

结直肠癌组织中 FOXO3a 与 MMP-9 的表达及意义*

孙晋敏, 郭存存[#], 柳红, 郑茂金, 韩文灿[△]

(徐州医学院病理学教研室, 江苏徐州 221002)

摘要:目的 探讨转录因子叉头框蛋白 O3a(FOXO3a)与基质金属蛋白酶 9(MMP-9)在结直肠癌组织中的表达以及二者的关系。方法 应用组织芯片和免疫组织化学 SP 法检测 FOXO3a 与 MMP-9 在 78 例结直肠癌组织和 69 例相应正常肠黏膜组织中的表达,分析 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白表达与结直肠癌患者临床病理特征的关系及 FOXO3a 和 MMP-9 的关系。结果 (1) 78 例结直肠癌组织与 69 例正常肠黏膜组织中,FOXO3a 的阳性表达率分别为 57.69%(45/78)和 95.65%(66/69),MMP-9 的阳性表达率分别为 85.90%(67/78)和 15.94%(11/69),FOXO3a 与 MMP-9 在结直肠癌组织和正常肠黏膜组织中表达的差异均具有统计学意义($P=0.000$)。(2) 结直肠癌组织中 FOXO3a 低表达、MMP-9 过表达与肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移和 TNM 分期密切相关($P<0.05$),与患者年龄、性别、肿瘤大小均无关($P>0.05$)。(3) FOXO3a 的表达与 MMP-9 的表达呈负相关($r=-0.272, P<0.05$)。结论 FOXO3a 表达降低及 MMP-9 表达增高可能与结直肠癌的进展有密切关系,联合检测 FOXO3a 与 MMP-9 的表达水平可能对预测结直肠癌的恶性程度和预后具有重要意义。

关键词:结直肠癌;FOXO3a;MMP-9;组织芯片

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.012

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)01-0035-04

Expression and significance of FOXO3a and MMP 9 in colorectal cancer*

Sun Jinmin, Guo Cuncun[#], Liu Hong, Zheng Maojin, Han Wencan[△]

(Department of pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of FOXO3a and MMP 9 in colorectal cancer tissues and their relationship. Methods Tissue microarray and immunohistochemical SP methods were used to detect the expression of FOXO3a and MMP 9 in 78 cases of colorectal cancer tissues and 69 cases of corresponding normal intestinal mucosa tissues, then analyze the relation between their expression and the clinicopathologic parameters of the patients, and the relation between the expression of FOXO3a and MMP 9. Results (1) The positive expression rate of FOXO3a in 78 cases of colorectal cancer tissues and 69 cases of normal intestinal mucosa tissues are 57.69%(45/78) and 95.65%(66/69), the positive expression rate of MMP 9 in 78 cases of colorectal cancer tissues and 69 cases of normal intestinal mucosa tissues are 85.90%(67/78) and 15.94%(11/69), and the difference is significant ($P=0.000$). (2) The decreased expression of FOXO3a and the increased expression of MMP 9 in colorectal cancer are significantly correlated with the depth of tumor invasion, tumor histological differentiation, metastasis of lymph node and TNM stage ($P<0.05$), but there is no significant relationship with patients' age, gender and tumor size ($P>0.05$). (3) There was a negative correlation between the expression of FOXO3a and MMP 9 ($r=0.272, P<0.05$). Conclusion The decreased expression of FOXO3a and the increased expression of MMP 9 may be closely related with carcinogenesis, invasion and metastasis of colorectal cancer, and their combination may be an important indicator to evaluate the malignant degree and prognosis of the colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer; FOXO3a; MMP 9; tissue microarray

结直肠癌是消化道的一种常见恶性肿瘤,肿瘤的侵袭和转移仍然是结直肠癌患者死亡的主要原因。结直肠癌的发生、发展是一个长期多因素、多阶段参与的复杂过程,其病因及发病机制的研究尚未完全明了。转录因子叉头框蛋白 O3a(FOXO3a)是叉头框转录因子家族的重要成员,研究发现 FOXO3a 在肝癌、肺癌、胃癌、原发性乳腺癌等^[1]多种恶性肿瘤中表达降低,与肿瘤的发生、侵袭和转移密切相关,成为近年来研究的热点。肿瘤的侵袭与转移受多种基因/蛋白质、细胞因子的调控^[2],涉及肿瘤细胞增殖、黏附、基膜和细胞外基质的降解等。基质金属蛋白酶 9(MMP-9)是基质金属蛋白酶家族(MMPs)中的重要蛋白水解酶,是 FOXO3a 众多下游调控蛋白之一,具有破坏和裂解细胞外基质的作用,与肿瘤的侵袭和转

