



成纤维细胞活化蛋白的研究进展*

孙朝晖 邹立伟** 杨 凌**

(上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203)

摘要 成纤维细胞活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 是一种II型跨膜丝氨酸蛋白水解酶, 在多种内源性多肽及多肽类药物的代谢中起着至关重要的作用. 在过去十年中, FAP已经被多个领域的研究人员广泛关注, 包括生物化学、药理学、临床医学等. 随着对FAP生理功能及其与临床相关疾病发生发展关系研究的深入, FAP在人体内正常和相关疾病状态下的调控方式已经越发清晰. 研究表明, FAP既可以作为肿瘤的潜在靶点, 又可以作为肿瘤、类风湿性关节炎等疾病早期诊断的生物学标志物. 因此, 多种FAP的检测方法和抑制剂被相继报道. 本综述总结近年来FAP的相关研究, 立足于FAP结构特点、催化性能、内源底物特征及外源底物偏好性、组织分布和组织特异性、生物功能, 分析当前FAP体外和体内的检测方法和抑制剂开发的优势与不足, 总结FAP检测底物的结构特征和抑制剂的潜在构效关系. 本综述将对FAP特异性检测方法和强效抑制剂的开发提供重要的参考价值.

关键词 成纤维细胞活化蛋白, 肿瘤, 检测方法, 荧光探针, 抑制剂

中图分类号 Q7, R9

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0218

1 FAP简介

成纤维细胞活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP) 是一种丝氨酸水解酶, 是II型丝氨酸蛋白酶家族成员之一. 早在1986年, FAP就已经在单克隆抗体F19培养的成纤维细胞中被发现^[1]. 大量研究表明, 在肿瘤的发生和发展中, 作为一种特异性标志物, FAP在肿瘤相关成纤维细胞中表达丰富, 具有特殊的生物学特性和基因稳定性, 在肿瘤细胞的生长、侵袭、转移和免疫抑制中发挥着重要的作用^[2-4]. 研究表明, 相比于正常人, FAP在多种肿瘤及关节炎中具有差异性高表达, 有望成为判断肿瘤的一个重要靶标, 在肿瘤的临床诊断与治疗方面具有极高的研究价值^[5-9].

1.1 FAP的结构特点和催化性能

1.1.1 FAP的蛋白质结构

FAP是一种II型跨膜蛋白质, 常见形式为95 ku的单体形式或分子质量为170 ku的同型二聚体, 这种二聚体结构由两个具有相同酶活性且分子质量为 97×10^3 的亚单位组成^[10]. 作为二肽基肽酶家族主要成员之一, FAP不仅与DPP4具有相同的结构域,

而且在完整的氨基酸序列中有48%的相同氨基酸. FAP的亚单位组成包括 β 螺旋结构域和 α/β 水解催化域. 由Ser⁶²⁴、Asp⁷⁰²和His⁷³⁴组成的催化三联体定位在 β 螺旋结构域和 α/β 水解催化域的交界面, 8片 β 螺旋桨叶位于催化三联体的顶部, 作为选择性过滤蛋白质的出入口^[11].

1.1.2 FAP的底物催化及其偏好性

在人体内FAP不仅表现出二肽酶活性^[3], 还有胶原酶活性^[12], 可以降解体内二肽和明胶. 研究表明, FAP能有效水解 $\alpha 2$ -抗纤溶酶、B型尿钠肽、神经肽Y、多肽YY和P物质等内源性底物, 而对胰高血糖素样肽1、葡萄糖依赖性促胰岛素多肽水解缓慢^[13]. 除了人工合成的多肽链外, FAP外源性

* 国家自然科学基金 (21602219, 81773810, 81973393), 科技部国家重点研发计划 (2017YFC1702000) 和沈阳市科学技术局 (17-230-9-05) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-51323182

邹立伟. E-mail: chemzlw@163.com

杨凌. E-mail: yling@shutcm.edu.cn

收稿日期: 2019-09-19, 接受日期: 2019-12-04

底物以短肽链和荧光基团连接合成的荧光探针为主, 其中多数探针以香豆素及其衍生物为母核, 并具有较好的水解速率(表1)。虽然FAP和DPP4具有相似的结构域和二肽基肽酶活性, 均具有肽链外肽酶活性, 但FAP还具有独特的肽链内肽酶活性, 可以裂解明胶、变性的I型胶原和IV型胶原^[14-16]。这些特性是DPP4不具备的, 因此内肽酶活性是区别FAP和DPP4的一个重要方向。

Table 1 FAP substrates

表1 部分FAP底物

内源性底物	外源性底物
α 2-抗纤溶酶、明胶、B型尿钠肽、神经肽Y、多肽YY	Z-GP-AMC、Tic-Pro-AFC、Thr-Ser-Gly-Pro-Asn-Gln

1.2 FAP的组织分布

通常FAP在女性组织中具有较高的表达, 包括子宫内膜、子宫颈^[17]。正常人体胆囊和膀胱中, FAP也有一定程度的表达, 但在正常成人其他组织、良性或癌前病变的上皮损伤中几乎不表达^[18]。研究表明, FAP在与炎症和细胞纤维化相关的疾病中表达明显, 包括伤口愈合、类风湿性关节炎、骨关节炎、肝硬化和肺纤维化^[19-24]。相较于正常组织, 肿瘤组织中的FAP表达更为明显, 且选择性地表达于90%以上的上皮性肿瘤的基质成纤维细胞中, 包在括卵巢癌、胃癌、肺癌和乳腺癌等^[25-31]。值得注意的是, 肝、卵巢、胰腺、胃在正常情况下几乎并不表现FAP活性, 但在癌变后, FAP表达量明显提高。因此基于正常组织癌变后FAP的表达上调和选择性表达, 它已被鉴定为肿瘤相关成纤维细胞的潜在标志物^[14]。Abbas等^[32]通过染色标记肿瘤细胞组织, 观察到FAP的梯度表达, FAP在肿瘤细胞周围的成纤维细胞中表达较高, 在肿瘤周围基质的远端部分中表达较低, 而在相邻的正常组织中表达最少。

1.3 FAP与疾病

研究表明, FAP的表达上调可以显著促进肿瘤细胞的发生发展^[16]。FAP通过改善肿瘤外基质和微血管, 在肿瘤形成和生长转移方面都发挥了重要的作用^[33]。在肿瘤组织中, 肿瘤细胞必须附着于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的黏附蛋白, 通过酶水解ECM, 肿瘤细胞可以迁移到远处位点并侵入周围正常组织, 实现最终转移。作为丝

氨酸蛋白酶, FAP既能降解I型胶原蛋白, 也能发挥二肽基肽酶活性。Chen等^[34]发现, 在胶原纤维成纤维细胞的表面, 一种由FAP和DPP4形成的复合物可以在细胞侵袭中与明胶结合并溶解明胶来促进细胞迁移。Wen等^[29]的研究显示, FAP⁺CAF CM可以促进胃癌(gastric cancer, GC)细胞在体外环境中的增殖能力。相比于正常培养基, 在FAP⁺CAF CM存在的情况下, GC的迁徙能力明显增强。而接种了FAP⁺CAF的小鼠肿瘤组织也具有较大的BrdU掺入率。Liu等^[27]对60例GC患者进行临床病例分析, 发现FAP与肿瘤直径及分化程度有关。通过Western blot和Transwell分析SGC7901细胞实验结果, 证明外源性FAP能显著提高SGC7901的增殖和迁移能力, 且呈剂量依赖性。Lee等^[35]发现通过调节蛋白质水平以及通过增加纤连蛋白和胶原纤维组织的水平, FAP可以重塑ECM。通过增强FAP⁺基质上胰腺癌细胞的方向性和速度, 可以证明ECM的FAP依赖性结构/组成改变促进肿瘤细胞沿着特征性平行纤维取向侵袭。而抑制FAP酶活性可以逆转该表型, 从而导致ECM解体和减缓肿瘤侵袭。

