

转录因子 FOXO1 在前列腺癌组织中的表达及临床意义*

瞿根义¹ 徐勇¹ 聂海波¹ 阳光¹

[摘要] 目的:检测前列腺癌(PCa)组织与良性前列腺增生(BPH)组织中转录因子 FOXO1 的表达情况,探讨 FOXO1 与 PCa 临床病理参数之间的关系。方法:收集 2010 年 1 月~2016 年 12 月我院 53 例 PCa 患者行根治性前列腺切除术病理标本和经尿道前列腺电切术的 53 例 BPH 病理标本,采用组织芯片方式收集组织标本,使用免疫组化染色法检测 FOXO1 表达情况,分析 FOXO1 表达同 PCa 患者临床病理参数之间的关系。结果:BPH 组织中 FOXO1 呈高表达,PCa 组织中 FOXO1 表达显著低于 BPH 组织(39.6% vs. 86.8%, $P < 0.05$),中低危 PCa 组织的相对表达量显著高于高危 PCa 组织($P < 0.05$)。FOXO1 表达与 PCa PSA 水平、病理 T 分期、淋巴结转移、Gleason 评分显著相关($P < 0.05$),Gleason 评分越高 FOXO1 水平越低,PCa 组织中 FOXO1 表达与患者年龄、前列腺体积、切缘阳性无明显相关性($P > 0.05$)。结论:FOXO1 在 PCa 组织中异常低表达,与 PCa 侵袭转移相关,FOXO1 表达与 PCa PSA 水平、病理 T 分期、淋巴结转移和 Gleason 评分密切相关。

[关键词] FOXO1;前列腺癌;免疫组化;病理参数

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.04.011

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A

Expression and clinical significance of transcription factor FOXO1 in prostate cancer tissues

QU Genyi XU Yong NIE Haibo YANG Guang

(Department of Urology, Affiliated Zhuzhou Hospital of Xiangya Medical College, Zhuzhou, Hunan, 412007, China)

Corresponding author: XU Yong, E-mail: tigerhnl@126.com

Abstract Objective: To detect the expression of FOXO1 in prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues, and to investigate the relationship between FOXO1 and clinicopathological parameters in PCa. **Method:** Fifty-three cases of PCa pathology specimens and 53 cases of BPH pathology specimens after TURP from January 2010 to December 2016 in our hospital were collected. Tissue samples were collected by tissue microarray and immunohistochemical staining was used to detect the expression of FOXO1. The relationship between FOXO1 expression and clinicopathological parameters in patients with PCa was analyzed. **Result:** FOXO1 was highly expressed in BPH tissues, while FOXO1 expression in PCa tissues was significantly lower than that in BPH tissues (39.6% vs. 86.8%, $P < 0.05$). The expression of FOXO1 in low-middle-risk PCa tissues was significantly higher than that in high-risk PCa tissues ($P < 0.05$). FOXO1 expression was significantly correlated with PSA level, pathological T stage, lymph node metastasis and Gleason score in PCa ($P < 0.05$). The higher the Gleason score was, the lower the FOXO1 level was. However, the FOXO1 expression in PCa wasn't correlated with age, prostate volume or pathological positive margin ($P > 0.05$). **Conclusion:** FOXO1 is abnormally low expressed in PCa tissues, which is correlated with the invasion and metastasis of PCa. FOXO1 expression is closely related to PSA level, pathological T stage, lymph node metastasis and Gleason score in PCa.

