

成纤维活化蛋白在眼睑基底细胞癌相关成纤维细胞中的表达研究

周金蕙^{1,2}, 王宁³, 母强元^{1,2}, 刘朱^{1,2}, 王大庆^{1,2}

引用:周金蕙,王宁,母强元,等.成纤维活化蛋白在眼睑基底细胞癌相关成纤维细胞中的表达研究.国际眼科杂志 2021; 21(8):1345-1350

作者单位:¹(637000)中国四川省南充市,川北医学院附属医院眼科;²(637000)中国四川省南充市,川北医学院眼视光学系;³(629000)中国四川省遂宁市中心医院眼科

作者简介:周金蕙,女,川北医学院在读硕士研究生,研究方向:眼表与眼眶疾病。

通讯作者:王大庆,男,毕业于四川大学,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:眼表、眼眶及眼整形。wdq11@sina.com

收稿日期:2020-10-27 修回日期:2021-07-02

摘要

目的:通过培养、分离、纯化、鉴定眼睑基底细胞癌相关成纤维细胞(CAFs)及正常眼睑皮肤成纤维细胞(NFs),将两种成纤维细胞的生物学特性和成纤维活化蛋白(FAP)表达情况进行对比研究,以进一步探究FAP以及CAF在眼睑基底细胞癌发病及其发展中的作用及意义。

方法:将眼睑基底细胞癌及眼睑正常皮肤组织块贴壁培养获得原代CAF及NFs,于倒置相差显微镜下观察纯化的两种细胞第3代的细胞形态并用细胞免疫化学染色(SP法)鉴定两种细胞;MTT法检测细胞生长增殖活力;通过RT-qPCR、Western Blot分别检测其FAP mRNA、蛋白在两种细胞中的表达差异。

结果:眼睑CAF呈长梭形或纺锤形,胞质突明显减少,而胞浆内具有较多颗粒,细胞体积差异明显,排列紊乱且密集,丧失接触抑制,存在明显的重叠生长现象;NFs呈长梭形,但胞浆内颗粒少见,细胞体积较均一,放射状排列,存在接触抑制,未见重叠生长。眼睑CAF的增殖速度明显快于NFs。RT-qPCR法检测眼睑CAF中FAP mRNA相对于内参的表达量为 3.672 ± 0.221 ,明显高于眼睑NFs中的含量 1.034 ± 0.024 ($P < 0.05$)。Western Blot法检测两种细胞中FAP蛋白表达水平发现,FAP在眼睑CAF中高表达,而眼睑NFs中几乎不表达 ($P < 0.05$)。

结论:眼睑CAF与眼睑NFs在形态结构、生长增殖、生长因子表达等生物学特征方面发生了显著改变,提示肿瘤微环境随眼睑基底细胞癌的发生发展相应地发生了一些变化,进而诱导NFs生物学特性和功能发生改变,最终转变为CAF。此外,眼睑CAF较NFs高表达分泌FAP,表明肿瘤细胞微环境中FAP可能参与肿瘤的发生发展,与眼睑基底细胞癌浸润性生长有一定关系。

关键词:成纤维活化蛋白;眼睑基底细胞癌;癌相关成纤维细胞;正常成纤维细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.8.07

Expression of fibroblast activating protein in eyelid basal cell carcinoma associated fibroblasts

Jin-Hui Zhou^{1,2}, Ning Wang³, Qiang-Yuan Mu^{1,2}, Zhu Liu^{1,2}, Da-Qing Wang^{1,2}

¹Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China;

²Department of Optometry, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; ³Department of Ophthalmology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Da-Qing Wang. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China; Department of Optometry, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China. wdq11@sina.com

Received:2020-10-27 Accepted:2021-07-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the role and significance of carcinoma-associated fibroblasts (CAF) in the occurrence and development of eyelid basal cell carcinoma (BCC), and study on the biological characteristics and the expression of fibroblast activation protein (FAP) of two kinds of fibroblasts associated with eyelid BCC and normal eyelid skin fibroblasts (normal fibroblasts, NFs).

• **METHODS:** CAFs and NFs were obtained by tissue primary cultured. The cell morphology of the 3rd generation purified cells were observed under an inverted phase contrast microscope and identified them using their biomarker by immunohistochemistry for CK, VIM, α -SMA and FAP. Cell growth and proliferation were measured by MTT assay. The expression of FAP mRNA and protein in cells was detected by RT-qPCR and Western Blot.

