

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.018

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20191226.1756.016.html\(2019-12-27\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20191226.1756.016.html(2019-12-27))

IKBKE 和 FOXO3 在结直肠癌中的表达及临床意义分析

张翠萍, 邹佳芮, 解水杉, 俎莎, 郝俊梅[△]

(滨州医学院烟台附属医院病理科, 山东烟台 264100)

[摘要] **目的** 探讨结直肠癌组织中核因子 κ B 激酶亚单位 ϵ 抑制剂 (IKBKE) 和叉头框蛋白 O3 (FOXO3) 的表达及与临床病理特征和生存预后的关系。**方法** 应用免疫组织化学染色方法检测该院 2013 年 1 月至 2014 年 1 月 79 例结直肠癌组织中 IKBKE 和 FOXO3 的表达, 分析其临床意义。**结果** 结直肠癌组织中 IKBKE 的表达与结直肠癌患者的性别、年龄及肿瘤浸润深度无关 ($P > 0.05$), 与分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。结直肠癌组织中 FOXO3 的表达与结直肠癌患者的性别、年龄及肿瘤浸润深度无关 ($P > 0.05$), 与分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移相关 ($P < 0.05$)。IKBKE 与 FOXO3 表达呈负相关 ($P < 0.01, r = -0.41$)。生存曲线及 Cox 回归模型显示, IKBKE 与 FOXO3 作为结直肠癌患者的独立预后危险因素均不确切 ($P > 0.05$)。**结论** 联合检测 IKBKE 和 FOXO3 在结直肠癌组织中的表达, 有助于判断结直肠癌的恶性程度及转移潜能。

[关键词] 结直肠肿瘤; 核因子 κ B 激酶亚单位 ϵ 抑制剂; 叉头框蛋白 O3**[中图分类号]** R735.37**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)07-1110-04

Expression of IKBKE and FOXO3 in colorectal cancer and their clinicopathological significances

ZHANG Cui ping, ZOU Jiarui, XIE Shuishan, ZU Sha, HAO Junmei[△]

(Department of Pathology, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264100, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of nuclear factor- κ B kinase subunit ϵ inhibitor (IKBKE) and forkhead box protein O3 (FOXO3) in colorectal cancer tissue, and to explore their correlation with clinicopathological features and survival prognosis. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of IKBKE and FOXO3 in 79 patients with colorectal cancer from January 2013 to January 2014 in this hospital, for analysis of their clinical significances. **Results** The expression of IKBKE was not correlated with gender, age or depth of tumor invasion in patients with colorectal cancer ($P > 0.05$), and associated with differentiation, TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of FOXO3 was not correlated with gender, age or depth of tumor invasion in patients with colorectal cancer ($P > 0.05$), and associated with differentiation, TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$). There was a negative correlation between IKBKE and FOXO3 expression ($P < 0.01, r = -0.41$). Survival curve and Cox regression model showed that IKBKE and FOXO3 were not accurate as independent prognostic risk factors for colorectal cancer patients ($P > 0.05$). **Conclusion** Combined detection of expressions of IKBKE and FOXO3 in colorectal cancer tissue is helpful to determine the malignant degree and metastatic potential of colorectal cancer.

[Key words] colorectal neoplasms; nuclear factor kappa B kinase subunit ϵ inhibitor; forkhead box protein O3

结直肠癌在消化道恶性肿瘤中发病率较高, 居第三位, 病死率居第五位^[1]。因此, 提高结直肠癌的治愈率, 降低病死率, 寻找有效的生物学靶点显得尤为重要。核因子 κ B 激酶亚单位 ϵ 抑制剂 (IKBKE) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可通过多种信号通路抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。已有多项研究表明^[2-4],

IKBKE 参与了乳腺癌、肺癌、卵巢癌等的发生。因此, IKBKE 可能作为抗癌治疗的潜在药物靶点。叉头框蛋白 O3 (forkhead box protein O3, FOXO3) 作为叉头转录因子家族中的重要成员是一种抑癌因子, 其缺失或突变可导致多种恶性肿瘤的发生^[5-6]。有研究证明^[7], IKBKE 可通过直接和间接的方式调节

