

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.06.05

• 临床研究 •

FAS mRNA 在肺癌中的表达及临床意义

阮征 花天放 薛月华

【摘要】 背景与目的 研究表明在许多肿瘤组织中脂肪酸合酶(FAS)呈高表达,酶活性增强且与不良预后有关。本研究的目的是探讨 FAS mRNA 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义。方法 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR法)和图像分析技术测定 FAS mRNA 在 55 例肺癌组织、32 例肺癌旁组织和 32 例正常肺组织中的表达。结果 FAS mRNA 在肺癌组织、癌旁组织和正常肺组织中的阳性表达率分别为 72.7%、62.5% 和 25.0% ($P < 0.01$)。半定量法检测表明 FAS mRNA 在肺癌组织中表达水平为 0.885 ± 0.06 , 癌旁组织中为 0.564 ± 0.10 , 正常组织中为 0.259 ± 0.04 ($P < 0.01$)。结论 FAS mRNA 在肺癌组织中高表达的,说明在肿瘤的形成与演变的过程中可能存在着同步的脂肪酸代谢改变。

【关键词】 非小细胞肺癌 脂肪酸合酶 逆转录聚合酶链反应

【中图分类号】 R730.2; R734.2

Clinical significance and expression of fatty acid synthase mRNA in lung cancer RUAN Zheng, HUA Tianfang, XUE Yuehua. Department of Thoracic Surgery, The Affiliated No.1 Hospital, Jiaotong University, Shanghai 200080, P. R. China

Corresponding author: RUAN Zheng, E-mail: ruanzheng@csc.org.cn

【Abstract】 Background and objective Fatty acid synthase (FAS) is differentially overexpressed and hyperactivated in many tumors and indicates poor prognosis. The aim of this study is to explore the expression of FAS mRNA and its significance in lung cancer tissues and paracancerous tissues, compared with normal lung tissues. **Methods** Fifty-five lung cancer tissues, 32 paracancerous tissues and 32 normal lung tissues were collected. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and imaging analysis were applied to determine the FAS mRNA expression. **Results** The positive rate of FAS mRNA expression was 72.7%, 62.5% and 25.0% in lung cancer tissues, paracancerous tissues and normal lung tissues, respectively ($P < 0.01$). The expression level of FAS mRNA was 0.885 ± 0.06 in lung cancer tissues, 0.564 ± 0.10 in paracancerous tissues and 0.259 ± 0.04 in normal lung tissues. The expression level of FAS mRNA in lung cancer was significantly higher than that in paracancerous tissues and normal lung tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** FAS mRNA is significantly overexpressed in lung cancer. The results suggest that overexpression of tumor lipid metabolism may play an important role in the oncogenesis and development of lung cancer.

【Key words】 Non-small cell lung cancer Fatty acid synthase Reverse transcription polymerase chain reaction

通过免疫组织化学的方法测定脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)在乳腺癌^[1]、前列腺癌^[2]、卵巢癌^[3]、结肠癌^[4]中的表达,国内外已经有许多文献报道。我们也曾通过免疫组织化学的方法,发现 FAS 在肺癌中有较高的阳性表达, FAS 的表达与患者的预后有关^[5]。受到技术手段的限制,免疫组织化学只能在蛋白质分子水平进行测定和评价。国外曾经报道使用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法研究前列腺癌

中 FAS mRNA 的表达^[6],发现 FAS mRNA 在前列腺癌组织、癌旁组织、不典型增生组织中表达是有明显差异的。目前尚未见有关 FAS mRNA 在肺癌方面的文献报道。本研究采用 RT-PCR 的方法观察肺癌组织、癌旁组织和正常肺组织中 FAS mRNA 的表达,进行相对定量的测定。

1 资料与方法

1.1 标本来源与临床资料 选自 2003 年 7 月~ 2004 年 11 月上海市第一人民医院胸外科行完全性切除的肺癌组织标本。将 55 例新鲜肺癌组织及 32 例未受肿瘤侵犯的肺癌旁组织立即投入液氮中保存 32 例正

