

# FOXC1 在胰腺癌中的表达及与预后的关系

罗倩<sup>1</sup>, 郭绍文<sup>2</sup>, 张珏<sup>1</sup>

1. 上海中医药大学附属曙光医院检验科, 上海 201203

2. 上海中医药大学附属曙光医院病理科, 上海 201203

**【摘要】** 目的 分析转录因子叉头框(fork head box C1, FOXC1)表达与患者临床资料及预后的关系。方法 选取上海中医药大学附属曙光医院进行胰腺根治性切除术的标本 56 例及配对正常癌旁胰腺组织 56 例, 采用定量反转录聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 和免疫组化分别检测胰腺癌组织和癌旁正常组织的 FOXC1 mRNA 和蛋白的表达水平, 分析 FOXC1 表达与患者临床资料及预后的关系。结果 在胰腺癌组织中 FOXC1 mRNA 相对表达量高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。胰腺癌组织 FOXC1 免疫组化阳性率 71.4% 高于对照组 26.8%, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。FOXC1 高表达与淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤直径存在关联( $P < 0.01$ ), 未发现 FOXC1 高表达与年龄、性别、癌症部位、分化程度存在统计学关联( $P > 0.05$ )。生存分析发现胰腺癌组中 FOXC1 高表达的生存时间(中位无病生存期: 7 个月, 中位总生存期: 15 个月)较低表达组生存时间(中位无病生存期: 18 个月, 中位总生存期: 29 个月)明显缩短, 差异有意义( $P < 0.01$ ), Cox 多因素分析表明 FOXC1 表达与胰腺癌的预后相关。结论 FOXC1 的表达与胰腺癌的转移、TNM 分型密切相关, 且是胰腺癌预后的独立因素。

**【关键词】** 胰腺癌; 转录因子叉头框; 生存分析

## Expression of FOXC1 in pancreatic cancer and its relationship with prognosis

Luo Qian<sup>1</sup>, Guo Shaowen<sup>2</sup>, Zhang Ye<sup>1</sup>

1. Department of Laboratory Medicine, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Department of Pathology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**【Abstract】** **Objective** To analyze the relationship between FOXC1 expression and clinical data and prognosis. **Methods** 56 cases of pancreatic radical resection and 56 cases of normal paracancerous pancreas were selected. The expressions of FOXC1 mRNA and protein in pancreatic cancer tissues and adjacent normal tissues were detected by qRT-PCR and Western blot. The relationship between FOXC1 expression and clinical data and prognosis was analyzed. **Result** The relative expression of FOXC1 mRNA and protein in pancreatic cancer tissues was higher than that in adjacent normal tissues ( $P < 0.01$ ). The positive rate of FOXC1 immunohistochemistry in pancreatic cancer tissues was 71.4% higher than that in the control group (26.8%), and the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The high expression of FOXC1 was associated with lymph node metastasis, TNM stage, and tumor diameter ( $P < 0.01$ ). There was no statistically significant correlation between age, gender, cancer location and degree of differentiation ( $P > 0.05$ ). Survival analysis found that DFS (7) and OS (15) with high expression of FOXC1 in pancreatic cancer group were lower than DFS (18) and OS (29) in low expression group, respectively, and the difference was significant ( $P < 0.01$ ). COX-Analysis showed that FOXC1 expression is associated with prognosis of pancreatic cancer. **Conclusion** The expression of FOXC1 is closely related to pancreatic cancer metastasis and TNM analysis, and is an independent factor in the prognosis of pancreatic cancer.

**【Key words】** Pancreatic cancer; Fork head box C1; Survival analysis

胰腺癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,因起病隐匿,易转移,病情迅速,5年生存率低于10%<sup>[1,2]</sup>。尽管近年来,在外科技术和药物治疗方面取得了进展,但胰腺癌的治疗效果并未显著改善,且80%的患者在治疗后复发<sup>[3]</sup>,严重威胁患者的生命健康。而肿瘤的靶向治疗在治疗肿瘤方面有良好的前景,因此,寻找胰腺癌发生发展中的关键基因对胰腺癌靶向治疗具有重要意义。

