

网络出版时间: 2021-11-25 10:39 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1043.001.html>

◇基础医学研究◇

## FoxO1 蛋白在癌细胞质中的差异表达及其功能研究

陈洁<sup>1\*</sup> 耿慧武<sup>2\*</sup> 王凤杰<sup>2</sup> 陈姝文<sup>2</sup> 刘晓颖<sup>2</sup> 范晓云<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨叉形头转录因子 O 亚型 1 (FoxO1) 蛋白在肺癌和食管癌细胞中的差异表达及分布特点,并初步了解其亚细胞定位与功能的关系。方法 采用免疫组化的方法评判收集到的临床术后肺癌和食管癌组织细胞质中 FoxO1 蛋白的表达情况;统计学方法分析细胞质中 FoxO1 蛋白表达水平与患者临床病理各指标间的相关性;免疫荧光实验确定 FoxO1 在肺癌细胞系 A549 和食管癌细胞系 Eca109 中的表达及定位,siRNA 干扰技术敲低 FoxO1 在上述两种细胞中的表达,随后进行克隆形成实验研究 FoxO1 对肿瘤细胞增殖的影响。结果 FoxO1 在肺癌组织细胞质中的表达高于相应癌旁组织 ( $P < 0.05$ ),但在肺鳞癌和肺腺癌细胞质中的表达差异无统计学意义;FoxO1 在食管癌组织细胞质中的表达高于相应癌旁组织,且与肿瘤分期呈相关性 ( $P < 0.05$ );FoxO1 敲低对肿瘤细胞 A549 及 Eca109 的增殖具有抑制作用。结论 FoxO1 蛋白在肺癌及食管癌细胞质中表达上调,而在细胞核中的表达减少;FoxO1 在肿瘤细胞质中的表达上调可能促进细胞增殖。

**关键词** FoxO1; 肺癌; 食管癌; 免疫组化; 差异表达

**中图分类号** R 734.2; R 735.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)12-1847-06

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.001

叉形头转录因子 O 亚型 1 (forkhead-box O class 1, FoxO1) 是叉形头转录因子 O (forkhead-box class O, FoxOs) 超家族中的一员,哺乳动物 FoxOs 超家族包含了 FoxO1、FoxO3A、FoxO4 等 4 名成员<sup>[1]</sup>。已知的 FoxOs 家族成员的功能包括参与细胞增殖、细胞存活、分化、凋亡、氧化应激、代谢、炎症、衰老及肿瘤

抑制等<sup>[2-6]</sup>。FoxO1 通过转录调节参与糖代谢、脂肪代谢等相关的疾病<sup>[7-8]</sup>,此外,已有研究<sup>[9-12]</sup>表明, FoxO1 参与了肿瘤的发生发展, FoxO1 在某些种类的肿瘤中表达下调,如乳腺癌、宫颈癌、肾癌、前列腺癌等。然而,有研究<sup>[13]</sup>指出了 FoxO1 在其他一些类型肿瘤中高表达,如膀胱癌。因此, FoxO1 在肿瘤发生发展过程中是否发挥不同作用值得探究。该研究对肺癌和食管癌及其相应的癌旁组织制作成的组织芯片 (tissue microarray, TMA) 进行免疫组化染色,探究 FoxO1 在肺癌和食管癌组织中的差异表达、具体亚细胞定位及相关影响因素;进一步在肺癌细胞系 A549 和食管癌细胞系 Eca109 中进行 FoxO1 的 siRNA 敲低及后续的克隆形成实验,初步探索 FoxO1 在肺癌和食管癌中的功能,了解 FoxO1 蛋白的亚细胞定位与肿瘤发生的可能关系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 收集 2013—2015 年在安徽医科大学第一附属医院经病理确诊的非小细胞肺癌组织及对应癌旁组织 110 例。收集 2018—2019 年在该院经病理确诊的食管癌组织样本及相应的癌旁组织 48 例。上述所有患者均未接受放疗或靶向治疗。每位患者签署了知情同意书。肺癌样本中,鳞癌组织 48 例,腺癌组织 62 例。男性 74 例,女性 36 例,年龄 48~73 岁,中位年龄 61 岁。食管癌样本全部为鳞癌,男性 38 例,女性 10 例,年龄 42~82 岁,中位年龄 66 岁。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司; RPMI 1640、DMEM 培养基购自美国 GE 公司; 胰酶细胞消化液购自上海碧云天生物技术有限公司; FoxO1 抗体购自武汉 Proteintech 公司 (18529-I-AP); Lipofectamine RNAi MAX 购自美国 Thermo Fischer Scientific 公司; 细胞总 mRNA 提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 二甲苯 (AR)、无水乙醇 (AR) 和 30%  $H_2O_2$  (AR) 购自上海国药集团; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化