• **RESULTS:** The CAFs of the eyelid was long fusiform or spindle-shaped, with reduced cytoplasmic processes, more cytoplasmic granules, different cell sizes, disordered arrangement, overlapping growth, and loss of contact inhibition. NFs were in the form of extensive shuttle, radial arrangement, the cytoplasmic particles were rare, there was no overlapping growth phenomenon, and no contact inhibition. The proliferation rate of eyelid CAFs was faster than that of NFs. And the expression of FAP mRNA in CAFs was 3.672 ± 0.221 , which

was significantly higher than that in NFs (1.034 ± 0.024) ($P < 0.05$). In addition, the expression level of FAP protein in CAFs was high, while NFs were not expressed ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** There were significant differences in the biological characteristics of CAFs and NFs, such as morphological structure, growth and the proliferation, growth factor expression and so on. It was therefore suggested that the tumor microenvironment of eyelid basal cell carcinoma had changed, and further induced the biological characteristics and function of NFs, and finally transformed into CAFs. In addition, eyelid CAFs expressed higher expression of FAP than NFs, indicating that FAP may be involved in the occurrence and development of tumor cells in tumor microenvironment, which is associated with the invasive growth of CAFs in eyelid.

• **KEYWORDS:** fibroblast activation protein; eyelid basal cell carcinoma; carcinoma - associated fibroblasts; normal fibroblasts

Citation: Zhou JH, Wang N, Mu QY, *et al.* Expression of fibroblast activating protein in eyelid basal cell carcinoma associated fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(8):1345-1350

0 引言

基底细胞癌(basal cell carcinoma, BCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一^[1],也是眼睑部位最常见的恶性上皮源性肿瘤,约占眼睑恶性肿瘤的90%,多见于60~80岁老年人,好发于下睑(50%)^[2-6]。眼睑BCC易出现倒睫、睑内翻等并发症,因而属于高危型BCC。大量研究证实,紫外线、放射线及遗传因素等均是导致眼睑BCC发生的危险因素^[7-8]。原癌基因异常激活或抑癌基因失活,多种相关蛋白、细胞因子等发生改变,均可导致细胞过度增殖、分化,凋亡受阻,最终引发肿瘤^[9],但其确切发病机制尚不清楚。

正常情况下,细胞外基质是抗肿瘤形成的屏障。但当细胞发生癌变时,其周围邻近的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)也会发生相应的变化以支持癌症的发展^[10-11],从而被称之为肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)^[12]。肿瘤的发生、发展与其微环境改变的相关性在众多研究中得到了验证^[12-14],其中癌相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts, CAFs)是存在于肿瘤微环境中最丰富的细胞类型之一,其主要功能是提供并维持良好的肿瘤细胞生长和增殖的微环境,从而在肿瘤的增殖、侵袭、转移及血管生成过程中起关键作用^[10,13-15]。

成纤维活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)是CAF最具有代表性的分泌产物之一,在90%以上的上皮细胞癌CAF和部分肿瘤细胞中高水平表达,而在人类正常组织中几乎不表达,已有研究表明FAP的高表达与大部分肿瘤的侵袭转移具有一定的相关性^[12,16]。眼睑BCC发病率高,具有侵袭性生长的特点,但其恶性程度和转移性较低^[17],其微环境中CAF表达FAP的情况以及FAP在其侵袭性生长中的作用尚不明确。因此,为了回答上述问题,本研究经原代细胞培养获得眼睑基底细胞癌CAF及

正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NFs),然后检测FAP在两种细胞中的表达情况,以期进一步探讨FAP在人眼睑基底细胞癌CAF中的作用,探索影响眼睑BCC发生、发展的关键因素,为BCC的预防、早期诊断及治疗提供理论依据及新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选取川北医学院附属医院眼科2016-10/2017-05期间收治的拟行眼睑基底细胞癌切除术和老年性眼睑皮肤松弛症矫正术共6例6眼患者的组织标本作为研究对象。其中3例3眼眼睑BCC患者(图1A)为CAF标本来源;3例3眼老年性眼睑皮肤松弛症患者(图1B)为NF标本来源,组织标本均经术后病理证实。6例患者均无创伤及其他部位肿瘤等疾患,年龄为47~80岁,男女比例为1:2,符合标本来源均衡性($P < 0.05$)。本研究经本院伦理委员会审批通过,组织标本的收取均获得患者的知情同意并签署知情同意书。

