

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160848

PFKFB3 在结肠癌患者中的表达及其临床意义

章密密, 何跃君

徐州医学院第二附属医院普通外科, 徐州 221006

[摘要] **目的:**检测 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 同工酶 3(PFKFB3)在大样本结肠癌患者中的表达情况及其临床意义。**方法:**用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化法分别检测 156 例结肠癌患者癌和癌旁组织中 PFKFB3 的 mRNA 和蛋白表达水平,分析其与结肠癌临床病理特征及预后的关系。**结果:**PFKFB3 的 mRNA 和蛋白表达在 114 例(73.1%)患者的结肠癌组织中高表达。结肠癌组织中 PFKFB3 的 mRNA 水平高表达与脉管内癌栓形成、淋巴结转移和 TNM 分期相关($P<0.05$)。PFKFB3 mRNA 高表达患者的生存期短于低表达患者($P<0.05$)。**结论:**PFKFB3 在结肠癌患者癌组织中高表达,PFKFB3 的 mRNA 水平高表达与患者恶性表型及不良预后相关。

[关键词] 结肠癌; PFKFB3; 临床病理特征; 预后

[中图分类号] R 365 **[文献标志码]** A

Expression of PFKFB3 in human colon cancer and its clinical significance

ZHANG Mi-mi, HE Yue-jun

Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221006, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of PFKFB3 in human colon cancer and its clinical significance. **Methods:** Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the mRNA and protein expression levels of PFKFB3 in cancer and adjacent tissues of 156 human colon cancer patients. The relationship of PFKFB3 expression with clinicopathological features and prognosis of colon cancer patients was analyzed by statistical analyses. **Results:** PFKFB3 mRNA and protein levels were significantly increased in tumor tissues compared to adjacent non-malignant tissues. Furthermore, correlation analysis indicated that PFKFB3 mRNA high expression in colon cancer tissues was significantly associated with intravascular cancer embolus, lymph node metastasis, and TNM staging($P<0.05$). Survival analysis showed a poor prognosis of patients with high expression of PFKFB3 mRNA level($P<0.05$). **Conclusions:** PFKFB3 is highly expressed in colon cancer. The expression level of PFKFB3 is correlated with the malignant phenotype and poor prognosis of colon cancer.

[Key Words] colon cancer; PFKFB3; clinicopathological features; prognosis

结肠癌发病率在我国逐年升高。最新的统计数据^[1]显示,结肠癌在我国各种肿瘤中发病率居第 3 位。研究^[2]表明,结肠癌的发生伴随着细胞能量代谢的改变。癌细胞即使在有氧条件下也优先利用糖酵解途径来提供能量,这一现象被称为肿瘤细胞的有氧糖酵解,也称为“Warburg 效应”^[3]。6-磷酸果糖激酶-1(PFK-1)是糖酵解途径的关键酶,其最重要的变构激活剂是 2,6 双磷酸果糖(F2,6P2)。而 6-磷酸果糖激酶-2/果糖双磷酸酶-2 同工酶 3(PFKFB3)是促进 F2,6P2 合成最重要的酶,因此具有协同促进调节肿瘤细胞糖酵解的作用。PFKFB3 已被发现在多种肿瘤中高表达^[4]。然而,有关 PFKFB3 在结肠癌中表达的大样本研究及其临床意

义研究较少。因此,本研究拟检测 PFKFB3 在大样本结肠癌患者中的表达情况,并结合相关临床病理资料分析 PFKFB3 的表达与结肠癌临床病理特征和预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2005 年 1 月至 2015 年 12 月在徐州医学院第二附属医院普通外科住院接受手术并接受术后规范治疗的 156 例结肠癌患者。其中男性 89 例,女性 67 例;年龄 18~89 岁,平均年龄(68.5±17.6)岁。患者术前均未接受放化疗以及肿瘤靶向治疗。术中收集手术切除的新鲜肠癌组织与配对的癌旁组织。标本采集后立即置于液氮

[收稿日期] 2016-08-31

[接受日期] 2017-07-12

[作者简介] 章密密,主治医师.E-mail:13914875807@163.com

中,随后于-80℃冰箱中保存待用。所有患者均由同一组医师进行根治性手术,均经病例证实为结肠癌。其中,右半结肠癌 62 例,横结肠癌 10 例,左半结肠直肠癌 84 例;病理类型均为腺癌;肿瘤分化 I 级 15 例,Ⅱ~Ⅲ级 120 例,Ⅲ级 21 例。所有病例均有完整随访资料,随访截至 2015 年 12 月。患者总生存时间为从手术时间至随访截止时间。本研究经徐州医学院第二附属医院伦理委员会批准,患者知情同意并签署知情同意书。