Key words FOXO1; prostate cancer; immunohistochemistry; pathological parameters

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是泌尿系统中常见的恶性肿瘤,在西方国家已成为男性的第二大恶性肿瘤,严重威胁着男性的健康^[1]。在我国随着生活水平的大步提高,PCa 的发病率正逐年快速增加,已严重威胁我国中老年男性的健康。研究指

出,2015 年我国 PCa 患者新增 60 300 例,死亡患者约 26 600 例^[2]。

转录因子 FOXOs 是 Forkhead 蛋白家族的一个亚群,目前在哺乳动物中共发现有 4 个成员,分别是 FOXO1、FOXO3a、FOXO4 和 FOXO6;转录因子 FOXO1 作为重要的成员之一,广泛表达于乳腺癌、结肠癌、肝癌、胃癌等肿瘤中^[3~5],FOXO1 是一种肿瘤相关基因,在肿瘤发生、发展中发挥着重要的作用。国外 Huang 等^[6]研究发现 FOXO1 具

* 基金项目:株洲市科技指导性计划项目(编号 20180004)

¹ 中南大学湘雅医学院附属株洲医院泌尿外科(湖南株洲, 412007)

通信作者:徐勇, E-mail: tigerhnl@126.com

有自噬活性因子的作用,在 PCa 细胞的生长、分化和凋亡中发挥重要的调控作用。国内外转录因子 FOXO1 作为研究热点,而目前在 PCa 中的表达研究尚未报道。本研究检测 PCa 组织中 FOXO1 的表达,探讨 FOXO1 与 PCa 临床病理参数之间的关系,研究其对 PCa 发生、发展的重要作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2010 年 1 月~2016 年 12 月我院行根治性前列腺切除术病理标本,术后经病理证实为 PCa;剔除病理或临床资料不全,所有病例术前未接受任何新辅助内分泌治疗及放疗,并且均行盆腔淋巴结清扫术。另随机选取 53 例经尿道前列腺电切术的良性前列腺增生(BPH)组织标本作为对照。其中共收集 PCa 患者病理标本 53 例,年龄(66.26 ± 5.99)岁,PSA(19.58 ± 12.82) ng/ml,前列腺体积(37.91 ± 8.93) ml(根据前列腺 MRI 测量的前后径 $\times$ 左右径 $\times$ 上下径 $\times 0.52$);其中 pT₂ 期 40 例,pT₃ 期 11 例,pT₄ 期 2 例;淋巴结转移阳性 14 例,切缘阳性 6 例。根据 2014 版中国泌尿外科疾病诊断治疗指南手册中 PCa 危险因素(血清 PSA、Gleason 评分和临床分期)将 PCa 分为低危、中危、高危 3 个等级,其中低危组 5 例、中危组 30 例、高危组 18 例。PCa 临床分期根据 2002 年 AJCC 的 TNM 分期标准。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗人 FOXO1 单克隆抗体(英国 Abcam 公司),DAKO ChemMate EnVision(美国 DAKO 公司),S-P 免疫组化染色试剂盒(北京中山生物有限公司),柠檬酸盐抗原修复液、DAB 显色液、PBS 缓冲液(上海长岛生物技术有限公司),双目光学显微镜和彩色病理图像分析系统(日本奥林巴斯)。

1.3 方法

1.3.1 组织芯片制作 从我院病理科收集 PCa 和 BPH 石蜡包埋标本及切片,由我院高年资病理医师对病理切片进行观察确认并圈出构建组织芯的代表区域,而后根据切片标记部位在蜡块上取材。在一个新空白蜡块上打孔,孔径为 2 mm,将 PCa、BPH 组织芯准确放入已打孔空白蜡块小孔内,按照事先设计好的顺序依次操作,每个受体蜡块设置 31(4 $\times$ 8)个组织芯,50℃ 对蜡块进行重新融合。最后对组织芯蜡块进行连续切片,片厚 4 μ m。

1.3.2 免疫组化 切片常规脱蜡,水化,将切片浸于 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中 95℃ 高压热修复 20 min,3% H₂O₂ 孵育 10 min;滴加正常

山羊血清封闭,室温孵育 15 min;滴加兔单克隆抗 FOXO1 抗体(一抗,英国 Abcam 公司,浓度 1 : 100),4℃ 冰箱中孵育过夜;滴加 DAKO ChemMate EnVision 试剂(二抗,美国 DAKO 公司),37℃ 恒温箱中孵育 30 min;DAB 显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,镜检。

