DOI:10.16016/j.1000-5404.201908081

FOLR1 与 MSLN 蛋白在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义

梁 振[1],董 郊[1],李凤杰[1],杨泽宇[2],王延洲[1],梁志清[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院:妇产科[1],全军临床病理学研究所,西南癌症中心[2]

[摘要] **目的** 研究 FOLR1(folate receptor 1)和 MSLN(mesothelin)在上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)中的表达和临床意义。**方法** 获取 GEO、TCGA 数据库(Ovarian Cancer TCGA, Provisional; GSE6008; GSE66957; GSE49997)EOC 临床样本信息和转录组测序表达矩阵;分析不同组织的表达情况及其与肿瘤的分期、预后的关系;收集本院 2018-2019 年 EOC(105 例)、卵巢交界性肿瘤(11 例)、正常卵巢组织(30 例);免疫组化法检测 FOLR1 和 MSLN 表达情况与卵巢癌患者临床病理特征间的关系。**结果** GEO、TCGA 数据库分析显示:EOC 组织中 FOLR1 和 MSLN mRNA 表达量明显高于正常组织($P<0.05$),Ⅲ~Ⅳ期病人表达量明显高于Ⅰ~Ⅱ期卵巢癌($P<0.05$),生存分析显示 FOLR1 高表达的患者预后好(总体生存期:$P<0.05$;无病生存期:$P<0.05$),MSLN 高表达患者预后差(总体生存期:$P<0.05$;无病生存期:$P<0.05$)。146 例卵巢组织免疫组化分析显示:FOLR1 和 MSLN 蛋白在正常卵巢组织中低表达,交界性卵巢肿瘤组织中表达上升,在 EOC 组织中表达明显升高,阳性表达率分别为 80.95%、53.33%。不同组织类型的表达具有统计学差异($P<0.001$);Ⅲ~Ⅳ期病人阳性率明显高于Ⅰ~Ⅱ期($P<0.05$);淋巴结转移的患者 MSLN 的阳性率明显升高($P<0.05$)。TCGA 数据库亚组生存分析显示在 mRNA 水平 MSLN 低表达和 FOLR1 高表达的患者(M^LF^H)预后最好,MSLN 高表达和 FOLR1 低表达的患者(M^HF^L)预后最差(中位生存期 70.57 *vs* 25.85 个月,$P<0.0001$)。相比于 M^LF^L 组,M^HF^L 组早期(<50 个月)预后较好,而超过 50 个月则生存率明显下降,但此种差异无统计学意义。**结论** FOLR1 高表达的 EOC 患者预后好,MSLN 高表达的患者预后差。两种蛋白可能共同参与了 EOC 的进程,联合检测 FOLR1 和 MSLN 两种蛋白的表达,有助于 EOC 的预后判断。

[关键词] 叶酸受体 α;间皮素;上皮性卵巢癌;生物信息学
[中图法分类号] R341;R730.23;R737.31 [文献标志码] A

Expression of folate receptor 1 and mesothelin proteins in epithelial ovarian cancer and their clinical significance

LIANG Zhen[1], DONG Jiao[1], LI Fengjie[1], YANG Zeyu[2], WANG Yanzhou[1], LIANG Zhiqing[1] [1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]Institute of Clinical Pathology, Southwest Cancer Center, First Affiliated Hospital, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of folate receptor 1(FOLR1) and mesothelin (MSLN) in epithelial ovarian cancer(EOC) and explore their clinical significance. **Methods** The data of clinical samples and transcriptome sequencing expression matrix of EOC were obtained from TCGA and GEO database(Ovarian Cancer TCGA, Provisional; GSE6008; GSE66957; GSE49997) to analyze the expressions of FOLR1 and MSLN in different tissues and their association with tumor staging and the prognosis of EOC. We also collected paraffin-embedded tissue samples of EOC (105 cases), ovarian borderline tumor (11 cases), and normal ovarian tissue(30 cases) from patients undergoing surgeries in our hospital between 2018 and 2019. The expression levels of FOLR1 and MSLN were detected by immunohistochemistry and their

[基金项目] 陆军军医大学第一附属医院重大领域技术创新计划项目(SWH2016ZDCX1013)
[通信作者] 梁志清,E-mail:zhi.lzliang@gmail.com

correlation with the clinicopathological characteristics of the patients was analyzed. **Results** Analysis of TCGA and GEO databases showed that the mRNA levels of FOLR1 and MSLN were significantly higher in EOC tissues than in normal ovarian tissues ($P<0.05$), and was also higher in stage Ⅲ ~ Ⅳ than in stage Ⅰ ~ Ⅱ EOC ($P<0.05$). Survival analysis showed that the patients with a high expression of FOLR1 had significantly longer overall survival ($P<0.05$) and disease-free survival ($P<0.05$), while the patients with a high expression of MSLN had significantly shortened overall survival ($P<0.05$) and disease-free survival ($P<0.05$). Immunohistochemical analysis showed that FOLR1 and MSLN proteins were lowly expressed in normal ovarian tissues, and their expressions increased moderately in borderline ovarian tumor and significantly in EOC tissues. The positive expression rates of FOLR1 and MSLN in EOC were 80.95% and 53.33%, respectively. The levels were of FOLR1 and MSLN differed significantly in different tissue types ($P<0.001$), and their positive rates were significantly higher in stage Ⅲ ~ Ⅳ than in stage Ⅰ ~ Ⅱ EOC ($P<0.05$). The positive rate of MSLN was significantly increased in patients with lymph node metastasis ($P<0.05$). Subgroup survival analysis of TCGA database showed that patients with a low MSLN expression and a high FOLR1 expression (M^LF^H) at the mRNA level had the best prognosis, while those with a high MSLN expression and a low FOLR1 expression (M^HF^L) had the worst prognosis (median survival time 70.57 *vs* 25.85 months, $P<0.000\ 1$); compared with the M^LF^L patients, the M^HF^L patients in the early stage (<50 months) had a better prognosis, while beyond 50 months, the survival rate of the patients decreased, but the difference was not statistically significant. **Conclusion** In patients with EOC, a high expression of FOLR1 indicates a more favorable prognosis while a high expression of MSLN is associated with a poor prognosis. These 2 proteins may participate in the process of EOC, and their combined detection may help in prognostic evaluation of EOC.

