

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.02.010

论著·临床研究

## 原癌基因 Fra-1 在肾母细胞瘤患儿血液中的表达及其意义

程永凤<sup>1</sup> 王学梅<sup>1</sup> 严媚<sup>1</sup> 肖钧刚<sup>2</sup>

(1. 新疆医科大学第一附属医院儿科中心, 新疆 乌鲁木齐 830054;  
2. 新疆乌鲁木齐武警新疆总队医院儿科, 新疆 乌鲁木齐 830000)

**[摘要]** **目的** 探讨原癌基因 Fra-1 在肾母细胞瘤患儿血液中的表达及其意义。**方法** 选取 2012 年 12 月至 2018 年 1 月病理明确诊断为肾母细胞瘤的患儿作为病例组 ( $n=50$ ), 健康体检儿童作为对照组 ( $n=40$ ); 获得随访的 45 例患儿中, 将持续缓解患儿纳入理想疗效组 ( $n=33$ ), 复发、转移或死亡患儿纳入疗效不佳组 ( $n=12$ )。采集所有研究对象外周血, 通过实时荧光定量 PCR 检测 Fra-1 mRNA 表达水平。**结果** 肾母细胞瘤患儿血液中 Fra-1 mRNA 相对表达量明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。Fra-1 mRNA 的表达水平在肾母细胞瘤是否远处转移及 TNM 分期间比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 而在患儿的性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤位置及不同甲胎蛋白 (AFP) 水平间比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。理想疗效组 Fra-1 mRNA 相对表达量低于疗效不佳组 ( $P<0.05$ )。**结论** Fra-1 可能参与肾母细胞瘤的形成, 并在其发展、侵袭及转移中起一定作用, 但具体机制仍有待深入研究。  
**[中国当代儿科杂志, 2019, 21(2): 161-164]**

**[关键词]** 肾母细胞瘤; Fra-1; 预后; 儿童

### Expression of the Fra-1 gene in the peripheral blood of children with Wilms tumor

CHENG Yong-Feng, WANG Xue-Mei, YAN Mei, XIAO Jun-Gang. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Yan M, Email: 13669901666@163.com)

**Abstract: Objective** To study the expression of the Fra-1 gene in the peripheral blood of children with Wilms tumor and its clinical significance. **Methods** Fifty children pathologically diagnosed with Wilms tumor between December 2012 and January 2018 were enrolled as the case group, and 40 healthy children for physical examination were selected as the control group. Among the 45 children with Wilms tumor who were followed up, the children with continuous remission were included in the ideal efficacy group ( $n=33$ ), and those with recurrence, metastasis or death were included in the poor efficacy group ( $n=12$ ). Peripheral blood samples were collected from all subjects. Quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of Fra-1. **Results** The case group had significantly higher mRNA expression of Fra-1 in peripheral blood than the control group ( $P<0.05$ ). In the case group, Fra-1 mRNA expression was significantly different between the individuals with and without distant metastasis and those with different TNM stages ( $P<0.05$ ), but was not significantly different between the individuals with different sexes, ages, tumor diabetes, tumor locations and alpha-fetoprotein levels ( $P>0.05$ ). The mRNA expression of Fra-1 was significantly lower in the ideal efficacy group than in the poor efficacy group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Fra-1 may be involved in the development of Wilms tumor and plays a certain role in its development, invasion and metastasis, but the mechanism remains to be further studied.  
**[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(2): 161-164]**

**Key words:** Wilms tumor; Fra-1; Prognosis; Child

[收稿日期] 2018-08-30; [接受日期] 2019-01-07

[作者简介] 程永凤, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 严媚, 女, 主任医师。Email: 13669901666@163.com。

