

# FANCD2 在子宫内膜癌中的表达及其意义

吴修伟<sup>1</sup>, 宋斌<sup>1</sup>, 常娟<sup>1</sup>, 张丽<sup>2</sup>

(十堰市太和医院, 1. 血液内科; 2 妇产科, 湖北 十堰 442000)

**【摘要】目的:** 分析范可尼贫血相关基因 D2 (FANCD2) 在子宫内膜癌 (UCEC) 的表达及其意义。**方法:** 生物信息学分析 FANCD2 在 UCEC 中的表达、预后及与免疫细胞浸润的关系; 逆转录聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测 FANCD2 在 62 例子宫内膜癌和 28 例正常子宫内膜组织中的表达, 分析其表达与临床病理特征的关系; 敲减 (KD) 技术构建低表达的 FANCD2 载体, 与空白载体一同转染 Ishikawa 细胞, 检测不同浓度顺铂处理后 Ishikawa 细胞、Ishikawa-Vector、Ishikawa-FANCD2KD 内谷胱甘肽 (GSH) 和脂质氧化 (MDA) 水平。**结果:** 生物信息学分析显示, FANCD2 在 UCEC 组织中高表达 ( $P < 0.05$ ), 且高表达的患者有较差的预后 ( $P < 0.05$ ); 免疫浸润分析显示, 常见免疫细胞 (B 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞) 的浸润与 FANCD2 负相关 ( $P < 0.05$ ); 与 Ishikawa-Vector 相比, 经不同浓度顺铂处理后的 Ishikawa-FANCD2KD 中 GSH 水平降低 ( $P < 0.05$ ); MDA 水平增高 ( $P < 0.05$ )。**结论:** FANCD2 在 UCEC 中高表达, FANCD2 下调可能通过铁死亡增加 Ishikawa 细胞对顺铂的敏感性。

**【关键词】** 子宫内膜癌; 范可尼贫血相关基因 D2; 顺铂; CD8<sup>+</sup> T 细胞

**【中图分类号】** R737.33 **【文献标志码】** A

## Expression and significance of FANCD2 in endometrial carcinoma

WU Xiu-wei<sup>1</sup>, SONG Bin<sup>1</sup>, CHANG Juan<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>

(1. Department of Hematology; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei, China)

**【Abstract】Objective:** To analyze the expression and significance of Fanconi anemia complementation group D2 (FANCD2) in uterine corpus endometrial carcinoma (UCEC). **Methods:** The expression, prognosis and relationship between FANCD2 and immune cell infiltration in UCEC were analyzed by bioinformatics. The expression of FANCD2 in 62 cases of endometrial carcinoma and 28 cases of normal endometrial tissue were detected by RT-qPCR, and the relationship between the expression of FANCD2 and clinicopathologic features was analyzed. The FANCD2 knockdown plasmid was constructed and transfected into Ishikawa cells to detect the levels of GSH and MDA by different concentrations of cisplatin. **Results:** Bioinformatics analysis showed that FANCD2 was highly expressed in UCEC tissues ( $P < 0.05$ ), and patients with high expression had poor prognosis ( $P < 0.05$ ). Immunoinfiltration analysis showed that immun cells (B cell, CD8<sup>+</sup> T cell, macrophage, neutrophil, dendritic cell) infiltration was negatively correlated with FANCD2 expression ( $P < 0.05$ ). Compared with Ishikawa-Vector, the levels of GSH in Ishikawa-FANCD2KD treated with different concentrations of cisplatin were decreased ( $P < 0.05$ ), while the levels of MDA were increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** FANCD2 is highly expressed in UCEC, and down-regulation of FANCD2 may increase the cisplatin sensitivity of Ishikawa cells through ferroptosis.

