

论著

文章编号:1000-5404(2012)07-0662-04

转录因子 FoxO1 在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义

朱允和¹, 向小勇¹, 陈力², 沈学远² (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院心胸外科¹; 402160 重庆, 重庆医科大学附属永川医院心胸外科²)

[摘要] 目的 检测 FoxO1 在食管鳞状细胞癌组织中的表达水平, 分析其与食管鳞状细胞癌各临床病理因素的关系。方法 应用实时荧光定量 PCR SYBR Green 荧光染料法, 检测 42 例手术切除的食管鳞癌组织及配对的正常食管黏膜组织中 FoxO1 mRNA 的表达; 免疫组化 S-P 法检测 FoxO1 蛋白的表达及组织学定位。结果 正常食管黏膜组织中 FoxO1 mRNA 及蛋白均呈低表达, 而食管鳞癌组织中 FoxO1 mRNA 及蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。高分化食管鳞癌组织的相对表达量显著高于中低分化食管鳞癌组织 ($P < 0.01$)。食管鳞癌组织中 FoxO1 mRNA 及蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤发生部位、TNM 分期及有无淋巴结转移无明显相关性 ($P > 0.05$)。结论 FoxO1 在正常食管黏膜组织和食管鳞癌组织中的表达存在明显差异, 其表达水平与肿瘤分化程度密切相关。

[关键词] FoxO1; 食管鳞癌; 实时荧光定量 PCR; 免疫组化

[中图分类号] R735.1; R394.3; R730.23

[文献标志码] A

Expression and clinical significance of transcription factor FoxO1 in human esophageal squamous carcinoma

Zhu Yunhe¹, Xiang Xiaoyong¹, Chen Li², Shen Xueyuan² (¹Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; ²Department of Cardiothoracic Surgery, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China)

[Abstract] **Objective** To determine the expression of transcription factor FoxO1, and its correlations to the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** SYBR green real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase PCR was used to detect the expression levels of FoxO1 mRNA in 42 matched pairs of ESCC tissues and normal samples. The protein expression and location of FoxO1 were measured by immunohistochemistry (SP method). The expression was analyzed with gender, age, site, TNM stage, lymphatic metastasis, and tumor cell differentiation. **Results** The expression of FoxO1 at mRNA or protein levels was upregulated significantly in ESCC tissues compared with normal esophageal epithelium tissues ($P < 0.01$). The expression of FoxO1 was higher in well differentiated ESCC than in poorly differentiated ESCC and normal esophageal epithelium tissues ($P < 0.01$). However, the expression of FoxO1 was not correlated to clinicopathological characters, such as gender, age, tumor site, TNM stage, lymphatic metastases and tumor cell differentiation ($P > 0.05$). The protein expression of FoxO1 was consistent with that of its mRNA expression. **Conclusion** The expression of FoxO1 varies significantly in ESCC and normal esophageal epithelium tissues. Over-expression of FoxO1 is closely related to the differentiation of ESCC.

[Key words] FoxO1; esophageal squamous cell carcinoma; real-time quantitative RT-PCR; immunohistochemistry

Corresponding author: Xuabg Xiaoyong, Tel: 86-23-89011132, E-mail: Charliexiang@sina.com

食管癌是目前世界范围内发病率和死亡率都较高的恶性肿瘤之一, 至今未能阐明其发病机制。FoxO 转录因子是 Forkhead 蛋白大家族的一个亚群, 广泛表达于心、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、胰腺、脾、胸腺、前列腺、

睾丸、卵巢和结肠等器官^[1]。转录因子 FoxO1 作为 FoxO 重要成员之一, 是近年来国内学者发现的又一具有自噬活性蛋白因子, 在肿瘤的形成和发展中发挥着重要作用。本研究应用实时荧光定量 PCR 及免疫组化技术, 检测 FoxO1 基因在食管鳞癌组织中的表达与

