

· 临床研究 ·

## 进展期胃癌组织中FOXP1和Ki67的表达及对患者预后的影响

陈 铁<sup>1</sup>, 陈 椽<sup>1\*</sup>, 吴金东<sup>1</sup>, 曹广鑫<sup>1</sup>, 李怀亮<sup>2</sup>, 侯炜晓<sup>2</sup>, 张一心<sup>1</sup>, 江晓晖<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南通大学附属肿瘤医院外科, 江苏 南通 226361; <sup>2</sup>南通大学研究生院临床医学系, 江苏 南通 226019

**[摘要]** 目的:分析进展期胃癌中叉头框P1(forkhead box P1, FOXP1)的表达与增殖因子Ki67的关系,探讨FOXP1联合Ki67与临床各参数之间的相关性及对预后的影响。方法:采用石蜡切片免疫组化SP法分析胃癌及癌旁组织中FOXP1和Ki67表达,对FOXP1和Ki67表达的相关性进行Pearson相关分析,采用单因素和多因素回归分析两者对患者预后的影响。结果:FOXP1在癌组织中低表达,FOXP1和Ki67蛋白的表达在胃癌组织中呈负相关。Ki67高表达和FOXP1低表达是进展期胃癌患者无复发生存期的影响因素。结论:Ki67和FOXP1在进展期胃癌组织中的表达呈负相关,二者共同影响胃癌患者预后。

**[关键词]** 胃癌;叉头框P1;Ki67;无复发生存期

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)08-1181-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20200817

## The expressions of FOXP1 and Ki67 in advanced gastric cancer and the effects on the prognosis of patients

CHEN Tie<sup>1</sup>, CHEN Yuan<sup>1\*</sup>, WU Jindong<sup>1</sup>, CAO Guangxin<sup>1</sup>, LI Huailiang<sup>2</sup>, HOU Weixiao<sup>2</sup>, ZHANG Yixin<sup>1</sup>, JIANG Xiaohui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226361; <sup>2</sup>Department of Clinical Medicine, Graduate School, Nantong University, Nantong 226019, China

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the correlation between the expression of forkhead box P1 (FOXP1) and proliferative factor Ki67 protein, and investigate the effects on prognosis of advanced gastric carcinoma patients. **Methods:** Paraffin-embedded sections immunohistochemical SP method was used to detect the expression of FOXP1 and Ki67 in gastric adenocarcinoma and paracancerous tissue. Pearson rank correlation analysis was used to analyze the relationship, and regression analysis was performed to estimate the effects of FOXP1 and Ki67 expression on the recurrence-free survival (RFS). **Results:** The expressions of FOXP1 were lower in the gastric cancer tissues than in the corresponding adjacent non-tumor tissues. There was negative correlation between the expression of FOXP1 and Ki67 in gastric cancer tissue. The results showed that the loss of FOXP1 expression and the higher Ki67 expression were influential factors of efficacy in the RFS. **Conclusion:** The expression of FOXP1 negatively correlates with the expression of Ki67 in gastric carcinoma. A loss of FOXP1 expression and a higher Ki67 expression affect the prognosis of gastric carcinoma patients together.

**[Key words]** gastric carcinoma; forkhead box P1; Ki67; recurrence-free survival

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1181-1185, 1240]

胃癌(gastric carcinoma, GC)是起源于胃黏膜上

皮的恶性肿瘤,在我国胃癌的发病率位列第2,病死率位列第3,高于世界平均水平<sup>[1]</sup>。2014年全球癌症调查报告显示,我国每年新增胃癌病例及死亡人数均居全球首位,全球每年超过40%的新发患者来自中国<sup>[1]</sup>。我国病理专家共识认为Ki67在癌中的表达有利于评估癌细胞的增殖状态,并为术后化疗疗

**[基金项目]** 南通市医学创新团队(团队22);南通市青年医学重点人才(青年068)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jxhyjl@163.com; chenyanman@126.com

