

· 论 著 ·

叉头框蛋白 M1、环氧合酶 2 在结肠癌组织中的表达及相关性分析

冒晓蓓, 刘小北, 褚晓源, 郁红菊

[摘要] 目的 探讨叉头框蛋白 M1(fork head box M1, FoxM1)和环氧合酶 2(cyclooxygenase2, COX-2)在结肠癌(colorectal carcinoma, CRC)中的表达及两者的相关性。方法 采用免疫组织化学法检测 FoxM1 和 COX-2 在 95 例 CRC 组织和 40 例正常结肠组织中的表达,分析 FoxM1 和 COX-2 与结肠癌临床病理参数间的关系及两者表达的相关性。结果 FoxM1 和 COX-2 在 CRC 组织中表达阳性率分别为 85.3% (81/95)和 87.4% (83/95),显著高于正常结肠组织的 7.5% (3/40)和 12.5% (5/40) ($P < 0.05$)。FoxM1 和 COX-2 的高表达与较多的淋巴结转移及较晚的临床分期密切相关 ($P < 0.05$),且两者在 CRC 中的表达强度呈正相关($r = 0.638, P < 0.05$)。结论 FoxM1 和 COX-2 的表达与 CRC 临床分期和淋巴结转移密切相关,提示其可能与 CRC 患者较差的预后相关。

[关键词] 结肠癌;叉头框蛋白 M1;环氧合酶 2;免疫组织化学

[中图分类号] R735.35 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.03.001

Expression and correlation of FoxM1 and COX-2 in colorectal cancer

MAO Xiao-bei, LIU Xiao-bei, CHU Xiao-yuan, YU Hong-ju. Department of Internal Medicine-Oncology, Nanjing Clinical Medical College of Second Military Medical University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of fork head box M1(FoxM1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in colorectal cancer (CRC) and analyze the correlation between them. **Methods** Expressions of FoxM1 and COX-2 were examined in 95 CRC tissues and 40 normal colon tissues by immunohistochemistry. Then the relationships among expression of FoxM1 and COX-2 and clinicopathological parameters of CRC analyzed. **Results** Both the positivity rates of FoxM1 and COX-2 in CRC tissues were significantly higher than in normal colon tissues [FoxM1: 85.3% (81/95) vs 7.5% (3/40); COX-2: 87.4% (83/95) vs 12.5% (5/40); $P < 0.05$]. Enhanced expressions of FoxM1 and COX-2 were still significantly correlated with the lymph node metastasis and advanced clinical stages in CRC ($P < 0.05$). Meanwhile, a positive correlation was observed between FoxM1 and COX-2 expressions ($r = 0.638, P < 0.05$). **Conclusion** Over-expressions of FoxM1 and COX-2 are significantly correlated with the lymph node metastasis and advanced clinical stage of CRC in the development and advancement of CRC.

[Key words] colorectal cancer; FoxM1; COX-2; immunohistochemistry

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是全世界范围内危害人类健康的重大疾病之一。在欧美, CRC 的发病及死亡率居所有恶性肿瘤的第三位,且呈逐年上升趋势^[1]。我国 1990 - 2009 年间的数据显示,确诊为 CRC 的患者男女比例为 6:4,发病高峰年龄为 50 ~ 74 岁,发病率亦呈上升趋势^[2]。CRC 的侵袭和转移往往是导致患者治疗失败和死亡的主要原因,探索其分子机制成为目前研究的热点。

叉头框蛋白 M1(fork head box M1, FoxM1)属于叉头框(fork head box, Fox)转录因子家族,在肿瘤的发生、进展及转移等相关事件中发挥重要作用。

FoxM1 主要对细胞的增殖和凋亡进程进行调控^[3]。环氧酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素合成初始步骤中的关键性限速酶,有 COX-1 和 COX-2 两种同工酶,其中 COX-2 与多种肿瘤形成相关^[4]。已发现 FoxM1 及 COX-2 在结肠癌中均高表达^[5-6],但两者的相关性以及两者之间是否存在共同作用通路尚未见报道。本研究通过分析 FoxM1 和 COX-2 在 CRC 中的表达情况及相关性,初步探讨两者与 CRC 侵袭、转移的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床标本 收集我院 2007 年 1 月 - 2010 年 12 月手术治疗的 CRC 患者术后病理标本 95 例,均经病理检查证实,所有患者术前均未接受放化疗。其中男 53 例,女 42 例,年龄 41 ~ 70 岁,中位年龄

基金项目:国家自然科学基金(81272394)

