

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.017

· 临床研究 ·

成纤维细胞活化蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义

刘蕊^{1,2}, 刘亮^{1,2}, 李慧², 于津浦², 任秀宝^{1,2}(1. 天津医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科, 天津 300060; 2. 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060)

[摘要] **目的:**检测人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)mRNA 的表达,探讨 FAP mRNA 与 NSCLC 临床特征及预后之间的关系。**方法:**2004 年 6 月至 2006 年 12 月选取天津医科大学附属肿瘤医院组织库中 247 例 NSCLC 患者瘤组织标本和对应的 48 例瘤旁组织标本,患者随访至 2011 年 12 月 1 日。采用实时荧光 PCR 检测 NSCLC 组织和正常肺组织中 FAP mRNA。临床病理参数与 FAP mRNA 相对表达量的相关性分析采用 Mann-Whitney U 检验,以 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,用 log-Rank 检验比较患者的生存差异,采用 Cox 回归模型评估独立的预后因素。**结果:**FAP mRNA 在 NSCLC 组织中过表达。NSCLC 组织中 FAP mRNA 表达水平与 NSCLC 患者 KPS 评分成正相关($P < 0.05$),而与肿瘤原发部位、肿块大小、淋巴结转移、临床分期、组织学类型等其他病理特征无明显关系($P > 0.05$)。高表达 FAP mRNA 的 NSCLC 患者与低表达者相比,中位总生存时间(overall survival, OS)无明显差异(43 vs 39 个月, $P > 0.05$)。进一步以组织学类型分层分析显示,肺腺癌患者 FAP mRNA 表达量与临床分期成负相关($P = 0.031$),与 KPS 评分成正相关($P = 0.041$)。高表达 FAP mRNA 的肺腺癌患者与低表达者相比,中位 OS 时间显著延长(42 vs 26 个月, $P < 0.05$),多因素分析进一步证实 FAP mRNA 表达是影响肺腺癌患者预后的独立因素。**结论:**FAP 在 NSCLC 组织中高表达, FAP mRNA 高表达与肺腺癌的临床分期呈负相关,并与肺腺癌患者的预后密切相关。

[关键词] 成纤维细胞活化蛋白(FAP)基因;非小细胞肺癌;预后

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0225-05

Expression and clinical significance of fibroblast activation protein in non-small cell lung cancer

Liu Rui^{1,2}, Liu Liang^{1,2}, Li Hui², Yu Jinpu², Ren Xiubao^{1,2}(1. Department of Biotherapy, Tumor Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of fibroblast activation protein (FAP) mRNA in non-small cell lung cancer (NSCLC) tissue, and to evaluate its relationship with clinical characteristic and prognosis of NSCLC. **Methods:** Two hundred and forty-seven tumor specimens with NSCLC and forty-eight cases of corresponding adjacent tumor tissues selected from the Department of Biotherapy, Tumor Hospital Affiliated to Tianjing Medical University from June 2004 to December 2006. All cases were followed up until December 1, 2011. The FAP mRNA was detected by real-time PCR in NSCLC and normal tissues. Mann-Whitney-Wilcoxon U-Test was used to evaluate the association between clinicopathological parameters and FAP mRNA expression. Survival curves were plotted using Kaplan-Meier method, and survival difference was compared by the Log-rank, with Cox regression model to evaluate the independent prognostic factors. **Results:** FAP was over-expressed in NSCLC tissues. FAP mRNA expression level in NSCLC tissues were positively related to the Karnofsky Performance Score (KPS) ($P < 0.05$), but not to the primary tumor location, size of tumor,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30901754);国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2012CB9333004)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30901754), and the National Key Basic Research and Development Project(973 Project) of China(No. 2012CB9333004)

[作者简介] 刘蕊(1985-),女,河北省唐山市人,硕士生,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。E-mail: 410172715@qq.com

