

论著 · 临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.09.009

HIF-1 α 、MACC1、FOXO4 与胃癌病理和预后的关系*

付 彪,李永翔 Δ ,赵志杰

(安徽医科大学第一附属医院普外科外八病区,合肥 230022)

[摘要] 目的 探究低氧诱导因子-1 (HIF-1 α)、结肠癌转移相关基因 1(MACC1)和转录因子 FOXO4 在胃癌中的表达及与胃癌的临床病理特征和预后的关系。**方法** 收集 2006 年 12 月至 2008 年 5 月安徽医科大学第一附属医院外科手术切除的原发性胃癌石蜡包埋标本 110 份,和距癌灶边缘 5 cm 以上且经病理检查确定为正常胃黏膜的癌旁组织标本 46 份,进行 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 蛋白免疫组织化学检测。统计标本来源患者的信息进行 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 蛋白与胃癌及转移淋巴结相关性分析。用 Kaplan-Meier 法分析术后胃癌患者的 5 年生存率和用 Cox 法进行生存率多因素回归分析。**结果** 免疫组织化学法检测发现 HIF-1 α ($P<0.001$)和 MACC1($P<0.001$)蛋白在癌灶细胞中的表达明显高于癌旁组织,而 FOXO4 蛋白在癌灶细胞中的表达明显低于癌旁组织($P<0.001$)。统计分析发现细胞分化程度越低、浸润程度越大、伴随着淋巴结转移和 TNM 分期越高,HIF-1 α 和 MACC1 的阳性表达也越高,而 FOXO4 因子的表达降低。胃癌组织中 3 种因子的表达存在显著相关性。HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 3 种因子的表达明显影响患者术后 5 年的生存率,而且是决定胃癌患者预后的独立因素。**结论** HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 在胃癌组织中存在异常表达,与胃癌的临床病理特征和胃癌患者的预后密切相关。

[关键词] 胃癌;低氧诱导因子-1;结肠癌转移相关基因 1;转录因子 FOXO4

[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)09-1180-04

The correlation of HIF-1 α ,MACC1 and FOXO4 in gastric carcinoma pathology and prognosis*

Fu Biao,Li Yongxiang Δ ,Zhao Zhijie

(Department of General Surgery,the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,Hefei,Anhui 230022,China)

[Abstract] **Objective** To explore significance and impact of hypoxia inducible factor 1 α ,metastasis associated with colon cancer 1 and transcription factor FOXO4 in gastric carcinoma and clinical pathological characteristics and prognosis. **Methods** 110 samples diagnosed as gastric carcinoma and 46 samples diagnosed as pericarcinomatous tissue which was 5 cm far away from cancer were collected in first affiliated hospital of Anhui medical university from December 2006 to May 2008. Immunohistochemical staining was performed in these samples to detect the expressions of HIF-1 α ,MACC1 and FOXO4. And the correlation between development of gastric carcinoma and expressions of HIF-1 α ,MACC1 and FOXO4 was analyzed with the help of patients' messages. Kaplan-Meier method and Cox regression were used to analyze patients' 5 years survival rate and the factors. **Results** The expression levels of HIF-1 α ($P<0.001$) and MACC1($P<0.001$) in gastric carcinoma tissues were significantly higher than pericarcinomatous tissues,however the expression levels of FOXO4($P<0.001$) was significantly decreased in gastric carcinoma tissues. Statistical analysis revealed that the expressions of HIF-1 α and MACC1 were apparently increased with the lower degree of cell differentiation, the greater degree of tumor infiltration,accompanied with lymph node metastasis and higher TNM scores,but lowered the expression of FOXO4 factor. There were significant correlations between expressions of the three factors in gastric carcinoma. The expressions of HIF-1 α ,MACC1 and FOXO4 had an apparent influence on the patients' 5 years survival rate. And they were independent factors on the prognosis of gastric carcinoma. **Conclusion** HIF-1 α ,MACC1and FOXO4 are abnormal expression in gastric cancer tissue,and the clinical pathological features of gastric cancer and the prognosis of patients with gastric cancer are closely related.

