

FAP 蛋白在卵巢癌组织中的表达及临床意义

王天科 何 珏

摘 要 目的 探讨成纤维细胞激活蛋白(fibroblast activationprotein, FAP)在卵巢癌组织中的表达及与微血管密度(microvessel density, MVD)的关系。**方法** 通过体外实验研究,用免疫组化法检测 FAP 在卵巢正常组织、卵巢交界性肿瘤和卵巢癌组织中的表达并分析 FAP 与卵巢癌的分化程度、侵袭程度的相关性。**结果** FAP 在卵巢癌间质成纤维细胞中有表达,而在卵巢癌细胞和正常卵巢组织及卵巢交界性肿瘤中未见表达,且 FAP 表达与卵巢癌的分化程度和侵袭程度有关。间质中的 MVD 与卵巢癌的分化程度有关,且随着 FAP 表达水平的增加, MVD 表达阳性率则逐渐上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** FAP 的异常表达可能与卵巢癌(浆液性囊腺癌)的发生、发展有关,其可通过促进肿瘤微血管的生成,诱导癌组织产生反应性间质,加快肿瘤的演进。

关键词 卵巢癌 成纤维细胞激活蛋白 免疫组织化学

[中图分类号] R737.31 [文献标识码] A

Expression and Significance of FAP in Ovarian Carcinoma Tissue. Wang Tianke, He Jue. Pathology Department, Cixi People's Hospital, Zhejiang 315300, China

Abstract Objective To explore the expression of fibroblast activation protein(FAP) in tissue of ovarian carcinom and its relationship to microvessel density(MVD). **Methods** Through an in vitro study by using immunohistochemical assay, we analyzed FAP in ovarian tumor, borderline ovarian tumors and normal tissues and FAP expression in ovarian cancer and differentiation, invasion degree of correlation. **Results** FAP expressed in ovarian cancer stromal fibroblasts, while there was no expression in ovarian cancer cells, borderline ovarian tumors and normal ovarian tissue. The expression of FAP in ovarian cancer and degree of differentiation and the degree of invasion about. Interstitial MVD is related to the degree of differentiation of ovarian cancer. As FAP expression levels increased, the positive expression rate of MVD gradually increased, and there was significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal expression of FAP may be associated with the occurrence and development of ovarian cancer. FAP may promote the progression of CC by facilitating tumor angiogenesis, and induction of carcinoma tissue reaction interstitial, thus accelerate tumor progression.

Key words Ovarian cancer; Fibroblast activation protein; Immunohistochemistry

卵巢癌是近年来严重威胁妇女生命健康的疾病之一^[1-3]。新生血管的形成是肿瘤发生的重要因素之一,近年来的研究发现,来自于Ⅱ型丝氨酸蛋白酶家族成员之一的 FAP,可通过促进肿瘤微血管的生成,来促进肿瘤的生长和增殖^[4-6]。本实验采用免疫组织化学法,检测 FAP 在正常卵巢组织及卵巢肿瘤组织中的表达,并分析 FAP 的表达及与 MVD 的关系,为卵巢癌的临床诊断和治疗提供依据。

资料与方法

1. 一般资料:收集新乡医学院第一附属医院肿瘤科 2009 年 3 月~2011 年 5 月有完整病例资料的手术切除的卵巢病变组织标本 66 例,卵巢交界性肿瘤组织 16 例(图 1B),卵巢癌(浆液性囊腺癌)组织 50 例。其中 50 例卵巢癌标本均经病理

检查证实(图 1C),患者年龄 35~54 岁,平均 45.8 ± 3.6 岁。病理组织分化程度:高分化 10 例,中分化 18 例,低分化 22 例;按国际妇产科联盟(FIGO)2000 年分期标准:Ⅰ期 11 例,Ⅱ期 16 例,Ⅲ期 23 例。另收集同期手术切除的 68 例卵巢正常组织作为对照组(图 1A)。以上患者术前均未接受过非甾体类抗炎药物治疗及放、化疗,所取病例均经病理专家确诊。

