

# 细丝蛋白 A 在肺鳞癌组织中的表达及临床意义

翟宏芳<sup>1</sup>, 赵刚<sup>2</sup>, 孙国贵<sup>1</sup>

(1. 唐山市人民医院, 河北 唐山 063000; 2. 唐山市第二医院, 河北 唐山 063000)

**摘要:** [目的] 探讨细丝蛋白 A (filamin A, FLNa) 在肺鳞癌组织中的表达及其临床意义。[方法] 采用 Western Blot 方法和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR), 分别检测 43 例肺鳞癌组织及距肺鳞癌组织边缘 5cm 以上的镜下未见癌组织浸润的正常组织中 FLNa 蛋白、mRNA 的表达情况。[结果] FLNa 蛋白在肺腺鳞组织及正常肺组织中的相对表达量分别为  $0.381 \pm 0.032$ 、 $0.673 \pm 0.072$ , 两组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。FLNa mRNA 在肺腺鳞组织及正常肺组织中的相对表达量分别为  $0.356 \pm 0.052$ 、 $0.573 \pm 0.075$ , 两组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。FLNa 蛋白、mRNA 表达与肺鳞癌患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤分化无关 ( $P > 0.05$ ); 而与淋巴结转移以及肿瘤 TNM 分期有关 ( $P < 0.05$ )。[结论] 肺鳞癌中 FLNa 蛋白和 mRNA 的表达均降低, 可能与肺鳞癌的发生、发展相关。

**关键词:** 细丝蛋白 A; 肺肿瘤; 逆转录聚合酶链反应; Western Blot

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)02-0130-04

## Expression of Filamin A in Lung Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance

ZHAI Hong-fang<sup>1</sup>, ZHAO Gang<sup>2</sup>, SUN Guo-gui<sup>1</sup>

(1. Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China;

2. The Second People's hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the expression of filamin A (FLNa) in lung squamous cell carcinoma and its significance. [Methods] The expression of FLNa protein and FLNa mRNA in 43 tissue specimens of lung adenocarcinoma and adjacent tissues 5cm outside the cancer without invasion in microscopically were detected by RT-PCR and Western Blot respectively. [Results] The relative expression of FLNa protein were  $0.381 \pm 0.032$  in lung squamous cell carcinoma,  $0.673 \pm 0.072$  in cancer adjacent tissues with significant difference ( $P < 0.05$ ). The relative expression of FLNa mRNA were  $0.356 \pm 0.052$  in lung squamous cell carcinoma and  $0.573 \pm 0.075$  in cancer adjacent tissues with significant difference ( $P < 0.05$ ). FLNa expression did not correlate to gender, age, tumor size, tumor differentiation ( $P > 0.05$ ), but correlated to lymph node metastasis and TNM staging ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] The expression of FLNa protein and mRNA are both lower in lung squamous cell carcinoma than in normal tissues. FLNa might be correlate to oncogenesis and cancer progression.

**Key words:** filamin A; lung squamous cell carcinoma; RT-PCR; Western Blot

肺癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 尽管肿瘤治疗手段不断改进, 但肺腺癌的疗效仍很差。分析肺癌的生物学特性, 探索肺腺癌治疗的新途径成为临床关注的问题。近年研究发现细丝蛋白 A (filamin A, FLNa) 基因在某些肿瘤中表现出的生物学和遗传学特征具有肿瘤抑制基因的特性, 由此推测 FLNa 在肺癌的形成和发展中具有重要作用。我们采用免疫

组织化学和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 研究 FLNa 在肺鳞癌中的表达情况, 为临床治疗和判断预后提供新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

2010 年 5 月至 2012 年 1 月于唐山市人民医院

收稿日期: 2012-10-22; 修回日期: 2012-12-24

通讯作者: 孙国贵, E-mail: guogui\_sun@hotmail.com

手术切除的 43 例新鲜肺鳞癌标本,分别于肿瘤组织及距肿瘤边缘 5cm 以上(镜下未见癌组织)的正常肺组织处取材。其中男性 24 例,女性 19 例;年龄 30~73 岁,中位年龄 52 岁,其中  $\leq 60$  岁 16 例,  $> 60$  岁 27 例;术前均未经放、化疗。肿瘤直径  $\leq 3$ cm 13 例,  $> 3$ cm 30 例;高中分化 29 例,低分化 14 例;淋巴结转移中 N<sub>0</sub> 18 例, N<sub>+</sub> 25 例;TNM 分期 I + II 期 17 例, III + IV 期 26 例。标本均为术后立即取材,一份于液氮中保存,供 Western Blot 检测;另一份于液氮中保存,供 RT-PCR 检测。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 主要试剂

