 V,80 min),用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h;一抗 FBP1 抗体(1:1 000)、β-actin 抗体(1:1 000)分别 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次;用红外荧光染料标记的二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,Odyssey 扫描成像。

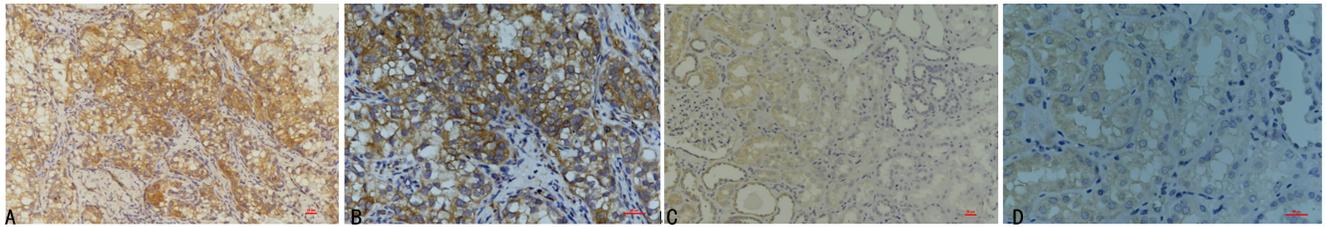
**1.2.5 RT-PCR 检测** 将新鲜标本组织剪成 0.2 cm×0.2 cm×0.2 cm 左右大小,应用 Trizol 法抽提组织中总 RNA,cDNA 合成实验根据 BIO-RAD 公司 cDNA synthesis Kit 实验步骤进行。FBP1 引物序列,上游:5'-ATG TTG GAA GAT CCA TCA AGG-3',下游:5'-AAC ATG TTC ATA ACC AGG TCG-3';β-actin 引物序列,上游:5'-GTA CCA CAG GCA TTG TGA TGG ACT-3',下游:5'-CTT TGA TGT CAC CCA CGA TTT CCC-3'。PCR 反应体系为 20 μL,反应条件为 94℃,预孵育 10 min,然后 94℃ 变性 30 s;57℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用配对 *t* 检验;计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RCCC 及癌旁组织中 FBP1 蛋白表达水平比较** 118 例 RCCC 及其癌旁组织的配对标本,通过免疫组织化学染色观察标本 FBP1 蛋白的表达情况,78.81%(93/118)的癌旁组织中可见 FBP1 蛋白呈强阳性表达,仅 39.83%(47/118)的 RCCC 癌组织中 FBP1 蛋白表达阳性,二者比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。RCCC 及癌旁组织中 FBP1 蛋白表达水平,见图 1。

**2.2 FBP1 低表达与 RCCC 患者临床病理特点及预后的关系** 根据 FBP1 的表达情况将 118 例 RCCC 患者分为 47 例 FBP1 高表达组和 71 例 FBP1 低表达组。分析 FBP1 的表达和肾癌患者病理特点之间的关系,发现 FBP1 低表达与患者临床分期、病理分级、危险系数及是否复发明显相关( $P < 0.05$ ),而与患者年龄、性别、症状及肿瘤大小,部位,是否有坏死,是否有



A: 癌组织(SP×200); B: 癌组织(SP×400); C: 癌旁组织(SP×200); D: 癌旁组织(SP×400)

图 1 免疫组织化学方法检测 RCCC 及癌旁组织中 FBP1 的表达

血管侵犯和肾上腺是否有累及无关( $P>0.05$ ), 见表 1。FBP1 高表达的肾癌患者的 5 年生存率高于 FBP1 低表达者( $P<0.05$ ), 见图 2。

表 1 118 例 RCCC 患者中 FBP1 的表达与临床病理特征间关系

临床特征	高表达组 (n=47)	低表达组 (n=71)	P
年龄( $\bar{x}\pm s$ , 岁)	60.00±11.60	59.00±10.90	0.283
性别[n(%)]			0.107
女	23(48.94)	23(32.39)	
男	24(51.06)	48(67.61)	
部位[n(%)]			0.142
左侧	21(44.68)	37(52.11)	
右侧	26(55.32)	34(47.89)	
临床分期[n(%)]			0.023
T <sub>1</sub>	33(70.21)	56(78.87)	
T <sub>2</sub>	12(25.53)	11(15.49)	
T <sub>3</sub>	2(4.26)	4(5.63)	
T <sub>4</sub>	0	0	
病理分级[n(%)]			0.001
高分化	3(6.38)	8(11.27)	
中分化	34(72.34)	63(88.73)	
低分化	10(21.28)	0	
危险系数[n(%)]			0.014
低危	26(55.32)	58(81.69)	
中危	19(40.43)	13(18.31)	
高危	2(4.26)	0	
肾上腺侵犯[n(%)]			0.126
否	45(95.74)	70(98.59)	
是	2(4.26)	1(1.41)	
血管侵犯[n(%)]			0.433
无	27(57.45)	48(67.61)	
有	20(42.55)	23(32.39)	
肿瘤坏死[n(%)]			0.962
否	40(85.11)	59(83.10)	
是	7(14.89)	12(16.90)	
临床症状[n(%)]			0.691
无	42(89.36)	64(90.14)	
有	5(10.64)	7(9.86)	
复发[n(%)]			0.043