2. 方法:所有标本离体后均经 4% 多聚甲醛固定 48h 后石蜡包埋,连续切片,3 μ m 厚,HE 染色。兔抗人 FAP 多克隆抗体,稀释浓度 1:200(英国 Abcam 公司)。采用免疫组化 SP 法(SP 试剂盒为福州迈新公司产品)常规脱蜡至水,高压抗原热修复,血清封闭,滴加 1:200 兔抗人 FAP 多克隆抗体 4℃ 过夜,1:200 生物素标记的羊抗兔二抗 37℃ 孵育 30min,再以 1:200 辣根过氧化物酶标记的链霉素抗生物素, DAB 显色(DAB 显色剂购自武汉博士德公司)。以 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知阳性染色卵巢癌切片作阳性对照。

作者单位:315300 浙江省慈溪市人民医院病理科(王天科);
341000 赣州,赣南医学院病理学教研室(何珏)

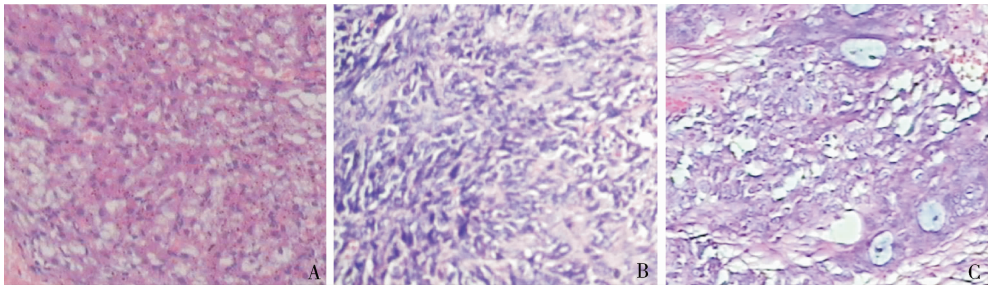


图1 卵巢组织 HE 染色光镜图(×40)

A. 正常卵巢组织;B. 卵巢交界性肿瘤组织;C. 恶性病变卵巢组织

3. 结果判定:根据阳性细胞百分比和染色强度进行 FAP 阳性判定。随机观察 10 个高倍视野,计数每个视野下间质细胞中的阳性细胞百分比。无染色为 0 分,弱染色(浅黄色)为 1 分,中等染色(棕黄色)为 2 分,强染色(黄褐色)为 3 分;阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分,5%~25%为 1 分,25%~50%为 2 分,>50%为 3 分。上述两项评分相加为总分,0 分(-),1~2 分(+),3~4 分(++),5~6 分(+++)。按参考文献[2]报道的方法进行 MVD 计数。

4. 统计学方法:用 SAS 8.0 软件进行统计分析。计量资料所得数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用重复测量方差分析和 t 检验进行统计学检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. FAP 在卵巢癌组织的表达情况:本研究对手术切除的 134(66+68)例卵巢标本中 FAP 的表达进行了分析,结果表明良性卵巢瘤组织、卵巢交界性肿瘤组织和卵巢癌细胞中未见表达,而在卵巢癌间质成纤维细胞中有表达,图 2A 为正常卵巢组织未见 FAP 表达、图 2B 和 C 的 FAP 表达分别为卵巢交界性肿瘤组织和卵巢癌组织间质细胞。

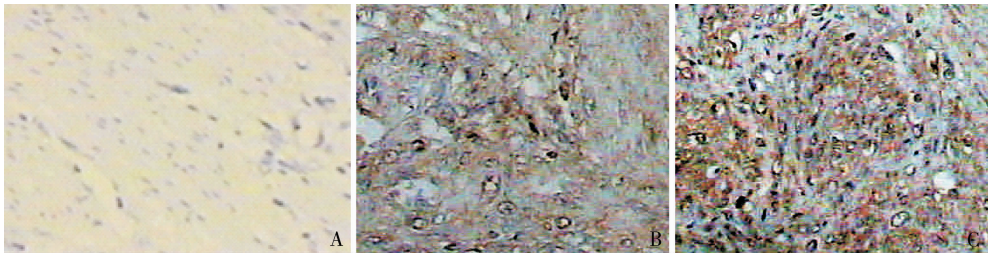


图2 卵巢组织免疫组化(SP)法 FAP 表达分析(×200)