[**Key words**] folate receptor 1; mesothelin; epithelial ovarian cancer; bioinformatics

Supported by the project for Technology Innovation in Important Fields of the First Affiliated Hospital of Army Medical Univeristy (SWH2016ZDCX1013).
Corresponding author: LIANG Zhiqing, E-mail: zhi.lzliang@gmail.com

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)的死亡率位于女性生殖系统3大恶性肿瘤的首位。由于其发病隐匿,70%的患者就诊时即为晚期并伴有远处转移[1]。一线治疗后缓解的患者中,有55%~75%在2年内复发,并且复发后缺乏有效的治疗手段[2]。因此,寻找有效的生物标志物并研究其在卵巢癌发展中的作用,对卵巢癌的预防、早期诊断和设计新的治疗策略具有重要意义。叶酸受体α是FOLR1(folate receptor 1)基因的编码产物,表达于多种上皮源性肿瘤的细胞膜上,属于叶酸受体(FR)的一种。研究表明,FR的表达受细胞的生长速度调节,细胞增殖速率下降则FR的表达增加[3],但是FOLR1在卵巢癌中高表达的机制仍不清楚,其在卵巢癌发生、发展中的作用存在争议[4]。间皮素(mesothelin, MSLN)是一种40×10^3的蛋白质,通过糖基磷脂酰肌醇附着在细胞膜上,在肺癌、间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌和乳腺癌等各种实体瘤中高表达[5],既往研究认为间皮素与细胞粘附有关,有报道称间皮素与CA125共同作用促进了卵巢癌的转移[6]。DAINTY等[7]通过q-PCR的方法检测FOLR1与MSLN共表达于子宫内膜癌中($P=0.014$),其蛋白表达阳性率分别为23/48(48%)和17/54(32%)。但目前关于FOLR1与MSLN在EOC发病中相互作用以及联合检测两者来判断EOC患者的预后研究尚少见报道,故本研究对FOLR1与MSLN在EOC中表达及临床意义进行探索,旨在为卵巢癌的诊断、治疗和预后判断提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

1.1.1 GEO(Gene Expression Omnibus)、TCGA(Cancer Genome Atlas)数据库下载FOLR1和MSLN基因表达谱 下载EOC数据集(Ovarian Cancer TCGA, Provisional; GSE6008; GSE66957; GSE49997)(www.cbioportal.org; www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/)的表达谱(数据通过log2标准化)和临床病理参数。

1.1.2 FOLR1和MSLN在EOC与正常组织的表达差异以及与分期的关系 获取GSE6008(n=103)、GSE66957(n=69)数据集中EOC和正常卵巢组织基因表达谱信息;利用R语言进行基因ID转换,并绘制表达差异图;利用TCGA(n=256)、GSE49997(n=194)数据集进一步分析FOLR1和MSLN在EOC中的分期差异。

1.1.3 Kaplan-Meier 生存曲线分析 整理 TCGA 中包含总体生存期(overall survival, OS)和无病生存期(disease-free survival, DFS)EOC 患者的临床病理信息;按照是否发生终点事件(复发/进展或死亡)分为无事件组和事件组,以 1-特异度为横坐标,灵敏度为纵坐标绘制 ROC 曲线,以最大约登值(灵敏度+特异度-1)为 cut-off 值,以此为临界值判断 mRNA 高表达和低表达患者。同时,为了研究 FORL1 和 MSLN 在 EOC 总体生存期上可能存在的交互影响,通过 TCGA 数据库对这两个基因进行 mRNA 水平的亚组生存分析,利用约登指数最大值对应的表达量作为 Cut-off 值。

1.2 材料

1.2.1 组织标本 收集 2018 年 4 月至 2019 年 7 月陆军军医大学第一附属医院生物样本库经病理学检查证实的石蜡包埋组织标本 146 例,其中正常卵巢组织标本 30 例、交界性卵巢肿瘤组织标本 11 例及 EOC 组织标本 105 例。105 例 EOC 患者中,年龄 28~79 岁,平均 51 岁,其中≤50 者 48 例(45.71%),>50 岁者 57 例(54.29%),浆液性卵巢癌 73 例(69.5%),黏液性卵巢癌 11 例(10.5%),透明细胞癌 10 例(9.5%),子宫内膜样癌 11 例(10.5%);高分化卵巢癌 12 例(11.4%),中低分化卵巢癌 93 例(88.6%);按国际妇产科联盟 2009 年 FIGO(Federation International of Gynecology and Obstetrics)分期,Ⅰ~Ⅱ期 25 例(23.8%),Ⅲ~Ⅳ期 80 例(76.2%);无淋巴结转移 73 例(69.5%),有淋巴结转移 32 例(30.5%)。本研究经伦理委员会批准(批件号:KY201843)。