2021-09-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81772908)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症学科, 合肥 230022

<sup>2</sup> 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 陈洁, 女, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn;

范晓云, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: 13956988552@126.com

\* 对本文具有同等贡献

物酶标记的山羊抗兔 IgG 和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司。

**1.1.3 主要仪器** 生物安全柜(BSC-2,新加坡 ES-CO 公司);微量核酸浓度检测仪(NanoDrop,美国 Thermo Fischer 公司);自动组织包埋机(HistoCroe Arcadia H&C,德国徕卡公司);全自动轮转切片机(RM2255,德国徕卡公司);光学显微镜(CX21,日本尼康公司)。

**1.1.4 细胞株** 肺癌细胞系 A549 和食管癌细胞系 Eca109 购自中国科学院上海细胞库。

**1.2 实验方法**

**1.2.1 细胞培养** A549 和 Eca109 复苏后,分别用含 10% 血清的 DMEM、RPMI 1640 培养基置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度的培养箱中培养 2~3 d 换液 1 次,细胞生长达 80%~90% 时传代。

**1.2.2 siRNA knockdown 实验** 将细胞用胰酶消化离心后重悬,按合适密度接种至适当的培养板中,次日细胞汇合度约 50%。用 Opti-MEM 分别稀释 siRNA 和 Lipofectamine RNAi MAX,静置 5 min 后,将两者等体积温和混匀,静置 20 min 后加入培养的细胞中,6 h 后更换不含抗生素的完全培养基继续培养。转染 48 h 后收集细胞进行后续检测。FoxO1 siRNA 序列见表 1。

表 1 FoxO1 siRNA 序列

名称	序列(5'-3')
阴性对照	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
siRNA 1	F: GCUCAAAUGCUAGUACUAUTT R: AUAGUACUAGCAUUUGAGCTT
siRNA 2	F: GCAGCCAGGCAUCUCAUAATT R: UUAUGAGAUGCCUGGCUGCTT
siRNA 3	F: CCACACAGUGUCAAGACAATT R: UUGUCUUGACACUGUGUGTT

**1.2.3 Western blot 实验** 弃去 6 孔板中的细胞培养液, PBS 洗涤 1 次, 弃尽残液, 加入 50~80 μl 细胞裂解液, 冰上裂解 15 min, 转移裂解液至 1.5 ml 离心管, 4 °C、14 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。配制 12% SDS-PAGE 凝胶, 每泳道上样 30 μg 总蛋白, 电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗涤后加入一抗置 4 °C 冰箱孵育过夜。次日 TBST 洗涤后加入二抗孵育, 再经 TBST 洗涤后进行 ECL 显影。

**1.2.4 qRT-PCR 实验** 弃去 12 孔板细胞培养液, 之后按试剂盒说明书提取细胞总 mRNA。微量核酸

浓度检测仪测定 mRNA 浓度和纯度。按逆转录试剂盒说明书进行逆转录获得 cDNA。PCR 反应体积 20 μl, 反应条件: 95 °C 初始变性 3 min、95 °C 变性 10 s、60 °C 退火 30 s、70 °C 延伸 30 s, 32 次循环。数据采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 FoxO1 与内参比值的相对表达量。FoxO1 qRT-PCR 引物序列见表 2。

表 2 FoxO1 qRT-PCR 引物序列

名称	序列(5'-3')
FoxO1	F: TCGTACGCCGACCTCATCA R: CTGTCGCCCTTATCCTTGAAGT
GAPDH	F: CAAGGTCATCCATGACAACCTTG R: GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