肿瘤细胞在融入周围组织和生长增殖过程中, 必须获得血液供应以持续生长。Huang等^[36]研究发现, 在小鼠乳腺癌移植模型中, FAP高表达组的肿瘤生长速度远超FAP未表达组且更富血管, 这为FAP促进肿瘤微环境的血管生成提供了证据。Wang等^[37]发现, FAP(+)的角膜细胞出现在新生血管的角膜基质中, 新生血管内皮细胞也有显著的生长。最近有文献报道, FAP能促进骨肉瘤血管的生成。Zeng等^[38]在MG63细胞中测得FAP的过表达现象, 血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGF-A)mRNA和蛋白质水平也有明显上调, 当沉默U2-OS细胞中FAP的表达后, VEGF-A的表达也显著下降。通过磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/AKT和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)信号通路, FAP能诱导VEGF A上调从而促进骨肉瘤血管生成。这些发现都证明了FAP与血管生成密切相关, 可以通过驱动血管生成至少部分地改变肿瘤微环境。

这些研究表明, FAP不仅可以在肿瘤的早期预防诊断中作为潜在的标志物^[32], 基于FAP在肿瘤生长和转移中的促进作用, FAP对肿瘤微环境(主要是肿瘤外基质和微血管)的显著效果, 还可作为肿瘤治疗的选择性靶点^[14, 39-44]。

近年来, FAP在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)疾病发展中的作用也引起了人们的关注^[19, 21, 45]. 在早期的研究中, Bauer等^[45]通过RT-PCR和免疫组织化学法测定了RA患者滑膜组织中FAP的表达, 发现RA滑膜组织中FAP表达有上调的趋势. Jakobs等^[46]研究发现, 与正常组织相比, FAP在RA滑膜组织中具有更高的表达, 并介导了RA中相关滑膜炎肿瘤样组织的破坏, 在滑膜细胞的免疫逃逸过程中发挥着重要的作用. FAP和DPP4作为二肽基肽酶成员, 其丝氨酸水解酶活性在保护关节软骨组织免受类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的侵蚀方面发挥着重要作用^[47-49]. 研究证明, 抑制FAP和DPP4在软骨组织中的表达会导致类风湿关节炎滑膜成纤维细胞侵蚀作用的加

剧^[48]. 目前临床上还没有靶向FAP的类风湿性关节炎治疗药物, 以FAP为类风湿性关节炎治疗靶点的应用还有待进一步研究.

2 FAP体内外检测方法

目前, 有关FAP的检测方法已有较多报道, 方法应用也较为成熟, 在RNA、蛋白质和组织器官水平均有研究. 目前已报道的检测方法主要有逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)、免疫组化法、蛋白质印迹法(Western blot)、液相质谱检测法和荧光检测法(表2). 在已有的方法评价中, 灵敏度、通量、选择性和抗干扰性是4个重要指标, 由于检测条件和原理的限制, 不同的方法在某方面都有各自的优势和一定的局限性.

Table 2 FAP detection methods
表2 FAP检测方法研究

方法	原理	工具	优点	缺点
RT-PCR	RNA反转录 聚合酶链式扩增	正反向引物	方法成熟	蛋白质水平无法检测
免疫组化	抗原与抗体特异性结合	特异性抗体	简单、时间短、特异性强	灵敏度低 所需抗体量大
Western blot	凝胶电泳	琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶	方法成熟 特异性较好	试剂昂贵 通量低
液相-质谱	液相分离 质谱检测	高效液相质谱	灵敏度较高	特异性差 仪器昂贵 操作不便
荧光检测	化学发光 生物发光	荧光探针	快速、便捷、高通量、灵敏	生物基质干扰

2.1 体外FAP检测方法

通过结合RNA的反转录(reverse transcription, RT)和cDNA的聚合酶链式扩增(polymerase chain reaction, PCR)技术, RT-PCR以其灵敏度高、操作简单、方法成熟等优点, 在检测细胞基因表达水平中有广泛的应用^[50-52]. 而PCR技术作为RT-PCR技术的核心, 最早出现于20世纪80年代, 作为一种体外半定量检测方法. Lee等^[53]通过利用FAP正向引物5'-TGGGTGTCCAGT-GAACGAGTATG-3'和反向引物5'-TGTATTCTT-GGTCTGTGCGGC-3', 检测了FAP在肿瘤中的表达, 并在1%的琼脂糖凝胶上显示. 实验结果证明, FAP在肿瘤相关成纤维细胞中选择性表达, 而且通过增加抗FAP免疫应答的CD4+ T细胞, 相关的抗肿瘤反应也会有显著增强. 虽然检测针对FAP-RNA, RT-PCR对FAP特异性较强, 受细胞内其他

酶干扰少, 但无法评价细胞中FAP的蛋白质表达水平. 在多数正常组织器官(例如胰腺、皮肤)中, FAP的蛋白质表达并不明显, 而癌变组织和器官中FAP表达特异性上调, 尤其是在肿瘤相关成纤维细胞中, 因此单独的基于基因水平的检测方法不能满足FAP在肿瘤发生和发展研究中的应用.

免疫组化法利用抗原与抗体特异性结合, 通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质), 从而在体外对靶标蛋白进行定性分析^[54-56]. Kraman等^[57]在鼠fap基因上插入编码增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP), 通过肿瘤细胞中EGFP共定位和FAP抗体染色, 证明修饰的细菌人工染色体含有对插入片段的适当表达所必需的FAP转录元件. Santos等^[58]通过用克隆抗体抗-CC10和多克隆兔

抗体抗-proSPC对Clara细胞和肺泡II型细胞进行染色,通过免疫组化分析,观察到FAP在肿瘤的所有阶段都有表达.这些结果表明,免疫组化法针对FAP抗体染色,可以在细胞或亚细胞水平定位FAP分布.基于免疫组化原理,直观地对FAP高表达的组织进行定性分析,特异性强、靶向作用明显,但灵敏度低、无法进行精准定量,而且检测过程中所需抗体量大、操作繁琐复杂,不利于样品的批量检测.除此以外,免疫组化法实验所用主要为体外组织标本和细胞标本,因此只能检测特殊时间段的FAP表达,无法检测FAP在体内的实时变化过程.

相比于免疫组化,Western blot方法研究更为成熟,由于其较好的特异性,Western blot在分子生物学、生物化学和免疫遗传学中应用广泛^[59-60].Lee等^[61]通过用单克隆抗体(F19)对rFAP进行Western blot分析,以及使用Met- α 2AP对rFAP进行液相质谱和免疫印迹分析.结果表明,FAP只有在其二聚体形态下才具有酶活性,而在单体形态下则没有活性,这对后期FAP体外重组表达具有重要的意义.Western blot法结合了电泳的高分辨率和酶免疫测定的高敏感性和特异性,将电泳与KJSA结合起来,无论是细胞还是组织水平,都能对FAP进行定性和半定量分析.但实验试剂昂贵,而且细胞成长周期长、处理过程繁复,无法满足体外大批量样品FAP活性或表达分析的要求.

随着探针底物在FAP活性检测中的应用,通过液相色谱质谱联用(LC-MS)检测FAP探针底物及其代谢产物来研究探针-酶相互作用的模式得以推广.Edosada等^[62]在研究多种二肽底物对FAP的动力学常数中,通过MALDI-质谱检测在FAP水解切割后产生的P₁脯氨酸残基,从而对最适多肽底物进行评价(表3).而且随着荧光探针分子在FAP活性检测中的应用,LC-MS常与荧光检测法联用以分析FAP在体外的水解活性强弱.

