



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.006
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.006
Chinese Journal of General Surgery, 2020, 29(4):429-439.

· 基础研究 ·

FOXP4 的表达及其对 β -catenin 转录的调控在结直肠癌中的作用

张淑莲¹, 马军¹, 齐宝华¹, 范志刚¹, 徐长福²

(1. 西安交通大学医学部附属三二〇一医院 肿瘤科, 陕西 汉中 723000; 2. 西安交通大学医学院基础医学院, 陕西 西安 710061)

摘要

背景与目的: FOXP 转录因子家族已被证明在多种肿瘤中发挥重要作用, 但其成员 FOXP4 在结直肠癌中的作用尚未见报道, 故本研究探讨 FOXP4 在结直肠癌中的表达, 及其与患者临床病理特征、预后的关系, 并探讨其潜在的作用机制。

方法: 采用免疫组化和 RT-PCR 检测 50 例结直肠癌患者癌组织以及癌旁正常组织标本中 FOXP4 的表达, 并分析其与患者临床病理特征的关系; 利用 GEIPA 数据库分析结直肠癌组织 FOXP4 的表达情况, 及其与患者生存率的关系。构建稳定过表达或敲减 FOXP4 的结直肠癌细胞系, 分别用 CCK8 与 Transwell 法检测各结直肠癌细胞系增殖能力与迁移能力的变化。根据 AnimalTFDB 3.0 数据库预测 FOXP4 可能的靶启动子, 分别用 CHIP 实验、荧光素酶报告基因、RT-PCR 和 Western blot 验证 FOXP4 与靶启动子结合能力及对相应靶基因转录的调控作用。最后, 对靶基因的功能进行验证。

结果: 临床标本与 GEIPA 数据库分析均显示, 结直肠癌组织中 FOXP4 的表达量明显升高, 其表达量与患者肿瘤大小、分化程度及 TNM 分期明显有关, 高表达 FOXP4 的患者总体生存率明显降低 (均 $P < 0.05$)。CCK8 与 Transwell 实验结果显示, FOXP4 过表达的结直肠癌细胞的增殖、迁移能力明显增强, 而 FOXP4 低表达的结直肠癌细胞的增殖、迁移明显减弱 (均 $P < 0.05$)。AnimalTFDB 3.0 数据库分析显示, β -catenin 的启动子可能是 FOXP4 的靶启动子; ChIP 实验证明 FOXP4 可以识别 β -catenin 启动子区域; 荧光素酶实验显示 FOXP4 仅可识别野生型的 β -catenin 序列; RT-PCR 和 Western blot 分析发现 FOXP4 过表达可增加 β -catenin 基因及蛋白的表达水平。 β -catenin 抑制剂处理后, FOXP4 过表达对结直肠癌细胞增殖与迁移能力的增强作用被取消 (均 $P < 0.05$)。

结论: FOXP4 的表达在结直肠癌中增高, 且与患者的恶性临床病理特征及不良预后密切相关。FOXP4 过表达可能是通过调控 β -catenin 转录促进结直肠癌细胞的增殖及迁移。综上提示, FOXP4 结直肠癌的发生发展中起了重要作用, 可作为结直肠癌的潜在治疗靶点。

关键词

结直肠肿瘤; 叉头转录因子类; β 连环素; 细胞增殖; 细胞运动

中图分类号: R735.3

收稿日期: 2019-09-29; 修订日期: 2020-03-14。

作者简介: 张淑莲, 西安交通大学医学部附属三二〇一医院副主任医师, 主要从事肿瘤综合治理方面的研究。

通信作者: 范志刚, Email: fanzg0418@163.com

Effects of FOXP4 expression and its regulation on β -catenin transcription in colorectal cancer

ZHANG Shulian¹, MA Jun¹, QI Baohua¹, FAN Zhigang¹, XU Changfu²

(1. Department of Oncology, the 3201 Hospital Affiliated to Medical Department of Xi'an Jiaotong University, Hanzhong, Shaanxi 723000, China; 2. College of Basic Medicine, Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710061, China)

Abstract

Background and Aims: The FOXP transcription factor family has been shown to play an important role in multiple cancer types. However, the function of its member FOXP4 in colorectal cancer has not reported yet. This study was conducted to investigate the FOXP4 expression in colorectal cancer and its relationship with clinicopathologic characteristics and prognosis of the patients, as well as its potential mechanism of action.

Methods: The FOXP4 expressions in the specimens of tumor tissue and tumor adjacent tissue from 50 colorectal cancer patients were determined by immunohistochemical staining and RT-PCR, respectively. Based on the GEIPA database, the FOXP4 expression in colorectal cancer tissues and its relationship with the survival rates of the patients were analyzed. The colorectal cell lines with stable FOXP4 overexpression or knockdown were created, and then, the changes in proliferative and migration abilities of them were examined by CCK8 and Transwell assay. The possible target promoter for FOXP4 was predicted by using AnimalTFDB 3.0 database, the combining ability of FOXP4 to its target promoter and the regulatory effect of FOXP4 on the corresponding target gene were verified by ChIP assay, luciferase reporter assay, RT-PCR and Western blot analysis, respectively. Finally, the function of the target gen was validated.

Results: The results of both analyses of the clinical specimens and GEIPA database showed that the FOXP4 expression in colorectal cancer tissue was significantly elevated, and its expression level was significantly associated with the tumor size, degree of tumor differentiation and TNM stage of the patients, and those with high FOXP4 expression had a significant low overall survival rate (all $P < 0.05$). The results of the CCK8 and Transwell assay showed that the proliferative and migration abilities in colorectal cancer cells with FOXP4 overexpression were significantly increased, while in those with low FOXP4 expression were significantly decreased (all $P < 0.05$). The analysis of AnimalTFDB 3.0 database showed that β -catenin promoter was the target promoter for FOXP4; ChIP assay revealed that FOXP4 recognized the β -catenin promoter region; luciferase reporter assay found that FOXP4 only recognized the wild-type β -catenin sequence; RT-PCR and Western blot analysis demonstrated that FOXP4 overexpression up-regulated both gene and protein expression levels of β -catenin. In colorectal cancer cells after treatment with β -catenin inhibitor, the enhancing effects of FOXP4 overexpression on proliferative and migration abilities were abolished (all $P < 0.05$).

Conclusion: The FOXP4 expression is increased in colorectal cancer, which is closely related to the malignant clinicopathologic features and unfavorable prognosis of the patients. FOXP4 overexpression can promote the proliferation and migration of colorectal cancer cells probably by regulating the transcription of β -catenin. So, this study suggests that FOXP4 play a critical role in the occurrence and development colorectal cancer, and may be served as a potential therapeutic target for colorectal cancer.