[通信作者] 向小勇, 电话: (023) 89011132, E-mail: Charliexiang@sina.com

定位,并分析其表达与临床病理因素之间的关系,以探讨其在食管鳞癌发生、发展中的重要作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取重庆医科大学附属第一医院、附属永川医院胸外科2010年3月至2011年1月间手术切除的食管鳞癌标本42例,所有病例术前均未经放疗、化疗及免疫治疗,术后经病理证实。年龄49~81岁,中位年龄67岁;男性30例,女性12例;高分化25例,中分化8例,低分化9例;食管上段癌7例,中段癌25例,下段癌10例;I期和II期33例,III期和IV期9例;有淋巴结转移12例,无转移30例。正常食管黏膜组织取自距肿瘤边缘4cm以上的食管黏膜组织,病理HE染色证实。肿瘤临床分期根据2009年第7版国际抗癌联盟(UICC)食管癌TNM分期标准。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗人FoxO1单克隆抗体购于Cell Signaling Technology(CST)公司;兔抗人Ki-67多克隆抗体、S-P免疫组化染色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;柠檬酸盐抗原修复液、DAB显色液、PBS缓冲液等购于福州迈新生物技术有限公司,TRIzol Reagent、HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司,BIO-RAD CFX96实时定量PCR仪、iQ SYBR Green Supermix购于成都百乐科技有限公司,Nanodrop2000分光光度计购于Thermo Fisher Scientific公司。

1.3 方法

1.3.1 RNA提取及纯度测定 取100mg待测样本组织,应用TRIzol RNA提取液,严格按照说明书操作进行提取总RNA,Nanodrop2000分光光度计测定其纯度, $D(260)/D(280)$ 值在1.8~2.1之间符合要求,置于-80℃冰箱保存备用。

1.3.2 合成cDNA 逆转录反应体系:总RNA 1μl(0.6μg/μl),dNTP Mix 4μl,Primer Mix 2μl,5×RT Buffer 4μl,0.1mol/L DTT 2μl,200U/μl HiFi-MMLV 1μl,RNase-Free Water补足至20μl。反应条件:42℃孵育50min,70℃孵育15min,反应结束,短暂离心,置于-20℃冰箱保存备用。

1.3.3 实时荧光定量PCR检测FoxO1基因的表达 应用BIO-RAD CFX96实时定量PCR仪检测FoxO1 mRNA的相对表达量,引物由上海生物工程有限公司设计并合成,选取β-actin^[2]作为内参。FoxO1上游:5'-CCAGCCCAAACCTACCAAAAATA-3',下游:5'-TTATGGGGAGGAGAGTCAGAAG-3',扩增产物片段172bp。β-actin上游:5'-CGGGAAATCGTGCCGTGACATTAAG-3',下游:5'-TGATCTCCTTCTGCATCCTGTCGG-3',扩增产物片段337bp。25μl PCR反应体系:SYBR Green Supermix 12.5μl,引物各0.8μl,cDNA模板2μl,加双蒸水补足至25μl。反应条件:95℃预变性3min,95℃变性15s,59℃退火20s,72℃延伸20s,40个循环。将食管鳞癌组织及正常食管黏膜组织的cDNA原液,按1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000倍稀释,构建FoxO1及β-actin扩增后的标准曲线。

1.4 免疫组化S-P法检测FoxO1蛋白的表达

常规石蜡切片脱蜡、水化,柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)高

温沸抗原修复20min;3% H₂O₂孵育10min,消除内源性过氧化物酶活性;PBS冲洗后滴加封闭用山羊血清孵育15min,阻断非特异性反应;PBS冲洗后滴加FoxO1抗体(1:100),4℃过夜;PBS冲洗后滴加生物素化二抗;PBS冲洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液;PBS冲洗后DAB显色;苏木精复染,酒精脱水、树胶封片、镜检。以PBS代替一抗作为阴性对照。

FoxO1阳性染色主要部位是细胞质,细胞质出现黄色、棕黄色或棕褐色为阳性细胞。FoxO1蛋白表达依据细胞阳性着色率及着色深度综合计算其表达量。根据着色深度分为弱阳性(+);中等阳性(++);强阳性(+++),依次记为1、2、3分。根据阳性细胞数可分为:阴性(-):无阳性细胞着色;弱阳性(+):阳性细胞数在1%~25%;中等阳性(++):阳性细胞数在26%~50%;强阳性(+++):阳性细胞数>51%,依次记为1、2、3分。二者乘积<2为低表达,≥3为高表达,随机观察5个400高倍镜视野,取其平均数值。结果由两位病理科副主任医师独立阅片后统一得出。

