

FOXC1 在非小细胞肺癌组织中的表达及预后意义

冯 蕾¹, 慕博华¹, 饶 秋², 张 鹏¹, 姜 俊¹, 赵 燕³, 孟凡青^{4*}

(¹泰州职业技术学院医学技术学院, 江苏 泰州 225300; ²南京军区南京总医院病理科, 江苏 南京 210002; ³泰州市人民医院病理科, 江苏 泰州 225300; ⁴南京市鼓楼医院病理科, 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨 FOXC1 在非小细胞肺癌(NSCLC)中的表达水平及其预后意义。方法:将 202 例 NSCLC 及 63 例癌旁肺组织标本制作成组织芯片,采用免疫组织化学 SP 法检测 FOXC1 的表达,探讨其表达水平与临床病理特征及预后的关系。结果: NSCLC 组织中高表达 FOXC1(60.87%) 的细胞比率显著高于癌旁肺组织 (25.40%)($P < 0.001$); NSCLC 中, FOXC1 的表达与 TNM 分期及淋巴结转移显著相关($P < 0.01$); Kaplan-Meier 生存分析显示 FOXC1 高表达的 NSCLC 患者生存期明显低于低表达的患者($P < 0.001$)。结论: FOXC1 在 NSCLC 中的表达与肿瘤的发生、进展有关,检测 FOXC1 的表达有助于对患者预后的评价。

[关键词] FOXC1; 非小细胞肺癌; 免疫组化; 组织芯片; 预后

[中图分类号] R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1693-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20131210

The expression and prognostic significance of FOXC1 in non-small cell lung cancer

Feng Lei¹, Mu Bohua¹, Rao Qiu², Zhang Peng¹, Jiang Jun¹, Zhao Yan³, Meng Fanqing^{4*}

(¹School of Medical Technology, Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ²Department of Pathology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002; ³Department of Pathology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300; ⁴Department of Pathology, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of FOXC1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its prognostic value. **Methods:** The tissue microarrays containing 202 NSCLC tissues and 63 normal lung tissues were constructed. The expression of FOXC1 was detected in these tissues by immunohistochemical method. The relationship between expression of FOXC1 and NSCLC's clinicopathological and survival parameters were evaluated. **Results:** The expression of FOXC1 (60.87%) in the NSCLC tissues was significantly higher than that in the normal group (25.40%) ($P < 0.0001$). In the group of NSCLC, FOXC1 expression was significantly correlated with TNM stage and lymph node metastasis. Kaplan-Meier survival analysis indicated that the survival rate was markedly lower in the patients with high level of FOXC1 than those with low level of FOXC1 ($P < 0.001$). **Conclusion:** The expression of FOXC1 in NSCLC was significantly correlated with the development and progression of the neoplasms. FOXC1 may play an important role in the evaluation of the prognosis of NSCLC patients.

[Key words] FOXC1; non-small cell lung cancer; immunohistochemistry; tissue microarray; prognosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1693-1697]

近年来,随着环境污染的加重以及吸烟人群的增加,肺癌的发病率及病死率不仅跃居欧美国家首位^[1],也成为我国恶性肿瘤病死率的第一位^[2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是指

除小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)之外的其他所有类型的肺癌,主要包括腺癌、鳞癌及腺鳞癌等,约占全部肺癌的 80%^[3]。尽管多年来人类在肺癌的治疗上付出了巨大的努力,但肺癌的 5 年生存率仍不足 15%^[4]。

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助(1201187)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: fqmeng2004@126.com