[Key words] gastric carcinoma;hypoxia inducible factor 1 α ;metastasis associated with colon cancer 1;transcription factor FOXO4

胃癌是临床上常见的消化系统恶性肿瘤疾病,其发病率位于中国各类肿瘤之首。由于胃癌无明确致病机制,发病隐匿且前期临床症状不明显,患者确诊多是在中晚期。淋巴转移是胃癌的一大特征,在胃癌初期即会出现淋巴转移现象,胃癌发展中期可达到 70%以上的淋巴转移率^[1]。组织浸润和转移性生长是导致胃癌患者死亡的根本原因^[2]。对肿瘤的大量研究发现,低氧是肿瘤微环境的一个重要特点。低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α ,HIF-1 α)是细胞为了适应低氧条件而产生的核转录因子,它在多种人类肿瘤组织中过量表达,

参与肿瘤血管形成,促进肿瘤的发展^[3-5]。HIF-1 α 的大量表达可以增加肿瘤细胞的侵袭性和降低肿瘤细胞对放、化疗药物的敏感性^[6]。结肠癌转移相关基因 1(metastasis associated with colon cancer 1,MACC1)是最早发现于结肠癌病灶的一段持续高表达基因序列,大量研究证实 MACC1 参与多种肿瘤的发生与发展^[7-8]。FOXO4 是一种肿瘤抑制因子,其表达水平可以预测肿瘤的进展^[9]。在本文中,作者采用免疫组织化学方法以癌旁组织为对照,检测胃癌组织中 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的表达水平,探究 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 在胃癌中的表

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871207);安徽省科技厅年度重点基金资助项目(12070403086)。 作者简介:付彪(1980—),主治医师,硕士,主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。 Δ 通讯作者,Tel:13615601088;E-mail:yongxiangli_1@hotmail.com。

达及与胃癌的临床病理特征和预后的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2006 年 12 月至 2008 年 5 月在安徽医科大学第一附属医院行外科手术切除的原发性胃癌石蜡包埋标本 110 份,胃癌患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗。其中,男 79 例,女 31 例;年龄 36~72 岁,平均 56.4 岁,小于或等于 55 岁者 61 例,大于 55 岁者 49 例;高分化 26 例,中分化 51 例,低分化 33 例;浸润至黏膜及其下层 22 例,浸润至肌层 31 例,浸润至浆膜层 57 例;伴随淋巴结转移 64 例,未伴随淋巴结转移 46 例;TNM 分期 I~II 期 38 例,III~IV 期 72 例。另采集距离癌灶边缘 5 cm 以上,且经病理检查确定为正常胃黏膜的癌旁组织标本 46 份作为对照组。切除手术后对胃癌患者进行病例跟踪 12 个月 1 次随访,记录随访率、患者术后生存情况,患者随访时间均大于 5 年。总生存期定义为自胃癌切除手术之日起至随访截止时间或死亡时间。

1.2 试剂 HIF-1 α 抗体(兔抗人,Invitrogen 公司),MACC1(兔抗人,Origene 公司),FOXO4(兔抗人,Origene 公司),HRP-IgG(羊抗兔,Invitrogen 公司),SP 免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),DAB 显色剂(武汉博士德生物工程有限公司)。