效评估提供参考<sup>[2]</sup>。转录因子叉头框 P1 (forkhead box P1, FOXP1) 是 FOX 家族成员之一, 参与细胞的增殖和分化以及新陈代谢, 细胞衰老、存活和凋亡, 影响许多不同类型肿瘤的进展<sup>[3]</sup>。在肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, CCRCC) 中, FOXP1 的表达与肿瘤分级以及 Ki67 表达负相关<sup>[4]</sup>, FOXP1 低表达的 CCRCC 患者预后更差, 其在 CCRCC 中可能扮演抑癌基因的角色, 有可能抑制肿瘤细胞的有丝分裂。但在肝癌中 FOXP1 起到癌基因的作用, 下调 FOXP1 的表达水平, 能抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[5]</sup>。所以 FOXP1 与细胞增殖之间的相关性值得进一步探讨。本研究对胃癌中 FOXP1 与增殖因子 Ki67 的相关性及其对患者预后的影响进行分析。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

收集 2007—2011 年本院进展期胃癌组织石蜡切片标本 167 例, 为胃癌手术患者 (均行胃癌 D2 手术), 其中男 114 例, 女 53 例, 年龄 35~83 岁, 平均 (61.59±11.11) 岁。肿瘤浸润深度均已经达到或超过肌层, TNM 分期参考文献<sup>[6]</sup>。入组和剔除条件如下: ①入组患者临床病理分期为 I B~III A 期胃癌患者。为减少治疗对胃癌患者预后的干扰, 剔除了 I A 期术后无需辅助性治疗的患者; 剔除了术前需新辅助治疗及发生远处转移的患者; 剔除了术后放疗患者。②术前未接受任何抗肿瘤治疗。③手术方式参照 D2 根治性手术切除范围; 剔除术前影像评估手术范围超过 D2 手术切除范围的患者及术中探查无法手术根治性切除 (剔除侵犯临近脏器患者 T4b) 的患者; 剔除淋巴结转移超过 15 个区域淋巴结 (N3b) 的患者。④入组患者均未合并其他恶性肿瘤及严重内科基础疾病, 一般身体状况良好。⑤入组患者术后均接受术后辅助性治疗超过 6 个疗程, 剔除术后接受靶向治疗者。

收集入组所有胃癌组织石蜡标本及患者的基本信息, 患者术后病理相关信息, 包括分化级别、浸润深度、淋巴结转移情况、TNM 分期、是否血管癌栓、是否神经侵犯等, 根据指南评价 TNM 分期。术后随访: 胃癌术后均接受 SOX 方案辅助化疗, 完成疗程治疗后, 根据指南随访患者术后 5 年, 随访方法参考文献<sup>[6]</sup>。评估复发标准: 无复发生存期 (recurrence-free survival, RFS) 为根治性手术到首次复发、转移的时间 (含病理及影像学提示远处转移)。本研究经本院伦理委员会审核批准。

试剂与材料包括: FOXP1 单克隆抗体 (ab16645, Abcam 公司, 美国), 工作液按 1:100 稀释; 兔抗人 Ki67 多克隆抗体 (ab15580, Abcam 公司, 美国), 工作液按 1:300 稀释, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (Dako Cytomation 公司, 美国), 具体方法参考文献<sup>[7-8]</sup>。

### 1.2 方法

石蜡切片免疫组化采用 SP 法。结果判定: 随机选择 5 个高倍镜 (×400) 视野进行计数, 每个视野计数 500 个细胞, 计算 FOXP1 阳性细胞数占总细胞数的百分比, 黄染细胞数 <10% 计为 0 分; 10%~30% 计 1 分 (弱阳性); 31%~50% 计 2 分 (阳性), >50% 计 3 分 (强阳性)。FOXP1 标记物敏感性评分: 2~3 分为高表达, 0~1 分为无或低表达, 评判标准参照文献<sup>[4]</sup>。Ki67 的判断标准参照相关文献报道<sup>[2,6,8]</sup>, 按细胞核呈棕褐色占总细胞数百分比计算, ≤5% 为低表达 >5% 为高表达。免疫组化切片在光镜 (×50) 下进行图像分析, 采用 IPWIN60 图像荧光分析软件, 每张切片观察 5 个高倍视野, 测量细胞质中 FOXP1 和 Ki67 表达的平均光密度值。