1.2 RT-PCR 法检测癌和癌旁组织中 PFKFB3 的表达 用 TRIzol 法提取结肠癌和癌旁组织总 RNA。取 1 μg 总 RNA 样品按 cDNA 反转录试剂盒说明合成 cDNA,用 TaKaRa 公司的 SYBR 实时定量 PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应。目的基因 PFKFB3 的引物序列正义链:5'-CCT CAC TCG CAG CCA CTT CT-3';反义链:5'-CAG TTC CTA CTC AAT TCC AA-3'。内参基因 β-actin 的 RT-PCR 引物序列正义链:5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3';反义链:5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'。引物均由上海生工生物合成有限公司合成。反应采用两步法在 StepOnePlus™实时荧光定量 PCR 系统进行,反应条件为:预变性 95℃ 1 min,变性 95℃ 5 s,退火和延伸 60℃ 30 s;共进行 40 个循环。癌组织和癌旁组织中 PFKFB3 mRNA 的表达差异采用相对定量法(2^{-ΔΔC_t}法)计算。

1.3 免疫组织化学染色法检测癌和癌旁组织中 PFKFB3 的蛋白表达 制作 4 μm 石蜡切片,常规处理后,采用 EnVision 二步法和 DAB 显色。PFKFB3 一抗按 1:150 稀释。

1.4 统计学处理 采用 Stata 软件数据进行统计学处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Student's *t* 检验或 χ^2 检验。用 Kaplan-Meier 法估计和绘制生存曲线,用 Log-rank 检验进行两组生存曲线的比较。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 PFKFB3 在结肠癌组织中的表达情况 RT-PCR 法检测(图 1)结果显示:156 例结肠癌患者中,

114 例(73.1%)癌组织中 PFKFB3 的 mRNA 表达水平高于癌旁组织($P<0.05$),平均为癌旁组织中 PFKFB3 mRNA 表达水平的 2.3 倍。免疫组化法结果(图 2)显示:癌组织中 PFKFB3 的蛋白水平也高于癌旁组织。

2.2 结肠癌组织 PFKFB3 mRNA 表达水平与结肠癌患者临床病理特征的关系 根据癌组织中 PFKFB3 的 mRNA 相对表达水平,将 156 例患者分为高表达组(78 例)和低表达组(78 例)两组。结果显示:PFKFB3 高表达与脉管内癌栓形成、淋巴结转移和 TNM 分期相关(表 1)。

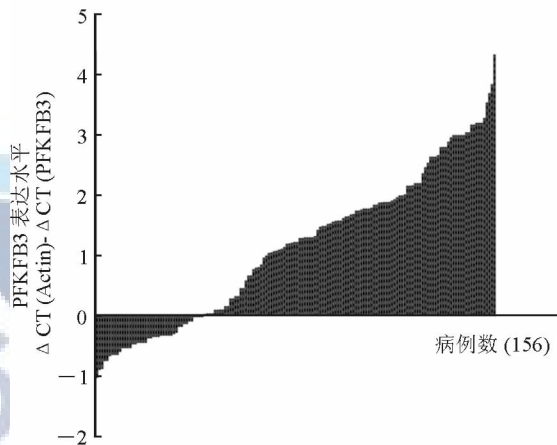


图 1 RT-PCR 法检测 156 例结肠癌和癌旁组织中 PFKFB3 的 mRNA 表达水平

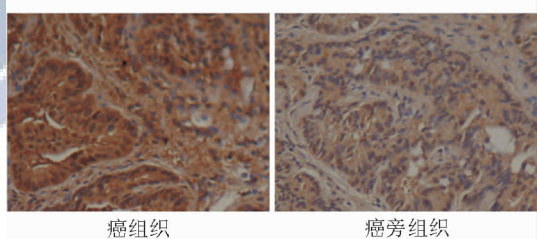


图 2 免疫组织化学染色法检测 PFKFB3 的蛋白表达水平
Original magnification: ×200

2.3 结肠癌组织 PFKFB3 mRNA 表达水平与患者预后的关系 PFKFB3 低表达组术后 1、3、5 年总生存率分别为 89.7%、76.9%、65.4%,PFKFB3 高表达组术后 1、3、5 年总生存率分别为 80.8%、61.5%、51.3%;两组生存率差异有统计学意义($P=0.02$,图 3)。

表 1 PFKFB3 mRNA 水平与结肠癌患者
临床病理特征的关系

			N=78, n	
	PFKFB3		χ^2 值	P 值
	低表达组	高表达组		
性别			0.23	0.63
男	44	41		
女	34	37		
年龄			0.43	0.51
>65 岁	45	49		
≤65 岁	33	29		
脉管内癌栓			6.22	0.01
有	21	36		
无	57	42		
周围神经侵犯			2.23	0.14
有	15	23		
无	63	55		
肿瘤直径			2.47	0.12
>4 cm	19	28		
≤4 cm	59	50		
T 分期			1.19	0.75
T ₁	6	4		
T ₂	20	17		
T ₃	21	20		
T ₄	31	37		
N 分期			8.38	0.02
N ₀	32	16		
N ₁	23	26		
N ₂	23	36		
M 分期			2.08	0.15
M ₀	67	60		
M ₁	11	18		
TNM 分期			7.96	0.04
I	10	6		
II	29	16		
III	28	38		
IV	11	18		

