

文章编号 1006-8147(2020)02-0149-04

论著

## FMNL2 在胃癌组织中的表达及其临床意义

张灿灿<sup>1</sup>, 谭志军<sup>2</sup>

(1. 天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; 2. 天津市第一中心医院普外科, 天津 300192)

**摘要** 目的: 研究在胃癌组织中形成素样蛋白 2(FMNL2) 的表达及临床意义。方法: 收集普外科 30 例胃癌组织标本及其对应的远癌组织, 利用免疫组化及实时定量 PCR 法检测胃癌中 FMNL2 蛋白及 mRNA 的表达情况, 并分析其蛋白表达与临床病理因素之间的关系, 运用数据库 *Kaplan-Meier* 分析胃癌的生存状况。结果: 胃癌组织中 FMNL2 蛋白及 mRNA 的表达均明显高于对应的远癌组织(均  $P < 0.05$ ); FMNL2 蛋白表达与胃癌的淋巴结转移、TNM 分期密切相关(均  $P < 0.05$ ), 而与患者的年龄、性别、浸润深度、分化程度以及远处转移之间没有显著相关性(均  $P > 0.05$ ); K-M 生存曲线显示 FMNL2 表达水平与胃癌生存预后明显相关(均  $P < 0.05$ )。结论: FMNL2 在胃癌组织中高表达, 且与肿瘤的一些临床病理因素特别是淋巴结转移密切相关。FMNL2 可能作为肿瘤转移、判断预后的标志基因。

**关键词** FMNL2; 胃癌; 转移; 生存分析

中图分类号 R735.2

文献标志码 A

### Expression and clinical significance of FMNL2 in gastric cancer

ZHANG Can-can<sup>1</sup>, TAN Zhi-jun<sup>2</sup>

(1. The First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of General Surgery, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract Objective:** To study the expression and clinical significance of Formin-like2(FMNL2) in gastric cancer tissues. **Methods:** Thirty gastric cancer tissue samples and their corresponding distal cancerous tissues were collected from the Department of General Surgery. The protein and mRNA expression of FMNL2 in gastric cancer and their corresponding adjacent tissues were detected by immunohistochemistry and real-time quantitative PCR, and the relationship between its protein expression and clinicopathological factors was analyzed. Survival analysis of gastric cancer was performed by *Kaplan-Meier* database. **Results:** The protein and mRNA expression of FMNL2 in gastric cancer tissues were significantly higher than those in the corresponding distal cancerous tissues(both  $P < 0.05$ ). The protein expression of FMNL2 was closely correlated with lymph node metastasis and TNM stage of gastric cancer (both  $P < 0.05$ ), but there was no significant correlation between expression of FMNL2 protein and age, gender, invasion depth, differentiation degree and distant metastasis(all  $P > 0.05$ ). The K-M survival curve showed that the expression level of FMNL2 was significantly correlated with the survival prognosis of gastric cancer (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** FMNL2 is highly expressed in gastric cancer tissues and closely related to the clinicopathological factors of tumor, especially lymph node metastasis. FMNL2, as a target gene, may play an important role in tumor metastasis and prognosis.

**Key words** FMNL2; gastric cancer; metastasis; survival analysis

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 患病率和死亡率均位于世界前列, 由于胃癌的复发和转移率较高, 5 年生存率较低, 预后较差, 而我国在全球范围内又属于胃癌高发国家, 严重影响患者健康, 是肿瘤预防和治疗的重点<sup>[1-2]</sup>。形成素样蛋白 2(Formin-like 2, FMNL2) 是形成素样蛋白(Formins)家族成员之一, 定位于人类染色体 2q23.3, 调控细胞分裂、极性、黏附和形态发生<sup>[3]</sup>。FMNL2 在肌动蛋白丝成核或伸长过程中起着关键作用, 影响细胞形态, 同时 FMNL2 与癌症的侵袭和转移有密切关系<sup>[4-5]</sup>。最近几年 FMNL2 作为肿瘤研究的热点, 主要集中在结直肠癌<sup>[6]</sup>、

