

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.06.018

FOXO1A 及 FLASH 在胃癌组织中的表达及其意义

周英姿,张友元,桂 律,罗金芳

Significance and Expression of FOXO1A and FLASH in Human Gastric Carcinoma

ZHOU Ying-zi, ZHANG You-yuan, GUI Lv, LUO Jin-fang

Department of Pathology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China

Corresponding Author: ZHANG You-yuan, E-mail: jsyzyz@163.com

Abstract: Objective To study the significance of FOXO1A, FLASH expression and analyzed their relationship with tumor clinicopathological features. **Methods** FOXO1A and FLASH expression were examined by immunohistochemical staining method in 68 cases of human gastric cancer compared with human normal gastric tissue. Further analysis was performed to make sure their relationship with some tumor clinicopathological features. **Results** In gastric carcinomas, the expression of FOXO1A, FLASH were 73.53%(50/68) and 77.94%(53/68) respectively. There were no significant associations between FLASH and age, tumor location, tumor size, depth of penetration or lymphatic metastasis. Besides grading, the expression of FOXO1A was related to gender too and higher in male. There was no significant correlation between the expression of FOXO1A and FLASH. In intraepithelial neoplasia gastric mucosa, the expression of FOXO1A and FLASH presents intensive positively. Their expression in epithelial cells of normal gastric mucosa was shown as no or very weak intensity. **Conclusion** In conclusion, our results showed that the expression of FOXO1A and FLASH is a frequent event in highly differentiated gastric carcinoma, and may play important role in tumorigenesis and tumor development. There was no significant correlation between the expression of FOXO1A and FLASH.

Key words: Gastric carcinoma; Intraepithelial neoplasia; FOXO1A; FLASH

摘要:目的 探讨 FOXO1A 及 FLASH 在胃癌组织中的表达及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学方法,对 68 例胃癌切除标本中 FOXO1A 及 FLASH 的表达情况进行检测。分析两种基因表达与胃癌临床病理参数的关系。**结果** 在胃癌组织中,FOXO1A 及 FLASH 的阳性表达率分别为 73.53%(50/68)和 77.94%(53/68)。FLASH 的表达与患者的年龄、性别、肿块的位置、大小、淋巴结转移、浸润深度等均无关,只与肿瘤的分化程度呈负相关。FOXO1A 的表达除与肿瘤分化程度呈负相关之外,还与患者性别相关。配对卡方分析显示 FLASH 和 FOXO1A 之间并无显著关联。在癌旁组织中,两种基因的表达主要在上皮内肿瘤病变区,在正常黏膜中不表达或呈极弱表达。**结论** FOXO1A、FLASH 在高分化胃癌中的表达属高频发事件,它们可能在胃癌的肿瘤发生和发展过程中起到了一定的作用。两基因表达在统计学上并未有显著的关系。

关键词: 胃癌;上皮内肿瘤; FOXO1A; FLASH

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)06-0675-04

0 引言

胃癌是我国的第三大常见肿瘤(在男性中仅次于肺癌和肝癌,女性位于乳腺癌和肺癌之后)^[1],尽管胃癌在综合治疗方面取得了许多进展,但是 5 年生存率仍然徘徊在 30%~40%左右^[2]。

Fox(forkhead)蛋白家族是 2000 年正式发布统一命名的一种转录因子,在进化上具有一个螺旋-转角-螺旋基序,3 α 螺旋和 2 个大环形成翼状(winged)结构保守的含 110 个氨基酸序列的 DNA 结合结构域。FOXO 主要通过转录调控和信号转导途径在动物的生长发育、细胞分化、代谢、凋亡、炎症和免疫等方面起重要作用^[3-5]。FLASH(Flice-associated huge protein)亦称为 caspase8 相关蛋白 2,在 Fas 诱导的凋亡过程中起传递作用。另外,FLASH 还被证实参与 TNF 诱导的 NF-kappaB 激

