

糖代谢中关键酶果糖双磷酸酶-1与 卵巢癌化疗敏感性关系的研究

李浩然¹, 李梦娇¹, 刘 霏¹, 王子良², 程 玺¹

1. 复旦大学附属肿瘤医院妇瘤科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032;
2. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 上皮性卵巢癌是女性生殖系统恶性肿瘤中死亡率最高的肿瘤。化疗期间耐药的产生是卵巢癌死亡率高的主要原因。果糖双磷酸酶-1(fructose-1, 6-bisphosphatase, FBP1)是糖代谢过程中的关键酶。FBP1用于催化1,6-二磷酸果糖水解释为6-磷酸果糖和磷酸盐, 从而抑制细胞的糖酵解。该研究旨在探讨FBP1与卵巢癌化疗敏感性关系。方法: 采用免疫组织化学方法检测209例卵巢癌患者标本中FBP1蛋白的表达水平及其与卵巢癌患者化疗敏感性的关系。结果: 在209例卵巢癌组织中, FBP1的阳性表达率为49.3%(103/209), FBP1表达阳性组患者生存期长于阴性组, 二者之间差异有统计学意义(42.6个月 vs 62.1个月, $P=0.003$), 并且FBP1表达与化疗敏感性相关($P=0.007$)。结论: 糖代谢中关键酶基因FBP1的表达可能与卵巢癌对化疗的敏感性有关, 可作为化疗敏感性及预后判断的重要指标。

[关键词] 果糖双磷酸酶-1; 卵巢癌; 顺铂; 化疗敏感性

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.05.004

中图分类号: R737.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)05-0340-05

Research on the relationship between fructose-1, 6-bisphosphatase and chemosensitivity of ovarian carcinoma LI Haoran¹, LI Mengjiao¹, LIU Fei¹, WANG Ziliang², CHENG Xi¹ (1. Department of Gynecological Oncology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Department of Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CHENG Xi E-mail: cheng_xil@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Epithelial ovarian carcinoma is the most malignant tumor in female reproductive system because of its resistance to chemotherapy. Fructose-1, 6-bisphosphatase (FBP1) is a rate-limiting enzyme in gluconeogenesis used to catalyze the hydrolysis of fructose-1, 6-bisphosphate to fructose-6-phosphate and inorganic phosphate, thereby inhibiting the effect of glycolysis in tumor cells. This study aimed to investigate the association between the expression of FBP1 and chemosensitivity. **Methods:** The expression level of FBP1 in ovarian cancer patients was measured by immunohistochemistry. **Results:** According to the results of immunohistochemistry in 209 ovarian carcinoma specimens, the percentage of positive FBP1 expression was about 49.3% (103/209). Loss of FBP1 was a negative factor of survival (42.6 months vs 62.1 months, $P=0.003$). Besides, patients who were sensitive to chemotherapy displayed significantly higher scores of FBP1 expression than patients who were resistant to therapy ($P=0.007$). **Conclusion:** The rate-limiting enzyme FBP1 in gluconeogenesis can be used as a biomarker for predicting the chemoresistance and prognosis of ovarian cancer patients.

[Key words] Fructose-1, 6-bisphosphatase; Ovarian neoplasms; Cisplatin; Chemosensitivity

上皮性卵巢癌是女性生殖系统恶性肿瘤中死亡率最高的肿瘤。流行病学数据表明,在妇科肿瘤引起的死亡病例中,上皮性卵巢癌占52%^[1]。2016年全球卵巢癌新发病例约20 000例,死亡病例约14 000例,其5年生存率只有46.2%,并且超过60%的卵巢癌患者在就诊时已处于晚期^[2]。2003—2007年我国卵巢癌发病率为8.28/10万,死亡率为3.31/10万。我国女性卵巢癌的发病率和死亡率逐年升高,卵巢癌严重威胁着妇女的健康^[3]。