转录因子叉头框(fork head box C1, FOXC1)也称为 Mf1、Fkh-1 或 FREAC3,属于 FOXC 亚组,位于 6p25 的单个外显子基因,其编码的蛋白位于细胞核由 533 个氨基酸组成<sup>[4]</sup>。有研究表明,FOXC1 能与 DNA 结合并调节基因表达,参与多种肿瘤的发生发展<sup>[5]</sup>。但 FOXC1 与胰腺癌的研究甚少,本研究通过分析免疫组化、定量反转录聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)、免疫印迹法(Western-blot)检测 FOXC1 的表达,分析 FOXC1 表达与患者临床资料及预后的关系,为胰腺癌的靶向治疗提供理论依据。

## 1 材料与方 法

1.1 病例资料 选取于 2013 年 5 月至 2016 年 7 月在上海中医药大学曙光医院进行胰腺根治性切除术的标本 56 例及配对正常癌旁胰腺组织 56 例,患者均对本试验知情并签署知情同意书。患者在术前未接受放化疗,且临床资料完整,其中男 32 例,女 24 例;年龄在 42~78(63.75±8.53)岁;肿瘤高分化患者 44 例,肿瘤中低分化患者 12 例;淋巴转移患者 37 例,未淋巴转移患者 19 例;恶性肿瘤 I~II 期患者 25 例,恶性肿瘤 III~IV 期患者 31 例;胰头癌患者 35 例,胰体尾癌 21 例;直径<20 mm 的患者 21 例,直径≥20 mm 的患者 35 例。

1.2 主要试剂 FOXC1 抗体、免疫组化试剂盒均来自北京中杉金桥生物有限公司,反转录试剂盒来自美国 Thermo 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR 按照试剂盒上说明书对 RNA 进行提取、扩增。FOXC1 引物序列:正向序列,5'-AAAAAATTGGAGGCTGCTT-3' 反向序列,5'-CCAAAGAAAAATCCCACA-3',并以 GAPDH 为对照。

1.3.2 免疫组化染色 4 μm 连续切片用石蜡固定的样本,采用二甲苯脱蜡,磷酸盐缓冲盐水重洗,放入高温高压 pH 为 6.0 的柠檬酸钠缓冲液中

修复。按照顺序加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,一抗,低温过夜。待室温后加入二抗,显色脱水封片。观察切片染色强度和染色细胞百分比进行估评。染色强度评分为:无着色 0 分,淡黄色 1 分,黄色 2 分,棕黄色 3 分;染色细胞百分比的评分为:0~5%的细胞染色 0 分,6%~25%的细胞染色 1 分,25%~50%的细胞染色为 2 分,51%~75%的细胞染色为 3 分,76%~100%的细胞染色为 4 分。两项得分相乘计算出最终得分,0 分为阴性,1~12 分为阳性;3 分以上为高表达,3 分及以下为低表达。

1.4 统计学方法 本研究数据整理和分析运用 SPSS 17.0 软件,计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,*t* 检验用于比较两组计量资料间差异。计数资料采用构成比(%)表示,卡方分析用于比较两组计数资料间差异。非参数资料采用秩和检验,采用 Kaplan-Meier 检验用于绘制生存曲线,Cox 回归用于分析胰腺癌的预后影响因素。检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 FOXC1 在胰腺癌组织中的表达 qRT-PCR 检测结果显示胰腺癌组织 FOXC1 mRNA 的相对表达量显著高于癌旁正常组织差异有统计学意义( $P<0.01$ )。见图 1。免疫组化提示胰腺癌组织的阳性表达率 71.4%(40/56)高于癌旁组织 26.8%(15/45),差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见图 2,图 3。

2.2 FOXC1 的表达与临床资料的比较 FOXC1 高表达组患者与淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤直径存在关联( $P<0.01$ ),FOXC1 高表达未发现与年龄、性别、癌症部位、分化程度存在统计学关联( $P>0.05$ )。见表 1。

2.3 生存分析 相关因素的总生存期和无疾病生存期单因素分析显示胰腺癌患者中 FOXC1 高表达组的总生存期(overall survival, OS)和无疾病生存期(disease free survival, DFS)显著低于低表达组。FOXC1 高表达组的中位 DFS 和 OS 分别为 7 和 15 个月,而低表达组中位 DFS 和 OS 分别为 18 和 29 个月,见图 4,图 5。

