

FOXC1、CXCR4 和 MMP-7 在肺腺癌组织中的表达及临床意义

葛红艳¹, 张正卫^{2△}

(南京医科大学附属淮安第一医院:1. 检验科;2. 病理科, 江苏淮安 223001)

摘要:目的 研究叉头盒蛋白 C1(FOXC1)、趋化因子受体 4(CXCR4)以及基质金属蛋白酶 7(MMP-7)在肺腺癌组织中的表达及意义。方法 采用免疫组织化学法检测肿瘤组织和癌旁组织中 FOXC1、CXCR4 和 MMP-7 蛋白的表达情况,并分析其与临床病理参数、患者预后的关系。结果 肿瘤组织中 FOXC1、CXCR4 及 MMP-7 的阳性表达率分别为 67.4%、55.8% 和 53.2%,均明显高于相应癌旁组织(分别为 11.6%、14% 和 10.5%),差异均有统计学意义($P < 0.05$);FOXC1、CXCR4 和 MMP-7 蛋白在肺腺癌中的表达与 EGFR 状态、淋巴结转移及 TNM 分期均相关($P < 0.05$),而与性别、年龄不相关($P > 0.05$),生存分析显示,FOXC1 表达阳性患者的累计生存率为 5.2%,低于 FOXC1 表达阴性患者的 58.3%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肺腺癌组织中 FOXC1 表达与 CXCR4 和 MMP-7 均存在正相关关系($P < 0.05$)。结论 FOXC1、CXCR4 和 MMP-7 在肺腺癌组织中具有异常高表达的特性,三者可能参与了肺腺癌的发生、发展、转移及浸润过程,可以为肺腺癌的临床诊断和预后提供了新的参考依据。

关键词:叉头盒蛋白 C1; 肺腺癌; 转移; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.18.018

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2019)18-2246-05

文献标识码:A

Expression and clinical significance of FOXC1, CXCR4 and MMP-7 in lung adenocarcinoma tissue

GE Hongyan¹, ZHANG Zhengwei^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pathology, the Affiliated Huaian No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huaian, Jiangsu 223001, China)

Abstract: **Objective** To study the expression and clinical significance of Forkhead box C1(FOXC1), c-x-c chemokine receptor 4(CXCR4) and matrix metalloproteinase 7(MMP-7) in lung adenocarcinoma tissue. **Methods** Immunohistochemistry method was used to detect the expression of FOXC1, CXCR4 and MMP-7 in 86 pairs of lung adenocarcinoma tissues and paracancerous tissues, then the relationships between the expression of FOXC1, CXCR4 and MMP-7 and clinicopathological parameters or prognosis were also analyzed. **Results** The positive rates of FOXC1, CXCR4 and MMP-7 in lung adenocarcinoma tissues were 67.4%, 55.8% and 53.2% respectively, which were significant higher than those (11.6%, 14% and 10.5% respectively) in the adjacent tissues, the expression of FOXC1, CXCR4 and MMP-7 were all correlated with positive EGFR status, large tumor size, positive lymph node metastasis and high TNM staging, the differences had statistical significance($P < 0.05$). Follow-up was conducted for 86 cases of patients with lung adenocarcinoma, The cumulative survival rate of the patients with FOXC1 negative expression was 58.3%, higher than patients with FOXC1 positive expression 5.2% ($P < 0.05$). The expression of FOXC1 was positively correlated with CXCR4 and MMP-7 ($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression of FOXC1, CXCR4 and MMP-7 might be involved in the occurrence and development of lung adenocarcinoma, metastasis and invasion process, and the expression level of FOXC1 could be used as biological indicator of prognosis.

Key words: forkhead box C1; lung adenocarcinoma; metastasis; prognosis

肺癌是严重危害人类健康的呼吸系统恶性肿瘤,随着工业的不断发展和环境污染问题的日益恶化,肺癌的发病率在世界范围内呈不断上升趋势;肺腺癌发

病率较其他类型肺癌发病率低,肿块生长缓慢,更容易漏诊,大多数患者被诊断时已经为进展期肺腺癌,往往失去了根治性手术的机会^[1-2]。近年来,除了不

作者简介:葛红艳,女,技师,主要从事肿瘤相关机制的研究。△ **通信作者,** E-mail: zzwblk@163.com。

本文引用格式:葛红艳,张正卫. FOXC1、CXCR4 和 MMP-7 在肺腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(18): 2246-2250.