近年来,荧光探针分子在体外靶酶的活性检测上有广泛的应用,包括细胞色素P450酶(cytochrome P450, CYP)、UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferases, UGT)、二肽基肽酶和羧酸酯酶等^[63-66].多种靶向FAP荧光探针被设计合成并在多项研究中得以应用(表4)^[67-75],

Table 3 Kinetic constants of peptide substrates with prolines hydrolysed by FAP

表3 通过FAP水解含脯氨酸的多肽底物的动力学常数

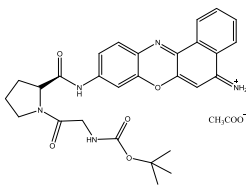
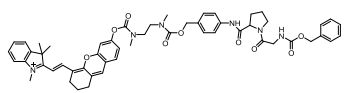
多肽底物	K_m (mmol/L) 值
Ala-Ser-Gly-Pro-Asn-Gln	0.0022
Ala-Ser-Gly-Pro-Ser-Ser	0.0043
Thr-Ala-Gly-Pro-Asn-Gln	0.0007
Thr-Ser-Gly-Pro-Asn-Gln	0.0013
Thr-Ser-Gly-Pro-Asn-Se	0.0022
Thr-Ser-Gly-Pro-Ser-Gln	0.0019

例如Z-甘氨酸-脯氨酸-7-酰氨基-4-甲基香豆素(Z-Gly-Pro-AMC)、丙氨酸-脯氨酸-7-氨基-4-三氟甲基香豆素(Ala-Pro-AFC)等.目前,FAP的相关荧光探针多以香豆素为荧光基团.Aggarwal等^[67]运用荧光探针Ala-Pro-AFC(500 μ mol/L)对FAP体外酶活性进行检测,通过其水解产生的AFC($\lambda_{ex/em}$ =370/535 nm)的荧光响应来反应FAP活性,并测定了Ala-Pro-AFC的水解反应速率.但由于荧光探针自身化学属性差或选择性等问题,FAP难以与二肽基肽酶的其他成员活性进行区分.以Ala-Pro-AFC为例,由于丙氨酸的氨基端没有被阻隔,因此除了可以被具有内肽酶活性的酶(如FAP)水解外,外肽酶活性的酶(如DPP4)也能水解Ala-Pro-AFC产生AFC.除此之外,以香豆素结构为主的荧光基团其发射和激发波长多在300~500 nm,这与生物基质中的部分荧光蛋白质等成分的激发条件相重合,因此在具体的生物组织细胞实验中,由于生物基质的干扰,往往无法得到较好的荧光成像结果.Miao等^[68]基于半萜类化合物结构,研究并合成了具有FAP特异性的荧光探针FNP1(水解产物 $\lambda_{ex/em}$ =680/710 nm).相较于前者的研究,Miao等补充了体外FAP单酶活性及选择性实验,证明了该探针并不会被DPP4水解,具有一定的选择性考证,但实验中用Talabostat作为抑制剂,会抑制多种二肽基肽酶的活性,在二肽基肽酶活性抑制作用上没有选择性,因此在FNP1选择性考察上还具有一定的提升空间,这些缺陷都限制了荧光探针在FAP深入研究中的应用.

Table 4 FAP fluorescent probes structure and kinetic constants
表4 FAP荧光探针结构及其动力学常数

荧光探针	结构式	$K_m / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	荧光基团检测条件 ($\lambda_{\text{ex/em}}/\text{nm}$)
7-methoxycoumarin-4-acetic acid-DSGETGPA-dinitrophenyl		0.020	340/435 ^[67]
MEPLGRQLTSGP-7-amido-4-methylcoumarin		0.021	360/460 ^[69]
Tic-Pro-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin		0.053	400/508 ^[70]
Z-Gly-Pro-4-methylcoumarin-7-amide		0.270	370/440 ^[71]
Ac-GPGP-2SBPO		—	630/670 ^[72]
ANP _{FAP}		—	675/695 ^[73]
HCFP		—	670/710 ^[74]

续表4

荧光探针	结构式	$K_m / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	荧光基团检测条件 ($\lambda_{\text{ex/em}}/\text{nm}$)
(R)-9-(1-((tert-butoxycarbonyl)glycyl)pyrrolidine-2-carboxamido)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-iminium acetate		0.110	585/625 ^[75]
FNPI		0.046	680/710 ^[68]

2.2 体内FAP检测方法

以荧光分子为基础,在一定波长的激发下,检测所产生的特定波长荧光,从而对目标物进行定性和定量分析.基于其独特的检测原理,荧光检测法具有高灵敏度,不论是化学发光还是生物发光,都可以对活体组织器官中FAP的表达进行定性或定量研究,并考察FAP的整体分布^[76].Xing等^[74]合成了探针母核激发与发射波长较长的半菁类荧光探针HCFP(水解产物 $\lambda_{\text{ex/em}}=670\text{ nm} / 710\text{ nm}$),近红外发射波长使该探针具有较好的组织穿透能力,可以避免生物基质的干扰.体内实验结构显示,HCFP(50 $\mu\text{mol/L}$)在MCF-7荷瘤BALB/c小鼠具有良好的可视性,并能靶向FAP和选择性成像,但该探针并没有进行体外FAP单酶活性检测和FAP选择性评价,因此在探针选择性上还需进一步研究.值得注意的是,相较于免疫组化这类体外染色方法,荧光检测可以观测靶酶在体内的实时变化,这对研究FAP在肿瘤发生发展过程中发挥的作用及其作用机制具有重大意义.

总的来说,不论是体外还是体内的FAP检测方法,都具有一定的局限性,应用范围也有限制.在体外检测方法中,RT-PCR、免疫组化和Western blot只能达到亚细胞或细胞水平的检测,而基于荧光探针分子的LC-MS和荧光检测法,则可以在分子水平对FAP水解活性进行检测,这对以FAP作为药物靶点的癌症精准治疗是很有帮助的.而在体内检测中,荧光检测法相较于其他方法具有自己特有的优势,具有良好的组织和整体成像能力,可以直观地分析FAP的整体分布.但基于荧光探针本身的属性,尤其是对FAP的选择性方面还有待进一步深入地研究.

3 FAP抑制剂

鉴于FAP在肿瘤微环境方面生物学功能的研究,近几年来,FAP抑制剂在肿瘤FAP靶向治疗中的应用引起了人们的重视^[3, 77-79].Gunderson等^[80]通过使用新型小分子抑制剂UAMC-1110,结合肿瘤局部放射进行治疗,发现FAP缺失与抗原特异性肿瘤T细胞浸润能力的改善和胶原沉积的增强相关,并且靶向FAP或CAF的放射治疗能明显增强抗肿瘤T细胞浸润能力.

目前,对FAP的抑制剂的研究尚不深入,对FAP天然抑制剂的研究少有报道,多数为合成FAP抑制剂,临床上也还没有靶向FAP治疗肿瘤的上市药物.最近有研究报道通过下调胃癌相关成纤维细胞中FAP和HGF(肝细胞生长因子)的表达,Polyphyllin I可以抑制胃癌细胞增殖^[81].

Talabostat又名PT-100,是第一个进入临床实验的FAP活性抑制剂,并在临床研究中发现了包括胰腺癌、肾癌在内的多种适应症(表5),目前已经进入临床III期研究.研究表明,通过向接种肿瘤的小鼠注射Talabostat,相比于对照组,测试组小鼠显示出明显的抗肿瘤效果,且肿瘤组织的大小减少60%.在体外实验中,除了减缓肿瘤生长之外,注射PT-100的EL4肿瘤小鼠的平均肿瘤大小显示出剂量依赖性消退并且在部分小鼠中未能检测出^[3],这都表现出Talabostat良好的抗肿瘤作用.但部分研究发现,Talabostat除了对FAP显示出明显的抑制作用外,对二肽基肽酶的其他成员也显示出一定的抑制能力,通过 IC_{50} 值的比较(表6),Talabostat可以明显抑制酶二肽基肽酶活性,且相较于FAP,Talabostat对DDP4具有更强的抑制作用.