**【Key words】** Endometrial carcinoma; FANCD2; Cisplatin; CD8<sup>+</sup> T cells

子宫内膜癌 (uterine corpus endometrial carcinoma, UCEC) 是一种较为常见的妇科恶性肿瘤, 好发于 >50 岁的妇女。2020 年约有 41.7 万新发病例和 9.7 万死亡病例, 且发病率以每年 1% 的速度增长<sup>[1-2]</sup>。UCEC 主要分为 I 型雌激素依赖性和 II 型非雌激素依赖性, 其中 I 型多见, 患者较年轻, 常发生磷酸酶张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 失活或微卫星不稳定等分子事件, 预后较好; II 型多见于老年妇女, 分化差, 恶性程度

高, 常发生 TP53 基因突变和人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 基因高表达等分子事件, 预后差。范可尼贫血相关基因 D2 (Fanconi anemia complementation group D2, FANCD2) 作为一种参与 DNA 修复途径的蛋白, 在骨肉瘤、卵巢癌、肝细胞癌及食管鳞癌发生发展过程中的作用越来越受到人们的重视<sup>[3-5]</sup>。本研究旨在通过分析 FANCD2 在 UCEC 中的表达及其意义, 探讨将 FANCD2 作为顺铂潜在治疗靶点的可能机制。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2021 年 2 月至 2022 年 11 月十堰市太和医院收治的 62 例 UCEC 患者为研究对象,其中年龄 40~75 岁;内膜样癌 46 例,浆液性癌 10 例,混合型癌 6 例(黏液性癌 2 例,透明细胞癌 4 例);高分化 30 例,中分化 19 例,低分化 13 例;FIGO 分期 I 期 25 例,II 期 24 例,III 期+IV 期 13 例。另选取 28 例子宫颈癌患者正常子宫内膜组织为阴性对照。本研究经院伦理委员会审批,患者及其家属知情同意。所有样本收集前患者未经过放化疗。

### 1.2 方法

**1.2.1 生物信息学分析** 通过 HPA、TCGA 及 GTEX 数据库,下载 UCEC 患者的临床资料。分析不同数据库中 FANCD2 基因和蛋白在 UCEC 中的表达及预后,K-M 在线分析 FANCD2 的表达与 UCEC 患者总生存时间(overall survival, OS)的关系;TCGA 数据库下载并整理 TCGA-UCEC 项目 STAR 流程的 RNAseq 数据,提取 TPM 格式的临床数据,R 语言分析 UCEC 中免疫细胞浸润、FANCD2 的表达与免疫细胞浸润的相关性及免疫细胞浸润与 PTEN 突变、TP53 突变的关系,其中免疫浸润算法基于 R 包-GSVA 中提供的 ssGSEA 算法,利用 24 种免疫细胞的标记来计算对应云端数据的免疫浸润情况。

**1.2.2 细胞培养及处理** UCEC 细胞株 Ishikawa (中科院上海细胞研究所)于含 10% 胎牛血清(赛默飞,美国)和 1% 青链霉素(赛默飞,美国)的 DMEM 培养基中(赛默飞,美国)进行传代培养,培养环境为 37℃ 并含 5% 的 CO<sub>2</sub>。同时将顺铂(Sigma,德国)配制不同浓度(0.5、10 和 20 μmol/L),待细胞融合达 90% 时采用不同浓度的顺铂处理。根据说明书,使用 Lipofectamine 3000 将空白载体和低

表达载体进行转染并用顺铂处理。

**1.2.3 FANCD2 表达检测** 组织和细胞总 RNA 按照试剂盒(赛默飞,美国)操作说明进行提取,测定浓度和纯度后按照逆转录说明书(赛默飞,美国)将其逆转录为 cDNA, -80℃ 中保存待扩增。FANCD2 mRNA 扩增正向引物:5'-TCTTCCGTGTGAT GATG GCTGAAC-3'; 反向引物:5'-ATGAATCTGCTG CGAGTCTGCTG-3'。GAPDH mRNA 扩增正向引物:5'-AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG-3'; 反向引物:5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTT-3'。根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 FANCD2 相对表达量。

**1.2.4 细胞内 GSH 和 MDA 水平检测** 按  $5 \times 10^4$ /孔的细胞密度将细胞接种于 6 孔培养板中,待细胞融合达 90% 左右时,继续用不同浓度的顺铂处理 12 h。收集处理后的细胞,按照 GSH 和 MDA 水平检测试剂盒(碧云天,上海)的操作步骤进行检测。所有细胞实验均重复 6 次。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行处理与分析。计量资料符合正态分布且方差齐性,以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,组间比较行独立样本 *t* 检验;相关性采用 Pearson 相关性分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同数据库中 FANCD2 在正常组织和 UCEC 组织中的表达情况