1.2.2 仪器及试剂 兔抗人单克隆 FOLR1 抗体购自英国 Abcam 公司,鼠抗人多克隆 MSLN 抗体购自美国 Invitrogen 公司;光学显微镜 BX40 购自日本奥林巴斯公司,牛血清白蛋白(BSA)、PBS 缓冲粉剂、苏木精染色液购自北京中杉金桥,二甲苯、30%过氧化氢、无水乙醇、中性树胶封片试剂购自重庆川东化工,鼠兔通用型免疫组化试剂盒(Envision 法,鼠/兔)购自丹麦 DAKO 公司。

1.3 免疫组织化学染色、图像采集及分析

①脱蜡:组织置于 60 ℃烤片 90 min,按标准流程进行脱蜡。②阻断:3%过氧化氢阻断液室温放置 20 min。③修复:切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中进行热修复。④BSA 封闭,37 ℃封闭 45 min。⑤滴加足量 FOLR1 和 MLSN 一抗工作液(FOLR1 稀释比 1∶100;MSLN 稀释比 1∶10),4 ℃过夜。⑥PBS 溶液洗涤 6 min/次×3 次,滴足量加鼠兔通用二抗覆盖组织,37 ℃孵育 60 min。⑦弃二抗,PBS 洗 6 min/次×5 次,DAB 显色。⑧苏木素染核。⑨脱水,二甲苯透明,中性树胶进行封片。每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,胞膜着色提示蛋白表达。根据染色强度将未着色、浅黄色、棕黄色、棕褐色分别计为 0 分、1 分、2 分、3 分;再根据染色阳性率将无阳性细胞、1%~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100%分别计为 0 分、1 分、2 分、3 分、4 分;将染色强度与染色阳性率评分的乘积作为最终分数,0~4 分为蛋白表达阴性(-),>4 分为蛋白表达阳性(+)。

1.4 统计学分析

利用 Graphpad Prism 7.0 软件对样本表达量进行两独立样本 t 检验,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,生存情况用中位生存期表示;Kaplan-Meier 生存分析采用 Log Rank 检验。采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率进行计数资料组间比较,检验水准:$\alpha=0.05$。