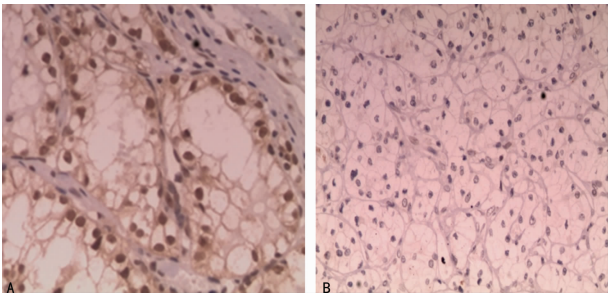
1.3 免疫组织化学法检测 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 蛋白的表达水平 胃癌组织蜡块经过修整后,于切片机上切得 4 μ m 病理切片。实验中采用 SP 法,以 PBS 缓冲溶液作为一抗的阴性对照,进行 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的免疫组织化学染色,实验操作按照 SP 试剂盒说明书进行。HIF-1 α 蛋白主要表达于胃癌细胞的细胞质区,细胞核弱表达,阳性反应可见棕黄色颗粒;MACC1 蛋白主要表达于细胞质区,较少表达于细胞核中,阳性反应可见棕黄色颗粒;FOXO4 蛋白主要表达于细胞核中,细胞质弱表达,阳性反应可见棕黄色或棕褐色颗粒。用染色强度与出现阳性反应面积的百分率之间的乘积作为免疫组织化学染色半定量结果。随机选择 5 个视野进行镜检统计,染色无色记为 0 分,浅黄色记为 1 分,棕黄色记为 2 分,深棕色记为 3 分;出现阳性反应面积小于或等于 25%记为 1 分,在 26%~50%之间记为 2 分,在 51%~75%之间记为 3 分,大于 75%记为 4 分;半定量结果以大于 2 记为阳性,否则阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析处理,各因素采用例数或百分数表示;HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的阳性表达与胃癌病理参数间的相关性采用 Spearman 分析,患者术后 5 年内生存率采用 Kaplan-Meier 方法分析,多因素分析采用 Cox 回归分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

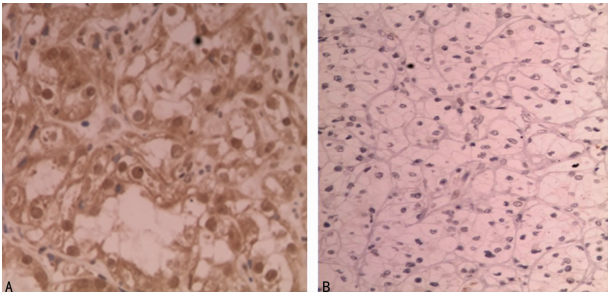
2.1 免疫组织化学法检测 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 蛋白的表达水平 镜检发现,HIF-1 α 阳性染色多在细胞质或细胞核(图 1)。110 例胃癌标本中出现 HIF-1 α 阳性染色 85 例;对照组 46 例癌旁组织出现阳性染色 8 例;HIF-1 α 在癌灶细胞中的表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。阳性 MACC1 染色集中在细胞质区,细胞核弱表达(图 2);110 例胃癌标本中出现 MACC1 阳性染色 82 例;对照组 46 例癌旁组织出现阳性染色 11 例;MACC1 在癌灶细胞中的表达明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。而阳性 FOXO4 染色集中在细胞核区,细胞质弱表达(图 3);110 例胃癌标本中出现 FOXO4 阳性染色 37 例;对照组 46 例癌旁组织出现阳性染色 36 例;FOXO4 在癌灶细胞中的表达明显低于癌旁组织,

差异有统计学意义($P<0.01$)。



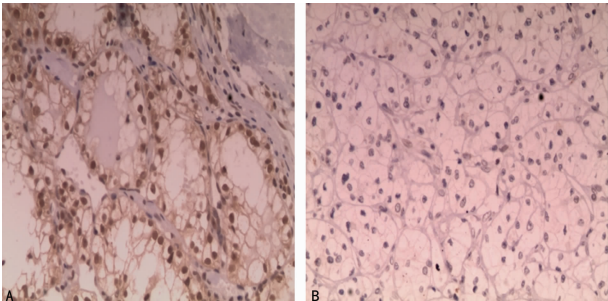
A:胃癌组织标本;B:癌旁组织标本。

图 1 免疫组织化学法检测 HIF-1 α 蛋白的表达($\times 200$)



A:胃癌组织标本;B:癌旁组织标本。

图 2 免疫组织化学法检测 MACC1 蛋白表达($\times 200$)