1.1.2 主要实验材料 主要试剂:高糖DMEM培养基(H-DMEM)、0.25%胰蛋白酶(美国Hyclone公司),胎牛血清(FBS,美国Gibco公司),RNA提取试剂(TRIZOL)(北京Leagene生物有限公司),逆转录试剂盒、RT-PCR试剂盒(Thermo),兔抗人波形蛋白(vimentin, VIM)单克隆抗体、鼠抗人细胞角蛋白(cytokeratin, CK)(广谱)单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司),鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体、兔抗人成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)多克隆抗体(英国Abcam公司),鼠抗人 β -actin抗体、山羊抗兔/小鼠IgG/HRP聚合物(杭州华安生物科技有限公司)。主要仪器设备:生物安全柜(BSC-1000 II A2,苏净安泰公司,中国)、二氧化碳细胞培养箱(CCL-170B-8,ESCO,印尼)、倒置相差显微镜(DM1L, Leica, 德国)、实时定量PCR仪(11491, Roche, 瑞士)、酶标仪(iMark, BIO-RAD, 日本)、电泳仪(PowerPac™ HC, BIO-RAD, 新加坡)、电转仪(Trans-Blot SD Cell, BIO-RAD, 美国)、Fusion曝光仪(Vilber Fusion solo4, Vilber, 法国)。

1.2 方法

1.2.1 标本的收集和处理 从川北医学院附属医院眼科手术室在无菌条件下完整切取新鲜基底细胞癌组织和正常眼睑皮肤组织,尽可能不破坏组织完整性,将其放置于预先加入少许合成培养基的无菌1.5mL离心管中,用含冰袋的保温箱低温迅速转移至实验室超净工作台。所有标本取材均由同一位有经验的术者操作。

1.2.2 CAFs及NFs细胞原代培养及细胞处理 用含0.1%双抗的PBS溶液反复清洗标本3次,置于细胞培养皿中剪去除多余上皮和脂肪组织,将剩余的组织分成大小约1mm³的小块后播种于含4mL合成培养基的培养瓶中,平放在含5%CO₂的37℃恒温细胞孵育箱中培养原代细胞。早期每天用倒置相差显微镜观察培养情况,每2~3d换液。当细胞生长铺满瓶底时,采用胰酶差速消化法进行细胞传代和纯化,使用第3~6代纯化细胞进行实验研究。

1.2.3 观察细胞并鉴定细胞 倒置相差显微镜下,观察第3代纯化的眼睑CAF和NFs细胞形态,拍摄图片。细胞

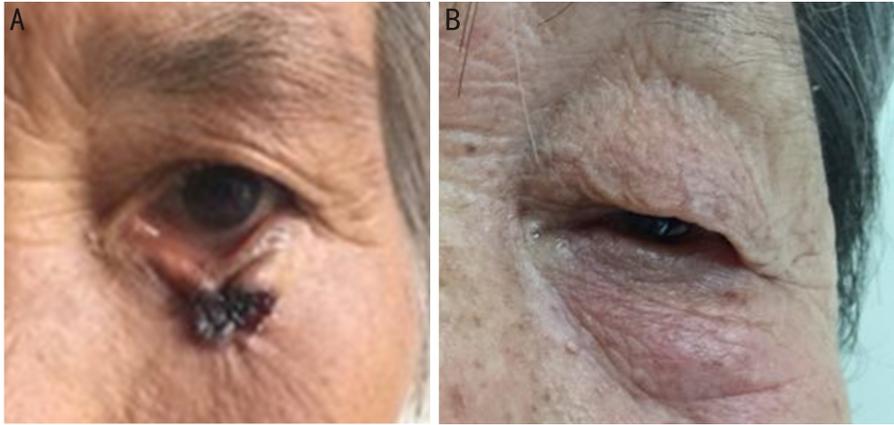


图1 标本来源 A:CAF来源;B:NFs来源。

免疫化学染色(SP法)鉴定两种细胞,步骤如下:爬片:将 5.0×10^3 个CAF和NFs接种于酸预处理置于6孔板中的无菌载玻片上;固定:载玻片浸入4%多聚甲醛中室温固定30min;破膜:0.5% Triton X-100溶液处理15min;灭活:3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶室温处理30min;封闭:正常山羊血清封闭液室温孵育30min;一抗孵育:滴加用PBS液稀释的一抗(稀释比例均为1:100),湿盒,4℃过夜孵育;二抗孵育:滴加山羊抗兔/小鼠IgG/HRP聚合物(稀释比例均为1:100),37℃避光孵育30min;显色:滴加DAB显色液(按DAB试剂盒说明临时配制使用,原液与稀释液比例为1:50),3~5min,自来水洗涤终止;复染:苏木素染核;脱水、透明、封片,显微镜观察并拍照记录结果。