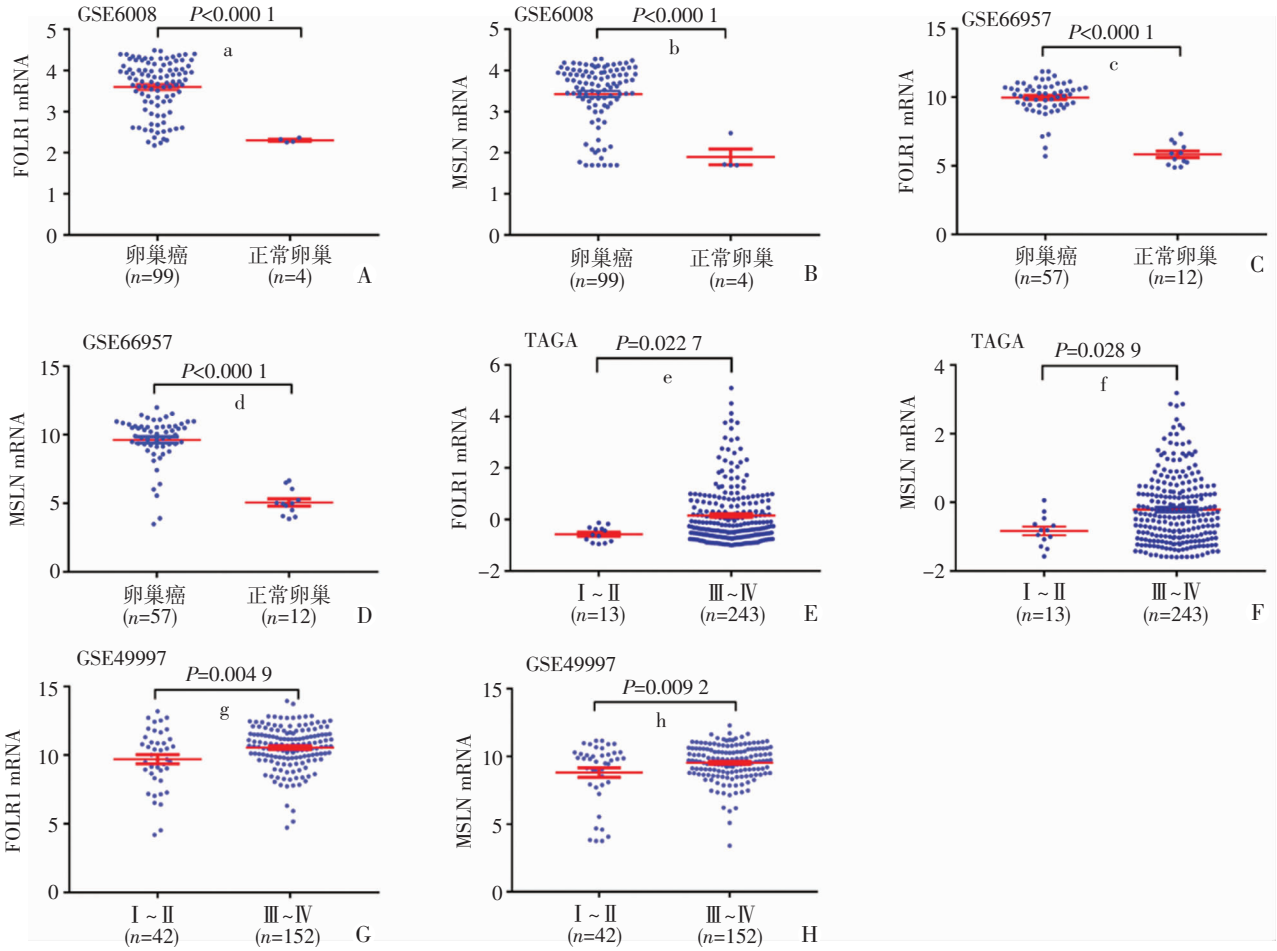
2 结果

2.1 TCGA、GEO 数据库分析 FOLR1 和 MSLN 在正常卵巢和 EOC 中表达与分期的关系

利用 GEO 数据集 GSE6008 和 GSE66957 分析 FOLR1 和 MSLN 在正常卵巢组织和 EOC 组织中的表达情况,相较于正常卵巢上皮,EOC 组织中 FOLR1($P<0.000\ 1$)和 MSLN($P<0.000\ 1$)mRNA 表达水平明显增高(图 1A、B、C、D)。TCGA 数据库和 GSE49997 分析显示中晚期(Ⅲ~Ⅳ期)患者的 FOLR1 和 MSLN 基因的表达水平明显高于早期(Ⅰ~Ⅱ期)患者(图 1E、F、G、H),提示 FOLR1 和 MSLN 可能与 EOC 的发生、发展有关。

2.2 FOLR1 高表达患者预后好,MSLN 高表达患者预后不良

以 TCGA 数据库(Ovarian Cancer TCGA, Provisional)中 FOLR1 和 MSLN mRNA 的表达进行生存分析。相比于 FOLR1 低表达患者,FOLR1 高表达患者预后好(中位生存时间:51.87 *vs* 35.55 个月,$P=0.000\ 3$;中位无病生存时间:18.89 *vs* 13.24 个月,$P=0.002$,图 2A、C)。相反,MSLN 水平越高,患者生存率越差(中位生存时间:47.5 *vs* 64.95 个月,$P=0.010\ 5$;中位无病生存时间:16.1 *vs* 21.29 个月,$P=0.010\ 2$,图 2 B、D)。



A:FOLR1 在 EOC 和正常卵巢中的表达　a:$P<0.000\ 1$,与正常卵巢比较;B:MSLN 在 EOC 和正常卵巢中的表达　b:$P<0.000\ 1$,与正常卵巢比较;C:FOLR1 在 EOC 和正常卵巢中的表达　c:$P<0.000\ 1$,与正常卵巢比较;D:MSLN 在 EOC 和正常卵巢中的表达　d:$P<0.000\ 1$,与正常卵巢比较;E:FOLR1 在不同分期 EOC 中的表达　e:$P=0.022\ 7$,与Ⅰ~Ⅱ期比较;F:MSLN 在不同分期 EOC 中的表达　d:$P=0.028\ 9$,与Ⅰ~Ⅱ期比较;G:FOLR1 在不同分期 EOC 中的表达　g:$P=0.004\ 9$,与Ⅰ~Ⅱ期比较;H:MSLN 在不同分期 EOC 中的表达　h:$P=0.009\ 2$,与Ⅰ~Ⅱ期比较

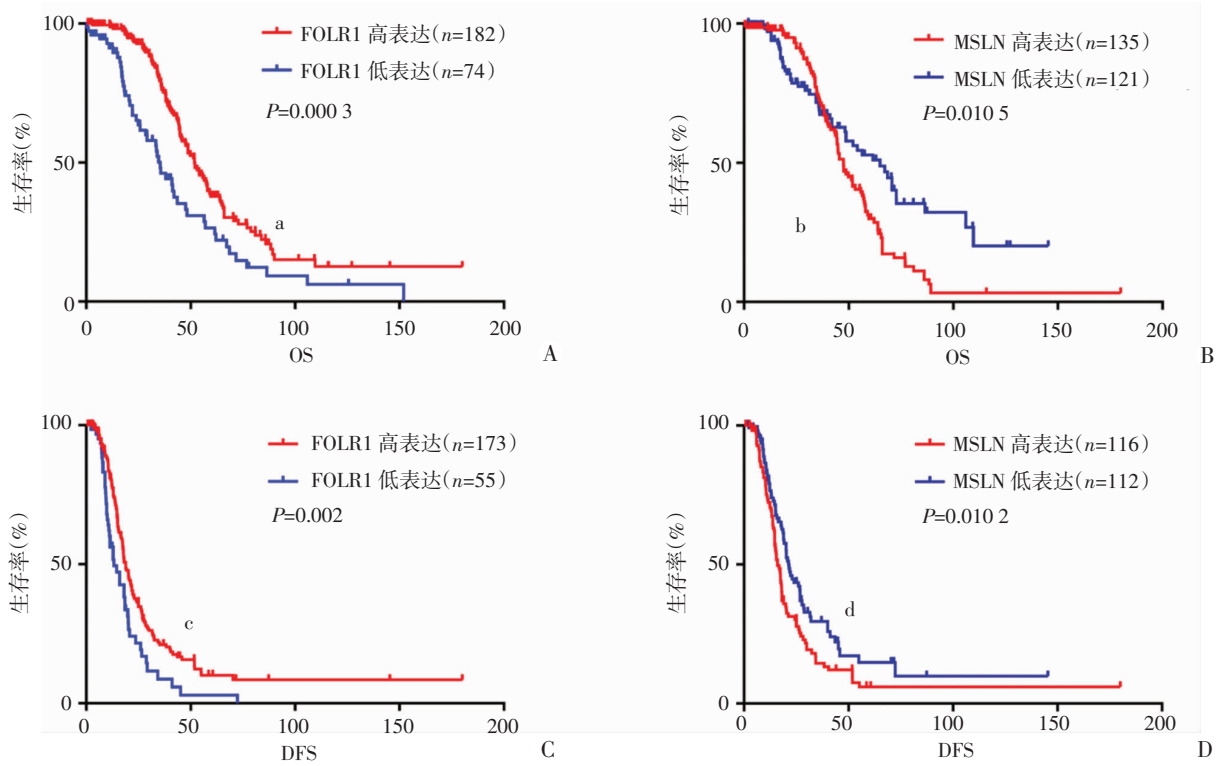
图 1　利用 GEO、TCGA 数据库分析 FOLR1 和 MSLN 在不同组织和不同分期的 EOC 组织中的表达