FOXO3,促进肿瘤的发生及发展。本文旨在研究人结直肠癌中 IKBKE 与 FOXO3 的表达情况,探讨其表达与临床病理特征及生存预后的关系,为结直肠癌患者的诊断与治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般材料

收集本院 2013 年 1 月至 2014 年 1 月手术切除的结直肠癌组织蜡块标本共 79 例,其中男 44 例,女 35 例;≤60 岁 20 例,>60 岁 59 例;肿瘤浸润深度 T₁~T₂ 14 例,T₃~T₄ 65 例;高-中分化 45 例,低分化 34 例;无淋巴结转移 40 例,有淋巴结转移 39 例;根据 AJCC 第八版肿瘤 TNM 分期,I~II 期 40 例,III~IV 期 39 例。所有患者均已同意入组,研究方案获滨州医学院烟台附属医院医学伦理委员会通过(20190726001)。

1.2 方法

1.2.1 试剂

兔抗 IKBKE 多克隆抗体(编号:D222536,上海生工生物工程有限公司)、兔抗 FOXO3 多克隆抗体(编号:D260364,上海生工生物工程有限公司)、即用型二抗及免疫组织化学染色相关试剂盒(丹麦 DAKO 公司)。

1.2.2 免疫组织化学染色方法及评分标准

取结直肠癌组织,用 4% 中性多聚甲醛进行固定、脱水、石蜡包埋后连续切片。脱蜡水化,用 DAKO 全自动免疫组织化学机进行染色,将切片放入自动抗原修复仪脱蜡,加 EDTA 碱性修复(95 °C 20 min),Buffer 清洗液浸泡缸中 5~15 min,滴加阻断剂室温孵育 20 min,Buffer 清洗液冲洗,滴加一抗(IKBKE 工作浓度 1:80,FOXO3 工作浓度 1:150),室温孵育 20 min,Buffer 清洗液冲洗,滴加即用型酶标二抗室温孵育 20 min,最后 Buffer 清洗液冲洗,滴加 DAB 显色(5 s)。免疫组织化学切片不同区域染色强度评分标准^[8]:阴性(无着色)为 1 分,弱阳性(淡黄色)为 2 分,中等程度阳性(棕黄色)为 3 分,强阳性(棕褐色)为 4 分;并于物镜下判断不同染色强度区域占整个切片面积的百分比,将不同区域染色强度的分值与其所占面积的百分比相乘,得出的数值即为切片总分,1~200 为低表达,201~400 为高表达。所有免疫组织化学评分均采用双盲法由病理科两位主治医师完成。

1.3 统计学处理

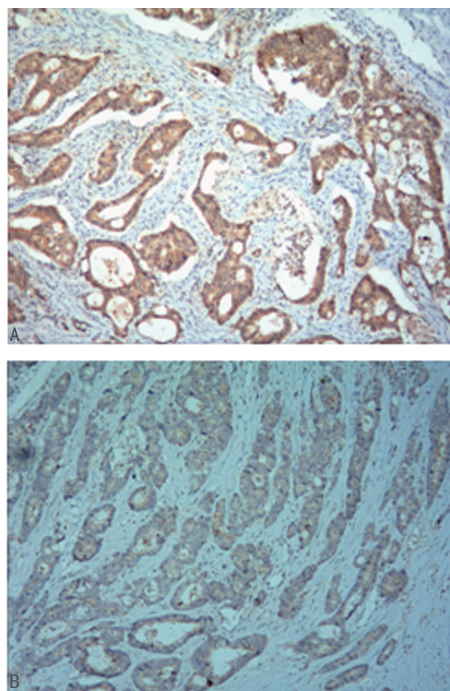
采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计数资料以例数和率表示,采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关性检验;IKBKE 及 FOXO3 与结直肠癌患者生存预后的关系采用 Log-rank 检验;Cox 回归模型进行多因素分析独立危险因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IKBKE 与结直肠癌患者临床病理特征的关系