断完善肺癌患者的治疗外,寻求有效指导临床诊断的肿瘤标志物也成了肺腺癌研究的热点。本文分析了 FOXC1,CXCR4 及 MMP-7 在肺腺癌组织中的表达及意义,以期对肺腺癌病情严重程度的评估及预后判断提供参考资料。

1 资料与方法

1.1 一般资料 包含 94 对肺腺癌组织及对应癌旁组织的芯片购自上海芯超科技有限公司,有完整的临床、病理资料,标本来源的患者男 51 例、女 43 例,年龄 30~84 岁,平均(62.2±9.9)岁,无淋巴结转移者 41 例,有淋巴结转移者 53 例。根据第 8 版 TNM 分期标准,I 期 31 例、II 期 24 例、III 期 38 例、IV 期 1 例,手术时间 2004 年 7 月至 2009 年 6 月,随访 5~10 年,患者术前均未经过化学治疗和放射治疗。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 仪器: CX31 奥林巴斯摄影显微镜(日本 Olympus 公司)。试剂: 兔抗人 FOXC1 抗体(稀释倍数 1:100)、CXCR4 抗体(稀释倍数 1:100)、MMP-7(稀释倍数 1:100)和鼠抗兔二抗均购于 Sigma 公司,免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 检测方法 芯片经 65℃烤片 20 min 后,使用二甲苯脱蜡,并用梯度乙醇脱水,经过 5%的过氧化氢浸润,放置于 37℃湿盒中孵育 20 min;经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后放置于 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 值为 6.0)中煮沸,自然冷却 1 h 用于抗原修复,使用羊血清工作液封闭非特异性抗原,滴加一抗置于 4℃冷库中孵育过夜(每次实验均用已知阳性片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照),滴加生物素标记二抗,37℃孵育 30 min;再滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉素卵白素,37℃孵育 1 h,滴加二氨基联苯胺(DAB)显色。结果判读:采用评分法,将染色强度和阳性细胞百分数结合进行评分。染色强度基本不着色计为 0 分,淡黄色计为 1 分,棕黄色计为 2 分,黄褐色计为 3 分。组织芯片置于显微镜下计数 200 个细胞,阳性细胞百分数<10%计为 0 分;10%~40%计为 1 分;40%~70%计为 2 分;>70%计为 3 分。两者相加 0~2 分评为阴性;3~6 分为阳性^[3]。所有免疫组化染色结果均采用双盲法进行病

理读片。

1.3 观察指标 (1)比较肿瘤组织和癌旁组织 FOXC1,CXCR4 和 MMP-7 蛋白阳性率;(2)分析肺癌患者 FOXC1,CXCR4 和 MMP-7 蛋白阳性率与其病理参数(性别、年龄、EGFR 状态、肿瘤直径、TNM 分期)、转移(淋巴结转移)的关系及三个指标间的相关性;(3)分析肺癌患者 FOXC1 蛋白阳性率与患者预后的关系。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件处理数据,组织蛋白表达与患者临床病理参数分析采用 Pearson 卡方检验进行分析,蛋白之间相关性采用 Spearman 等级相关分析,使用 Kaplan-Meier 法评估患者累积生存期,组间生存期的比较采用 Log-Rank 法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织和癌旁组织 FOXC1 蛋白、CXCR4 蛋白和 MMP-7 蛋白阳性率情况比较 FOXC1、CXCR4 和 MMP-7 在肺腺癌组织中的阳性表达率(分别为 67.4%、55.8%和 53.2%)明显高于相应癌旁组织(分别为 11.6%、14.0%和 10.5%),差异有统计学意义($P<0.001$),见表 1、图 1。

表 1 FOXC1 蛋白、CXCR4 蛋白和 MMP-7 蛋白阳性表达的比较[n(%)]

分组	FOXC1 阳性	CXCR4 阳性	MMP-7 阳性
肿瘤组	58(67.4)	48(55.8)	50(53.2)
癌旁组	10(11.6)	12(14.0)	9(10.5)
χ^2	56.036	33.171	43.368
P	<0.001	<0.001	<0.001

