

Foxo1 与 Ki-67 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其意义

朱允和^① 向小勇^① 陈力^② 沈学远^②

摘要 目的:探讨 Foxo1 和 Ki-67 蛋白在食管鳞状细胞癌组织及食管正常鳞状上皮组织中的表达及其临床意义。**方法:**采用免疫组织化学 SP 法,检测食管鳞状细胞癌(36例)组织及食管正常鳞状上皮(12例)组织中 Foxo1 和 Ki-67 蛋白的表达情况。**结果:**Foxo1 蛋白在食管鳞状细胞癌及食管正常鳞状上皮组织中的阳性表达率分别为 75.00%、16.67%,而 Ki-67 的阳性表达率分别为 83.33%、0。Foxo1 和 Ki-67 在食管鳞状细胞癌中的阳性表达率均明显高于食管正常鳞状上皮($P < 0.01$)。Foxo1 蛋白的表达随肿瘤分化程度增高而显著增高($P < 0.01$),而 Ki-67 的表达随肿瘤分化程度增高而降低($P = 0.107$)。Foxo1 和 Ki-67 蛋白的表达与其他临床病理特征无明显相关性($P > 0.05$)。**结论:**在食管鳞状细胞癌中,Foxo1 及 Ki-67 蛋白表达明显高于食管正常鳞状上皮组织,且随肿瘤分化程度的增高 Foxo1 的表达显著升高,而 Ki-67 的表达则显著降低。提示 Foxo1 和 Ki-67 在食管鳞状细胞癌肿瘤细胞分化过程中发挥着不同作用,其作用机制不同。

关键词 Foxo1 Ki-67 食管鳞癌 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.05.007

Expression and Significance of FoxO1 and Ki-67 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Yunhe ZHU¹, Xiaoyong XIANG¹, Li CHEN², Xueyuan SHEN²

Correspondence to: Xiaoyong XIANG, E-mail: charliexiang@sina.com

¹Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

²Department of Cardiothoracic Surgery, The Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract Objective: To determine the expression and clinical significance of the FoxO1 and Ki-67 proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and normal esophageal epithelial tissue. **Methods:** Streptavidin - peroxidase (SP) staining was used to detect the expression of FoxO1 and Ki-67 in 36 ESCC samples and 12 samples of normal esophageal epithelium. **Results:** The positive expression rate of FoxO1 was 75.00% in ESCC and 16.67% in the normal esophageal epithelium tissue. The positive expression rate of Ki-67 was 83.33% in ESCC and 0% in the normal esophageal epithelium tissue. The positive expression rates of FoxO1 and Ki-67 were significantly higher in ESCC than in normal esophageal tissue ($P < 0.01$). Among the ESCC cases, the rates of positive FoxO1 and Ki-67 expression were related to the degree of ESCC differentiation. The rate of positive FoxO1 expression increased as the degree of pathological differentiation increased ($P < 0.01$); however, the rate of positive Ki-67 expression decreased as the degree of pathologic ESCC differentiation increased ($P < 0.01$). No significant correlation was observed among other clinicopathologic features. **Conclusion:** The positive expression rates of FoxO1 and Ki-67 are significantly higher in ESCC than in normal esophageal epithelial tissue. As the degree of pathologic ESCC differentiation increases, the rate of positive FoxO1 expression increases, whereas that of Ki-67 decreases. FoxO1 and Ki-67 play different roles in ESCC differentiation, and the mechanism of action is different.

Keywords FoxO1; Ki-67; Esophageal squamous carcinoma; Immunohistochemistry

食管癌的发生也是多种癌基因和抑癌基因相互作用失调而形成的一种多基因性疾病。近年来研究发现很多癌基因和抑癌基因与食管癌的发生发展有关,但至今未确认与食管癌直接有关的基因。Foxo1 蛋白作为 FOXO 转录因子亚家族中的重要一员,在细胞增殖、凋亡、自噬、代谢和免疫反应等多种生理效应中,以及在肿瘤的发生发展中扮演了重要的角色。本研究利用免疫组织化学技术检测食管鳞状细胞癌组织和食管正常鳞状上皮中 Foxo1 及细胞核增殖抗原(Ki-67)蛋白的表达,并探讨其意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 选取 2010 年 1 月至 2011 年 2 月在重庆医科大学附属永川医院内镜活检及手术切除并经病理学确诊的食管鳞癌患者。所选 36 例食管鳞癌患者术前均未行放疗、化疗及免疫治疗。另选其中手术切除的 12 例癌旁正常食管鳞状上皮组织作对照。36 例标本均经本院病理医师复阅 HE 切片证实。