[通信作者] 任秀宝(Ren Xiubao, corresponding author), E-mail: rwziyi@yahoo.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130424.1310.008.html>

lymph node metastasis, clinical stage and pathologic type of tumor ($P > 0.05$). The median overall survival (OS) between patients with high FAP expression and low FAP expression showed no statistical significance (43 vs 39 months, $P > 0.05$). Further histology hierarchical analysis showed that FAP mRNA expression in lung adenocarcinoma cancer patients was found to correlate inversely with clinical stages ($P = 0.031$), and correlate positively with KPS ($P = 0.041$). Lung adenocarcinoma lung cancer patients with high FAP expression had longer OS than did patients with low FAP expression (42 vs 26 months, $P < 0.05$). Multivariate analyses showed that FAP expression was an independent prognostic predictor of lung adenocarcinoma cancer patients. **Conclusion:** FAP is over-expressed in NSCLC tissues. FAP is found to correlate inversely with clinical stage of lung adenocarcinoma cancer, and the expression of FAP is closely related to prognosis of lung adenocarcinoma cancer patients.

[**Key words**] fibroblast activation protein (FAP) gene; non-small cell lung cancer; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 225-229]

近年研究^[1]表明,肿瘤微环境在肿瘤的发生、进展和转移中扮演重要的角色。肿瘤微环境最早于1979年由Lord正式提出,指肿瘤在其发生发展过程中所处的内环境,由肿瘤细胞本身、间质细胞、微血管、微淋巴管、组织液、众多细胞因子及少量浸润细胞等共同构成^[2]。成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)是肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblast, TAF)的表达产物,选择性表达于肿瘤间质活化的成纤维细胞表面,而在正常组织成纤维细胞表面很少表达或不表达,是肿瘤微环境中重要的活性产物之一^[3]。目前,FAP在恶性肿瘤中所起的作用尚存在争议。研究^[4]报道FAP能促进肿瘤的生长和增殖,但有些研究^[5]却表明,FAP高表达患者预后较好。本研究通过检测FAP mRNA在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达,分析FAP mRNA与NSCLC临床病理特征及预后的关系,为NSCLC患者的预后评估奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 患者临床资料

247例NSCLC患者肿瘤组织和其中48例患者的相对正常肺组织标本来源于2004年6月至2006年12月天津医科大学附属肿瘤医院组织库,正常肺组织距离癌组织5 cm以上。按WHO标准初次诊断为原发性肺癌的247例患者中:男性165例,女性82例;鳞癌147例,腺癌100例;中位年龄58岁(范围18~76岁)。随访从2004年6月开始,到2011年12月结束,中位随访时间为37个月(范围1~89个月)。

1.2 Real-time PCR检测FAP mRNA的表达

采用PrimeScript^{RT} reagent Kit (Takara公司)逆转录试剂盒按说明书进行操作,750 ng总RNA配成15 μ l反应体系。逆转录条件:37 $^{\circ}$ C、15 min,85 $^{\circ}$ C、

5 s。核酸定量分析仪测量cDNA浓度并调整浓度为100 ng/ μ l,4 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。FAP正义链引物为5'-TCAAAGAAGTATCCCTTGCTAATTCA-3',反义链引物为5'-GCAATGACCATCCCTTCCTTAC-3',产物119 bp; GAPDH正义链引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反义链引物为5'-GAAGATGTGATGGGATTTTC-3',产物213 bp。采用SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TaKaRa公司)试剂盒按说明书进行操作。反应体系:cDNA模版200 ng,正义链和反义链引物各8 pmol,配成20 μ l反应体系。反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s、1个循环,95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 34 s、40个循环。以48例相对正常肺组织的平均表达量为参照量,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各例患者癌组织中FAP mRNA的相对表达量($\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$)。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数,使用7500 System Software实时定量仪(ABI公司)进行自动分析。

