

- [14] EURICH D T, MAJUMDAR S R, TSUYUKI R T, et al.Reduced mortality associated with the use of ACE inhibitors in patients with type 2 diabetes[J].Diabetes Care,2004,27(6): 1330-1334.
- [15] IMAI E,CHAN J C,ITO S,et al.Effects of olmesartan on renal and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes with overt nephropathy:a multicentre,randomised,placebo-controlled study[J].Diabetologia,2011,54(12): 2978-2986.
- [16] JAVADZADEH A, GHORBANIHAGHJO A, ADL FH, et al.Calcium dobesilate reduces endothelin-1 and high-sensitivity creactive protein serum levels in patients with diabetic retinopathy [J]. Mol Vis, 2013, 19(7):62-68.
- [17] ALDA O, VALERO MS, PEREBROOM D, et al. *In vitro* effect of calcium dobesilate on oxidative/inflammatory stressin human varicose veins[J]. Phlebology, 2011,26(8):332-337.
- [18] 吕智美,甘 华.足细胞损伤与糖尿病[J]中华老年医学杂志,2005,24(1):67-71.
- [19] ZHOU Y,YUAN J,QI C,et al.Calcium dobesilate may alleviate diabetes-induced endothelial dysfunction and inflammation[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 16(6):8635-8642.
- [20] GAO M J, YU G, DONG J.Comparison of therapeutic effects of calcium dobesilate and perlnodopril in treatment of early diabetic nephropathy [J]. Diabetes Research & Clinical Practice,2014,106(3):S30-S30.

(本文编辑:禩霏霏)

广西医科大学学报 2018 Nov;35(11)

卵巢癌患者新型肿瘤标志物 LyGDI 水平及其与肿瘤恶性分子基因表达量的关系*

刘志文,冯慧芳,夏丽伟

(南方医科大学附属小榄医院妇产科,中山 528415)

摘要 目的:检测卵巢癌患者新型肿瘤标志物 LyGDI 水平,分析其与肿瘤恶性分子基因表达量的关系。**方法:**选取 2015 年 1 月至 2017 年 5 月在南方医科大学附属小榄医院接受手术治疗的卵巢病变患者 175 例,根据病理结果将其分为卵巢癌组 91 例,卵巢良性病变组 84 例。对比两组术前 LyGDI 水平以及相应病灶组织中增殖[Yes 相关蛋白 1(YAP1)、T-box 转录因子 2(TBX2)、含 KH RNA 结合结构域信号转导相关分子 3(KHDRBS3)、氧化还原酶的 WW 结构域(WWOX)]、侵袭[胶原三股螺旋重复蛋白 1(CTHRC1)、盘状结构域受体 1(DDR1)、E74-like factor 5(ELF5)、转移相关基因 3(MTA3)、整合素 A2(ITGA2)]、自噬[Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3-II)]基因表达量的差异,采用 Pearson 相关分析法分析卵巢癌患者血清 LyGDI 水平与肿瘤恶性分子基因表达量的关系。**结果:**卵巢癌组患者血清 LyGDI 水平及 YAP1、TBX2、KHDRBS3、CTHRC1、DDR1、ITGA2 mRNA 表达量高于卵巢良性病变组,而 WWOX、ELF5、MTA3、Beclin1 和 LC3-II mRNA 表达量低于卵巢良性病变组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。卵巢癌患者血清 LyGDI 水平与以上增殖、侵袭、自噬基因表达量均存在明显相关关系(均 $P < 0.05$)。**结论:**卵巢癌患者血清中 LyGDI 水平异常增高,且与癌细胞增殖、侵袭及自噬活性相关,或可作为早期评估卵巢癌病情的简便指标。

关键词 卵巢癌;LyGDI;增殖基因;侵袭基因;自噬基因**中图分类号:**R730.43;R737.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1005-930X(2018)11-1489-05

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.11.005

The serum level of LyGDI in ovarian cancer patients and its correlation with the expression of malignant tumor molecules

Liu Zhiwen, Feng Huifang, Xia Liwei, (Department of Obstetrics and Gynecology, Siu Lam Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528415, China)

* 基金项目:广东省中山市卫生局项目(No.2016A020241)