黑色素瘤<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>等。例如, FMNL2 在结肠癌中高表达, 增强结肠癌的生长和转移, 并且 FMNL2 表达异常的患者 5 年生存率较低<sup>[5-6]</sup>。但是目前 FMNL2 在胃癌中的作用尚不清楚, 同时胃癌晚期患者易发生转移, 手术及化疗效果不佳, 研究 FMNL2 在胃癌中的作用机制, 在胃癌的治疗上将具有重要的指导意义。本研究主要采用免疫组化和实时定量 PCR 的方法检测 FMNL2 在胃癌组织中的表达情况, 并分析 FMNL2 的表达量与其临床病理因素和生存预后之间的关系, 探讨 FMNL2 在肿瘤形成及转移过程中的机制。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集我院普外科 2017 年 11 月至

作者简介 张灿灿(1991-), 女, 硕士在读, 研究方向: 胃肠肿瘤基础与临床; 通信作者: 谭志军, E-mail: zhijuntan2013@163.com。

2018年11月的30例患者胃癌组织标本(取自手术切除经病理检查确认为胃癌标本的组织)及对应的远癌组织(取自距离原发病灶边缘5 cm以外且病理报告无癌残留区的组织);男性21例,女性9例,平均年龄( $63.8 \pm 11.2$ )岁,术前均未接受放化疗。将收集的组织标本分别存储于液氮罐和4%组织固定液中以待后续实验。本实验经过医院伦理委员会讨论通过,患者均签署知情同意书。

**1.2 主要实验试剂** FMNL2抗体购自英国Abcam公司(货号:ab72105)。免疫组化试剂盒(货号:ZLI9018)、DAB显色液(货号:SP9001)等购自北京中杉金桥公司。动物组织总RNA提取试剂盒购自北京天根公司(货号:DP431),引物由上海生工公司合成。逆转录试剂盒购自美国Promega公司(货号:A5001)。SYBRGREEN购自瑞士Roche公司(货号:4913914001)。

**1.3 免疫组化** 按照免疫组化步骤进行实验,经预实验得出FMNL2一抗的最佳稀释浓度为1:200,以PBS作为阴性对照。免疫组化评分(IHC评分)通过其染色强度及阳性细胞率进行评分,染色强度分为4类:0(阴性)、1(弱染色)、2(中等染色)、3(强染色);阳性率(即阳性细胞占所有细胞百分比)分为5类:0(<1%)、1(1%~25%)、2(25%~50%)、3(50%~75%)、4(>75%)。IHC评分为各个染色强度与其对应的阳性细胞率乘积之和,双盲法阅片,本研究中IHC评分标准如下:胃癌中FMNL2低表达IHC评分为 $\leq 7$ ,高表达IHC评分为 $\geq 8$ 。

**1.4 组织总RNA提取及逆转录** 取约20 mg组织,加入300  $\mu$ L裂解液匀浆,完成后加入590  $\mu$ L无酶水和10  $\mu$ L蛋白酶K,混匀后56  $^{\circ}\text{C}$ 金属浴20 min,低温离心机以12 000 $\times g$ 离心5 min,取上清420  $\mu$ L和等量无水乙醇轻柔混匀置于吸附柱中离心1 min,加入350  $\mu$ L去蛋白液离心1 min,加入80  $\mu$ L DNase I工作液,室温静置15 min,重复一次去蛋白液,加入500  $\mu$ L漂洗液室温静置2 min离心1 min,重复一次后加入DEPC水溶解离心即可得RNA液。按照逆转录试剂盒说明操作制备cDNA:取1  $\mu$ g RNA和1  $\mu$ L Oligo(dT)后,补DEPC水至10.5  $\mu$ L,70  $^{\circ}\text{C}$ 反应5 min后迅速置于冰上,加入4  $\mu$ L 5 $\times$  Reaction Buffer、3  $\mu$ L  $\text{MgCl}_2$ 、1  $\mu$ L PCR Nucleotide Mix、1  $\mu$ L Reverse Transcriptase和0.5  $\mu$ L RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor,程序设为:25  $^{\circ}\text{C}$  5 min、42  $^{\circ}\text{C}$  60 min、70  $^{\circ}\text{C}$  15 min,反应完成后所得反应液为cDNA。