作者单位:210002 江苏南京,第二军医大学南京临床医学院(南京军区南京总医院)肿瘤内科

通讯作者:陈龙邦, E-mail: dr.chenlb@163.com

52 岁。肿瘤临床分期按 2009 年美国癌症联合委员会 (American Joint Committee on Cancer, AJCC) TNM 分期标准。肿瘤浸润深度 T1 18 例, T2 25 例, T3 31 例, T4 21 例。有淋巴结转移者 54 例, 无淋巴结转移者 41 例。I 期 12 例, II 期 28 例, III 期 41 例, IV 期 14 例。组织学分级按 1997 年 WHO 标准, 高分化 29 例, 中分化 45 例, 低或未分化 21 例。同时取 40 例正常结肠活检组织作为对照。

1.2 试剂 兔抗人 FoxM1 多克隆抗体、COX-2 多克隆抗体均为 SANTA CRUZ Biotechnology Inc 产品, 购自南京优宁维公司。EnVision 免疫组化检测试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。

1.3 方法 所有标本均经 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4~6 μm 连续切片。切片常规脱蜡至水, 高温高压组织抗原修复, FoxM1 抗体稀释度为 1:50, COX-2 多克隆抗体稀释度为 1:100, 操作步骤按试剂盒说明进行, 最后经二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色, 常规复染封片。用已知的阳性切片作为阳性对照, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判定 仅细胞核着蓝色者为阴性, 凡细胞质内或核膜上呈棕黄色者为阳性。每张切片 400 倍视野下至少计数 10 个区域, 每个区域计数 100 个细胞, 计算阳性细胞百分率, <5% 为 (-), 5%~10% 为 (+), 11%~50% 为 (++) , >50% 为 (+++)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件包进行统计学分析。率比较用卡方检验, 等级资料比较采用 Kruskal-Wallis 检验, FoxM1 和 COX-2 两者之间的相

关性分析采用 Spearman 相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FoxM1 和 COX-2 在结肠癌组织中的表达 FoxM1 和 COX-2 蛋白阳性染色表现为细胞质出现棕黄色颗粒, 主要定位于细胞质, 少量定位于细胞核。结肠癌组织中 FoxM1 阳性率为 85.3% (81/95) (图 1a), 正常结肠组织中只有极少阳性表达 (图 1b), 阳性率仅为 7.5% (3/40)。COX-2 在结肠癌组织中表达阳性率为 87.4% (83/95) (图 1c), 而在正常结肠组织阳性表达率较低, 为 12.5% (5/40) (图 1d)。FoxM1 和 COX-2 在结肠癌组织中表达均明显高于正常结肠组织 (P < 0.05, 表 1)。

2.2 FoxM1 和 COX-2 表达与结肠癌临床病理参数的关系 FoxM1 和 COX-2 蛋白的表达强度与患者的性别、年龄、病理分型、肿瘤浸润深度及有无远处转移无相关性, 但与淋巴结转移和临床分期密切相关。在有淋巴结转移及临床分期较晚的组织标本中两者的阳性表达率明显上升, 多为强阳性表达。结果见表 2。

2.3 结肠癌组织中 FoxM1 和 COX-2 蛋白表达之间的关系 在结肠癌组织中, FoxM1 和 COX-2 均为阴性表达者 8 例 (8.4%), 表达强度均为 + 者 13 例 (13.7%), 表达强度均为 ++ 的有 18 例 (18.9%), 表达强度均为 +++ 者 17 例 (17.9%)。Spearman 相关分析显示, FoxM1 和 COX-2 表达强度呈正相关性 (r = 0.638, P < 0.05)。结果见表 3。

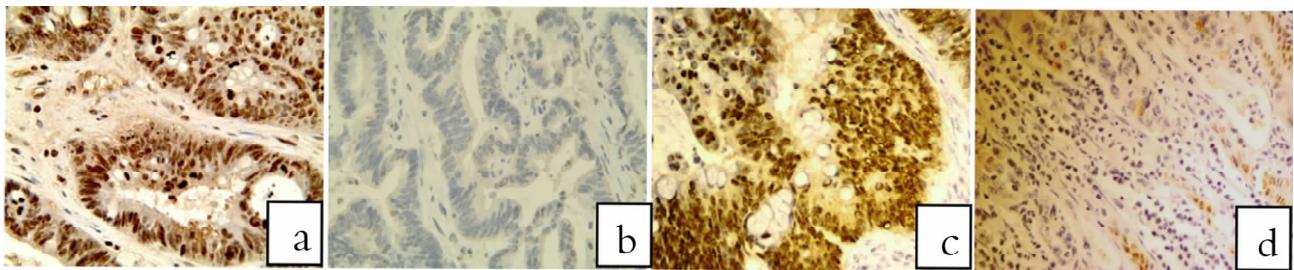


图 1 免疫组化法检测 FoxM1 和 COX-2 在结肠癌组织及结肠正常组织中的表达

a: FoxM1 在 CRC 组织中的表达; b: FoxM1 在正常结肠组织中的表达; c: COX-2 在 CRC 组织中的表达; d: COX-2 在正常结肠组织中的表达 (DAB ×400)