2.4 OS 和 DFS 单因素和多因素分析 表 2 提示了多因素 Cox 分析结果,提示 FOXC1 表达是胰腺癌预后的独立相关因素,见表 2。

## 3 讨论

FOXC1 参与多种生物过程,包括细胞增殖、分

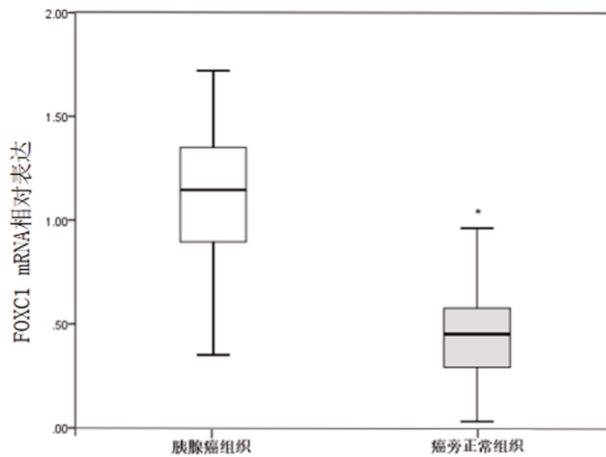


图1 FOXC1 mRNA在胰腺癌和癌旁组织中的表达

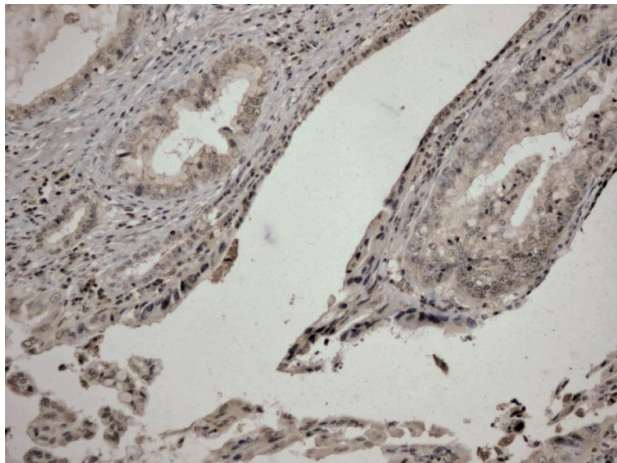


图2 FOXC1在胰腺癌组织的表达 SP×400

化、存活和死亡<sup>[6,7]</sup>,最近的研究表明 FOXC1 在乳腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌和前列腺癌异常表达<sup>[8,9]</sup>。但 FOXC1 与胰腺癌的关系报道较少,本研究旨在分析 FOXC1 的表达与胰腺癌患者临床资料及预后的关系。

PI3K/AKT 和 ERK 信号通路除传递细胞增殖信号外,还参与细胞的生长和转移的信号传导<sup>[10]</sup>。Huang 等<sup>[11]</sup>的研究表明在宫颈癌中 FOXC1 通过 PI3K / AKT 信号通路影响细胞增殖,迁移和侵袭。Wang 等<sup>[12]</sup>在黑色素瘤的研究中也有相似的发现。而 Subramani 等<sup>[13]</sup>在 FOXC1 沉默和过表达研究中发现,FOXC1 的过表达通过上调 PI3K/AKT 和 ERK 信号传导,从而影响胰腺癌细胞的生长和增殖。亦有研究发现基底样乳腺癌细胞 FOXC1 通过控制其下游基质金属蛋白酶 7 表达从而影响乳腺癌细胞的侵袭性<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,FOXC1 在胰腺癌中的表达高于癌旁正常组织,此结果与 FOXC1 在多种肿瘤组织如肝癌组织、非小细胞肺