Key words

Colorectal Neoplasms; Forkhead Transcription Factors; β -Catenin; Cell Proliferation; Cell Movement

CLC number: R735.3

结直肠癌为全球第三大最常见的恶性肿瘤，据报道仅2018年全球新增结直肠癌病例180万，死亡86万例^[1]。近10年来，由于生活和饮食习惯的变

化，结直肠癌的发病率迅速上升^[2-3]。癌细胞转移是目前结直肠癌致死的主要原因，大约60%的结直肠癌患者后期会发生转移^[4]。尽管结直肠癌的标准

治疗方法可以使早期结直肠癌患者的病情有所改善,但对中晚期结直肠癌患者疗效并不明显,5年生存率仅为13.9%^[5-6]。因此,有必要了解中晚期结直肠癌进展与转移的机制,希望能找到一种新的可以降低晚期结直肠癌患者耐药的治疗靶点。越来越多的证据表明转录因子在对肿瘤的进展中发挥重要作用,比如FOXP家族(FOXP1、FOXP2、FOXP3和FOXP4)作为其中一类转录因子,研究发现其在多种肿瘤的生长、发生和转移中发挥重要作用^[7-9]。已证实FOXP1低表达的结直肠癌,其肿瘤细胞增殖能力强,生存期较差^[10]。而FOXP4在结直肠癌中的调节机制目前尚未报道,因此本研究通过收集结直肠癌患者的临床标本,分析FOXP4在癌组织和癌旁组织中的表达水平,并通过细胞与分子生物学实验进一步分析相关的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HT-29细胞、CaCo2细胞、HT-29和CaCo2耐药细胞均购自盖宁生物;DMEM细胞培养基、胎牛血清购自Gibco公司;XAV-939以及CCK8试剂盒购自Selleck公司;psPAX2、pMD2G、pLKO.1-NO、pLKO.1-siFOXP4、pLenti-3F以及pLenti-FOXP4购自生物风有限公司;FOXP4引物、GAPDH引物购自武汉擎科生物有限公司;RNA提取试剂盒购自Takara公司;RNA逆转录试剂盒(Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit)以及Universal SYBR[®] qPCR Master Mix试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司;一抗GAPDH、 β -catenin及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠二抗购自三鹰生物科技有限公司;Western blot试剂盒及BCA蛋白浓度测量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;免疫组化试剂盒以及双荧光素酶试剂盒购自Sigma公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 239T细胞、LOVO细胞、CaCo2细胞、DLD1细胞、SW48细胞、HCT116细胞均培养于含10%FBS-DMEM中,5%CO₂,37℃。

1.2.2 组织来源 于西安交通大学医学部附属三二〇一医院收集50例确诊为结直肠癌的患者临

床信息,取其癌组织和癌旁组织。取出样本后立即置于液氮中冷冻,然后置于-80℃保存。

1.2.3 病毒包装 收集对数期生长293T细胞,接种于6cm培养皿中,待细胞融合度达到70%时进行转染。首先将质粒以pLent-3F/pLent-FOXP4/pLKO.1-NO/pLKO.1-siFOXP4:psPAX2:pMD2G=4:3:1的比例混合,转染至293T细胞,6h后更换新鲜DMEM培养基,48h收细胞上清。

1.2.4 病毒感染及稳定敲减细胞系筛选 收集处于对数生长期的结直肠癌细胞系,待细胞融合度达到80%时进行转染,严格按照Lipofectamine 3000说明书进行慢病毒感染,24h后更换至新鲜培养基。并进一步采用嘌呤霉素(2mg/L)持续筛选,2周后,采用Western blot,RT-PCR检测上述细胞的过表达以及敲减的效率。

1.2.5 RT-PCR检测 首先使用TRNA提取试剂盒提取RNA;进一步将RNA逆转录生成cDNA。以GAPDH为内参,GAPDH正向引物为5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3',反向引物为5'-TGC ACC ACC AAC TGT TAG C-3';FOXP4正向引物为5'-CGA CAT GAT GGT GGA ATC TG-3',反向引物为5'-TGT TTG CTG TCA TTG TTC CC-3',所有基因的相对表达水平用2^{- Δ CT}法计算。

1.2.6 Western blot检测 加入RIPA裂解液处理细胞,待细胞充分裂解后,4℃,离心10min。取上清,BCA法测定蛋白浓度,取等量的蛋白上样,运行SDS-PAGE电泳。然后采用PDVF膜转膜,5%脱脂奶粉封闭,孵育FOXP4、 β -catenin、GAPDH一抗,室温孵育二抗,曝光显影。

1.2.7 CCK8检测细胞活力 将处理好的LOVO细胞,SW48细胞,SW480细胞,HCT116细胞接种于96孔板中,接种密度为 2.0×10^3 个。分别于0、12、24、48、72h避光加入CCK-8溶液30 μ L;孵育3h后,采用多功能酶标仪检测450nm波长处的吸光度值。

1.2.8 Transwell检测细胞的迁移能力 将处理好的LOVO细胞,SW48细胞,SW480细胞,HCT116细胞培养于Transwell小室的上层,同时下层添加500 μ L含有10%FBS的DMEM培养基。培养48h后,用棉签去除上室的细胞,室温下用0.1%结晶紫染色30min。最后,对迁移的细胞进行计数,并用光学显微镜拍照。每个独立的实验至

少重复3次。

1.2.9 免疫组化检测 组织切片放入65℃烤箱中烤1.5 h, 切片在二甲苯放置10 min, 更换二甲苯放置10 min, 将切片依次放入100%乙醇、95%乙醇、80%乙醇中、纯化水各5 min, 将切片放入修复盒中加入抗原修复液, 高压锅加热到自动放气, 2 min后离开热源, 自然冷却。弃去抗原修复液, 将切片用PBS淋洗, 0.5% Triton X-100室温通透20 min, 将切片移入湿盒中加入新鲜配制的3%双氧水, 室温孵育10 min, PBS充分淋洗, 浸洗3次, 每次3 min, 吸水纸吸干PBS, 在玻片上滴加山羊血清, 室温封闭30 min, 每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗(FOXP4 1:300), 放入湿盒, 4℃孵育过夜, 滴加兔二抗工作液, 室温孵育1 h, PBS充分淋洗, DAB显色10 min, PBS冲洗2 min, 苏木精复染3 min, 盐酸酒精分化, 反蓝, PBS冲洗1 min脱水、透明、封片、光学显微镜下拍照。

