

FATS在非小细胞肺癌组织中的表达及临床相关性研究*

闫双双 田寅 张军 仇丽 马克 李政

摘要 目的:研究脆性位点相关抑癌基因(fragile-site associated tumor suppressor, FATS)在非小细胞肺癌以及癌旁正常组织的mRNA和蛋白表达水平,探讨FATS在非小细胞肺癌发生发展中的作用。方法:通过实时定量PCR技术和Western blot技术分析检测天津医科大学附属肿瘤医院2003年5月至2007年10月间91例非小细胞肺癌患者FATS基因和蛋白表达水平,并且研究其表达水平与患者临床预后的关系。结果:实时定量PCR和Western blot结果均显示非小细胞肺癌患者肿瘤组织FATS表达量明显低于其配对的癌旁正常组织($P=0.001$)。FATS基因低表达患者与高表达患者在总生存期差异有统计学意义($P=0.030$)。Cox多因素分析显示FATS基因的表达是非小细胞肺癌独立的预后因素($OR=2.250$;95%CI:1.054~4.805; $P=0.036$)。结论:FATS低表达与非小细胞肺癌的发生发展具有高度相关性,FATS表达作为非小细胞肺癌的独立预后因素,有望成为新的肿瘤标记物,为临床诊治提供新的靶点。

关键词 非小细胞肺癌 预后 FATS mRNA表达

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.11.003

Expression and Clinical Significance of FATS in Non-small Cell Lung Cancer

Shuangshuang YAN, Yin TIAN, Jun ZHANG, Li QIU, Ke MA, Zheng LI

Correspondence to: Zheng LI, E-mail: zhengli@tjmu.edu.cn

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

This work was supported by Tianjin Municipal Foundation of Science and Technology (No. IOJCZDJC18600)

Abstract Objective: To compare the levels of FATS mRNA and protein in non-small cell lung cancer (NSCLC) and paired normal tissues and to investigate the function of FATS in NSCLC. **Methods:** The mRNA and protein expression levels of the FATS gene in 91 NSCLC patients were determined using quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and Western blot analysis. The relationship between FATS expression and the prognosis of these patients was investigated. **Results:** The qRT-PCR and Western blot analysis showed that FATS expression was significantly lower in NSCLC tissue than in the paired paraneoplastic tissue ($P=0.001$). The differences in the overall survival of patients with low and high FATS expression were statistically significant ($P=0.030$). Multivariate analysis indicated that the FATS expression was an independent prognostic factor for NSCLC (odds ratio, 2.250; 95% confidence interval, 1.054-4.805; $P=0.036$). **Conclusion:** FATS expression is clinically significant and appears to be a new independent marker for NSCLC.

Keywords NSCLC; Prognosis; FATS; mRNA expression

肺癌是一种常见的恶性肿瘤,是肿瘤相关死亡的主要原因^[1],近年来我国肺癌的发病率及病死率逐年增高,其中非小细胞肺癌(non small cell lung cancer, NSCLC)约占85%^[2]。临床确诊时的病期是影响肺癌患者预后的主要因素之一,尽管现代诊断技术已取得长足进步,但目前针对肺癌早期诊断的方法仍不尽人意,70%的患者就诊时已经是局部晚期或发生转移^[3],而目前肺癌患者的5年生存率仅15%^[4]。因此,寻找能早期发现和诊断肺癌或者评价其预后的肿瘤标志物已成为目前肺癌临床和基础研究的主

要方向。FATS是一个全新的普通脆性位点相关性抑癌基因,其定位于人类10q26染色体上,很多肿瘤在这个位点上表现杂合性缺失^[5],目前仅在乳腺癌的研究中发现其对预后预测具有一定的意义。本研究采用相对实时定量PCR技术检测NSCLC及癌旁正常组织中FATS的表达量,探讨FATS表达量对NSCLC发生、发展及临床预后的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集天津医科大学附属肿瘤医院2003年5月至

作者单位:天津医科大学附属肿瘤医院生化与分子生物学室,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

*本文课题受天津市应用基础及前沿技术研究计划(编号:IOJCZDJC18600)资助

通信作者:李政 zhengli@tjmu.edu.cn

2007年10月间收治的经过临床病理确诊、临床随访资料完整NSCLC 91例,其中男性69例,女性22例;年龄40~79岁,中位年龄62岁;鳞癌67例,腺癌24例。随访1~59个月,中位随访期39个月。所有病例均未行术前化疗、放疗,肺叶切除术后均经TP方案化疗6个周期。91例NSCLC以及与其配对的癌旁正常组织标本15例均来自天津医科大学附属肿瘤医院组织库。

