

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.20.003
文章编号: 1005-8982(2020)20-0012-05

临床研究·论著

子宫内膜癌中线粒体融合蛋白2的表达及其临床意义*

接智慧¹, 周岩¹, 高翔¹, 邵婷², 张雪英²

(1. 山东第一医科大学第二附属医院 妇产科, 山东 泰安 271000; 2. 赤峰学院附属医院 妇产科, 内蒙古 赤峰 024000)

摘要: 目的 探讨线粒体融合蛋白2(MFN2)在子宫内膜癌的表达及其临床意义。**方法** 利用免疫组织化学法检测MFN2在20例正常子宫内膜(正常子宫内膜组)、33例非典型增生(非典型增生组)和72例子宫内膜癌(子宫内膜癌组)患者石蜡包埋组织中的表达,并分析其与子宫内膜癌临床病理特征及预后的关系。采用qRT-PCR检测正常子宫内膜组(20例)、非典型增生组(23例)和子宫内膜癌组(40例)的新鲜冷冻组织中MFN2 mRNA相对表达量。**结果** 子宫内膜癌组MFN2蛋白阳性率低于非典型增生组和正常子宫内膜组($P < 0.05$)。qRT-PCR结果提示,子宫内膜癌组MFN2 mRNA相对表达量低于非典型增生组和正常子宫内膜组($P < 0.05$)。不同病理类型、分化程度、FIGO分期及有无淋巴结转移的子宫内膜癌患者MFN2蛋白高表达率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);而不同年龄、是否绝经及肌层浸润深度的MFN2蛋白高表达率比较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。生存分析结果显示,MFN2蛋白低表达子宫内膜癌患者生存时间短于高表达患者($P < 0.05$)。**结论** MFN2在子宫内膜癌中的异常表达可能参与肿瘤的发生、发展生物学过程,检测MFN2的表达水平可以为子宫内膜癌的诊断和预后判断提供参考。

关键词: 子宫内膜肿瘤;线粒体蛋白质类;基因表达调控,肿瘤;预后

中图分类号: R737.3

文献标识码: A

Expression of MFN2 in endometrial carcinoma and its clinical significance*

Zhi-hui Jie¹, Yan Zhou¹, Xiang Gao¹, Ting Shao², Xue-ying Zhang²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Taian, Shandong 271000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated hospital of Chifeng University, Chifeng, Inner Mongolia 024000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of mitochondrial fusion protein 2 (mitofusin-2, MFN2) in endometrial carcinoma. **Methods** The expression of MFN2 in 20 cases of normal endometrium, 33 cases of atypical hyperplasia and 72 cases of endometrial carcinoma embedded in paraffin was detected by immunohistochemical method, and its relationship with the clinicopathological features and prognosis of endometrial carcinoma was analyzed. The expression of MFN2 mRNA in 20 cases of normal endometrium, 23 cases of atypical hyperplasia and 40 cases of endometrial carcinoma was detected by real time quantitative PCR (qRT-PCR). **Results** The positive rate of MFN2 protein in endometrial carcinoma was lower than that in atypical hyperplasia and normal endometrial tissue ($P < 0.05$). The qRT-PCR results indicated that the relative expression of MFN2 mRNA in endometrial carcinoma was lower than that in atypical hyperplasia and normal endometrial tissue ($P < 0.05$). There were statistically significant differences in the high expression rate of MFN2 protein in endometrial carcinoma of different pathological types, grades, stages and that with or without lymph node metastasis ($P < 0.05$), while there were no statistically significant differences in the high expression rate of MFN2 protein in patients at

收稿日期: 2020-04-30

* 基金项目: 内蒙古自治区高校科研项目(No: NJZY17311); 泰安市科技发展计划(No: 2018NS0205)

different ages, after or before menopause and with different levels of myometrial invasion of endometrial carcinoma ($P > 0.05$). Survival analysis showed that patients with low expression of MFN2 protein had a shorter survival time than those with high expression of MFN2 protein ($P < 0.05$). **Conclusions** The abnormal expression of MFN2 in endometrial carcinoma may participate in the biological process of tumor occurrence and development. The detection of the expression of MFN2 can provide reference for the diagnosis and prognosis of endometrial carcinoma.

