

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.022

叉头框蛋白 Q1 在非小细胞肺癌的表达及其与预后关系

王斌¹, 张逊^{2△}, 耿华³, 徐美林³, 周海英⁴

(1. 天津医科大学第四中心临床学院胸外科 300140; 2. 天津胸科医院胸外科 300051; 3. 天津胸科医院病理科 300051; 4. 唐山工人医院胸外科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 研究人非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤组织中叉头框蛋白 Q1(FOXQ1)的表达水平,探讨其与 NSCLC 患者的临床病理特征相关性,及其对患者预后的影响。方法 选择天津市胸科医院 2007 年 6 月至 2008 年 12 月期间术后病理为 NSCLC 患者石蜡标本共 84 例。应用免疫组织化学染色 SP 法检测患者肿瘤组织中 FOXQ1 蛋白的表达水平。分析 FOXQ1 蛋白的表达与 NSCLC 患者临床病理参数、NSCLC 患者生存时间的关系。结果 FOXQ1 在肿瘤组织中阳性表达率为 91.7%(77/84)。FOXQ1 蛋白阳性表达与 NSCLC 患者的病理类型、临床分期均密切相关($P<0.05$)。COX 比例风险回归模型分析结果显示:病理分型、临床分期以及 FOXQ1 蛋白表达水平均是影响 NSCLC 预后的独立因素($P<0.05$)。结论 FOXQ1 蛋白在 NSCLC 患者肿瘤组织中高表达与患者预后呈负相关。

关键词: 肺肿瘤;癌,非小细胞肺;预后;叉头框蛋白 Q1

中图分类号:R655.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)01-0063-03

Expression and relationship between forkhead box Q1 and prognosis in NSCLC

Wang Bin¹, Zhang Xun^{2△}, Geng Hua³, Xu Meilin³, Zhou Haiying⁴

(1. Department of Thoracic Surgery, Fourth Central Clinical Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300140, China; 2. Department of Thoracic Surgery, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300051, China; 3. Department of pathology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300051, China; 4. Department of Thoracic Surgery, Tangshan Workers' Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To study the expression of forkhead box Q1(FOXQ1) in non-small cell lung cancer(NSCLC), then investigate clinical pathological characteristics of NSCLC and its prognosis in patients. **Methods** The expression of FOXQ1 in 84 cases of NSCLC(selected from June 2007 to December 2008) was detected by immunohistochemistry(SP). The correlations of the expression of FOXQ1 with clinic pathological features and survival time of the NSCLC patients were analyzed. **Results** The positive expression rate of FOXQ1 was 91.7%(77/84), closely correlated with patients' histological type and TNM stage($P<0.05$). The Cox multivariate analysis demonstrated that histological type, TNM stage and FOXQ1 expression were independent factors of NSCLC ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of FOXQ1 may be highly expressed in NSCLC and negatively correlated with prognosis.

Key words: lung neoplasms; carcinoma, non-small cell lung; prognosis; foxhead box Q1

肺癌是世界范围内病死率最高的恶性肿瘤之一^[1]。非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌病理类的 80%,已经成为威胁人类健康的主要疾病^[2]。尽管肺癌治疗方法取得了巨大进步,但肺癌患者 5 年生存率仅有 16%,在 5 年内估计有 35%~50%的早期 NSCLC 患者死亡^[3]。叉头框(forkhead, FOX)蛋白是一类转录调控因子,参与多种生物学过程,其异常表达与肿瘤发展有关。最新研究提示 FOXQ1 是 FOX 基因家族中又一与肿瘤相关的重要成员^[4]。本研究通过免疫组织化学 SP 的方法,观察 NSCLC 患者组织中 FOXQ1 蛋白的表达情况,探讨其对 NSCLC 患者的临床病理特征及预后的影响,为进一步研究 FOXQ1 蛋白应用于临床提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择天津市胸科医院 2007 年 6 月至 2008 年 12 月期间术后病理为 NSCLC 患者石蜡标本共 84 例。其中,男 55 例,女 29 例,年龄 35~78 岁,平均(55.2±3.16)岁;癌症类型:腺癌 43 例,鳞癌 22 例,其他类型 19 例;病理分期: I 期 17 例, II 期 25 例, III 期 27 例, IV 期 15 例;分化类型:高分化 31 例,中分化 25 例,低分化 28 例。随访时间为 3~63 个月,随访率为 98.8%。截止随访结束,存活 24 例,死亡 60 例,死亡原