作者单位: 200080 上海交通大学附属第一人民医院、上海市第一人民医院胸外科(阮征), 普外科(花天放), 中心实验室(薛月华)(通讯作者)。

阮征 E-mail: ruanzheng@csc.org.cn

常肺组织的取材来源于同期气胸、肺大疱等肺良性疾病手术标本中正常肺组织。55 例肺癌患者, 其中男性 39 例, 女性 16 例; 中位年龄 63 岁, 平均 60 岁; 按 1999 年 WHO 肺和胸膜肿瘤组织分类, 鳞癌 23 例, 腺癌 25 例, 腺鳞癌 4 例, 大细胞癌 3 例。pTNM 分期(UICC 1997 分期标准): I 期 13 例, II 期 18 例, IIIA 期 24 例。

1.2 试剂和分析软件 Trizol, MMLV reverse transcriptase, RNasin Ribonuclease Inhibitor(Invitrogen 公司); 定量用 Taq 酶(dNTP)(ABI 公司); DNA Engine OpticonTM 1.02 版分析软件; GIS Gel 1D 凝胶图像分析软件。

1.3 FAS 引物 序列引用蔡文伟设计^[7], 由上海生工合成: 上游 5'-CCCACCTACGTACTGGCCTA-3'; 下游 5'-CTTGGCCTTGGGTGTGTACT-3'; 扩增片段 294 bp; 反应条件 95℃ 5 min(95℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s), 35 次循环, 72℃ 5 min 延长。

内参照 3 磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH) 上游 5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAG-3'; 下游 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'; 扩增片段 288 bp; 反应条件 95℃ 5 min(95℃ 30 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s), 35 次循环, 72℃ 10 min 延长。

1.4 实验步骤

1.4.1 样品处理, 组织样品总 RNA 的抽提 从液氮中取出冰冻的 100 mg 组织, 转移到匀浆管中, 加入 1 mL Trizol, 匀浆混匀(用匀浆机研磨 3 min)。转移到 1.5 mL DEPC 处理的无菌离心管中, 加入 400 μ L 氯仿, 剧烈震荡混匀, 室温 12 000 r/min 离心 10 min。转移上清至另一离心管中, 加入等体积氯仿: 异戊醇(24: 1), 剧烈震荡混匀, 室温 12 000 r/min 离心 10 min, 计 2 次。转移上清至另一离心管中, 加入等体积异丙醇, 震荡混匀, 室温放置 2 min, 室温 12 000 r/min 离心 10 min。轻轻移弃上清, 防止吸去沉淀, 加入 1 mL 70% 乙醇, 悬浮沉淀, 室温 12 000 r/min 离心 10 min, 计 2 次。轻轻移弃上清, 防止吸去沉淀, 室温 12 000 r/min 离心 1 min, 用移液器吸干残余酒精, 室温空气干燥, 使酒精挥发。加入 100 μ L DEPC 处理的灭菌水, 溶解 RNA。电泳观察 RNA 的浓度和完整性。

1.4.2 RNA 的反转录, 合成 cDNA RNA (2 μ g) 4 μ L, Primer(oligo dT) 1 μ L, RNase 抑制剂 0.5 μ L, 补灭菌水至终体积 10 μ L。轻轻混匀并在微量离心机低速将混合液收集在底部。72℃ 水浴 2 min, 迅速冰浴 2 min 离心收集混合液至管底 每个反应管中顺序

加入以下试剂: 10 \times Buffer 2 μ L, dNTP Mix (10 mmol/L) 1 μ L, RNase 抑制剂 0.5 μ L, Sterile H₂O 5.5 μ L, MMLV Reverse Transcriptase (100 U/ μ L) 1 μ L, 42℃ 空气浴孵育 1.5 h, 95℃ 5 min。

1.4.3 cDNA 的 PCR 扩增 第一链产物 2 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP 1 μ L, 引物 1 (50 μ mol/L) 1 μ L, 引物 2 (50 μ mol/L) 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 1 μ L, Sterile H₂O 39 μ L。反应条件 95℃ 5 min (95℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s), 35 次循环, 72℃ 延长 5 min。

1.4.4 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶溴乙啶电泳分离, 紫外灯下观察, 凝胶成像分析系统拍照记录。