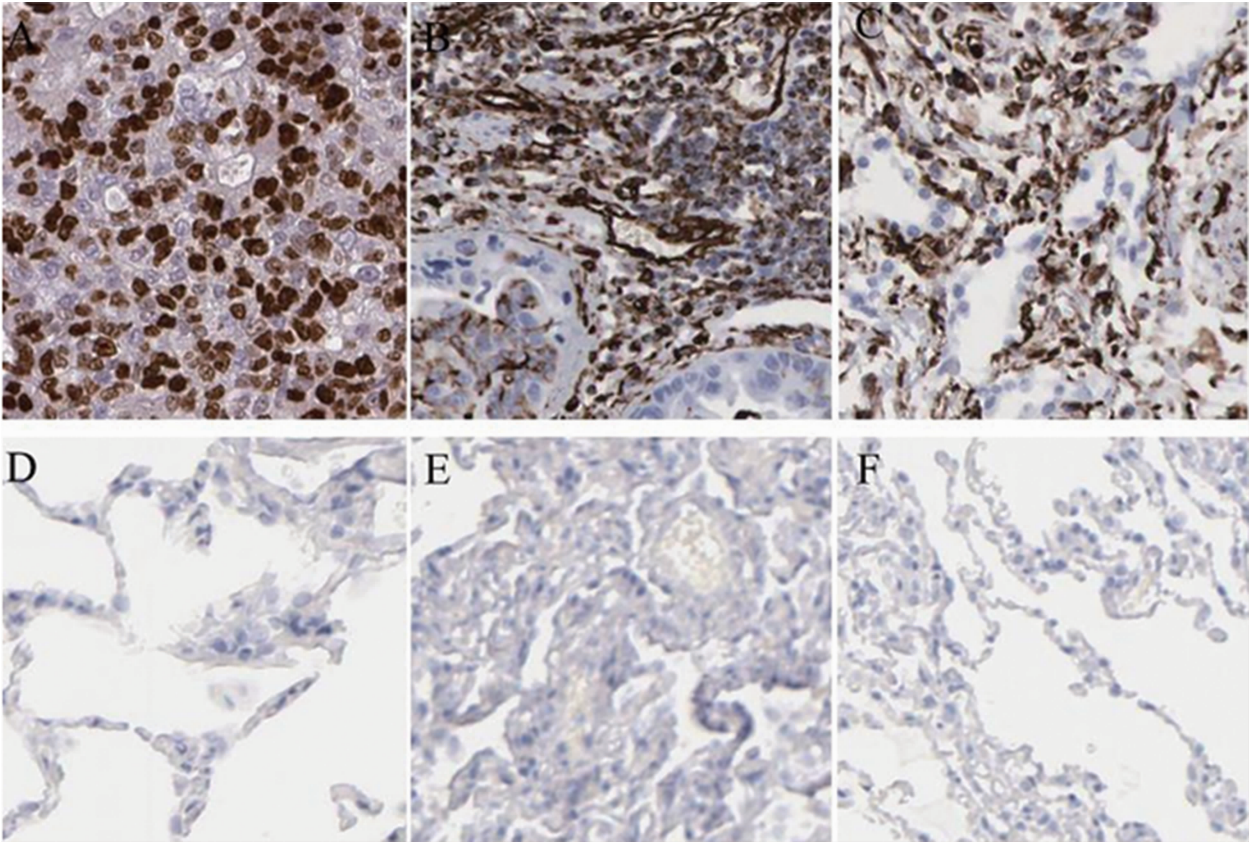
2.2 肺腺癌组织中 FOXC1、CXCR4、MMP-7 表达与临床病理特征关系分析 EGFR 阳性、肿瘤直径 T₃~T₄、淋巴结转移阳性和 TNM 分期 III~IV 期患者的 FOXC1 阳性率更高($P<0.05$);EGFR 阳性、淋巴结转移阳性和 TNM 分期 III~IV 期患者的 CXCR4 和 MMP-7 阳性率更高($P<0.05$);FOXC1 的阳性率与患者的性别、年龄无关,CXCR4 的阳性率与患者的性别、年龄和肿瘤直径无关,MMP-7 的阳性率与患者的年龄、肿瘤直径无关($P>0.05$)。见表 2。

表 2 不同临床病理参数的患者 FOXC1、CXCR4、MMP-7 阳性率的比较[n(%)]

分组	n	FOXC1		CXCR4		MMP-7	
		阳性	P	阳性	P	阳性	P
性别			0.821		0.101		<0.001
男	51	32(62.7)		30(58.8)		36(70.6)	
女	43	26(60.5)		18(41.9)		14(32.6)	
年龄			0.114		0.859		0.908

表 2 不同临床病理参数的患者 FOXC1、CXCR4、MMP-7 阳性率的比较[n(%)]