2.3　FOLR1 与 MSLN 蛋白在不同卵巢组织中的表达

对不同卵巢组织进行 FOLR1 与 MSLN 免疫组化染色,发现 FOLR1 和 MSLN 在正常卵巢组织中低表达,在交界性卵巢癌中表达升高,而在 EOC 组织中阳性率明显升高(图 3)。利用卡方检验对 3 组卵巢石蜡切片组织中 FOLR1 蛋白的表达进行分析,发现 FOLR1 蛋白表达从正常卵巢组织、交界性卵巢肿瘤组织到 EOC 组织呈逐渐增加,FOLR1 蛋白阳性表达率为 80.95%(85/105),显著高于交界性卵巢癌 9.09%(1/11)及正常卵巢组织 3.33%(1/30)($P<0.001$,表 1)。同样地,MSLN 蛋白在正常卵巢组织、交界性卵巢肿瘤组织及 EOC 组织中的阳性表达率也呈逐渐升高的趋势($P<0.001$),MSLN 蛋白阳性表达率为 53.33%(56/105),显著高于交界性卵巢癌 18.18%(2/11)及正常卵巢组织 0.00%(0/30)($P<0.001$,表 1)。

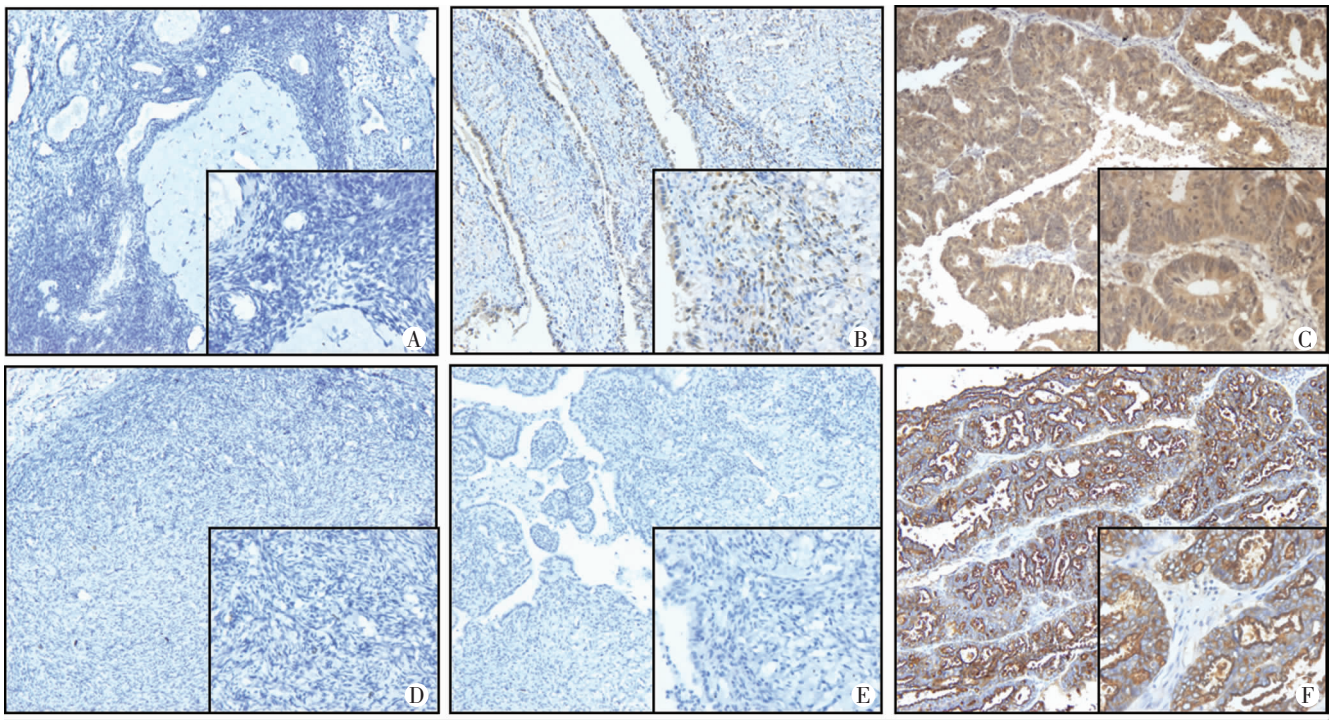
2.4　FOLR1 与 MSLN 蛋白表达与上皮性卵巢癌临床病理特征的关系

为明确 FOLR1、MSLN 和患者临床病理参数之间的相关性,进一步利用卡方检验分析相同视野下上皮性卵巢癌中两种蛋白表达与患者临床病理特征之间的关系,由表 2 可见,FOLR1 蛋白在Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌中阳性表达率高于Ⅰ~Ⅱ期;但不同年龄、病理类型、分化程度、有无淋巴结转移患者的 FOLR1 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。MSLN 蛋白在Ⅲ~Ⅳ期卵巢癌中阳性表达率高于Ⅰ~Ⅱ期;在有淋巴结转移的患者中阳性表达率明显高于无淋巴结转移者($P=0.000$);不同组织类型间的表达有差异($P=0.008$);不同年龄、分化程度患者的 MSLN 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。