1.3 统计学处理

总体生存时间(overall survival, OS)指从治疗开始到患者死亡或最后一次随访的时间。FAP mRNA相对表达量数据呈偏态分布,故采用中位数结合范围表示,组间比较采用Mann-Whitney U检验。以Kaplan-Meier法进行单因素分析,采用Log Rank检验比较组间生存时间。应用Cox比例风险回归模型进行预后的多因素分析,采用ROC工作曲线法计算连续性变量的最佳分组点。所有的统计均选用SPSS 16.0软件进行统计分析。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC组织高表达FAP mRNA

Real-time PCR结果显示,肺癌组织FAP mRNA

的相对表达量均大于正常肺组织的平均表达量正常肺组织 *FAP* mRNA 的平均表达量为 1, 肺癌组织 *FAP* mRNA 的相对表达量为 5.428(范围为 1.009 ~ 60.106)。图 1 为 1 例肺癌和正常肺组织 *FAP* mRNA 表达检测的典型曲线。

2.2 NSCLC 患者 *FAP* mRNA 表达与临床病理特征的关系

NSCLC 组织 *FAP* mRNA 表达水平只与术前 KPS 评分有密切关系 ($P < 0.05$), KPS 评分越高, *FAP* mRNA 表达水平越高; 与肺癌原发部位、肿块大小、淋巴结转移状态、临床分期、组织学类型等其他病理特征均无明显关系 ($P > 0.05$) (表 1)。

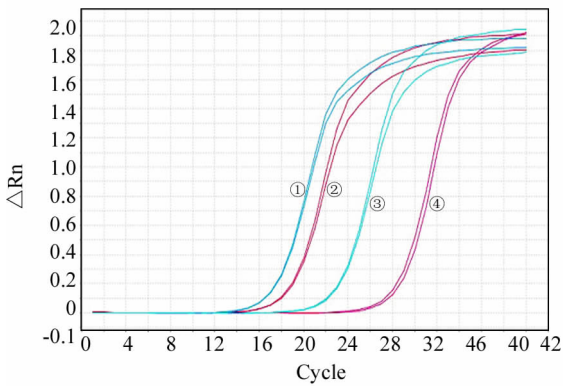


图 1 *FAP* mRNA 在肺癌及正常肺组织中的表达

Fig. 1 Expression of *FAP* mRNA in NSCLC and normal lung tissues

1: *GAPDH* in NSCLC tissue; 2: *GAPDH* in normal lung tissue; 3: *FAP* mRNA in NSCLC tissue; 4: *FAP* mRNA in normal lung tissue

2.3 分层分析 *FAP* mRNA 表达量与 NSCLC 患者临床病理特征之间的关系

根据 NSCLC 组织学类型进行分层分析表明, 肺癌组织中早期 (I ~ IIIA) 患者中位 *FAP* mRNA 相对表达量为 6.471(范围为 1.390 ~ 60.106), 明显高于晚期 (IIIB ~ IV) 患者的中位 *FAP* mRNA 相对表达量 3.709(范围为 1.918 ~ 36.891) ($P = 0.031$); KPS 评分 ≥ 80 患者中位 *FAP* mRNA 相对表达量为 6.471(范围为 1.390 ~ 60.106), 明显高于 KPS 评分 < 80 患者的中位 *FAP* 相对表达量 4.190(范围为 1.464 ~ 36.891) ($P = 0.041$)。肺鳞癌组织中 *FAP* mRNA 与各项病理特征均无明显相关性 ($P > 0.05$, 数据未列出)。

2.4 *FAP* mRNA 表达量与 NSCLC 患者预后的关系

本研究随访截至时间为 2011 年 12 月 1 日。中位 *FAP* mRNA 相对表达量为 5.428(范围为 1.009 ~

表 1 *FAP* mRNA 表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

Tab.1 Relationship of *FAP* mRNA expression with clinicopathologic characteristics of NSCLC