移密切相关^[3-4]。

本研究应用组织芯片技术结合免疫组化方法检测 FOXO3a 与 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织和相应正常肠黏膜组织中的表达,分析 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白与各临床病理特征之间的关系及 FOXO3a 和 MMP-9 的关系,以探讨 FOXO3a 与 MMP-9 蛋白在结直肠癌侵袭和转移过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 收集徐州医学院附属医院 2008~2011 年经手术切除的结直肠癌组织存档蜡块 78 例和相应正常肠黏膜组织(距肿瘤组织 5 cm 以上)存档蜡块 69 例,所有病例的临床和病理资料完整。其中男 40 例,女 38 例。年龄 22~89 岁,中位年龄 50 岁。根据 AJCC 临床分期: I~II 期 37 例, III~IV 期 41

* 基金项目:徐州医学院科研课题(2011KJ10)。 作者简介:孙晋敏(1982-),硕士研究生,讲师,主要从事肿瘤转移与抗转移的研究。

[#] 并列第一作者。郭存存(1987-),住院医师,硕士研究生,主要从事肿瘤转移方面的研究。 [△] 通讯作者, Tel:15162247495; E-mail: hanwencan@163.com。

例。所有患者术前均未行放疗、化疗以及其他针对肿瘤的特殊治疗,术后病理检查均经两位病理医师诊断。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的制备 复查 HE 染色切片,对代表性组织位点进行标记,每个病例的癌组织和相应正常组织各选 3 个位点,所使用组织芯片制备仪为 Alphelys 公司产品 MINICORE,取样针直径 1.0 mm,组织芯间距 2.0 mm,设计 10×7 点组织阵列,含 70 个位点,共制备组织芯片蜡块 7 个。组织阵列块在 52°C 恒温烤箱中加热融合, 4°C 冰箱存放备用。

1.2.2 免疫组化检测 兔抗人 FOXO3a 多克隆抗体、兔抗人 MMP-9 多克隆抗体均购自美国 CST(Cell Signaling Technology)公司,SP-9000 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒以及其他试剂均购于北京中杉金桥公司。采用免疫组化 SP 法,按试剂盒说明书进行,每批均设已知阳性切片做阳性对照,PBS 代替一抗做阴性对照。

1.2.3 结果判定 本实验中所有免疫组织化学染色结果均用双盲法阅片,由两位有经验的病理医师分别作出判断。FOXO3a 蛋白免疫组化以细胞核呈现棕黄色颗粒为阳性,MMP-9 蛋白免疫组化以细胞质呈现棕黄色颗粒为阳性。每张切片于 400 倍光镜下随机取 5 个视野,每个视野计数 100 个细

胞,(1)阳性细胞百分比计分:无为 0 分;1%~25%为 1 分;26%~50%为 2 分;51%~75%计为 3 分;76%~100%计为 4 分;(2)着色强弱:无为 0 分;弱(淡黄色)为 1 分;中(棕黄色)为 2 分;强(棕褐色)为 3 分。以(1)和(2)的乘积评分, ≤ 3 分者为阴性, > 3 分者为阳性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关性检验。以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白在正常肠黏膜组织和结直肠癌组织中表达 FOXO3a 蛋白阳性产物为棕黄色颗粒,定位于细胞核。MMP-9 蛋白阳性产物为棕黄色颗粒,定位于细胞质(图 1)。FOXO3a 在结直肠癌组和正常肠黏膜组中的阳性表达率分别为 57.69%和 95.69%,结直肠癌组 FOXO3a 的阳性表达率明显低于正常肠黏膜组($P=0.000$);MMP-9 在结直肠癌组和正常肠黏膜组中的阳性表达率分别为 85.90%和 15.94%,结直肠癌组 MMP-9 的阳性表达率明显高于正常肠黏膜组($P=0.000$),见表 1。

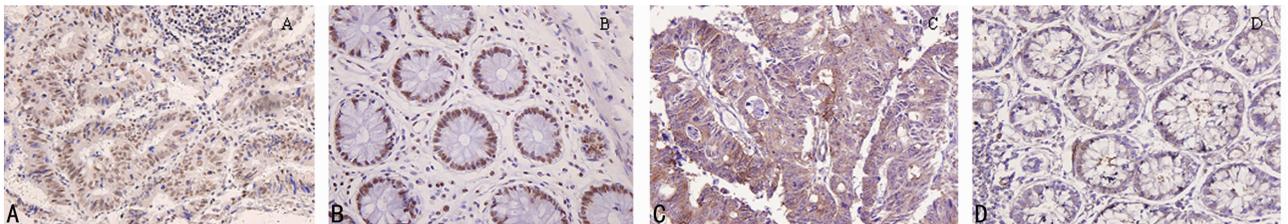


图 1 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织和正常肠黏膜组织中的表达(SP 法, $\times 400$)
A:FOXO3a 蛋白在结直肠癌组织中的表达;B:FOXO3a 蛋白在正常肠黏膜组织中的表达;C:MMP-9 蛋白在结直肠癌组织中的表达;D:MMP-9 蛋白在正常肠黏膜组织中的表达。