叉头框(forkhead box, FOX)蛋白是一类结构类似、在进化上高度保守的转录因子家族,它们广泛参与细胞增殖、分化、凋亡以及转移等各种生物学行

为。FOXC1属于其中的FOXC亚族,广泛存在于人体多种组织和器官中。近年来的研究表明,FOXC1的表达与乳腺癌、喉癌及妇科肿瘤的发生发展有着密切联系^[5-7],但在NSCLC组织内的表达国内尚无文献报道。本研究采用组织芯片技术和免疫组织化学方法,检测FOXC1在NSCLC组织中的表达情况,分析其表达与NSCLC患者临床病理参数及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集南京市鼓楼医院病理科2006年1月~2008年12月存档的202例NSCLC组织和63例远离肿瘤的肺组织石蜡标本并构建组织芯片(图1A)。所有病例均经病理科医生确诊。患者均接受了手术治疗且术前未接受放疗和化疗,每例均有详细的临床病理资料及随访结果。202例NSCLC患者中男130例,女72例,年龄36~83岁,中位年龄60岁。术后生存时间为1~70个月,中位生存时间35个月。随访采取信访结合电话的方式,截止日期为2012年12月,生存期的计算为手术日期到随访日期或由于复发、转移而死亡的日期为止,截尾值为0。参照2004年WHO肺癌组织学分类及分级标准,202例NSCLC中有150例腺癌,38例鳞癌,14例腺鳞癌;23例高分化,110例中分化,69例低分化;按TNM分期,I期71例,II期48例,III期76例,IV期7例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

采用SP免疫组化染色法,按试剂盒操作说明书染色。FOXC1山羊抗人多克隆抗体(sc-21396, Santa Cruz公司,美国),稀释度1:100;SP超敏试剂盒(福州迈新公司),DAB显色试剂盒(北京中杉生物技术公司)。

1.2.2 结果判定

双盲法观察免疫组化结果,每张切片高倍镜下随机选取10个视野共记录1000个细胞,综合染色强度和阳性细胞数量进行判定。按切片中细胞着色深浅评分:细胞无显色为0分;黄色为1分;棕黄色

为2分;棕褐色为3分。按阳性细胞数占同类细胞数的百分比评分:≤5%为0分;6%~25%为1分;26%~50%为2分;51%~75%为3分;>75%为4分。取两项评分的乘积作为总积分,≥4分为高表达,<4分则为低表达。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件处理数据。运用 χ^2 检验等统计学方法,对生存数据进行Kaplan-Meier单因素生存分析,应用Log-rank检验差异性,采用Cox比例风险回归模型进行多因素分析。 $P \leq 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXC1在NSCLC及癌旁肺组织中的表达

FOXC1蛋白定位于细胞浆及细胞核,以出现棕黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色者为阳性。在202例NSCLC中FOXC1的高表达率为60.87%(127/202),在63例癌旁肺组织中的高表达率为25.40%(16/63),差异有统计学意义($\chi^2 = 27.51, P < 0.001$,表1,图1)。

2.2 FOXC1的表达与NSCLC临床病理特征的关系

对202例NSCLC患者的临床病理资料所做的回顾性研究结果显示,NSCLC中FOXC1的表达与TNM分期、淋巴结转移显著相关,与性别、年龄、组织学类型、肿瘤分化程度、肿瘤大小、神经侵袭、脉管侵袭、吸烟史等无明显相关(表2)。

2.3 FOXC1的表达与NSCLC预后的关系

2.3.1 Kaplan-Meier单因素生存分析

将FOXC1表达分为低表达组和高表达组,两组的3年生存率分别为58%和40%。采用Kaplan-Meier法绘制NSCLC患者生存曲线,Log-rank检验不同样本的生存曲线,结果显示:FOXC1低表达组和高表达组的NSCLC患者生存期存在差异[(41.87 ± 5.03)月 vs (29.85 ± 19.90)月, $\chi^2 = 14.249, P < 0.001$,图2]。