1.3.3 结果判定 FOXO1 主要表达于细胞质,细胞质出现黄色、棕黄色或棕褐色为阳性细胞。由我院 2 位高年资病理科医师进行双盲阅片。以 PBS 替代一抗作为阴性对照,用已知阳性切片作为阳性对照。具体评分标准如下:①根据染色程度进行评分:0 分(无染色),1 分(弱染色),2 分(中染色),3 分(强染色);②根据着色细胞百分率进行评分:0 分($< 5\%$),1 分($5\% \sim 25\%$),2 分($> 25\% \sim 50\%$),3 分($> 50\% \sim 75\%$),4 分($> 75\%$)。①+②为总积分,总分为 0~7 分。0 分(-),1~2 分(+),3~5 分(++),6~7 分(+++) [7]。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料比较采用独立样本 *t* 检验、Mann-Whitney *U* 检验或 Kruskal Wallis 检验,计数资料的比较采用独立样本卡方检验或者 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

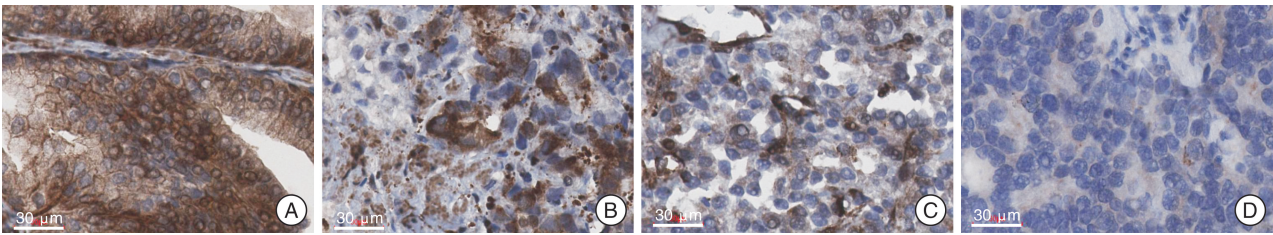
2 结果

2.1 FOXO1 在 BPH 和 PCa 组织中表达情况

免疫组化染色结果(图 1)显示:在前列腺组织中,FOXO1 主要表达于阳性细胞质中,BPH 组织中 FOXO1 呈高表达,PCa 组织中 FOXO1 阳性表达率显著低于 BPH 组织(39.6% vs. 86.8%),差异有统计学意义($P < 0.001$)。并且 BPH 患者和 PCa 患者的 PSA 水平、前列腺体积比较差异有统计学意义($P < 0.001$),两组年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 FOXO1 表达水平与 PCa 患者临床病理参数之间的关系

通过对 FOXO1 蛋白表达水平和 PCa 患者临床病理参数进行分析,结果显示 FOXO1 表达与 PCa PSA 水平、病理 T 分期、淋巴结转移、Gleason 评分显著相关($P < 0.05$)。Gleason 评分越高 FOXO1 表达水平越低,结果显示在 Gleason 评分 8~10 分的患者中,其表达阳性率明显低于 Gleason 评分 7 分与 Gleason 评分 5~6 分的患者($P < 0.05$),PCa 组织中 FOXO1 表达与患者年龄、前列腺体积及切缘阳性无明显相关性($P > 0.05$)。见表 2。FOXO1 强染色多见于高分化、低分期以及淋巴结转移阴性的病例标本(图 1)。



BPH(A)、低危 PCa(B)、中危 PCa(C)和高危 PCa(D)组织中 FOXO1 的表达(免疫组化×400)。FOXO1 在 BPH 和中低危 PCa 组织中染色更强,高危 PCa 组织中相对染色较低。

图 1 FOXO1 在 BPH 组织和 PCa 组织中表达情况

表 1 PCa 患者与 BPH 患者临床病理特征的比较

参数	PCa(<i>n</i> = 53)	BPH(<i>n</i> = 53)	<i>P</i> 值
年龄/岁	66.26 ± 5.99(54~74)	68.16 ± 6.52(57~84)	0.120
PSA 水平/(ng · ml ⁻¹)	19.58 ± 12.82(7.04~56.16)	4.62 ± 2.48(0.42~9.62)	<0.001
前列腺体积/cm ³	37.91 ± 8.93(25~68)	63.37 ± 14.56(45~133)	<0.001
FOXO1 表达水平			<0.001
—	32	7	
+	5	5	
++	10	7	
+++	6	34	