A. 良性病变卵巢组织;B. 卵巢交界性肿瘤组织;C. 浆液性囊腺癌病变卵巢组织

2. 各组病理组织 FAP 表达情况:本研究对 50 例卵巢癌组织和 16 例卵巢交界性肿瘤组织及 68 例卵巢正常组织 FAP 的表达进行了分析,结果表明 50 例卵巢癌组织中 FAP 的阳性率显著高于正常组织和卵巢交界性肿瘤组织($\chi^2 = 61.68, \chi^2 = 12.90, P < 0.01$),详见图 2A 及表 1,且卵巢交界性肿瘤组织的 FAP 阳性率亦显著高于正常组织($\chi^2 = 4.16, P < 0.05$),详见图 2B 及表 1,68 例卵巢正常组织中未见 FAP 表达,详见图 2C 及表 1。

3. FAP 表达与肿瘤病理分级的关系:肿瘤组织分化程度越低,FAP 的阳性率越高,低分化的肿瘤组织 FAP 阳性率显著高于中分化和高分化的肿瘤组织($\chi^2 = 5.309, P < 0.05; \chi^2 = 19.363, P < 0.01$),中分化肿瘤组织的 FAP 阳性率亦显著高于高分化的肿瘤组织($\chi^2 = 4.368, P < 0.05$),详见表 2。

表2 FAP 表达与肿瘤腺癌病理分级的关系(卵巢癌 50 例)

分组	n	FAP 表达		阳性率 (%)
		阳性	阴性	
高分化腺癌(Ⅰ级)	10	2	8	20.0
中分化腺癌(Ⅱ级)	18	11	7	61.1
低分化腺癌(Ⅲ级)	22	21	1	95.5

表1 FAP 在正常卵巢组织、卵巢交界性肿瘤组织及卵巢癌组织中的表达

分组	n	FAP 表达		阳性率 (%)
		阳性	阴性	
正常卵巢组织	68	0	68	0
卵巢交界性肿瘤组织	16	2	14	12.5
卵巢癌组织	50	34	16	68.0

4. FAP 表达与肿瘤临床分期的关系:临床 I 期的卵巢癌组织中阳性表达率为 9.1% (1/11), II 期患者阳性表达率显著高于 I 期患者,为 62.5% (10/16)

($\chi^2 = 5.649, P < 0.05$); 而Ⅲ期的 FAP 阳性表达率较Ⅱ期显著性升高($\chi^2 = 7.516, P < 0.01$), 为 100% (23/23); Ⅲ期的 FAP 阳性表达率较Ⅰ期明显升高($\chi^2 = 25.404, P < 0.01$), 即肿瘤组织临床分期越晚, FAP 的表达阳性率越高(表 3)。

表 3 FAP 表达与卵巢癌临床分期的关系

分组(期)	n	FAP 表达		阳性率 (%)
		阳性	阴性	
I	11	1	10	35.0
II	16	10	6	66.7
III	23	23	0	91.3

5. FAP 表达与 MVD 的关系: 卵巢癌间质中的 MVD 与卵巢癌的分化程度有关, 且随着 FAP 表达水平的增加、MVD 表达阳性率则逐渐上升, 比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2), 提示在卵巢癌组织中 FAP 的表达可能会促进肿瘤微血管的形成。

表 2 卵巢癌中 FAP 表达与 MVD 的关系

FAP	n	MVD/mm ²	t	P
-	16	42.7 ± 11.3		
+	8	67.8 ± 14.8	4.6297	<0.05
++	16	96.1 ± 15.1	4.3555	<0.05
+++	10	126.8 ± 20.1	4.4415	<0.05