1.2.10 ChIP 实验检测 取出经过实验要求处理的细胞, 加入1%多聚甲醛, 37℃孵育10 min, 加甘氨酸, 混匀后, 在室温下放置5 min。吸尽培养基, 用冰冷的PBS清洗细胞2次。细胞刮刀收集细胞于15 mL离心管中, 2 000 r/min, 离心5 min, 收集细胞, 加入500 μL SDS裂解缓冲液, 超声破碎, 1 200 r/min, 4℃, 离心10 min。取上清, 其中1管中加入1 μL FOXP4抗体, 另1管中加对照IgG, 4℃颠转过夜。孵育过夜后, 每管中加入60 μL Protein A/G, 4℃, 孵育2 h。700 r/min离心1 min, 除去上清, 每管中加入20 μL NaCl溶液, 混匀, 65℃解交联过夜, 每管加入1 μL RNase A, 37℃孵育1 h, 每管加入10 μL EDTA, 20 μL Tris-HCl(pH6.5), 2 μL 10 mg/mL蛋白酶K, 回收DNA片段。

1.2.11 荧光素酶检测 将野生型以及突变型的β-catenin的启动子质粒转染到相应的细胞系中, 48 h后, 使用双荧光素酶报告系统检测荧光素酶活性。

1.3 统计学处理

每组实验重复至少3次, 应用SPSS 14.0进行统计分析, 计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较均采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXP4在结直肠癌组织中的表达及作用分析

采用免疫组化和RT-PCR检测癌组织和癌旁组织中FOXP4的相对表达量(图1A-B), 结果显示结直肠癌患者癌组织中FOXP4的表达量明显高于癌旁组织($P < 0.01$)。采用GEIPA(<http://gepia.cancer-pku.cn>)数据库分析FOXP4在结直肠癌中的表达量以及对结直肠癌患者的生存期的影响(图1C-D), 结果显示, 癌组织中的FOXP4表达量明显高于正常组织($P < 0.05$), 且高表达FOXP4的患者其总体生存率明显较差($P < 0.05$)。据上述结果推测FOXP4在结直肠癌进展中可能发挥一定作用。

比较结直肠癌组中FOXP4表达与不同病理特征发现, FOXP4的表达在不同性别、年龄段的患者中无明显差异(均 $P > 0.05$), 在不同肿瘤大小、分化程度、T分期、N分期及M分期的患者中差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$), 其在肿瘤大小 > 1 cm、分化程度中低、T3~4期、及高N和M1期的患者中表达明显增高(表1)。

2.2 FOXP4表达水平对结直肠癌细胞的增殖的影响

进一步探究FOXP4对结直肠癌进展的影响, 首先使用RT-PCR检测结肠癌细胞系LOVO, SW48, SW480, HCT116, CaCo2以及DLD1中FOXP4的表达量(图2A), 结果显示, LOVO, SW48细胞FOXP4表达量相对降低, HCT116、SW480细胞FOXP4表达量相对较高。基于该结果, 构建SW48-空载体、SW48-FOXP4、LOVO-空载体、LOVO-FOXP4细胞系以及SW480-阴性对照序列、SW480-siFOXP4、HCT116-阴性对照序列、HCT116-siFOXP4细胞系; 采用RT-PCR证实了FOXP4在结直肠癌细胞系中的过表达及敲减效率(图2B-C)。进一步使用CCK8检测FOXP4对结直肠癌细胞系增殖能力的影响(图2D-G), 结果表明, FOXP4过表达可明显增加结直肠癌细胞的增殖能力(均 $P < 0.01$); FOXP4低表达可明显降低结直肠癌细胞的增殖能力(均 $P < 0.01$)。

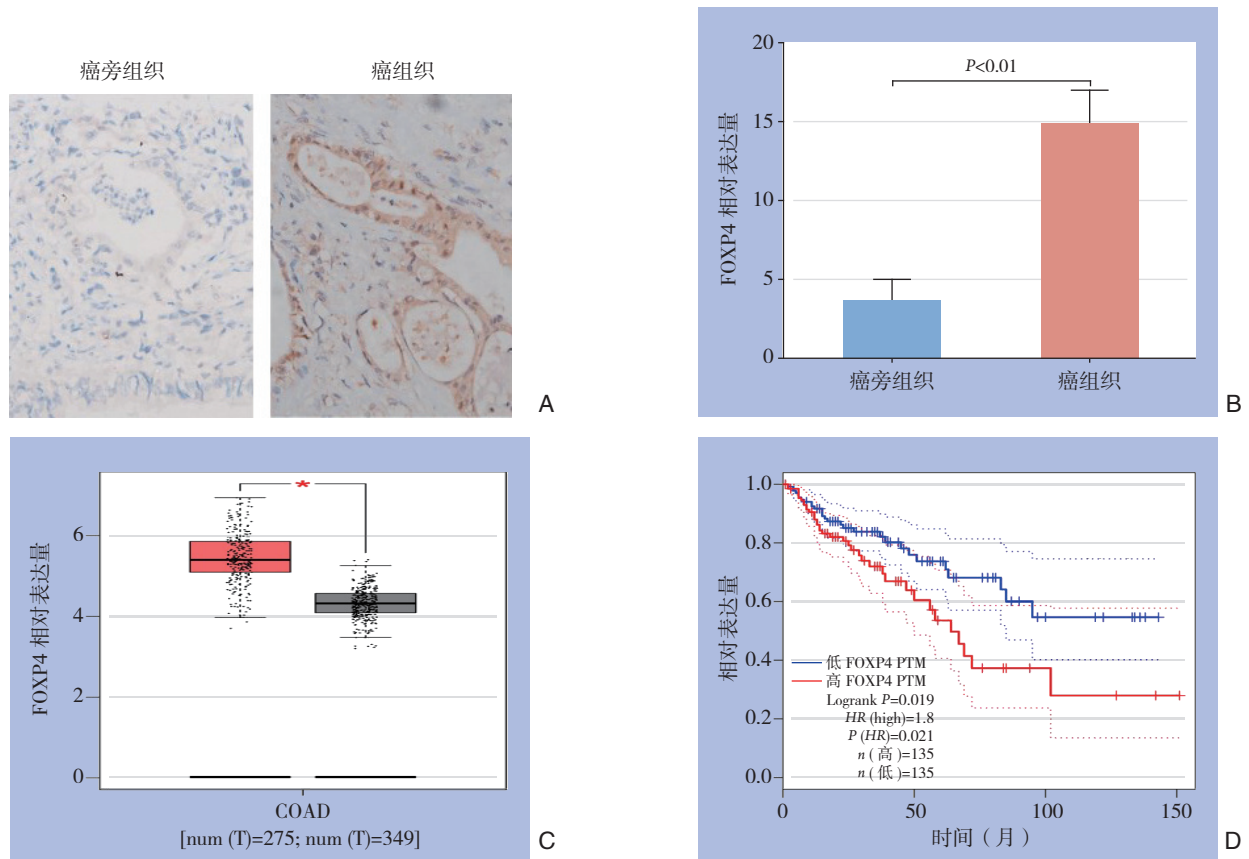


图 1 FOXP4 在结直肠癌中表达的检测与分析 A: 免疫组化检测结直肠癌组织与癌旁组织中 FOXP4 的表达 ($\times 200$); B: RT-PCR 检测结直肠癌组织和癌旁组织中 FOXP4 的表达; C: GEPIA 数据库分析结直肠癌患者 FOXP4 的表达; D: GEPIA 数据库分析结直肠癌患者 FOXP4 的表达量与总体生存率的关系