收稿日期:2009-02-19;修回日期:2009-05-15

作者单位:200540 上海,复旦大学附属金山医院病理科

通信作者:张友元, E-mail:jsyzyz@163.com

作者简介:周英姿(1982-),女,硕士,主要从事肿瘤病理的研究

活、凋亡信号细胞周期进程、细胞分化和分裂。FLASH 的这些功能对肿瘤发生起着重要的作用,但是目前为止对 FLASH 基因改变在人类肿瘤中的表达还所知甚少^[6-9]。我们在这里对两种基因在胃癌发生和发展中的作用进行探讨,以期进一步了解胃癌的发病机制。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 病例收集 收集复旦大学附属金山医院 2005 年 1 月~2007 年 12 月间手术切除的胃癌标本,从中选取带有癌旁胃黏膜的癌组织标本 68 例作为研究对象。68 例胃癌标本均有完整的临床和病理资料,所有病例均未接受过术前放化疗。其中男 49 例,女 19 例,中位年龄 61 岁(32~85 岁)。有淋巴结转移的 19 例,无淋巴结转移的 49 例,且每例剥离的淋巴结数目均不低于 15 枚(根据 2003 年 UICC/AJCC 第 6 版之规定)。高分化腺癌 8 例、中等分化 29 例、低分化 23 例及印戒细胞癌 8 例,癌旁胃黏膜中有 17 例伴上皮内肿瘤病变。肿瘤主要位于胃窦、胃角(26 例),胃体、贲门(42 例)。

1.1.2 试剂与方法 兔抗人 FOXO1A 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司,工作浓度 1:100;兔抗人 FLASH 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,工作浓度为 1:100。

免疫组织化学采用二步法。石蜡包埋组织 4 μm 厚连续切片,常规脱腊至水,置于 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中加热行抗原修复。修复后经冷却、PBS 洗涤,滴加一抗兔抗人 FOXO1A 多克隆抗体,浓度 1:100,兔抗人 FLASH 多克隆抗体湿盒内过夜。PBS 洗后滴加二抗(上海长岛生物技术有限公司),孵育 1 h。再 PBS 洗涤,DAB 显色,苏木精复染,树胶封片,显微镜下观察。PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,癌旁黏膜组织作为阳性对照。

1.2 结果判定

免疫组织化学结果由两位经验丰富的病理医生在不知晓临床资料的情况下做出,并达成了很高的一致率(>90%),不一致的经共同商讨后亦达成了共识。FOXO1A 在癌细胞的表达着色超过核心区域的 10%即判定为阳性^[4]。FLASH 阳性着色定位于细胞质,当全片中超过 30%的肿瘤细胞阳性时判定为阳性,否则为阴性。

1.3 统计学方法

两种基因与性别、年龄、肿瘤位置、肿瘤最大径、pN、pT 间的关系,使用 stata 8.0 分析软件进行

方差分析。分化程度采用 SAS 统计软件 CMH 分析法进行分析。两种基因间的关系,采用 stata 8.0 配对卡方的方法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXO1A 在胃癌中的表达

FOXO1A 阳性着色主要定位于细胞质,但在分化较好的病例中细胞质、细胞核均着色。68 例胃癌中 FOXO1A 阳性表达率为 73.53%(50/68)。在不同分化程度的胃腺癌中,FOXO1A 的表达程度不同,在高分化腺癌中,FOXO1A 阳性表达率为 100%,且阳性着色深,细胞核及细胞质均着色。在低分化腺癌中,FOXO1A 不表达或阳性着色淡。在 8 例印戒细胞癌中,所有病例均无 FOXO1A 表达。

在癌旁胃黏膜中,FOXO1A 在上皮内瘤病变区的阳性表达率为 100%,并出现较强表达;而在正常黏膜中,FOXO1A 无表达或呈现极弱的表达,见表 1、图 1。

2.2 FLASH 在胃癌中的表达

68 例胃癌中 FLASH 阳性表达率为 77.94%(53/68)。在不同分化程度的胃腺癌中 FLASH 的表达程度与 FOXO1A 的表达情况一致。在癌旁胃黏膜中,两种基因的表达也具有 consistency,见表 1、图 2。

2.3 FOXO1A,FLASH 的表达与临床病理指标的关系

我们的数据表明,FOXO1A 的表达与患者的年龄、肿块的位置、浸润深度、淋巴结转移等无关,与肿瘤的分化程度呈负相关。另外 FOXO1A 的表达还与性别相关,患者中男性阳性比例高于女性。

FLASH 的表达与患者的年龄、性别、肿块的位置、浸润深度、淋巴结转移等均无关,其表达只与肿瘤的分化程度呈负相关,见表 2。

2.4 FOXO1A,FLASH 的表达的相关性

配对卡方分析显示两者表达无明显相关性($P = 0.5078$),见表 3。

表 1 FOXO1A 及 FLASH 在胃癌中的表达

Table 1 The expression of FOXO1A and FLASH in gastric carcinoma

Tissues	FOXO1A positive (%)	FLASH positive (%)
Adenocarcinoma	50(73.53)	53(77.94)
Intraepithelial neoplasia	17(100.00)	17(100.00)
Signet-ring cell carcinoma	0(0.00)	0(0.00)