Keywords: endometrial cancer; MFN2; expression; prognosis

子宫内膜癌发病率仅次于宫颈癌,且有逐年上升的趋势^[1]。根据 2014 年我国肿瘤登记年报,子宫内膜癌的发病率在女性恶性肿瘤中居第 9 位,且患病人群呈年轻化趋势^[2],给患者和社会带来沉重的负担。虽然手术结合放疗、化疗及激素治疗等方法使子宫内膜癌疗效提高,但晚期患者疗效仍较差^[3]。因此,探讨子宫内膜癌发生、发展的分子生物学机制,寻找治疗新靶点成为研究热点。近年来研究发现,线粒体融合蛋白 2 (Mitofusin 2, MFN2) 在多种恶性肿瘤中存在差异表达,且与肿瘤患者的不良预后有关^[4]。但 MFN2 在子宫内膜癌中的表达及与预后的关系国内外报道较少,本研究采用免疫组织化学 SP 法和 qRT-PCR 检测 MFN2 在子宫内膜癌组织、非典型增生组织和正常子宫内膜组织中的表达,分析 MFN2 蛋白与子宫内膜癌临床病理特征及预后的关系,为进一步探究 MFN2 在子宫内膜癌发生、发展过程中的作用提供研究基础,同时为子宫内膜癌的诊断和治疗提供新策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2010 年 1 月—2014 年 1 月在山东第一医科大学第二附属医院经病理诊断为子宫内膜腺癌后行手术治疗的 72 例患者标本作为子宫内膜癌组。其中,年龄 30 ~ 71 岁,平均 50.5 岁;病理类型: I 型 60 例, II 型 12 例。依照 2009 年国际妇产科联盟 (Federation International of Gynaecology and Obstetrics, FIGO) 分期标准, I、II 期 41 例, III、IV 期 31 例;分化程度:低分化 21 例,中分化 40 例,高分化 11 例。另收集同期本院 33 例子宫内膜非典型增生患者的内膜组织标本作为非典型增生组。其中,年龄 32 ~ 68 岁,平均 51.4 岁。收集同期本院 20 例因宫颈上皮内瘤变 III 级行全子宫切除术的正常子宫内膜组织标本作为正常子宫内膜组 (包括增生期内膜组织 11 例,分泌期内膜组织 9 例)。其中,年龄 38 ~ 50 岁,平均 45.4 岁。此外,收集 20 例正常子宫内膜、23 例非典型增生和 40 例子宫内膜癌的新鲜组织,均在大体标本离体后 30 min 内采集,立即放入液氮,然后转

入 -80°C 保存,行 qRT-PCR 检测。子宫内膜癌患者术前均未行放疗、化疗及介入等抗肿瘤治疗,纳入患者 (子宫内膜癌、非典型增生、正常子宫内膜) 术前均未行内分泌治疗。本研究通过医院伦理委员会批准,患者及其家属知情同意。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 鼠抗人 MFN2 抗体购自美国 Abcam 公司 (货号 ab56889), 免疫组织化学 SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自福州迈新公司 (货号 KIT-9730), 苏木精染色剂购自珠海贝索生物公司, Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, cDNA 逆转录试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司 (货号 K1622), qRT-PCR 检验试剂盒购自珠海莫纳生物科技有限公司 (货号 MQ00201), 目的基因及内参基因引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。7500 型定量 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司)。

1.2.2 免疫组织化学 SP 法 对正常子宫内膜、内膜非典型增生和子宫内膜癌组织中 MFN2 的表达进行检测。石蜡包埋组织后进行连续性切片,脱蜡至水后采用过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性,室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次后蛋白封闭 2 h, 将兔抗人 MFN2 抗体 (1 : 1 000) 加入后, 4°C 过夜,复温后滴加二抗 (1 : 400), 室温孵育 30 min, 加入辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标志物,室温孵育 10 min。PBS 冲洗后滴加 DAB 显色,复染、脱水、封片。镜检并拍照记录。结果判定: MFN2 蛋白阳性表现为细胞质出现棕黄色颗粒。染色强度:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。阳性细胞比例: $<26\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\%$ 为 3 分。根据染色强度和阳性细胞比例乘积判定:得分 ≥ 5 分为高表达, <5 分为低表达^[5]。结果由 2 名观察者独立阅片判定。