1.2.4 细胞生长增殖活力测定 将眼睑CAF和NFs分别接种于96孔板中(4.0×10^3 个/孔),每例细胞设置6个复孔,置于37℃含5% CO_2 细胞培养箱中继续培养。每隔24h,取出一块96孔板,向每孔加入20 μ L 0.5% MTT溶液,作用4h后吸除含MTT溶液的上清液,加入150 μ L DMSO后置于酶联免疫检测仪上,避光震荡10min使紫色结晶物充分溶解,选择490nm波长,检测其吸光度值(OD值);按以上步骤连续进行7d,记录数据,并进行统计学分析,绘制生长曲线。

1.2.5 实时定量聚合酶反应 用TRIzol处理细胞提取总RNA后逆转录合成cDNA。RT-qPCR循环条件为:初始变性(95℃下10min)、40次变性(95℃下15s)、退火(60℃下60s)、延伸(60℃下60s)。引物序列如下:FAP mRNA引物序列:上游引物:5'-TAG AAC CAT GCT TTG GAG ATA CT-3';下游引物:5'-CAA CAG GCG ACC AGC ATA AA-3'。 β -actin引物序列:上游引物:5'-ACA GAG CCT CGC CTT TGC C-3';下游引物:5'-GAT ATC ATC ATC CAT GGT GAG CTG G-3'。以 β -actin作为内参对照标准进行定量分析。使用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 获得实验组样本基因的相对表达量。

1.2.6 蛋白免疫印迹分析 用RIPA裂解缓冲液提取蛋白,使用BCA蛋白分析试剂盒测定总蛋白含量。用10% SDS-PAGE分离等量蛋白质,然后将蛋白转移到膜上。在4℃条件下,与一抗抗体(稀释比例:FAP 1:3000, β -actin 1:1000)轻轻摇匀共同孵育一夜。添加二抗抗体(稀释比例:羊抗兔二抗 1:10000,羊抗鼠二抗 1:2000),在室

温下孵育1h。采用Fusion FX5程序曝光显影对其免疫反应进行检测和分析,引入 β -actin作为内参对照。应用Image J软件对所获得的条带灰度值进行统计分析。

统计学分析:采用SPSS 19.0进行分析,计量资料使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组重复测量资料比较采用重复测量数据方差分析,两组间比较采用独立样本t检验,组内两两比较采用Bonferroni检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼睑CAF和NFs的细胞培养和分离及纯化结果

在原代培养第3d可见上皮细胞和CAF从癌组织块边缘爬出,癌上皮细胞呈团状生长,CAF排列紧密,呈放射状生长,约7d铺满瓶底;NFs组细胞生长相对缓慢,原代培养第5~7d组织块边缘可见少量的上皮细胞和NFs,NFs形态规则,排列稀疏,约11~13d铺满瓶底。待细胞铺满瓶底经胰酶差速消化法传代与纯化后,CAF和NFs在形态上均未发生明显改变,上皮细胞消失,原代CAF生长速度明显快于NFs。

2.2 眼睑CAF及NFs的初步鉴定结果

2.2.1 细胞形态学观察结果 倒置显微镜下可见,眼睑CAF体积较大,呈长梭形或纺锤形,胞质突明显减少,而胞浆内具有较多颗粒,细胞大小差异明显,生长较快,排列紊乱且密集,丧失接触抑制和密度抑制,存在明显的重叠生长现象(图2A);NFs呈扁平长梭形,胞浆内颗粒较少,细胞大小相对均一,分散排列,存在接触抑制和密度抑制现象(图2B)。

2.2.2 免疫细胞化学检测结果 FAP、VIM、 α -SMA、CK在细胞中阳性表达主要表现为胞质中出现淡棕色或棕黄色颗粒。免疫化学染色结果示:CAF组:FAP、VIM、 α -SMA呈阳性,CK呈阴性(图3A~D);NFs组:除了阳性表达VIM外,其余均为阴性表达(图3E~H)。

2.3 细胞生长增殖活力检测结果 两组间OD值比较差异有统计学意义($F_{组间} = 1882, P_{组间} < 0.0001; F_{时间} = 1464, P_{时间} < 0.0001; F_{组间 \times 时间} = 323.5, P_{组间 \times 时间} < 0.0001$),见表1。绘制细胞生长曲线,并在细胞对数生长期以y分别为0.27、0.54划线,其与细胞生长曲线交叉点x的差值分别表示CAF和NFs的群体倍增时间,即 $T_c = 4.39 - 1.01 = 3.38d$ 、 $T_n = 5.06 - 1.01 = 4.05d$ 。通过绘制细胞生长曲线及倍增时间比较可见CAF增殖速度相对更快,且呈持续增长状态,但