分组	n	FOXC1		CXCR4		MMP-7	
		阳性	P	阳性	P	阳性	P
≥65 岁	40	21(52. 5)		20(50. 0)		21(52. 5)	
<65 岁	54	37(68. 5)		28(51. 9)		29(53. 7)	
EGFR			<0. 001		0. 012		0. 02
阴性	76	40(52. 6)		34(44. 7)		36(47. 4)	
阳性	18	18(100. 0)		14(77. 8)		14(77. 8)	
肿瘤直径			0. 018		0. 279		0. 184
T ₁ ~T ₂	71	39(54. 9)		34(47. 9)		35(49. 3)	
T ₃ ~T ₄	23	19(82. 6)		14(60. 9)		15(65. 2)	
淋巴结转移			<0. 001		<0. 001		<0. 001
N0	41	8(19. 5)		11(39. 5)		9(22. 0)	
N1~N3	53	50(94. 3)		37(45. 9)		41(77. 4)	
TNM 分期			<0. 001		<0. 001		<0. 001
I ~ II	55	20(36. 4)		19(34. 5)		19(34. 5)	
III ~ IV	39	38(97. 4)		29(74. 4)		31(79. 5)	



注:A 为 FOXC1 蛋白在肺腺癌组织中的表达(SP ×200);D 为 FOXC1 蛋白在癌旁组织中的表达(SP ×200);B 为 CXCR4 蛋白在肺腺癌组织中的表达(SP ×200);E 为 CXCR4 蛋白在癌旁组织中的表达(SP ×200);C 为 MMP-7 蛋白在肺腺癌组织中的表达(SP ×200);F 为 MMP-7 蛋白在癌旁组织中的表达(SP ×200)

图 1 FOXC1 蛋白、CXCR4 蛋白和 MMP-7 蛋白在不同组织中的表达

2.3 FOXC1 表达情况与肺腺癌患者预后情况分析
对 94 例肺腺癌患者进行预后随访,肺腺癌组中的 FOXC1 蛋白表达阳性患者的累积生存率为 5.2%(3/52),低于 FOXC1 表达阴性患者的 58.3%(21/36),

差异有统计学意义($\chi^2=28.57,P<0.001$),见图 2。单因素分析见表 3。此外,多因素 Cox 回归分析显示,肺腺癌组织中 FOXC1 的表达是肺腺癌预后不良的独立危险因素[相对风险比(RR)=4.351,95%

CI:2.417~7.834, $P<0.001$]

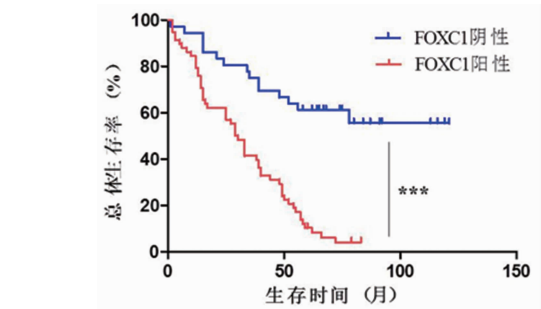


图2 FOXC1 蛋白不同表达患者的生存函数图

表3 肺腺癌患者预后因素的单因素分析

参数	RR	95% CI	P
年龄	1.401	0.857~2.289	0.179
性别	1.359	0.832~2.220	0.221
肿瘤大小	1.083	0.604~1.942	0.789
淋巴结转移	0.868	0.447~1.686	0.676
TNM 分期	1.455	0.777~2.724	0.241
FOXC1 表达	4.104	1.892~8.901	<0.001

注:RR 表示相对风险比

2.4 肺腺癌组织中 FOXC1 蛋白、CXCR4 蛋白和 MMP-7 蛋白表达之间的相关性分析 采用 Spearman 等级分析方法对 FOXC1 蛋白、CXCR4 蛋白和 MMP-7 蛋白表达之间的相关性进行分析,结果显示,FOXC1 与 CXCR4 和 MMP-7 均呈正相关,差异有统计学意义($r=0.455、0.577,P<0.001$)。