1.1.2 临床资料 36 例标本中,男性 27 例,女性 9 例,年龄 47 ~ 83 岁,中位年龄 64 岁;其中上段食管鳞

作者单位:①重庆医科大学附属第一医院心胸外科(重庆市 400016);②重庆医科大学附属永川医院心胸外科

通信作者:向小勇 Charliexiang@sina.com

癌6例,中段20例,下段10例。36例食管鳞癌患者中,低分化8例,中分化6例,高分化22例。临床分期依据2009年第7版国际抗癌联盟(UICC)食管癌分期对T、N、M的划分标准。

1.1.3 试剂 Foxo1抗体购于Cell Signaling Technology(CST)公司;Ki-67抗体、SP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。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用SP免疫组织化学染色方法,严格按照SP试剂盒说明书进行实验,以PBS代替一抗作为阴性对照。主要实验步骤如下:1)常规石蜡切片脱蜡、水化,高温沸腾柠檬酸盐抗原修复;2)用3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性;3)封闭用山羊血清阻断非特异性反应;4)滴加Foxo1及Ki-67一抗,4℃过夜;5)滴加生物素化二抗;6)滴加S-A/HRP;7)DAB显色剂显色;8)苏木素复染,酒精脱水、树胶封片、镜检。

1.2.2 结果判定 Foxo1阳性染色主要部位是细胞质,细胞质出现淡黄色、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:阴性(-)为无阳性细胞着色;弱阳性(+)为阳性细胞数在1%~25%;中等阳性(++)为阳性细胞数在26%~50%;强阳性(+++)为阳性细胞数>51%,依次记为1、2、3分。两者乘积<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。Ki-67阳性染色主要部位是细胞核,细胞核有淡黄色、棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,阳性细胞表达以百分率表示。在400高倍镜下随机选取10个视野,计数阳性细胞百分率。判定标准:阴性(-)为阳性细胞数<5%;弱阳性(+)为阳性细胞数在5%~25%;阳性(++)为阳性细胞数在26%~60%;强阳性(+++)为阳性细胞数>60%。(-)为阴性表达;(+)-(+++)为低表达;(+++)为高表达。结果由两位病理科副主任医师独立阅片后统一得出。

1.3 统计学处理

应用SPSS 17.0统计软件。采用 t 检验、Fisher确切概率法和Spearman相关分析,进行统计学处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞癌组织中Foxo1和Ki-67蛋白的表达及定位

在食管鳞癌组织石蜡切片中,Foxo1单克隆抗体

显示明确的细胞质染色。食管正常鳞状上皮主要于细胞质内,不显色或仅有少许着色(图1);食管正常鳞状上皮和食管鳞癌组织比较,具有显著性差异($P<0.01$,表1)。在鳞癌组织中,Foxo1的表达明显增强,阳性表达率为75.00%(27/36),见图2。

Ki-67在正常的食管鳞状上皮组织中主要表达于基底层,中间层和表皮层几乎不着色(图3)。在鳞癌组织中,Ki-67的表达明显增强($P<0.001$,图4)。

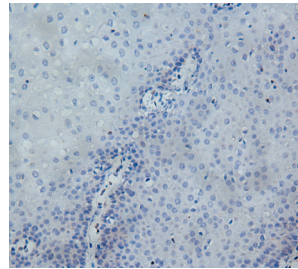


图1 Foxo1在正常食管鳞状上皮组织中的表达 (SP × 400)

Figure 1 Foxo1 protein expression in normal esophageal epithelial tissue (SP × 400)

表1 正常食管鳞状上皮和食管鳞癌组织中Foxo1、Ki-67蛋白的表达

Table 1 Foxo1 and Ki-67 protein expression in normal esophageal epithelium and esophageal squamous carcinoma tissue

项目	例数	Foxo1阳性率	Ki-67阳性率
正常食管鳞状上皮	12	2(16.67)	0(0)
食管鳞癌组织	36	27(75.00*)	30(83.33*)

*:相对于正常食管组织 $P<0.001$;()内为%

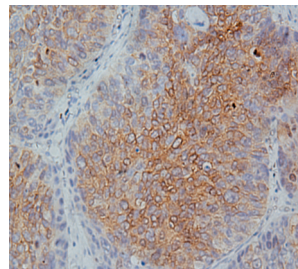


图2 Foxo1在食管鳞癌组织中的表达 (SP × 400)

Figure 2 Foxo1 protein expression in esophageal squamous carcinoma tissue (SP × 400)