A:FOLR1 与 EOC 总体生存期相关性 a:$P=0.000\ 3$,与 FOLR1 低表达患者比较;B:MSLN 与 EOC 总体生存期相关性 b:$P=0.010\ 5$,与 MSLN 低表达患者比较;C:FOLR1 与 EOC 无进展生存期相关性 c:$P=0.002$,与 FOLR1 低表达患者比较;D:MSLN 与 EOC 无进展生存期相关性 d:$P=0.010\ 2$,与 MSLN 低表达患者比较

图 2 基于 TCGA 数据库中 FOLR1 和 MSLN 表达差异的 Kaplan-Meier 生存曲线分析



A:FOLR1 在正常卵巢组织中的表达;B:FOLR1 在交界性卵巢肿瘤组织中的表达;C:FOLR1 在 EOC 中的表达;D:MSLN 在正常卵巢组织中的表达;E:MSLN 在交界性卵巢肿瘤组织中的表达;F:MSLN 在 EOC 中的表达;右下框(Envision ×400)

图 3 免疫组织化学检测 FOLR1 和 MSLN 在不同卵巢组织中的表达(Envision ×100)

表 1 FOLR1 和 MSLN 蛋白在 146 例不同卵巢组织中的表达

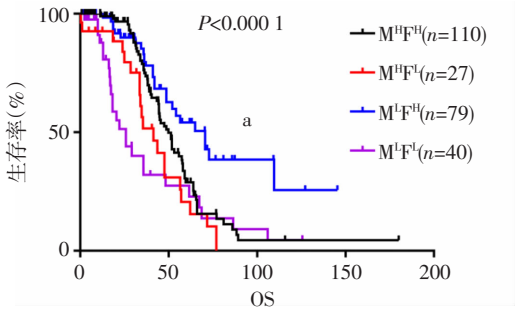
卵巢组织	例数	FOLR1				MSLN			
		阳性	阴性	阳性率	*P* 值	阳性	阴性	阳性率	*P* 值
正常卵巢	30	1	29	3.33%	<0.001	0	30	0%	<0.001
交界性	11	1	10	9.09%		2	9	18.18%	
上皮性卵巢癌	105	85	20	80.95%		56	49	53.33%	

表 2 105 例上皮性卵巢癌患者 FOLR1 和 MSLN 表达与临床病理参数的关系

临床病理参数	FOLR1 表达(n=105)			MSLN 表达(n=105)		
	阳性	阴性	*P* 值	阳性	阴性	*P* 值
年龄			0.669			0.582
≤50	38(36.19%)	10(9.52%)		27(25.71%)	21(20.00%)	
>50	47(44.77%)	10(9.52%)		29(27.62%)	28(26.67%)	
组织类型			0.904			0.008*
浆液性	60(57.14%)	13(12.38%)		47(44.76%)	26(24.76%)	
粘液性	9(8.58%)	2(1.90%)		3(2.86%)	8(7.62%)	
透明细胞癌	8(7.62%)	2(1.90%)		3(2.86%)	7(6.66%)	
子宫内膜样癌	8(7.62%)	3(2.86%)		3(2.86%)	8(7.62%)	
分化程度			0.289			0.389
高分化	8(7.62%)	4(3.81%)		5(4.76%)	7(6.67%)	
低-中分化	78(74.29%)	15(14.28%)		51(48.57%)	42(40.00%)	
FIGO 分期			3.87×10^{-9}*			2.58×10^{-5}*
Ⅰ~Ⅱ	11(10.48%)	16(15.24%)		5(4.76%)	22(20.95%)	
Ⅲ~Ⅳ	74(70.47%)	4(3.81%)		51(48.57%)	27(25.72%)	
淋巴结转移			0.19			0.000*
有	28(26.67%)	3(2.86%)		25(23.81%)	6(5.72%)	
无	57(54.28%)	17(16.19%)		31(29.52%)	43(40.95%)	

2.5 TCGA 数据库中 FOLR1 与 MSLN 表达的亚组生存分析

为了探索 FORL1 和 MSLN 在上皮性卵巢癌总体生存期上可能存在的交互作用,通过 TCGA(ovarian cancer TCGA, Provisional)数据库对这两个预后标志物进行了 mRNA 水平的亚组生存分析,利用约登指数最大值对应的表达量作为 Cut-off 值。结果显示 M^LF^L 组和 M^HF^L 组存在明显交叉,早期(<50 个月)M^HF^L 组的预后较好,而超过 50 个月则生存率下降明显,但这种差异无统计学意义(P>0.05)。这可能与 M^HF^L 组晚期淋巴结转移有关。此外,MSLN 低表达和 FOLR1 高表达的患者(M^LF^H)预后最好,MSLN 高表达和 FOLR1 低表达的患者(M^HF^L)预后最差(中位生存期 70.57 *vs* 25.85 个月,P<0.000 1,图 4),提示 FOLR1 的高表达可能有助于上皮性卵巢癌患者预后改善。



a:P<0.0001,与 M^HF^L 组比较

图 4 FOLR1 和 MSLN 不同表达水平的亚组生存分析

3 讨论

叶酸受体 α 由 FOLR1 基因编码,是一种通过糖基磷脂酰肌醇偶联于细胞膜表面的单链糖蛋白,可将叶酸结合并转运到细胞中。FOLR1 显著表达于许多恶性肿瘤细胞(如宫颈癌、肝癌、子宫内膜癌等)的基底