Figure 1 Determination and analysis of FOXP4 expression in colorectal cancer A: Immunohistochemical attaining for FOXP4 expressions in colorectal cancer tissues and adjacent tissues ($\times 200$); B: RT-PCR detection of FOXP4 expressions in colorectal cancer tissues and adjacent tissues; C: GEPIA database analysis of the expression level of FOXP4 in patients with rectal cancer; D: GEPIA database analysis of the relationship between the expression level of FOXP4 and overall survival rate in patients with colorectal cancer

表 1 FOXP4 表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系 [n (%)]

Table 1 Relations of FOXP4 expression with the clinicopathologic characteristics of colorectal cancer patients [n (%)]

临床病理特征	n	高表达	低表达	χ^2	P	临床病理特征	n	高表达	低表达	χ^2	P
性别				0.912	0.428	T 分期				9.812	0.005
男	33	25 (75.76)	8 (24.24)			T ₁₋₂	18	10 (55.56)	8 (44.44)		
女	17	13 (76.47)	4 (23.53)	T ₃₋₄	32	27 (84.36)	5 (15.64)				
年龄(岁)				1.183	0.284	N 分期				7.775	0.017
> 50	30	23 (76.67)	7 (23.33)			N ₀	31	25 (80.65)	6 (19.35)		
≤ 50	20	15 (75.00)	5 (25.00)	N ₁	11	8 (72.73)	3 (27.27)				
肿瘤大小 (cm)				19.732	0.000	N ₂	8	6 (75.00)	2 (25.00)	7.194	0.022
> 1	35	32 (91.43)	3 (8.57)			M 分期					
≤ 1	15	6 (40.00)	9 (60.00)	M ₀	38	32 (84.21)	6 (15.79)				
分化程度						M ₁	12	11 (91.67)	1 (8.33)		
低	3	3 (100.00)	0 (0.00)								
中	23	19 (82.61)	4 (17.39)								
高	24	14 (58.33)	10 (41.67)								

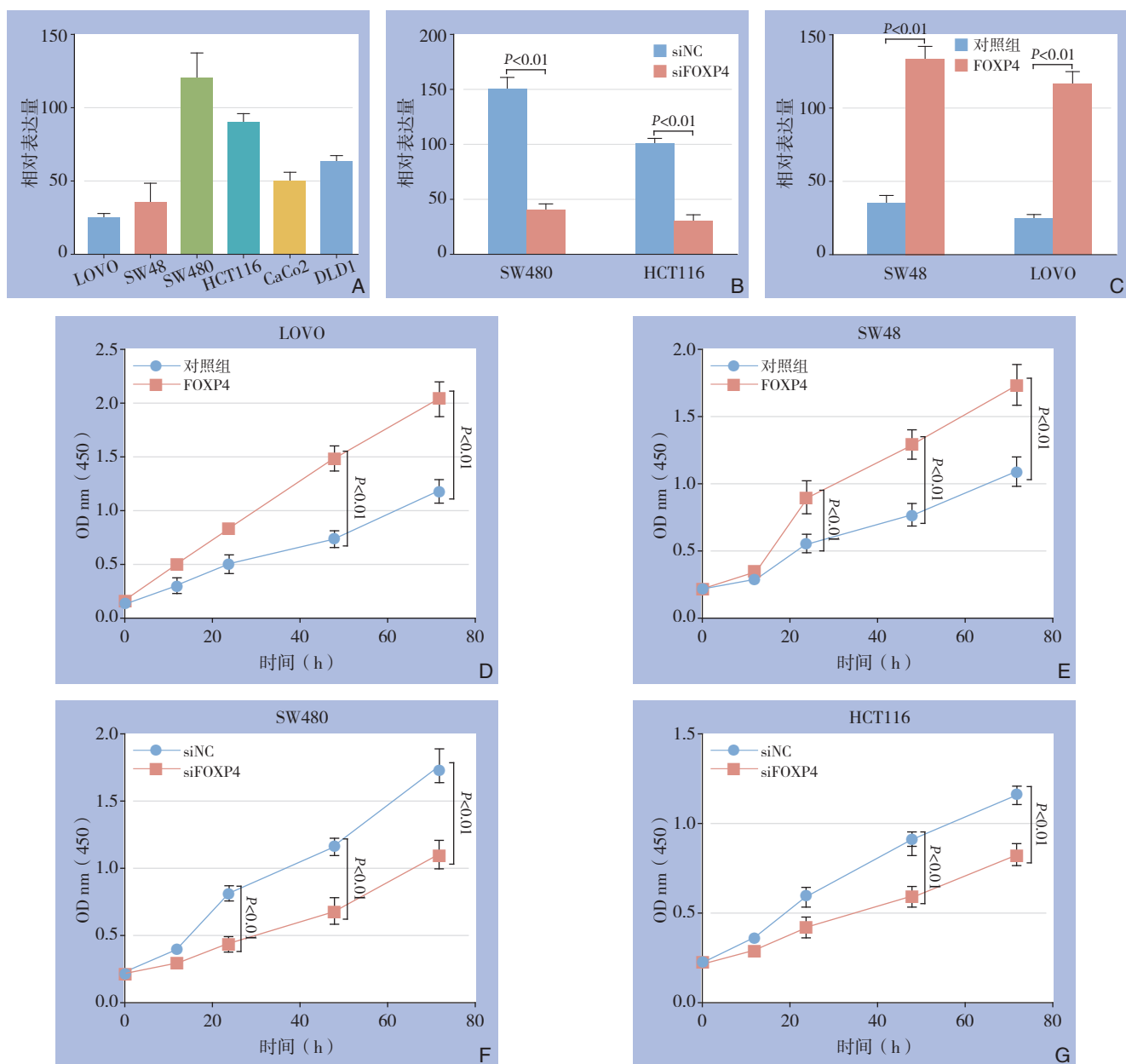


图 2 FOXP4 表达量对结直肠癌细胞增殖能力的影响 A: RT-PCR 检测结直肠癌细胞系中 FOXP4 的表达量; B: RT-PCR 检测结直肠癌细胞系中 FOXP4 的过表达效率; C: RT-PCR 检测结直肠癌细胞系中 FOXP4 的敲减效率; D: CCK8 检测 FOXP4 过表达对 LOVO 细胞增殖能力的影响; E: CCK8 检测 FOXP4 过表达对 SW48 细胞增殖能力的影响; F: CCK8 检测 FOXP4 敲减对 SW480 细胞增殖能力的影响; G: CCK8 检测 FOXP4 敲减对 HCT116 细胞增殖能力的影响