Parameter	N	<i>FAP</i> mRNA	P
Gender			0.154
Male	165	5.201 (1.009-60.106)	
Female	82	6.040 (1.390-36.899)	
Age(year)			0.383
<60	103	5.931 (1.106-60.106)	
≥ 60	144	5.166 (1.009-36.434)	
Pathologic type			0.475
Adenocarcinoma	100	5.765 (1.390-60.106)	
Squamous cell carcinoma	147	5.428 (1.009-37.971)	
T			0.274
T1 + T2	163	5.830 (1.107-36.899)	
T3 + T4	84	4.978 (1.009-60.106)	
N			0.535
N0	137	5.878 (1.107-60.106)	
N1 + N2	110	5.409 (1.009-37.971)	
M			0.327
M0	214	5.854 (1.009-60.106)	
M1a + M1b	33	4.190 (1.194-36.891)	
TNM stage			0.145
I - III A	204	5.890 (1.106-60.106)	
III B-IV	43	4.190 (1.009-36.891)	
Tumor location			0.069
Central	84	6.133 (1.009-60.106)	
Peripheral	163	5.159 (1.194-36.899)	
KPS			0.047
<80	92	4.707 (1.106-36.891)	
≥ 80	155	5.934 (1.009-60.106)	
Hemoglobin (HGB)			0.605
< LLN	20	4.105 (1.448-37.971)	
\geq LLN	227	5.437 (1.009-60.106)	
WBC			0.896
\leq ULN	217	5.575 (1.009-60.106)	
> ULN	30	5.311 (1.502-31.084)	
ANC			0.945
\leq ULN	218	5.502 (1.009-60.106)	
> ULN	29	5.421 (1.502-31.084)	
PLT			0.620
\leq ULN	183	5.390 (1.009-60.106)	
> ULN	64	5.866 (1.345-24.377)	
Lactic dehydrogenase (LDH)			0.716
\leq ULN	220	5.588 (1.009-60.106)	
> ULN	27	4.511 (1.506-31.084)	

60.106), 通过 ROC 曲线计算出最佳的 *FAP* mRNA 相对表达量分组点为 3.989。对 247 例 NSCLC 患者 OS 进行单因素分析后发现(图 2), *FAP* mRNA 相对表达量 >3.989 的 86 例患者与 *FAP* mRNA 相对表达量 ≤3.989 的 161 例患者相比, 中位 OS 无明显差异(43 vs 39 个月, $P > 0.05$)。

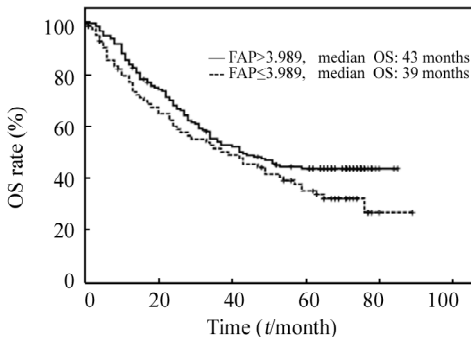


图 2 *FAP* mRNA 的表达量对 NSCLC 患者预后的影响

Fig. 2 Impact of *FAP* mRNA expression level on prognostic of NSCLC patients

2.5 分层分析 *FAP* mRNA 表达量与肺腺癌患者预后之间的关系

对 100 例肺腺癌患者 OS 进行单因素分析, 结果(图 3)显示, *FAP* mRNA 相对表达量是肺腺癌预后的重要因素。*FAP* mRNA 相对表达量 >3.989 的 66 例肺腺癌患者与 *FAP* mRNA 相对表达量 ≤3.989 的 34 例肺腺癌患者相比, 中位 OS 显著延长(42 vs 26 个月, $P = 0.018$)。多因素分析进一步证实 *FAP* mRNA 表达是影响预后的独立因素。*FAP* mRNA 相对表达量与肺鳞癌患者预后无明显相关($P > 0.05$), 数据未列出。