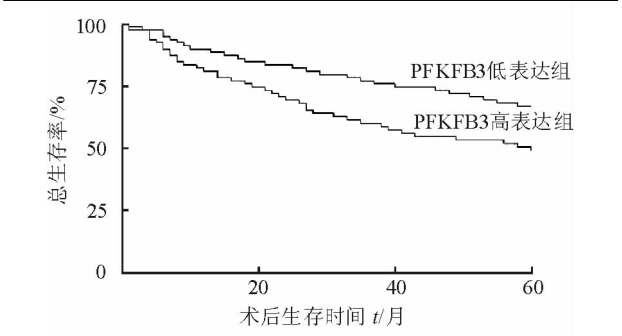


图 3 Kaplan-Meier 曲线分析 PFKFB3 mRNA 表达水平
与结肠癌患者预后的关系

P=0.02

3 讨论

PFKFB3 家族共有 4 个亚型,其中 PFKFB3 于 1995 年首先从脑组织中分离出来^[5];随后在其他组织中也相继分离出了 PFKFB3^[6-7];进一步的研究^[8-9]发现,PFKFB3 没有磷酸酶活性而只有激酶活性。PFKFB3 是促进 F-2,6-BP 形成的最重要的激酶。PFKFB3 被认为在肿瘤的生成和代谢过程中发挥关键作用,但其在大样本结肠癌组织中的表达情况还不清楚。本研究中检测了 PFKFB3 在 156 例结肠癌患者中的表达情况,显示其在结肠癌组织中高表达,这与其他肿瘤中的表达情况类似^[4],提示 PFKFB3 在结肠癌形成过程中可能发挥重要作用。但是其促进结直肠癌肿瘤细胞生长的功能和机制还有待基础研究进一步证实。

此外,本研究表明,PFKFB3 在结肠癌组织中高表达与脉管内癌栓形成、淋巴结转移和 TNM 分期明显相关,提示 PFKFB3 可能也参与肿瘤细胞的血行转移和淋巴结转移等过程,这与基础研究^[10]中发现的 PFKFB3 可促进恶性肿瘤的血管生成的结论相一致。基础研究^[10]表明,PFKFB3 主要通过促进糖酵解过程而加快肿瘤病理性血管的生成,当阻断 PFKFB3 后,血管内皮细胞的增殖和移动受到抑制,从而减少血管的生成,达到阻断肿瘤细胞通过血管进行扩散的目的。但是,PFKFB3 通过何种机制促进结直肠癌细胞淋巴结转移还有待进一步研究。

另外,PFKFB3 高表达的结直肠癌患者预后较差,提示 PFKFB3 有望作为判断结肠癌患者预后的指标,但还需要更大样本的临床研究支持,并与癌胚抗原(CEA)等结直肠癌的经典预后指标进行比较。

综上所述,本研究初步揭示了 PFKFB3 在大样本结直肠癌患者中的表达情况及其临床意义。随着对 PFKFB3 在结直肠癌发生发展过程中作用和机制的深入研究,将来有望通过阻断 PFKFB3 而达到防治结直肠癌或者通过检测 PFKFB3 判断结直肠癌患者预后的目的。

参考文献

[1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016,66(2):115-132.

[2] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011,144(5):646-674.

[3] WARBURG O. On the origin of cancer cells[J]. Science,

- 1956,123(3191):309-314.
- [4] ATSUMI T, CHESNEY J, METZ C, et al. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers[J]. *Cancer Res*, 2002,62(20):5881-5887.
- [5] VENTURA F, AMBROSIO S, BARTRONS R, et al. Cloning and expression of a catalytic core bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995,209(3):1140-1148.
- [6] HAMILTON J A, CALLAGHAN M J, SUTHERLAND R L, et al. Identification of PRG1, a novel progesterin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase[J]. *Mol Endocrinol*, 1997,11(4):490-502.
- [7] MANZANO A, ROSA J L, VENTURA F, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase gene (PFKFB3)[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1998,83(3-4):214-217.
- [8] MARSIN A S, BOUZIN C, BERTRAND L, et al. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(34):30778-30783.
- [9] MINCHENKO A, LESHCHINSKY I, OPENTANOVA I, et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect[J]. *J Biol Chem*, 2002,277(8):6183-6187.
- [10] ROS S, SCHULZE A. Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2, 6-bisphosphatases in cancer metabolism[J]. *Cancer Metab*, 2013,1(1):8.

[本文编辑] 姬静芳