**1.2.5 免疫组化** 组织芯片置于二甲苯中脱蜡 15 min × 2 次, 取出玻片, 依次放入无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇和蒸馏水中, 每次 3 min。采用枸橼酸钠缓冲液进行抗原修复, 微波炉中高火加热至沸腾开始计时 7 min, 暂停 1 min 后继续加热至沸腾 5 min, 自然冷却至室温。将玻片放置湿盒内, PBS 清洗后滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液完全覆盖整个组织, 室温反应 30 min, PBS 洗涤 3 min × 3 次, 滴加一抗完全覆盖整个组织, 置 4 °C 冰箱内孵育过夜。次日恢复至室温, PBS 洗涤 3 min × 3 次, 滴加二抗, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 min × 3 次, 显微镜下进行 DAB 染色, 蒸馏水终止反应。加入苏木精染液中染色 2 min, 1% 盐酸乙醇分化、0.01 mol/L 碳酸锂蓝化后烘干, 二甲苯透明, 滴加中性树脂封片, 固定后显微镜下观察。根据染色强弱, 对染色结果分别评分为 0~3 分。0 分 细胞核和(或)细胞质内无棕色染色; 1 分 细胞核和(或)细胞质有淡黄色染色; 2 分, 细胞核和(或)细胞质有中等棕色染色; 3 分 细胞核和(或)细胞质有棕褐色染色。根据染色肿瘤细胞占有肿瘤细胞的比例, 分别评分为 1~4 分。1 分 0% < 染色细胞占比 ≤ 25%; 2 分 25% < 染色细胞占比 ≤ 50%; 3 分 50% < 染色细胞占比 ≤ 75%; 4 分 染色细胞占比 > 75%。综合评分 = 染色评分 × 占比评分。综合评分 > 3 分为阳性, 综合评分 > 6 分为高表达, 3 ≤ 综合评分 ≤ 6 分为低表达。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 软件对该实验数据进行统计分析, 率的比较采用 χ<sup>2</sup> 检验, 相关性分析采用 Spearman 相关性检验。所有实验数据资料均保留小数点后 3 位, P < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FoxO1 在肺癌组织细胞质中表达情况 肺癌组织的免疫组织化学结果显示,在正常呼吸性支气管上皮细胞和细支气管上皮细胞中,FoxO1 在细胞核和细胞质中都有表达;在肿瘤细胞中,FoxO1 主要在细胞质中表达。比较 FoxO1 在癌组织及对应癌旁组织细胞质中的表达情况,结果显示,在肺鳞癌组中,癌组织 FoxO1 表达高于癌旁的有 38 例,低表达的有 10 例,占比分别为 79.17% 和 20.83%;癌旁组织中高表达的有 12 例,低表达的有 36 例,占比分别为 25.00% 和 75.00%。在肺腺癌组中,癌组织细胞质中 FoxO1 高表达的有 43 例,低表达的有 19 例,占比分别为 69.35% 和 30.65%;癌旁组织细胞质中高表达的有 20 例,低表达的有 42 例,占比分别为 32.26% 和 67.74%。 $\chi^2$  检验比较肺鳞癌组和腺癌组 FoxO1 细胞质高、低表达占比情况,结果表明两种类型的肿瘤间差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.342, P = 0.247$ )。见图 1。

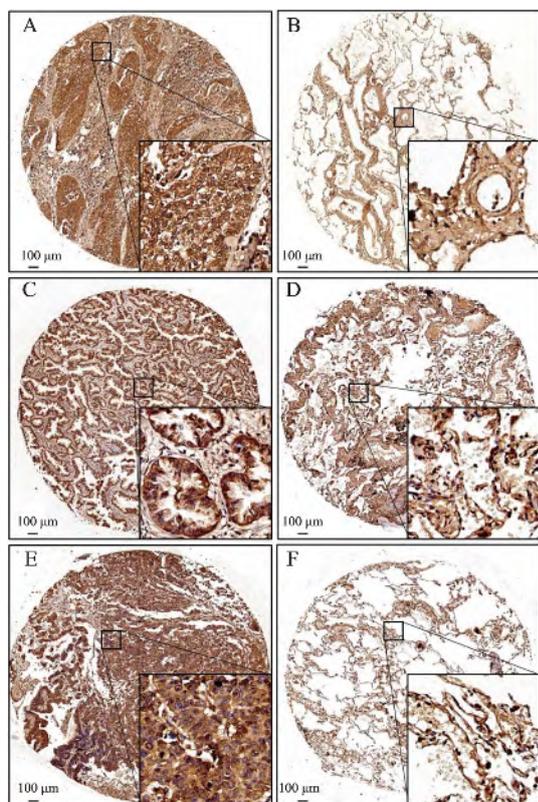


图 1 FoxO1 在肺鳞癌、肺腺癌及相应癌旁组织中的表达

A、B: 鳞癌及对应的癌旁组织; C、D: 腺泡型腺癌及对应的癌旁组织; E、F: 实体型腺癌及对应的癌旁组织; 原图  $\times 40$ ; 局部图  $\times 400$