1.2 方法

1.2.1 细胞总RNA的提取及cDNA的合成

采用Trizol(Invitrogen公司)提取组织细胞总RNA,紫外分光光度法测定RNA的浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。cDNA的合成:使用20 μ L反应体系。在适量的焦炭酸二乙酯(DEPC)水中加入5 μ g总RNA,0.5 μ g Oligo(dT),65 $^{\circ}$ C变性5 min,冰浴后加入10 nmoL dNTP混合物、CDNA合成缓冲液、0.2 μ moL DTT,40 U RNA抑制剂和200 U逆转录酶(Invitrogen公司),42 $^{\circ}$ C反应60 min。反应完成后70 $^{\circ}$ C 15 min终止反应。

1.2.2 组织中总蛋白的提取及Western blot反应

取新鲜的NSCLC组织及其配对正常组织,用预冷的PBS洗去血液并称重后放入液氮中冷冻,取出组织于研钵中充分剪碎及研磨后,重悬于8倍体积的RIPA裂解液中,置于冰上裂解30 min。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心20 min后取上清,测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(蛋白定量30 μ g),蛋白分离之后采用电泳法转移至PVDF膜上。5%脱脂奶粉封闭1 h,加入一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗膜6次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2 500)室温孵育1 h,常规洗膜,ECL荧光显色系统,X线片感光显影,扫描分析感光条带效果。

1.2.3 实时定量PCR检测

实时定量PCR检测采用Platium Quantitative PCR SuperMix-UDG system(Invitrogen公司),并按操作手册执行。FATS基因上下游引物和探针分别为:5'-CATTACATTCCTGGCTGGAGTTA-3',5'-CCTCTTGCTGCTCCAGAAAATACT-3'和5'(FAM)-CAGGGCAGTACACACAAA-3'。管家基因甘油醛-3-三磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,其上下游引物和探针分别为:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',5'-GAAGATGGTGTGGGATTTTC-3'和5'(FAM)-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC(TAMRA)-3'。PCR反应条件为50 $^{\circ}$ C温育2 min,95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,65 $^{\circ}$ C退火、延伸1 min,50个循环。 C_r 值为荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。 ΔC_r 值为FATS的 C_r 值与管家基因GAPDH的 C_r 值之差, $2^{-\Delta C_r}$ 则为该样本中FATS mRNA相对于GAPDH的mRNA的

相对表达量。

1.3 统计学方法

采用SPSS 15.0统计软件。NSCLC及其配对的癌旁正常组织的FATS mRNA表达水平采用秩和检验;FATS mRNA与临床病理因素采用 χ^2 检验;采用ROC曲线确定分组阈值;Kaplan-Meier法绘制生存曲线;Log-rank时序检验比较组间生存期差异;多因素分析采用Cox风险比模型。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FATS mRNA在NSCLC组织以及配对正常组织中的表达

采用实时定量PCR技术检测91例肿瘤组织以及配对的正常组织FATS mRNA的表达量。FATS mRNA在NSCLC组织中表达明显低于配对的正常腺体组织($P=0.001$,表1)。FATS在NSCLC组织中的平均表达量比配对正常组织低 1×10^4 倍,提示FATS在NSCLC的发生发展中的重要作用。

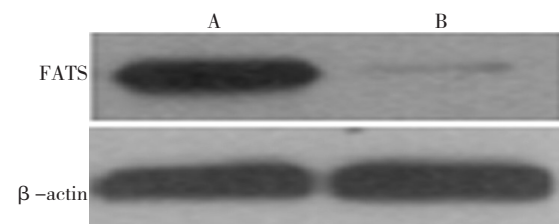
表1 FATS mRNA在NSCLC及癌旁正常组织的表达量 $\bar{x} \pm s$

Table 1 FATS mRNA expression in NSCLC specimens and normal lung tissue

分组	FATS mRNA 表达量	<i>t</i>	<i>P</i>
正常组织组	1.53E-1 \pm 2.40E-1	3.408	0.001
NSCLC组	2.59E-5 \pm 4.00E-5		

2.2 FATS蛋白在NSCLC组织以及配对正常组织中的表达

采用Western blot技术检测NSCLC及其配对正常组织中FATS蛋白的表达量。结果显示NSCLC组织中FATS蛋白的表达量(0.045 \pm 0.10)明显较配对正常组织(0.97 \pm 0.07)中低($P < 0.05$,图1),提示FATS在NSCLC的发生发展中的具有重要作用。