A:胃癌组织标本;B:癌旁组织标本。

图 3 免疫组织化学法检测 FOXO4 蛋白表达($\times 200$)

2.2 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 阳性表达与胃癌病理参数间的相关性分析 从患者的性别、年龄、胃癌细胞分化程度、浸润程度、淋巴结转移与 TNM 分期 6 个方面,用 Spearman 法分析 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的表达与胃癌病理之间的关系,见表 1。统计分析后发现 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的阳性率与胃癌细胞的分化程度、浸润程度、淋巴结转移与 TNM 分期相关性强。细胞分化程度低,HIF-1 α 与 MACC1 的阳性表达升高,而 FOXO4 的阳性表达降低;肿瘤细胞浸润程度越大,HIF-1 α 与 MACC1 的阳性表达越高,FOXO4 的阳性表达越低;HIF-1 α 与 MACC1 的阳性率伴随着淋巴结转移有升高趋势,相反,FOXO4 的阳性率伴随着淋巴结转移有降低趋势;TNM 分期越高 HIF-1 α 与 MACC1 的阳性率越大,而 FOXO4 的阳性率越小。

2.3 胃癌患者中 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 3 种因子阳性表达的相关性分析 免疫组织化学法对胃癌组织进行 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 阳性统计分析,发现 110 例胃癌标本中,HIF-1 α 和 MACC1 均表现出阳性结果 79 例,HIF-1 α 和 MACC1 均表现为阴性结果 22 例,胃癌组织中 HIF-1 α 和 MACC1 之间表现出正相关性, $r_s=0.481,P=0.009$;HIF-1 α 和 FOXO4 均表现出阳性结果 16 例,HIF-1 α 和 MACC1 均表

表 1 HIF-1α、MACC1 和 FOXO4 阳性表达与胃癌病理参数间的相关性分析(%)

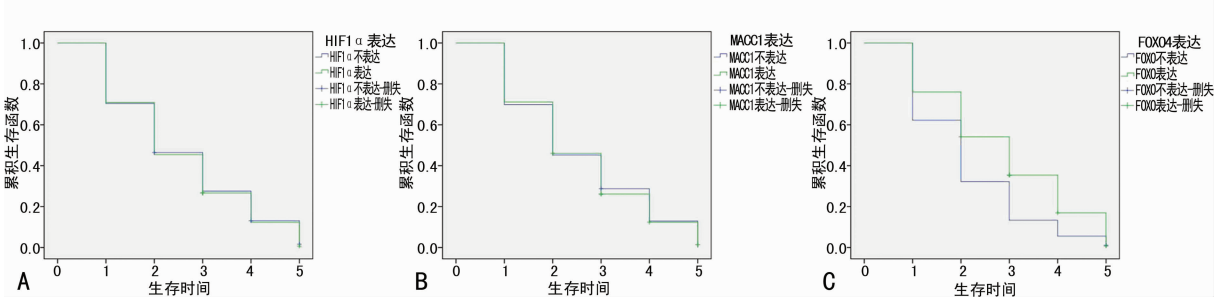
胃癌病理参数	<i>n</i>	HIF-1α 阳性率	<i>P</i>	MACC1 阳性率	<i>P</i>	FOXO4 阳性率	<i>P</i>
性别							
男	79	78.5	0.629	75.9	0.589	34.2	0.848
女	31	74.2		71.0		32.3	
年龄(岁)							
≤50	61	75.4	0.603	72.1	0.517	36.1	0.547
>50	49	79.6		77.6		30.6	
细胞分化程度							
高分化	26	57.7	0.010	46.2	0.000	76.9	0.000
中分化	51	78.4	0.012	78.4	0.010	25.5	0.002
低分化	33	90.9		90.9		12.1	
浸润程度							
黏膜及以下	22	54.5	0.002	45.5	0.000	86.4	0.000
肌层	31	71.0	0.001	71.0	0.021	38.7	0.011
浆膜层	57	89.5		87.7		10.5	
淋巴结转移							
伴随淋巴结转移	64	90.6	0.000	92.2	0.000	20.3	0.000
未伴随淋巴结转移	46	58.7		50.0		52.2	
TNM 分期							
I~Ⅱ期	38	65.8	0.037	55.3	0.001	57.9	0.000
Ⅲ~Ⅳ期	72	83.3		84.7		20.8	