IKBKE 表达于细胞质及细胞核,IKBKE 高表达

54 例(68.35%),低表达 25 例(31.65%),见图 1。



A:高表达;B:低表达。

图 1 IKBKE 在结直肠癌中的表达(EnVision 法×100)

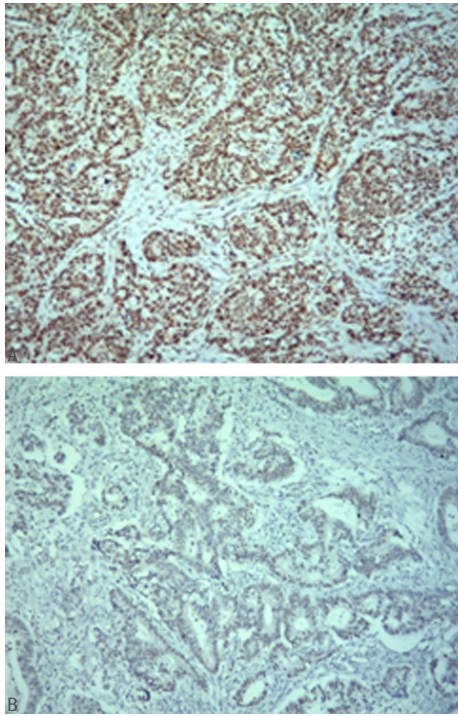
IKBKE 的表达与结直肠癌患者的性别、年龄及肿瘤浸润深度无关($P > 0.05$),与分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移相关($P < 0.05$),见表 1。

表 1 IKBKE 与结直肠癌患者临床病理特征的关系[n(%)]

临床病理资料	IKBKE 低表达组 (n=25)	IKBKE 高表达组 (n=54)	χ^2	P
性别			0.25	1.20
男	15(60.00)	29(53.70)		
女	10(40.00)	25(46.30)		
年龄(岁)			1.76	0.35
≤60	8(32.00)	12(22.22)		
>60	17(68.00)	42(77.78)		
肿瘤浸润深度			0.16	0.79
T ₁ ~T ₂	4(16.00)	10(18.52)		
T ₃ ~T ₄	21(84.00)	44(81.48)		
分化程度			5.75	0.02
高-中分化	19(76.00)	26(48.15)		
低分化	6(24.00)	28(51.85)		
TNM 分期			8.98	<0.01
I~II	18(72.00)	22(40.74)		
III~IV	7(28.00)	32(59.26)		
淋巴结转移			8.98	<0.01
无	18(72.00)	22(40.74)		
有	7(28.00)	32(59.26)		

2.2 FOXO3 与结直肠癌患者临床病理特征的关系

FOXO3 表达于细胞核, FOXO3 高表达 53 例 (67.09%), 低表达 26 例 (32.91%), 见图 2。



A: 高表达; B: 低表达。

图 2 FOXO3 在结直肠癌中的表达 (EnVision 法 $\times 100$)

FOXO3 的表达与结直肠癌患者的性别、年龄及肿瘤浸润深度无关 ($P > 0.05$), 与分化程度、TNM 分期及有无淋巴结转移相关 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 FOXO3 与结直肠癌患者临床病理特征的关系 [n (%)]

临床病理资料	FOXO3 低表达组 (n=53)	FOXO3 高表达组 (n=26)	χ^2	P
性别			0.05	1.63
男	30 (56.60)	14 (53.85)		
女	23 (43.40)	12 (46.15)		
年龄(岁)			3.54	0.06
≤ 60	10 (18.87)	10 (38.46)		
> 60	43 (81.13)	16 (61.54)		
肿瘤浸润深度			0.08	0.81
$T_1 \sim T_2$	9 (16.98)	5 (19.23)		
$T_3 \sim T_4$	44 (83.02)	21 (80.77)		
分化程度			5.45	< 0.01
高-中分化	25 (47.17)	21 (80.77)		
低分化	28 (52.83)	5 (19.23)		
TNM 分期			4.27	0.02
I ~ II	22 (41.51)	18 (69.23)		
III ~ IV	31 (58.49)	8 (30.77)		
淋巴结转移			4.27	0.02
无	22 (41.51)	18 (69.23)		
有	31 (58.49)	8 (30.77)		