肾母细胞瘤又称 Wilms 肿瘤或肾胚胎瘤,是婴幼儿时期最常见的泌尿生殖器恶性肿瘤,占儿童肾脏恶性肿瘤的 90% 以上<sup>[1]</sup>,发病高峰年龄在 4 岁以下<sup>[2]</sup>,年发病率约为 7/100000<sup>[3]</sup>,在患儿中多以腹部肿块、血尿等表现就诊。肾脏胚胎发育是一个复杂的过程,受转录因子、原癌基因及生长因子等调控,因而肾母细胞瘤的发生是多病因、多基因、多阶段性的,其基因表达、细胞信号转导通路等与肾母细胞瘤的发生、发展及预后密切相关。国际上有关儿童实体瘤的诊断治疗技术进展很快,近 20 年肾母细胞瘤的预后得到了很大的改善,目前总体生存率已超过 90%<sup>[4]</sup>。新疆是儿童肾母细胞瘤高发地区之一,由于地域、经济及医疗状态等限制,导致本地区儿童肾母细胞瘤初诊时体积均较大,位于 National Wilms Tumor Study Group (NWTSG) 和 International Society of Pediatric Oncology (SIOP) 分期的 III、IV 和 V 期。因此对相关基因的研究,在肾母细胞瘤的早期诊断、个体化治疗、改善预后等方面具有重要意义。本课题组前期对新疆维吾尔族三胞胎(1 例患肾母细胞瘤,2 例未患肾母细胞瘤)儿童血液样本进行 RNA-seq 分析,最终获得 199 个上调表达差异基因以及 250 个下调表达差异基因,其中 Fra-1 基因在肾母细胞瘤患儿中明显高于 2 例非肾母细胞瘤同胞,由此可见,Fra-1 基因与肾母细胞瘤可能存在某种内在联系。因此,本实验通过实时荧光定量 PCR 检测 Fra-1 在肾母细胞瘤患儿和正常儿童血液中的表达差异,以及 Fra-1 在肾母细胞瘤患儿理想疗效组(持续缓解)和疗效不佳组(转移、复发或死亡)的表达差异,探讨 Fra-1 在儿童肾母细胞瘤的表达及其意义,为后续临床治疗实践提供参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象及分组

选取 2012 年 12 月至 2018 年 1 月新疆医科大学第一附属医院收治的肾母细胞瘤患儿 50 例作为病例组,其中男 23 例,女 27 例,平均年龄  $34.8 \pm 21.3$  个月,所有患儿活检标本均经病理检查明确诊断为肾母细胞瘤;选取同期健康体检儿童 40 例作为对照组,其中男 22 例,女 18 例,平均

年龄  $38.6 \pm 22.6$  个月。

纳入标准:(1)病理明确诊断为肾母细胞瘤的患儿;(2)年龄 28 d 至 14 岁;(3)无既往肿瘤发病史及其他恶性疾病;(4)手术前及采血前均未进行化疗、放疗、生物治疗等治疗;(5)均获得监护人知情同意书。

排除标准:(1)既往有肿瘤病史和有其他部位转移的肿瘤;(2)伴有严重或严重未能控制疾病者;(3)未获得监护人知情同意;(4)接受过其他研究性药物治疗。

### 1.2 主要试剂

TRIzol 试剂由美国 Invitrogen 公司生产;红细胞裂解液由上海索来宝生物科技有限公司生产;逆转录试剂盒及 RNA 提取试剂盒由美国 Invitrogen 公司生产;定量 PCR 试剂盒由美国 Roche 公司生产;qRT-PCR 仪由美国 Bio-RAD 公司生产;内参照 GAPDH 及目的基因引物均购于上海生工生物工程有限公司。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 检测 Fra-1 mRNA 表达

采集两组儿童清晨空腹外周血 3 mL,迅速将标本置入  $-80^{\circ}\text{C}$  保存,后期经过处理,利用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,利用逆转录试剂盒合成 cDNA 备用,然后以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 扩增。Fra-1 上游引物:5'-AACCCCTCCTCGCTTTGTGAG-3',下游引物:5'-GCTGGCTCTACTGTGAAGCA-3',片段长度 182 bp;内参基因为 GAPDH,上游引物:5'-TGTG-GGCATCAATGGATTTGG-3',下游引物:5'-ACACC-ATGTATTCGGGTCAAT-3',片段长度 145 bp。反应体系:2 × SYBR Green Master Mix 10 μL,上下游引物各 0.4 μL,cDNA Template 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。反应条件:95℃预变性 2 min;95℃变性 5 s,60℃退火延伸 10 s,40 个循环。标准品 cDNA 和待测样品均设置 3 次重复,数据处理采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算。

### 1.4 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组儿童外周血 Fra-1 mRNA 水平变化

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 病例组患儿外周血 Fra-1 mRNA 相对表达量为  $4.7 \pm 1.5$ , 健康对照组儿童外周血 Fra-1 mRNA 相对表达量为  $2.4 \pm 1.6$ , 病例组 Fra-1 mRNA 相对表达量明显高于对照组 ( $t=7.017, P<0.05$ )。

### 2.2 肾母细胞瘤患儿血液 Fra-1 mRNA 表达水平与临床特征的关系

Fra-1 mRNA 表达在肾母细胞瘤的远处转移、tumor node metastasis (TNM) 分期间比较差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )；而在患者的性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤位置及不同甲胎蛋白 (AFP) 水平间比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 肾母细胞瘤患儿血液 Fra-1 mRNA 表达水平与临床特征的关系