表 2 FOXO1 表达与 PCa 患者临床病理特征的关系

病理参数	例数	FOXO1 表达水平				<i>P</i> 值
		—	+	++	+++	
年龄/岁						0.515
<70	33(62.3)	19(59.4)	4(80.0)	5(50.0)	5(83.3)	
≥70	20(37.7)	13(40.6)	1(20.0)	5(50.0)	1(16.7)	
PSA 水平/(ng · ml ⁻¹)						0.035
<10	12(22.6)	3(9.4)	2(40.0)	3(30.0)	4(66.7)	
10~20	23(43.4)	15(46.9)	3(60.0)	4(40.0)	1(16.7)	
>20	18(34.0)	14(43.8)	0	3(30.0)	1(16.7)	
前列腺体积/cm ³						0.701
≤35	25(47.2)	14(43.8)	3(60.0)	6(60.0)	2(33.3)	
>35	28(56.3)	18(40.0)	2(40.0)	4(66.7)	4(52.8)	
Gleason 评分/分						0.003
5~6	5(9.4)	1(3.1)	0	2(20.0)	2(33.3)	
7	30(56.6)	16(50.0)	5(100.0)	5(50.0)	4(66.7)	
8~10	18(34.0)	15(46.9)	0	3(30.0)	0	
病理 T 分期						<0.001
T ₂	40(75.4)	24(68.8)	5(83.3)	7(77.8)	4(80.0)	
T ₃	11(20.8)	7(31.2)	1(16.7)	2(22.2)	1(20.0)	
T ₄	2(3.8)	1(10.0)	0	1(10.0)	0	
淋巴结转移						0.022
阴性	39(73.6)	19(59.4)	4(80.0)	10(100.0)	6(100.0)	
阳性	14(26.4)	13(40.6)	1(20.0)	0	0	
切缘阳性						0.369
阴性	47(88.7)	27(84.4)	4(80.0)	10(100.0)	6(100.0)	
阳性	6(11.3)	5(15.6)	1(20.0)	0	0	

3 讨论

PCa 是导致老年男性死亡的最主要的恶性肿瘤之一,近年来我国 PCa 的发病率也呈明显上升趋势^[8]。由于 PCa 早期发病隐匿,且具有侵袭性的生物学特性,临床上许多患者在就诊时常常已经发生扩散转移,此外,PCa 患者在行根治性切除后最后都几乎不可避免复发,以及发生远处的转移^[9],因此进一步研究揭示 PCa 侵袭转移的机制对于优化临床 PCa 治疗方案具有重要的意义。

叉头蛋白家族成员 FOXO1 转录因子是 PI3K/Akt 信号通路调控细胞存活的一个关键底物,其有多个苏氨酸和丝氨酸磷酸位点,活化的蛋白激酶 B(protein kinase B)可使 FOXO1 N 端 1 个苏氨酸(Thr24)和中部 2 个丝氨酸(Ser256、Ser319)发生磷酸化,由核内转移至胞质中,进而引起下游信号通路阻断^[10]。另外研究显示 FOXO1 可以通过调控细胞周期阻滞蛋白、促凋亡基因如 BIM、FASL 等的转录活性,也可以通过与抑癌基因 p53 的相互结合,从而在细胞的增殖、发育、凋亡和代谢的过程中发挥着重要的作用^[11,12]。抑癌基因 PTEN 失活及其导致的 PI3K/Akt 信号通路的过度持续激活在 PCa 中是普遍现象,Akt 的活化又可通过磷酸化 FOXO1 使其失活,从而抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和血管生成等多种途径促进癌细胞的增殖和迁移^[12]。近年来的研究表明,FOXO1 可以通过多种分子机制参与了包括 PCa 在内的多种癌症的发生发展,与癌症的进展、侵袭与转移密切相关。PCa 的细胞系和临床标本的研究表明,FOXO1 的检出率在 PCa 中较正常前列腺组织降低了 31%~34%^[13]。我们的研究结果显示 PCa 组织中 FOXO1 的表达明显低于 BPH 组织,阳性表达率分别为 39.6% 和 86.8%,差异有统计学意义($P<0.05$),并且与 PCa 的 Gleason 评分,即 PCa 的恶性程度密切相关,其中 Gleason 评分越高 FOXO1 表达水平越低。