1.4.5 凝胶成像分析系统处理和计算各条带的扫描量(密度和面积), 以此作为各条带的定量。各标本的 FAS mRNA 的 PCR 产物条带扫描量与 GAPDH PCR 产物扫描量的比值, 为该标本中 FAS mRNA 的相对含量。

1.5 统计分析 统计软件采用 SPSS11.5。FAS mRNA 在各组织中表达率的差异用 χ^2 检验, FAS mRNA 含量在各组中的差异采用 *F* 检验。

2 结果

2.1 FAS mRNA 的 PCR 产物的定性观察

2.1.1 FAS mRNA 在不同肺组织中的表达(图 1) 内标基因 GAPDH 在肺癌组织、癌旁组织、正常肺组织中的表达是稳定的、一致的。FAS mRNA 在肺癌组织中呈高表达, 阳性表达率为 72.7% (40/55); 在肺癌旁组织中也有较高的表达率(62.5%, 20/32); 正常肺组织中 FAS mRNA 的阳性表达率为 25.0% (8/32)。经 χ^2 检验, 肺癌组织与正常肺组织间的差异有统计学意义($\chi^2 = 18.63, P = 0.000$), 癌旁组织与正常肺组织间差异亦有统计学意义($\chi^2 = 9.134, P = 0.002$), 而肺癌组织与癌旁组织之间的差异无统计学意义($\chi^2 = 0.989, P = 0.32$)。

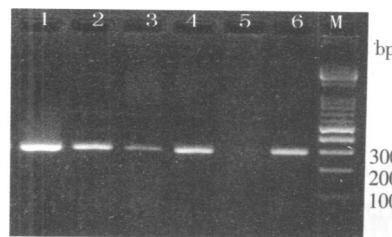


图 1 RT-PCR 检测 FAS mRNA 在不同组织中的表达

Fig 1 Expression of FAS mRNA in different tissues by RT-PCR M: DNA marker; Lanes 1, 3, 5: FAS mRNA in lung cancer tissues, paracancerous tissues and normal lung tissues respectively; Lanes 2, 4, 6: GAPDH mRNA in lung cancer tissues, paracancerous tissues and normal lung tissues respectively

2.1.2 FAS mRNA 的表达与肺癌临床病理特征的关系 结果显示, FAS mRNA 的表达仅与肺癌患者原发肿瘤分期有密切关系, 而与病理类型、肿瘤部位、淋巴结转移与否、pTNM 分期、细胞的分化程度均无明显关系(表 1)。

表 1 FAS mRNA 表达与肺癌患者临床病理特征之间的关系

Tab 1 Relationship between expression of FAS mRNA and the clinicopathologic characteristics in lung cancer

Characteristic	n	Positive expression of	χ ² value	P value
		FAS mRNA (%)		
Sex			0.059	0.808
Male	39	28(71.79)		
Female	16	12(75.00)		
Age (year)			1.760	0.185
< 60	25	16(64.00)		
≥60	30	24(80.00)		
Gross			0.028	0.867
Peripheral type	23	17(73.91)		
Central type	32	23(71.88)		
Histology			0.145	0.930
SQC	23	18(78.26)		
Adenocarcinoma	25	18(72.00)		
Others	7	4(57.14)		
Differentiation			2.554	0.279
Well	28	19(67.86)		
Moderate	16	14(87.50)		
Poor	11	7(63.64)		
T stage			6.342	0.042
T1	20	12(60.00)		
T2	21	18(85.71)		
T3	14	13(92.86)		
TNM stage			0.145	0.930
I	13	9(69.23)		
II	18	13(72.22)		
III	24	18(75.00)		
Lymph node metastasis			3.227	0.199
N0	16	13(81.25)		
N1	19	11(57.89)		
N2	20	16(80.00)		

Note: SQC, squamous cell carcinoma

2.2 FAS mRNA PCR 产物的定量观察 我们使用 GIS Gel ID 凝胶图像分析软件发现, FAS mRNA 在肺癌组织、癌旁组织、正常肺组织中的表达是不同的, 分别为 0.885 ± 0.06、0.564 ± 0.10 和 0.259 ± 0.04 ($F = 12.725, P = 0.000$)。再行两两比较检验, 发现在肺癌组织与正常肺组织之间($t = 4.469, P = 0.000$)、癌旁组织与正常肺组织之间($t = 2.137, P = 0.042$)以及