表 1 FoxM1 和 COX-2 在结肠癌及结肠正常组织中的表达 (例)

组别	n	FoxM1 表达评分				P 值	COX-2 表达评分				P 值
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
结肠癌	95	14	22	32	27	<0.05	12	21	33	29	<0.05
正常组织	40	37	3	0	0		35	2	3	0	

表 2 FoxM1 和 COX-2 与结肠癌临床病理参数之间的关系(例)

临床参数	n	FoxM1 表达评分					COX-2 表达评分				
		-	+	++	+++	P 值	-	+	++	+++	P 值
性别											
男	53	8	10	18	17	>0.05	6	10	19	18	>0.05
女	42	6	12	14	10		6	11	14	11	
年龄											
<60 岁	50	7	11	18	14	>0.05	7	12	18	13	>0.05
≥60 岁	45	7	11	14	13		5	9	15	16	
分化程度											
低	29	6	6	8	9	>0.05	5	6	11	7	>0.05
中	45	7	10	15	13		7	10	13	15	
高	21	3	8	5	5		2	5	7	7	
T 分期											
T1	18	3	5	6	4	>0.05	3	6	6	3	>0.05
T2	25	5	5	8	7		4	4	7	10	
T3	31	6	8	9	8		5	9	8	9	
T4	21	2	5	6	8		3	5	8	5	
N 分期											
N ₀	41	12	15	10	4	<0.05	10	17	9	4	<0.05
N ₁₋₃	54	2	7	22	23		2	4	23	25	
M 分期											
M ₀	83	13	20	28	22	>0.05	11	18	30	24	>0.05
M ₁	12	2	2	3	5		1	3	3	5	
临床分期											
I + II	40	11	17	6	6	<0.05	9	15	9	7	<0.05
III + IV	55	3	5	26	21		3	6	24	22	

表 3 FoxM1 和 COX-2 在结肠癌组织中表达强度之间的关系(例)

FoxM1 表达评分	COX-2 表达评分				r	P 值
	-	+	++	+++		
-	8	2	3	1	0.638	<0.05
+	3	13	4	2		
++	1	4	18	9		
+++	0	2	8	17		

3 讨论

FoxM1 是增殖特异性转录因子,在增殖期细胞内高表达。在所有胚胎组织中,尤其是上皮或间质来源的增殖细胞中均有不同程度表达。成年人仅在胸腺及睾丸组织高表达,肺及肠道组织中度表达^[7]。

FoxM1 作为细胞周期的关键因子在细胞周期的 G1 到 S 期以及细胞有丝分裂期均高表达,其表达缺失导致细胞停滞于有丝分裂期,同时可引起染色体有丝分裂异常,甚至细胞凋亡^[3]。FoxM1 转录活性与细胞周期密切相关,在 G1 期达到最高,主要与其 C 末端区的磷酸化程度有关。FoxM1 可调控多种影响 G1-S 和 G2-M 进程的细胞周期相关基因,包括细

胞分裂周期蛋白 25A (cell division cycle 25 A, cdc25A)、细胞分裂周期蛋白 25B(cell division cycle 25 B,cdc25B)、细胞周期蛋白 B(cyclin B)、细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、p21 cip1、p27kip1、Polo 样激酶(Polo-like kinase, PIK1) 等^[8]。

FoxM1 已被证实多种恶性肿瘤组织中异常高表达^[9-10],其在肿瘤的发生、侵袭和转移过程中与多条相关的信号通路之间有交互作用,从而可能对肿瘤的转归有重要意义。有报道表明,FoxM1 在结肠癌中高表达,并与肿瘤的临床分期、淋巴结转移以及患者的 5 年生存率密切相关,抑制结肠癌细胞株中 FoxM1 表达可降低细胞侵袭和转移能力^[5]。本研究结果显示,FoxM1 在结肠癌中的表达显著高于正常

结肠组织,其表达强度与患者的临床分期、是否有淋巴结转移等因素呈正相关,提示 FoxM1 与结肠癌的侵袭、转移密切相关。

COX-2 主要作用为抑制细胞凋亡、促进肿瘤新生血管形成以及增加肿瘤的侵袭能力和促进癌变,从而参与肿瘤的形成、浸润和转移^[11]。近年来发现,COX-2 抑制剂和非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)能够降低部分人群罹患肿瘤(结肠癌和肺癌)的风险^[12],提示 COX-2 有可能作为恶性肿瘤的治疗性分子靶标之一。应用免疫组化及 Western blot 分析 49 例结肠癌患者的组织标本发现,COX-2 高表达与患者的预后密切相关^[13]。本研究结果提示,COX-2 在结肠癌中明显高表达,在有淋巴结转移及分期晚的患者中表达强度显著增高,与文献报道基本一致。