讨 论

卵巢癌是一种病死率较高的妇科恶性肿瘤^[7]。卵巢癌的侵袭转移是一个复杂的过程, 肿瘤血管形成是这个过程中必不可少的环节。近年来研究发现 FAP 具有血管源性功能。FAP 是转膜丝氨酸蛋白酶的小家族, 它表达于 90% 以上的上皮性肿瘤的基质成纤维细胞的胞膜和胞质中, 包括卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、肺癌等。FAP 是一个增生性成纤维细胞的表面标志物, 在控制成纤维细胞生长及胚胎发育、组织修复和上皮性肿瘤的演进过程中可能起一定的作用^[8,9]。其阳性细胞靠近肿瘤毛细血管内皮细胞并围绕着肿瘤结节, 但在正常成人的组织、良性和癌前病变的上皮性损伤中通常不表达^[10-12]。

通过免疫组化法对 32 例正常卵巢组织、16 例卵巢交界性肿瘤组织和 50 例卵巢癌进行检测, 结果显示 FAP 主要表达于肿瘤间质成纤维细胞内, 正常卵巢组织及卵巢交界性肿瘤组织中 FAP 未见表达。统计结果显示, FAP 表达与卵巢癌的分化和侵袭程度有关, 且随着卵巢癌恶性程度的增强 FAP 表达逐渐增

高。肿瘤必须靠血液供应(血管生成)吸收必要的营养物质才能为肿瘤生长、侵袭转移提供所需条件, 研究表明 FAP 在微血管内皮细胞中都有所表达^[13]。本研究结果显示, 在卵巢癌组织中, 随着 FAP 表达水平的增加、MVD 表达阳性率则逐渐上升, 此结果与 FAP 在乳腺癌、子宫内膜癌及胃癌间质中的表达及其与微血管密度的关系中的相关报道结果相似^[9,14,15]。

本研究结果表明, FAP 在卵巢癌间质成纤维细胞中呈现高表达, FAP 的高表达导致了新生血管的形成, 说明了 FAP 可通过促进肿瘤微血管的生成, 诱导癌组织产生反应性间质, 加快肿瘤的演进。它的异常表达可能会促进卵巢癌的发生与发展。因此加强对 FAP 的进一步研究, 有助于为卵巢癌提供临床实验依据。目前临床上对 FAP 虽然做了大量的科学研究, 但它的生化特性和功能尚未清楚, 尤其是卵巢癌与不同的组织学类型之间是否有 FAP 蛋白之间的区别, 仍有待于进一步的深化。

参考文献

- 1 温秋婷, 孙玉荣, 李春红, 等. 成纤维细胞激活蛋白对卵巢癌细胞增殖、迁徙和侵袭的影响[J]. 中国癌症杂志, 2011, 21, (6): 441-445
- 2 Campagne S, Saurel O, Gervais V, *et al.* Structural determinants of specific DNA - recognition by the THAP zinc finger[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: 3466
- 3 Sabogal A, Lyubimov AY, Corn JE, *et al.* THAP proteins targetspecific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves[J]. Nat Struct Mol Biol, 2010, 17: 117-123
- 4 Cheng JD, Valianou M, Canutescu AA, *et al.* Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(3): 351-360
- 5 Wang X, Y DM, Schnapp A, *et al.* The role of fibroblast activation protein (FAP) in cell adhesion, migration and liver fibrosis[J]. Hepatology, 2005, 42: 738A-738A
- 6 江冠民, 刘鹏, 李小青, 等. 小鼠成纤维细胞激活蛋白 a 二肽基肽酶核心序列原核表达与纯化及复性[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(16): 1206-1209
- 7 范宇飞, 朱严冰, 孟继昌, 等. Survivin、p53 蛋白与细胞周期蛋白 D1 在乳腺癌中的表达及其相关性[J]. 临床误诊误治, 2010, 23(2): 101-103
- 8 张红霞, 郭佑民. 成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(9): 1866-1869
- 9 邵洪江, 靳占峰. FAP 在胃癌间质中的表达及其与微血管密度的关系[J]. 国际遗传学杂志, 2010, 33(3): 134-146
- 10 Lo P, Chen J, Steffola K, *et al.* Photodynamic molecular beacon triggered by fibroblast activation protein on cancer associated fibroblasts for diagnosis and treatment of epithelial cancers[J]. Med Chem, 2009, 52(2): 358-368