3 讨 论

人类叉头盒(FOX)基因家族共有一个进化上保守的“叉头”或“翼-螺旋”DNA 结合域,由 40 多个进化上保守的转录调节因子组成。FOX 蛋白在多种生理病理过程如细胞增殖、分化和凋亡中起到重要作用^[2],并且 FOX 蛋白的失调与发育障碍或肿瘤密切相关^[4]。FOXC1 是 FOX 转录因子家族的成员,之前已有研究报道 FOXC1 在乳腺癌、肝癌、胃癌的发生、发展中起到重要作用^[5-7],比如 FOXC1 可以通过调节 MMP7 促进基底样乳腺癌(BLBC)的侵袭性并且可以作为 BLBC 预后不良的标志物。本研究结果也显示,肺腺癌组织中 FOXC1 的表达明显高于癌旁组织,表明 FOXC1 可能参与肺腺癌的发生,其异常高表达可能导致肺腺癌组织上皮细胞过度增殖或突变,从而形成肿瘤。肺腺癌中 FOXC1 的表达与肿瘤的直径相关,肿瘤组织中 FOXC1 表达越高,肿瘤直径越大,结合以往报道 FOXC1 在子宫内膜癌和宫颈癌中促进肿瘤细胞增殖^[8-9],推测 FOXC1 也同样与肺腺癌增殖相关;FOXC1 的表达越高,肿瘤越趋于淋巴结转移,同时 FOXC1 与转移相关蛋白 CXCR4 和 MMP-7 呈正相关,结合以往报道 FOXC1 在多种肿瘤如食管癌、胰腺癌和胃癌中促进肿瘤转移^[2,7,10],FOXC1 可

能也具有促进肺腺癌细胞转移的功能;FOXC1 的表达越高,TNM 分期越高,以上结果提示 FOXC1 促进了肺腺癌的发展。

虽然近年来肺腺癌患者总体生存时间不断提高,但是在接受标准化治疗后,部分肺腺癌患者仍然会发生局部复发和远处转移,直接影响了患者的寿命,这突出了肺腺癌患者预后评估的重要性。生存分析结果表明,FOXC1 高表达的肺腺癌患者总体生存率较 FOXC1 低表达患者明显缩短。肺腺癌组织中 FOXC1 的表达是患者总体生存率的独立危险因素,提示 FOXC1 在肺腺癌中同样可以作为预后标志物,其高表达提示肺腺癌患者预后不良。

CXCR4 属于跨膜 G 蛋白偶联受体,同时也是基质衍生因子-1 的天然受体(SDF-1)^[11-12],在包括非小细胞肺癌、胃癌、乳腺癌和结肠癌在内的多种肿瘤中高表达^[13-16],CXCR4 促进上皮间质转化(EMT)过程,在肿瘤转移中起到重要作用^[17-19],基质金属蛋白酶(MMPs)属于锌依赖性同源蛋白酶家族,能够降解大多数细胞外基质(ECMs)。作为 MMPs 重要成员,MMP-7 同样具有基质蛋白酶功能,在肿瘤迁移中起到关键的作用^[20-21]。本研究发现,CXCR4 和 MMP-7 在肺腺癌组织中高表达,并且 FOXC1 的表达与 CXCR4 和 MMP-7 均呈正相关,结合以往报道,推测 FOXC1 可能通过调控 CXCR4 和 MMP-7 促进肺腺癌的发生发展,但是肺腺癌中三者是否存在调控关系需要进一步实验验证。

4 结 论

肺腺癌组织中 FOXC1 蛋白、CXCR4 蛋白和 MMP-7 蛋白表达水平高于癌旁组织,且其表达水平与患者临床病理参数及转移存在密切关系,FOXC1 可以作为肺腺癌患者预后不良的标志物,临床可将其作为治疗靶点开展进一步研究。

参考文献

[1] LAM E W,BROSENS J J,GOMES A R,et al. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony [J]. Nat Rev Cancer,2013,13(7):482-495.

[2] ZHU X,WEI L,BAI Y,et al. FoxC1 promotes epithelial-mesenchymal transition through PBX1 dependent transactivation of ZEB2 in esophageal cancer[J]. Am J Cancer Res,2017,7(8):1642-1653.

[3] YOO Y,KONG G,LEE M. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1alpha protein by recruiting histone deacetylase 1[J]. EMBO J, 2006,25(6):1231-1241.

[4] LEHMANN O J,SOWDEN J C,CARLSSON P,et al. Fox's in development and disease [J]. Trends Genet, 2003,19(6):339-344.