表 2 FOXO1A 及 FLASH 表达与胃癌临床病理参数的关系

Table 2 Correlations between expression of FOXO1A, FLASH and clinicopathological parameters in gastric carcinoma

Clinicopathological parameters	n	positive(%)		positive(%)	
		FOXO1A	P	FLASH	P
Age(years)			0.818		0.625
<60	28	21(75.00)		21(75.00)	
≥60	40	29(72.50)		32(80.00)	
Gender			0.015*		0.238
Male	49	39(79.59)		40(81.63)	
Female	19	11(57.89)		13(68.42)	
Location			0.527		0.873
Antrum	26	18(69.23)		20(76.92)	
Body and cardiac	42	32(76.19)		33(78.57)	
pN			0.395		0.288
pN0	19	12(63.16)		14(73.68)	
pN1	29	22(75.86)		22(75.86)	
pN2	15	13(86.67)		14(99.33)	
pN3	5	3(60.00)		3(60.00)	
pT			0.225		0.964
T1,T2	23	19(82.60)		18(78.26)	
T3,T4	45	31(68.89)		35(77.78)	
Largest dimension(cm)			0.090		0.161
≤3	28	17(60.71)		19(67.86)	
>3	40	33(82.00)		34(85.00)	
Differentiated degree			<0.0001*		<0.0001*
Well	8	8(100.00)		8(100.00)	
Moderately	29	26(89.66)		27(39.13)	
Poorly	23	16(69.57)		18(78.26)	

Note: * : P<0.05, the difference has a statistically significance

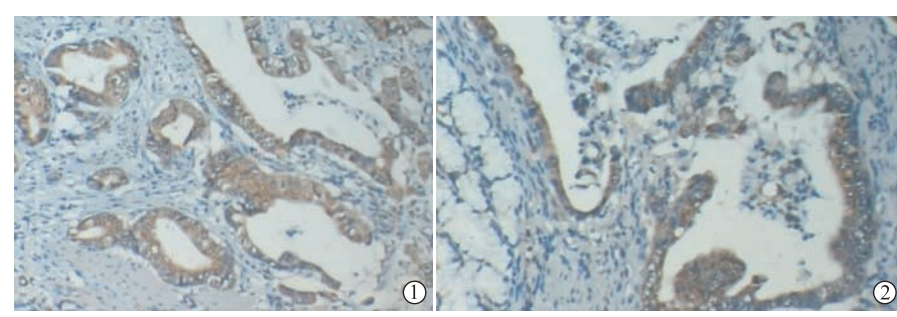


图 1 胃癌中 FOXO1A 高表达, 阳性着色主要定位于细胞质 (HE×200) 图 2 FLASH 在胃癌细胞中的表达 (HE×200)
 Figure 1 Gastric carcinoma cells showing cytoplasmic FOXO1A expression with or without nuclear staining (HE×200)
 Figure 2 FLASH-positive Gastric carcinoma cells (HE×200)

表 3 FOXO1A 表达及 FLASH 表达间的关系

Table 3 Correlation between the expression of FOXO1A and FLASH

FLASH	FOXO1A		P
	positive	negative	
positive	47	6	0.5078
negative	3	12	

3 讨论

作为 Fox 转录因子亚家族, FOXO(Forkhead box, classO)包括 FOXO1A(亦称做 FOXO1)、FOXO3A(FKHR-like1)、MLLT7(也称为 FOXO4)和 FOXO6 等成员。大量的哺乳动物体外实验研究证实,磷酸化的 FOXO1A(FOXO1A)与前列腺癌^[10]、神经胶质瘤、多发性骨髓瘤及肠癌细胞的生存能力增强有关,并与多发性骨髓瘤及肠癌细胞增殖相关。

在临床研究中,磷酸化的 FOXO1A 表达与急性髓白血病的不良预后及肠癌的转移相关,另外 FOXO1A 的表达还在糖尿病^[3],横纹肌肉瘤^[11]等疾病中有报道。但目前对于人类胃癌组织中 FOXO1A 表达状况及生物学意义鲜有报道。Kim JH^[3]等首次对 FOXO1A 表达与胃癌的关系作了报道,实验结果显示 FOXO1A 表达是胃癌肿瘤形成的早期频发事件。在各项临床病理指标的分析中,FOXO1A 表达与淋巴结的转移和浸润呈负相关,而与患者的年龄、性别、肿瘤位置及远处转移等均无关。