2.3 IKBKE 与 FOXO3 的关系

结直肠癌中 IKBKE 与 FOXO3 表达呈负相关 ($P < 0.01$, $r = -0.41$), 见表 3。

表 3 IKBKE 与 FOXO3 表达的相关性

IKBKE	FOXO3		P	r
	低表达	高表达		
低表达	8	17	< 0.01	-0.41
高表达	45	9		

2.4 IKBKE、FOXO3 表达与结直肠癌患者预后的关系

2.4.1 生存曲线

结直肠癌组织中 IKBKE 高表达组 5 年生存率为 59.26% (32/54), 低表达组 5 年生存率为 60.00% (17/25), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.52$, $P = 0.47$), 见图 3; 结直肠癌组织中 FOXO3 高表达组 5 年生存率为 62.26% (33/53), 低表达组 5 年生存率为 61.54% (16/26), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.01$, $P = 0.94$), 见图 4。

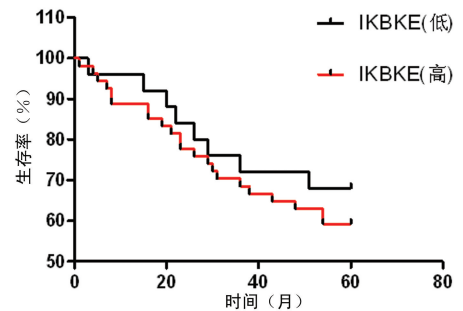


图 3 IKBKE 表达与结直肠癌患者的预后生存曲线

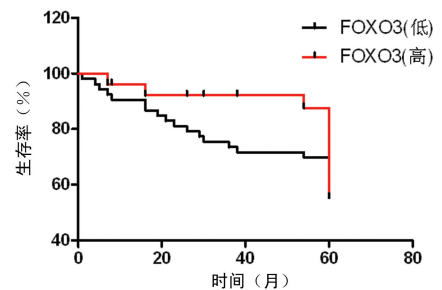


图 4 FOXO3 表达与结直肠癌患者的预后生存曲线

2.4.2 Cox 回归模型分析

IKBKE、FOXO3 均不是结直肠癌患者预后的独立危险因素 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 Cox 回归模型分析结直肠癌患者预后与 IKBKE、FOXO3 表达的相关性

因素	总生存率		
	HR	95%CI	P
IKBKE(高 vs. 低)	0.94	0.52~1.61	0.76
FOXO3(高 vs. 低)	0.13	0.59~1.81	0.91

3 讨论

IKBKE 作为先天免疫的关键调节因子, 可参与

炎症反应、免疫反应及肿瘤的形成。IKBKE 导致肿瘤发生的机制大致可归纳为:(1)IKBKE 可通过各种途径激活转录因子 NF- κ B,如 IKBKE 可磷酸化 I κ B-Ser36,进而诱导 NF- κ B 核积累和 DNA 结合活性,启动细胞生长/存活基因,如 cyclinD1、Bcl-XL 和 Bcl-2 的转录^[7];IKBKE 通过激活 T 细胞受体、佛波醇 12-myristate 13-acetate 及干扰素等,进而激活 NF- κ B^[9]。(2)IKBKE 可通过增加 Hippo 途径下游因子 Yes 相关蛋白 1(YAP1)和 TEA 结构域家族成员 2(TEAD2)的表达^[10],诱导上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)^[11]。(3)IKBKE 可通过直接或间接的方式抑制 FOXO3 的转录^[11]。

本研究通过对结直肠癌组织中 IKBKE 的表达与患者临床病理特征的分析显示,IKBKE 表达增高与结直肠癌的分化程度、TNM 分期、有无淋巴结转移相关($P < 0.05$),提示 IKBKE 具有促进结直肠癌侵袭和转移的作用。生存曲线及 Cox 回归模型分析结果显示,IKBKE 高表达组患者与低表达组患者预后差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 IKBKE 作为结直肠癌患者预后的独立危险因素不确切。分析原因如下:随着结直肠癌分子研究的不断进步及结直肠癌患者的个性化治疗方案的定制^[12],明显改善了结直肠癌的治疗效果;其次,本研究样本量较小,容易造成结果的偏倚。