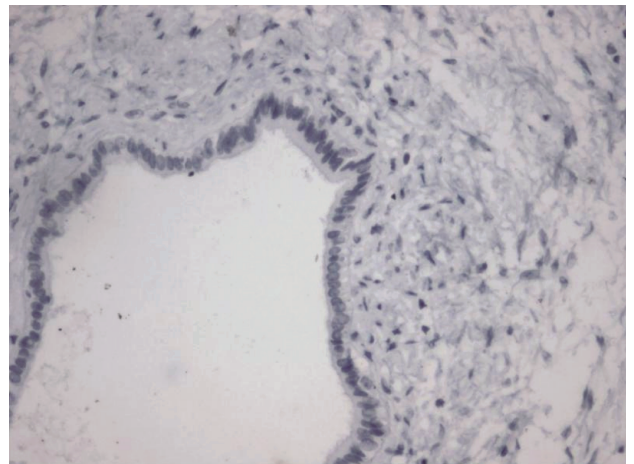


图3 FOXC1在癌旁正常组织的表达 SP×400

表1 FOXC1表达与胰腺癌临床资料的分析

变量	例数	FOXC1		$\chi^2$	P
		阴性	阳性		
TNM 分期				19.950	<0.001
I ~ II	23	14	9		
III ~ IV	33	2	31		
淋巴结转移				22.376	<0.001
阴性	19	13	6		
阳性	37	3	34		
年龄				1.900	0.206
<60 岁	17	7	10		
≥60 岁	39	9	30		
分化程度				1.283	0.293
中低	12	5	7		
高	44	11	33		
肿瘤直径(mm)				5.973	0.030
<20	21	10	11		
≥20	35	6	29		
肿瘤部位				0.373	0.557
体尾部	21	7	14		
头部	35	9	26		
性别				2.917	0.135
女	24	4	20		
男	32	12	20		

癌组织中的高表达相似。提示 FOXC1 的高表达可能与胰腺癌相关。

过往的研究发现 FOXC1 表达升高与肝细胞癌、胰腺导管腺癌和胃癌不良预后有关<sup>[14-16]</sup>。乔丽<sup>[17]</sup>等的研究提示在非小细胞肺癌中 FOXC1 的高表达与淋巴转移、分化程度有关。聂丽敏等<sup>[18]</sup>亦有相似的研究结果。Cheang 等<sup>[19]</sup>的研究发现神经钙黏素的表达与癌症如鼻咽癌的不良预后有关, VEGFR2 则参与血管生成<sup>[20]</sup>。有研究发现 FOXC1

表2 胰腺癌患者 OS 和 DFS 的 Cox 多因素分析

变量	OS			DFS		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
肿瘤部位(头/体尾)	1.111	0.239~5.170	0.893	1.166	0.269~5.054	0.837
性别(女/男)	0.755	0.354~1.612	0.467	0.757	0.377~1.519	0.433
肿瘤直径(<20 mm/≥20 mm)	1.415	0.667~3.003	0.365	1.100	0.525~2.308	0.800
分化程度(中低/高)	0.893	0.344~2.320	0.817	1.300	0.506~3.336	0.586
年龄(<60岁/≥60岁)	1.261	0.520~3.054	0.608	1.037	0.429~2.506	0.935
肿瘤淋巴结(阴性/阳性)	4.992	0.984~25.326	0.052	5.111	1.142~22.878	0.033
TNM 分期(I~II/III~IV)	2.84	1.020~7.909	0.046	2.838	1.035~7.777	0.043
FOXC1(高表达/低表达)	2.28	1.025~5.069	0.043	2.395	1.096~5.234	0.029