膜和侧膜上。既往研究认为肿瘤细胞可通过上调FORL1增加对叶酸的摄取,促进DNA合成以保证肿瘤细胞快速增殖的需要[8]。但尚有研究表明,相较于还原型叶酸受体(reduced folate carrier, RCF),FOLR1对叶酸的亲和力较低[9],因而FOLR1所介导的叶酸摄取过程效率较低[10],这提示FOLR1在肿瘤中高表达的作用可能并非促进叶酸的摄取来提高其增殖率。与以往的研究一致,生物信息学分析和临床样本免疫组化染色均提示FOLR1在EOC中表达高于正常卵巢组织($P<0.001$),且Ⅲ~Ⅳ期患者的表达量明显高于Ⅰ~Ⅱ期卵巢癌($P<0.001$),提示FOLR1可能参与了EOC的进展[11],进一步的生存分析结果提示FOLR1高表达有利于患者的预后,这与以往的报道不同,因为FOLR1在肿瘤发生、发展及预后中的作用尚存在许多争议[12]。

一方面,早期的研究称FOLR1高表达与卵巢癌的复发和总体生存率无关[11],也有研究表明在浆液性卵巢癌中FOLR1的高表达是无病生存期($P=0.02$)和化疗反应($P=0.021$)的独立不良预后因素[13]。此外,SIU等[12]的研究发现叶酸可以诱导卵巢肿瘤细胞(skov-3)的增殖、迁移和侵袭,而FOLR1的高表达与总体生存期或无病生存期无关。在另一方面,最近的一项研究表明,FOLR1的高表达增加了卵巢癌细胞对顺铂治疗的敏感性[14],这有可能与改善患者预后相关。对于以往报道的不一致,可能存在以下几点原因:①以往研究的样本量偏小,可能产生误差。②研究种族的不同也可能是报道不一致的原因之一。③这些流行病学研究结果都缺乏对机制的探索。对此,基于目前的TCGA大样本分析,结合最新报道的机制研究(FOLR1增加顺铂敏感性),我们认为FOLR1高表达是卵巢的有利预后因素,原因可能在于:FOLR1高表达的患者,化疗敏感性增加,从而预后得到改善。当然,其具体机制需要进一步研究阐明。

MSLN基因位于染色体16p13.3,含有17个外显子,编码628个氨基酸,在细胞内首先翻译为72×10^3前体蛋白,然后被furin蛋白酶水解剪接为两部分,羧基末端的疏水序列被糖基磷脂酰肌醇取代并偶联于细胞膜上,称为间皮素(40×10^3),33×10^3的氨基端脱落片段释放入血,称为巨核细胞增强因子(MPF)[15]。CHANG等[16]研究证明MSLN可通过MAPK/ERK和JNK通路上调MMP-7,从而增强卵巢癌细胞的侵袭能力。此外,在化疗患者中,MSLN还可以通过PI3K/AKT和MAPK/ERK信号通路诱导卵巢癌细胞对紫杉醇产生耐药[17]。与以往的研究结果一致,本研究发现从正常组织、交界性肿瘤到卵巢癌,MSLN的mRNA和蛋白的相对表达量呈逐渐上升,且MSLN高表达的患者FIGO分期晚、淋巴结转移率高[18-19]。发生淋巴结转移的EOC患者中,MSLN的表达量明显增加,这提示MSLN可能与卵巢癌的淋巴转移相关,进一步生存分析提示MSLN是卵巢癌的一个重要不良预后因素。因此,抑制MSLN的表达,可能是减缓卵巢癌侵袭和耐药的一个重要努力方向。

MSLN与FOLR1的关系以及两者对预后的影响缺乏深入研究,在子宫内膜癌差异基因的研究中,DAINTY等[7]发现FOLR1高表达的患者,MSLN的mRNA表达也显著上调($P=0.014$),提示二者可能存在共表达关系。为明确卵巢癌患者中MSLN与FOLR1在总体生存期上可能存在的交互关系,我们联合MSLN与FOLR1对患者进行亚组生存分析,发现在mRNA水平M^HF^L组早期(<50个月)预后较好,而超过50个月生存率则明显下降,其原因可能是由于MSLN高表达的患者晚期淋巴结转移率较高所致(表2,$P<0.001$),也有可能与这部分患者早期化疗敏感有关,但数据库中缺乏这一部分数据,因此有待未来进一步研究。此外,MSLN低表达和FOLR1高表达的患者(M^LF^H)预后最好,而M^HF^L组预后最差(中位生存期70.57 *vs* 25.85个月,$P<0.0001$),这对卵巢癌患者生存状态具有重要预测意义。同时,根据生存分析结果:M^HF^H组的预后明显优于M^HF^L组(图4),推测在卵巢癌发生、发展过程中,FOLR1可能部分抑制了MSLN对肿瘤细胞恶性表型的促进作用,但这种推测和其内在调控机制尚有待进一步研究和证实。

