

## FAP-1 在人结肠癌组织中的表达

姚和瑞, 谢德荣, 李志花, 林显敢, 梁新文, 刘天浩, 江志敏, 詹俊

(中山大学附属第二医院肿瘤科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨 Fas 相关磷酸酯酶(FAP-1)在结肠癌抵抗 Fas 介导的凋亡中的作用。【方法】通过免疫组化方法检测结肠癌组织中 FAP-1、Fas 受体 (Fas-R) 的表达及癌旁肿瘤浸润淋巴细胞 Fas 配基 (Fas-L) 的表达, 通过 TUNEL 染色原位检测肿瘤细胞凋亡。【结果】56 例结肠癌组织中, 肿瘤细胞 FAP-1 阳性率为 71% (40/56), FAP-1 表达与组织分化程度及病理分期无关,  $P$  均  $> 0.05$ 。56 例结肠癌组织中肿瘤细胞 Fas-R 免疫组化染色均阳性, 且肿瘤组织中均可见到 Fas-L 免疫组化染色阳性的癌旁肿瘤浸润淋巴细胞浸润。FAP-1 阴性的结肠癌组织中肿瘤细胞凋亡百分比较 FAP-1 阳性组高,  $(6.0 \pm 1.6)$  vs  $(4.0 \pm 1.2)$ ,  $P < 0.05$ 。FAP-1 阴性的结肠癌组织中, 肿瘤细胞凋亡与 Fas-L 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞数目呈正相关,  $r = 0.785$ ,  $P < 0.01$ ; FAP-1 阳性组未见此现象。【结论】结肠癌抵抗 Fas 介导的细胞凋亡与结肠癌细胞表达 FAP-1 有关。

**关键词:** 结肠肿瘤; 脱噬作用; FAP-1; Fas 受体

中图分类号: R735.34

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2003)02-0168-03

## Expression of FAP-1 in Human Colon Adenocarcinoma Tissues

YAO He-rui, XIE De-rong, LI Zhi-hua, LIN Xian-gan, LIANG Xin-wen,

LIU Tian-hao, JIANG Zhi-min, ZHAN Jun

(Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To evaluate whether Fas-associated phosphatase-1(FAP-1), an inhibitor of Fas signal transduction, is associated with resistance against Fas-R-mediated apoptosis in colon cancers. 【Methods】FAP-1, Fas-R and Fas-L were detected in colon cancer tissues using immunohistochemistry. Apoptosis of cancer cells were detected in situ using terminal deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick end labelling (TUNEL). 【Results】FAP-1 expression was detected in 40 out of 56 resected colon adenocarcinomas (71%) independent of the differentiation and staging of cancer ( $P > 0.05$ ). Fas-R expression was observed in tumor cells of all colon adenocarcinomas tested. Fas-L immunostaining was observed in tumor infiltrating lymphocytes (TIL) adjacent to tumor nests. Percentage of apoptotic cancer cells was lower in colon cancers with positive FAP-1 immunostaining than in FAP-1 negative tumors,  $(4.0 \pm 1.2)$  vs  $(6.0 \pm 1.6)$ ,  $P < 0.05$ . Positive correlation between the percentage of in situ apoptotic tumor cells and the number of Fas-L-positive tumor infiltrating lymphocytes was observed in FAP-1 negative colon cancers ( $r = 0.785$ ,  $P < 0.01$ ), but not in FAP-1 positive ones. 【Conclusion】Resistance against Fas-mediated apoptosis in colon cancers is correlated with FAP-1 expression.

**Key words:** colonic neoplasms; apoptosis; fas-associated phosphatase-1; fas receptor

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 168 ~ 170]

近年来研究表明, Fas-Fas-L 系统是细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 和自然杀

伤细胞 (natural killer cell, NK) 细胞介导的细胞凋亡的主要途径<sup>[1,2]</sup>。而结肠癌像其他很多肿瘤一样,

收稿日期: 2002-09-11

基金项目: 广东省自然科学基金(重点)资助项目(013147)