收稿日期:2018-02-01

Abstract Objective: To detect the serum level of LyGDI in ovarian cancer patients and to analyze the

correlation between LyGDI and the expression of malignant tumor molecules. **Methods:** A total of 175 patients with ovarian disease in our hospital from January 2015 to May 2017 were selected, and divided into ovarian cancer group ($n=91$) and ovarian benign lesion group ($n=84$) according to pathological findings. The preoperative LyGDI content in serum and the expressions of YAP1, TBX2, KHDRBS3, WWOX, CTHRC1, DDR1, ITGA2, ELF5, MTA3, Beclin1 and LC3- II were determined and compared. The association between LyGDI level and the mRNA expressions of malignant tumor molecules was analyzed. **Results:** The serum LyGDI level and YAP1, TBX2, KHDRBS3, CTHRC1, DDR1 and ITGA2 mRNA levels were significantly higher in the ovarian cancer group than those in the ovarian benign lesion group, while the mRNA expression levels of WWOX, ELF5, MTA3, Beclin1 and LC3- II were lower ($P<0.05$). The Pearson correlation analysis showed that serum content of LyGDI in ovarian cancer patients was related to the proliferation, invasion and autophagy related genes expressions. **Conclusion:** Patients with ovarian cancer had markedly higher level of LyGDI. The serum LyGDI level was correlated with cancer cells' proliferation, invasion and autophagy activities, and it might be a circulating tumor marker for ovarian cancer.

Keywords ovarian cancer; LyGDI; proliferating gene; invasion gene; autophagy gene

卵巢癌是女性多见的生殖系统疾病,该病恶性程度较高,若不及时确诊可能贻误最佳治疗时机,导致治疗预后不佳^[1-2]。组织病理检查是确诊卵巢癌并明确其恶性程度的金标准,但组织获取困难、获得结果耗时较长,寻找简便、特异性高的血清指标是当下临床研究的热点。LyGDI 是一种新型肿瘤标志物,参与调控 Rho 蛋白的小 GTP 酶循环,被认为参与恶性肿瘤的发生发展^[3-4]。本研究通过检测卵巢癌、卵巢良性病变患者血清中 LyGDI 水平,并进一步探讨 LyGDI 水平与肿瘤恶性分子基因表达量的相关性,以明确该肿瘤标志物在卵巢癌辅助诊断、病情评估中的作用,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2017 年 5 月在南方医科大学附属小榄医院接受手术治疗的卵巢病变患者 175 例作为研究对象,根据病理结果将其分为卵巢癌组(91 例)和卵巢良性病变组(84 例)。卵巢癌组年龄 41~76 岁,平均(63.28±8.17)岁;卵巢良性病变组年龄 38~75 岁,平均(62.76±8.32)岁。两组年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究已取得医院伦理委员会批准。

1.2 病例纳入及排除标准 纳入标准:(1)病灶组织性质经病理检查确诊;(2)既往无卵巢病变及治疗史;(3)患者及其家属已签署知情同意书。排除标准:(1)合并肺炎等全身感染性疾病;(2)有生育要

求;(3)妊娠或者哺乳期女性;(4)严重凝血功能异常;(5)恶液质、无法耐受手术创伤。

1.4 血清 LyGDI 水平检测 术前(均未经任何保守治疗)留取两组患者的空腹外周血标本,离心后取上层血清,采用上海西唐生物公司的酶联免疫吸附试剂盒测定血清中 LyGDI 水平。

1.5 肿瘤恶性分子基因表达量检测 取术中所得病灶组织标本,TRIZOL 法提取 RNA,逆转录成 cDNA,在 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 反应。检测基因包括增殖基因[Yes 相关蛋白 1(YAP1)、T-box 转录因子 2(TBX2)、含 KH RNA 结合结构域信号转导相关分子 3(KHDRBS3)、氧化还原酶的 WW 结构域(WWOX)]、侵袭基因[胶原三股螺旋重复蛋白 1(CTHRC1)、盘状结构域受体 1(DDR1)、E74-like factor 5(ELF5)、转移相关基因 3(MTA3)、整合素 A2(ITGA2)]、自噬基因[Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3-II)]。获取相应 PCR 扩增曲线,同时计算目的基因 mRNA 表达量。设置卵巢良性病变组上述基因的平均值为标准值 100,计算卵巢癌组中对应基因的相应表达量。引物序列见表 1。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件对数据进行分析处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
YAP1	GCGAGCGACAGAGCGAGCG	AGCAGTAGTCGTATAGCTAG
TBX2	GCGATTTCGATCGATCGATGC	CGTAGGCGCTAATGCTAGCTA
KHDRBS3	GCGAGCATCGAGTTATCGT	CGATATCGGTACGTAGCTAG
WVOX	ATAGCTAGCTAGCAGCTAG	CGAGCTACGTACGATCGTAGC
CTHRC1	GCTAGCGATCGGCGATCGA	CGGACATGCATGCATCGTAC
DDR1	GCTAGCTACGGATCGATCT	CGATGCGTCAGTTCGTACGCC
ELF5	GCGATCGAGCGGCGCGTAG	CGCTGACTACGGATCGAGTGG
MTA3	GCTATAGCACGATCGAGCTG	CGATGCAGAGTCAGCGTAGCT
ITGA2	GGCAGCTACGGCAAGCGTAC	GCTACGTACGATCGAAGCTAC
Beclin1	GGTACGATCCCGTAGCTACCC	CCATGCTAGCGGATCGTACGC
LC3-II	CGACTGCATCGATGGCGATCG	CCGTAGTGCATCGTACGCCAC