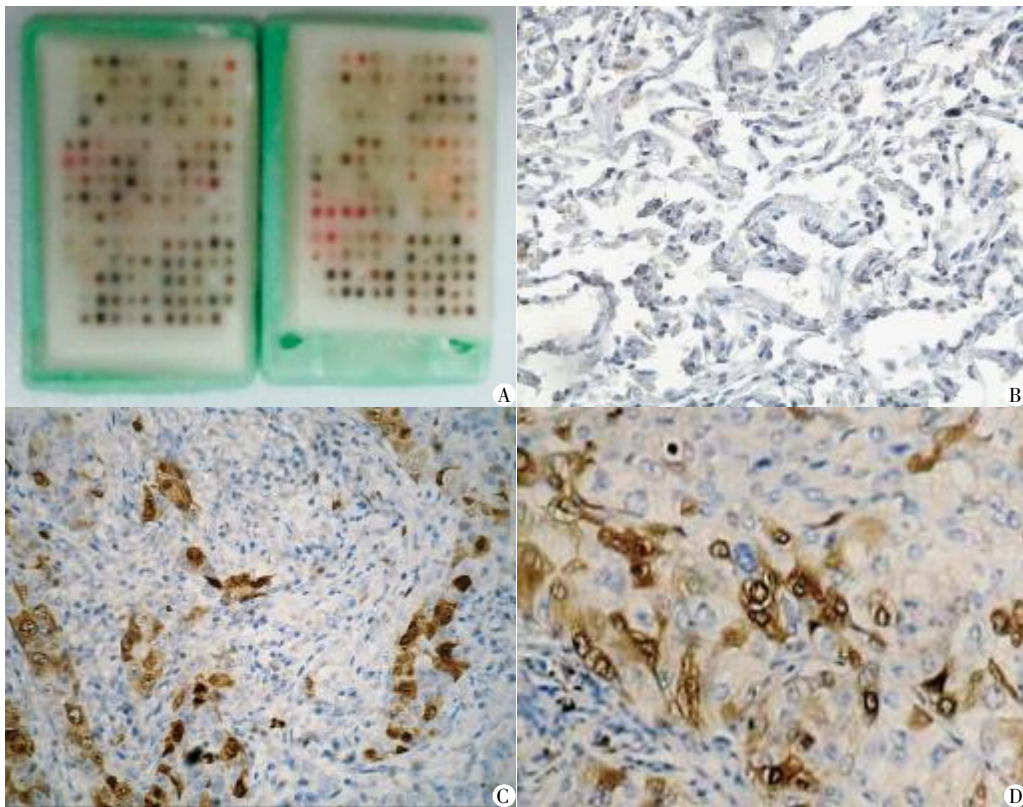
2.3.2 Cox比例风险回归模型分析

对影响预后的因素采用比例风险模型进行多因素分析,纳入的变量有年龄、性别、吸烟史、组织学类

表1 FOXC1在NSCLC及癌旁肺组织中的表达

Table 1 Expression of FOXC1 in NSCLC and adjacent normal lung cancer tissue

分组	n	FOXC1		高表达率(%)	χ^2 值	P值
		高表达	低表达			
非小细胞肺癌	202	127	75	62.87	27.15	< 0.001
癌旁肺组织	63	16	47	25.40		



A: 构建完成的 NSCLC 组织芯蜡块; B: FOXC1 在癌旁肺组织中呈阴性表达; C: 鳞癌中 FOXC1 呈弥漫性表达; D: 腺癌中 FOXC1 呈弥漫性表达。

图 1 FOXC1 在非小细胞肺癌中的表达(SP, ×400)

Figure 1 The expressions of FOXC1 in non-small cell lung cancer(SP, ×400)

型、分化程度、TNM 分期、肿瘤大小、淋巴结转移、FOXC1 表达等,采用前向逐步法,显示在 $\alpha = 0.05$ 的水平上,TNM 分期和淋巴结转移这 2 个因素是影响 NSCLC 患者预后的独立危险因素(表 3)。

3 讨论

FOX 蛋白是一类从酵母到人类都广泛存在的转录因子,属于“螺旋-转角-螺旋”类蛋白的一个亚群。它们广泛参与细胞凋亡、增殖、分化以及转移等各种生物学行为,该基因的突变、蛋白功能的缺失或获得可导致许多人类发育性疾病及肿瘤的发生^[8-9]。所有 FOX 蛋白的 DNA 结合区为该家族的保守序列,又称“叉头框区”。FOX 蛋白分布广泛,目前在人类中发现至少 44 个家族成员^[10]。