表 1 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织及正常肠黏膜组织中的表达

组别	n	FOXO3a			MMP-9		
		+(%)	χ^2	P	+(%)	χ^2	P
正常组织	69	66(95.65)	28.529	0.000	11(15.94)	71.938	0.000
癌组织	78	45(57.69)			67(85.90)		

2.2 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织中的表达与患

者临床病理特征的关系 结直肠癌组织中,FOXO3a 低表达和 MMP-9 过表达与肿瘤浸润深度、分化程度、淋巴结转移以及临床分期密切相关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、肿瘤大小无相关性($P>0.05$),见表 2。

2.3 结直肠癌组织中 FOXO3a 与 MMP-9 蛋白表达之间的相关性 结直肠癌组织中 FOXO3a 与 MMP-9 蛋白表达均为阳性的有 19 例,均为阴性的 10 例。Spearman 等级相关性检验显示结直肠癌组织中 FOXO3a 的表达与 MMP-9 的表达呈负相关($r=-0.272$, $P<0.05$),见表 3。

表 2 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织中的表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	FOXO3a			MMP-9		
		+(%)	χ^2	P	+(%)	χ^2	P
性别							
男	40	20(50.00)	0.489	0.484	23(57.50)	0.001	0.972
女	38	22(57.89)			22(57.89)		
年龄(岁)							
< 56	24	12(50.00)	0.206	0.650	14(58.33)	0.006	0.939
≥ 56	54	30(55.56)			31(57.41)		
肿瘤直径(cm)							
< 5	37	20(54.05)	0.001	0.972	22(59.46)	0.090	0.764
≥ 5	41	22(53.66)			23(56.10)		

续表 2 FOXO3a 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织中的表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	FOXO3a			MMP-9		
		+(%)	χ^2	P	+(%)	χ^2	P
浸润深度							
未达浆膜层	19	18(94.74)	16.90	0.000	5(26.32)	10.131	0.001
已达浆膜层	59	24(40.68)			40(67.80)		
分化程度							
高、中分化	68	40(58.82)	5.287	0.021	36(52.94)	4.905	0.027
低分化	10	2(20.00)			9(90.00)		
淋巴结转移							
无转移	40	28(70.00)	8.621	0.003	14(35.00)	17.322	0.000
有转移	38	14(36.84)			31(81.58)		
临床分期							
I 期+II 期	37	27(72.97)	10.362	0.001	12(32.43)	18.401	0.000
III 期+IV 期	41	15(36.59)			33(80.49)		

表 3 结直肠癌组织中 FOXO3a 与 MMP-9 蛋白表达之间的相关性

FOXO3a	MMP-9		r	P
	-	+		
-	10	26		
+	23	19	-0.272	0.017
合计	33	45		

3 讨 论

叉头框蛋白(Forkhead box, FOX)转录因子家族是 2000 年被统一命名的蛋白家族。FOXO (Forkhead box O 亚家族)蛋白作为其中研究最深入的亚家族,在调控机体生长发育、细胞分化、代谢凋亡、信号转导、转录和免疫等方面发挥重要的生物学功能^[5]。近年来研究发现,FOXO 转录因子还能通过调控与细胞凋亡和细胞周期相关的众多下游效应分子(如 TRAIL、Bcl-2 等)来诱导细胞凋亡、抑制细胞周期、修复损伤的 DNA,成为公认的肿瘤抑制物。FOXO3a 是 FOXO 亚家族中的重要成员,其磷酸化失活及亚细胞定位与肿瘤的发生密切相关。研究证实,FOXO3a 表达缺失在甲状腺癌^[6]、卵巢癌^[7]、乳腺癌^[8]、尿路上皮癌^[9]等多种肿瘤发生、发展过程中起到重要作用,且与患者预后密切相关。Zhang 等^[6]应用免疫荧光方法检测到滤泡性甲状腺癌组织中 FOXO3a 表达失活,通过基因转染使甲状腺癌细胞(FTC133)中 FOXO3a 过表达后,能够显著抑制肿瘤细胞的生长。早在 2004 年, Hu 等^[1]发现 FOXO3a 功能失活的乳腺癌患者预后较差,更容易因发生肿瘤转移而死亡,并因此推测 FOXO3a 可以抑制乳腺癌发展。本实验结果显示 FOXO3a 在正常肠黏膜组织中的阳性表达率为 95.69%,明显高于癌组织中 57.69%的阳性表达率,差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示 FOXO3a 表达下调可能与结直肠癌的发生密切相关。同时,FOXO3a 表达下调与结直肠癌的浸润深度、分化程度、淋巴结转移和临床分期有关,FOXO3a 表达下降,结直肠癌浸润深度增加,分化程度降低,出现淋巴结转移,临床分期增高,提示 FOXO3a 具有抑制结直肠癌侵袭和转移的作用,与上述文献报道均一致。