肺癌组织与癌旁组织之间($t = 2.943, P = 0.005$) FAS mRNA 的表达水平差异均有统计学意义。

3 讨论

最近的研究发现, 肿瘤细胞内的脂肪酸代谢发生异常的变化, 表现为肿瘤 FAS 表达的增高, 肿瘤细胞内源性脂肪酸合成代谢的增强。FAS 的调控可发生在蛋白质和基因水平。基因转录水平的调控有多种方式, mRNA 表达量的变化是其中之一。Oskouian^[8]以 SK-BR3 乳腺癌细胞株模型为例, 研究 FAS 在不同阶段潜在在基因的表达与 FAS 过度表达的关系。结果没有发现 FAS 染色体位点的重排、FAS 基因的扩增、FAS mRNA 稳定性的增加以及 FAS 蛋白半衰期的延长, 只是发现了 FAS mRNA 的表达增加和转录增快, 以此来解释 FAS 的过度表达。Rossi 等^[6]研究前列腺癌手术标本, 发现在前列腺癌中 FAS mRNA 和 FAS 蛋白的表达远远大于正常组织, 且具有统计学意义; 从正常的前列腺组织、前列腺上皮的增生、高度增生到雄激素依赖的癌细胞、非雄激素依赖的癌细胞, FAS mRNA 和 FAS 蛋白的表达是逐渐上升的, 提示 FAS mRNA 与 FAS 蛋白与前列腺癌的启动和演变阶段有较强的联系。

FAS mRNA 在肺癌中的表达情况, 国内外均未有报道。本研究通过 RT-PCR 的方法发现, 在肺癌组织中 FAS mRNA 是高表达的, 阳性率为 72.7% (40/55); 癌旁组织也有较高的表达, 阳性率为 62.5% (20/32); 而在正常肺组织中是低表达的, 阳性率仅 25.0% (8/32)。FAS mRNA 在不同组织中的表达是有差异的, 且有统计学意义。FAS mRNA 在正常组织中的表达, 说明正常肺组织中也有内源性脂肪酸的合成代谢。文献报道 II 型肺泡细胞合成卵磷脂, 形成肺表面活性物质。FAS mRNA 在癌旁组织中也有较高的表达, 说明肿瘤代谢的改变是细胞表型转化的早期特征之一, 即在出现形态改变之前已经有代谢的异常。肺癌中 FAS mRNA 的高表达, 可以在基因转录水平增强调控 FAS 酶蛋白的表达和活性, 影响细胞内脂肪酸的合成情况。

本研究通过凝胶图像分析系统来测定 FAS mRNA 在肺的表达, 以 FAS/GAPDH 的比值作为该组织的含量。肺癌组织中为 0.885 ± 0.06, 癌旁组织为 0.564 ± 0.10, 正常肺组织中为 0.259 ± 0.04, 经 F 检验, 发现有统计学上的差异 ($P < 0.01$)。进一步行两两比较发现, FAS mRNA 在肺癌组织中的表达明显高于癌旁组织 ($P < 0.01$) 而后者又显著高于正常

肺组织中的 FAS mRNA 表达 ($P < 0.05$)。说明 FAS mRNA 在肺癌的生长发展过程中表达量是增加的,从正常组织到癌旁组织、癌组织的表达量显著升高,提示 FAS mRNA 与肺癌的发生、演变、进展有密切的联系,存在着脂肪酸代谢调控的异常。国外的研究也有类似的结论^[9]。同时,提示我们在病变组织中动态观察 FAS mRNA 有助于恶性肿瘤的早期筛查。