2 结果

2.1 两组血清 LyGDI 水平比较 卵巢癌组患者血清中 LyGDI 水平为 (3.07 ± 0.38) mg/L, 明显高于卵巢良性病变组的 (1.13 ± 0.15) mg/L, 差异有统计学意义 ($t = 45.05, P = 0.00$)。

2.2 两组增殖基因表达量比较 卵巢癌组病灶组织中增殖基因 YAP1、TBX2、KHDRBS3 mRNA 的表达量高于卵巢良性病变组, WVOX mRNA 的表达量低于卵巢良性病变组, 差异均有统计学意义(均

$P < 0.05$), 见表 2。

2.3 两组侵袭基因表达量比较 卵巢癌组病灶组织中侵袭基因 CTHRC1、DDR1、ITGA2 mRNA 的表达量高于卵巢良性病变组, ELF5、MTA3 mRNA 的表达量低于卵巢良性病变组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见表 3。

2.4 两组自噬基因表达量比较 卵巢癌组病灶组织中自噬基因 Beclin1、LC3-II mRNA 的表达量均低于卵巢良性病变组(均 $P < 0.05$), 见表 4。

表 2 不同卵巢组织中增殖基因表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	YAP1	TBX2	KHDRBS3	WVOX
卵巢良性病变组	84	100.00 ± 15.82	100.00 ± 12.93	100.00 ± 13.77	100.00 ± 15.12
卵巢癌组	91	130.28 ± 14.76	127.05 ± 14.61	151.38 ± 17.05	71.49 ± 8.65
t		13.099	12.927	21.820	15.457
P		0.000	0.000	0.000	0.000

表 3 不同卵巢组织中侵袭基因表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CTHRC1	DDR1	ELF5	MTA3	ITGA2
卵巢良性病变组	84	100.00 ± 12.72	100.00 ± 11.93	100.00 ± 10.93	100.00 ± 13.79	100.00 ± 11.03
卵巢癌组	91	131.54 ± 14.58	128.61 ± 14.39	83.71 ± 9.65	65.39 ± 7.12	128.54 ± 14.71
t		15.194	14.253	11.769	21.092	14.427
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 不同卵巢组织中自噬基因表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Beclin1	LC3-II
卵巢良性病变组	84	100.00 ± 14.27	100.00 ± 11.03
卵巢癌组	91	77.48 ± 8.12	81.65 ± 9.07
t		12.955	12.057
P		0.000	0.000

2.5 相关性分析 Pearson 相关性分析显示: 卵巢癌组血清 LyGDI 水平与增殖基因 YAP1、TBX2、

KHDRBS3 mRNA 的表达量呈正相关关系 ($r = 0.738, 0.662, 0.691$, 均 $P < 0.05$), 与 WVOX mRNA 的表达量呈负相关关系 ($r = -0.596, P < 0.05$); 与侵袭基因 CTHRC1、DDR1、ITGA2 mRNA 的表达量呈正相关关系 ($r = 0.639, 0.712, 0.648$, 均 $P < 0.05$); 与 ELF5、MTA3 mRNA 的表达量呈负相关关系 ($r = -0.629, -0.711$, 均 $P < 0.05$); 与自噬基因 Beclin1、LC3-II mRNA 的表达

量呈负相关关系 ($r = -0.592$ 、 -0.663 , 均 $P < 0.05$)。

3 讨 论

卵巢癌早期临床表现不显著,导致疾病早期确诊困难、治疗预后不佳。LyGDI 是调控 Rho 蛋白表达的重要因子, LyGDI 表达异常被认为是导致恶性肿瘤发生的重要因素^[5]。目前关于 LyGDI 在卵巢癌中的意义研究开展不多,本研究结果显示,与卵巢良性病变组患者比较,卵巢癌患者血清中 LyGDI 的水平异常增高,提示高水平的 LyGDI 可能是卵巢癌发生的重要标志。