A: NSCLC癌旁组织; B: NSCLC组织

图1 FATS蛋白在NSCLC及癌旁正常组织的表达量

Figure 1 FATS protein expression in NSCLC specimens and normal lung tissue

2.3 FATS表达与NSCLC临床病理特征的关系

NSCLC样本根据ROC曲线设定的临界值(4.57E-4)被分为高表达和低表达两组。FATS在NSCLC组织中的表达在患者年龄、性别、组织类型、肿瘤大小、临床分期、家族史、吸烟史等方面差异均

无统计学意义(表2)。

表2 FATS表达与临床病理因素的关系 例

Table 2 Association of FATS expression with clinical characteristics

临床因素	例数	FATS表达/例		P
		低表达	高表达	
组织				
正常组织	15	1	14	<0.001
非小细胞肺癌	91	69	22	
性别				
男性	69	53	16	0.222
女性	22	14	8	
年龄/岁				
<60	37	29	8	0.394
≥60	54	38	16	
组织类型				
鳞癌	67	50	17	0.717
腺癌	24	17	7	
肿瘤大小/cm				
≤2	13	11	2	0.150
2~5	38	24	14	
≥5	40	32	8	
临床分期				
I	45	33	12	0.948
II	25	18	7	
III~IV	21	16	5	
家族史				
有	10	9	1	0.239
无	81	59	22	
吸烟史				
有	75	58	17	0.215
无	16	10	6	

2.4 FATS表达的生存分析

91例随访结果显示,FATS高表达的患者比低表达的患者有更长的总生存期,其差异有统计学意义($P=0.030$,图2)。FATS mRNA低表达和高表达患者的3年总生存率分别为48.5%和65.2%(表3)。

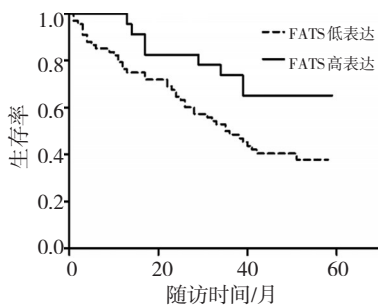


图2 FATS高表达与FATS低表达NSCLC患者生存曲线比较

Figure 2 Survival curves of NSCLC patients with low FATS expression and high FATS expression

2.5 多因素生存分析

在单因素分析中发现FATS表达与患者总生存期相关,有显著性差异($P=0.030$)。将单因素分析中具有统计学意义的影响因素带入Cox模型进行多因素分析,结果显示:临床分期(OR=1.894; 95% CI: 0.443~8.107; $P=0.005$)、性别(OR=2.403; 95% CI: 1.087~5.315; $P=0.030$)以及FATS表达水平(OR=2.250; 95% CI: 1.054~4.805; $P=0.036$)是影响患者总生存期的独立预后因素(表3)。

表3 NSCLC患者总生存期Cox多因素分析及3年生存率

Table 3 Cox multivariate analysis of OS and 3-year DFS of NSCLC patients

因素	3年生存率/%	P	多因素分析		
			相对风险度	95%CI	P
临床分期					
I	57.8	0.082	1.894	0.443~8.107	0.005
II	59.4				
III	21.4				
IV	71.4				
性别					
男	50.6	0.061	2.403	1.087~5.315	0.030
女	63.6				
FATS表达量					
低表达	48.5	0.030	2.250	1.054~4.805	0.036
高表达	65.2				

3 讨论

肺癌为当今全世界最为常见的恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康和生命。近半个世纪以来,世界各国肺癌的发病率和病死率均有明显增高。全球每年新增肺癌病例将达120万。我国是世界上肺癌患者最多的国家,且发病率和病死率一直呈上升趋势。近30年来,尽管在肺癌治疗方面有了很大的进展,但肺癌生存率仍然不容乐观^[6]。其主要原因是肺癌生物学特性十分复杂,恶性程度高,大部分患者在确诊时已属晚期、发生转移,预后甚差。因此,必须寻找更加精确、有效的分子标志物,以期早期发现肿瘤。

癌症的发生和发展是多基因和多阶段协同作用的结果,与癌基因激活和抑癌基因失活等遗传因素有关,并受多种环境因素的影响^[7]。基因组不稳定性(genomic instability)是肿瘤细胞的共同特征,表现为DNA损伤修复机制的异常和细胞周期调控紊乱。其中DNA损伤是恶性肿瘤发生发展的重要机制,而染色体脆性位点抑癌基因对DNA损伤高度敏感,这类基因的低表达或缺失可能与肿瘤的发生发展高度相