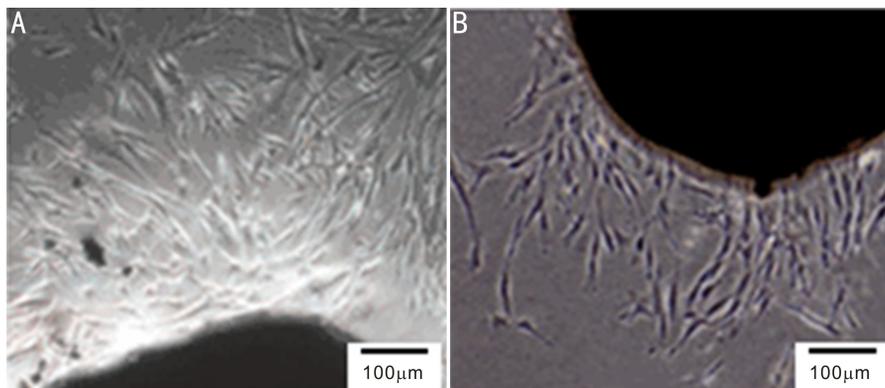


图2 细胞培养 A:CAF_s从组织块边缘呈放射状爬出,细胞较紧密,出现重叠现象;B:NF_s从组织块边缘散在爬出,细胞较松散,未见紧密接触。

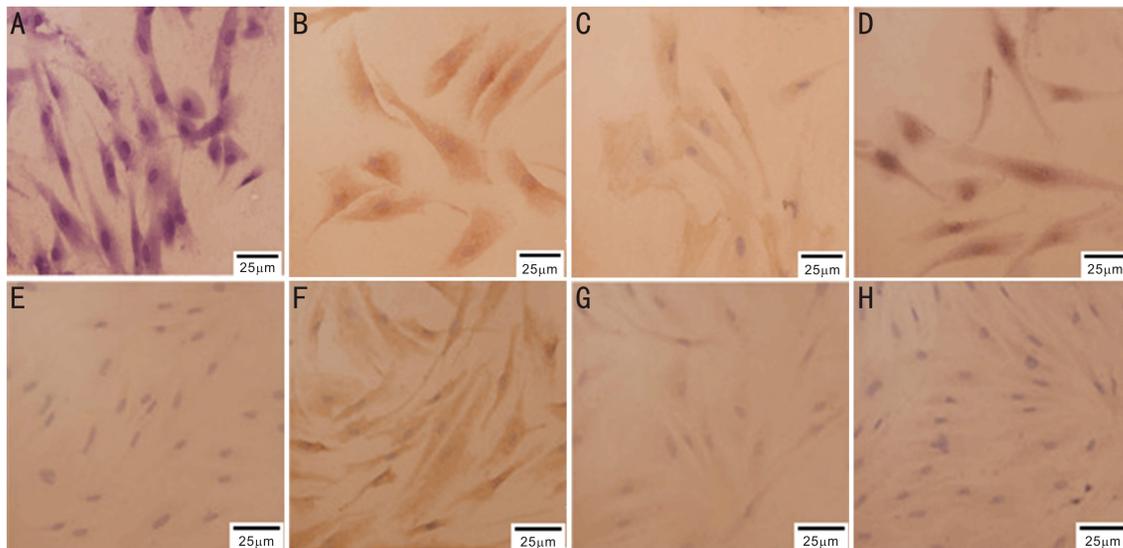


图3 免疫细胞化学染色 CAF_s:A:CK呈阴性表达,B:VIM呈阳性表达,C:α-SMA呈阳性表达,D:FAP呈阳性表达;NF_s:E:CK呈阴性表达,F:VIM呈阳性表达,G:α-SMA呈阴性表达,H:FAP呈阴性表达。

表1 细胞生长增殖活力 MTT 法检测结果

组别	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	$\bar{x} \pm s$
NF _s	0.272±0.003 ^{a,c,e,g,i,k}	0.326±0.001 ^{g,i}	0.369±0.006 ^{c,g,i}	0.470±0.008	0.536±0.005 ^{i,k}	0.493±0.004 ^k	0.339±0.001	
CAF _s	0.274±0.002 ^{a,c,e,g,i,k}	0.364±0.002 ^{c,e,g,i,k}	0.439±0.004 ^{g,i,k}	0.519±0.007	0.572±0.003	0.608±0.005	0.641±0.013	
<i>t</i>	-0.883	-29.597	-13.425	-6.265	-7.892	-26.255	-33.242	
<i>P</i>	0.427	<0.01	<0.01	0.003	0.001	<0.01	0.001	