FOXO3 作为一个已知的抑癌基因,靶基因包括诱导细胞凋亡的 Bim 和 FasL,用于细胞周期调控的 p27 kip1 和细胞周期蛋白 D 等^[13]。本研究通过对结直肠癌组织中 FOXO3 的表达与患者临床病理特征的分析显示,FOXO3 表达与结直肠癌的分化程度、TNM 分期、有无淋巴结转移相关($P < 0.05$)。BULLOCK 等^[14]研究结果表明,在结直肠癌中 FOXO3 能明显抑制肿瘤的发生,并且与其分期、转移和预后相关。然而本研究通过进一步的生存曲线及 Cox 回归模型分析显示,FOXO3 高表达组患者与低表达组患者预后相比差异不大($P > 0.05$),提示 FOXO3 作为结直肠癌患者预后的独立危险因素亦不确切,与上述文献报道不一致。

IKBKE 作为 FOXO3 的上游基因,可以直接或间接的抑制 FOXO3 的转录。其主要作用机制:(1)IKBKE 可激活 AKT,继而通过丝氨酸 32 位点(Ser32)、丝氨酸 253 位点(Ser253)和丝氨酸 315 位点(Ser315)的磷酸化抑制 FOXO3 的转录功能^[15];(2)IKBKE 可以直接通过丝氨酸 644 位点(Ser644)磷酸化导致 FOXO3a 细胞核-细胞质异位,IKBKE 还可以直接抑制 FOXO3a 和 FOXO3a-A3 的 DNA 结合活性^[7];(3)IKBKE 可以通过调控 PI3K-AKT 信号传导进而抑制 FOXO3 及 β -catenin 的表达^[13]。本研究显示,IKBKE 与 FOXO3 表达呈负相关($P < 0.01, r = -0.41$),提示 IKBKE 和 FOXO3 可能共同参与了结直肠癌的发

生,IKBKE 的上调及 FOXO3 的下调是导致结直肠癌发生及转移的重要分子机制,与上述文献报道一致。

然而,本文有一些不足之处,研究是一个相对较小样本的回顾性研究,容易造成结果的偏倚,还需要同一标准下的大样本病例研究进一步验证;本研究未进行健康人群的样本研究,故无法确定研究结果是否可以作为更好的预测指标。

综上所述,IKBKE、FOXO3 与结直肠癌的发生、发展及转移有关。下一步将进一步加大样本量,把研究的重点放在二者相互作用的机制及与患者生存预后的研究。

参考文献

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.
- [2] BARBIE T U, ALEXE G, AREF A R, et al. Targeting an IKBKE cytokine network impairs triple-negative breast cancer growth[J]. J Clin Invest,2014,124(12):5411-5423.
- [3] GUO J, KIM D, GAO J, et al. IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer[J]. Oncogene,2013,32(2):151-159.
- [4] 成开花. IKK ϵ 在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 江苏医药,2014,40(1):63-66.
- [5] PARK S H, JANG K Y, MIN J K, et al. Tumor suppressive effect of PARP1 and FOXO3A in gastric cancers and its clinical implications[J]. Oncotarget,2015,6(42):44819-44831.
- [6] 张庚艳,陈余清. FOXO3 基因与肿瘤的研究进展[J]. 临床肺科杂志,2017(5):151-154.
- [7] GUO J P, TIAN W, SHU S K, et al. IKBKE phosphorylation and inhibition of FOXO3a: a mechanism of IKBKE oncogenic function[J]. PLoS One,2013,8(5):e63636.
- [8] HIRSCH FR, VARELLA-GARCIA M, BUNN PA, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis[J]. J Clin Oncol,2003,21(20):3798-3807.
- [9] WENJING Y, YAN Q, BINGXU T, et al. Prognostic significance of preoperative IKBKE expression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Onco Targets Ther,2018,11:1305-1314.
- [10] ZHANG Z, LU J, GUO G, et al. IKBKE promotes glioblastoma progression(下转第 1117 页)