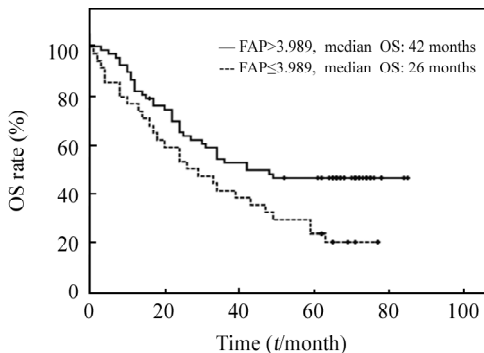


图 3 *FAP* mRNA 的表达量对肺腺癌患者预后的影响

Fig. 3 Impact of *FAP* mRNA expression level on prognostic of lung adenocarcinoma cancer patients

3 讨论

近年研究表明, 肿瘤微环境在肿瘤的发生、进展、转移中扮演着重要的角色。*FAP* 属于丝氨酸蛋白酶家族成员, 选择性表达于肿瘤组织的基质成纤维细胞中, 是肿瘤微环境的重要成员之一。正常成人组织中, *FAP* 仅仅在子宫内膜中存在。同时有报道指出, *FAP* 在某些病理过程中也有表达, 如胚胎发育过程、角膜新生血管、慢性丙型肝炎、特发性肺纤维化、风湿性关节炎、骨关节炎等疾病^[6-10]。*FAP* 表达于 90% 以上的上皮恶性肿瘤的基质成纤维细胞中, 但在良性肿瘤和癌前病变中通常不表达^[11], 因此 *FAP* 有可能成为肿瘤诊断的新型分子标志物。本研究以正常肺组织作为参照, 发现肺癌组织中 *FAP* mRNA 的相对表达量均大于 1 (范围为 1.009 ~ 60.106)。

FAP 在恶性肿瘤细胞中的作用有不同的观点。Wen 等^[4]研究发现, 经质粒转染 *FAP* 的结肠癌细胞系, 其生长与成瘤性均较对照组显著。然而, 有些研究^[12]却表明, *FAP* 有抑制肿瘤的活性, 且 *FAP* 高表达促进或抑制肿瘤与实验模型的选择相关。如在以人乳腺癌细胞系^[13]、胰腺癌细胞系^[14]、星形胶质细胞瘤^[15]为实验模型的研究中, 发现 *FAP* 能够促进肿瘤的侵袭和转移; 而在以鼠恶性黑色素细胞^[16]、HeLa 细胞系^[17]为实验模型的研究中, 却发现 *FAP* 能够显著抑制肿瘤的增殖和侵袭。

本研究采用实时荧光 PCR 相对定量法检测了 NSCLC 患者 *FAP* mRNA 的表达水平, 探讨 *FAP* 表达与 NSCLC 临床特征和预后之间的关系。结果发现, NSCLC 组织中 *FAP* mRNA 表达水平只与术前 KPS 评分有密切关系($P < 0.05$), KPS 评分越高, *FAP* mRNA 表达水平越高。而与 NSCLC 原发部位、肿块大小、淋巴结转移状态、临床分期等其他病理特征均无明显关系($P > 0.05$)。进一步按组织学类型进行分层分析, 结果显示, 肺腺癌组织中临床分期越早, *FAP* mRNA 表达越高; KPS 评分越高, *FAP* mRNA 表达越高。本研究发现肺腺癌组织中 *FAP* mRNA 的表达与肺腺癌临床分期呈负相关, 这与 Leonard 等^[18]在结肠癌患者中观察到的结果一致。

生存分析结果显示中, 高表达 *FAP* mRNA 患者与低表达者相比, 中位 OS 无明显差异($P > 0.05$)。分层进行预后分析发现, *FAP* mRNA 表达量是肺腺癌患者的重要预后影响因素, 高表达 *FAP* mRNA 的肺腺癌患者与低表达者相比, 中位 OS 显著延长($P < 0.05$), 说明 *FAP* mRNA 的高表达预示着肺腺