(约36倍). 这些结果表明, Talabostat 虽然是良好的靶向 FAP 肿瘤治疗药物, 但在其 FAP 活性选择性上还有一定的缺陷, 有待进一步的研究. 此外, FAP 在 小鼠肺纤维化模型中的作用研究表明, FAP 具有抗纤维蛋白增殖的作用并促进巨噬细胞的活化^[82].

Table 5 Indications of Talabostat
表5 Talabostat的适应症

适应症	研究进展	最后更新日期
脑和中枢神经系统肿瘤	Phase 1	2012-03-15
黑素瘤	Phase 2	2007-06-08
非小细胞肺癌	Phase 3	2007-06-08
胰腺癌	Phase 2	2007-06-08
慢性阻塞性肺疾病	Phase 2	2015-03-25
肾癌	Phase 2	2018-02-26

Table 6 IC₅₀ values of Talabostat on dipeptidyl peptidase inhibition

化合物	IC ₅₀ / (nmol·L ⁻¹)				
	FAP	DPP4	DPP7	DPP8	DPP9
Talabostat	11	0.3	38	15	2

Jansen 等^[83]考察已批准的 DPP4 抑制剂, 相比于其他抑制剂, Linagliptin 具有最显著的 FAP 抑制作用 ($IC_{50}=0.089\text{ }\mu\text{mol/L}$). 通过研究黄嘌呤母核 N-1、N-7 和 C-8 位不同取代基团对 FAP 抑制作用的影响, 筛选并鉴定出 3 种基于黄嘌呤结构的 FAP 选择性抑制剂. 如表 7 所示, 在众多的黄嘌呤衍生物

Table 7 IC₅₀ values of xanthine derivatives on FAP inhibition

化合物	IC ₅₀ / (nmol·L ⁻¹)				
	FAP	DPP4	PREP	DPP9	DPP2
1-1	(1.9±0.1)×10 ³	>50.0×10 ³	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵
1-2	(3.3±0.5)×10 ³	(18.1±0.9)×10 ³	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵
1-3	(5.8±0.5)×10 ³	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵

中, 在低微摩尔范围内, 化合物 1-1、1-2、1-3 显示出对 FAP 的强亲和力, 并在不依赖于亲电子基团功能的情况下发挥了强效的 FAP 抑制作用. 结构分析可知 (图 1), 位于 C-8 位置的哌嗪酮基团是 FAP 选择性的重要保障. 而在 N-1 位置, 检测了多种芳香基和氮杂环芳香基, 但没有一个衍生化合物

在与 FAP 有强亲和力的情况下, 同时具备区别于 DPP4 的 FAP 选择性. 在 N-7 位置, 相比于 2-异戊烯基和 2-异己烯基, 丁炔基是测定的最佳 N-7 取代基, 在 FAP 和 DPP 4 结合特性上有明显的差异.

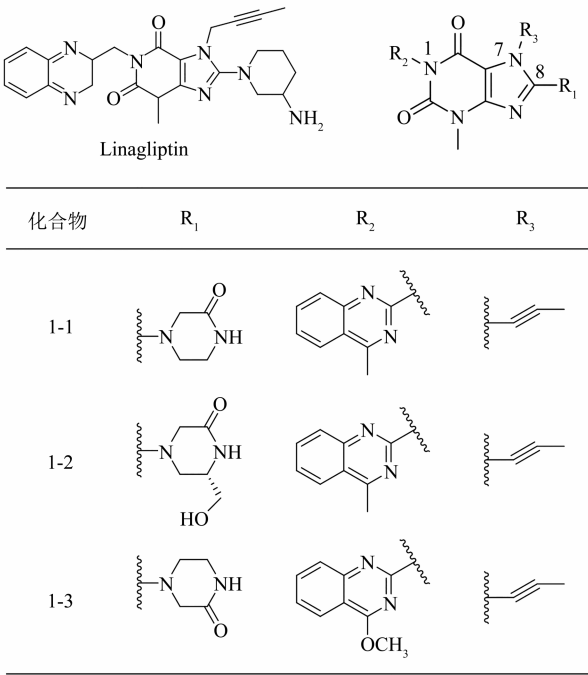


Fig. 1 Xanthine derivative FAP inhibitors
图1 黄嘌呤衍生物类FAP抑制剂

Tsai 等^[84]基于 4-羧甲基焦谷氨酸二酰胺衍生出的系列化合物, 鉴定并探究了 C-2 位和 C-4 位不同取代基对 FAP 抑制能力及其选择性的影响, 最终筛选出图 2 所示的三个化合物. 在 C-4 号位, 分别引入了双环、哌嗪环、单环和苯胺取代基. 其中, 异吲哚啉环的引入比其他取代基有更强的影响, 能明显增强衍生物对 FAP 的亲和力, 而在异吲哚啉 C-5 位 (即 R₂) 引入卤素原子 (-Cl、-F、-CF₃) 后, 化合物对 FAP 的抑制效力亦没有明显的改变. 但是 C-4 号位上苯胺的引入结果表明, C-4 号位极性基团可能会降低衍生物对 FAP 的亲和力. 在确定 C-4 号位取代基 (异吲哚啉) 下, C-2 号位的衍生物构效关系更为明显. 含 F 原子的 2-氰基吡咯烷环为最优构象, 对比 C-4 号位吡咯烷取代衍生物, 表明 2-氰基吡咯烷环上的氰基是必不可少的取代基 ($IC_{50}=0.079\text{ }\mu\text{mol/L}$ vs. $IC_{50}>100\text{ }\mu\text{mol/L}$). 如表 8 所示, 2-氰基吡咯烷环上 F 原子的引入能明显增强对 FAP 的抑制效力 (IC_{50} 约为 2-氰基吡咯烷环

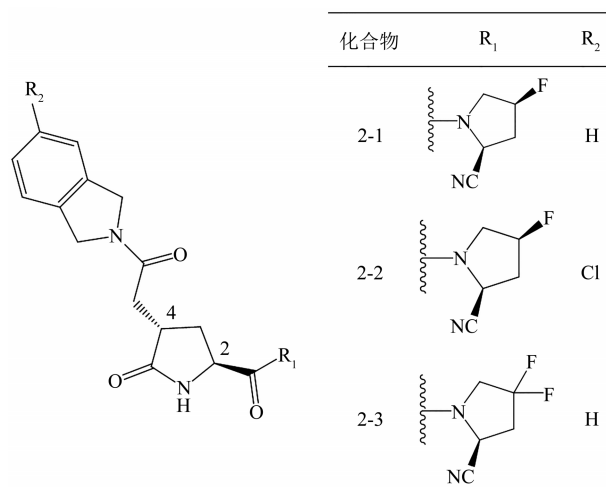


Fig. 2 4-carboxymethylpyroglutamic acid diamide derivative FAP inhibitors

图2 4-羧甲基焦谷氨酸二酰胺衍生物类FAP抑制剂

Table 8 IC₅₀ values of 4-carboxymethyl pyroglutamic acid diamide derivatives on FAP inhibition

表8 4-羧甲基焦谷氨酸二酰胺衍生物对FAP抑制IC₅₀

化合物	IC ₅₀ / (nmol·L ⁻¹)				
	FAP	DPP4	DPP8	DPP9	DPP2
2-1	20	>10 ⁵	>10 ⁵	>0.5×10 ⁵	>10 ⁵
2-2	63	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵
2-3	22	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵

衍生物的4倍), 但更多引入F原子对抑制作用没有更进一步的影响. 相比于对FAP所显示出的强亲和能力, 化合物2-1、2-2、2-3对二肽基肽酶其他成员的活性几乎没有抑制作用, 具有高度的FAP酶选择性, 这对靶向FAP有着重要作用.