### 1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS19.0 统计软件处理, 对 FOXP1 和 Ki67 蛋白表达情况及其与各临床参数间的关系进行卡方检验, 对 FOXP1 和 Ki67 蛋白表达的相关性进行 Pearson 相关分析, 采用 Log-rank 和 Kaplan-Meier 法对 RFS 进行分析, 单变量 Cox 比例风险回归用于分析患者的生存差异, 单因素回归分析中有统计学意义的因素进一步纳入多因素回归分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

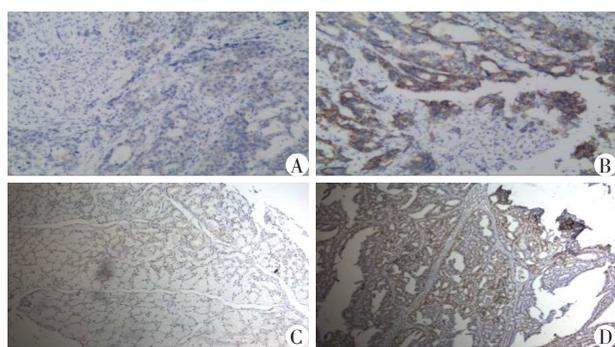
### 2.1 免疫组化结果

本研究对收集到的所有胃癌组织石蜡样本进行免疫组化 SP 法检测, 结果显示, FOXP1 蛋白阳性信号定位于细胞核和细胞质中, 呈深褐色染色 (图 1B), Ki67 蛋白阳性信号定位于细胞核中, 呈深褐色染色 (图 1D)。

将复染后的石蜡切片进行扫描, 绘制切片平均光密度值散点图, 统计学分析结果显示, FOXP1 和 Ki67 蛋白在胃癌组织中的表达呈负相关, 经 Pearson 相关性分析发现, 两者呈中度负相关 ( $r = -0.571, P < 0.001$ , 图 2)。

### 2.2 FOXP1、Ki67 表达与胃癌临床病理的相关性

167 例胃癌病例中, FOXP1 低表达 105 例



A: FOXP1 蛋白在胃癌组织中低表达; B: FOXP1 蛋白在胃癌组织中高表达; C: Ki67 蛋白在胃癌组织中低表达; D: Ki67 蛋白在胃癌组织中高表达。

图1 胃癌组织中FOXP1与Ki67的表达(免疫组化, ×200)

Figure 1 The expressions of FOXP1 and Ki67 protein in gastric cancer tissues (immunohistochemistry, ×200)

(62.87%), Ki67高表达112例(67.07%)。χ<sup>2</sup>检验结果显示, FOXP1和Ki67的表达在不同的分化级别、浸润深度、淋巴结转移、TNM分期、是否血管癌栓之

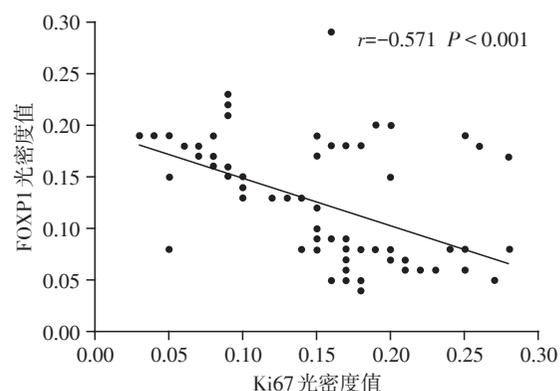


图2 胃癌组织中FOXP1和Ki67蛋白表达呈负相关

Figure 2 The negative correlation between FOXP1 and Ki67 protein expressions in gastric cancer tissues

间差异有统计学意义(表1)。

2.3 FOXP1与Ki67表达对患者术后RFS的影响分析  
单因素Cox回归分析发现患者5年的RFS与肿瘤的分化级别(HR=0.600, P=0.018)、浸润深度

表1 胃癌组织中FOXP1及Ki67蛋白的表达与临床参数的关系

Table 1 The relationship between expressions of FOXP1, Ki67 protein and clinical parameters of gastric cancer