癌患者有较好的预后;多因素分析进一步证实 *FAP* mRNA 表达是影响肺腺癌患者预后的独立因素。而在 Ariga 等^[5]的报道中,*FAP* 表达量与乳腺癌患者生存期呈正相关,表达量越高,预后越好,与本研究结果一致。但是在肺鳞癌中 *FAP* mRNA 表达与临床病理特征及预后均无明显相关。反映了不同肺癌病理类型间 *FAP* 的作用及其机制并不完全一致,因此不同肺癌病理类型间 *FAP* 的作用差异需要多中心、大样本的深入研究。

在细胞学及动物学实验中,*FAP* 对肿瘤细胞的生长抑制作用已得到证实。Ramirez 等^[16]用恶性黑色素瘤细胞构建动物模型时发现,转染并表达 *FAP* 的恶性黑色素瘤细胞系失去致瘤性,其接触抑制和生长因子依赖性得以恢复,并发现诱导的突变型 *FAP* 在缺乏活化的蛋白酶活性的情况下对肿瘤起抑制作用。Tsujiimoto 等^[17]发现,在正常成纤维细胞和 HeLa 细胞的杂交体细胞实验中也证明 *FAP* 表达能显著抑制肿瘤的生长。

总之,*FAP* mRNA 在 NSCLC 组织中呈高表达状态,*FAP* mRNA 高表达与肺腺癌的临床分期呈负相关,并与肺腺癌患者的预后密切相关,是影响肺腺癌患者预后的独立因子之一。

[参 考 文 献]

[1] Xu Y, Xia X, Pan H. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5(2): 411-416.

[2] Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Cancer*, 2013, 4(1): 66-83.

[3] Liu R, Li H, Liu L, et al. Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(3): 123-129.

[4] Wen Y, Wang CT, Ma TT, et al. Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(11): 2325-2332.

[5] Ariga N, Sato E, Ohuchi N, et al. Stromal expression of fibroblast activation protein/seprase, a cell membrane serine proteinase and gelatinase, is associated with longer survival in patients with invasive ductal carcinoma of breast [J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(1): 67-72.

[6] Wang T, Shi W. Expression of fibroblast activation proteins in corneal stromal neovascularization [J]. *Curr Eye Res*, 2009, 34

(2): 112-117.

- [7] Wang XM, Yao TW, Nadvi NA, et al. Fibroblast activation protein and chronic liver disease [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 3168-3180.
- [8] Acharya PS, Zukas A, Chandan V, et al. Fibroblast activation protein: A serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Hum Pathol*, 2006, (3): 352-360.
- [9] Bauer S, Jendro MC, Wadle A, et al. Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): R171.
- [10] Milner JM, Kevorkian L, Young DA, et al. Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(1): R23.
- [11] Dohi O, Ohtani H, Hatori M, et al. Histogenesis-specific expression of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase-IV in human bone and soft tissue tumours [J]. *Histopathology*, 2009, 55(4): 432-440.
- [12] O'Brien P, O'Connor BF. Seprase: An overview of an important matrix serine protease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784(9): 1130-1145.
- [13] Huang Y, Simms AE, Mazur A, et al. Fibroblast activation protein-alpha promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(6): 567-579.
- [14] Lee HO, Mullins SR, Franco-Barraza J, et al. FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 245.
- [15] Mentlein R, Hattermann K, Hemion C, et al. Expression and role of the cell surface protease seprase/fibroblast activation protein-alpha (FAP-alpha) in astroglial tumors [J]. *Biol Chem*, 2011, 392(3): 199-207.
- [16] Ramirez-Montagut T, Blachere NE, Sviderskaya EV, et al. FAP alpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor [J]. *Oncogene*, 2004, 23(32): 5435-5446.
- [17] Tsujiimoto H, Nishizuka S, Redpath JL, et al. Differential gene expression in tumorigenic and nontumorigenic HeLa X normal human fibroblast hybrid cells [J]. *Mol Carcinog*, 1999, 26(4): 298-304.
- [18] Henry LR, Lee HO, Lee JS, et al. Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(6): 1736-1741.

[收稿日期] 2012 - 11 - 08

[修回日期] 2013 - 02 - 25

[本文编辑] 王莹,黄静怡