Figure 2 The influence of FOXP4 expression level on the proliferative ability of colorectal cancer cells A: RT-PCR detection of FOXP4 expression levels in different colorectal cancer cell lines; B: RT-PCR detection of FOXP4 overexpression efficiency in colorectal cancer cell lines; C: RT-PCR detection of FOXP4 knockdown efficiency in colorectal cancer cell lines; D: CCK8 detection of the effect of FOXP4 overexpression on the proliferation of LOVO cells; E: CCK8 detection of the effect of FOXP4 overexpression on the proliferation of SW48 cells; F: CCK8 detection of the effect of FOXP4 knockdown on the proliferation of SW480 cells; G: CCK8 detection of the effect of FOXP4 knockdown on the proliferation of HCT116 cells

2.3 FOXP4 促进结直肠癌细胞的迁移能力

进一步探讨 FOXP4 对结直肠癌细胞系迁移能力的影响, 结果显示, 过表达 FOXP4 后, LOVO 细

胞和 SW48 细胞的迁移能力明显增加 (均 $P < 0.01$) (图 3A-D); FOXP4 敲减后, SW480 和 HCT116 细胞的迁移能力明显下降 (均 $P < 0.01$) (图 3E-H)。

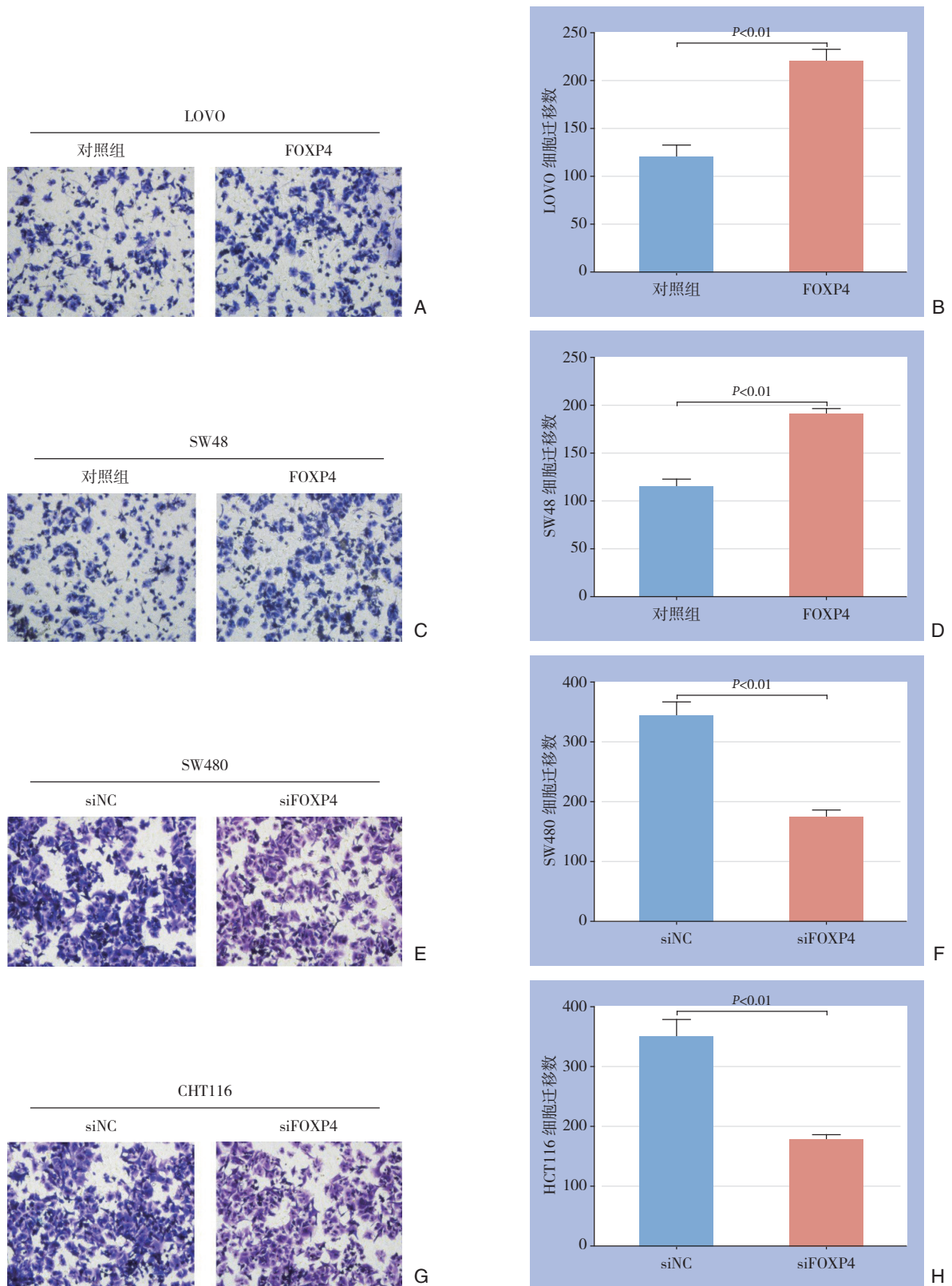


图3 FOXP4 表达量对结直肠癌细胞迁移能力的影响 A-B: Tranwell 检测过表达 FOXP4 后, LOVO 细胞的迁移能力; C-D: Tranwell 检测过表达 FOXP4 后, SW48 细胞的迁移能力; E-F: Tranwell 检测 FOXP4 敲减后, SW480 细胞的迁移能力; G-H: Tranwell 检测 FOXP4 敲减后, HCT116 细胞的迁移能力

Figure 3 The effect of FOXP4 expression level on the migration ability of colorectal cancer cells A-B: Tranwell assay for the migration ability of LOVO cells after FOXP4 overexpression; C-D: Tranwell assay for the migration ability of SW48 cells after FOXP4 overexpression; E-F: Tranwell assay for the migration ability of SW480 cells after FOXP4 knockdown; G-H: Tranwell assay for the migration ability of HCT116 cells after FOXP4 knockdown

2.4 FOXP4 对 β -catenin 转录水平的影响

上述实验初步证明了FOXP4可调节结直肠癌细胞的增殖、转移,接下来,进一步探究其涉及的分子机制。首先,采用AnimalTFDB 3.0数据库预测FOXP4的靶启动子(图4A),结果发现FOXP4有可能与 β -catenin启动子结合。进一步采用ChIP实验证明了FOXP4可识别 β -catenin启动