FOXC1 (以往也称 Mf1 或 FKHL7 或 FREAC3) 属于 FOXC 的 1 个亚族,广泛存在于人体多种组织和器官中^[11]。FOXC1 基因定位在人 6p25 基因编码区,仅含有 1 个外显子,长约 1 659 bp,编码的蛋白由 553 个氨基酸组成^[12]。以往对 FOXC1 的研究表明,其对组织器官的结构形成和功能发育起着重要作用^[13]。近年来,研究者们发现 FOXC1 的表达与乳

腺癌、喉癌及妇科肿瘤的发生发展有着密切联系^[5-7],而 FOXC1 是否对 NSCLC 的生物学行为有影响尚少见报道。

本文研究结果显示,FOXC1 在 NSCLC 中为细胞核及细胞浆表达,而以往报道 FOXC1 定位于细胞核内,其具体机制尚不清楚。有研究证实,FOXC1 蛋白叉头框区内的两端各有一个核定位信号,其中位于 C 端的核定位信号对 FOXC1 的细胞核定位起着重要作用^[14],而疾病可使 FOXC1 的基因发生突变,从而影响该蛋白的核定位^[15]。对 FOX 家族另一成员 FOXO1 的研究结果显示,FOXO1 在未磷酸化时定位在细胞核,而磷酸化后则定位在细胞浆。在 AKT 的作用下,FOXO1 发生磷酸化,从而由细胞核向细胞浆转位^[16]。FOXC1 定位的改变是否存在上述相似的机制,有待进一步的研究。

本研究显示,NSCLC 组织中 FOXC1 的高表达率为 62.87%,癌旁肺组织为 25.40%,NSCLC 组织中高表达 FOXC1 的细胞比率明显高于癌旁肺组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)。该研究结果与其他研究结论一致^[5-7]。FOXC1 蛋白表达与临床病理学参数之间的统计学分析显示,其表达与 TNM 分期和淋巴

表2 FOXC1 的表达与 NSCLC 临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between the expression of FOXC1 and the pathological characteristics of NSCLC

临床病理特征	n	FOXC1		高表达率(%)	χ ² 值	P 值
		高表达	低表达			
性别					0.99	0.320
男	130	85	45	65.38		
女	72	42	30	58.33		
年龄(岁)					2.33	0.127
≤60	103	70	33	67.96		
>60	99	57	42	57.58		
组织学类型					1.62	0.446
腺癌	150	93	57	62.00		
鳞癌	38	23	15	60.53		
腺鳞癌	14	11	3	78.57		
分化程度					3.04	0.219
低	69	49	20	71.01		
中	110	64	46	58.18		
高	23	14	9	60.87		
TNM 分期					19.23	<0.001
I、II	119	60	59	50.42		
III、IV	83	67	16	80.72		
肿瘤最大径(cm)					1.47	0.226
≤4.0	121	72	49	59.50		
>4.0	81	55	26	67.90		
淋巴结转移					9.40	0.002
无	80	40	40	50.00		
有	122	87	35	71.31		
神经侵袭					0.30	0.585
无	163	101	62	61.96		
有	39	26	13	66.67		
脉管侵袭					0.04	0.837
无	115	73	42	63.48		
有	87	54	33	62.07		
吸烟					0.34	0.557
无	124	76	48	61.29		
有	78	51	27	65.38		

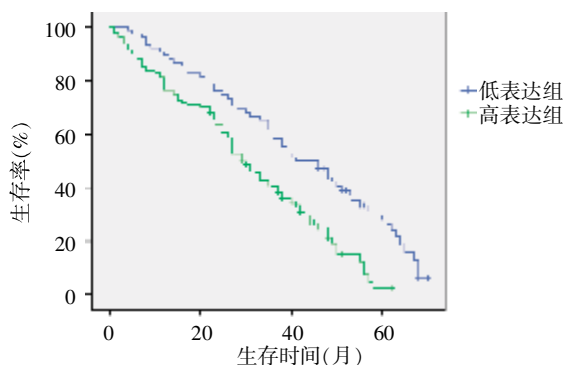


图2 FOXC1 低表达和高表达组 NSCLC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线

Figure 2 Kaplan-Meier survival curve of NSCLC patients with low and high level of FOXC1