1.2.3 qRT-PCR 采取 Trizol 一步法提取组织中总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度 (OD 260/OD 280 比值 1.8 ~ 2.0),按逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,置于 -20°C 冷冻保存备用。MFN2 正向引物: 5'-AACCCGGTCATCTAACCCGT-3', 长度 20 bp;反向引物: 5'-TACTCCA

CTATCGTTCTCTATTGAG-3', 长度 25 bp。GAPDH 正向引物: 5'-ACGCCTGCGCACTCGCATG-3', 长度 19 bp; 反向引物: 5'-TAGTCGGACTGAGTTACTGC-3', 长度 20 bp。qRT-PCR 扩增体系为 20 μl, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 10 s, 63 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共计 40 个循环。每一样本重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 MFN2 mRNA 相对表达量进行定量分析。

1.3 随访

采用电话或者门诊随访。随访时间为患者术后 1 ~ 73 个月, 中位随访时间 42 个月, 随访终点事件为患者死亡或者到达随访截止时间 (2019 年 4 月)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 24.0 及 GraphPrism 8.0 统计

软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析; 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验, 进一步两两比较用校正检验水准法 ($\alpha = 0.0125$); Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 比较用 Log-rank χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 MFN2 蛋白表达比较

MFN2 蛋白阳性表现为细胞质出现棕黄色颗粒 (见图 1), 在正常子宫内膜组、非典型增生组和子宫内膜癌组高表达率分别为 85.0%、39.4% 及 20.8% (见图 2), 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 子宫内膜癌组低于非典型增生组和正常子宫内膜组 (P < 0.05)。见表 1。

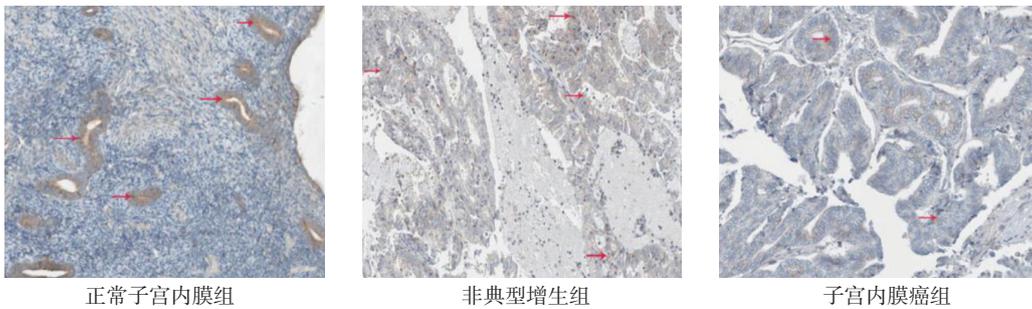
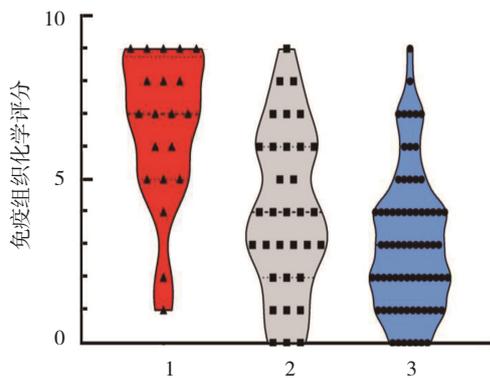


图 1 3 组 MFN2 蛋白表达情况 (SP 法 × 200)



1: 正常子宫内膜组; 2: 非典型增生组; 3: 子宫内膜癌组。

图 2 3 组 MFN2 蛋白免疫组织化学评分比较

表 1 3 组 MFN2 蛋白表达水平比较 例 (%)