子区域(图4B)。此外,RT-PCR和Western blot分别从转录和翻译水平验证了FOXP4过表达可明显增加 β -catenin的表达(图4C-E)。最后,构建野生型和突变型的 β -catenin荧光素酶报告基因(图4D),结果显示,FOXP4只能识别野生型的 β -catenin的序列(图4G-H)。综合以上结果,提示FOXP4可识别调控 β -catenin的转录水平。

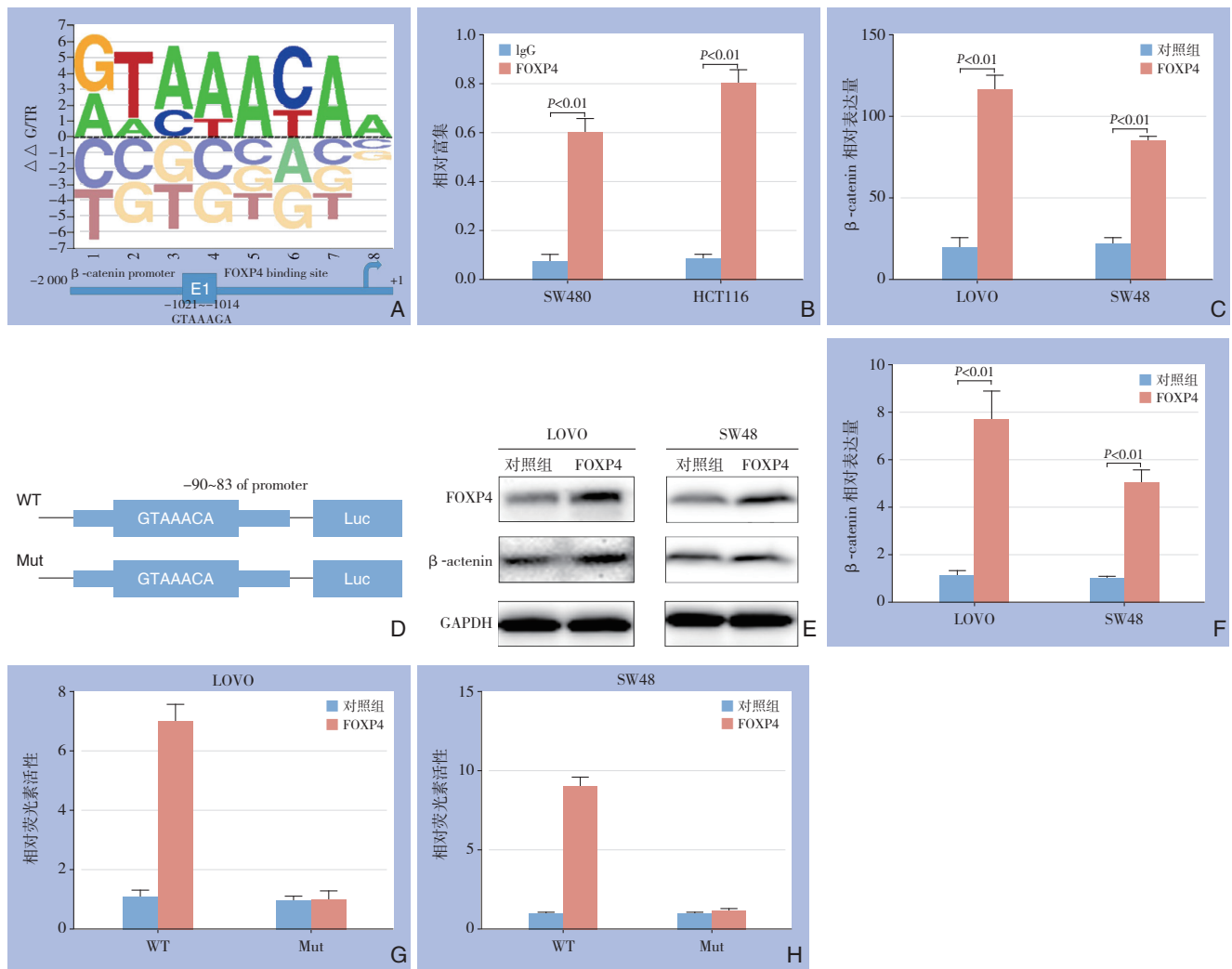


图 4 FOXP4 对 β -catenin 转录水平的影响 A: AnimalTFDB 3.0 预测 FOXP4 结合 β -catenin 启动子序列; B: ChIP 验证 FOXP4 与 β -catenin 的相互作用; C: RT-PCR 检测 FOXP4 过表达对 β -catenin 的 mRNA 水平的影响; D: 野生型以及突变型的 β -catenin 启动子荧光素酶报告质粒的构建; E-F: Western blot 检测 FOXP4 过表达对 β -catenin 的蛋白水平的影响; G-H: 荧光素酶报告实验检测 FOXP4 对野生型以及突变型的 β -catenin 转录活性的影响

Figure 4 Effect of FOXP4 on β -catenin transcription level A: AnimalTFDB3.0 predicting the FOXP4 binding to the promoter sequence of β -catenin; B: ChIP verification of the interaction between FOXP4 and β -catenin; C: RT-PCR detection of the effect of FOXP4 overexpression on the mRNA expression level of β -catenin; D: Construction of luciferase reporter plasmids of wild and mutant type of β -catenin promoter; E-F: Western blot analysis of the effect of FOXP4 overexpression on protein expression level of β -catenin; G-H: Luciferase report assay for influence of FOXP4 on transcriptional activities of the wild and mutant type of β -catenin

2.5 结直肠癌细胞中 β -catenin 与 FOXP4 的关系

为进一步确定 β -catenin 是否参与介导了 FOXP4 所引起的结直肠癌细胞增殖迁移能力的变化, 使用 β -catenin 抑制剂 XAV-939 处理过表达 FOXP4 的结直肠癌细胞, 结果显示, FOXP4 过

表达对结直肠癌细胞增殖与迁移能力的增强作用均被取消 (均 $P < 0.05$) (图5)。上述实验结果说明 β -catenin 介导了 FOXP4 对结直肠癌细胞的调控作用。