FLNa 兔抗人单克隆抗体(Epitomics 公司), GAPDH 鼠抗人单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术公司),RNA Trizol 提取试剂盒(索莱宝公司),Super-script II 逆转录试剂盒(Invitrogen 公司),PCR 扩增试剂盒(Fermentas 公司)。

### 1.2.2 Western Blot

将标本从液氮中取出约 100mg,加入 1ml 冰冷蛋白裂解液,玻璃匀浆器匀浆,超声破碎机超声 10s $\times$ 4,间隔 15s,所有操作均在冰上进行。4℃, 12 000r/min 离心 20min,取上清, -20℃ 备用。BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按每孔上样量 50 $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 电泳,稳压冰浴电转至硝酸纤维素膜上,5%脱脂牛奶封闭 2h,一抗孵育 4℃ 过夜(Wip1 1:500,GAPDH 1:500),加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000)室温孵育 1h,ECL 化学发光,FUJI Mini-4000 扫描图像,应用 LabWorks 4.5 软件对 Western 条带进行定量分析。

### 1.2.3 半定量 RT-PCR

总 RNA 提取:将标本从液氮中取出,按 Trizol 试剂说明书要求,提取总 RNA。逆转录:取 2 $\mu$ g 总 RNA,按 Superscript II 逆转录试剂盒说明书要求操作合成 cDNA,20 $\mu$ l 反应体系;反应条件为:变性 65℃ 5min,逆转录 50℃ 50min。PCR 扩增 FLNa 基因上游引物为:5'-AGCCTCCACGAGACATCATC-3',下游引物为:5'-CCAGTGTGTACTCCCCCTTG-3',扩增片段长度为 310 bp;GAPDH 为内参照,上游引物为:5'-CCGACCTGCCCTACGACTA-3',下游引物为:5'-CTGGGCTGTAACATCTCCCTT-3',扩增片段长度为 226 bp。PCR 反应体系 50 $\mu$ l,包括:5 $\mu$ l 10 $\times$ PCR

buffer,1 $\mu$ l 10mmol dNTP,0.5 $\mu$ l TaqDNA 聚合酶,上下游引物各 2 $\mu$ l,1 $\mu$ l 模板 cDNA,加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 $\mu$ l。反应条件为:预变性 95℃,3min,变性 95℃,30s,退火 56℃,30s,延伸 72℃,45s,35 个循环,置于 4℃ 保存。PCR 产物的检测及半定量:产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,结果经凝胶成像系统结合 Multi Gauge V3.1 进行光密度分析。

## 1.3 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用配对 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 FLNa 蛋白在肺鳞癌组织及正常肺组织中的表达

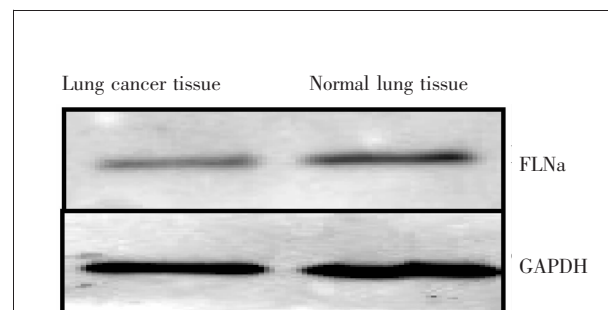
FLNa 蛋白在肺鳞癌组织的表达量为  $0.381\pm 0.032$ ,低于正常肺组织  $0.673\pm 0.072$ ,两组之间比较差异有统计学意义(*t*=3.785,*P* < 0.05)(Figure 1、Table 1)。

### 2.2 FLNa mRNA 在肺鳞癌组织及正常肺组织中的表达

FLNa mRNA 在肺鳞癌组织的表达量为  $0.356\pm 0.052$ ,低于正常肺组织  $0.573\pm 0.075$ ,两组之间比较差异具有统计学意义(*t*=3.298,*P* < 0.05)(Figure 2、Table 2)。

**Table 1 Expression of FLNa protein in lung squamous cell carcinoma and normal tissue**

| Group                        | N  | FLNa protein     | <i>t</i> | <i>P</i> |
|------------------------------|----|------------------|----------|----------|
| Normal lung tissue           | 43 | $0.673\pm 0.072$ | 3.785    | <0.05    |
| Lung squamous cell carcinoma | 43 | $0.381\pm 0.032$ |          |          |