1.5 统计学方法

应用SPSS 17.0统计软件,FoxO1在食管鳞状细胞癌组织与配对的癌旁组织之间用Wilcoxon Signed Ranks Test;FoxO1在食管鳞状细胞癌组织表达评分与临床病理特征的关系用χ²检验或Fisher确切概率法,3组间比较用Kruskal-Wallis H检验,其表达相关性用Spearman相关性分析;正常食管黏膜组织与食管鳞癌组织两组之间比较采用配对t检验。

2 结果

2.1 PCR扩增产物的特异性

PCR温度梯度实验显示最佳退火温度为59℃,熔解曲线显示单峰集中,说明产物特异性较好。实时荧光定量PCR的标准曲线中,cDNA浓度梯度实验中各起始浓度的对数值与Ct值成一条直线;FoxO1及β-actin的标准曲线斜率分别为-3.10、-2.71;纵截距为27.633、37.503;相关系数r²为0.9928、0.9960,线性关系良好(图1~3)。

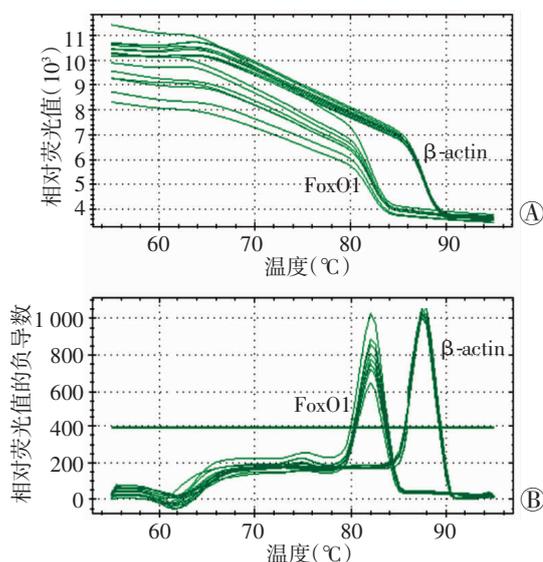


图1 FoxO1(A)及β-actin(B)的熔解曲线分析

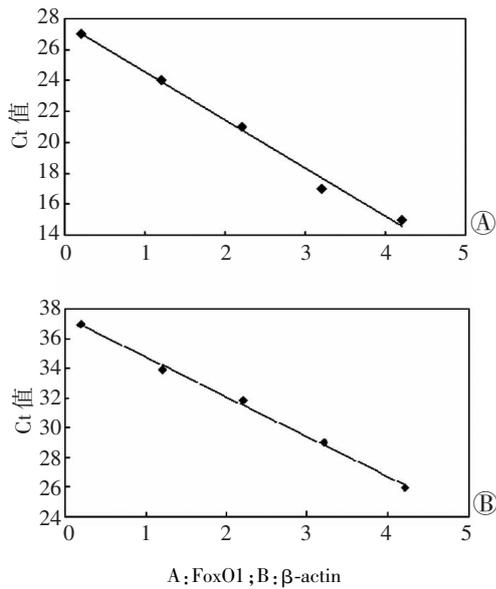


图2 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 倍梯度稀释食管鳞癌组织的cDNA为模板构建的FoxO1及 β -actin扩增的标准曲线(log-Ct)

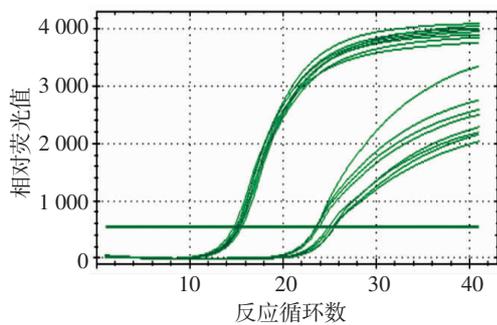


图3 FoxO1及 β -actin的反应扩增曲线分析

2.2 食管鳞癌组织中FoxO1 mRNA及 β -actin mRNA的表达

设癌旁正常食管黏膜组织中FoxO1 mRNA的相对表达量为1.000,计算出42例食管鳞癌组织中,FoxO1 mRNA的相对表达量为 (6.279 ± 2.269) ,二者之间的差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 FoxO1蛋白在食管鳞癌组织中的表达