HPA 数据库中,FANCD2 蛋白在正常组织中细胞未染色,而在肿瘤组织中细胞深染呈褐色;TCGA 数据库和 GTEX 数据库中,FANCD2 基因在肿瘤组织(*n* = 174)中的表达高于正常组织(*n* = 91) (*P* < 0.05);此外,在线分析显示,FANCD2 低表达患者有更好的 OS (*P* < 0.05)。见图 1。

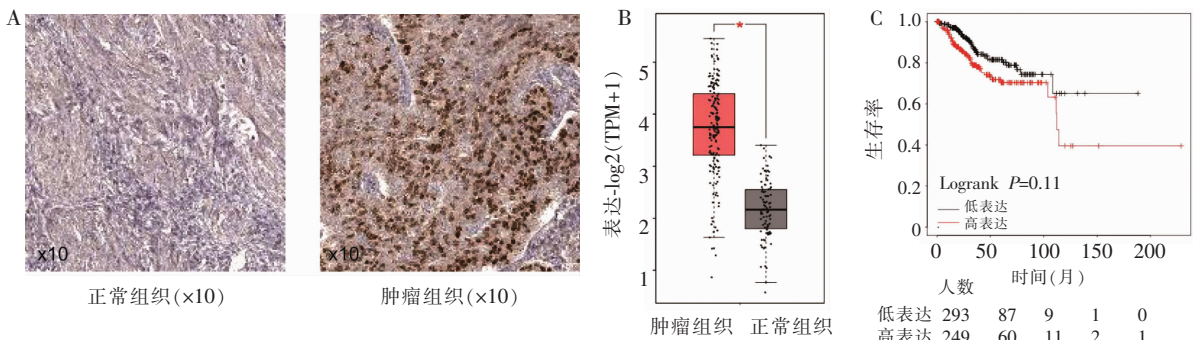


图 1 FANCD2 的表达与预后

A. HPA 数据库中 FANCD2 蛋白的表达;B. TCGA 和 GTEX 数据库中 FANCD2 基因的表达,\**P* < 0.05;C. FANCD2 表达同预后的 K-M 生存曲线。

## 2.2 UCEC 组织中 FANCD2 表达、PTEN 及 TP53 突变与免疫细胞浸润的相关性

相关性分析显示, FANCD2 表达与 B 细胞、CD8<sup>+</sup>T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及树突状细胞

浸润负相关 ( $P < 0.05$ ); PTEN 突变与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞浸润正相关 ( $P < 0.05$ ), 而 TP53 突变与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞浸润负相关 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