临床参数	n	FOXP1			Ki67		
		低表达[n(%)]	χ <sup>2</sup> 值	P值	高表达[n(%)]	χ <sup>2</sup> 值	P值
年龄(岁)			2.929	0.087		0.202	0.653
< 50	39	20(51.28)			25(64.10)		
≥50	128	85(66.41)			87(67.97)		
性别			0.639	0.424		0.299	0.585
男性	114	74(64.91)			78(68.42)		
女性	53	31(58.49)			34(64.15)		
血管癌栓			18.270	< 0.001		11.370	0.001
是	46	17(36.96)			40(86.96)		
否	121	88(72.73)			72(59.50)		
神经侵犯			1.119	0.290		0.013	0.909
是	80	47(58.75)			54(67.50)		
否	87	58(66.67)			58(66.67)		
分化级别			11.090	0.001		94.940	< 0.001
G1~G2	53	43(81.13)			8(15.09)		
G3	114	62(54.39)			104(91.23)		
浸润深度			21.460	< 0.001		5.137	0.023
T2	121	89(73.55)			75(61.98)		
T3~T4	46	16(34.78)			37(80.43)		
淋巴结转移			40.290	< 0.001		17.390	< 0.001
无	83	72(86.75)			43(51.81)		
有	84	33(39.29)			69(82.14)		
TNM分期			47.700	< 0.001		15.640	< 0.001
I B	85	75(88.24)			45(52.94)		
II~III A	82	30(36.59)			67(81.71)		

(HR=0.492,  $P=0.005$ )、淋巴结转移(HR=0.506,  $P=0.005$ )、TNM分期(HR=0.515,  $P=0.006$ )、血管癌栓(HR=0.530,  $P=0.011$ )、Ki67高表达(HR=0.296,  $P < 0.001$ )、FOXP1低表达(HR=0.365,  $P < 0.001$ )之间有统计学关系。多因素Cox回归分析结果显示,患者5年RFS与FOXP1低表达(HR=0.513,  $P=0.033$ )和Ki67高表达(HR=0.318,  $P < 0.001$ )之间有统计学关系(表2)。

通过Kaplane-Meier法分析患者的RFS, Log-rank检验发现FOXP1高表达和Ki67低表达的患者RFS更长,无复发生存率更高,FOXP1低表达和Ki67高表达影响患者的预后(图3)。

### 3 讨论

我国属于胃癌高发国家之一,我国胃癌的发病率仅次于肺癌,病死率位列第3<sup>[1]</sup>。随着我国将胃癌

表2 单因素和多因素回归分析影响胃癌患者RFS预后的相关因子

Table 2 Univariate and multivariate analysis of RFS in patients with gastric cancer

因素	单因素分析			多因素分析		
	P值	HR	95%CI	P值	HR	95%CI
性别(男性 vs. 女性)	0.810	1.055	0.680~1.637			
年龄(<50岁 vs. ≥50岁)	0.079	1.620	0.945~2.776			
分化级别(G1~G2 vs. G3)	0.018	0.600	0.392~0.917	0.729	1.102	0.635~1.915
浸润深度(T2 vs. T3~T4)	0.005	0.492	0.300~0.807	0.185	0.670	0.371~1.211
淋巴结转移(N0 vs. N1~N3)	0.005	0.506	0.315~0.812	0.644	1.281	0.448~3.661
TNM分期(I B vs. II+III A)	0.006	0.515	0.321~0.825	0.734	0.833	0.291~2.387
血管癌栓(NO vs. YES)	0.011	0.530	0.325~0.866	0.259	0.729	0.421~1.262
神经侵犯(NO vs. YES)	0.737	1.074	0.709~1.625			
Ki67表达水平(<10% vs. ≥10%)	<0.001	0.296	0.180~0.487	<0.001	0.318	0.171~0.592
FOXP1表达水平(无或低表达 vs. 中高表达)	<0.001	0.365	0.227~0.589	0.033	0.513	0.277~0.948