免疫组化染色结果显示:在食管鳞癌组织石蜡切片中,FoxO1单克隆抗体显示明确的细胞质着色。正常食管黏膜组织不显色或仅有少许着色,主要也在细胞质内;正常食管鳞状上皮和食管鳞癌组织比较,FoxO1蛋白表达具有显著性差异($P < 0.01$)。在食管鳞癌组织中,FoxO1的表达明显增强,阳性表达率76.19%(32/42);正常食管黏膜组织中阳性表达率仅为19.05%(8/42)。见图4。

2.4 FoxO1在食管鳞癌组织中的表达与临床病理特征的关系

FoxO1蛋白阳性表达均与患者性别、年龄、肿瘤发生部位、分期及有无淋巴结转移等无明显相关性($P > 0.05$),而肿瘤的分化程度与FoxO1蛋白表达具有显著差异($P < 0.01$)。随肿瘤组织分化程度升高,FoxO1蛋白表达显著增强($P < 0.01$) (表1)。

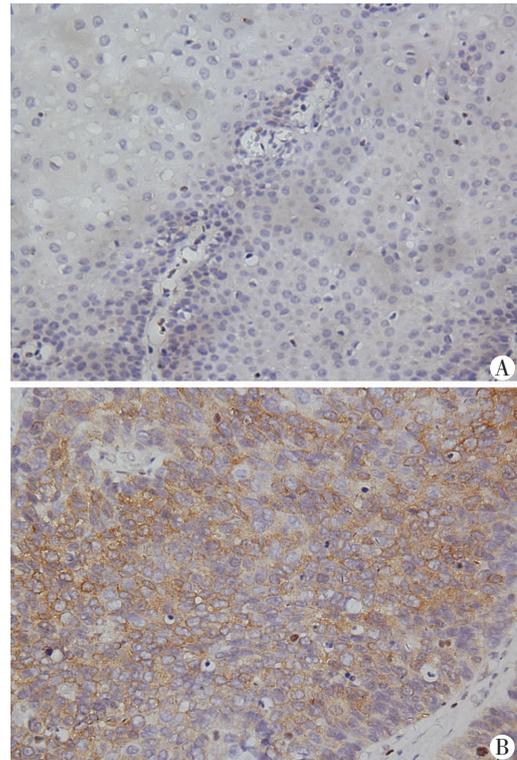


图4 FoxO1蛋白在正常食管黏膜和食管鳞癌组织中的表达(S-P $\times 400$)

表1 FoxO1蛋白在食管鳞癌组织中的表达与临床病理特征的关系

临床指标	n	阳性表达[例数(%)]
年龄(岁)		
≤60	12	9(75.00)
>60	30	23(76.67)
性别		
男	30	24(80.00)
女	12	8(66.67)
肿瘤部位		
上段	7	5(71.43)
中段	25	20(80.00)
下段	10	7(70.00)
分化程度		
低分化	9	3(33.33) ^a
中分化	8	5(62.50) ^a
高分化	25	24(96.00)
TNM分期		
I期+II期	33	25(75.75)
III期+IV期	9	7(77.78)
淋巴结有无转移		
有	12	9(75.00)
无	30	23(76.67)

a: $P < 0.01$,与高分化比较

3 讨论

Forkhead转录因子是2000年正式统一命名的1

个新的转录因子家族^[3],从1989年发现第一个 Forkhead 基因以来,目前该家族已超过100个成员,分为17个亚家族,FoxA~Q,它们功能复杂多样。其中研究最为深入的是O亚家族。FoxO转录因子在哺乳动物中有4个成员,包括FoxO1、FoxO3a、FoxO4和FoxO6,分别有不同的基因编码,并定位于不同的染色体上。FoxO1基因亦称FoxO1a、FKHR或FKH1,是FoxO家族的重要一员,定位于人染色体:13q14.1。FoxO1是胰岛素/胰岛素样生长因子-1(INS/IGF-1)信号通路中的关键下游分子,直接受上游分子PI3K/Akt磷酸化作用调节,与细胞周期、细胞凋亡、衰老及代谢有着密切联系。同时,FoxO1在机体细胞的增殖、凋亡、分化和抵抗氧化应激方面发挥重要作用^[4]。近年来,国内外学者研究发现FoxO1与机体的肿瘤发生、发展有着密切关系。