注:^a*P*<0.05 vs 2d,^c*P*<0.05 vs 3d,^e*P*<0.05 vs 4d,^g*P*<0.05 vs 5d,ⁱ*P*<0.05 vs 6d,^k*P*<0.05 vs 7d。

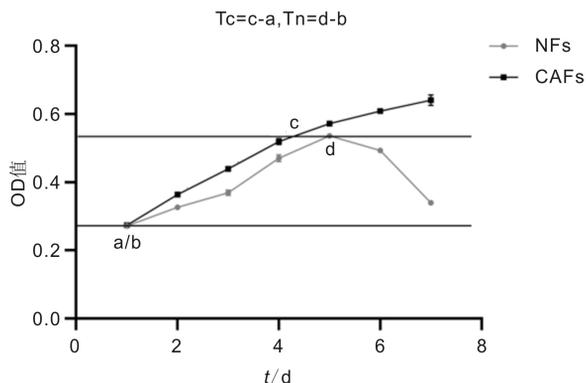


图4 CAF_s与NF_s生长曲线比较图。

其在第4d后增速逐渐减缓;而NF_s于第5d细胞数达峰值后开始逐渐减少,见图4。在第2~7d的增殖活力测定中,

CAF_s及NF_s两者之间同一天内的增殖能力比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。

2.4 RT-qPCR法检测两种细胞中FAP mRNA含量 统计分析结果显示眼睑CAF_s中FAP mRNA扩增含量(3.672±0.221)明显高于眼睑NF_s含量(1.034±0.024),差异具有统计学意义(*t*=21.58, *P*=0.002),见图5。

2.5 Western Blot检测FAP蛋白表达结果 Western Blot法检测两种细胞中FAP蛋白的表达结果显示CAF_s表达较高水平的FAP,而NF_s几乎不表达FAP(图6A)。统计分析结果显示,FAP在CAF_s中的表达量明显高于NF_s,两者之间的差异具有统计学意义(*t*=11.720, *P*=0.007),见图6B。

3 讨论

肿瘤或癌的发生、发展是多种因素共同作用的结果,

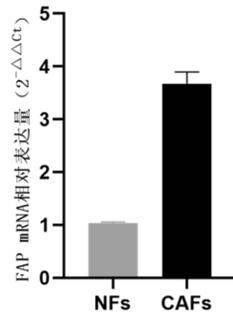


图5 FAP mRNA 相对表达水平比较。

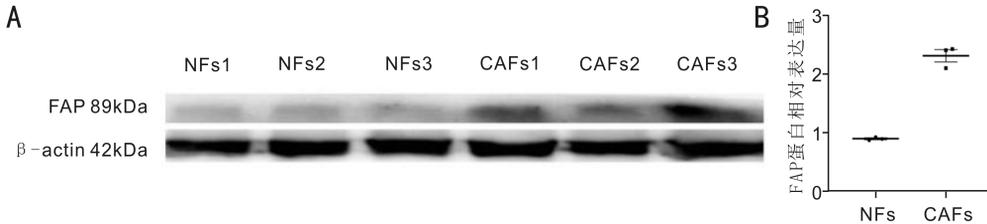


图6 FAP 蛋白表达水平 A:具有代表性的 FAP 蛋白水平的 Western Blot 图像;B:用三个独立实验的总结数据对免疫印迹进行定量分析。

许多证据表明,肿瘤的发生、发展与肿瘤微环境变化紧密相关^[18-19]。大量研究表明,CAFs 是肿瘤微环境中最重要、最丰富的间质细胞之一,其存在有利于合成更多的细胞外基质蛋白质,为肿瘤的生长、侵袭等提供更有利的物质条件,故而也被认为是肿瘤发生、发展、转移和侵袭的关键调节因素之一^[20]。FAP 是 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶,属于二肽基肽酶家族一员,具有二肽基肽酶和内肽酶双重蛋白水解酶活性,其内肽酶活性可降解肿瘤组织细胞外基质,参与细胞外基质的重塑,在多种人类恶性上皮肿瘤 CAFs 中高表达,也在部分肿瘤细胞中表达^[8],通过不断释放促肿瘤生长和促血管生成介质,介导上皮间质转化并抑制免疫应答,参与肿瘤的生长、侵袭、转移,并与部分患者的不良预后密切相关^[11-12, 16]。眼睑 BCC 以局部侵袭性生长为特征,但恶性程度和转移性均较低,所以本次我们探讨了其微环境中 CAFs 表达 FAP 的情况以及 FAP 在其侵袭性生长中的作用。