作者简介: 姚和瑞(1970-), 男, 广东潮阳人, 硕士, 讲师。

虽然在 mRNA 及蛋白质水平上均有大量 Fas 受体表达,但对 Fas 受体介导的凋亡不敏感,从而导致它们逃脱免疫系统的攻击<sup>[3,4]</sup>。结肠癌逃避 Fas 介导的细胞凋亡的分子机制仍不清楚,有作者认为这可能与其结肠癌细胞表达 Fas 相关磷酸酯酶-1 (Fas-associated phosphatase-1, FAP-1) 有关<sup>[5]</sup>。本研究通过检测大肠癌细胞中 FAP-1 的表达,探讨 FAP-1 与结肠癌细胞抵抗 Fas 介导的细胞凋亡的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病人及组织标本

56 例结肠腺癌患者为中山大学附属第二医院的住院病人,男 30 例,女 26 例。年龄 31~81 岁,平均 61.4 岁。手术前均未接受化疗、放疗或免疫治疗。高分化、中分化、低分化各 18、22、16 例。按常规 Dukes 分期,A、B、C 期各 14、24、18 例。手术后将标本立即液氮冷冻,保存在 -80℃ 备用。

### 1.2 免疫组化

Fas-R 多克隆抗体 (C20, 工作浓度 1:50)、Fas-L 多克隆抗体 (N20, 工作浓度 1:50)、FAP-1 多克隆抗体 (C20, 工作浓度 1:50) 均为 Santa Cruz 公司试剂。白细胞共同抗原 CD45 (2B11 + PD7/26 克隆, 工作浓度 1:70) 用于分辨肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL), LSAB 试剂盒购于 Dako 公司。

用以上抗体及常规 LSAB 技术染色,操作按试剂盒说明书。结肠癌组织丙酮固定,连续低温组织切片 (4 μm), 30 mL/L 过氧化氢消除内源性过氧化酶活性, PBS 洗涤, 50 mL/L 羊血清封闭 1 h, 加一抗 4℃ 孵育过夜, 阴性对照用 PBS 代替一抗。PBS 洗涤, 依次加入生物素标记的羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的链霉素抗生物素, DAB 显色, 苏木素复染。CD45 染色时阴性对照采用非免疫性鼠血清代替 CD45 单克隆抗体。

在 400 倍高倍镜下每张切片浏览超过 30 个视野, 统计邻近癌巢的 Fas-L 免疫组化阳性染色的淋

巴细胞。Fas-L 阳性肿瘤浸润淋巴细胞计数依每个视野的细胞数计算 (cell/field)。

### 1.3 DNA 末端原位标记染色检测细胞凋亡

DNA 末端原位标记 (TUNEL) 染色检测组织切片中凋亡的肿瘤细胞。低温组织切片用蛋白酶 K 处理后, 3 mL/L 过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性、渗透液处理、加入含生物素标记 dUTP 的 TdT 缓冲液, 湿盒 37℃ 孵化 60 min, 阴性对照组以不含 TdT 的缓冲液处理。加过氧化物酶标记的链霉素抗生物素, DAB 显色, 苏木素复染。400 倍高倍镜下计数大约 1 000 个结肠癌细胞, 计算 DNA 末端原位标记染色阳性具有凋亡形态的肿瘤细胞。

### 1.4 统计学处理

细胞计数结果用均数 ± 标准差表示, 组间对照采用非配对 *t* 检验, 率的比较用  $\chi^2$  检验。直线相关分析了解 Fas-L 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞与肿瘤细胞凋亡的关系。

## 2 结 果

### 2.1 FAP-1、Fas-R、Fas-L 免疫组化染色结果

56 例结肠腺癌中 40 例有 FAP-1 阳性表达 (71%), 癌周浸润的淋巴细胞未见表达, FAP-1 表达分布于癌细胞膜下的胞浆内, 细胞核未见着色 (图 1A), 切片中 FAP-1 阳性细胞散在分布。FAP-1 表达与肿瘤组织分化和分期无关, *P* 均 > 0.05, 见表 1。56 例结肠腺癌中均有 Fas-R 阳性染色, Fas-R 阳性染色主要位于胞浆 (图 1B)。56 例结肠腺癌癌周均可见到 Fas-L 免疫组化染色阳性的淋巴细胞浸润, Fas-L 阳性染色位于淋巴细胞胞浆及胞膜 (图 1C)。