**Figure 1 Expression of FLNa protein in lung squamous cell carcinoma and normal lung tissue**

### 2.3 FLNa 蛋白、mRNA 表达与肺鳞癌临床特征的关系

FLNa 蛋白、mRNA 表达与肺鳞癌患者性别、年龄、肿瘤大小及肿瘤分化程度无关( $P>0.05$ );而在有无淋巴结转移以及肿瘤 TNM 分期 I + II 期、III + IV

期的 FLNa 蛋白和 FLNa mRNA 表达差异均有统计学意义( $P<0.05$ )(Table 3)。

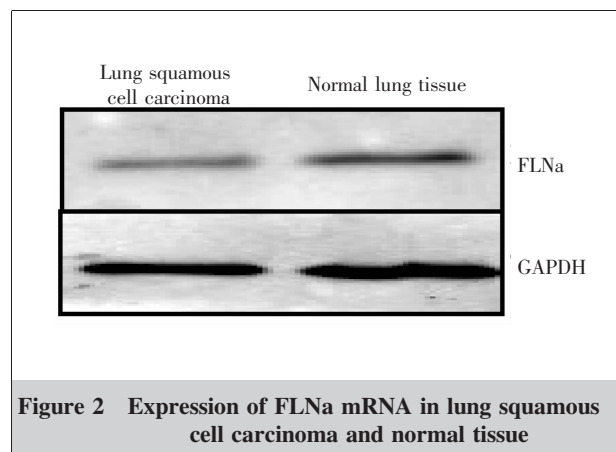
## 3 讨论

FLNa 属于肌动性结合蛋白(actin binding protein, ABP),参与细胞骨架形成,与细胞的增殖、黏附、迁徙、信号转导及肿瘤发生等密切相关<sup>[1]</sup>。FLNa 主要分布在细胞质,具有多种功能,其 N 末端的肌动蛋白结合结构域能与 ABP 结合,可交联肌动蛋白形成稳固的细胞骨架,与细胞运动有关;多重  $\beta$  片层结构为蛋白质—蛋白质相互作用提供了平台,能够与多种具有重要功能的蛋白质相互作用。因此,FLNa 分子作为重要的信号转导支架蛋白参与细胞增殖、黏附、侵袭等多种行为<sup>[2]</sup>。此外,FLNa 还与其它 ABP 一起影响多种受体在细胞内的表达,干预多条与肿瘤形成有关的信号转导通路,在肿瘤的发生发展中起着重要作用<sup>[3]</sup>。

本研究用 Western Blot 和 RT-PCR 技术对肺鳞癌组织及正常肺组织进行检测,结果显示 FLNa 蛋白、mRNA 在肺鳞癌组织中的表达水平均显著性低于正常肺组织。这一研究与 FLNa 在正常结直肠组织、食管组织中的阳性表达率高于结直肠腺癌组织、

**Table 2 Expression of FLNa mRNA in lung squamous cell carcinoma and normal tissue**

| Group                        | N  | FLNa mRNA   | t     | P     |
|------------------------------|----|-------------|-------|-------|
| Normal lung tissue           | 43 | 0.573±0.075 | 3.298 | <0.05 |
| Lung squamous cell carcinoma | 43 | 0.356±0.052 |       |       |



**Table 3 Relation ship between FLNa expression and clinic characteristics in lung squamous cell carcinoma**

| Virable               | N  | FLNa protein   |       |       | FLNa mRNA      |       |       |
|-----------------------|----|----------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
|                       |    | $\bar{x}\pm s$ | t     | P     | $\bar{x}\pm s$ | t     | P     |
| Gender                |    |                |       |       |                |       |       |
| Male                  | 24 | 0.371±0.042    | 1.328 | >0.05 | 0.358±0.026    | 0.823 | >0.05 |
| Female                | 19 | 0.386±0.051    |       |       | 0.351±0.033    |       |       |
| Age(year)             |    |                |       |       |                |       |       |
| ≤60                   | 16 | 0.393±0.036    | 1.421 | >0.05 | 0.362±0.027    | 1.135 | >0.05 |
| >60                   | 27 | 0.380±0.043    |       |       | 0.348±0.033    |       |       |
| Tumor size(cm)        |    |                |       |       |                |       |       |
| ≤3                    | 13 | 0.365±0.051    | 1.236 | >0.05 | 0.378±0.028    | 1.370 | >0.05 |
| >3                    | 30 | 0.389±0.034    |       |       | 0.356±0.025    |       |       |
| Differentiation       |    |                |       |       |                |       |       |
| Poor                  | 14 | 0.401±0.025    | 0.938 | >0.05 | 0.371±0.029    | 1.223 | >0.05 |
| Well+moderate         | 29 | 0.392 ±0.026   |       |       | 0.353±0.024    |       |       |
| Lymph node metastasis |    |                |       |       |                |       |       |
| N <sub>0</sub>        | 18 | 0.326±0.031    | 8.331 | <0.05 | 0.321±0.035    | 6.330 | <0.05 |
| N <sub>1</sub>        | 25 | 0.421±0.027    |       |       | 0.392±0.029    |       |       |
| TNM stage             |    |                |       |       |                |       |       |
| I ~ II                | 17 | 0.347±0.028    | 5.733 | <0.05 | 0.390±0.031    | 5.240 | <0.05 |
| III ~ IV              | 26 | 0.403±0.035    |       |       | 0.337±0.033    |       |       |