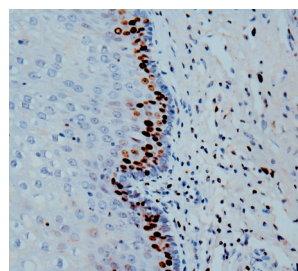


图3 Ki-67在正常食管鳞状上皮组织中的表达 (SP × 400)

Figure 3 Ki-67 protein expression in normal esophageal epithelium tissue (SP × 400)

2.2 Foxo1、Ki-67的表达与临床病理特征的关系

Foxo1和Ki-67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显著性差异($P>0.05$),而与肿瘤的分化程度和两种蛋白表达具有显著性差异(表2)。

2.3 食管鳞癌组织中Foxo1与Ki-67蛋白表达的相关性

在36例食管鳞癌组织中,27例Foxo1阳性表达的食管鳞癌中有22例Ki-67呈阳性表达,在9例Foxo1阴性表达的食管鳞癌中有1例Ki-67不表达。Foxo1及Ki-67均高表达于食管癌组织。经Spearman相关性分析,两者在食管鳞癌中的表达无显著性差异($P>0.05$,表3)。

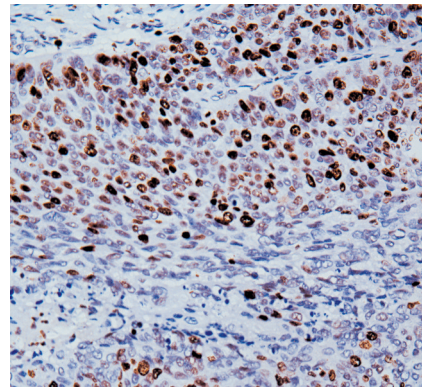


图4 Ki-67在食管鳞癌组织中高表达 (SP × 400)

Figure 4 Ki-67 protein expression in esophageal squamous carcinoma tissue (SP × 400)

表2 Foxo1、Ki-67蛋白的表达与临床病理特征的关系

Table 2 Correlations among Foxo1 and Ki-67 protein expression and the clinicopathologic features of esophageal squamous carcinoma tissue

临床指标	例数	Foxo1			P	Ki-67			P
		阳性例数	阴性例数	阳性率/%		阳性例数	阴性例数	阳性率/%	
年龄/岁	≤60	10	7	3	70.00	9	1	90.00	0.655
	>60	26	19	7	73.08	21	5	80.77	
性别	男	27	21	6	77.78	21	6	77.78	0.303
	女	9	3	6	33.33	9	0	100.00	
发生部位	上段	6	4	2	66.67	5	1	83.33	0.413
	中段	20	15	5	75.00	18	2	90.00	
	下段	10	8	2	80.00	7	3	70.00	
分化程度	低分化	8	2	6	25.00	8	0	100.00	0.107
	中分化	6	4	2	66.67	6	0	100.00	
	高分化	22	21	1	95.45	16	6	72.72	
TNM分期	I、II	28	21	7	75.00	22	6	78.57	0.302
	III、IV	8	6	2	75.00	8	0	100.00	
淋巴结转移	有	12	9	3	75.00	12	0	100.00	0.079
	无	24	18	6	75.00	18	6	75.00	

* $P<0.001$

表3 食管鳞癌中Foxo1与Ki-67蛋白表达的相关性

Table 3 Correlations between Foxo1 and Ki-67 protein expression in esophageal squamous carcinoma

项目	Ki-67阳性例数	Ki-67阴性例数	r	P
FoxO1阴性	8	1	0.086	*
FoxO1阳性	22	5		

* $P>0.05$

3 讨论

Forkhead转录因子是2000年正式统一命名的一个新的转录因子家族^[1],该家族成员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、凋亡和免疫等方面起关键作用,并迅速成为医学细胞生物学、遗传学、免疫学以及肿瘤学领域的研究热点^[2-3]。Foxo1基因也称FKHR、Foxo1a、Forkhead

box O1,定位于人染色体13q14.1。Foxo1作为PI3K-Akt信号通路的直接下游信号分子,通过转录和传导各种生长因子及细胞因子信号,从而对细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种生物过程起重要的调节作用。此外,Foxo1还参与人体的生长发育、代谢、自噬、应激、DNA损伤/修复、肿瘤发生、血管生成等生命过程。近年来,研究发现FOXO1的失活与人类多种肿瘤的发生、发展及预后密切相关。