MMP9 是基质金属蛋白酶(MMPs)家族中相对分子质量最大的基质金属蛋白酶,是 Reponen 和 Sahlberg 于 1994 年从

小鼠胚胎中的破骨细胞内发现的,其基本结构包括 N-末端肽区、信号肽区、c-末端血红素缩合蛋白样区、催化团区和锁链区,基因定位于人 16 号染色体。依据发现的先后顺序将 MMP-9 命名为基质金属蛋白酶 9。Chiang 等^[13]研究表明,肿瘤侵袭转移的能力与其产生或诱导产生 MMP 的能力呈正相关,因此 MMP 在肿瘤浸润转移中的作用日益受到重视, MMP-9 为其中重要的一类。它是一类 Zn^{2+} 依赖的细胞外蛋白水解酶,可降解细胞外基质,促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[10-12]。本研究显示, MMP-9 在结直肠癌中的表达明显高于正常肠黏膜组织,分析癌组织中 MMP-9 表达与结直肠癌各临床病理特征的关系发现, MMP-9 阳性表达与结直肠癌的浸润深度、分化程度、淋巴结转移和临床分期密切相关($P < 0.05$), MMP-9 在有淋巴结转移组的表达明显高于无淋巴结转移组, MMP-9 表达越高,肿瘤浸润越深、分化越低、分期越高。

FOXO3a 与 MMP-9 在肿瘤的侵袭与转移过程中有较多联系。FOXO3a 在乳腺癌细胞(MDA-MB-231)中有激活 MMP-9 的作用, Storz 等^[14]证实, FOXO3a 能够通过调节转录因子 SMAD3/4 或者肿瘤坏死因子 κB (NF- κB), 间接激活 MMP-9 进而促进乳腺癌的转移。而 Suthakar 等^[15]发现, 在前列腺癌中 FOXO3a 可以通过促进肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的表达来抑制 MMP-9 的激活进而发挥抑癌作用。作者对结直肠癌临床病理组织学标本进行了初步研究,发现结直肠癌组织中 FOXO3a 的表达与 MMP-9 的表达呈负相关($r = -0.272, P < 0.05$),说明二者在肿瘤的发生、发展,浸润转移中可能存在一定的内在联系性,或者相互拮抗的作用。FOXO3a 表达越低、MMP9 表达越高,结直肠癌的分化程度越低,越容易发生淋巴结转移。FOXO3a 与 MMP-9 在不同肿瘤组织中表现出不同的作用机制和关系,可能在不同肿瘤发生、发展过程中,涉及不同癌基因的突变或激活、抑癌基因的丢失或失活及凋亡调节机制的紊乱等,在此过程中 FOXO3a 与 MMP-9 的相互作用机制较为复杂^[16]。

综上所述,FOXO3a 表达下调和 MMP-9 表达增高在结直肠癌发生、侵袭和转移过程中起到重要作用,联合检测 FOXO3a 和 MMP-9 的表达可能为结直肠癌分化程度、转移潜能、临床分期提供重要依据,初步探讨 FOXO3a 与 MMP-9 的相关性将为进一步了解 FOXO3a 抑制结直肠癌发生、发展的作用机制打下基础。

参考文献:

- [1] Hu MC, Lee DF, Xia W, et al. Ikappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3[J]. Cell, 2004, 227(2): 225-237.
- [2] Coomber BL, Yu JL, Fathers KE, et al. Angiogenesis and the role of epigenetics in metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(3): 215-227.
- [3] Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, et al. MMP-9 (gelatinase B) expression is associated with disease-free survival and disease-specific survival in colorectal cancer patients[J]. Cancer Invest, 2010, 28(1): 38-43.
- [4] Chen X, Su Y, Fingleton B, et al. Increased plasma MMP9 in integrin alpha1-null mice enhances lung metastasis of colon carcinoma cells[J]. Int J Cancer, 2005, 116(1): 52-61.
- [5] 李学斌, 谢庄, 石放雄. FOXO 蛋白在动物细胞的分化、增殖、免疫、衰老调节中的作用[J]. 中国临床康复, 2006, 9(10): 158-162.
- [6] Hong ZY, Lee HJ, Shin DY, et al. Inhibition of Akt/FOXO3a signaling by constitutively active FOXO3a suppresses growth of follicular thyroid cancer cell lines[J]. Cancer Lett, 2012, 314(1): 34-40.
- [7] Lu M, Zhao Y, Xu F, et al. The expression and prognosis of FOXO3a and Skp2 in human ovarian cancer[J]. Med Oncol, 2012, 29(5): 3409-3415.
- [8] Zou Y, Tsai WB. Forkhead box transcription factor FOXO3a suppresses estrogen dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(1): R21.
- [9] Shiota M, Song Y, Yokomizo A, et al. FOXO3a Suppression of Urothelial Cancer Invasiveness Regulation through Twist1, Y-Box -Binding Protein 1, and E-Cadherin [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(23): 5654-5663.
- [10] Quaranta M, Daniele A, Coviello M, et al. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15. 3 in breast cancer [J]. Anticancer Res, 2007, 27(5): 3593-3600.
- [11] Sillanpaa S, Anttila M, Voutilainen K, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2007, 104(2): 296-303.
- [12] Kim SM, Lee H, Park YS, et al. ERK5 regulates invasiveness of osteosarcoma by inducing MMP-9 [J]. J Orthop Res, 2012, 30(7): 1040-1044.
- [13] Chiang AC, Massague J. Molecular basis of metastasis [J]. N Engl J Med, 2008, 359(26): 2814-2823.
- [14] Storz P, Döppler H, Copland JA, et al. FOXO3a Promotes Tumor Cell Invasion through the Induction of Matrix Metalloproteinases [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(18): 4906-4917.
- [15] Ganapathy S, Chen Q, Singh KP, et al. Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor [J]. PLoS One, 2010, 5(12): e15627.
- [16] Miyazono K. Tumour promoting functions of TGF- β in CML-initiating cells [J]. J Biochem, 2012, 152(5): 383-385.

(收稿日期: 2013-08-01 修回日期: 2013-09-21)

(上接第 34 页)

一步进展, 从而尽早、有效的预防中青年缺血性脑卒中的发生, 降低其发病率, 促进中医“治未病”理论的进一步发展, 对脑卒中日益年轻化的我国社会具有重要的社会经济意义。

参考文献:

- [1] Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2003, 108(12): 1440-1445.
- [2] 夏稻子. 超声诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 220-223.
- [3] 李宗信, 黄小波, 陈文强, 等. 颈动脉粥样硬化中医证型的函数判别分析 [J]. 中国脑血管病杂志, 2007, 4(11): 481-485.
- [4] 王文志, 吴升平, 洪震, 等. 我国三城市开展社区人群干预九年脑卒中发病率的变化 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2002, 4(1): 30-33.
- [5] 吕亚林. 青年型缺血性脑血管病的临床特点及预后分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(16): 45, 81.
- [6] Saito O, Saito T, Okuda K, et al. Serum adiponectin and markers of endothelial injury in hemodialysis patients with arteriosclerosis obliterans [J]. Clin Exp Nephrol, 2008, 12(1): 58-64.
- [7] 钟森, 蒋宜, 史若飞. 老年高血压病患者颈动脉粥样硬化与血清高敏 C 反应蛋白、脂蛋白(a)及尿酸关系 [J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1891-1893.
- [8] 李强, 凌芳, 聂德云, 等. 大剂量阿托伐他汀对急性脑梗死患者血清细胞因子及动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. 重庆医学, 2012, 41(16): 1598-1603.
- [9] 朱文晖, 李瑞珍, 唐水娟, 等. 颈动脉斑块内新生血管与血浆髓过氧化物酶浓度及脑梗死的相关性研究 [J]. 中华超声影像学杂志, 2008, 17(11): 952-955.
- [10] 韩轲, 贾宁, 闵连秋. 脑梗死患者血清髓过氧化物酶和妊娠相关血浆蛋白 A 与颈动脉易损斑块的相关性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(6): 561-563.
- [11] 黄小波, 李宗信, 陈文强, 等. 颈动脉粥样硬化痰浊内阻证与血瘀证主成分的相关分析 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(3): 135-137.
- [12] 陈文强, 黄小波, 李宗信, 等. 颈动脉粥样硬化中医证候转化的定量分析 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(15): 2089-2091.

(收稿日期: 2013-08-16 修回日期: 2013-09-23)