肿瘤细胞恶性增殖是卵巢癌病情进展的内在机制,也是肿瘤负荷增加的核心原因,检测与卵巢癌细胞无限增殖密切相关的基因表达量可反映疾病恶性程度。YAP1 是 Hippo-YAP 信号通路的下游分子,可调节细胞增殖及凋亡间的平衡。Hippo-YAP 信号通路属于抑癌通路, YAP1 发挥负调控作用,可促进癌细胞增殖^[6-7]。TBX2 参与细胞周期调控并加速细胞增殖,细胞研究发现特异性下调 TBX2 表达可抑制卵巢癌细胞的增殖活性^[8-9]。KHDRBS3 被发现在乳腺癌、前列腺癌中呈异常高表达, KHDRBS3 低表达可抑制细胞增殖^[10]。WWOX 属于抑癌基因,在人体脑组织、胃肠道组织、外周神经中普遍表达,而在胃癌、食管癌等多种恶性肿瘤组织中则表达量下调^[11-13]。本研究发现,与卵巢良性病变组比较,卵巢癌组中 YAP1、TBX2、KHDRBS3 mRNA 的表达量较高, WWOX mRNA 的表达量较低;进一步相关性分析显示,卵巢癌患者血清中 LyGDI 的水平与 YAP1、TBX2、KHDRBS3 mRNA 的表达量呈正相关关系,与 WWOX mRNA 的表达量呈负相关关系(均 $P < 0.05$),表明 LyGDI 水平可客观反映卵巢癌细胞的增殖活性。

肿瘤细胞的侵袭活性直接决定肿瘤恶性程度与患者治疗的预后,卵巢癌组织中存在多种侵袭相关基因的异常表达。CTHRC1 可抑制 I 型胶原沉积进而促进癌细胞侵袭转移,已经在较多恶性肿瘤组织中发现其高表达^[14-15]。DDR1 属于受体酪氨酸激酶,可被蛋白酶裂解并诱导卵巢癌细胞表达继而增强其侵袭转移活性^[16]。ELF5 属于 Ets 转录因子家族,在癌症发生时其易发生杂合性丢失,是一个潜在的肿瘤抑制因子^[17-18]。MTA3 可改变染色体结构并

促进黏连蛋白结合,其异常低表达于宫颈癌、乳腺癌等生殖系统肿瘤中^[19]。ITGA2 属于整合素家族,可促进肿瘤细胞的上皮-间质转化,可促进恶性肿瘤细胞侵袭转移^[20-21]。本研究中,与卵巢良性病变组比较,卵巢癌组病灶组织中 CTHRC1、DDR1、ITGA2 mRNA 的表达量较高, ELF5、MTA3 mRNA 的表达量较低。进一步经相关性分析发现,卵巢癌患者血清中 LyGDI 的水平与 CTHRC1、DDR1、ITGA2 mRNA 的表达量呈正相关关系,与 ELF5、MTA3 mRNA 的表达量呈负相关关系,表明 LyGDI 水平同样可以客观反映卵巢癌细胞的侵袭活性。

自噬又称为 II 型程序性死亡,通过调节逆转录 RNA 维持基因稳定性,自噬过程受抑制可能增加恶性肿瘤发生的概率。Beclin1 是最典型的自噬基因,许多文献报道 Beclin1 表达量改变参与卵巢癌发生发展^[22-23]。在基因敲除 Beclin1 的大鼠的研究发现, Beclin1 表达缺失可引起自噬降低并加速细胞增殖。LC3-II 是特异性表达于自噬体膜上的分子标志物,其表达量与自噬活性呈正相关关系,已经有研究在卵巢癌组织中发现 LC3-II 的异常低表达^[24-25]。本研究结果显示,卵巢癌组病灶组织中 Beclin1、LC3-II mRNA 的表达量均低于卵巢良性病变组。进一步经相关性分析发现,卵巢癌患者血清中 LyGDI 的水平与 Beclin1、LC3-II mRNA 的表达量呈负相关关系,表明 LyGDI 水平可客观反映卵巢癌细胞的自噬活性。

综上所述,卵巢癌患者血清 LyGDI 水平异常增高,其水平与癌细胞的增殖、侵袭及自噬活性相关,或可作为早期评估卵巢癌病情的简便指标。

参考文献:

- [1] SHAHZAD M M K, FELDER M, LUDWIG K, et al. Trans10, cis12 conjugated linoleic acid inhibits proliferation and migration of ovarian cancer cells by inducing ER stress, autophagy, and modulation of Src[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0189524.
- [2] GUO Q, LU L, LIAO Y, et al. Influence of c-Src on hypoxic resistance to paclitaxel in human ovarian cancer cells and reversal of FV-429[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 8(1): e3178.
- [3] DUAN W, XU Y, DONG Y, et al. Ectopic expression of miR-34a enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells, partly by suppressing the LyGDI signaling pathway[J]. *J Radiat Res*, 2013, 54(4): 611-619.