组别	n	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
正常子宫内膜组	20	17 (85.0)	3 (15.0)		
非典型增生组	33	13 (39.4)	20 (60.6)	65.659	0.000
子宫内膜癌组	72	15 (20.8)	57 (79.2)		

2.2 不同临床病理特征子宫内膜癌患者的 MFN2 蛋白表达

子宫内膜癌组不同年龄、是否绝经及不同肌层浸润深度的 MFN2 蛋白高表达率比较, 差异无统计学意义 (P < 0.05); 而不同病理类型、不同分化程度、有无淋巴结转移及不同 FIGO 分期的 MFN2 蛋白高表达率比较, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 病理类型 II 型高于 I 型, 低分化高于高分化, 无淋巴结转移高于有淋巴结转移, FIGO 分期 I、II 期高于 III、IV 期。见表 2。

2.3 MFN2 蛋白表达与子宫内膜癌患者预后的关系

72 例子宫内膜癌患者中, MFN2 高表达者 57 例, 低表达者 15 例。经过 5 年随访, 无患者失访。Kaplan-Meier 法绘制的生存曲线结果显示, 高表达者的中位生存期为 47 个月, 低表达者的中位生存期为 26 个月。MFN2 高表达组 3 年生存率为 73.3%, 5 年生存率为 33.3%; MFN2 低表达组 3 年生存率为 38.6%, 5 年生存率为 9.8%。两组生存率比较, 经 Log-rank χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.077, P = 0.008$)。见图 3。

表 2 不同临床病理特征子宫内膜癌患者的 MFN2 蛋白表达 例

临床病理特征	n	高表达	低表达	χ^2 值	P 值
年龄					
< 50 岁	37	9	28	0.562	0.453
≥ 50 岁	35	6	29		
是否绝经					
是	32	8	24	0.606	0.436
否	40	7	33		
病理类型					
I 型	60	10	50	9.626	0.002
II 型	12	5	7		
分化程度					
低	21	9	12	8.708	0.012
中	40	5	35		
高	11	1	10		
肌层浸润深度					
≤ 1/2	42	11	31	1.754	0.185
> 1/2	30	4	26		
淋巴结转移					
有	26	2	24	4.261	0.039
无	46	13	33		
FIGO 分期					
I、II 期	41	12	29	4.108	0.043
III、IV 期	31	3	28		

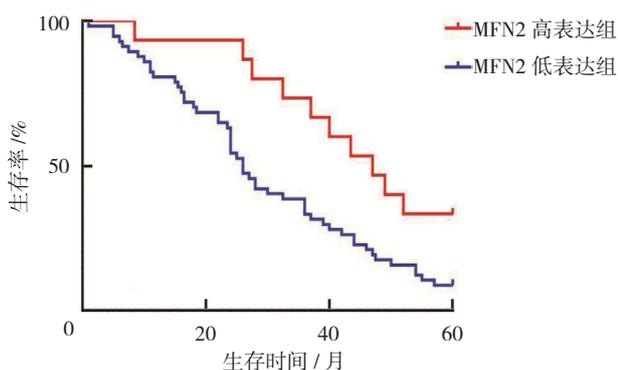
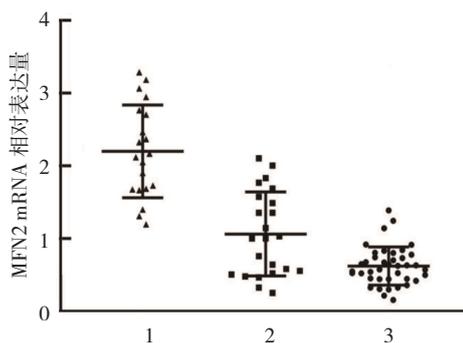


图 3 子宫内膜癌患者生存曲线

2.4 3 组 MFN2 mRNA 相对表达量比较

qRT-PCR 检测结果显示, MFN2 mRNA 在正常子宫内膜组、非典型增生组及子宫内膜癌组相对表达量分别为 (2.200 ± 0.234) 、 (1.063 ± 0.158) 及 (0.622 ± 0.119) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=115.462, P=0.000$), 子宫内膜癌组较正常子宫内膜组、非典型增生组低 ($P<0.05$)。见图 4。