目前,国内外关于FoxO1基因的研究主要集中在乳腺癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、宫颈癌、结肠癌、横纹肌肉瘤和急性白血病等恶性肿瘤,以及糖尿病等方面,尚少见在食管癌方面的研究报道。在肿瘤研究中,多数学者主要是通过研究FoxO1基因的转录调控和信号转导途径,来解释FoxO1的功能,仅有少数学者将其作为肿瘤细胞凋亡或自噬作用中的关键分子而深入研究^[5]。Guttilla等^[6]研究报道乳腺癌组织中FoxO mRNA表达下调。Myatt等^[7]报道在子宫内膜癌中FoxO1 mRNA及其蛋白低表达或不表达,而在正常子宫内膜组织中均高表达,细胞质和细胞核有着色。国内学者颜亚晖等^[8]报道在乳腺癌中FoxO1蛋白稳定表达于细胞核,FoxO1蛋白在浸润性导管癌和导管内癌中的阳性表达率和表达强度显著低于导管内乳头状瘤和正常乳腺组织($P < 0.01$)。周英姿等^[9]报道在胃癌组织中FoxO1主要表达于细胞质,在高分化腺癌中,细胞核及细胞质均着色,在低分化腺癌和正常胃黏膜中不表达或是低表达。而我国学者朱卫国等研究发现FoxO1蛋白是诱导细胞自噬的关键蛋白,从而揭示了FoxO1作为抑癌因子抗肿瘤的新的作用机制,否定了以往研究报道FoxO1诱导的细胞死亡是细胞凋亡的结论。

本研究结果显示:FoxO1 mRNA及蛋白在食管鳞癌中的表达明显高于正常食管黏膜组织,提示FoxO1的表达与食管鳞癌的发生有着密切的关系。推测其原因:FoxO1转录因子广泛表达于人体各组织器官中,包括心、脑、胎盘、肺、肝、骨骼肌、肾、胰腺、脾、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠和外周血白细胞等^[7,10-11]。

FoxO1在胚胎时期主要表达于肌肉组织,成年后主要表达于脂肪组织,故FoxO1基因表达具有时空差异。因此,该基因可能在食管鳞癌中发挥着不同于其他器官肿瘤的作用机制。实验结果还表明FoxO1基因在食管鳞癌中的表达与肿瘤细胞分化程度密切相关($P < 0.01$),肿瘤组织分化程度越低,基因表达越高,提示FoxO1在食管鳞癌组织恶变过程中起到非常重要的作用。其作用机制需进一步研究阐明。

随着基因组和蛋白组学的不断深入研究,转录因子FoxO1的功能将不断被揭示。同样随食管鳞癌的深入研究,FoxO1可能在其发生、发展中起到重要的作用,但能否成为食管鳞癌临床诊断和判断肿瘤生物学行为的重要指标,仍需要大量的实验证实。

参考文献:

- [1] Anderson M J, Viars C S, Czekay S, *et al.* Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily[J]. *Genomics*, 1998, 47(2): 187-199.
- [2] Kang S, Xu H, Duan X, *et al.* PCD1, a novel gene containing PDZ and LIM domains, is overexpressed in several human cancers[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(18): 5296-5302.
- [3] Kaestner K H, Knochel W, Martinez D E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2): 142-146.
- [4] Greer E L, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7410-7425.
- [5] Medema R H, Jaattela M. Cytosolic FoxO1: alive and killing[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(7): 642-643.
- [6] Guttilla I K, White B A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35): 23204-23216.
- [7] Myatt S S, Wang J, Monteiro L J *et al.* Repression of FOXO1 expression by microRNAs in endometrial cancer[J]. *Cancer*, 2010, 70(1): 367-377.
- [8] 颜亚晖, 钱燕春. 乳腺癌组织中FOXO1蛋白表达与细胞增殖和细胞凋亡的相关性[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(4): 380-384.
- [9] 周英姿, 张友元, 桂律, 等. FOXO1A及FLASH在胃癌组织中的表达及其意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2010, 37(6): 675-678.
- [10] 卢忠燕, 甘立霞, 缪洪明, 等. FOXO1在胰岛β细胞中的表达及对增殖凋亡功能的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(1): 50-56.
- [11] Rached M T, Kode A, Xu L, *et al.* FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(2): 147-160.

(收稿:2011-10-15;修回:2011-12-15)

(编辑 栾嘉)