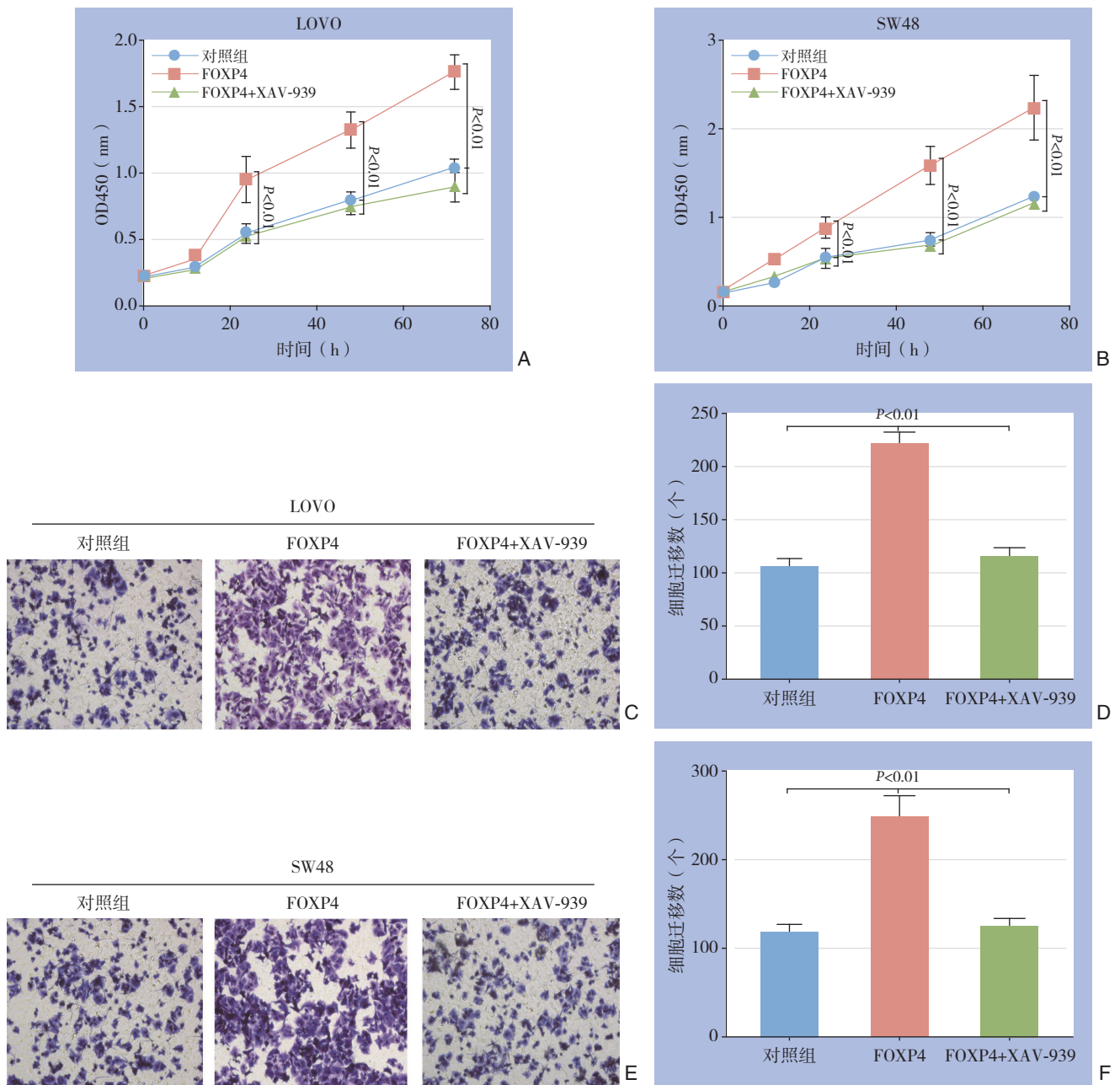


图5 结直肠癌细胞中 β -catenin 与 FOXP4 的关系 A: CCK8 检测 β -catenin 抑制剂对 SW48 细胞增殖能力的影响; B: CCK8 检测 β -catenin 抑制剂对 LOVO 细胞增殖能力的影响; C-D: Transwell 检测 β -catenin 抑制剂对 SW48 细胞迁移能力的影响; E-F: Transwell 检测 β -catenin 抑制剂对 LOVO 细胞迁移能力的影响

Figure 5 Relationship between β -catenin and FOXP4 in colorectal cancer cells A: CCK8 assay for the effect of β -catenin inhibitor on the proliferation of SW48 cells; B: CCK8 assay for the proliferation of LOVO cells; C-D: Transwell assay for the effect of β -catenin inhibitor on migration ability of SW48 cells; E-F: Transwell assay for the effect of β -catenin inhibitor on migration ability of LOVO cells

3 讨论

中晚期结直肠癌的恶性增殖以及远处转移是导致结直肠癌患者死亡的主要原因, 约有15%~25%的结直肠癌患者出现肝转移^[11-12]。目前肝转移灶的切除只可以提高部分患者(25%~40%)的5年生存率^[13-14], 所以目前急需探索可影响结直肠癌增殖、远处转移的因素。

FOXP转录因子家族可通过调节肿瘤细胞的上皮间充质转化影响肿瘤的细胞生物学表型。比如FOXP1可调控趋化因子CXCL的表达来控制乳腺癌细胞对淋巴结的浸润^[15-16]; 同样在三阴性乳腺癌中, FOXP2可通过靶向GRP78增加肿瘤细胞的增殖与迁移能力^[17]; FOXP3特异性表达于T调节细胞中, 参与调节肿瘤细胞的免疫耐受能力, 最近也有文章报道FOXP3可通过抑制COX2的转录抑制结直肠癌干细胞的自我更新^[18-21]; FOXP4可通过调节转录因子Snail的活性来增强上皮间质转化(EMT)相关分子的表达, 促进乳腺癌细胞的转移^[22], 而在肝细胞癌中的FOXP4可激活Slug的转录活性, 促进肿瘤细胞迁移能力^[23]。本研究发现, 与癌旁正常组织相比, FOXP4在结直肠癌组织中表达显著上调, FOXP4高表达与患者不同临床特征具有显著性差异, 同时高表达FOXP4的患者总体生存率可能降低。细胞层面发现FOXP4过表达可促进结直肠癌细胞的增殖和迁移, 而敲低FOXP4可抑制结直肠癌细胞的增殖及迁移, 这些实验结果表明FOXP4可能在结直肠肿瘤的进展中起关键作用。

在80%的结直肠癌患者中 β -catenin处于过度激活状态^[24-25], β -catenin是Wnt通路的靶向分子, 其激活被认为是肿瘤形成过程的核心。另外还发现 β -catenin/TCF信号在90%以上的结直肠癌中呈现高表达, 而这与结直肠癌的不良预后息息相关^[26-30]。然而目前关于转录因子FOXP4是如何影响结直肠癌进展的机制仍不清楚。本研究发现FOXP4可以识别 β -catenin启动子区域, 提示FOXP4可能通过调控 β -catenin发挥促结直肠癌增殖和迁移的作用。进一步验证试验发现, 过表达FOXP4可增加 β -catenin基因及蛋白的表达, 其仅可识别野生型 β -catenin的序列。使用 β -catenin抑制剂抑制其活性后发现, FOXP4过表达所促进的结直肠癌细胞增殖和迁移能力下降, 表明FOXP4可能通过调控 β -catenin活性促进结直肠癌