[5] 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.
- [6] YU C, WANG M, LI Z, et al. MicroRNA-138-5p regulates pancreatic cancer cell growth through targeting FOXC1[J]. *Cell Oncol*, 2015, 38(3): 173-181.
- [7] XU Y, SHAO Q S, YAO H B, et al. Overexpression of FOXC1 correlates with poor prognosis in gastric cancer patients[J]. *Histopathology*, 2014, 64(7): 963-970.
- [8] XU Y Y, TIAN J, HAO Q, et al. MicroRNA-495 down-regulates FOXC1 expression to suppress cell growth and migration in endometrial cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 239-251.
- [9] HUANG L, HUANG Z, FAN Y, et al. FOXC1 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.
- [10] WANG L, GU F, LIU C Y, et al. High level of FOXC1 expression is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(2): 853-858.
- [11] DENG Q J, XU X F, REN J. Effects of SDF-1/CXCR4 on the repair of traumatic brain injury in rats by mediating bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(2): 467-477.
- [12] PARK H J, LEE W Y, KIM J H, et al. Expression patterns and role of SDF-1/CXCR4 axis in boar spermatogonial stem cells[J]. *Theriogenology*, 2018, 113: 221-228.
- [13] TU Z, XIE S, XIONG M, et al. CXCR4 is involved in CD133-induced EMT in non-small cell lung cancer[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 505-514.
- [14] LI H, YAO G, FENG B, et al. Circ_0056618 and CXCR4 act as competing endogenous in gastric cancer by regulating miR-206[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(11): 9543-9551.
- [15] ZHANG F, GONG S, WU J, et al. CXCR4-targeted and redox responsive dextran nanogel for metastatic breast cancer therapy[J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(6): 1793-1802.
- [16] ZHU G D, LIU F, OUYANG S, et al. BACH1 promotes the progression of human colorectal cancer through BACH1/CXCR4 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(2): 120-127.
- [17] ZHENG C H, CHEN X M, ZHANG F B, et al. Inhibition of CXCR4 regulates epithelial mesenchymal transition of NSCLC via the Hippo-YAP signaling pathway[J]. 2018, 42(10): 1386-1394.
- [18] WERNER T A, FORSTER C M, DIZDAR L, et al. CXCR4/CXCR7/CXCL12-Axis in Follicular Thyroid Carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(6): 929-940.
- [19] CHENG Y, SONG Y, QU J, et al. The chemokine receptor CXCR4 and c-MET cooperatively promote epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(2): 487-497.
- [20] GUO H, DAI Y, WANG A, et al. Association between expression of MMP-7 and MMP-9 and pelvic lymph node and para-aortic lymph node metastasis in early cervical cancer[J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2018, 44(7): 1274-1283.
- [21] HE W, ZHANG H, WANG Y, et al. CTHRC1 induces non-small cell lung cancer (NSCLC) invasion through upregulating MMP-7/MMP-9[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 400.

(收稿日期:2019-01-22 修回日期:2019-03-14)

(上接第 2245 页)

- sectional study[J]. *Diabetes Therapy*, 2018, 9(1): 209-217.
- [18] 张青立. 2 型糖尿病患者空腹血糖水平对机体血清 CEA, CA199, CA125 水平的影响[J]. *临床研究*, 2018, 26(11): 15-17.
- [19] VASCONCELOS-DOS-SANTOS A, LOPONTE H F, MANTUANO N R, et al. Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(3): e306.
- [20] BOTTONI P, SCATENA R. The role of CA 125 as tumor marker: biochemical and clinical aspects[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 867: 229-244.
- [21] 卢海霞, 陆晓华, 张霞, 等. 2 型糖尿病肾病患者血清 CA125 水平分析[J]. *宁夏医学杂志*, 2016, 38(3): 228-229.
- [22] 张桂香. 糖尿病肾病患者血清肿瘤标志物水平变化及相关因素分析[J]. *母婴世界*, 2018, 18(24): 3-4.
- [23] KOSAR F, AKSOY Y, OZGUNTEKIN G, et al. Relationship between cytokines and tumour markers in patients with chronic heart failure[J]. *Eur J Heart Fail*, 2014, 8(3): 270-274.
- [24] HAMDY N M. Relationship between pro-anti-inflammatory cytokines, T-cell activation and CA 125 in obese patients with heart failure[J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17(3): CR174-CR179.
- [25] DU R, SUN W W, LIN L, et al. Serum CA 19-9 and risk of incident diabetes in middle-aged and elderly Chinese: a prospective cohort study[J]. *Acta Diabetol*, 2017, 54(2): 201-208.
- [26] UYGUR-BAYRAMICLI O, DABAK R, ORBAY E, et al. Type 2 diabetes mellitus and CA 19-9 levels[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(40): 5357-5359.

(收稿日期:2019-01-30 修回日期:2019-03-22)