- [4] ZHEN H, YANG S, WU H, et al. LyGDI is a promising biomarker for ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(3): 316-322.
- [5] MEHTA P, WAVREILLE A S, JUSTINIANO S E, et al. LyGDI, a novel SHIP-interacting protein, is a negative regulator of Fc γ R-mediated phagocytosis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21175.
- [6] 毛静月, 刘蕊, 李彩云, 等. siRNA 靶向沉默 YAP1 对卵巢癌细胞 skov3 增殖凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(4): 798-802.
- [7] YU S J, YANG L, HONG Q, et al. MicroRNA-200a confers chemoresistance by antagonizing TP53INP1 and YAP1 in human breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 74.
- [8] 张雁, 袁树楷, 李晓萌, 等. TBX2 基因沉默抑制卵巢癌细胞增殖同时促进细胞衰老发生 [J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2017, 50(3): 60-63.
- [9] LV Y, SI M, CHEN N, et al. TBX2 over-expression promotes nasopharyngeal cancer cell proliferation and invasion [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(32): 52699-52707.
- [10] LEI K F, LIU B Y, WANG Y F, et al. SerpinB5 interacts with KHDRBS3 and FBXO32 in gastric cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(5): 1115-1120.
- [11] JAHID S, SUN J, GELINCIK O, et al. Inhibition of colorectal cancer genomic copy number alterations and chromosomal fragile site tumor suppressor FHIT and WWOX deletions by DNA mismatch repair [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42): 71574-71586.
- [12] 王祎祎, 张向宁, 董浩, 等. 抑癌基因 WWOX 促进卵巢癌干细胞的凋亡及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(29): 4660-4663.
- [13] HSU L J, HONG Q, CHEN S T, et al. Hyaluronan activates Hyal-2/WWOX/Smad4 signaling and causes bubbling cell death when the signaling complex is overexpressed [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19137-19155.
- [14] WANG Y, LEE M, YU G, et al. CTHRC1 activates pro-tumorigenic signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(62): 105238-105250.
- [15] 郭碧莹, 严欢, 张殊. CTHRC1 在卵巢癌细胞侵袭转移中的作用及相关机制 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(4): 438-441.
- [16] DENG Y, ZHAO F, HUI L, et al. Suppressing miR-199a-3p by promoter methylation contributes to tumor aggressiveness and cisplatin resistance of ovarian cancer through promoting DDR1 expression [J]. *J Ovarian Res*, 2017, 10(1): 50.
- [17] 邱玲琳, 闫洪超. ELF5 基因对人卵巢癌细胞侵袭转移和大鼠移植瘤生长的抑制作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2017, 57(13): 45-48.
- [18] CHEAN J, CHEN C J, SHIVELY J E. ETS transcription factor ELF5 induces lumen formation in a 3D model of mammary morphogenesis and its expression is inhibited by Jak2 inhibitor TG101348 [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(1): 62-75.
- [19] 彭书敏, 王凯, 詹光熙, 等. MTA3 通过 β -hCG 调控上皮性卵巢癌侵袭转移的机制研究 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2017, 38(4): 1-4.
- [20] NONES K, WADDELL N, SONG S, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(5): 1110-1118.
- [21] FERRARO A, BONI T, PINTZAS A. EZH2 regulates cofilin activity and colon cancer cell migration by targeting ITGA2 gene [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115276.
- [22] 杨雪芬. 自噬基因 Beclin1 在卵巢癌中的研究进展 [J]. *海南医学*, 2015, 26(13): 1941-1945.
- [23] CHEN J F, WU P, XIA R, et al. STAT3-induced lncRNA HAGLROS overexpression contributes to the malignant progression of gastric cancer cells via mTOR signal-mediated inhibition of autophagy [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 6.
- [24] PANNEERDOSS S, VISWANADHAPALLI S, ABDELFATTAH N, et al. Cross-talk between miR-471-5p and autophagy component proteins regulates LC3-associated phagocytosis (LAP) of apoptotic germ cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 598.
- [25] HORNG C T, WU Y J, CHEN P N, et al. Koelreuteria formosana extract induces growth inhibition and cell death in human colon carcinoma cells via G2/M arrest and LC3-II activation-dependent autophagy [J]. *Nutr Cancer*, 2017, 69(1): 44-55.

(本文编辑:王春苗)