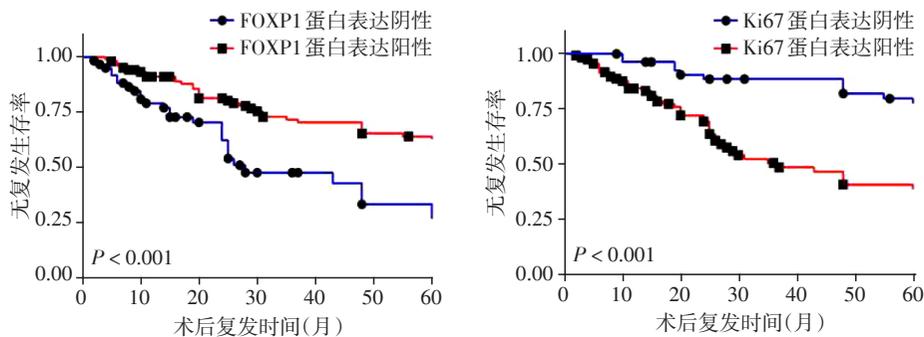


图3 FOXP1和Ki67的表达与胃癌患者术后无复发生存率的关系

Figure 3 The relationship between FOXP1 and Ki67 expressions and the prognosis of patients with gastric cancer

纳入大病医疗、胃镜检查的普及、诊疗手段的发展及早期发现、早期诊断、早期治疗,早期胃癌患者的总生存期(overall survive, OS)有所提高,但其疗效仍不令人满意。进展期胃癌(advanced gastric carcinoma)相对于早期胃癌,更容易发生肿瘤转移,如何判断术后胃癌患者肿瘤细胞是否有残留、术后复发风险,如何在分子水平判断胃癌患者预后及复发风险,值得深入研究。

至今为止胃癌的发病机制尚未阐明。分子肿瘤学认为胃癌的发生是一套复杂的分子生物学过程,包括众多抑癌基因失活和癌基因激活。因此,

研究胃癌发病的分子机制,发现新的肿瘤生物标志物,显得尤为重要。研究表明,FOX家族与多种癌症的侵袭转移关系密切<sup>[9]</sup>。FOXP1存在于多种实体瘤中,FOXP1在一些肿瘤细胞中的高表达与患者预后差有关<sup>[3,8]</sup>。复旦大学团队研究发现,细胞质中的FOXP1在浸润性导管乳腺癌中表达水平与雌激素受体(ER)表达呈负相关,FOXP1阳性患者中ER低表达,FOXP1阴性患者中ER高表达,且FOXP1阴性患者的10年OS和RFS高于FOXP1阳性患者,差异有统计学意义,他们认为细胞质中的FOXP1低表达可能是浸润性导管乳腺癌患者OS的预测因子<sup>[8]</sup>。

在肝癌细胞中,下调FOXP1的表达水平能诱导G1/S期细胞周期阻滞而抑制肝癌细胞增殖<sup>[10]</sup>,影响细胞增殖周期。国外学者通过多中心回顾性分析发现,采用抗PD-1药物治疗IV期非小细胞肺癌患者组织中,非甲基化的FOXP1与患者无进展生存和OS有关,检测甲基化的FOXP1作为预测生物标志物,可以用于评价纳武单抗(Nivolumab)或彭溴利唑(Pbrolizumab)治疗效果,非小细胞肺癌患者可能从中获益<sup>[11]</sup>。但在CCRCC中其低表达与患者预后差有关<sup>[4]</sup>。中南大学的学者通过细胞实验利用EB病毒EBV-miR-BART11抑制FOXP1表达水平,诱导胃腺癌细胞增殖<sup>[12]</sup>。有研究认为Aurora激酶A通过FOXP1-FBXL7轴,下调FOXP1的表达,导致抗凋亡蛋白Survivin的过表达,减弱了DNA损伤剂阿霉素对癌细胞的杀伤作用,增加了胃癌细胞株BGC823的抗药性<sup>[13]</sup>。刘剑等<sup>[14]</sup>报道FOXP1在胃癌组织中呈低表达。综上所述,FOXP1在胃癌的耐药性方面发挥着重要的作用,在体外研究中发现胃癌细胞株中FOXP1的缺失或低表达容易导致细胞的耐药性增加或凋亡抑制,但没有临床大样本证明FOXP1的表达差异与胃癌肿瘤的增殖、耐药有关。