现为阴性结果 7 例,胃癌组织中 HIF-1α 和 FOXO4 之间表现为负相关性, $r_s = -0.647, P < 0.01$;MACC1 和 FOXO4 均表现出阳性结果 17 例,MACC1 和 FOXO4 均表现为阴性结果 6 例,胃癌组织中 MACC1 和 FOXO4 表达存在负相关性, $r_s = -0.513, P < 0.01$ 。

2.4 术后胃癌患者的 5 年生存率和多因素回归分析 对 110 例胃癌标本的患者均进行术后 5 年随访,回访率 90% 以上。≤12 个月 HIF-1α 阳性表达患者生存率为 56.5%,MACC1 阳性表达患者生存率为 57.3%,FOXO4 阳性表达患者生存率为 94.6%;≤24 个月 HIF-1α 阳性表达患者生存率为 49.4%,MACC1 阳性表达患者生存率为 48.2%,FOXO4 阳性表达患者生存率为 86.5%;≤36 个月 HIF-1α 阳性表达患者生存率为

36.5%,MACC1 阳性表达患者生存率为 39.0%,FOXO4 阳性表达患者生存率为 73.0%;≤48 个月 HIF-1α 阳性表达患者生存率为 25.9%,MACC1 阳性表达患者生存率为 25.6%,FOXO4 阳性表达患者生存率为 67.6%;≤60 个月 HIF-1α 阳性表达患者生存率为 21.2%,MACC1 阳性表达患者生存率为 19.5%,FOXO4 阳性表达患者生存率为 56.8%;对患者进行 Kaplan-Meier 生存率分析,累积生存函数如图 4 所示。

用 Cox 回归方法分析 HIF-1α、MACC1 和 FOXO4 对胃癌标本患者及癌旁组织患者生存率的影响作用(表 2)。通过对生存率进行 Kaplan-Meier 分析及 Cox 多因素分析,发现 HIF-1α、MACC1 和 FOXO4 是胃癌预后的独立因素。



A: HIF-1α 因子;B: MACC1 为因子;C: FOXO4 因子。

图 4 胃癌标本患者累积生存函数图

3 讨 论

胃癌在中国是高发病率的恶性肿瘤疾病,由于其发病初期诊断率低,发生淋巴结转移率高,使得患者预后复发率高,转移率高。肿瘤微环境对肿瘤疾病的发展至关重要,低氧是肿瘤微环境的一个重要特征。HIF-1α 是肿瘤细胞适应低氧环境的重要调节蛋白,正常条件下 HIF-1α 表达后很快被降解,而低氧

或缺氧的肿瘤微环境干扰了 HIF-1α 的降解途径,增加其稳定和浓度水平^[10-12]。HIF-1α 转移至细胞核内,可以调控 VEGF、肿瘤多药耐药相关蛋白、糖代谢酶和炎症因子等的大量表达,加速肿瘤血管的形成,增加肿瘤细胞的糖代谢,降低肿瘤细胞对放、化疗药物的敏感性,增强肿瘤的转移和侵袭能力^[13]。借助于免疫组织化学法手段,通过对胃癌病理及 HIF-1α 蛋白表