**1.5 实时定量PCR法测定胃癌组织中FMNL2的表达情况** FMNL2的上游引物为5'-CCCGCTCTG-GAAGACATT-3',下游引物为5'-CTGCCAACAG

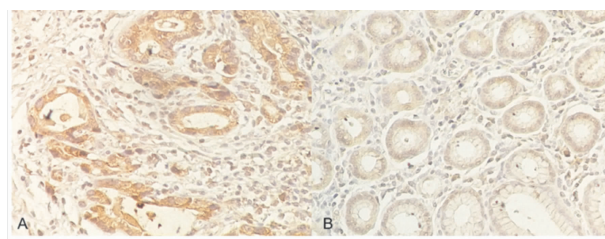
TAAGACAAG-3';GAPDH的上游引物为5'-TGCAC CACCAACTGCTTAGC-3',下游引物为5'-GGCATG GACTGTGCTCATGAG-3'。建立20  $\mu$ L反应体系[Fast Start Universal SYBR Green Master(ROX)10  $\mu$ L,上下游引物各1  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L],设置反应条件:预变性95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。通过循环数法 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 计算位于组织中各指标的表达情况。

**1.6 通过Kaplan-Meier数据库分析FMNL2基因mRNA水平与胃癌患者生存预后的关系** Kaplan-Meier数据库是一个包含5种癌症(乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胃癌和肝癌)的mRNA表达谱芯片公共数据库,从中能够获得基因表达与疾病预后的信息。通过此数据库输入胃癌与目的基因FMNL2来挖掘数据,即可得到该基因表达的K-M曲线图。

**1.7 统计学处理** 通过软件SPSS19.0对实验数据进行分析,计数资料采用卡方检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用组间 $t$ 检验,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 胃癌组织中FMNL2的表达情况** 免疫组化染色结果如图1所示,胃癌组织中细胞质内有大量深棕色颗粒,而在远癌组织中未观察到FMNL2阳性细胞,说明FMNL2在胃癌组织中的表达与其对应的远癌组织相比明显升高。



注:A:胃癌组织中高表达,呈棕褐色;B:远癌组织中低或不表达

图1 IHC检测胃癌组织中FMNL1的表达情况(免疫组化)

Fig 1 Expression of FMNL1 in gastric cancer tissues detected by IHC(IHC)

通过实时定量PCR检测30对胃癌组织及其相对应的远癌组织中FMNL2基因的mRNA表达情况。结果如图2所示,在胃癌组织中,FMNL2基因的表达水平显著高于其对应的远癌组织,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 FMNL2的表达水平与临床病理因素的关系** 按照IHC评分标准进行评分,将30例胃癌组织分为低表达组和高表达组。两组胃癌组织中FMNL2表达与临床病理因素分析如表1所示,FMNL2表达与患者年龄、性别及癌症的浸润深度、肿瘤分化程度

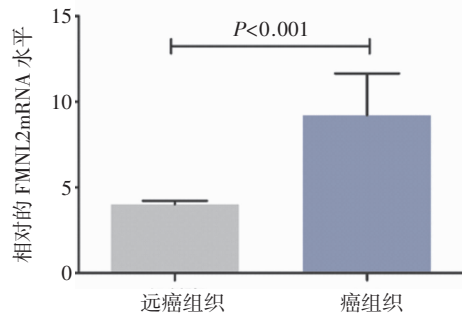


图 2 实时定量 PCR 法检测胃癌组织中 FMNL2 的表达

Fig2 Expression of FMNL2 in gastric cancer tissues detected by real-time PCR

和远处转移等临床病理学特征没有显著相关性(均  $P>0.05$ )。然而,FMNL2 表达水平与胃癌的淋巴结转移和 TNM 分期之间具有相关性(均  $P<0.05$ )。

表 1 胃癌中 FMNL2 表达与临床病理因素关系

Tab 1 Relationship between expression of FMNL2 and clinico-pathological factors in gastric cancer

临床病理因素	数量	低表达组 <i>n</i> (%)	高表达组 <i>n</i> (%)	$\chi^2$	<i>P</i>
年龄					
≤65	16	10(62.5)	6(42.9)	1.158	0.464
>65	14	6(37.5)	8(57.1)		
性别					
男	21	11(68.8)	10(71.4)	0.026	1.000
女	9	5(31.2)	4(28.6)		
肿瘤分化程度					
中高分化	13	8(50.0)	5(35.7)	0.621	0.484
低分化	17	8(50.0)	9(64.3)		
TNM 分期					
I-II	13	11(68.8)	2(14.3)	9.020	0.004
III-IV	17	5(31.2)	12(85.7)		
浸润深度(T)					
T1-T2	7	6(37.5)	1(7.1)	3.846	0.086
T3-T4	23	10(62.5)	13(92.9)		
淋巴结转移(N)					
N0	8	7(43.8)	1(7.1)	5.117	0.039
Nx	22	9(56.2)	13(92.9)		
远处转移(M)					
M0	25	15(93.8)	10(71.4)	2.679	0.157
M1	5	1(6.2)	4(28.6)		