Ki67反映肿瘤细胞有丝分裂增殖状态,与胃癌的分化程度、细胞分型、淋巴结转移等相关,也与预后相关,为评估术后化疗疗效提供参考<sup>[2]</sup>。Toma等<sup>[4]</sup>发现在CCRCC中FOXP1的表达与肿瘤分级以及Ki67表达负相关。而在结肠癌和弥漫性大B细胞淋巴瘤中FOXP1和Ki67高表达又是影响患者预后的预测因素,FOXP1的表达与肿瘤侵袭性有关<sup>[15]</sup>。由此可见,FOXP1影响细胞的增殖,而Ki67是公认的增殖因子,但尚未有研究报道FOXP1和Ki67在胃癌组织中的相关性,我们猜想FOXP1和Ki67在胃癌组织中的作用可能跟CCRCC<sup>[4]</sup>中相似。且FOXP1参与了细胞增殖、分化、代谢、免疫等多个方面,研究胃癌组织中FOXP1和Ki67的相关性及对预后的影响具有一定的临床研究价值,其结果可为胃癌的诊治及预防提供参考。

本研究利用石蜡组织切片通过免疫组织化学染色的方法检测了167例胃癌组织中FOXP1和Ki67的表达情况。结果发现,在胃癌组织中FOXP1蛋白在癌中低表达,FOXP1与Ki67蛋白表达水平截然相反,呈负相关。且FOXP1和Ki67分别与不同组织学分级、浸润深度、淋巴结转移情况、TNM分期、是否血管癌栓之间差异有统计学意义,与国外的CCRCC报道类似<sup>[4]</sup>。多因素回归分析显示,FOXP1

低表达、Ki67高表达与患者RFS相关。Kaplan-Meier分析结果发现,FOXP1低表达、Ki67高表达影响患者术后RFS,差异具有统计学意义。Ki67反映细胞的分裂增殖状态,Ki67指数常用于评估肿瘤增殖活性、评估化疗后肿瘤细胞的坏死情况。FOXP1和增殖因子Ki67呈负相关,进一步说明FOXP1低表达和Ki67高表达与胃癌增殖活性的关系,FOXP1的缺失可能与肿瘤细胞耐药性的增强有关,可用于评估化疗后肿瘤细胞的凋亡坏死情况。

本研究也存在一定局限性。由于时间久远,新鲜标本储存时间有限,且随着时间的推移,新鲜标本不断的冻融,组织信息容易降解,无法行新鲜组织大样本的Western blot定量检测FOXP1和Ki67在组织中的表达水平,分析相关性,且本研究只纳入术后采用SOX方案化疗的患者,并没有研究FOXP1缺失对其他治疗方案的影响,这些因素都有可能致数据的偏倚。对于术后复发的患者,由于科技的进步,治疗手段多样,尤其是靶向药物的应用,干扰因素太多,没有对患者OS进行分析探讨,分析FOXP1对患者OS的影响。

综上所述,本研究首次证明FOXP1和Ki67在胃癌组织中具有一定的相关性,在胃癌发生和发展中起着重要作用,FOXP1作为评估胃癌治疗效果的一个新的生物学标志物,联合增殖因子Ki67可以预测进展期胃癌患者的预后,并有望为术后辅助性化疗制定相应的治疗策略,有可能为评价治疗预后及疾病转归、指导临床个性化用药提供指导。但关于FOXP1与Ki67之间相互作用的关系尚不明朗,仍需进一步研究,其研究结果可能对进展期胃癌的治疗产生重大意义。

#### [参考文献]

- [1] 段纪俊,严亚琼,杨念念,等.中国恶性肿瘤发病与死亡的国际比较分析[J].中国医学前沿杂志(电子版),2016,8(7):17-23
- [2] 薛卫成,樊祥山,孟刚,等.胃癌相关标志物免疫组化指标选择专家组共识(2014版)[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(9):951-953
- [3] GOLSON M L, KAESTNER K H. Fox transcription factors: from development to disease [J]. Development, 2016,143(24):4558-4570
- [4] TOMA M I, WEBER T, MEINHARDT M, et al. Expression of the Forkhead transcription factor FOXP1 is associated with tumor grade and Ki67 expression in clear cell renal cell carcinoma[J].Cancer Invest,2011,29(2):123-129

(下转第1240页)