目前治疗卵巢上皮性肿瘤的标准策略是细胞减灭术辅以铂类药物为基础的化疗^[4-5]。虽然卵巢癌的诊断和治疗手段不断进步,但是晚期卵巢癌患者的5年生存率没有明显提高^[2]。卵巢癌死亡率高的主要原因是肿瘤耐药^[6]。有研究表明,在发生耐药的患者中,有1/3接受过铂类药物为基础的化疗,几乎所有的复发性卵巢肿瘤对铂类药物产生耐药^[7]。由于耐药性的产生显著降低了卵巢癌患者的生存率,当今迫切需要发现能降低耐药发生率的治疗方法。

德国生物化学和生理学家Warburg^[8]首次报道了肿瘤细胞比正常细胞有更高的葡萄糖消耗率和较少的氧气消耗率。进一步研究表明,即使在氧气供应充足的条件下,肿瘤细胞糖酵解代谢同样明显活跃。这种在肿瘤细胞中特有的有氧糖酵解现象称之为Warburg效应^[9-10]。随着分子生物学技术的发展,研究发现肿瘤细胞葡萄糖的摄取和糖酵解维持在较高水平是肿瘤选择性的改变。调节糖酵解途径流量最重要的是6-磷酸果糖激酶-1的活性。6-磷酸果糖激酶-1是一个四聚体,受多种变构效应剂的影响。1,6-二磷酸果糖是6-磷酸果糖激酶-1的变构激活剂。果糖双磷酸酶-1(fructose-1,6-bisphosphatase, FBP1)用于催化1,6-二磷酸果糖水解释为6-磷酸果糖和磷酸盐^[11],从而抑制细胞的糖酵解。

在哺乳动物体内,FBP1广泛表达在不同的组织中^[12]。最新的研究表明,FBP1在肿瘤的发生、发展中起着关键作用。在胃癌、肝细胞癌、结肠癌、乳腺癌及肺癌中,FBP1普遍

存在低表达,且其低表达是患者预后不良的因素^[13-14]。FBP1表达下降的主要机制是启动子区域甲基化^[13-18]。FBP1表达下调可引起细胞内一系列的反应,包括引起肿瘤细胞对葡萄糖的敏感性和摄取率增强,糖酵解增加而氧化磷酸化水平下降,ROS产生增加以及引起肿瘤干细胞数量的增加^[16]。除此之外,除了能直接抑制肿瘤细胞的糖酵解外,FBP1还能通过与缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF)抑制结构域直接相互作用从而抑制细胞增殖^[19]。

目前,对糖代谢中的关键酶FBP1在卵巢癌化疗中功能的研究国内外尚未见报道。本研究旨在探索FBP1的表达在卵巢癌临床标本与化疗药物敏感性的关系,以探讨糖代谢中关键基因FBP1在卵巢癌化疗增敏中作为分子靶点的价值及其机制,为建立新的分子靶向治疗联合化疗模式提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 组织样本及主要试剂

组织芯片取材于在2008年3月—2012年3月之间在复旦大学附属肿瘤医院诊治的根据2014年国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期为I~IV期209例卵巢癌标本,其中包括高级别浆液性腺癌113例以及透明细胞癌96例。所有患者均行以铂类药物为基础的辅助性化疗。组织标本用4%的甲醛溶液固定,常规脱水石蜡包埋后制作而成。所有涉及人类受试者的研究均在获得复旦大学附属肿瘤医院伦理委员会批准。免疫组织化学试剂盒购自丹麦DAKO公司。

1.2 免疫组织化学检测

对每个蜡块进行切片和H-E染色并标记典型的肿瘤组织。10×12组织芯片(tissue microarray, TMA)是由复旦大学附属肿瘤医院组织库制作,以5 μm厚度连续切片。每点组织结构完整排列整齐,无脱片、缺损现象。FBP1在组织中的表达水平是用针对FBP1的抗体(ab197777,小鼠多克隆抗体,购自英国Abcam

公司, 1:200稀释)在5 μ m厚的切片上运用免疫组织化学技术检测的。每例选取2个不同位置的组织以排除肿瘤的异质性。已知的阳性病例样本作为阳性对照, 非免疫小鼠/兔血清作为阴性对照。由两名经验丰富的妇科病理医师采用双盲法在显微镜下观察免疫组织化学染色结果, 根据细胞染色强度及染色细胞百分率综合分析评定。根据染色强度分为+~++++, 根据细胞核染色百分率分为+(染色细胞数小于10%)、++(染色细胞数10%~50%)和+++ (染色细胞数大于50%)。综合评分为0(+)、1(+~++)、2(++~++++)、3(+++以上)。FBP1蛋白表达为+定义为阴性, ++及以上为阳性。