续表 1 118 例 RCCC 患者中 FBP1 的表达与临床病理特征间关系

临床特征	高表达组 (n=47)	低表达组 (n=71)	P
否	42(89.36)	46(64.79)	
是	5(10.64)	25(35.21)	
肿瘤大小( $\bar{x}\pm s$ , cm)	5.56±2.89	7.19±3.49	0.124

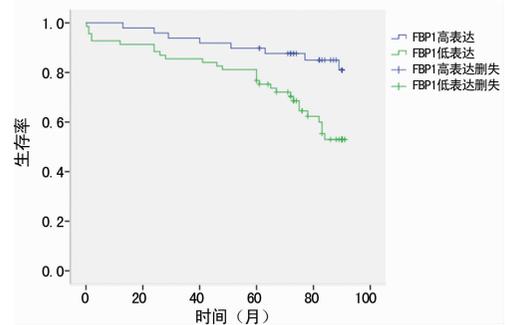
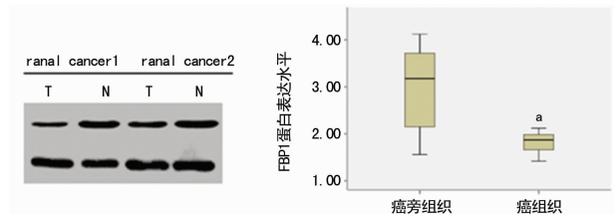


图 2 基于 FBP1 表达有关的患者总生存率曲线

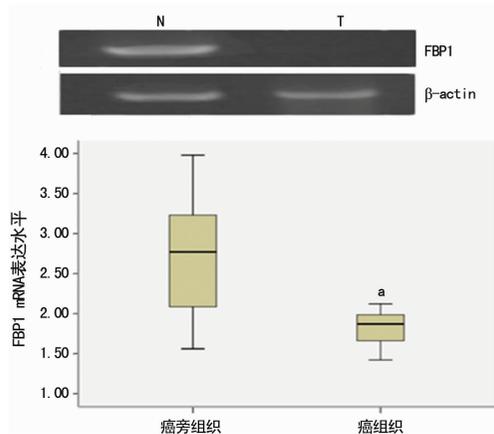
2.3 RCCC 癌组织和癌旁组织中 FBP1 蛋白的表达水平比较 用相同的 40 例 RCCC 及其癌旁组织的配对标本, 采用 Western blot 法进一步验证 FBP1 蛋白的表达变化情况。结果显示 40 份 RCCC 癌组织中 FBP1 的阳性表达率较其相应癌旁组织明显下降, 差异有统计学意义( $t=8.665, P<0.01$ ), 见图 3。



T: 癌组织; N: 癌旁组织; a:  $P<0.01$ , 与癌旁组织比较

图 3 FBP1 蛋白在 RCCC 癌组织及癌旁组织中的表达

2.4 RCCC 癌组织和癌旁组织中 FBP1 mRNA 的表达水平比较 应用 RT-PCR 方法, 检测 40 例新鲜 RCCC 癌组织及其癌旁组织的配对标本中 FBP1mRNA 的表达变化。结果显示, 31 份标本的癌旁组织中 FBP1mRNA 均有明显的表达, 而仅 9 份癌组织中 FBP1mRNA 表达阳性( $t=2.908, P=0.044$ ), RCCC 癌组织中 FBP1mRNA 的表达水平明显降低, 见图 4。



N: 癌旁组织; T: 癌组织; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与癌旁组织比较

图 4 FBP1 mRNA 在 RCCC 癌组织及癌旁组织中的表达

### 3 讨 论

肾癌在泌尿系统肿瘤中居第 2 位,在全身所有肿瘤中大约占 2%,85%左右为 RCCC<sup>[5-6]</sup>。肾癌的发病机制十分复杂,是一个多基因、多信号、多因素共同作用的过程,国内的流行病学检查结果显示肾癌的发病率在不断的升高<sup>[7]</sup>。