Tran等^[85]以硼酸结构(boroPro)为基础设计了系列衍生物(图3), 当固定R₃为氢原子, 绝大多数R₂取代基(例如环戊烷、环己烷和苯环)衍生物对FAP都具有较好的选择性. 在R₂苯环取代衍生物上引入氯原子能显著增强FAP和DPP4亲和力. 化合物3-1作为最优构象, 与FAP具有强亲和力(K_i=7.5 nmol/L), 是DPP4的3 000多倍. 但在该实验中, 系列衍生物对脯氨酰内肽酶(prolyl endopeptidase, PREP)的亲和力未被研究, 有关FAP选择性还需进一步研究. FAP和PREP同属于二肽基肽酶, 不同的是PREP主要发挥内肽酶活性, 而FAP除具有内肽酶活性外, 还具有外肽酶活性. Poplawski等^[86]也设计了相同硼酸结构为基础的系

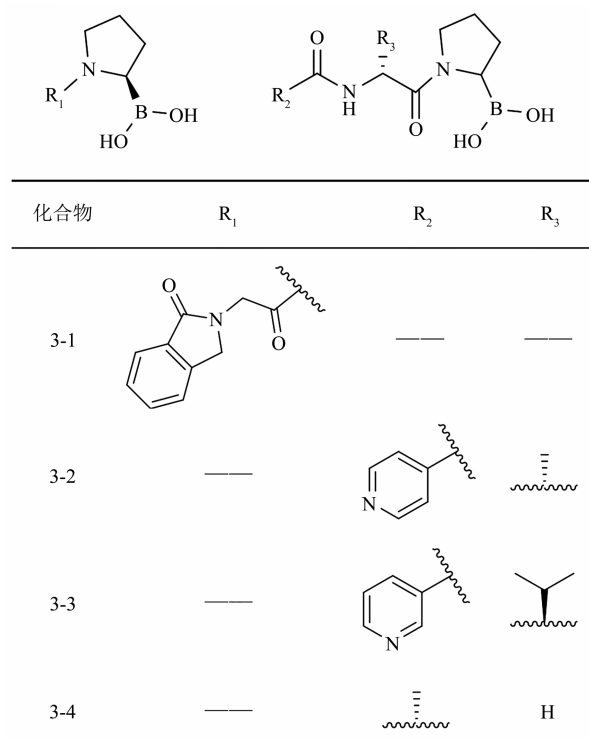


Fig. 3 Boric acid derivative FAP inhibitors

图3 硼酸衍生物类FAP抑制剂

列衍生物, 并分别鉴定出FAP和PREP特异性抑制剂. 如表9所示, 化合物3-2对FAP显示出强效的抑

Table 9 IC₅₀ values of boric acid derivatives on FAP inhibition

表9 硼酸衍生物对FAP抑制IC₅₀

化合物	IC ₅₀ / (nmol·L ⁻¹)				
	FAP	PREP	DPP4	DPP8	DPP9
3-2	36±4.8	(13±4.3)×10 ³	>100	>10 ³	>10 ³
3-3	>100	1.3±0.2	>100	>100	>100

制作用, 相比于PREP强约360倍, 而化合物3-3对除PREP之外的其他二肽基肽酶几乎无抑制作用, 两者对相应的靶酶都具有良好的选择性. R₁的甘氨酸取代衍生物对FAP有更强的选择性, 其抑制活性约为PREP的900倍, 但是由于甘氨酸上游游离N端的存在, 甘氨酸取代衍生物对二肽基肽酶家族其他成员也有明显的抑制. 当引入哌啶环作为N端封闭基团(R₂), 该问题得以明显改善, 因此游离N端的封闭对内肽酶活性的选择性是必不可少的. 同时, 在哌啶环上引入卤素原子(Cl和F), 化合物对FAP与PREP的抑制能力都明显加强, 这与Tran

等的实验结果相符合. 除此以外, D-丙氨酸取代甘氨酸可以增强内肽酶的活性. 通过改变哌啶环中氮原子的位置以及引入异丙基替换D-丙氨酸上的甲基 (R_3), 化合物对FAP的亲合力大幅降低, 而PREP活性明显提高. 除了上述实验外, Lee等^[70]在化合物3-4 (Ac-Gly-boroPro) 的乙酰基和甘氨酸中引入8-氨基-3, 6-二氧杂辛酸 (*peg*), 增强了化合物对FAP的亲合力 ($K_i = 0.8 \pm 0.2$ nmol/L), 相比于DPP4 ($K_i = 440 \pm 29$ nmol/L), 加强了对内肽酶活性的选择性.

Ryabtsova等^[87]基于N-酰基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷骨架 (图4), 通过引入不同酰基取代基并检测其衍生物对二肽基肽酶的抑制作用, 研究了不同取代基衍生物对靶酶的构效关系. 在固定 R_2 取代基为氢原子时, 1-萘甲酰基取代衍生物为最优势构象, 但大多数芳香类酰基 (不论单环或多环) 衍生物对FAP和PREP都有很强的亲合力, 而对二肽基肽酶其他成员几乎没有抑制, 这说明游离氨基端的阻滞对二肽基肽酶的外肽酶活性作用明显. 而2-氰基吡咯烷 (R_2) C-4位不同取代基衍生物的研究表明, 氟原子的引入能在不影响二肽基肽酶家族其他成员的情况下, 大幅增强化合物对FAP和PREP的亲合力, 更多氟原子能加强FAP抑制作用并减弱PRER的抑制, 但作用皆不明显. 在此实验的基础上, Jansen等^[88]通过引入喹啉酰基, 增强了对FAP的亲合力和选择性 (IC_{50} 约为PREP的83倍) (表10), 并研究了喹啉环上氮的不同位置对其抑制作用的影响, 确立了N- (4-喹啉酰基) -甘氨酸- (2-氰基吡咯烷) 为最优势构象. 值得注意的是, 相比于N- (4-喹啉酰基) -甘氨酸- (2-氰基吡咯烷), 喹啉环C-6位氯原子或溴原子的引入没有明显改变FAP亲合力, 但它们确实具有适度增加对PREP的选择性.

Gilmore等^[89]合成了一系列二肽脯氨酸二苯

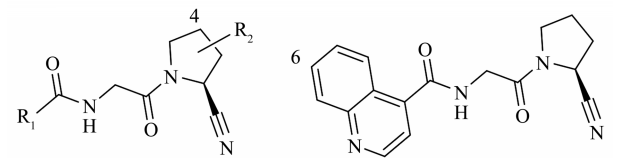


Fig. 4 The skeleton of *N*-acyl-glycine-2-cyanopyrrolidine and *N*-(4-quinolinyl)-glycine-(2-cyanopyrrolidine)

图4 *N*-酰基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷骨架及*N*- (4-喹啉酰基) -甘氨酸- (2-氰基吡咯烷)

Table 10 IC_{50} values of *N*-acyl-glycine-2-cyanopyrrolidine derivatives on FAP inhibition

表10 *N*-酰基-甘氨酸-2-氰基吡咯烷衍生物对FAP抑制

IC_{50}				
$IC_{50} / (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$				
FAP	PREP	DPP2	DPP4	DPP9
10.3±0.4	(0.86±0.07)×10 ³	>10 ⁵	>10 ⁵	>10 ⁵

基磷酸酯类化合物 (图5), 并分别测定了对FAP和DPP4的抑制活性. 如表11所示, 不同氨基酸的引入对FAP抑制能力影响并不明显, 而Gly对DPP4的抑制大幅增强 ($K_i = (5.94 \pm 0.61) \times 10^{-8}$ mol/L). 尽管Gly-Pro^P(OPh)₂对DPP4的抑制作用为FAP的180倍, 但Gly-Pro^P(OPh)₂对FAP具有较强的亲合力. 由于游离氨基酸N端的存在, 对于同时具有内肽酶和外肽酶活性的FAP而言, 难以从外肽酶的活性区分FAP和DPP4, 从而提高对化合物对FAP的选择性.