本研究不足之处在于仅探讨了mRNA水平FOLR1及MSLN对卵巢癌预后的影响,缺乏蛋白水平的预后影响、不同患者的化疗敏感性数据以及深入的机制研究。今后可进一步利用基因敲除等手段干预卵巢癌细胞系中FOLR1和MSLN的表达,明确FOLR1和MSLN之间的相互作用,以及对卵巢癌细胞生物学功能的影响。此外对患者生存、化疗耐药情况进行随访,明确FOLR1和MSLN在蛋白水平的表达与预后和化疗的关系,并结合RNA-seq等方法寻找影响FOLR1和MSLN表达的核心转录因子,以探讨卵巢癌中FOLR1和MSLN表达变化的原因。

综上所述,FOLR1高表达是上皮性卵巢癌预后的有利因素,MSLN高表达是患者预后的不良因素。通过联合检测FOLR1和MSLN两种蛋白的表达,有助于EOC患者的预后判断,两种蛋白可能共同参与了EOC的发展过程,有望作为EOC临床预后辅助预测指标。

参考文献:

[1] TIMMERMANS M, SONKE G S, VAN DE VIJVER KK,

et al. No improvement in long-term survival for epithelial ovarian cancer patients: A population-based study between 1989 and 2014 in the Netherlands[J]. Eur J Cancer, 2018, 88: 31-37. DOI:10.1016/j.ejca.2017.10.030.

[2] MORRISON J, THOMA C, GOODALL R J, *et al*. Epidermal growth factor receptor blockers for the treatment of ovarian cancer[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2018, 10: CD007927. DOI:10.1002/14651858.CD007927.pub4.

[3] DOUCETTE MM, STEVENS V L. Folate receptor function is regulated in response to different cellular growth rates in cultured mammalian cells[J]. J Nutr, 2001, 131(11): 2819-2825. DOI: 10.1093/jn/131.11.2819.

[4] SIU M K, KONG D S, CHAN H Y, *et al*. Paradoxical impact of twofolate receptors, FRα and RFC, in ovarian cancer: effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e47201. DOI: 10.1371/journal.pone.0047201.

[5] ZHENJIANG L, RAO M, LUO X H, *et al*. Mesothelin-specific immune responses predict survival of patients with brain metastasis[J]. EBioMedicine, 2017, 23: 20-24. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.08.024.

[6] SASAKI A, AKITA K, ITO F, *et al*. Difference inmesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2015, 136(8): 1985-1990. DOI: 10.1002/ijc.29185.

[7] DAINTY L A, RISINGER J I, MORRISON C, *et al*. Overexpression offolate binding protein and mesothelin are associated with uterine serous carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2007, 105(3): 563-570. DOI: 10.1016/j.ygyno.2006.10.063.

[8] LIU Z B, JIN X, PI W, *et al*. Folic acid inhibits nasopharyngeal cancer cell proliferation and invasion via activation of FRα/ERK1/2/TSLC1 pathway[J]. Biosci Rep, 2017, 37(6): BSR20170772. DOI: 10.1042/BSR20170772.

[9] VERGOTE I B, MARTH C, COLEMAN R L. Role of thefolate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications[J]. Cancer Metastasis Rev, 2015, 34(1): 41-52. DOI: 10.1007/s10555-014-9539-8.

[10] KAMEN B A, SMITH A K. A review offolate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56(8): 1085-1097. DOI: 10.1016/j.addr.2004.01.002.

[11] HEKMAN M C H, BOERMAN O C, BOS D L, *et al*. Improved intraoperative detection of ovarian cancer byfolate receptor alpha targeted dual-modality imaging[J]. Mol Pharm, 2017, 14(10): 3457-3463. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00464.

[12] SIU M K, KONG D S, CHAN H Y, *et al*. Paradoxical impact of twofolate receptors, FRα and RFC, in ovarian cancer: effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e47201. DOI: 10.1371/journal.pone.0047201

[13] CHEN Y L, CHANG M C, HUANG C Y, *et al*. Serous ovarian carcinoma patients with high alpha-folate receptor had reducing survival and cytotoxic chemo-response[J]. Mol Oncol, 2012, 6(3): 360-369. DOI: 10.1016/j.molonc.2011.11.010.

[14] HUANG M J, ZHANG W, WANG Q, *et al*. FOLR1 increases sensitivity tocisplatin treatment in ovarian cancer cells[J]. J Ovarian Res, 2018, 11(1): 15. DOI: 10.1186/s13048-018-0387-y.

[15] PASTAN I, HASSAN R. Discovery ofmesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy[J]. Cancer Res, 2014, 74(11): 2907-2912. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0337.

[16] CHANG M C, CHEN C A, CHEN P J, *et al*. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways[J]. Biochem J, 2012, 442(2): 293-302. DOI: 10.1042/BJ20110282.

[17] CHANG M C, CHEN C A, HSIEH C Y, *et al*. Mesothelin inhibits paclitaxel-induced apoptosis through the PI3K pathway[J]. Biochem J, 2009, 424(3): 449-458. DOI: 10.1042/BJ20082196.

[18] CHENG W F, HUANG C Y, CHANG M C, *et al*. Highmesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma[J]. Br J Cancer, 2009, 100(7): 1144-1153. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604964.

[19] HANAOKA T, HASEGAWA K, KATO T, *et al*. Correlation between tumormesothelin expression and serum mesothelin in patients with epithelial ovarian carcinoma: A potential noninvasive biomarker for mesothelin-targeted therapy[J]. Mol Diagn Ther, 2017, 21(2): 187-198. DOI: 10.1007/s40291-017-0255-2.

(收稿:2019-08-12;修回:2019-10-30)

(编辑 王 红)