1: 正常子宫内膜组; 2: 非典型增生组; 3: 子宫内膜癌组。

图 4 3 组 MFN2 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

子宫内膜癌是女性生殖系统常见恶性肿瘤之一, 近 30 年来, 其发病率逐年增加, 且复发率和病死率较高^[6]。尽管通过手术联合放疗、化疗等综合治疗提高早期患者生存率, 但是对晚期患者的治疗难度仍较大, 且病死率仍高居不下^[7]。目前研究认为, 子宫内膜癌是一种高度异质性的肿瘤, 且多种危险因素可诱发子宫内膜癌, 如高血压、绝经状态、不孕症及家族史等^[8]。关于其机制研究较多, 但尚未有统一论。因此, 深入研究、阐明子宫内膜癌发病机制, 寻找新的防治方法是目前子宫内膜癌研究的紧迫任务。

MFN2 由定位于 chr 1p 36.22 的 MFN2 基因编码, 含 757 个氨基酸残基, 锚定于线粒体外膜的 U 型跨膜蛋白^[9]。目前研究表明, MFN2 在维持线粒体正常形态、调节线粒体的新陈代谢及参与细胞信号传导等生理功能方面有重要作用^[10]。有学者研究指出, MFN2 低表达与线粒体过度分裂有关, 在癌细胞增殖、凋亡、代谢紊乱、细胞运动和迁移过程中起重要作用, 并且可以激活固有的 (线粒体) 凋亡通路, 而 MFN2 高表达可通过抑制线粒体分裂调控细胞存活、耐药^[11]。MFN2 表现出多方面的作用, 目前许多学者认为, MFN2 在肿瘤细胞的增殖、凋亡细胞自噬中有重要作用^[12]。多位学者分别在膀胱癌^[13]、肝癌^[14]、肺癌^[15]等肿瘤组织中证实, MFN2 在肿瘤中呈低表达, 可能发挥抑癌基因作用, 但在子宫内膜癌中的研究较少。

本研究结果显示, MFN2 在子宫内膜癌组织中的表达均低于非典型增生及正常子宫内膜组织。MUSICCO 等^[16]研究认为, I 型子宫内膜癌组织中 MFN2 蛋白表达低于正常内膜组织及内膜增生组织, 在有线粒体突变的癌组织中降低更为显著, 这与本研究结果一致。进一步分析子宫内膜癌患者的临床病理

特征, 结果表明 MFN2 蛋白低表达与子宫内膜癌患者的病理类型、分化程度、FIGO 分期及有无淋巴结转移有关; 而与患者年龄、是否绝经及肌层浸润深度无关, 提示 MFN2 蛋白低表达与子宫内膜癌的发生、发展有重要关系。MITSUDOMI 等^[17]研究发现, *MFN2* 基因在人乳腺癌 MCF-7 细胞系中表达降低, 而过表达 MFN2 后可抑制 MCF-7 细胞增殖。徐斌武等^[18]研究证实, MFN2 蛋白在骨肉瘤细胞中表达降低可促进肿瘤细胞增殖、侵袭和肿瘤细胞干性特征, 这些研究均提示 *MFN2* 基因在肿瘤的发生、发展过程中起抑癌基因的作用, 其低表达将促进肿瘤的进展。因此认为, MFN2 蛋白在子宫内膜癌中低表达, 可能发挥抑癌基因作用, 低表达可能促进子宫内膜癌肿瘤细胞的增殖、侵袭。

Kaplan-Meier 法生存曲线结果显示, 本研究中 MFN2 低表达子宫内膜癌患者的中位生存期为 23.5 个月, 高表达患者的中位生存期为 32.5 个月, MFN2 低表达患者的中位生存期低于高表达患者。SOARES 等^[19]应用免疫组织化学方法检测头颈部黏膜黑色素瘤组织中 MFN2 蛋白表达, 发现 MFN2 蛋白在肿瘤组织中低表达, 且与较低的无病生存期和总生存期有关。本研究结果与 SOARES 等^[19]的结果一致。因此, 在今后的临床治疗中可通过检测 MFN2 蛋白在子宫内膜癌组织中的表达来作为对患者预后的重要参考指标。