雄激素受体(adrogen receptor,AR)信号通路在 AR 依赖性和非 AR 依赖性的 PCa 中均发挥着重要的作用,对于 PCa 细胞的生长、增殖和侵袭具有重要调控作用。已有的研究表明,FOXO1 介导了抑癌基因 PTEN 和 13q14 对 AR 信号通路的转录抑制,AR 可以通过与 FOXO1 形成复合物而抑制 FOXO1 的转录活性,而 FOXO1 活性的降低可以导致促凋亡因子 TRAIL(肿瘤坏死因子家族成员)表达下调,继而促进 PCa 细胞的生长与增殖^[14,15]。并且研究显示对于去势抵抗性 PCa 有明显疗效药物之一的多烯紫杉醇,其抗癌作用与其诱导的 FOXO1 表达以及核聚集是密不可分的^[16]。由此可见,无论是在 AR 依赖性还是非 AR 依赖性

的 PCa 中,FOXO1 均发挥着重要的调控作用,而其活性抑制以及表达下调也正是 PCa 进展及转移的重要原因之一。同时我们研究显示,FOXO1 表达与 PCa PSA 水平、病理 T 分期、淋巴结转移密切相关。显示 FOXO1 表达与 PCa 侵袭转移密切相关。

本研究显示 BPH 患者与 PCa 患者的 PSA 水平和前列腺体积比较差异有统计学意义,同时 FOXO1 在 BPH 组织表达量显著高于 PCa 组织,在中低危 PCa 组织的相对表达量显著高于高危 PCa 组织,并且 FOXO1 表达与 PCa PSA 水平、病理 T 分期、淋巴结转移、Gleason 评分显著相关,Gleason 评分越高 FOXO1 水平越低,说明 FOXO1 可能在 PCa 侵袭转移中发生重要作用,为 PCa 的侵袭转移提供了一定的理论依据,并为临床治疗 PCa 提供了新的作用靶点。但是本研究为回顾性研究,病例数有限,且缺乏多中心病例的支持,其次由于术后大部分患者随访时间少于 3 年,因此无法研究 FOXO1 与 PCa 预后、生化复发是否相关。

【参考文献】

- 1 Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- 2 Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- 3 陈宝英, 张英, 黄胜超, 等. FOXO1 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. 海南医学, 2017, 28(9): 1383-1386.
- 4 Zhao Y, Yang J, Liao W, et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(7): 665-675.
- 5 周英姿, 张友元, 桂律, 等. FOXO1A 及 FLASH 在胃癌组织中的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2010, 37(6): 675-678.
- 6 Huang H, Tindall D J. Dynamic FoxO transcription factors [J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 15): 2479-2487.
- 7 Ma H Q, Liang X T, Zhao J J, et al. Decreased expression of Neurensin-2 correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(38): 4844-4848.
- 8 杨进益, 杨明州, 魏伟, 等. 前列腺癌发生发展的流行病学研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2017, 32(9): 721-725.
- 9 Calabrò F, Sternberg C N. Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients [J]. Eur Urol, 2007, 51(1): 17-26.
- 10 金益, 邵钦树. FOXO1 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21(2): 81-85.
- 11 Ha S, Ruoff R, Kahoud N, et al. Androgen receptor levels are upregulated by Akt in prostate cancer [J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18(2): 245-255.