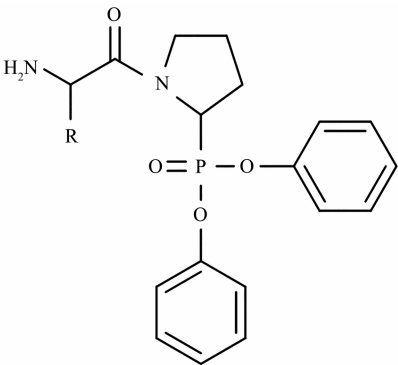


Fig. 5 The skeleton of dipeptide proline diphenylphosphonates

图5 二肽脯氨酸二苯基磷酸酯骨架

Table 11 IC_{50} values of Dipeptide proline diphenyl phosphonates on FAP inhibition

表11 二肽脯氨酸二苯基磷酸酯对FAP抑制 IC_{50}

化合物	$K_i / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
	FAP	DPP4
Gly-Pro ^P (OPh) ₂	(3.27±0.19)×10 ⁻⁶	(5.94±0.61)×10 ⁻⁸
Tyr-Pro ^P (OPh) ₂	(2.59±0.25)×10 ⁻⁶	(1.42±0.17)×10 ⁻⁵
Pro-Pro ^P (OPh) ₂	(4.60±0.68)×10 ⁻⁶	(4.28±0.49)×10 ⁻⁵
Val-Pro ^P (OPh) ₂	(3.63±0.62)×10 ⁻⁶	(3.13±0.42)×10 ⁻⁶

4 结 论

鉴于FAP特殊的蛋白质结构和生物学功能,以及在肿瘤治疗的发生发展中的重要作用.近几年来,FAP在肿瘤临床上的应用引起了越来越多研究者的关注.FAP在90%以上的上皮性肿瘤组织中特异性表达,并随着成纤维细胞向CAFs转化上调,这使得FAP可作为肿瘤检测中的重要标志物.虽然FAP在肿瘤和类风湿性关节炎中的生理学作用研究尚不深入,但大量研究证明FAP可通过降解细胞外基质,在肿瘤细胞的侵袭和转移中发挥重要的作用,并能改善肿瘤组织微血管促进肿瘤细胞的增殖.而FAP在RA滑膜细胞的免疫逃逸中也扮演了重要的角色,并对关节软骨组织起到了一定的保护.这些研究证明,FAP可作为肿瘤和RA临床诊断治疗的潜在靶分子,这为FAP抑制剂的临床应用提供了广阔的前景.目前,由于FAP的外肽酶和内肽酶活性,大多数FAP检测方法难以区分FAP与DPP4和PREP之间的活性差别,在FAP抑制剂的研发方面无法兼具高选择性和高通量筛选的特点,这使得国内外绝大多数抑制剂在其选择性上具有一定的缺陷.因此,快速高效的FAP检测方法开发已经成为该领域研究的重要核心之一.荧光检测法是近几年快速发展的一类检测方法,检测方便快捷的优点使FAP抑制剂的高通量筛选得以实现,FAP高选择性荧光探针的研发也成为开发FAP特异性抑制剂的重点,并推动抑制剂与FAP构效关系的研究.随着FAP相关研究的深入,FAP在生理功能及其在相关疾病中的调控方式将越发清晰,FAP作为选择性治疗肿瘤和RA的潜在靶点,在临床上的应用也会愈加广泛,而FAP特异性抑制剂也将成为FAP靶向药物开发的重点研究方向.

参 考 文 献

- [1] Rettig W J, Chesa P G, Beresford H R, *et al.* Differential expression of cell surface antigens and glial fibrillary acidic protein in human astrocytoma subsets. *Cancer Res*, 1986, **46**(12): 6406-6412
- [2] Zi F M, He J S, He D H, *et al.* Fibroblast activation protein alpha in tumor microenvironment: recent progression and implications. *Mol Med Report*, 2015, **11**(5): 3203-3211
- [3] Cheng J D, Valianou M, Canutescu A A, *et al.* Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther*, 2005, **4**(3): 351-360
- [4] Huang Y Y, Zhou S F, Huang Y, *et al.* Isolation of fibroblast-activation poetein-specific cancer-associated fibroblasts. *Biomed Research International*, 2017: 4825108
- [5] Liu R, Li H, Liu L, *et al.* Fibroblast activation protein A potential therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, 2012, **13**(3): 123-129
- [6] Lopez J I, Errarte P, Erramuzpe A, *et al.* Fibroblast activation protein predicts prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Hum Pathol*, 2016, **54**: 100-105
- [7] Kawase T, Yoshida K, Hino K. Fibroblast activation protein (FAP) expression of cancer-associated fibroblast predicts poor prognosis in patients with pancreatic. *Gastroenterology*, 2013, **144**(5): S869-S869
- [8] Jiang G M, Xu W, Du J, *et al.* The application of the fibroblast activation protein alpha-targeted immunotherapy strategy. *Oncotarget*, 2016, **7**(22): 33472-33482
- [9] Shi M, Yu D H, Chen Y, *et al.* Expression of fibroblast activation protein in human pancreatic adenocarcinoma and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol*, 2012, **18**(8): 840-846
- [10] O'brien P, O'connor B F. Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2008, **1784**(9): 1130-1145
- [11] Aertgeerts K, Levin I, Shi L H, *et al.* Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha. *J Biol Chem*, 2005, **280**(20): 19441-19444
- [12] Pineirosanchez M L, Goldstein L A, Dold J, *et al.* Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J Biol Chem*, 1997, **272**(12): 7595-7601
- [13] Keane F M, Nadvi N A, Yao T W, *et al.* Neuropeptide Y, B-type natriuretic peptide, substance P and peptide YY are novel substrates of fibroblast activation protein-alpha. *Febs Journal*, 2011, **278**(8): 1316-1332
- [14] Yazbeck R, Jaenisch S E, Abbott C A. Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein. *Protoplasma*, 2018, **255**(1): 375-386
- [15] Wang X M, Yao T W, Nadvi N A, *et al.* Fibroblast activation protein and chronic liver disease. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2008, **13**: 3168-3180
- [16] Pure E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. *Oncogene*, 2018, **37**(32): 4343-4357
- [17] Dolznig H, Schweifer N, Puri C, *et al.* Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun*, 2005, **5**: 10
- [18] Garin-Chesa P, Old L J, Rettig W J. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(18): 7235-7239
- [19] Dankbar B, Neugebauer K, Meyer L H, *et al.* Disease-specific upregulation of fibroblast activation protein alpha in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2008, **67**: A31-A32
- [20] Acharya P S, Zukas A, Chandan V, *et al.* Fibroblast activation