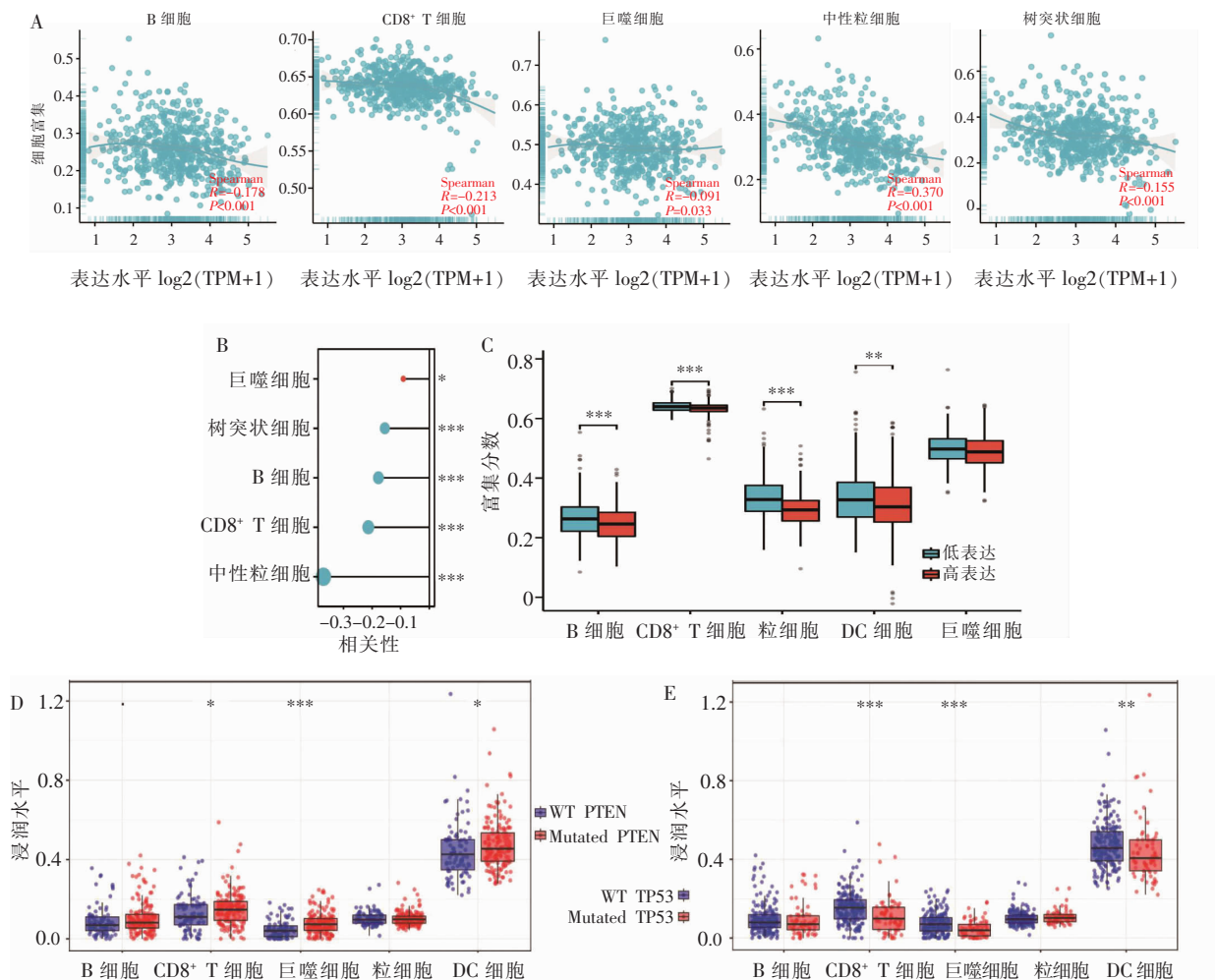


图 2 UCEC 组织中 FANCD2 表达、PTEN 及 TP53 突变与免疫细胞浸润的相关性

A. TIMER 分析; B-C. R 语言分析; D. PTEN 突变; E. TP53 突变。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

## 2.3 FANCD2 在肿瘤组织和正常组织中的表达及与临床病理特征的关系

FANCD2 在 UCEC 组织中 ( $n = 62$ ) 的表达水平高于正常组织 ( $n = 28$ ), 两组组织比较差异有统计学意义 [ $(0.56 \pm 0.16)$  vs.  $(0.34 \pm 0.11)$ ,  $P < 0.05$ ]; 在不同分化程度 UCEC 组织中的表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且低分化 > 中分化 > 高分化; 在内膜样癌中的表达水平低于浆液性和混合型, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在 UCEC II 型患者中的表达水平高于 I 型, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 在其他临床特征 (年龄、体质量指数、是否更年期、是否糖尿病、临床分期) 中的表达水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

## 2.4 Ishikawa 细胞中 FANCD2、GSH 及 MDA 水平

不同浓度的顺铂处理后, Ishikawa 细胞中

FANCD2 和 GSH 水平逐步降低 ( $P < 0.05$ ); MDA 水平逐步升高 ( $P < 0.05$ )。与 Ishikawa-Vector 细胞相比, 不同浓度顺铂处理后 Ishikawa-FANCD2KD 细胞中 GSH 水平进一步降低 ( $P < 0.05$ ); MDA 水平进一步升高 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

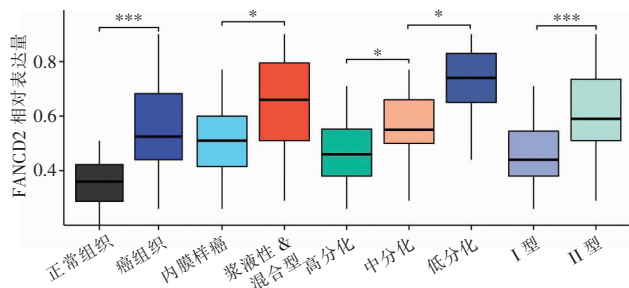


图 3 FANCD2 在肿瘤组织和正常组织中的表达及与临床病理特征的关系  
\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