因为肿瘤复发和转移,患者术前均未进行化疗及放疗。所有患者手术标本均用 10%甲醛固定,石蜡包埋,所有患者的临床及病理资料完整。

1.2 方法

1.2.1 SP 染色 应用免疫组织化学 SP 法,烤片,常规脱蜡,梯度乙醇脱水。阻断灭活内源性过氧化物酶,3% H₂O₂ 37℃ 孵育 10 min, PBS 冲洗后进行抗原修复。山羊血清 37℃ 孵育 10 min;滴加 FOXQ1 抗体(工作浓度为 1:500)50 μL, 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 冲洗 5 min×3。滴加生物素标记二抗, 37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 5 min×3。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液, 37℃ 30 min, PBS 冲洗, 5 min×3; DAB 显色。自来水充分冲洗,苏木素复染,脱水,透明,干燥,封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.2 SP 染色结果判定 FOXQ1 蛋白阳性表达主要表现为细胞质内呈现棕黄色或者棕褐色颗粒,也有少量胞核内呈现棕黄色颗粒,故以细胞核或细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。FOXQ1 染色结果由专业病理科医师评估,根据细胞染色强度及着色面积综合评定。细胞染色强度分为 4 级:无着色 0 分;浅黄色 1 分;棕黄色 2 分;棕褐色 3 分。着色面积按照阳性

细胞占总细胞数的百分率分为以下 4 级: $\leq 25\%$ 为 1 分; $>25\% \sim \leq 50\%$ 为 2 分; $>50\% \sim \leq 75\%$ 为 3 分; $>75\%$ 为 4 分。用两者得分和进行判断: 0~1 分为阴性(-), 2~3 分为弱阳性(+), 4~5 分为阳性(++), 6~7 分为强阳性(+++)。

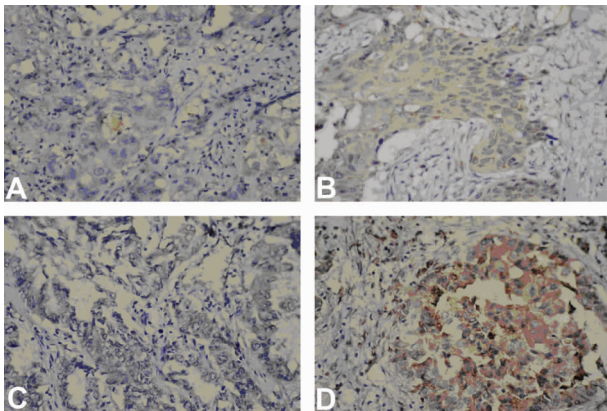
1.2.3 随访方法 随访采取门诊复查和电话相结合的方式, 所有复发、转移的病例均经临床影像或病理学证实。随访日期: 2007 年 6 月 1 日至 2013 年 12 月 31 日, 生存期的计算从手术日期到随访截止日期, 或由于复发、转移而死亡的日期为止。

1.2.4 数据比较 SP 染色结果得出后, 分析 FOXQ1 蛋白的表达与 NSCLC 患者临床病理参数、NSCLC 患者生存时间的关系。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。计数资料用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法进行分析, 生存曲线采用 Kaplan-Meier, 并用 Log rank 进行检验。采用 COX 比例风险回归模型进行预后多因素分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 SP 染色结果 FOXQ1 阳性表达呈现为棕黄色或棕褐色染色颗粒, 位于细胞质, 部分位于细胞核(图 1)。84 例样本中, 定义积分大于 4 分为强阳性, FOXQ1 表达强阳性 56 例(66.7%), 弱阳性 21 例(25.0%), 阴性 7 例(8.3%), 阳性表达率为 91.7%。



A: 弱阳性鳞癌; B: 强阳性鳞癌; C: 弱阳性腺癌; D: 强阳性腺癌。

图 1 SP 检测不同病理类型肺癌组织中 FOXQ1 的表达 (SP $\times 400$)

2.2 FOXQ1 蛋白的表达与 NSCLC 患者临床病理参数的关系

FOXQ1 蛋白的表达与 NSCLC 患者的性别、年龄、吸烟史以及肿瘤大小、淋巴结转移状态、肿瘤分化程度存活状态无关($P > 0.05$)。与肺癌的分期、病理类型密切相关($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 84 例 NSCLC 患者临床病理参数与 FOXQ1 蛋白表达的关系

| 项目 | n | FOXQ1 蛋白表达强阳性 [n(%)] | χ^2 | P |
|-----------|----|-------------------------|----------|-------|
| 性别 | | | 0.658 | 0.417 |
| 男 | 55 | 35(63.6) | | |
| 女 | 29 | 21(72.4) | | |
| 年龄(岁) | | | 1.636 | 0.201 |
| ≥ 60 | 53 | 38(71.7) | | |
| < 60 | 31 | 18(58.1) | | |
| 吸烟史 | | | 0.770 | 0.380 |