目前,国内外关于Foxo1蛋白的研究主要集中于乳腺癌、胃癌、前列腺癌、宫颈癌等方面,鲜见在食管癌方面的研究报道。颜亚晖等^[4]报道在乳腺癌中Foxo1蛋白表达于细胞核,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($P<0.01$)。Guttilla

等^[5]研究报道乳腺癌组织中 Foxo1 mRNA 表达下调。周英姿等^[6]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。许多学者一直认为 Foxo1 通过细胞凋亡途径,诱导肿瘤细胞死亡。Foxo1 蛋白是诱导细胞自噬的关键蛋白,通过自噬途径抗癌,从而揭示了 Foxo1 作为抑癌因子抗肿瘤的新机制。

本研究结果显示:Foxo1 蛋白在食管鳞癌中的表达明显高于食管正常鳞状上皮组织,提示 Foxo1 的表达与食管鳞癌的发生发展有关。推测其原因为 Foxo1 转录因子广泛表达于成人各组织器官中,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、外周血白细胞等^[7]。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,其基因表达具有时空差异,因此该基因可能在食管鳞癌的发生过程中发挥着重要的作用机制。实验结果表明 Foxo1 在食管鳞癌中的表达与鳞癌组织分化程度密切相关($P<0.01$),而与食管鳞癌患者的年龄、性别、肿瘤发生部位、分期及有无淋巴结转移无显著性差异,提示 Foxo1 在食管鳞癌肿瘤细胞分化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。

Ki-67 是目前公认的评价细胞增殖状态的稳定指标,在研究细胞增殖方面优于 PCNA、DNA 指数等指标^[8]。本研究显示:在正常食管黏膜组织中,Ki-67 主要表达于鳞状上皮基底层,细胞核染色较稳定,这与当前 Ki-67 鳞状上皮组织中的研究结果较一致。食管鳞癌组织与食管正常鳞状上皮组织相比较,Ki-67 的阳性表达率显著升高($P<0.01$)。在食管鳞癌中,Ki-67 主要表达于细胞核,与癌组织分化程度有关($P<0.01$),癌组织分化程度越低,Ki-67 阳性表达率越高,但与患者的性别、年龄、肿瘤发生部位、TNM 分期及有无淋巴结转移无关($P>0.05$),与国内几项文献报道相符^[9-10]。

Ki-67 能较准确地反映肿瘤的恶性程度,且与肿瘤复发有密切关系。Ki-67 在肿瘤病理分级较低,在具有高度增殖能力的恶性肿瘤中高表达,从而准确反映出肿瘤的性质^[11]。而本研究显示 Foxo1 蛋白与 Ki-67 表达不同,从而揭示 Foxo1 可能在食管鳞癌恶变中发挥着重要作用。

Foxo1 基因广泛表达于人体的各组织器官中,因其表达的时空差异,故 Foxo1 基因随人体的生长发育在各组织器官中表达存在着动态变化。在食管鳞癌的发生及组织分化过程中,Foxo1 可能起到重要的作用,但能否成为食管鳞癌临床诊断和判断肿瘤生物

学行为的有效指标,仍需要大量的实验证实。坚信随着生命科学研究的不断深入,Foxo1 在食管鳞癌中的作用机制将被进一步揭示。

参考文献

- 1 Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2): 142-146.
- 2 Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1[J]. *Cell*, 2005, 122(1): 33-43.
- 3 Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, et al. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3[J]. *Immunity*, 2005, 22(3): 329-341.
- 4 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*,2010,4(19): 380-384.
- 5 Guttilla IK, White BA. 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.
- 6 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*,2010,6(37):675-678.
- 7 Andersonm J, Viarsc 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.
- 8 Duchrow M, Gerdes J, Schluter G, et al. The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms [J]. *Cell Prolif*, 1994, 27(5): 235-242.
- 9 陶玉梅,陶仪声,马莉.食管鳞状细胞癌中 MCM2 蛋白与 Ki-67 的表达及对比研究[J].*临床与实验病理学杂志*,2011,27(4):382-384.
- 10 郝曙光,冯笑山,董彩虹,等.食管鳞癌及其癌前病变组织 P63 与 Ki-67 蛋白共表达临床意义的探讨[J].*中华肿瘤防治杂志*,2010,20(17):1646-1661.
- 11 Verdolini R, Amerio P, Goteri G, et al. Cutaneous carcinomas and preinvasive neoplastic lesions. Role of MMP-2 and MMP-9 metalloproteinases in neoplastic invasion and their relationship with proliferative activity and p53 expression[J]. *J Cutan Pathol*, 2001, 28(3): 120-126.

(2011-08-29 收稿)

(2011-12-11 修回)

(张佺校对)