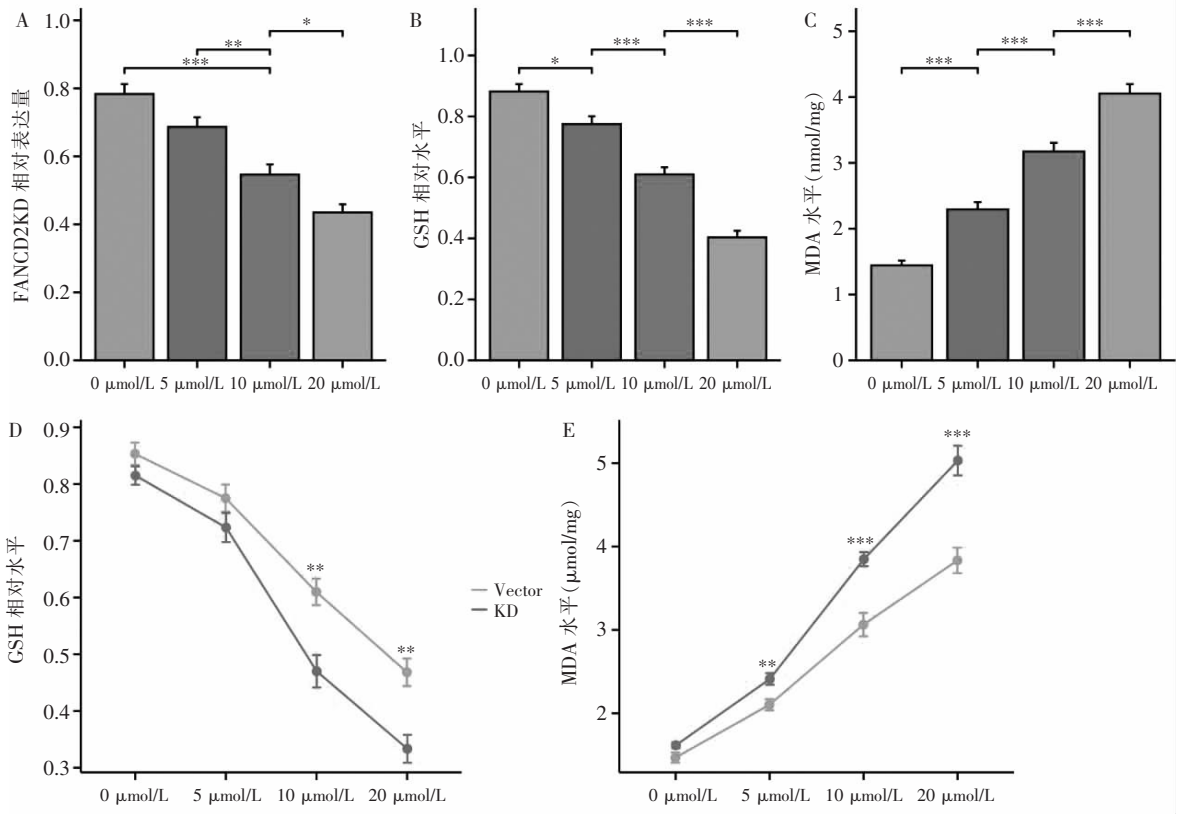


图 4 Ishikawa 细胞中 FANCD2、GSH 及 MDA 水平

A-C. 不同浓度顺铂处理后 Ishikawa 细胞中 FANCD2、GSH 和 MDA 水平;D-E. 不同浓度顺铂处理后 Ishikawa-Vector 和 Ishikawa-FANCD2KD 细胞中 GSH 和 MDA 水平。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

### 3 讨论

UCEC 作为一种常见的女性生殖系统恶性肿瘤,发病率逐年上升,且发病年龄越来越年轻化。其治疗方法包括常规手术治疗、辅助放疗、孕激素治疗等。由于影响 UCEC 患者预后的因素较多,尤其是部分 II 型的患者预后较差,所以研究 UCEC 的发病机制,寻求合适的靶点精准治疗尤为重要。