细胞增殖和迁移。

尽管本研究首次揭示FOXP4在结直肠癌中的可能作用, 但本实验结果仍需在动物层面进一步验证, 同时FOXP4是如何调控 β -catenin活性, 其具体调控机制尚不清晰, 这将是今后进一步研究的方向。

总之, 本文证明了FOXP4可促进结直肠癌细胞的增殖、转移, 在分子机制上, 明确了FOXP4可能通过促进 β -catenin的转录活性, 增加结直肠癌细胞的增殖与迁移能力, 这为未来结直肠癌患者的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, doi: 10.3322/caac.21601. [Epub ahead of print]
- [2] Riley JM, Cross AW, Paulos CM, et al. The clinical implications of immunogenomics in colorectal cancer: a path for precision medicine[J]. *Cancer*, 2018, 124(8):1650-1659. doi:10.1002/ncr.31214.
- [3] Van Blarigan EL, Meyerhardt JA. Role of physical activity and diet after colorectal cancer diagnosis[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16):1825-1834. doi: 10.1200/JCO.2014.59.7799.
- [4] Fakhri MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16):1809-1824. doi: 10.1200/JCO.2014.59.7633.
- [5] Ciombor KK, Wu C, Goldberg RM. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer[J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66:83-95. doi: 10.1146/annurev-med-051513-102539.
- [6] Bardou M, Barkun A, Martel M. Effect of statin therapy on colorectal cancer[J]. *Gut*, 2010, 59(11):1572-1585. doi:10.1136/gut.2009.190900.
- [7] Myatt SS, Lam WF. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11):847-859. doi:10.1038/nrc2223.
- [8] Nilsson J, Helou K, Kovács A, et al. Nuclear Janus-activated kinase 2/nuclear factor 1-C2 suppresses tumorigenesis and epithelial-to-mesenchymal transition by repressing Forkhead box F1[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(5):2020-2029. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1677.
- [9] Wei HJ, Nickoloff JA, Chen WH, et al. FOXF1 mediates mesenchymal stem cell fusion-induced reprogramming of lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19):9514-9529. doi:10.18632/oncotarget.2413.

- [10] De Smedt L, Palmans S, Govaere O, et al. Expression of FOXP1 and Colorectal Cancer Prognosis[J]. *Lab Med*, 2015, 46(4):299–311. doi:10.1309/LM7IHV2NJI1PHMXC.
- [11] Carpizo DR, D'Angelica M. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the presence of extrahepatic disease[J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(9):2411–2421. doi: 10.1245/s10434-009-0493-6.
- [12] Rex DK, Kahi CJ, Levin B, et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after cancer resection: a consensus update by the American Cancer Society and the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(6):1865–1871. doi:10.1053/j.gastro.2006.03.013.
- [13] Fong Y. Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis[J]. *CA Cancer J Clin*, 1999, 49(4):231–255. doi: 10.3322/canjclin.49.4.231.
- [14] Bentrem DJ, Dematteo RP, Blumgart LH. Surgical therapy for metastatic disease to the liver[J]. *Annu Rev Med*, 2005, 56:139–156. doi: 10.1146/annurev.med.56.082103.104630.
- [15] Yu BH, Li BZ, Zhou XY, et al. Cytoplasmic FOXP1 expression is correlated with ER and calpain II expression and predicts a poor outcome in breast cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13(1):36. doi: 10.1186/s13000-018-0715-y.
- [16] De Silva P, Garaud S, Solinas C, et al. FOXP1 negatively regulates tumor infiltrating lymphocyte migration in human breast cancer[J]. *EBioMedicine*, 2019, 39:226–238. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.11.066.
- [17] Wu J, Liu P, Tang H, et al. FOXP2 Promotes Tumor Proliferation and Metastasis by Targeting GRP78 in Triple-negative Breast Cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2018, 18(4):382–389. doi: 10.2174/1568009618666180131115356.
- [18] Masiuk KE, Laborada J, Roncarolo MG, et al. Lentiviral Gene Therapy in HSCs Restores Lineage-Specific Foxp3 Expression and Suppresses Autoimmunity in a Mouse Model of IPEX Syndrome[J]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(2):309–317. doi:10.1016/j.stem.2018.12.003.
- [19] Stathopoulou C, Gangaplara A, Mallett G, et al. PD-1 Inhibitory Receptor Downregulates Asparaginyl Endopeptidase and Maintains Foxp3 Transcription Factor Stability in Induced Regulatory T Cells[J]. *Immunity*, 2018, 49(2):247–263. doi:10.1016/j.immuni.2018.05.006.
- [20] Van Gool F, Nguyen MLT, Mumbach MR, et al. A Mutation in the Transcription Factor Foxp3 Drives T Helper 2 Effector Function in Regulatory T Cells[J]. *Immunity*, 2019, 50(2):362–377. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.016.
- [21] Liu S, Zhang C, Zhang K, et al. FOXP3 inhibits cancer stem cell self-renewal via transcriptional repression of COX2 in colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27):44694–44704. doi:10.18632/oncotarget.17974.
- [22] Ma T, Zhang J. Upregulation of FOXP4 in breast cancer promotes migration and invasion through facilitating EMT[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:2783–2793. doi: 10.2147/CMAR.S191641.
- [23] Zhang G, Zhang G. Upregulation of FoxP4 in HCC promotes migration and invasion through regulation of EMT[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(4):3944–3951. doi:10.3892/ol.2019.10049.
- [24] White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(2):219–232. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.001.
- [25] Walther A, Johnstone E, Swanton C, et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7):489–499. doi: 10.1038/nrc2645.
- [26] Peters U, Jiao S, Schumacher FR, et al. Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(4):799–807. doi:10.1053/j.gastro.2012.12.020.
- [27] Moon RT, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin[J]. *Science*, 2002, 296(5573):1644–1646. doi:10.1126/science.1071549.
- [28] Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors[J]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 62:50–60. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.002.
- [29] Yu W, Ma Y, Shankar S, et al. SATB2/ β -catenin/TCF-LEF pathway induces cellular transformation by generating cancer stem cells in colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10939. doi: 10.1038/s41598-017-05458-y.
- [30] Wang Z, Zhou L, Xiong Y, et al. Salinomycin exerts anti-colorectal cancer activity by targeting the β -catenin/T-cell factor complex[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(17):3390–3406. doi: 10.1111/bph.14770.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 张淑莲, 马军, 齐宝华, 等. FOXP4的表达及其对 β -catenin转录的调控在结直肠癌中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(4):429–439. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.006
Cite this article as: Zhang SL, Ma J, Qi BH, et al. Effects of FOXP4 expression and its regulation on β -catenin transcription in colorectal cancer[J]. *Chin J Gen Surg*, 2020, 29(4):429–439. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2020.04.006