临床特征	n	Fra-1 mRNA	t 值	P 值
性别				
男	23	$4.6 \pm 2.0$	0.807	>0.05
女	27	$4.2 \pm 1.5$		
年龄				
≥ 3 岁	26	$3.4 \pm 1.4$	1.278	>0.05
<3 岁	24	$4.0 \pm 1.9$		
肿瘤位置				
左肾	29	$3.9 \pm 1.1$	1.763	>0.05
右肾	21	$4.5 \pm 1.3$		
肿瘤直径				
≥ 10 cm	30	$4.7 \pm 2.3$	1.309	>0.05
<10 cm	20	$3.8 \pm 2.5$		
TNM 分期				
I ~ II 期	31	$3.7 \pm 1.7$	2.319	<0.05
III ~ IV 期	19	$4.8 \pm 1.5$		
远处转移				
是	18	$5.3 \pm 1.9$	2.379	<0.05
否	32	$4.1 \pm 1.6$		
甲胎蛋白				
≥ 10 ng/mL	31	$4.6 \pm 2.2$	0.793	>0.05
<10 ng/mL	19	$4.1 \pm 2.1$		

### 2.3 随访患儿疗效与 Fra-1 mRNA 表达水平关系

随访 5 年, 50 例肾母细胞瘤患儿中, 45 例获得随访, 其中 8 例死亡; 将持续缓解患儿纳入理想疗效组 ( $n=33$ ), 将复发、转移或死亡的

病例纳入疗效不佳组 ( $n=12$ ), 理想疗效组 Fra-1 mRNA 相对表达量 ( $3.8 \pm 1.9$ ) 低于疗效不佳组 ( $5.3 \pm 2.2, t=2.246, P<0.05$ )。

## 3 讨论

Fra-1 基因编码 Fos-related antigen 1, 是转录因子 Fos 家族成员, 家族其他成员包括 c-Fos、FosB 和 FosL2, 这些基因编码一些亮氨酸拉链蛋白, 编码的蛋白可与 JUN 家族蛋白形成二聚体, 然后形成转录因子复合物激活蛋白 -1 作用于机体。研究证实, Fra-1 在多种恶性肿瘤中高表达, 特别是在上皮细胞生长、分化和转化中<sup>[5-7]</sup>, Fra-1 有助于产生上皮-间质转化 (EMT) 和进一步致癌<sup>[8]</sup>。此外, 其还可作为 PI3K/AKT 的下游靶向分子, 参与调控滋养层细胞浸润和血管重建<sup>[9]</sup>, 控制胚胎干细胞和滋养层细胞的分化<sup>[10]</sup>等。

目前研究显示, Fra-1 通过其调节的众多转录靶标影响肿瘤细胞增殖、侵袭和转移<sup>[11]</sup>。Fra-1 可通过络氨酸激酶 AXL 的转录上调来控制膀胱癌细胞的侵袭力<sup>[12]</sup>; 通过诱导 MMP 的高表达从而增强骨肉瘤细胞的侵袭性<sup>[13]</sup>。EB 病毒可通过 ERK-Fra-1 介导的 MMP-9 的高表达而增强鼻咽癌细胞的侵袭性<sup>[14]</sup>; 升高的 Fra-1 与浸润性导管癌的分级增加相关<sup>[15-16]</sup>。食管鳞状细胞癌患者 Fra-1 表达阳性与不良预后有直接关系; 同时, 在食管癌的侵袭进展中 Fra-1 扮演着重要角色<sup>[17]</sup>。还有研究表明, Fra-1 表达量的降低可以抑制结肠癌细胞的迁移、侵袭和增殖<sup>[18]</sup>, 在肺癌中 Fra-1 表达量的上调抑制癌细胞的凋亡<sup>[19]</sup>, Fra-1 表达量减少可促进癌细胞的凋亡<sup>[20]</sup>。

细胞迁移是细胞侵袭的关键步骤, 肿瘤转移带来了两大挑战: 估计病人肿瘤转移风险及确定治疗靶点, 这早已成为当前肿瘤治疗与评估中不可或缺的一部分。本实验通过回顾性研究, 利用 qRT-PCR 技术检测肾母细胞瘤患儿及正常体检小儿血液中 Fra-1 mRNA 表达情况, 结果发现, 肾母细胞瘤患儿血液 Fra-1 mRNA 相对表达量较健康体检儿童上调, 其在肾母细胞瘤的远处转移、TNM 分期间差异均有统计学意义, 而在患者的性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤位置及不同甲胎蛋白水平间比较差异均无统计学意义; 持续缓解患儿 Fra-