FLASH 在 Fas 诱导的凋亡过程中起传递作用,与 caspase-8 的活性有关。FLASH 通过与 FADD 和 caspase-8 结合在死亡诱导复合体(DISC)中起传递凋亡信号的作用。另外,FLASH 还被证实参与 TNF 诱导的 NF-kappaB 激活(通过结合肿瘤坏死因子信号中的 TRAF2 而激活 NF-kappaB)、凋亡信号细胞周期进程和细胞分化。FLASH 还具有促进细胞存活和细胞增值的生物学功能并与细胞分裂有关。FLASH 的这些功能对肿瘤发生起着重要的作用。但是目前为止对 FLASH 基因改变和 FLASH 蛋白在人类肿瘤中的表达还所知甚少。Jeong^[9]等首次对胃癌组织中 FLASH 表达的形式和突变情况进行了报道,在他们的实验中 FLASH 阳性表达率为 70%,正常黏膜呈阴性或极弱表达,并推测这一发现表明 FLASH 可能在胃癌的发展过程中起到了一定的作用。

本实验 68 例胃癌病例中,FOXO1A、FLASH 的阳性表达率分别为 73.53% (50/68) 和 77.94% (53/68),均呈现出较高的表达。通过对胃癌病理学参数与两种基因间关系的研究,我们发现两种基因的表达与分化程度显著相关,阳性率及表达强度均随着肿瘤分化程度降低而减低。由此我们可以看出在高分化胃癌中两种基因的表达属高频发事件,它们可能在胃癌的发生和发展过程中起到了一定的作用。我们希望这一发现能为高分化胃癌靶向基因治疗的研究提供新的思路。在不同类型的胃癌中,FOXO1A 及 FLASH 在腺癌中的表达明显高于印戒细胞癌,说明两种基因的表达还与病理分型有关。此外,与 Kim JH^[3]等的报道 FOXO1A 表达与性别无关的结论不同,本研究表明 FOXO1A 的表达与患者性别有关,并认为这可能预示着患早期胃癌的男性患者更易被检测出并可得到早期治疗。本实验

中 FLASH 的阳性表达率 77.94% 略高于 Jeong 等^[9]报道的 70%,且正常黏膜亦呈阴性或极弱表达,这进一步验证了 Jeong 等^[9]的结论,认为 FLASH 可能在胃癌的发展过程中起到了一定的作用。

另外,本实验结果显示无论是在分化程度不同的癌组织还是癌旁组织中,FOXO1A 和 FLASH 在表达上均表现出了较高的一致性。但统计分析结果显示两者之间并无显著相关。在以后的研究中,我们将继续此方向的工作。

参考文献:

- [1] Ling Yang. Incidence and mortality of gastric cancer in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2006,12(1):17-20.
- [2] 马向涛,余力伟,付静. 趋化因子受体 CXCR4 及其配体 CXCL12 在胃癌组织中的表达及其意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2009,36(2):134-136.
- [3] 李养军,惠延年. 高糖诱导牛视网膜微血管周细胞 FOXO1A 表达增加 [J]. *国际眼科杂志*, 2007,7(2):373-376.
- [4] Kim JH, Kim MK, Lee HE, et al. Constitutive phosphorylation of the FOXO1A transcription factor as a prognostic variable in gastric cancer [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(8):835-842.
- [5] Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization [J]. *Clin Invest*, 2005,1 (15):2382-2392.
- [6] Morgan R, Nalliah A, Morsi El-Kadi AS. FLASH, a component of the FAS-CAPSASE8 apoptotic pathway, is directly regulated by Hoxb4 in the notochord [J]. *Dev Biol*, 2004,265 (1):105-112.
- [7] Tomoshige Kino, George P Chrousos. Tumor Necrosis Factor Receptor- and Fas-associated FLASH Inhibit Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor by Binding to and Interfering with Its Interaction with p160 Type Nuclear Receptor Coactivators [J]. *J of Biol Chem*, 2003,278(5): 3023-3029.
- [8] D Barcaroli, L BB, A Terrinoni, et al. FLASH is required for histone transcription and S-phase progression [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006,103(40):14808-14812.
- [9] Jeong EG, Lee SH, Lee HW, et al. Immunohistochemical and mutational analysis of FLASH in gastric carcinomas [J]. *APMIS*, 2007,115(8):900-905.
- [10] Dong XY, Chen CS, Sun XD, et al. FOXO1A Is a Candidate for the 13q14 Tumor Suppressor Gene Inhibiting Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14):6998-7006.
- [11] Roberts I, Gordon A, Wang R, et al. Molecular cytogenetic analysis consistently identifies translocations involving chromosomes 1, 2 and 15 in five embryonal rhabdomyosarcoma cell lines and a PAX-FOXO1A fusion gene negative alveolar rhabdomyosarcoma cell line [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001,95(3 - 4):134-142.

[编辑:贺文;校对:刘红武]