- 策[J]. 养生保健指南(医药研究), 2015(15): 127.
- [2] KIM K B, YOON S M, YOUN S J. Endoscopy for nonvariceal upper gastrointestinal bleeding [J]. *Clin Endosc*, 2014, 47(4): 315-319.
- [3] HOLSTER I L, KUIPERS E J. Management of acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: current policies and future perspectives[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(11): 1202-1207.
- [4] 鲁昌辉, 朱庆伟, 葛广德, 等. 中西医结合治疗幽门螺杆菌相关性消化性溃疡临床疗效观察[J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(3): 724-725.
- [5] 杨智慧. 埃索美拉唑三联疗法根除幽门螺杆菌对消化性溃疡的疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(27): 3030-3031.
- [6] 周文斌, 李志英. 上消化道疾病患者幽门螺杆菌感染情况分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(5): 962-963.
- [7] 杜华英, 吕宏. 消化性溃疡 2 387 例胃镜分析[J]. *中华消化内镜杂志*, 2001, 18(1): 30-31.
- [8] 刘达云, 高安宁, 唐国都, 等. 南宁市消化性溃疡发病与气象因子的关系[J]. *世界华人消化杂志*, 2002, 10(1): 48-52.
- [9] 董秋萍, 罗兵, 郭爱军, 等. 3 种上消化道疾病中幽门螺杆菌感染率的检测及分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(2): 208-210.
- [10] SAVARINO V, MELA G S, ZENTILIN P, et al. Are duodenal ulcer seasonal fluctuations paralleled by seasonal changes in 24-hour gastric acidity and *Helicobacter pylori* infection [J]. *J Clin Gastroenterol*, 1996, 22(3): 178-181.
- [11] 王天骄, 高绥之, 夏士博, 等. 季节变化对消化性溃疡内镜检出率的影响: 一项单中心 10 年内镜数据回顾研究[J]. *中华消化内镜杂志*, 2016, 33(5): 291-295.
- [12] 顾廷, 黄一沁, 于晓峰, 等. 老年消化性溃疡复发相关因素分析[J]. *中华消化杂志*, 2016, 36(6): 388-390.
- [13] 张琴, 吕鸣, 杨龙, 等. 幽门螺杆菌感染与老年人上消化道疾病的关系[J]. *中华消化杂志*, 2005, 25(11): 697-697.
- [14] 林德仿, 陈伟, 韦洪江, 等. 中老年患者消化性溃疡复发相关因素临床分析[J]. *岭南急诊医学杂志*, 2016, 21(4): 399-400.
- [15] 刘军平, 殷玉敏, 陈浩, 等. 老年消化性溃疡伴焦虑、抑郁多因素分析[J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(12): 69-72.

(收稿日期: 2019-11-18 修回日期: 2020-02-21)

(上接第 1113 页)

- by establishing the regulatory feedback loop of IKBKE/YAP1/miR-Let-7b/i[J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(7): 101042831770557.
- [11] LU J, YANG Y, GUO G, et al. IKBKE regulates cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human malignant glioma via the Hippo pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49502-49514.
- [12] 卢海欣, 黄志辉, 陈佳雅, 等. 结直肠癌化疗增敏性研究进展[J]. *国际外科学杂志*, 2015, 42(11): 789-792.
- [13] TENBAUM S P, ORDONEZ-MORAN P, PUIG I, et al. β -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer[J]. *Nat Med*, 2012, 18(6): 892-901.
- [14] BULLOCK M D, BRUCE A, SREEKUMAR R, et al. FOXO3 expression during colorectal cancer progression: biomarker potential reflects a tumor suppressor role[J]. *Brit J Cancer*, 2013, 109(2): 387-394.
- [15] QI W, WEBER C R, WASLAND K, et al. Tumor suppressor FOXO3 mediates signals from the EGF receptor to regulate proliferation of colonic cells [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(2): 264-272.

(收稿日期: 2019-11-18 修回日期: 2020-02-09)