食管癌组织的结果一致<sup>[4,5]</sup>;但与 FLNa 在浸润性乳腺癌组织中的表达随着分化程度降低而增高的结果相悖<sup>[6]</sup>。Bedolla 等<sup>[7]</sup>使用免疫组化法检测了不同进展阶段的前列腺癌组织 FLNa 蛋白表达情况,发现与良性前列腺、前列腺上皮内瘤和原位癌的 FLNa 蛋白表达相比,转移性前列腺癌 FLNa 蛋白细胞质内 FLNa 表达明显减少,而细胞核内表达明显增多,并分析这可能与癌细胞恶性程度增加有关。对于这些不同的研究结果,还难以解释,可能是由于 FLNa 对不同部位、不同病理类型的肿瘤细胞存在着不同的作用,其机制还有待于进一步探讨。本组结果显示,FLNa 蛋白、mRNA 的表达水平与癌组织有无淋巴结转移、TNM 分期有关,但与肺鳞癌患者性别、年龄、肿瘤大小及肿瘤分化无关。国内也有学者<sup>[4]</sup>研究认为,FLNa 蛋白、mRNA 的表达水平与结直肠癌腺癌的 TNM 分期、肝转移、淋巴结转移和肠壁浸润深度具有相关性,而与患者的性别、年龄以及肿瘤的部位、大小、分化程度、肉眼形态和组织学类型无关。乳腺癌组织中 FLNa 的表达率与 TNM 分期、淋巴结转移相关,而与患者年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、病理分型、组织学类型无相关<sup>[8]</sup>。

本研究结果提示,FLNa 在肺鳞癌表达下调,可能与肺鳞癌的发生和发展相关。然而,细胞癌变是一个复杂的过程,涉及细胞分裂、信号转导途径、细胞骨架结构等多方面改变,也涉及多种细胞因子,多种作用机制共同作用。FLNa 是通过何种途径与肺鳞癌的发生和发展相联系的,还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Feng Y, Walsh CA. The many faces of flamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signaling [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11):1034-1038.
- [2] Roberson SP, Twigg SR, Sutherland-Smith AJ, et al. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(4): 487-491.
- [3] Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, et al. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/ invasive phenotype [J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(5):1143-1154.
- [4] Shi JW, Yu YM, Wang SJ, et al. Expressions of filamin A and matrix metalloproteinase 9 in colorectal adenocarcinoma and their significance [J]. *Tumor*, 2010, 30 (9):768-773. [史建伟, 于跃明, 王士杰, 等. 细丝蛋白 A 和基质金属蛋白酶 9 在结直肠癌腺癌中的表达及意义 [J]. *肿瘤*, 2010, 30 (9):768-773.]
- [5] Zhang J, Liang J, Sun GG, et al. Expression of filamin A protein and mRNA in esophageal squamous cell carcinoma and clinical significance [J]. *Clinical Focus*, 2011, 26(8): 684-686. [张钧, 梁健, 孙国贵, 等. 细丝蛋白 A 在食管鳞癌组织中的表达及临床意义 [J]. *临床荟萃*, 2011, 26(8): 684-686.]
- [6] Wu YP, Li JB, Zhao RJ, et al. Expression of filamin A in invasive breast carcinoma and its significance [J]. *Tumor*, 2009, 29(7):659-662. [吴艳萍, 李京彬, 赵瑞景, 等. 细丝蛋白 A 在浸润性乳腺癌中的表达及意义 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(7):659-662.]
- [7] Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, et al. Nuclear versus cytoplasmic localization of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3):788-796.
- [8] Liu XH, Gao H, Liu XL, et al. Expression and clinical significance of filamin A in breast cancer tissues [J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2012, 38(1): 102-105. [刘秀花, 高航, 刘晓亮, 等. 细丝蛋白 A 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38(1): 102-105.]