生物信息学分析结合了多个组学的内容,为癌基因或抑癌基因的鉴定、肿瘤诊断预后模型的构建及治疗靶点的选择等提供了一种新的方法。本研究生物信息学分析显示,FANCD2 在肿瘤组织中的表达水平高于正常组织 ( $P < 0.05$ ),且低表达的患者有更长的 OS ( $P < 0.05$ )。在肝细胞癌中,FANCD2 与 HBV 相关性肝癌的进展正相关<sup>[6]</sup>;在直肠癌中 FANCD2 高表达,且可用于预测患者的预后,指导个体化治疗<sup>[7]</sup>。本研究 FANCD2 表达与临床病理特征的关系分析显示,FANCD2 在浆液性和混合型 UCEC 中的表达增高 ( $P < 0.05$ );在分化低的 UCEC 组织中的表达增高 ( $P < 0.05$ );II 型 UCEC 患者的表达增高 ( $P < 0.05$ )。国外学者<sup>[8]</sup>研究 UCEC 中 DNA 修复蛋白时发现,I 型 FANCD2 阳性表达与肿瘤的分级和分期相关,而 II 型 TP53 或 FANCD2 阳

性表达的患者更容易复发,5 年无复发生存率和总生存率较其他患者低。

肿瘤细胞免疫在免疫应答及免疫逃逸中发挥重要作用,不同类型的免疫细胞在肿瘤细胞免疫的不同阶段的作用也完全不同。相关性分析显示,UCEC 肿瘤组织中 FANCD2 的表达水平与常见的免疫细胞 (B 细胞、CD8<sup>+</sup> T 细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及树突状细胞) 的浸润负相关 ( $P < 0.05$ )。子宫内膜组织中含有大量白细胞,在整个月经周期中其数量和表型各不相同,可能与子宫内膜破裂时所需的免疫保护有关<sup>[9]</sup>。因此,肿瘤免疫反应可能在 UCEC 细胞中特异性增强。无论属于 UCEC 哪种亚型,瘤内 CD8T 细胞的数量与更好的 OS 及无病生存相关<sup>[10]</sup>。免疫调节分子 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 在促进肿瘤免疫抑制中发挥重要作用<sup>[11-12]</sup>。UCEC 中的 IDO1 将 L-色氨酸转化为免疫抑制代谢产物 L-犬尿酸,促进调节性 T 细胞分化,诱导树突状细胞和髓源性抑制细胞的耐受性,且调节分子的表达与肿瘤内 CD8<sup>+</sup> T 细胞和自然杀伤细胞数量及无进展生存期降低相关。在肺腺癌中,FANCD2 表达水平与肿瘤浸润性免疫细胞及其匹配的基因特征相关,且 FANCD2 的过表达与 LUAD 患者的低生存率密切相关<sup>[13]</sup>;在肾上腺皮质癌中,

FANCD2 对预后、肿瘤微环境中免疫调节因子的表达及免疫治疗的疗效相关关系<sup>[14]</sup>;在范可尼贫血患者中,FANCD2 可能参与未成熟的 B 细胞和 T 细胞向成熟细胞的转变<sup>[15]</sup>。本研究中,PTEN 突变与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞的浸润正相关 ( $P < 0.05$ ),而 TP53 突变与 CD8<sup>+</sup>T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞的浸润负相关 ( $P < 0.05$ ),与 II 型 UCEC 患者较差的预后一致。

本研究细胞实验部分表明,Ishikawa 细胞中 FANCD2 高表达 ( $P < 0.05$ ),不同浓度顺铂处理后 FANCD2 和 GSH 水平降低 ( $P < 0.05$ ),而 MDA 水平增高 ( $P < 0.05$ ),同时在经过 FANCD2KD 后,GSH 水平进一步降低 ( $P < 0.05$ ),MDA 水平进一步升高 ( $P < 0.05$ ),表明 FANCD2 的低表达可以导致 Ishikawa 细胞中 GSH 水平降低,MDA 水平增高;FANCD2 的表达下调可能通过铁死亡增加 Ishikawa 细胞对顺铂敏感性,但其在 UCEC 中的具体机制还需要进一步研究。铁死亡是一种不同于细胞凋亡的新型细胞死亡方式,GSH 消耗和脂质过氧化是其主要特征,主要受 GSH/GPX4 途径的调控。FANCD2 作为一种参与 DNA 损伤修复的铁死亡抑制剂,可以抑制细胞中的铁积累和脂质过氧化<sup>[16]</sup>。常见的铁死亡诱导剂直接作用于 GPX4 并抑制其活性,影响 GSH 的合成,从而降低细胞的抗氧化能力并积累活性氧(ROS),最终发生氧化损伤导致铁死亡<sup>[17]</sup>。有研究<sup>[18]</sup>表明,辛伐他汀可以通过上调 MDA 水平和下调 GSH 水平,进而影响 Ishikawa 细胞内 ROS 水平,通过参与 RAS/MAPK 信号通路抑制 Ishikawa 细胞增殖、集落形成和侵袭,促进细胞氧化和铁死亡,但免疫细胞的浸润是否也参与该机制还需要进一步的分析与研究。