FoxM1 对 COX-2 的表达有直接或间接的调节作用。Balli 等^[14]发现,在 FoxM1 基因敲除小鼠中,COX-2 表达显著下降,这与肺部炎症反应及肿瘤发生密切相关。Wang 等^[15]在肺腺癌细胞株 A549 中应用 siRNA 干扰 FoxM1 的表达后,可观察到 COX-2 表达受抑制。当应用 FoxM1 抑制剂时,同样观察到 COX-2 表达下调。在 FoxM1 表达阳性的肺组织中,可检测到 COX-2 的高表达,而在 FoxM1 阴性肺组织中,COX-2 的表达亦明显下降。FoxM1 可结合于 COX-2 的启动子,从而在转录水平对 COX-2 正调控。Xu 等^[16]发现,在 EGF 刺激下,FoxM1 的表达明显上调,但未监测到 COX-2 表达的不同步上调,认为 FoxM1 可能作用于 COX-2 启动子 Sp1 结合位点,从而调节 EGFR 信号通路对 COX-2 表达的调控作用。

本研究结果显示,FoxM1 和 COX-2 在结肠癌组织中表达明显高于正常结肠组织,并与结肠癌的 TNM 分期、淋巴转移、远处转移均相关,提示 FoxM1 及 COX-2 均参与肿瘤的形成、发展,并在肿瘤的浸润、转移过程中起至关重要的作用。两者在结肠癌组织中的表达呈正相关,提示 FoxM1 可能通过调控 COX-2 表达从而参与结肠癌的发生、发展及转移,但具体分子机制有待进一步研究。

【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] Chen HM, Weng YR, Jiang B, et al. Epidemiological study of colorectal adenoma and cancer in symptomatic patients in China between 1990 and 2009 [J]. J Diges Dis, 2011, 12 (5) : 371-378.
- [3] Wonsey DR, Follettie MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe [J]. Cancer Res, 2005, 65 (12) : 5181-5189.
- [4] Khan Z, Khan N, Tiwari RP, et al. Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics [J]. Curr Drug Targets, 2011, 12 (7) : 1082-1093.
- [5] Chu XY, Zhu ZM, Chen LB, et al. FOXM1 expression correlates with tumor invasion and a poor prognosis of colorectal cancer [J]. Acta Histochem, 2012, 114 (8) : 755-762.
- [6] Pirkebner D, Fuetsch M, Wittmann W, et al. Reduction of intracellular pH inhibits constitutive expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells [J]. J Cell Physiol, 2004, 198 (2) : 295-301.
- [7] Laoukili J, Kooistra MR, Bras A, et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability [J]. Nat Cell Biol, 2005, 7 (2) : 126-36.
- [8] Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1775 (1) : 92 - 102.
- [9] Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: from cancer initiation to progression and treatment [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819 (1) : 28-37.
- [10] Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, et al. Overexpression of FoxM1 offers a promising therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma [J]. Haematologica, 2012, 97 (7) : 1092-1100.
- [11] Cao YI, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer [J]. J Cell Physiol, 2002, 190 (3) : 279-286.
- [12] Khan Z, Khan N, Tiwari RP, et al. Biology of Cox-2: an application in cancer therapeutics [J]. Curr Drug Targets, 2011, 12 (7) : 1082-1093.
- [13] Lin PC, Lin YJ, Lee CT, et al. Cyclooxygenase-2 expression in the tumor environment is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients [J]. Oncol Lett, 2013, 6 (3) : 733-739.
- [14] Balli D, Ren X, Chou FS, et al. Foxm1 transcription factor is required for macrophage migration during lung inflammation and tumor formation [J]. Oncogene, 2012, 31 (34) : 3875-3888.
- [15] Wang IC, Meliton L, Tretiakova M, et al. Transgenic expression of the forkhead box M1 transcription factor induces formation of lung tumors [J]. Oncogene, 2008, 27 (30) : 4137-4149.
- [16] Xu K, Shu HK. Transcription factor interactions mediate EGF-dependent COX-2 expression [J]. Mol Cancer Res, 2013, 11 (8) : 875-886.

(收稿日期:2014-02-26;修回日期:2014-03-24)

(本文编辑:齐名;英文编辑:王建东)