本实验采用组织块贴壁法,成功获得了纯化的原代眼睑 CAFs 与 NFs,并对 CAFs 的生物学特性进行了初步鉴定,发现 CAFs 呈纺锤形或长梭形,胞质突减少,增殖速率更快,存活能力更强,排列紧密,可重叠生长,丧失了接触抑制现象,分泌更多骨膜蛋白、生长因子等,与 NFs 存在明显的不同,这些差异与国内外文献报道相似^[21-22]。除了形态学特征改变之外,还需要使用细胞的特异性蛋白进行免疫细胞化学染色来鉴定两种细胞。因为 CAFs 是肿瘤间质中活化的成纤维细胞,具备平滑肌细胞和成纤维细胞双重特征,所以它们既表达肌纤维母细胞特异标记 α -SMA、FAP 等^[19, 23-25],又表达成纤维细胞标志物 VIM^[26],但上皮细胞标志物 CK 为阴性表达^[27-28]。因此,我们选用既往研究中常见的 α -SMA、FAP、VIM 及 CK 作为 CAFs 检测指标,运用免疫细胞化学方法对眼睑 CAFs 及 NFs 进行了鉴定。实验结果显示:眼睑 CAFs 表达 α -SMA、FAP 及 VIM 均阳性,CK 为阴性;NFs 除表达 VIM 阳性外,其余均阴性。其中 α -SMA 和 FAP 已被证实存在体外培养的 NFs 中无表达或极低表达,免疫细胞化学染色技

术不能发现,但 RT-qPCR 方法可能检出^[29],本实验的结果与国内外研究结果一致^[30]。

我们通过 MTT 实验检测发现,CAFs 较 NFs 具有更强的生长增殖及存活能力 ($P < 0.05$),其群体倍增时间明显较 NFs 缩短,表明肿瘤组织中 CAFs 呈激活状态,与 NFs 正常表型存在明显差异,本实验的结果与我们前期的研究结果一致^[22]。然后,我们进一步通过 RT-qPCR 实验发现,眼睑基底细胞癌 CAFs 中 FAP mRNA 扩增水平明显高于 NFs ($P < 0.05$);且 Western Blot 实验发现眼睑 CAFs 高表达 FAP,而 NFs 不表达 FAP ($P < 0.05$),与国内外许多相关研究结果一致^[11, 23, 31-33],提示眼睑基底细胞癌肿瘤微环境发生了变化,进一步诱导 NFs 生物学特性和功能发生变化,最终转变为 CAFs。以上分析结果表明,眼睑基底细胞癌 CAFs 中 FAP 表达增强可能与其生长增殖特性改变以及浸润性生长有关。

目前关于 FAP 与 CAFs 相关的研究结果大多来源于一些恶性程度高、转移性强且范围广的肿瘤类型,如乳腺癌^[32]、胃癌^[34]、结直肠癌^[35]等。不同来源的肿瘤和不同区域肿瘤的 CAFs 的表型组成不同,因此其形态、功能具有异质性^[33]。多数研究认为 FAP 促进肿瘤生长、转移、侵袭,但也有研究发现 FAP-a 除了发挥其酶的活性外,还具有非酶功能,认为其在肿瘤发生发展过程中可能具有抑制作用^[33]。有研究发现 FAP 可能参与 FAK、PTEN/PI3K/Akt 和 Ras-ERK 信号通路调控细胞增殖、迁移、侵袭及转移^[32-33]。

本实验通过对比研究发现眼睑 BCC 与正常眼睑皮肤组织中相关成纤维细胞生物学特性以及 FAP 的表达存在明显差异,这说明肿瘤微环境中成纤维细胞已经发生生物学特性和分泌功能的变化,并参与基底细胞癌的发生发展。FAP 作为 CAFs 特异性的标记蛋白,其在眼睑基底细胞癌表达明显增高,推测其可能与 CAFs 的生长增殖特性改变以及眼睑基底细胞癌的浸润性生长有密切联系,可能是眼睑基底细胞癌病因及防治的新靶标,但其具体作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

1 De Vries E, van de Poll-Franse LV, Louwman WJ, et al. Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015. *Br J Dermatol* 2005;152(3):481-488

2 Saleh GM, Desai P, Collin JR, et al. Incidence of eyelid basal cell carcinoma in England: 2000-2010. *Br J Ophthalmol* 2017;101(2):209-212

3 Furdová A, Horkovičová K, Babál P, et al. Non-Melanotic tumors of the eyelids skin and inner corner - Basocellular carcinoma. *Cesk Slov Ophthalmol* 2015;71(6):293-301

4 Yu SS, Zhao Y, Zhao H, et al. A retrospective study of 2228 cases with eyelid tumors. *Int J Ophthalmol* 2018;11(11):1835-1841