表3 Cox 回归模型筛选的影响 NSCLC 患者的危险因素

Table 3 The risk factors of NSCLC patients selected by Cox regression model

	Wald	P	Exp(B)	95% CI
TNM 分期	5.583	0.018	1.590	1.082~2.335
淋巴结转移	5.893	0.015	1.651	1.101~2.476

结转移密切相关 ($P < 0.01$), 而与患者的性别、年龄、组织学类型、肿瘤分化程度、肿瘤大小、神经侵袭、脉管侵袭、吸烟史等均无显著相关性。本文研究结果提示 FOXC1 的表达与 NSCLC 肿瘤的发生、进展相关。

Kaplan-Meier 单因素生存分析显示, FOXC1 高

表达的 NSCLC 患者生存期明显低于低表达的患者 ($P < 0.001$)。研究结果提示,检测 FOXC1 的表达将有助于对 NSCLC 患者预后的评价。

[参考文献]

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2012 [J]. CA Cancer J Clin,2012,62(1):10-29
- [2] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国 2009 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2013,22(1):2-12
- [3] Jemal A,Siegel R,Xu J,et al. Cancer statistics,2010[J]. CA Cancer J Clin,2010,60(5):277-300
- [4] Ott S,Geiser T. Epidemiology of lung tumors [J]. Ther Umsch,2012,69(7):381-388
- [5] 王露颖,杨正才,杨 竹. FOXC1 蛋白在子宫颈癌及子宫内膜癌中的表达及意义 [J]. 重庆医科大学学报,2010,35(4):497-500
- [6] 贺小玲,王斌全,高 伟,等. FOXC1 蛋白在喉鳞状细胞癌中表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2012,20(5):930-933
- [7] 贾海全,赵国强. FOXC1 在复发性乳腺浸润性导管癌中的表达及其意义 [J]. 重庆医科大学学报,2011,36(11):1372-1374
- [8] Feuerborn A,Kuffer S,Grone HJ. Forkhead factors regulate epithelial plasticity:impact on cancer progression[J]. Cell Cycle,2011,10(15):2454-2460
- [9] Benayoun BA,Caburet S,Veitia RA. Forkhead transcription factors:key players in health and disease[J]. Trends Genet,2011,27(6):224-232
- [10] Kaestner KH,Knochel W,Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors [J]. Genes Dev,2000,14(2):142-146
- [11] Tonoki H,Harada N,Shimokawa O,et al. Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome:clinical,molecular-cytogenetic,and DNA array analyses of three patients with chromosomal defects at 6p25 [J]. Am J Med Genet A,2011,155A(12):2925-2932
- [12] Nishimura DY,Swiderski RE,Alward WL,et al. The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25 [J]. Nat Genet,1998,19(2):140-147
- [13] Berry FB,Mirzayans F,Walter MA. Regulation of FOXC1 stability and transcriptional activity by an epidermal growth factor-activated mitogen-activated protein kinase signaling cascade [J]. J Biol Chem,2006,281(15):10098-10104
- [14] Berry FB,Saleem RA,Walter MA. FOXC1 transcriptional regulation is mediated by N- and C-terminal activation domains and contains a phosphorylated transcriptional inhibitory domain [J]. J Biol Chem,2002,277(12):10292-10297
- [15] Saleem RA,Murphy TC,Liebmann JM,et al. Identification and analysis of a novel mutation in the FOXC1 forkhead domain [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2003,44(11):4608-4612
- [16] Tzivion G,Dobson M,Ramakrishnan G. FoxO transcription factors;Regulation by AKT and 14-3-3 proteins[J]. Biochim Biophys Acta,2011,1813(11):1938-1945

[收稿日期] 2013-06-17

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。