1.3 统计学处理

患者随访的时间从开始治疗后计算。总生存期(overall survival, OS)被定义为从诊断日期开始到癌症相关的死亡或最后访问日期。随访截止时间为2016年6月。在最后随访日期时未进展、失访或因其他原因死亡视为截尾。化疗结束后至复发的时间大于6个月被定义为化疗敏感, 化疗结束后至复发的时间小于6个月被

定义为化疗抵抗。采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。FBP1表达与耐药的关系采用 χ^2 检验或Fisher确切检验评估。Kaplan-Meier法估计生存曲线。OS差异比较采用log-rank或者Cox单因素或双因素回归检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 FBP1表达与卵巢癌患者临床病理因素的关系

209例卵巢癌患者中, 其平均年龄为55岁(26~79岁)。在组织学上, 113例(54%)为高级别浆液性腺癌, 96例(46%)为卵巢透明细胞癌(表1)。所有的患者均采用卵巢癌标准治疗方案: 肿瘤细胞减灭术联合铂类和紫杉醇化疗。免疫组织化学检测结果显示, FBP1在卵巢癌组织中的阳性表达率为49.3%(103/209)(图1)。采用Cox比例风险模型同时进行单因素及多因素分析评估卵巢癌的预后因素, 结果发现残余肿瘤大小, 是否耐药以及FBP1表达水平是卵巢癌存活的预后因素(表1, 图2, $P<0.05$)。

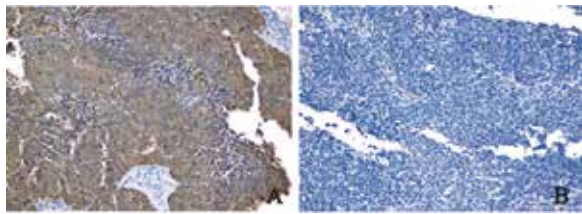
表 1 卵巢癌患者临床病理因素、复发与预后的关系

Tab. 1 The association between clinicopathological characteristics, recurrence and survival in ovarian cancer patient

Prognostic factors	All patients	Non recurrence	Recurrence	Univariate			Multivariate		
				HR	95%CI	P value	HR	95%CI	P value
All patients	209(100.0)	100(47.8)	109(52.2)						
Age/year					0.715-2.021	0.488		0.735-2.111	0.415
≤ 58	137(65.6)	80(58.4)	57(41.6)	1.000			1.000		
> 58	72(34.4)	20(27.8)	52(72.2)	1.202			1.245		
FIGO stage					1.247-7.789	0.015		0.673-5.029	0.235
I - II	94(45.0)	64(68.1)	31(31.9)	1.000			1.000		
III - IV	114(55.0)	36(31.6)	78(68.4)	3.016			1.840		
Ascites					0.768-5.854	0.147		0.317-2.880	0.936
No	83(39.7)	65(78.3)	18(21.7)	1.000			1.000		
Yes	126(60.3)	35(27.8)	91(72.2)	2.120			0.956		
Residual tumor d/cm					1.325-5.551	0.006		1.216-5.184	0.013
≤ 1	157(75.1)	73(46.5)	84(53.5)	1.000			1.000		
> 1	52(24.9)	27(51.9)	25(48.1)	2.712			2.510		
FBP1 expression status					0.286-0.781	0.003		0.279-0.787	0.004
Negative	111(53.1)	55(49.5)	56(50.5)	1.000			1.000		
Positive	98(46.9)	45(54.9)	53(45.1)	0.473			0.468		
Chemotherapeutic response					3.977-11.348	0.000		3.494-0.589	0.000
Platinum sensitive	138(66.0)	84(60.9)	16(39.1)	1.000			1.000		
Platinum resistant	71(34.0)	54(22.5)	55(77.5)	6.718			6.082		