达的检测结果分析,作者发现 HIF-1 α 蛋白的大量表达与胃癌浸润程度大、TNM 分期高、发生淋巴结转移之间存在正相关性。MACC1 最早发现于结肠癌组织中,其与结肠癌的转移密切相关^[14]。MACC1 可以调控 c-Met 的表达,调节 HGF/c-Met 途径,增强肿瘤细胞迁移侵袭的能力,促进胃癌细胞的淋巴结转移和浸润。研究发现 MACC1 的表达程度将直接影响胃癌患者生存率^[15]。本研究结果得出相同结论,胃癌浸润程度越大、TNM 分期越高、伴随转移淋巴结的标本中,MACC1 表达阳性率越大。FOXO4 属于 FOXO 转录因子家族,因其具有下调 HIF-1 α 蛋白表达、抑制肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞增殖的作用而成为近年来的研究热点^[16]。本研究发现 FOXO4 在胃癌组织中表达明显低于癌旁组织,而且其表达水平与胃癌浸润程度、TNM 分期、淋巴结转移有显著负相关性。大量的临床研究发现,HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的表达水平会严重影响胃癌患者的预后,他们与胃癌复发、远端淋巴结转移密切相关^[13,15-16]。本研究随访发现 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 的表达情况直接影响胃癌患者的 5 年生存率,而且 HIF-1 α 、MACC1 和 FOXO4 因子之间存在显著相关性,共同影响胃癌患者的预后生存水平。

参考文献

[1] Glehen O, Gilly FN, Arvieux C, et al. Peritoneal carcinomatosis from gastric cancer; a multi-institutional study of 159 patients treated by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(9): 2370-2377.

[2] Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression; signaling functions of cell adhesion molecules[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1014(4): 58-66.

[3] 刘兴振, 沈康平. 缺氧诱导因子 1 功能调节及其在凋亡中的研究进展[J]. *重庆医学*, 2010, 39(19): 2675-2677.

[4] Corzo CA, Condamine T, Lu L, et al. HIF-1 α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment[J]. *J Exp Med*, 2010, 207(11): 2439-2453.

[5] Wang J, Ni Z, Duan Z, et al. Altered expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and its regulatory genes in gastric cancer tissues[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99835.

[6] 王圣巍, 成延萍, 魏晓萍, 等. HIF-1 α 在胃癌组织中的表

达及其意义[J]. *山东医药*, 2012, 29(52): 20-22.

[7] Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, et al. Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 141(4): 895-898.

[8] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9): 3441-3444.

[9] Xu MM, Mao GX, Liu J, et al. Low expression of the FoxO4 gene may contribute to the phenomenon of EMT in non-small cell lung cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(9): 4013-4018.

[10] Kim JW, Evans C, Weidemann A, et al. Loss of fibroblast HIF-1 α accelerates tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3187-3195.

[11] Koh MY, Lemos R, Liu X, et al. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α -to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 4015-4027.

[12] Isobe T, Aoyagi K, Koufuji K, et al. Clinicopathological significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) expression in gastric cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2013, 18(2): 293-304.

[13] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics[J]. *Trends Mol Med*, 2002, 4(8): S62-S67.

[14] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(1): 59-67.

[15] Ma J, Ma J, Meng Q, et al. Prognostic value and clinical pathology of MACC-1 and c-MET expression in gastric carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(4): 821-832.

[16] Su L, Liu X, Chai N, et al. The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 378.

(收稿日期: 2014-10-10 修回日期: 2014-12-10)

(上接第 1179 页)

[12] 李梅芳, 欧阳学农, 余宗阳, 等. 非小细胞肺癌 EGFR 突变与 ERCC1 和 BRCA1 表达相关性的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(18): 1393-1396.

[13] Gandara DR, Grimminger P, Mack PC, et al. Association of epidermal growth factor receptor activating mutations with low ERCC1 gene expression in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(12): 1933-1938.

[14] Kotoula V, Krikelis D, Karavasilis V, et al. Expression of DNA repair and replication genes in non-small cell lung cancer (NSCLC): a role for thymidylate synthetase

(TYMS) [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(1): 342. doi: 10.1186/1471-2407-12-342.

[15] Giovannetti E, Lemos C, Tekle C, et al. Molecular mechanisms underlying the synergistic interaction of erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with the multitargeted antifolate pemetrexed in non-small-cell lung cancer cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 73(4): 1290-1300.

(收稿日期: 2014-10-03 修回日期: 2014-12-13)