- protein: a serine protease expressed at the remodeling interface in idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol*, 2006, **37**(3): 352-360
- [21] Sinnathurai P, Lau W, De Ribeiro A V, *et al.* Fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase IV in rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Intern Med J*, 2014, **44**: 22-23
- [22] Chen H, Yang W W, Wen Q T, *et al.* TGF-beta-induced fibroblast activation protein expression, fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM. *Exp Mol Pathol*, 2009, **87**(3): 189-194
- [23] Da Silva A C, Jammal M P, Etchebehere R M, *et al.* Role of alpha-smooth muscle actin and fibroblast activation protein alpha in ovarian neoplasms. *Gynecol Obstet Invest*, 2018, **83**(4): 381-387
- [24] Lay A J, Zhang H E, McCaughan G W, *et al.* Fibroblast activation protein in liver fibrosis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2019, **24**: 1-17
- [25] Yang L J, Ma L, Lai D M. Over-expression of fibroblast activation protein alpha increases tumor growth in xenografts of ovarian cancer cells. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2013, **45**(11): 928-937
- [26] Meng M Y, Wang W J, Yan J, *et al.* Immunization of stromal cell targeting fibroblast activation protein providing immunotherapy to breast cancer mouse model. *Tumour Biol*, 2016, **37**(8): 10317-10327
- [27] Liu J Y, Huang C Q, Peng C W, *et al.* Stromal fibroblast activation protein alpha promotes gastric cancer progression via epithelial-mesenchymal transition through Wnt/beta-catenin pathway. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1): 1099
- [28] Pan X, Shi H. The expression of fibroblast activation protein (FAP) in human lung cancer tissues and its clinical significance. *J Thorac Oncol*, 2015, **10**(9): S461-S461
- [29] Wen X Y, He X P, Jiao F, *et al.* Fibroblast activation protein-alpha-positive fibroblasts promote gastric cancer progression and resistance to immune checkpoint blockade. *Oncol Res*, 2017, **25**(4): 629-640
- [30] Fukumoto Y, Yamada Y, Fukuda K, *et al.* Clinical findings on fibroblast activation protein in patients with gastric cancer. *Yonago Acta Med*, 2009, **52**(1): 21-25
- [31] Yang W W, Han W, Ye S Q, *et al.* Fibroblast activation protein-alpha promotes ovarian cancer cell proliferation and invasion via extracellular and intracellular signaling mechanisms. *Exp Mol Pathol*, 2013, **95**(1): 105-110
- [32] Abbas O, Richards J E, Mahalingam M. Fibroblast-activation protein: a single marker that confidently differentiates morpheiform/infiltrative basal cell carcinoma from desmoplastic trichoepithelioma. *Mod Pathol*, 2010, **23**(11): 1535-1543
- [33] Jia J, Martin T A, Ye L, *et al.* Fibroblast activation protein-promotes the growth and migration of lung cancer cells via the PI3K and sonic hedgehog pathways. *Int J Mol Med*, 2018, **41**(1): 275-283
- [34] Chen W T, Kelly T. Seprase complexes in cellular invasiveness. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, **22**(2-3): 259-269
- [35] Lee H O, Mullins S R, Franco-Barraza J, *et al.* FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer*, 2011, **11**: 245
- [36] Huang Y, Wang S, Kelly T. Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Res*, 2004, **64**(8): 2712-2716
- [37] 王婷, 史伟云, 李素霞, 等. 大鼠角膜新生血管生长与其周围基质内相关生物因子表达关系的研究. *中华眼科杂志*, 2009, **45**(2): 158-163
- Wang T, Shi W Y, Li S X, *et al.* *Chinese Journal of Ophthalmology*, 2009, **45**(2): 158-163
- [38] Zeng C, Wen M, Liu X M. Fibroblast activation protein in osteosarcoma cells promotes angiogenesis via AKT and ERK signaling pathways. *Oncol Lett*, 2018, **15**(4): 6029-6035
- [39] Watanabe S, Noma K, Ohara T, *et al.* Photoimmunotherapy for cancer-associated fibroblasts targeting fibroblast activation protein in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2019, **20**(9): 1234-1248
- [40] Pleshkan V V, Alekseenko I V, Tyulkina D V, *et al.* Fibroblast activation protein (FAP) as a possible target of an antitumor strategy. *Molecular Genetics Microbiology and Virology*, 2016, **31**(3): 125-134
- [41] Fang J X, Xiao L, Joo K I, *et al.* A potent immunotoxin targeting fibroblast activation protein for treatment of breast cancer in mice. *Int J Cancer*, 2016, **138**(4): 1013-1023
- [42] Loktev A, Lindner T, Burger E M, *et al.* Development of fibroblast activation protein-targeted radiotracers with improved tumor retention. *J Nucl Med*, 2019, **60**(10): 1421-1429
- [43] Chen M H, Xu G C, Fan M, *et al.* Anti-tumour effects of a xenogeneic fibroblast activation protein-based whole cell tumour vaccine in murine tumour models. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 2019, **47**(1): 4182-4193
- [44] Chai X P, Sun G L, Fang Y F, *et al.* Tumor-targeting efficacy of a BF211 prodrug through hydrolysis by fibroblast activation protein-alpha. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, **39**(3): 415-424
- [45] Bauer S, Jendro M C, Wadle A, *et al.* Fibroblast activation protein is expressed by rheumatoid myofibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 2006, **8**(6): R171
- [46] Jakobs M, Fritsche-Guenthe R. Specificity of inhibitors and frequency of expression of target proteins used to study cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: comment on the article by Ospelt *et al.* *Arthritis Rheum*, 2010, **62**(11): 3513-3514
- [47] Kelly T. Fibroblast activation protein-alpha and dipeptidyl peptidase IV (CD26): Cell-surface proteases that activate cell signaling and are potential targets for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, 2005, **8**(1-2): 51-58
- [48] Ospelt C, Mertens J C, Jungel A, *et al.* Inhibition of fibroblast activation protein and dipeptidylpeptidase 4 increases cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2010, **62**(5): 1224-1235
- [49] Pham C T N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of

- inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2006, **6**(7): 541-550
- [50] Suryavanshi M, Mehta A, Jaipuria J, *et al.* Clinical utility of RT-PCR in assessing HER 2 gene expression versus traditional IHC and FISH in breast cancer patients. *Breast Cancer*, 2018, **25**(4): 416-430
- [51] Ma L, Zeng F W, Huang B H, *et al.* Development of a conventional RT-PCR assay for rapid detection of porcine deltacoronavirus with the same detection limit as a SYBR green-based real-time RT-PCR assay. *Biomed Research International*, 2018, **2018**: 5035139
- [52] Giordano M, Bruno R, Ali G, *et al.* Evaluation of aberrant ALK expression in lung cancer by RT-PCR and comparison with FISH and immunohistochemistry. *J Thorac Oncol*, 2017, **12**(1): S1165-S1166
- [53] Lee J, Fassnacht M, Nair S, *et al.* Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 2005, **65**(23): 11156-11163
- [54] Panse G, Subtil A. CD117 immunohistochemistry in sarcomatoid porocarcinoma. *J Cutan Pathol*, 2017, **44**(6): 596-598
- [55] Sukswai N, Khoury J D. Immunohistochemistry innovations for diagnosis and tissue-based biomarker detection. *Curr Hematol Malig Rep*, 2019, **14**(5): 368-375
- [56] Pelster M W, Amin S M, Yoo S. Multiple recurrent squamous cell carcinomas and utility of anticytokeratin immunohistochemistry. *JAAD Case Reports*, 2016, **2**(4): 346-349
- [57] Kraman M, Bambrough P J, Arnold J N, *et al.* Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α . *Science*, 2010, **330**(6005): 827-830
- [58] Santos A M, Jung J, Aziz N, *et al.* Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest*, 2009, **119**(12): 3613-3625
- [59] Mavin S, Evans R, Cornulier T, *et al.* The development of an IgG avidity Western blot with potential to differentiate patients with active Lyme borreliosis from those with past infection. *J Microbiol Methods*, 2018, **146**: 71-76
- [60] Schwartz K, Bochkariov D. Novel chemiluminescent western blot blocking and antibody incubation solution for enhanced antibody-antigen interaction and increased specificity. *Electrophoresis*, 2017, **38**(20): 2631-2637
- [61] Lee K N, Jackson K W, Christiansen V J, *et al.* Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood*, 2006, **107**(4): 1397-1404
- [62] Edosada C Y, Quan C, Tran T, *et al.* Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly(2) -Pro(1) -cleaving specificity. *FEBS Lett*, 2006, **580**(6): 1581-1586
- [63] Zou L W, Wang P, Qian X K, *et al.* A highly specific ratiometric two-photon fluorescent probe to detect dipeptidyl peptidase IV in plasma and living systems. *Biosens Bioelectron*, 2017, **90**: 283-289
- [64] Jin Q, Feng L, Wang D D, *et al.* A highly selective near-infrared fluorescent probe for carboxylesterase 2 and its bioimaging applications in living cells and animals. *Biosens Bioelectron*, 2016, **83**: 193-199
- [65] Lv X, Ge G B, Feng L, *et al.* An optimized ratiometric fluorescent probe for sensing human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and its biological applications. *Biosens Bioelectron*, 2015, **72**: 261-267
- [66] Feng L, Liu Z M, Hou J, *et al.* A highly selective fluorescent ES IPT probe for the detection of Human carboxylesterase 2 and its biological applications. *Biosens Bioelectron*, 2015, **65**: 9-15
- [67] Aggarwal S, Brennen W N, Kole T P, *et al.* Fibroblast activation protein peptide substrates identified from human collagen I derived gelatin cleavage sites. *Biochemistry*, 2008, **47**(3): 1076-1086
- [68] Miao Q Q, Yeo D C, Wiraja C, *et al.* Near-infrared fluorescent molecular probe for sensitive imaging of keloid. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2018, **57**(5): 1256-1260
- [69] Lee K N, Jackson K W, Terzyan S, *et al.* Using substrate specificity of antiplasmin-cleaving enzyme for fibroblast activation protein inhibitor design. *Biochemistry*, 2009, **48**(23): 5149-5158
- [70] Lee K N, Jackson K W, Christiansen V J, *et al.* Enhancement of fibrinolysis by inhibiting enzymatic cleavage of precursor α (2)-antiplasmin. *J Thromb Haemost*, 2011, **9**(5): 987-996
- [71] Collins P J, McMahon G, O'Brien P, *et al.* Purification, identification and characterisation of seprase from bovine serum. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(11): 2320-2333
- [72] Lai K S, Ho N H, Cheng J D, *et al.* Selective fluorescence probes for dipeptidyl peptidase activity-Fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase IV. *Bioconjug Chem*, 2007, **18**(4): 1246-1250
- [73] Li J B, Chen K, Liu H G, *et al.* Activatable near-infrared fluorescent probe for *in vivo* imaging of fibroblast activation protein- α . *Bioconjug Chem*, 2012, **23**(8): 1704-1711
- [74] Xing J, Gong Q Y, Zou R F, *et al.* A novel fibroblast activation protein-targeted near-infrared fluorescent off-on probe for cancer cell detection, *in vitro* and *in vivo* imaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, **6**(10): 1449-1451
- [75] Gong Q Y, Shi W, Li L H, *et al.* Ultrasensitive fluorescent probes reveal an adverse action of dipeptide peptidase IV and fibroblast activation protein during proliferation of cancer cells. *Anal Chem*, 2016, **88**(16): 8309-8314
- [76] Zhang H E, Hamson E J, Koczowska M M, *et al.* Identification of novel natural substrates of fibroblast activation protein- α by differential degradomics and proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2019, **18**(1): 65-85
- [77] Kratochwil C, Lindner T, Giesel F L, *et al.* FAPI-PET/CT (fibroblast activation protein inhibitor) in staging of pancreatic cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2018, **45**: S97-S98
- [78] De Matos R, Vuilleumier J, Mas C, *et al.* Inhibitor-conjugated harmonic nanoparticles targeting fibroblast activation protein. *Rsc Advances*, 2019, **9**(54): 31659-31669
- [79] Plescia J, De Cesco S, Patrascu M B, *et al.* Integrated synthetic, biophysical, and computational investigations of covalent inhibitors of prolyl oligopeptidase and fibroblast activation protein α . *J Med Chem*, 2019, **62**(17): 7874-7884
- [80] Gunderson A J, Yamazaki T, Mccarty K, *et al.* Blockade of

- fibroblast activation protein in combination with radiation treatment in murine models of pancreatic adenocarcinoma. *Plos One*, 2019, **14**(2): e0211117
- [81] Dong R Z, Guo J M, Zhang Z W, *et al.* Polyphyllin I inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating the expression of fibroblast activation protein alpha (FAP) and hepatocyte growth factor (HGF) in cancer-associated fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **497**(4): 1129-1134
- [82] Egger C, Cannet C, Gerard C, *et al.* Effects of the fibroblast activation protein inhibitor, PT100, in a murine model of pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol*, 2017, **809**: 64-72
- [83] Jansen K, De Winter H, Heirbaut L, *et al.* Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a xanthine scaffold. *Medchemcomm*, 2014, **5**(11): 1700-1707
- [84] Tsai T Y, Yeh T K, Chen X, *et al.* Substituted 4-carboxymethylpyroglutamic acid diamides as potent and selective Inhibitors of fibroblast activation protein. *J Med Chem*, 2010, **53**(18): 6572-6583
- [85] Tran T, Quan C, Edosada C Y, *et al.* Synthesis and structure-activity relationship of N-acyl-Gly-, N-acyl-Sar- and N-blocked-boroPro inhibitors of FAP, DPP4, and POP. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**(5): 1438-1442
- [86] Poplawski S E, Lai J H, Li Y H, *et al.* Identification of selective and potent inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase. *J Med Chem*, 2013, **56**(9): 3467-3477
- [87] Ryabtsova O, Jansen K, Van Goethem S, *et al.* Acylated Gly-(2-cyano)pyrrolidines as inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) and the issue of FAP/prolyl oligopeptidase (PREP) - selectivity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, **22**(10): 3412-3417
- [88] Jansen K, Heirbaut L, Cheng J D, *et al.* Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-Quinolinoyl)-glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold. *ACS Med Chem Lett*, 2013, **4**(5): 491-496
- [89] Gilmore B F, Lynas J F, Scott C J, *et al.* Dipeptide proline diphenyl phosphonates are potent, irreversible inhibitors of seprase (FAP alpha). *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **346**(2): 436-446

Research Progress in Fibroblast Activation Protein*

SUN Zhao-Hui, ZOU Li-Wei**, YANG Ling**

(Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract Over the past decade, fibroblast activation protein (FAP), a type II transmembrane serine hydrolase, has been identified and investigated widely in multiple research fields, including biochemistry, pharmacy, clinical medicine, which plays a key role in the metabolism of multiple endogenous peptides and peptide drugs. With the researching of FAP on its physiological functions and the relationships between FAP and clinical diseases, the biological or pathological processes of FAP in normal human or FAP-related diseases has been more clearer. Besides of being a potential therapeutic target for the treatment of cancer, FAP also serves as diagnostic markers for some diseases such as tumor and rheumatoid arthritis. Therefore, a variety of FAP detection methods and inhibitors have been reported. Based on FAP structural features, catalytic properties, endogenous substrate characteristics and exogenous substrate preferences, tissue distribution and specificity, and biological functions, this review not only analyzed the advantages and disadvantages of current FAP detection methods (*in vitro* and *in vivo*) and inhibitors but also summarized the structural characteristics of FAP detection substrates and the potential structure-activity relationship of inhibitors. This review will provide an overview of reference values and important reference value for the development of FAP-specific detection methods and potent inhibitors.

Key words fibroblast activation protein, tumor, analysis methods, fluorescent probes, inhibitors

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0218

* This work is supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21602219, 81773810, 81973393), National Basic Research Program of China (2017YFC1702000) and Shenyang Science and Technology Bureau (17-230-9-05).

** Corresponding author.

Tel: 86-21-51323182

ZOU Li-Wei. E-mail: chemzlw@163.com

YANG Ling. E-mail: yling@shutcm.edu.cn

Received: September 19, 2019 Accepted: December 4, 2019