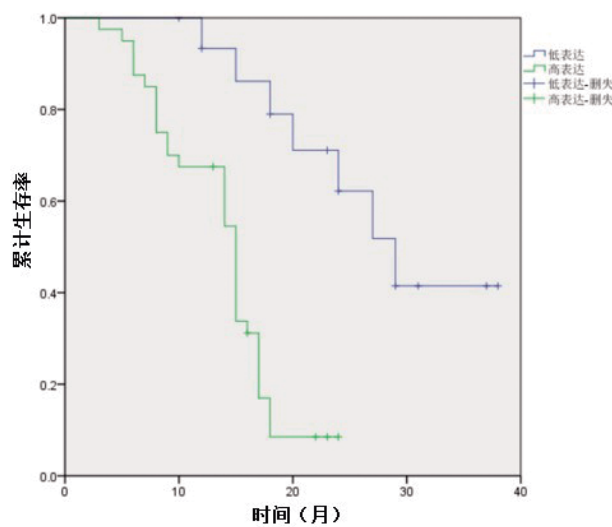


图4 FOXC1 高表达组与低表达组的总生存情况

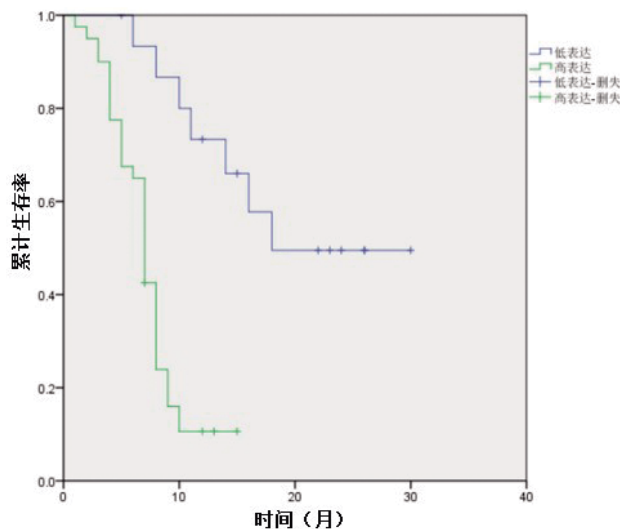


图5 FOXC1 高表达组与低表达组的无疾病生存情况

的表达不同改变神经钙黏素蛋白的表达以及血管生成标志物 VEGFR2 和 DLL4 的水平,而这些因素可能有胰腺癌的侵袭性有关。本研究结果表明,FOXC1 的高表达与胰腺癌的淋巴结转移、TNM 分

期、肿瘤直径相关,与年龄、性别、癌症部位、分化程度无关。生存分析发现 FOXC1 的高表达与胰腺癌预后独立相关。

FOXC1 在胰腺癌中的作用机制尚未明了,仍需要深入研究,本研究结果表明 FOXC1 的高表达与胰腺癌发生发展及预后密切相关,FOXC1 的检测可作为评价胰腺癌发生发展的指标,供临床参考。

参考文献

- [1] 侯慧,刘慧敏,古再丽阿依·阿不力孜,等. 肿瘤标志物 CEA、CA724、CA199 在评估胰腺癌治疗预后中的应用价值[J].消化肿瘤杂志(电子版),2019,11(3):267-271.
- [2] 刘家栋,张婷.血清 LDH,CA19-9,CRP 联合检测与胰腺癌预后的相关性分析[J].消化肿瘤杂志(电子版),2019,11(2):109-112.
- [3] 苗毅,陈建敏.胰腺癌的诊断和外科治疗进展[J].消化肿瘤杂志(电子版),2011,3(4):199-202.
- [4] ZHU H. Forkhead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease[J]. Life Sci, 2016, 144:194-201.
- [5] HAN B, BHOWMICK N, QU Y, et al. FOXC1: an emerging marker and therapeutic target for cancer[J]. Oncogene, 2017,36(28):3957-3963.
- [6] YANG Z, JIANG S, CHENG Y, et al. FOXC1 in cancer development and therapy: deciphering its emerging and divergent roles[J]. Ther Adv Med Oncol, 2017, 9(12): 797-816.
- [7] LAM EW, BROSENS JJ, GOMES AR, et al. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony [J]. Nat Rev Cancer, 2013,13(7):482-495.
- [8] WANG J, LI W, ZHAO Y, et al. Members of FOX family could be drug targets of cancers[J]. Pharmacol Ther, 2018,181:183-196.
- [9] SIZEMORE ST, KERI RA. The forkhead box transcription factor FOXC1 promotes breast cancer invasion by inducing matrix metalloprotease 7 (MMP7) expression[J]. J Biol Chem, 2012, 287(29):24631-24640.
- [10] 刘慧,李鑫,胡腾鹏,等.PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂

- 在淋巴瘤中的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(5): 211-215.
- [11] HUANG L, HUANG Z, FAN Y, et al. FOXCl promotes proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma through the PI3K-AKT signal pathway [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3):1297-1306.
- [12] WANG J, LI L, LIU S, et al. FOXCl promotes melanoma by activating MST1R/PI3K/AKT [J]. Oncotarget, 2016, 7(51): 84375-84387.
- [13] SUBRAMANI R, CAMACHO FA, LEVIN CI, et al. FOXCl plays a crucial role in the growth of pancreatic cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(7):52.
- [14] XIA L, HUANG W, TIAN D, et al. Overexpression of forkhead box C1 promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2013, 57(2):610-624.
- [15] WANG L, GU F, LIU CY, et al. High level of FOXCl expression is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. Tumour Biol, 2013, 34(2):853-858.
- [16] XU Y, SHAO QS, YAO HB, et al. Overexpression of FOXCl correlates with poor prognosis in gastric cancer patients [J]. Histopathology, 2014, 64(7):963-970.
- [17] 乔丽, 刘杰, 高薇, 等. FOXCl 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(9):2171-2173.
- [18] 聂丽敏, 王琳琳, 刘杰, 等. FOXCl 蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(4): 796-798.
- [19] CHEANG MC, VODUC D, BAJDIK C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5):1368-1376.
- [20] MISHRA S, CHOE Y, PLEASURE SJ, et al. Cerebrovascular defects in Foxc1 mutants correlate with aberrant WNT and VEGF-A pathways downstream of retinoic acid from the meninges [J]. Dev Biol. 2016. 420(1): 148-165.

## ·读者·作者·编者·

### 本刊中容易出现的错别字和错误用法(破折号后面为正确用法)

病原体——病原体	甘油三脂——甘油三酯	mg/kg/次——mg/(kg·次)	黏连——粘连
侧枝——侧支	基因片断——基因片段	核分裂像——核分裂象	秩和检验——秩和检验
成份——成分	记数法——计数法	牵联——牵连	应急性溃疡——应激性溃疡
大肠——结肠	甲氨碟磷/甲氨喋磷/ 甲氨喋呤——甲氨碟呤	色采——色彩	影象——影像
发烧——发热	简炼——简练	石腊——石蜡	瘀血——淤血
返流性食管炎 ——反流性食管炎	节段性肠炎——局限性肠炎	食道——食管	愈合期——恢复期
阿酶素——多柔比星	禁忌症——禁忌证	适应症——适应证	愈后——预后
阿斯匹林——阿司匹林	抗菌素——抗生素	水份——水分	匀浆——匀浆
疤痕——瘢痕	化验检查——实验室检查	排便——排粪	血象——血常规
细胞浆——细胞质	环胞素——环孢素	盆隔——盆膈	血液动力学——血流动力学
报导——报道	机理——机制	剖腹产——剖宫产	炎症性肠病——炎性肠病
分子量——相对分子质量	几率/机率——概率	其它——其他	已往——以往
份量——分量	机能——功能	丝裂酶素——丝裂霉素	粘膜——黏膜
服帖——服贴	肌肝——肌酐	松驰——松弛	粘液——黏液
浮肿——水肿	考马斯亮兰——考马斯亮蓝	探察——探查	直肠阴道膈——直肠阴道隔
幅射——辐射	克隆氏病——克罗恩病	提肛肌——肛提肌	指证——指征
腹泄——腹泻	离体——体外	体重——体质量	质膜——细胞膜
肝昏迷——肝性脑病	连结——联结	同功酶——同工酶	转酞酶——转肽酶
肛皮线——齿状线	淋巴腺——淋巴结	同位素——核素	姿式——姿势
枸缘酸钠——枸橼酸钠	痿道——痿管	图象——图像	综合症——综合征
海绵——海绵	录象——录像	胃食管返流——胃食管反流	纵膈——纵膈
合并症——并发症	毛细血管嵌压 ——毛细血管楔压	无须——无需	H-E 染色 ——苏木精-伊红染色
何杰金病——霍奇金病	尿生殖隔——尿生殖膈	消毒中——无菌中	组织胺——组胺
返流——反流	氨基糖甙类——氨基糖苷类	血色素——血红蛋白	幽门螺旋杆菌——幽门螺杆菌
雪旺氏细胞——雪旺细胞		5-羟色氨——5-羟色胺	横膈——横膈
		核磁共振——磁共振	