近年来,FBP1 与肿瘤的关系受到越来越多的关注。在胰腺癌组织中,核仁磷酸蛋白(NPM1)通过抑制 FBPI 的表达来促进有氧糖酵解和肿瘤进展,FBP1 的表达缺失提示胰腺癌患者预后差<sup>[1]</sup>。SHENG 等<sup>[2]</sup>通过检测了 140 例肺癌、癌旁及正常肺组织发现肺癌组织中 FBP1 的表达明显低于癌旁及正常肺组织,较高表达 FBP1 肺癌患者的生存期和总体生存率明显高于 FBP1 低表达的肺癌人群。本研究结果显示,FBP1 蛋白在肾癌组织中的表达明显低于癌旁组织,呈现明显异常低表达,提示 FBP1 蛋白功能缺失可能与肾癌的发生、发展密切相关,这也与 LI 等<sup>[8]</sup>的研究结果一致,而且本研究还进一步分析了 FBP1 与 RCCC 患者临床、病理等之间的关系。LI 等<sup>[8]</sup>在研究 FBP1 与 RCCC 的关系时发现 FBP1 主要通过两种不同的机制来抑制肾癌的进展。(1)FBP1 作为糖酵解中的关键酶,对抗肾小管上皮细胞中的糖酵解流量<sup>[9]</sup>,从而抑制透明细胞癌生成的潜在瓦勃效应<sup>[10-11]</sup>。(2)在 VHL 缺乏的 RCCC 中,FBP1 通过直接结合缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的转录抑制去抑制 HIF-1 $\alpha$  的功能,从而达到其抑制细胞增殖、糖酵解和糖磷酸途径<sup>[12]</sup>,这些都是以非催化作用依赖方式进行的。

本研究结果显示,肾癌组织与癌旁组织比较,FBP1 不仅在蛋白质水平表达明显降低,而且 mRNA 水平表达也明显降低,且差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。而且 FBP1 低表达与患者临床分期、病理分级、危险系数及是否复发呈明显阳性关系,FBP1 表达阳性的肾癌患者,其 5 年生存率明显高于 FBP1 表达阴性的患者。这些结果说明了 FBP1 与肾癌密切相

关,伴随着肾癌的发生,FBP1 基因表达在转录水平受到了抑制,具体作用机制需要更广泛而深入的研究。如果找到了肾癌发生中调控 FBP1 基因表达的调节因子,就能够为研发干预治疗药物提供理论指导,并且这一发现将具有重要的潜在临床意义。

### 参考文献

- [1] ZHU Y, SHI M M, CHEN H, et al. NPM1 activates metabolic changes by inhibiting FBPI while promoting the tumorigenicity of pancreatic cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(25): 21443-21451.
- [2] SHENG H Y, YING L S, ZHENG L, et al. Down expression of FBPI is a negative prognostic factor for Non-Small-Cell lung cancer [J]. *Cancer Invest*, 2015, 33(5): 197-204.
- [3] ZHANG J, WANG J, XING H, et al. Down-regulation of FBPI by ZEB1-mediated repression confers to growth and invasion in lung cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 411(1/2): 331-340.
- [4] DONG C, YUAN T, WU Y, et al. Loss of FBPI by snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3): 316-331.
- [5] WEIN A J, KAVOUSSI L R, NOVICK A C, et al. Campbell-Walsh Urology (the 9th edition). Ying-lu guo, li-qun zhou main translation [M]. Beijing: Beijing medical university press, 2009: 1651-1733.
- [6] LINDSKOG M, WAHLGREN T, SANDIN R, et al. Overall survival in Swedish patients with renal cell carcinoma treated in the period 2002 to 2012: Update of the RENCOMP study with subgroup analysis of the synchronous metastatic and elderly populations [J]. *Urol Oncol*, 2017(17): 30226-30229.
- [7] LI H R, SAMAWI H, HENG D Y. The use of prognostic factors in metastatic renal cell carcinoma [J]. *Urol Oncol*, 2015, 33(12): 509-516.
- [8] LI B, QIU B, LEE D S, et al. Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression [J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 251-255.
- [9] COHEN H T, MCGOVERN F J. Renal-cell carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(23): 2477-2490.
- [10] HEIDEN M G, THOMPSON C B. understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [11] DEBERARDINIS R J, THOMPSON C B. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? [J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1132-1144.
- [12] SHI L, HE C, LI Z, et al. FBPI modulates cell metabolism of breast cancer cells by inhibiting the expression of HIF-1 $\alpha$  [J]. *Neoplasma*, 2017, 64(4): 535-542.