续表 1 84 例非小细胞肺癌患者临床病理参数与 FOXQ1 蛋白表达的关系

| 项目 | n | FOXQ1 蛋白表达强阳性 [n(%)] | χ^2 | P |
|----------|----|-------------------------|----------|-------|
| 有 | 62 | 43(69.4) | | |
| 无 | 22 | 13(59.1) | | |
| 肿瘤分期 | | | 10.728 | 0.013 |
| I | 17 | 8(47.1) | | |
| II | 25 | 13(52.0) | | |
| III | 27 | 23(85.2) | | |
| IV | 15 | 12(80.0) | | |
| 肿瘤大小(cm) | | | 0.033 | 0.856 |
| ≥ 3 | 64 | 43(67.2) | | |
| < 3 | 20 | 13(65.0) | | |
| 淋巴结转移 | | | 0.696 | 0.404 |
| 有 | 58 | 37(63.8) | | |
| 无 | 26 | 19(73.1) | | |
| 病理类型 | | | 9.310 | 0.010 |
| 鳞癌 | 22 | 10(45.5) | | |
| 腺癌 | 43 | 35(81.4) | | |
| 其他 | 19 | 11(57.9) | | |
| 分化程度 | | | 3.241 | 0.072 |
| 低分化 | 28 | 15(53.6) | | |
| 中、高分化 | 56 | 41(73.2) | | |
| 存活状态 | | | 2.363 | 0.124 |
| 存活 | 24 | 13(54.2) | | |
| 死亡 | 60 | 43(71.7) | | |

2.3 FOXQ1 蛋白的表达与 NSCLC 患者生存时间的关系

84 例 NSCLC 总体中位生存时间为 15 个月。FOXQ1 表达强阳性者(56 例)中位生存时间为 12.5 个月; 弱阳性者(21 例)中位生存时间为 23.8 个月, 前者生存时间显著短于后者, 差异有统计学意义($\chi^2 = 13.564, P = 0.001$)。生存曲线见图 2。

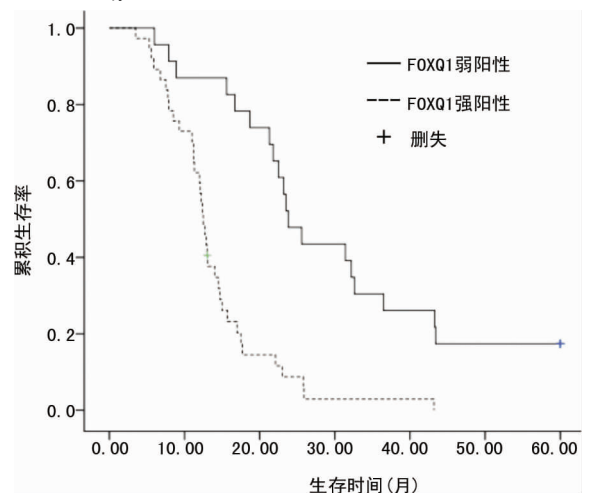


图 2 FOXQ1 蛋白的表达与 NSCLC 患者生存时间的关系

2.4 COX 比例风险模型的预后分析 根据单因素分析结果, 以性别、年龄、病理分型、肿瘤分化程度、淋巴结转移、临床分期及 FOXQ1 表达水平为自变量, 以患者生存时间为因变量, 应用 COX 比例风险回归模型进行分析。结果显示, FOXQ1 蛋白表达水平、病理分型和临床分期均是影响预后的独立因素($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 影响非小细胞肺癌患者预后的 COX 多因素分析

| 因素 | β | SE | Wald χ^2 | P | RR | 95%CI(RR) |
|--------------|---------|-------|---------------|-------|-------|--------------|
| 性别 | 0.341 | 0.658 | 0.269 | 0.604 | 1.407 | 0.387~5.110 |
| 年龄 | -0.022 | 0.021 | 1.062 | 0.303 | 0.979 | 0.939~1.020 |
| 临床分期 | 0.945 | 0.365 | 6.707 | 0.010 | 2.573 | 1.258~5.259 |
| 分化程度 | 0.107 | 0.479 | 0.050 | 0.824 | 1.113 | 0.435~2.843 |
| 病理分型 | 0.846 | 0.406 | 4.354 | 0.037 | 2.331 | 1.053~5.163 |
| 淋巴结转移状态 | 0.878 | 0.744 | 1.390 | 0.238 | 2.405 | 0.559~10.345 |
| FOXQ1 蛋白表达水平 | -1.739 | 0.706 | 6.076 | 0.014 | 0.176 | 0.044~0.700 |