### 2.2 肿瘤细胞凋亡检测结果

通过 DNA 末端原位标记染色发现癌巢中散在分布的凋亡细胞均有典型的凋亡形态, 包括染色质浓集、与周围细胞脱离、凋亡小体形成 (图 1D)。

在 FAP-1 阴性的结肠癌组织中发现肿瘤细胞凋亡百分数与 Fas-L 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞数

表 1 FAP-1 表达与肿瘤组织分化和分期的关系

	Differentiation			<i>P</i>	Duke's staging			<i>P</i>
	Good	Moderate	Poor		A	B	C	
FAP-1 (+)	12	18	10	0.370	10	18	12	0.839
FAP-1 (-)	6	4	6		4	6	6	

表 2 肿瘤细胞凋亡与 Fas-L(+)肿瘤浸润淋巴细胞的关系

Table 2 Examination of tumor apoptosis and its relationship with Fas(+) TIL cells adjacent to tumor nests *n*

	<i>n</i>	Fas(+)TIL	Tunel staining	Correlation coefficients ( <i>r</i> value)	<i>P</i> value
FAP-1(-)	16	24.98 ± 5.60	6.0 ± 1.6 <sup>1)</sup>	0.785	0.000
FAP-1(+)	40	24.97 ± 5.48	4.0 ± 1.2	0.045	0.782

1) Compared with FAP-1(+), *P* = 0.000

之间存在线性相关,而在 FAP-1 阳性的结肠癌组织中二者之间未发现相关性,而且,在 FAP-1 阳性的结肠癌组织中凋亡细胞的百分数较 FAP-1 阴性的组织低,见表 2。

### 3 讨论

Fas-L 是 Fas-R 的天然配体,当 CTL 细胞或 NK 细胞识别肿瘤细胞后受到激活,表达 Fas-L,结合到肿瘤细胞表面的 Fas-R,将刺激信号传递到胞内,诱导凋亡的产生<sup>[6]</sup>。我们及其他作者的研究<sup>[3-5]</sup>均发现结肠癌细胞有 Fas 受体表达,癌周亦有 Fas-L 阳性的淋巴细胞浸润。但结肠癌为何能逃避 Fas 介导的细胞凋亡,产生免疫逃避?其分子机制仍不清楚,有作者认为这可能是因为结肠癌细胞 Fas 信号传导通路中出现了抑制蛋白 FAP-1,导致胞内 Fas 信号传导异常所致<sup>[4,5]</sup>。

众多的研究已证实在胰腺癌、白血病等肿瘤疾病中,FAP-1 是 Fas 受体介导细胞凋亡的胞内抑制剂<sup>[5,7,8]</sup>。FAP-1 在 Fas 通路上,通过与 Fas 受体胞质区的“死亡区域”相互作用而起着负调节作用。本研究中,我们发现表达 FAP-1 的结肠癌肿瘤细胞凋亡较 FAP-1 阴性的结肠癌减少,而且 FAP-1 表达的结肠癌肿瘤细胞凋亡的百分比与癌周 Fas-L 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞无相关性,相反,在不表达 FAP-1 的结肠癌中,肿瘤细胞凋亡的百分比与 Fas-L 阳性的肿瘤浸润淋巴细胞呈正相关。以上结果提示,结肠癌中 FAP-1 表达与肿瘤细胞抵抗 Fas 介导的细胞凋亡机制有关,这可能是其逃避肿瘤浸润淋巴细胞或 NK 细胞杀伤导致免疫逃避的机制之一。

(本文图 1 见插页 6. Fig. 1 shown in back coloured page 6)