综上所述, MFN2 的表达与子宫内膜癌的病理类型、FIGO 分期、分化程度及淋巴结转移有关, 提示两者可能与子宫内膜癌的发生、发展密切相关。因此, 检测两者的相关性可对疾病的预后提示作用, 为子宫内膜癌的诊治提供新的思路和线索。

参 考 文 献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 277-300.
- [2] 杨曦, 马珂, 吴成. 子宫内膜癌的流行病学及高危因素 [J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(7): 485-488.
- [3] 陈晓斐, 王鹏飞, 刘晨晨, 等. FIGO I 期子宫内膜癌患者 159 例预后影响因素 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(6): 416-420.
- [4] 接智慧, 许文, 高翔, 等. 线粒体融合蛋白 2 基因与肿瘤发生和发展关系研究进展 [J]. *新乡医学院学报*, 2019, 36(8): 797-780.
- [5] 李金贵, 黄飏, 万华, 等. MFN2 mRNA 和蛋白在膀胱癌组织中的表达及与临床特征的关系 [J]. *癌症进展*, 2018, 16(7): 917-919.

- [6] ROSSI E C, KOWLSKI L D, SCALICI J, et al. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(3): 384-392.
- [7] BLEU G, ARSÈNE E, MERLOT B, et al. How to improve the preoperative staging of presumed early-stage endometrioid endometrial cancer[J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2015, 36(6): 698-702.
- [8] 廖秦平, 杨曦. 子宫内膜癌筛查及早期诊断的现状与展望 [J]. *实用妇产科杂志*, 2015, 31(7): 481-484.
- [9] ALLEGRA A, INNAO V, ALLEG A G, et al. Relationship between mitofusin 2 and cancer[J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2019, 116: 209-236.
- [10] 时玉龙, 易成腊. 线粒体融合蛋白 2 的研究进展 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2017, 12(3): 234-237.
- [11] FILADI R, PENDIN D, PIZZO P. Mitofusin 2: from functions to disease[J]. *Cell Death Disease*, 2018, 9(3): 330.
- [12] CHAKRABORTY S, PRASADA K S, SINGH R P, et al. Mitochondria in health and disease[J]. *Mitochondrion*, 2018, 43, 25-29.
- [13] CORMIO A, SANGUEDOLCE F, MUSICCO C, et al. Mitochondrial dysfunctions in bladder cancer: exploring their role as disease markers and potential therapeutic targets[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017, 117, 67-72.
- [14] ZHOU X H, ZHANG L S, ZHENG B C, et al. MicroRNA-761 is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates tumorigenesis by targeting Mitofusin-2[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(4): 424-432.
- [15] REHMAN J, ZHANG H J, TOTH P T, et al. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer[J]. *FASEB J off Publ Fed Am Soc Exp Biol*, 2012, 26(5): 2175-2186.
- [16] MUSICCO C, CORMIO G, PESCE V, et al. Mitochondrial dysfunctions in type I endometrial carcinoma: exploring their role in oncogenesis and tumor progression[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2076.
- [17] MITSUDOMI T, YATABE Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer[J]. *FEBS J*, 2010, 227(2): 301-306.
- [18] 徐斌武, 李晨. 线粒体融合基因 2 抑制骨肉瘤及其干细胞增殖功能分析对其转移机制的影响 [J]. *吉林医学*, 2018, 39(6): 1003-1005.
- [19] SOARES C D, MORAIS T M L, CARLOS R, et al. Prognostic importance of mitochondrial markers in mucosal and cutaneous head and neck melanomas[J]. *Human Pathology*, 2019, 85: 279-289.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 接智慧, 周岩, 高翔, 等. 子宫内膜癌中线粒体融合蛋白 2 的表达及其临床意义 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(20): 12-16.