2.3 胃癌患者 FMNL2 基因 mRNA 水平与生存预后之间的关系 通过 Kaplan-Meier 数据库分析了胃癌组织中 FMNL2 基因的表达水平和胃癌患者生存预后之间的关系。结果如图 3 所示,胃癌组织中 FMNL2 基因高表达(high)患者组的生存期较短,生存预后较差,其中位生存期为 29 个月,然而 FMNL2 基因低表达(low)患者组的中位生存期为 89 个月,

差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

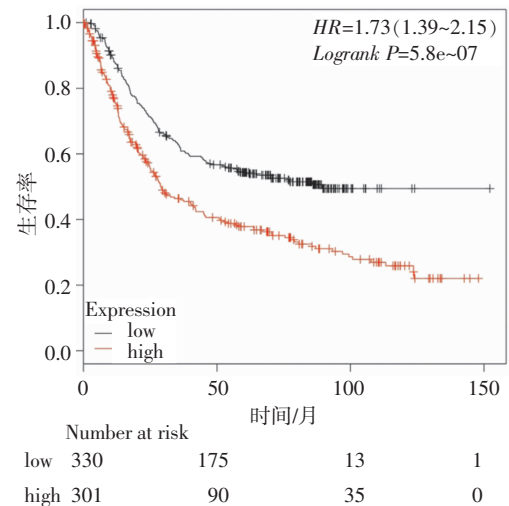


图 3 利用 Kaplan-Meier 数据库研究 FMNL2 在胃癌中的生存分析

Fig 3 Survival analysis of FMNL2 in gastric cancer using Kaplan-Meier database

### 3 讨论

Formins 家族是一类参与细胞黏附、细胞分裂、细胞极性和细胞形态发生的肌动蛋白修饰蛋白,其中 FMNL2 在迁移细胞的前缘产生突出的肌动蛋白结构,即板层和丝状足<sup>[9-10]</sup>。FMNL2 可促进上皮间质转化<sup>[5]</sup>,这与细胞黏连的丧失和迁移能力的增强有关<sup>[11]</sup>。在健康组织中,FMNL2 广泛表达,最高表达在中枢神经系统<sup>[10,12]</sup>;FMNL2 在几种癌症中表达上调,尤其是在转移性肿瘤中<sup>[6,13]</sup>。不受控制的增殖以及侵袭性和转移性是恶性肿瘤的一个特征。因此,对肿瘤组织中 FMNL2 的研究是必要的。

迁移和侵袭是肿瘤转移的重要起始步骤。而 FMNL2 与肿瘤的迁移和侵袭密切相关,例如,FMNL2 在结肠癌中的表达与肿瘤侵袭和淋巴转移密切相关<sup>[14]</sup>。Zhu 等<sup>[6]</sup>研究表明,FMNL2 在结肠癌中的表达水平较高,同时 FMNL2 的高表达也被发现与结肠癌的侵袭和转移相关<sup>[14]</sup>,这为 FMNL2 在癌细胞生长中的作用提供了直接证据。相反,在 FMNL2 水平较低的肝癌中,FMNL2 过表达抑制肝癌细胞的运动和侵袭<sup>[15]</sup>。这说明 FMNL2 在不同肿瘤类型中起着不同的作用。在胃癌细胞中发现:抑制 FMNL2 基因的表达可影响胃癌细胞的增殖并诱导其凋亡,这表明 FMNL2 可能参与胃癌的生长<sup>[16]</sup>。本研究探讨了 FMNL2 在胃癌组织中的作用,结果发现 FMNL2 在胃癌组织中高表达,并且高表达组的胃癌恶性程度较高,促进淋巴结转移,表明 FMNL2 可能与胃癌发展进程以及转移密切相关。此结果与 Zhong 等发现的 FMNL2 参与胃癌细胞转移的结论一致。然而 FMNL2 在胃癌发