1 mRNA 表达量低于复发、转移或死亡患儿。以上结果均提示 Fra-1 基因可能在肾母细胞瘤的侵袭及转移中具有重要作用, 并有望成为肾母细胞瘤诊断的分子标志物及临床治疗、预后评估的有效指标之一。目前 Fra-1 在恶性肿瘤形成、进展中的作用尚存在争议, 与肾母细胞瘤的相关研究鲜有报道, 其导致肾母细胞瘤发生、发展和侵袭的具体作用机制仍有待进一步深入研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Friedman AD. Wilms tumor[J]. *Pediatr Rev*, 2013, 34(7): 328-330.
- [2] Davenport KP, Blanco FC, Sandler AD. Pediatric malignancies: neuroblastoma, Wilm's tumor, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, and sacrococcygeal teratoma[J]. *Surg Clin North Am*, 2012, 92(3): 745-767.
- [3] Verschuur AC, Vujanic GM, Van TH, et al. Stromal and epithelial predominant Wilms tumours have an excellent outcome: the SIOP 93 01 experience[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2010, 55(2): 233-238.
- [4] Gleason JM, Lorenzo AJ, Bowlin PR, et al. Innovations in the management of Wilms' tumor[J]. *Ther Adv Urol*, 2014, 6(4): 165-176.
- [5] Zhong G, Chen X, Fang X, et al. Fra-1 is upregulated in lung cancer tissues and inhibits the apoptosis of lung cancer cells by the P53 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 447-453.
- [6] Iskit S, Schlicker A, Wessels L, et al. Fra-1 is a key driver of colon cancer metastasis and a Fra-1 classifier predicts disease-free survival[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43146-43161.
- [7] Oliveira-Ferrer L, Kürschner M, Labitzky V, et al. Prognostic impact of transcription factor Fra-1 in ER-positive breast cancer: contribution to a metastatic phenotype through modulation of tumor cell adhesive properties[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(10): 1715-1726.
- [8] Hasselblatt P, Gresh L, Kudo H, et al. The role of the transcription factor AP-1 in colitis-associated and  $\beta$ -catenin-dependent intestinal tumorigenesis in mice[J]. *Oncogene*, 2008, 27: 6102-6109.
- [9] Kent LN, Rumi MAK, Kubota K, et al. FOSL1 is integral to establishing the maternal-fetal interface[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(23): 4801-4813.
- [10] Lee BK, Uprety N, Jang YJ, et al. Fos11 overexpression directly activates trophoblast-specific gene expression programs in embryonic stem cells[J]. *Stem Cell Res*, 2018, 26: 95-102.
- [11] Desmet CJ, Gallenne T, Prieur A, et al. Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(13): 5139-5144.
- [12] Sayan AE, Stanford R, Vickery R, et al. Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase AXL[J]. *Oncogene*, 2012, 31(12): 1493-1503.
- [13] Kimura R, Ishikawa C, Rokkaku T, et al. Phosphorylated c-Jun and Fra-1 induce matrix metalloproteinase-1 and thereby regulate invasion activity of 143B osteosarcoma cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(8): 1543-1553.
- [14] Zhang Q, Kleeberger SR, Reddy SP. DEP-induced fra-1 expression correlates with a distinct activation of AP-1-dependent gene transcription in the lung[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(2): 427-436.
- [15] Tam WL, Lu H, Buikhuizen J, et al. Protein kinase C  $\alpha$  is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(3): 347-364.
- [16] Logullo AF, Nonogaki S, Pasini FS, et al. Role of Fos-related antigen 1 in the progression and prognosis of ductal breast carcinoma[J]. *Histopathology*, 2011, 58(4): 617-625.
- [17] Usui A, Hoshino I, Akutsu Y, et al. The molecular role of Fra-1 and its prognostic significance in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2012, 118(13): 3387-3396.
- [18] Wu J, Wu G, Lv L, et al. MicroRNA-34a inhibits migration and invasion of colon cancer cells via targeting to Fra-1[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(3): 519-528.
- [19] Zhong G, Chen X, Fang X, et al. Fra-1 is upregulated in lung cancer tissues and inhibits the apoptosis of lung cancer cells by the P53 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 447-453.
- [20] Verde P, Casalino LF, Yaniv M, et al. Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-1 ternizing on target promoters[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(21): 2633-2639.

( 本文编辑: 万静 )