关^[8-9]。FATS是一个全新的脆性位点相关性抑癌基因,其mRNA广泛表达于胸腺、心、脑、乳腺、睾丸、脾、肾、乳腺及肺组织中^[5]。FATS基因不仅在乳腺癌、卵巢癌患者DNA中存在显著的缺失,通过RT-PCR检测还发现FATS基因mRNA表达水平在多种癌细胞和肿瘤组织中广泛降低甚至不表达。将FATS表达载体导入细胞后,呈现明显的体外和体内抗肿瘤活性。本研究组前期对FATS基因作用的机理研究发现FATS能显著诱导一个关键的细胞周期抑制性分子p21的蛋白表达量,使细胞周期阻滞于G₁期,在DNA损伤后,FATS过量表达使细胞周期阻滞于G₁期的效应更加明显。FATS基因表达被抑制后,导致G₂/M期细胞周期节点(checkpoint)功能受损,表明FATS基因表达对维持基因组稳定性(genomic stability)有重要影响。除此之外,FATS基因还是p53的转录靶点,并具有不依赖p53的独特抗肿瘤激活作用,表明FATS在肿瘤发生发展过程中的重要作用^[10]。

本研究采用实时定量PCR方法证实全部NSCLC患者的原发癌较配对的正常肺组织中FATS mRNA表达量下调,提示FATS mRNA表达量的改变可能在NSCLC发生过程中发挥重要的作用。但是本研究还发现,FATS mRNA在不同性别、年龄、组织类型、肿瘤大小、临床分期、有无家族史及是否吸烟患者组中表达量无显著性差异(均 $P>0.05$)。因此,FATS可能与上述临床病理因素无明显关系。Kaplan-Meier生存分析结果表明,FATS mRNA高表达量组和FATS mRNA低表达量组患者的3年总生存率分别为65.2%和48.5%。FATS mRNA表达水平($P=0.030$)是影响预后的因素。同时Cox比例风险模型进行多因素分析显示,FATS mRNA表达水平($OR=2.250$;95%CI:1.054~4.805; $P=0.036$)是NSCLC患者明显的独立预后危险因素。因此,FATS表达水平的检测可能有助于判断肿瘤患者的预后,但也有待进一步大样本量验证。

综上所述,本研究检测了原发肿瘤以及配对的正常组织FATS mRNA的水平,发现FATS mRNA在非小细胞肺癌组织中表达明显低于配对的正常组织。同时还探讨了FATS基因在NSCLC中的临床病理和预后的意义,发现FATS高表达患者比低表达的患者有更长的生存期,并且FATS表达是NSCLC的独立预后因素。由此表明FATS在NSCLC的发生发展过程中具有重要作用,为非小细胞肺癌的研究提供了新的研究思路与方向。

参考文献

- 1 Grills C, Jithesh PV, Blayney J, et al. Gene expression meta-analysis identifies VDAC1 as a predictor of poor outcome in early stage non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14635.
- 2 Maione P, Rossi A, Sacco PC, et al. Advances in chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(18): 2997-3007.
- 3 Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003[J]. J Clin Oncol, 2004, 22(2): 330-353.
- 4 Oliver TG, Mercer KL, Sayles LC, et al. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer[J]. Genes Dev, 2010, 24(8): 837-852.
- 5 Li Z, Zhang Q, Mao JH, et al. An HDAC1-binding domain within FATS bridges p21 turnover to radiation-induced tumorigenesis[J]. Oncogene, 2010, 29(18): 2659-2671.
- 6 Giangreco A, Groot KR, Janes SM. Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows[J]? Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(6): 547-553.
- 7 Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours[J]. J Thorac Oncol, 2007, 2(8): 706-714.
- 8 Gasser S, Raulat D. The DNA damage response, immunity and cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(5): 344-347.
- 9 Drusco A, Pekarsky Y, Costinean S, et al. Common fragile site tumor suppressor genes and corresponding mouse models of cancer [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 984505.
- 10 Zhang X, Zhang Q, Zhang J, et al. FATS is a transcriptional target of p53 and associated with antitumor activity[J]. Mol Cancer, 2010, 16(9): 244.

(2011-12-14收稿)

(2012-04-05修回)

(本文编辑:邢颖)