生、发展中的作用机制还有待进一步探索。

在多种人类癌症中均发现 FMNL2 的异常表达,并且与肿瘤进展和不良预后相关,例如在结直肠癌中,FMNL2 高表达可能与淋巴转移瘤相关,而在肝癌中,FMNL2 表达降低被认为是预后较差的一个标志<sup>[15,17]</sup>。通过 *Kaplan-Meier* 数据库分析 FMNL2 在胃癌中对生存预后的作用,发现胃癌患者 FMNL2 高表达组的生存期少于低表达组的生存期,中位生存期仅 29 个月。本研究结果推测,在胃癌组织中 FMNL2 表达量越高,胃癌的恶性程度越高,患者的预后也越差。

综上所述,通过本实验证明 FMNL2 在胃癌组织中高表达,并且 FMNL2 很可能是了解胃癌发生和转移的重要生物学分子,为胃癌的治疗提供了新的思路和途径。

#### 参考文献:

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359
- [2] Nie Y, Wu K, Yu J, et al. A global burden of gastric cancer: the major impact of China[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 11(7): 651
- [3] Kuhn S, Geyer M. Formins as effector proteins of Rho GTPases[J]. *Small GTPases*, 2014, 5(3): e29513
- [4] Faix J, Grosse R. Staying in shape with formins[J]. *Dev Cell*, 2006, 10(6): 693
- [5] Yang S S, Li X M, Yang M, et al. FMNL2 destabilises COMMD10 to activate NF- $\kappa$ B pathway in invasion and metastasis of colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2017, 117(8): 1164
- [6] Zhu X L, Zeng Y F, Guan J, et al. FMNL2 is a positive regulator of cell motility and metastasis in colorectal carcinoma[J]. *J Pathol*, 2011, 224(3): 377
- [7] Torre L A, Siegel R L, Ward E M, et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016, 25(1): 16
- [8] Lizarraga F, Poincloux R, Romao M, et al. Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2792
- [9] Ren X L, Qiao Y D, Li J Y, et al. Cortactin recruits FMNL2 to promote actin polymerization and endosome motility in invadopodia formation[J]. *Cancer Lett*, 2018, 419: 245
- [10] Gardberg M, Talvinen K, Kaipio K, et al. Characterization of Diaphanous-related formin FMNL2 in human tissues[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11: 55
- [11] Péladeau C, Heibin A, Maltez M T, et al. A specific FMNL2 isoform is up-regulated in invasion cells[J]. *BMC Cell Biol*, 2016, 17(1): 32
- [12] Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 genes in silico[J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(5): 1161
- [13] Yan Y, Wang Z, Qin B, et al. A novel long noncoding RNA, LINC00483 promotes proliferation and metastasis via modulating of FMNL2 in CRC[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 509(2): 441
- [14] Zhu X L, Liang L, Ding Y Q. Overexpression of FMNL2 is closely related to metastasis of colorectal cancer[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23(11): 1041
- [15] Liang L, Guan J, Zeng Y, et al. Down-regulation of formin-like 2 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(11): 1603
- [16] Zhong B, Wang K, Xu H, et al. Silencing Formin-like 2 inhibits growth and metastasis of gastric cancer cells through suppressing internalization of integrins[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 79
- [17] Gardberg M, Heuser V D, Koskivuo I, et al. FMNL2/FMNL3 formins are linked with oncogenic pathways and predict melanoma outcome[J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 2(1): 41

(2019-6-13 收稿)

(上接第 144 页)

- [11] 赵凤毛,冀园琦,孙骇浪,等.婴儿促纤维增生性星形细胞瘤/神经节细胞胶质瘤的诊治体会[J].*中华神经外科杂志*,2017,33 (7):708
- [12] 中国脑胶质瘤协作组(CGCG).成人幕上低级别胶质瘤的手术治疗指南[J].*中华神经外科杂志*,2016,32(7):652
- [13] 苏国辉,刘志雄,霍雷,等.神经导航辅助下显微手术治疗功能区胶质瘤[J].*中南大学学报:医学版*,2017,42(5):542
- [14] Spitaels J, Devriendt D, Sadeghi N, et al. Management of supratentorial recurrent low-grade glioma: A multidisciplinary experience in 35 adult patients[J].*Oncol Lett*,2017,14(3):2789
- [15] 马康平,易林华,秦广彪,等.神经节细胞胶质瘤致癫痫的临床特点及手术疗效分析[J].*中国微侵袭神经外科杂志*,2017,22(8):347

(2018-12-28 收稿)