2.2 卵巢癌组织中FBP1表达水平与耐药的关系

采用 χ^2 检验或Fisher确切检验评估FBP1蛋白表达强度与化疗敏感性的关系。结果发现，低表达FBP1的患者比高表达FBP1的患者对铂类更为耐药，差异有统计学意义(表2, $P < 0.05$)。以上结果表明，FBP1的表达可能与卵巢癌对化疗的敏感性有关，可作为化疗敏感性判断的重要指标。



(DAB, $\times 200$)

图1 FBP1在卵巢癌组织中的表达

Fig. 1 FBP1 expressions in ovarian cancer tissues

A: FBP1 positive expression; B: FBP1 negative expression

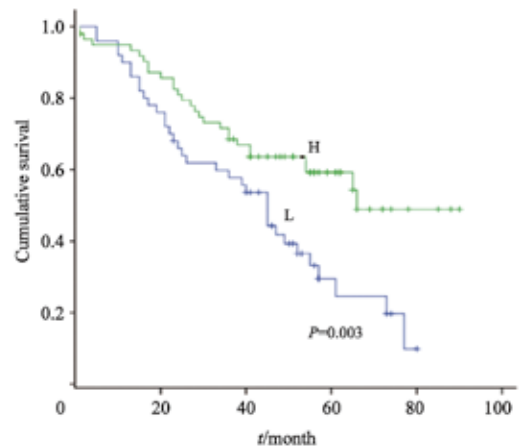


图2 通过Kaplan-Meier曲线和对数秩检验对FBP1高表达(免疫组织化学评分 ≥ 2)以及低表达患者生存情况进行分析

Fig. 2 Survival curves of patients were analyzed by Kaplan-Meier plots and log-rank tests

Patients were categorized by high and low expression of FBP1 based on immunohistochemistry staining scores; H: High expression; L: Low expression; Only immunohistochemistry scores ≥ 2 was considered high expression

表2 FBP1表达与卵巢癌患者临床病理因素的关系

Tab. 2 The relationship between clinicopathological characteristics and FBP1 expression in ovarian cancer patients

Prognostic factors	FBP1 negative	FBP1 positive	<i>P</i> value*	<i>n</i> (%)
Age(median)/year			0.069	
≤ 55	79(71.2)	58(59.2)		
> 55	32(28.8)	40(40.8)		
FIGO stage			0.036	
Early (I + II)	58(52.3)	37(37.8)		
Late (III + IV)	53(47.7)	61(62.2)		
Ascites			0.164	
No	49(44.1)	34(34.7)		
Yes	62(55.9)	64(65.3)		
Residual tumor <i>d</i> /cm			0.007	
≤ 1	75(67.6)	82(83.7)		
> 1	36(32.4)	16(16.3)		
Chemotherapeutic response			0.007	
Platinum sensitive	64(57.7)	74(75.5)		
Platinum resistant	47(42.3)	24(24.5)		

*: Two-sided χ^2 test for distributions between negative and positive expression of FBP1

3 讨论

FBP1是糖代谢过程中的关键酶。近年来，其在肿瘤中的作用越来越受到人们的重视。在多种肿瘤包括结肠癌、乳腺癌、肝癌、肺癌及胃癌中存在FBP1基因的表达缺失，且与肿瘤

患者不良的预后有关。造成这种现象的原因是FBP1与肿瘤细胞的Warburg效应有关。Warburg效应是恶性肿瘤的一个常见的代谢特征。然而这种恶性肿瘤细胞对糖酵解的依赖性也成为治疗癌症的机制之一。FBP1可以抑制细胞的糖酵解，从而抑制肿瘤细胞的生长。本研究在卵