FAS 在肿瘤组织中的表达调控很复杂,与正常组织中的代谢活化是不同的,但某些信号传导和下游通路是相似的。例如, MCF-10a 乳腺癌细胞株的脂肪酸代谢受表皮生长因子所驱动,通过丝裂原活化蛋白激酶(MAP)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PF3K) 信号级联调控,类固醇调节蛋白(SREBP) 表达上升, FAS mRNA 上升,调节脂双层,支持膜形成。转导 H-ras 的细胞, MAP 和 PF3K 表达上升, SREBP 表达上升, FAS mRNA 表达提高,脂肪酸合成增加。使用 MAP 和 PF3K 的抑制剂, SREBP 表达下降,使 FAS mRNA 表达下降,脂肪酸合成减少^[10]。

受此启发,某些药物或方法能够通过直接或间接的途径干扰或影响 FAS mRNA 的表达。例如, Herceptin 是酪氨酸激酶受体抑制剂,通过 PF3K 通路,由 HER2/EGF 刺激 FAS 启动子, FAS mRNA 表达增多,脂肪酸合成增加。Herceptin 药理性抑制,可引起 HER2 过度表达的肿瘤上皮细胞(H16N2-HER2)的凋亡^[11,12]。

RNA 干扰技术是指一段 21~25 个碱基组成的 RNA 互补双链能够抑制与其同源的 mRNA 表达的技术。这一抑制作用是通过诱导与其同源的 mRNA 的降解而造成的。De Schrijver 等^[13] 在前列腺癌细胞株 LNCaP 中应用 RNA 干扰技术,发现 RNA 干扰技术可下调 FAS 的表达,主要是减少了甘油三酯、膜磷脂的合成,诱导形态上的改变,包括细胞容积的减少、细胞间接触丧失,导致细胞凋亡,具有抗肿瘤的效应,而且不影响非肿瘤细胞、成纤维细胞的生长速度和变化。因此,在肺癌组织中 FAS mRNA 表达的增多,也为肺癌特异的治疗包括基因治疗提供了可能性和介入针对治疗的位点。

参 考 文 献

1 Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, et al. Fatty acid synthesis: a

potential selective target for antineoplastic therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(14): 6379-6383.

- 2 Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. Hum Pathol, 1996, 27(9): 917-921.
- 3 Alo PL, Visca P, Framarino ML, et al. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. Oncol Rep, 2000, 7(6): 1383-1388.
- 4 Rashid A, Pizer ES, Moga M, et al. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. Am J Pathol, 1997, 150(1): 20F-208.
- 5 Ruan Z, Hua TF, Peng SX, et al. Clinical significance of fatty acid synthase in non-small cell lung cancer. Chin Oncol, 2005, 15(5): 450-453. [阮征, 花天放, 彭寿行, 等. 脂肪酸合酶在非小细胞肺癌中的表达及临床意义. 中国癌症杂志, 2005, 15(5): 450-453.]
- 6 Rossi S, Graner E, Febbo P, et al. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. Mol Cancer Res, 2003, 1(10): 707-715.
- 7 Cai WW, Hua TF, Cao J, et al. The change in metabolism of fatty acids in breast cancer cells and its significance. Parent Enteral Nutr, 2003, 10(2): 68-70, 73. [蔡文伟, 花天放, 曹俊, 等. 乳腺癌中脂肪酸代谢的异常变化及其意义. 肠外与肠内营养, 2003, 10(2): 68-70, 73.]
- 8 Oskouian B. Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3 breast cancer cell line is mediated via a transcriptional mechanism. Cancer Lett, 2000, 149(1-2): 43-51.
- 9 O'Connell MJ, McInerney JO. Adaptive evolution of the human fatty acid synthase gene: support for the cancer selection and fat utilization hypotheses? Gene, 2005, 360(2): 151-159.
- 10 Yang YA, Han WF, Morin PJ, et al. Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. Exp Cell Res, 2002, 279(1): 80-90.
- 11 Kumar Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, et al. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. Cancer Res, 2003, 63(1): 132-139.
- 12 Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Targeting fatty acid synthase: potential for therapeutic intervention in her2/neu overexpressing breast cancer. Drug News Perspect, 2005, 18(6): 375-385.
- 13 De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, et al. RNA interference mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. Cancer Res, 2003, 63(13): 3799-3804.

(收稿: 2006-01-25 修回: 2006-04-10)

(本文编辑 李蓓兰)