5 Iljin A, Zieliński T, Antoszewski B, et al. Clinicopathological analysis of recurrent basal cell carcinoma of the eyelid. *Postepy Dermatol Alergol* 2016;33(1):42-46

6 Ben Simon CJ, Lukovetsky S, Lavinsky F, et al. Histological and clinical features of primary and recurrent periocular Basal cell carcinoma. *ISRN Ophthalmol* 2012;2012:354829

7 Morris S, Cox B, Bosanquet N. Cost of skin cancer in England. *Eur J Health Econ* 2009;10(3):267-273

8 Sun MT, Wu A, Huilgol SC, et al. Accuracy of biopsy in subtyping periocular basal cell carcinoma. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2015;31(6):449-451

9 Celebi AR, Kiratli H, Soylemezoglu F. Evaluation of the 'Hedgehog' signaling pathways in squamous and basal cell carcinomas of the eyelids and conjunctiva. *Oncol Lett* 2016;12(1):467-472

10 Chen F, Zhuang XQ, Lin LY, et al. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med* 2015;13:45

11 Singh SR, Rameshwar P, Siegel P. Targeting tumor microenvironment in cancer therapy. *Cancer Lett* 2016;380(1):203-204

12 Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21(1):19-25

13 Fiori ME, di Franco S, Villanova L, et al. Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol Cancer* 2019;18(1):70

14 Yan Y, Chen X, Wang X, et al. The effects and the mechanisms of autophagy on the cancer-associated fibroblasts in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):171

15 Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer* 2019;18(1):63

16 Lindner T, Loktev A, Altmann A, et al. Development of quinoline-based theranostic ligands for the targeting of fibroblast activation protein. *J Nucl Med* 2018;59(9):1415-1422

17 谢立信, 李凤鸣. 中华眼科学(上册). 北京: 人民卫生出版社 2014;916-917

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

19 Kadel D, Zhang Y, Sun HR, et al. Current perspectives of cancer-

associated fibroblast in therapeutic resistance: potential mechanism and future strategy. *Cell Biol Toxicol* 2019;35(5):407-421

20 Wang RF, Sun YQ, Yu WW, et al. Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF₉ and inducing EMT. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):20

21 Buganim Y, Madar S, Rais Y, et al. Transcriptional activity of ATF₃ in the stromal compartment of tumors promotes cancer progression. *Carcinogenesis* 2011;32(12):1749-1757

22 赵佐芳, 王宁, 王大庆, 等. 眼睑基底细胞癌相关成纤维细胞与正常成纤维细胞形态与生长增殖特性差异. *眼科新进展* 2016;36(4):327-330

23 Shiga K, Hara M, Nagasaki T, et al. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)* 2015;7(4):2443-2458

24 Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α . *Science* 2010;330(6005):827-830

25 Wanganu B, Berger BW. A specific, transmembrane interface regulates fibroblast activation protein (FAP) homodimerization, trafficking and exopeptidase activity. *Biochim Biophys Acta* 2016;1858(8):1876-1882

26 Togo S, Polanska UM, Horimoto Y, et al. Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers* 2013;5(1):149-169

27 Sukowati CH, Anfusio B, Croc e LS, et al. The role of multipotent cancer associated fibroblasts in hepatocarcinogenesis. *BMC Cancer* 2015;15:188

28 Nair N, Calle AS, Zahra MH, et al. A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Sci Rep* 2017;7(1):6838

29 王晓翊, 韩方, 唐慧娟, 等. 卵巢癌相关成纤维细胞和正常卵巢成纤维细胞的基因表达差异. *中国妇幼保健* 2011;26(6):909-912

30 唐婉容, 李丽华, 喻洁, 等. TGF- β 1 对口腔鳞癌相关成纤维细胞 FAP 表达的影响. *安徽医科大学学报* 2017;52(9):1293-1297

31 Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets. *Semin Cancer Biol* 2011;21(1):35-43

32 Hosein AN, Livingstone J, Buchanan M, et al. A functional *in vitro* model of heterotypic interactions reveals a role for interferon-positive carcinoma associated fibroblasts in breast cancer. *BMC Cancer* 2015;15:130

33 Comito G, Giannoni E, Segura CP, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene* 2014;33(19):2423-2431

34 Hu CY, Wang ZC, Zhai LL, et al. Effects of cancer-associated fibroblasts on the migration and invasion abilities of SGC-7901 gastric cancer cells. *Oncol Lett* 2013;5(2):609-612

35 Nagasaki T, Hara M, Nakanishi H, et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *Br J Cancer* 2014;110(2):469-478