私,获得的信息不能保证绝对准确,可能影响结果统计分析。另外自然受孕成功的因素很多,不排除精液质量改善之外的因素影响。本研究纳入的研究对象有限,可能导致研究结果偏倚,仍需大样本量研究为显微镜辅助精索静脉曲张日间手术模式的开展提供参考^[14]。

综上所述,日间手术模式应用于显微镜辅助精索静脉曲张结扎术是安全可行的,其可以缩短患者的入院等待时间和住院时间、缩减住院费用及提高医疗资源的使用效率,不增加术后并发症发生率,可以提高患者的满意度,值得推广。

[参考文献]

- 1 Cassinotti E, Colombo E M, Di Giuseppe M, et al. Current indications for laparoscopy in day-case surgery[J]. *Int J Surg*, 2008, 6 Suppl 1: S93—S96.
 - 2 管日戡, 李森, 王进, 等. 左肾静脉受压与精索静脉曲张术后复发关系的探讨[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2017, 32(2): 122—126.
 - 3 Niederberger C. Re: varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair[J]. *J Urol*, 2012, 187(2): 626—626.
 - 4 Guo S J, Sun Z J, Li W. New insights about the early diagnosis of fertility impairment in varicoceles; the DNA repair gene example[J]. *Med Hypotheses*, 2012, 78(4): 536—538.
 - 5 Zheng Y Q, Gao X, Li Z J, et al. Efficacy of bilateral and left varicoectomy in infertile men with left clinical and right subclinical varicoceles: a comparative study[J]. *Urology*, 2009, 73(6): 1236—1240.
 - 6 Taniguchi F, Kaponis A, Izawa M, et al. Apoptosis and endometriosis[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 648—662.
 - 7 Goldstein M. New insights into the etiology and treatment of male infertility[J]. *J Urol*, 1997, 158(5): 1808—1809.
 - 8 林莉, 武志刚, 翁志梁, 等. 三种不同手术方式治疗精索静脉曲张的对比研究[J]. *浙江医学*, 2014, 36(15): 1324—1327.
 - 9 徐淳, 王海峰. 显微镜与腹腔镜下精索静脉结扎术治疗精索静脉曲张的效果比较[J]. *中国当代医药*, 2016, 23(7): 71—73, 79.
 - 10 Cayan S, Shavakhabov S, Kadioglu A. Treatment of palpable varicocele in infertile men: a meta-analysis to define the best technique[J]. *J Androl*, 2009, 30(1): 33—40.
 - 11 Suhonen R A, Iivonen M K, Valimäki M A. Day-case surgery patients' health-related quality of life[J]. *Int J Nurs Pract*, 2007, 13(2): 121—129.
 - 12 Esteves S C, Roque M, Agarwal A. Outcome of assisted reproductive technology in men with treated and untreated varicocele: systematic review and meta-analysis[J]. *Asian J Androl*, 2016, 18(2): 254—258.
 - 13 Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair[J]. *Eur Urol*, 2011, 60(4): 796—808.
 - 14 Ding H, Tian J, Du W, et al. Open non-microsurgical, laparoscopic or open microsurgical varicoectomy for male infertility: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *BJU Int*, 2012, 110(10): 1536—1542.
- (收稿日期: 2018-04-27)
-
- (上接第 296 页)
- 12 Liu X, Choi R Y, Jawad S M, et al. Androgen-induced PSA expression requires not only activation of AR but also endogenous IGF-I or IGF-I/PI3K/Akt signaling in human prostate cancer epithelial cells[J]. *Prostate*, 2011, 71(7): 766—777.
 - 13 Li R, Erdamar S, Dai H, et al. Forkhead protein FKHR and its phosphorylated form p-FKHR in human prostate cancer[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(10): 1501—1507.
 - 14 Ma Q, Fu W, Li P, et al. FoxO1 mediates PTEN suppression of androgen receptor N- and C-terminal interactions and coactivator recruitment[J]. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(2): 213—225.
 - 15 Dong X Y, Chen C, Sun X, et al. FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14): 6998—7006.
 - 16 Jiang J T, Huang H J. Targeting the Androgen Receptor by Taxol in Castration-Resistant Prostate Cancer[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2010, 2(1): 1—5.
- (收稿日期: 2018-03-13)