综上,FANCD2 高表达是导致 UCEC 患者预后较差的原因之一,可能与免疫细胞浸润、铁死亡有关,可能成为顺铂的潜在治疗靶点,但具体机制还需要进一步研究。

#### 参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209–249.

[2] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021 [J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(1): 7–33.

[3] Li X, Liu J. FANCD2 inhibits ferroptosis by regulating the JAK2/STAT3 pathway in osteosarcoma[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 179.

[4] Joshi S, Campbell S, Lim JY, et al. Subcellular localization of

FANCD2 is associated with survival in ovarian carcinoma[J]. Oncotarget, 2020, 11(8): 775–783.

[5] Yang Z, Song Y, Li Y, et al. Integrative analyses of prognosis, tumor immunity, and ceRNA network of the ferroptosis-associated gene FANCD2 in hepatocellular carcinoma[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 955225.

[6] Su H, Liu Y, Huang J. Ferroptosis-related gene SLC1A5 is a novel prognostic biomarker and correlates with immune microenvironment in HBV-related HCC[J]. Journal of Clinical Medicine, 2023, 12(5): 1715.

[7] Shi WK, Liu YX, Qiu XY, et al. Construction and validation of a novel Ferroptosis-related gene signature predictive model in rectal Cancer[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 764.

[8] Mhawech-Fauceglia P, Wang D, Kim G, et al. Expression of DNA repair proteins in endometrial cancer predicts disease outcome[J]. Gynecologic Oncology, 2014, 132(3): 593–598.

[9] Lainé A, Gonzalez-Lopez AM, Hasan U, et al. Immune environment and immunotherapy in endometrial carcinoma and cervical tumors [J]. Cancers, 2023, 15(7): 2042.

[10] Pakish JB, Zhang Q, Chen Z, et al. Immune microenvironment in microsatellite-unstable endometrial cancers: hereditary or sporadic origin matters[J]. Clinical Cancer Research; an Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2017, 23(15): 4473–4481.

[11] Prendergast GC, Malachowski WJ, Mondal A, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and its therapeutic inhibition in cancer[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2018, 336: 175–203.

[12] Salminen A. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and kynurenine pathway in the regulation of the aging process[J]. Ageing Research Reviews, 2022, 75: 101573.

[13] Zhang J, Wang D, Chen X, et al. Upregulation of ferroptosis-related fanconi Anemia group D2 is a poor prognostic factor and an indicator of tumor immune cell infiltration in lung adenocarcinoma[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 825685.

[14] Shen C, Wang Y. Ferroptosis biomarkers for predicting prognosis and immunotherapy efficacy in adrenocortical carcinoma[J]. Archives of Medical Research, 2023, 54(1): 45–55.

[15] Deniskin R, Sasa GS, Nandiwada SL, et al. Lymphopenia with clinical and laboratory features of combined immune deficiency in an 11-year-old female with FANCD2 variants and fanconi Anemia [J]. Frontiers in Pediatrics, 2018, 6: 390.

[16] Song X, Xie Y, Kang R, et al. FANCD2 protects against bone marrow injury from ferroptosis[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 480(3): 443–449.

[17] Liu P, Zhang Z, Cai Y, et al. Ferroptosis: mechanisms and role in diabetes mellitus and its complications[J]. Ageing Research Reviews, 2024, 94: 102201.

[18] Zhou D, Wu Q, Qiu H, et al. Simvastatin inhibits endometrial cancer malignant behaviors by suppressing RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway-mediated reactive oxygen species (ROS) and ferroptosis [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM, 2022, 2022: 6177477.

(收稿日期: 2024-02-24

修回日期: 2024-05-28)