(下转第 106 页)

一步分析发现, IL-10 与 MDA 含量呈负相关, 说明心力衰竭患者氧化应激程度的增加可能与 IL-10 水平的降低有关。

目前针对心力衰竭发病过程中炎症反应与氧化应激机制的治疗靶点主要为 TNF- α , 但临床上心力衰竭患者抗 TNF- α 治疗并未取得理想效果^[17]。笔者的研究结果提示心力衰竭患者心肌促炎因子及氧化应激程度增高与 IL-10 水平的降低密切相关, 因此推测上调 IL-10 水平可能抑制心力衰竭患者炎症及氧化应激过程, 从而干预心力衰竭的病理、生理过程。

参考文献

- MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, *et al.* Evidence of improving prognosis in heart failure; trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995 [J]. *Circulation*, 2000, 102(10):1126-1131
- Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function[J]. *Circ Res*, 2004, 95(12):1140-1153
- Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, *et al.* Redox signaling in cardiac physiology and pathology[J]. *Circ Res*, 2012, 111(8):1091-1106
- Dokka S, Shi X, Leonard S, *et al.* Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(6):L1196-L1202
- Yamaoka M, Yamaguchi S, Okuyama M, *et al.* Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure; behavior of interleukin-10 in association with tumor necrosis factor- α [J]. *Jpn Circ J*, 1999, 63(12):951-956
- Kaur K, Dhingra S, Slezak J, *et al.* Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2009, 14(2):113-123
- Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, *et al.* Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF α in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10[J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32(11):803-810
- Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A, *et al.* Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2003, 105(1):45-50
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, *et al.* ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012; The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(14):1787-1847
- Rajasingh J, Bord E, Luedemann C, *et al.* IL-10-induced TNF- α mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression[J]. *FASEB J*, 2006, 20(12):2112-2114
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(6):1549-1555
- Kwon OJ. The role of nitric oxide in the immune response of tuberculosis[J]. *J Korean Med Sci*, 1997, 12(6):481-487
- Didion SP, Kinzenbaw DA, Schrader LI, *et al.* Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction[J]. *Hypertension*, 2009, 54(3):619-624
- Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, *et al.* Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor- κ B [J]. *Circulation*, 2012, 126(4):418-429
- Pascotto M, Leong-Poi H, Sari I, *et al.* Anti-inflammatory and pro-angiogenic effects of beta blockers in a canine model of chronic ischemic cardiomyopathy: comparison between carvedilol and metoprolol [J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(6):384
- Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, *et al.* Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(15):3990-4000
- Javed Q, Murtaza I. Therapeutic potential of tumour necrosis factor- α antagonists in patients with chronic heart failure [J]. *Heart Lung Circ*, 2013, 22(5):323-327

(收稿日期:2014-05-14)

(修回日期:2014-06-14)

(上接第 161 页)

- Lebeau AM, Brennenw N, Aggarwal S, *et al.* Targeting the cancer-stroma with a fibroblast activation protein activated promelitin-protoxin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(5):1378-1386
- Ospeh c, Meens JC, Jungel A, *et al.* Inhibition of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase 4 increases cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(5):1224-1235
- Xu J, Chen SHW, Chen H, *et al.* STAT5 mediates antiapoptotic effects of methylprednisolone on oligodendrocytes [J]. *J Neurosci*, 2009, 29:2022-2026

- 赵志娟, 米小轶, 刘树立, 等. FAP 在乳腺癌间质中的表达及其与微血管密度的关系 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2007, 16(5):559-563

- 宋敬, 李越. 成纤维细胞激活蛋白 P 和转化生长因子在子宫内膜癌组织中的表达及其意义 [J]. *中国临床保健杂志*, 2010, 13(5):485-487

(收稿日期:2014-03-04)

(修回日期:2014-04-04)