3 讨 论

FOX 蛋白家族是一类 DNA 结合区具有翼状螺旋结构的转录因子(transcription factor,TF),它是维持细胞生命活动的关键调控因子^[5]。在胚胎发育过程中,不同胚层或同一胚层的不同部位都有特征性的 FOX 基因表达,从而参与细胞的分化和代谢,通过调节细胞凋亡和细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖,因此 FOX 蛋白可作为治疗靶点^[6]。FOXQ1 作为 FOX 基因家族成员之一,定位于第 6 号常染色体短臂 25.3 区(6p25.3),全长 2 319 bp,仅含 1 个外显子,编码 403 个氨基酸。近年来,研究发现 FOXQ1 基因在不同肿瘤类型中作用截然不同。如 FOXQ1 在黑素瘤中随着肿瘤的发生、发展表达逐渐下调^[7],在乳腺癌癌旁和正常组织中低表达,而在乳腺癌组织中表达呈强阳性^[8]。Kaneda 等^[9]研究发现:FOXQ1 mRNA 在结直肠癌组织中高表达;FOXQ1 能正向调控基因的表达,从而对肿瘤生长和肿瘤血管生成起促进作用。Wang 等^[10]研究发现在肝细胞癌中 FOXQ1 是一种致癌基因,其表达与肿瘤恶性程度呈正相关。在胃癌中,FOXQ1 表达水平可作为不良预后的独立预测因子^[11]。

本研究结果显示,84 例 NSCLC 患者中,处于癌症中晚期、病理分型差的患者,其肿瘤组织中 FOXQ1 蛋白表达水平较高,肿瘤进展期 FOXQ1 蛋白表达水平要高于肿瘤早期,这提示 FOXQ1 蛋白的表达水平与肿瘤恶性程度密切相关。同时研究发现,肿瘤淋巴结转移状态、分化程度与 FOXQ1 蛋白的表达水平无明显相关性,原因可能与本研究的样本量偏小有关,还需要大样本进行进一步检验。根据生存曲线本研究发现:FOXQ1 阳性表达患者的生存时间(OS)显著短于 FOXQ1 阴性表达的患者($P=0.001$)。COX 比例风险回归模型进行多因素分析的结果显示:临床分期、病理分型和 FOXQ1 蛋白的表达水平是影响 NSCLC 患者预后的独立因素(均 $P<0.05$)。

近年来,肺癌发病率在世界范围内呈急剧上升趋势,在许多国家肺癌的发病率和病死率均已居各种恶性肿瘤的首位^[12]。靶向治疗已逐渐成为 NSCLC 治疗的新选择,肿瘤增殖过程中细胞信号传导和其他生物学途径可作为 NSCLC 预防和治疗的新靶点。本研究证实 FOXQ1 在 NSCLC 组织中高表达,且与不良预后有关。目前对 FOXQ1 作用机制的研究仍然处于初级水平,对其具体调控机制尚不清楚。探究 FOXQ1 作用的分子机制是今后研究的热点方向,进一步探索 FOXQ1 在 NSCLC 发生、发展中的生物学和分子学机制,将有助于更好地阐述 NSCLC 的生物学行为,而下调 FOXQ1 基因的表达可能成为 NSCLC 治疗的新思路。

tics,2002[J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108.

[2] Nordquist LT,Simon GR,Cantor A,et al. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung[J]. Chest,2004,126(2):347-351.

[3] Gao W,Liu LX,Lu X,et al. Circulating MicroRNAs: possible prediction biomarkers for personalized therapy of Non-Small-Cell lung carcinoma [J]. Clin Lung Cancer, 2011,12(1):14-17.

[4] Feuerborn A,Srivastava PK,Kiuffer S,et al. The forkhead factor FOXQ1 influences epithelial differentiation [J]. J Cell Physiol,2011,226(3):710-719.

[5] Chen K,Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs[J]. Nat Rev Genet, 2007,8(2):93-103.

[6] Hannehalli S,Kaestner KH. The evolution of Fox genes and their role in development and disease [J]. Nat Rev Genet,2009,10(4):233-240.

[7] Jensen EH,Lewis JM,Mcloughlin JM,et al. Down-regulation of pro-apoptotic genes is an early event in the progression of malignant melanoma [J]. Ann Surg Oncol, 2007,14(4):1416-1423.

[8] Zhang HJ,Meng FY,Liu G,et al. Forkhead transcription factor Foxq1 promotes Epithelial-Mesenchymal transition and breast cancer metastasis[J]. Cancer Res,2011,71(4): 1292-1301.

[9] Kaneda H,Arao T,Tanaka K,et al. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumor genicity and tumor growth[J]. Cancer Res,2010,70:2053-2063.

[10] Wang WW,He S, Ji JL, et al. The prognostic significance of FOXQ1 oncogene overexpression in human hepatocellular carcinoma [J]. Pathol Res Pract, 2013, 209(6): 353-358.

[11] Liang SH, Yan XZ, Wang BL, et al. Increased expression of FOXQ1 is a prognostic marker for patients with gastric cancer [J]. Tumor Biology, 2013, 34(5): 2605-2609.

[12] Dearing KR, Sangal A, Gj W. Maintaining clarity: Review of maintenance therapy in non-small cell lung cancer [J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(2): 103-113.

参考文献:

[1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statis-