#### 参考文献:

- [1] Lowin B, Hahne M, Mattmann C, *et al.* Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways[J]. *Nature*, 1994, 370(6491): 650.
- [2] Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells[J]. *J Exp Med*, 1995, 181(3): 1235.
- [3] von Reyher U, Strater J, Kittstein W, *et al.* Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(3): 526.
- [4] O'Connell J, Bennett M W, O'Sullivan G C, *et al.* Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer[J]. *J Pathol*, 1998, 186(3): 240.
- [5] Lee S H, Shin M S, Park W S, *et al.* Immunohistochemical localization of FAP-1, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in normal and neoplastic human tissues[J]. *APMIS*, 1999, 107(12): 1101.
- [6] Nagata S. Apoptosis by death factor[J]. *Cell*, 1997, 88(3): 355.
- [7] Sato T, Irie S, Kitada S, *et al.* FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas[J]. *Science*, 1995, 268(5209): 411.
- [8] Itakura M, Mori S, Park N H, *et al.* Both HPV and carcinogen contribute to the development of resistance to apoptosis during oral carcinogenesis[J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(3): 591.

(编辑 黄小廷)

Expression of FAP-1 in Human Colon Adenocarcinoma Tissues (Text in page 168)

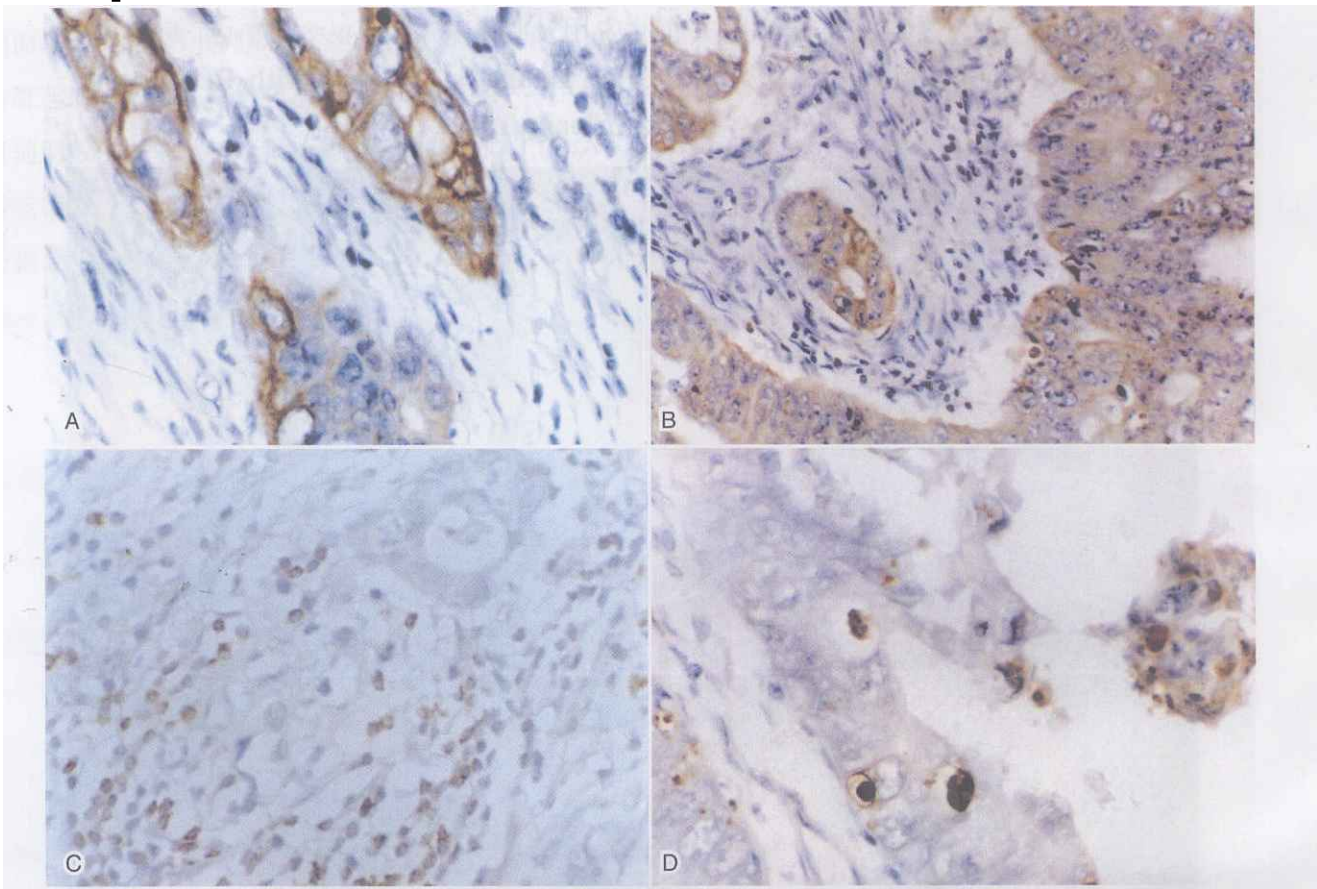


图 1 人结肠癌组织中 FAP-1、FasR 和 FasL 免疫组化及 TUNEL 检测

Fig. 1 Immunohistochemical examination of FAP-1, FasR and FasL expression and TUNEL staining in human colon adenocarcinomas

- A. FAP-1 positive immunohistochemical staining of colon adenocarcinoma cells,
- B. FasR positive immunohistochemical staining of colon adenocarcinoma cells,
- C. FasL positive immunohistochemical staining of tumor infiltrating lymphocytes,
- D. TUNEL staining in apoptotic colon adenocarcinoma cells

Experimental Study of Titanium Implant with Low Elastic Modulus (Text in page 126)

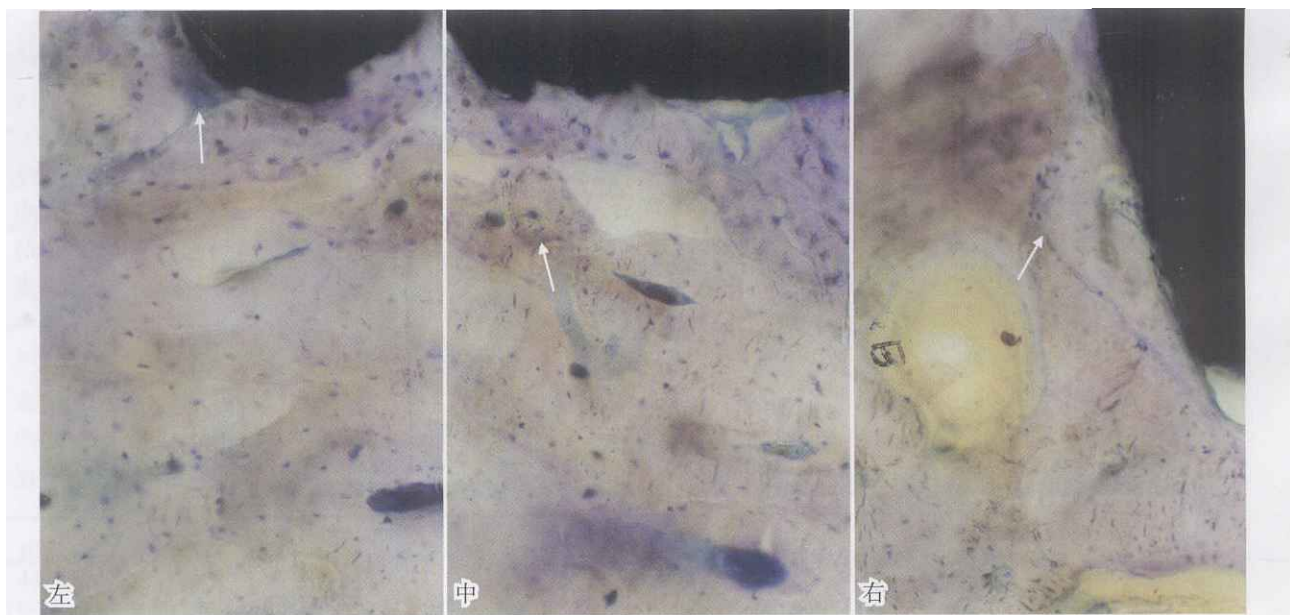


图 2 种植体骨界面骨整合情况

Fig. 2 The interface of implant-bone

- No gap were observed between bone and implants ( $\times 100$ ) Left: Type A, a little cartilage existed in the interface (arrow). middle: Type B, a few Haversian system were observed (arrow); right: Type C, the borderline existed between newborn and primary bone tissue (arrow)