巢癌组织中探讨了FBP1表达与化疗敏感性的关系,发现FBP1的表达可能与卵巢癌对化疗的敏感性有关,可作为化疗敏感性判断的重要分子。

铂类药物耐药一直是卵巢癌患者治疗中存在的问题。目前,寻求一个可以提高铂类药物的细胞毒作用的潜在靶点是迫切的。此前,顺铂引起肿瘤细胞死亡的主要机制为细胞内无法修复的断裂的DNA双链(double-strand break, DSBs)持续积累。然而,最近的研究表明顺铂可发挥抑制肿瘤细胞糖酵解作用。在此基础上,联合靶向糖酵解途径中的分子可以使化疗更为有效^[20]。在卵巢癌、肺癌,越来越多的证据表明抑制糖酵解可以增强顺铂引起的肿瘤细胞的凋亡^[21-22]。本研究发现,FBP1表达相对高的组织和细胞系对铂类药物的敏感性更高。因此,在传统的化疗基础上增强FBP1的表达,可增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效应,从而提高卵巢癌的治疗疗效。后续的实验可以将卵巢癌细胞株FBP1基因沉默或过表达后,观察卵巢癌细胞对顺铂敏感性的变化,以探讨FBP1在卵巢癌化疗增敏中作为分子靶点的价值及其机制,为建立新的分子靶向治疗联合化疗模式提供重要依据。

[参 考 文 献]

- [1] CANNISTRA S A. Cancer of the ovary [J] . N Engl J Med, 2004, 351(24): 2519-2529.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J] . CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] 杨念念, 严亚琼, 龚洁, 等. 中国2003—2007年卵巢癌发病与死亡分析 [J] . 中国肿瘤, 2012, 21(6): 401-405.
- [4] MCGUIRE W P, HOSKINS W J, BRADY M F, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer [J] . N Engl J Med, 1996, 334(1): 1-6.
- [5] PICCART M J, BERTELSEN K, JAMES K, et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results [J] . J Natl Cancer Inst, 2000, 92(9): 699-708.
- [6] KUMAR S, KUMAR A, SHAH P P, et al. MicroRNA signature of cisplatin resistant vs cisplatin sensitive ovarian cancer cell lines [J] . J Ovarian Res, 2011, 4(1): 17.
- [7] ZAMBLE D B, LIPPARD S J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy [J] . Trends Biochem Sci, 1995, 20(10): 435-439.
- [8] WARBURG O. On the origin of cancer cells [J] . Science, 1956, 123(3191): 309-314.
- [9] VANDER H M, CANTLEY L C, THOMPSON C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J] . Science, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [10] DEBERARDINIS R J. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea [J] . Genet Med, 2008, 10(11): 767-777.
- [11] JURICA M S, MESECAR A, HEATH P J, et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1, 6-bisphosphate [J] . Structure, 1998, 6(2): 195-210.
- [12] MARIN-HERNANDEZ A, RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, VITAL-GONZALEZ P A, et al. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase [J] . 2006.
- [13] SHENG H, YING L, ZHENG L, et al. Down expression of FBP1 is a negative prognostic factor for non-small cell lung cancer [J] . Cancer Invest, 2015, 33(5): 197-204.
- [14] ZHANG J, WANG J, XING H, et al. Down-regulation of FBP1 by ZEB1-mediated repression confers to growth and invasion in lung cancer cells [J] . Mol Cell Biochem, 2016, 411(1-2): 331-340.
- [15] BIGL M, JANDRIG B, HORN L C, et al. Aberrant methylation of human L- and M-fructose 1,6-bisphosphatase genes in cancer [J] . Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(2): 720-724.
- [16] DONG C, YUAN T, WU Y, et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer [J] . Cancer Cell, 2013, 23(3): 316-331.
- [17] CHEN M, ZHANG J, LI N, et al. Promoter hypermethylation mediated downregulation of FBP1 in human hepatocellular carcinoma and colon cancer [J] . PLoS One, 2011, 6(10): e25564.
- [18] LIU X, WANG X, ZHANG J, et al. Warburg effect revisited: an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis [J] . Oncogene, 2010, 29(3): 442-450.
- [19] LI B, QIU B, LEE D S, et al. Fructose-1, 6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression [J] . Nature, 2014, 513(7517): 251-255.
- [20] AI Z, LU Y, QIU S, et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism [J] . Cancer Lett, 2016, 373(1): 36-44.
- [21] LOAR P, WAHL H, KSHIRSAGAR M, et al. Inhibition of glycolysis enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells [J] . Am J Obstet Gynecol, 2010, 202(4): 371.
- [22] GUO W, ZHANG Y, CHEN T, et al. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model [J] . J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(1): 65-72.