2.2 FoxO1 在肺癌组织细胞质中的表达与临床各

指标间的相关性分析 FoxO1 在肺癌组织细胞质中表达的免疫组化评分与临床各指标间的相关性分析表明,细胞质中 FoxO1 的表达与性别、年龄、分化程度、侵袭程度、淋巴结转移以及肿瘤分期差异无统计学意义。见表 3、4。

表 3 FoxO1 在肺癌组织细胞质中表达的免疫组化评分与临床各指标间的相关性

相关因素	r 值	P 值
年龄	-0.063	0.515
分化程度	-0.133	0.173
TNM 分期	-0.088	0.359
肿块最大径	0.007	0.941
淋巴结总数	-0.143	0.136
淋巴结转移数目	-0.157	0.102

表 4 性别及组织类型对肺癌组织细胞质中 FoxO1 表达的影响 [n(%) ]

相关因素	FoxO1 表达情况		$\chi^2$ 值	P 值
	高表达	低表达		
性别			0.051	0.821
男	54(72.97)	20(27.03)		
女	27(75.00)	9(25.00)		
组织类型			1.342	0.247
腺癌	43(69.35)	19(30.65)		
鳞癌	38(79.17)	10(20.83)		

2.3 FoxO1 在食管癌组织中的表达 免疫组化结果显示,在食管癌癌旁组织中,FoxO1 主要表达在基底层和上皮细胞的细胞核中,间质细胞中表达较低或不表达,见图 2;在癌组织中,FoxO1 主要表达于肿瘤细胞的细胞质中,细胞核中表达减少或不表达,其表达与正常细胞中的定位有显著差异。癌旁组织样本中阳性表达 17 例,阴性表达 31 例;癌组织中阳性表达 41 例,阴性表达 7 例,癌组织中阳性率高于癌旁组织( $\chi^2 = 15.875, P < 0.01$ )。癌旁组织样本中高表达 9 例,低表达 39 例;癌组织中高表达 28 例,低表达 20 例,癌组织中阳性率高于癌旁组织( $\chi^2 = 25.089, P < 0.01$ )。

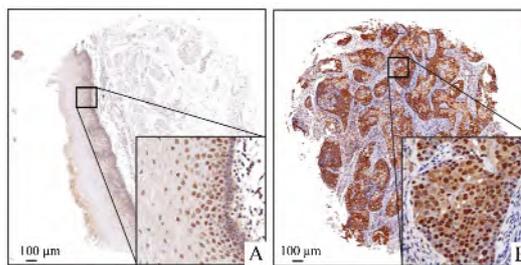


图 2 FoxO1 在食管癌癌旁和癌组织中的表达

A: 癌旁组织; B: 癌组织; 原图  $\times 40$ ; 局部图  $\times 400$

**2.4 FoxO1 在食管癌组织细胞质中的表达与临床各指标间的相关性分析** 该实验对 FoxO1 在食管癌组织中的免疫组化评分与临床各指标间的关系进行相关性分析,结果显示,FoxO1 的表达与肿瘤分期相关,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而与性别、年龄、是否吸烟、是否饮酒、分化程度、侵袭程度、淋巴结转移分期以及是否有其他消化系统疾病差异无统计学意义,见表 5、6。

表 5 FoxO1 在食管癌组织中的免疫组化评分与临床各指标间的相关性

相关因素	r 值	P 值
年龄	0.099	0.503
吸烟	0.025	0.871
饮酒	-0.118	0.455
分化程度	-0.010	0.949
肿瘤侵袭程度	0.247	0.098
肿瘤分期	0.348	<0.050
淋巴结转移分期	0.067	0.658

表 6 性别及伴有其他消化系统疾病对食管癌 FoxO1 免疫组化评判的影响 [n(%) ]

相关因素	FoxO1 表达情况		$\chi^2$ 值	P 值
	阴性	阳性		
性别			0.061	0.805
男	9(23.7)	29(76.3)		
女	2(20.0)	8(80.0)		
伴有其他消化系统疾病			0.152	0.697
是	2(25.0)	6(75.0)		
否	7(18.9)	30(81.1)		

**2.5 FoxO1 在肺癌细胞系 A549 和食管癌细胞系 Eca109 中的表达及定位** 为了验证肿瘤细胞系中 FoxO1 的表达是否与组织中的表达一致,该实验选择常用的肺癌细胞系 A549(图 3A~C)和食管癌细胞系 Eca109(图 3D~F)中进行 FoxO1 的内源性免疫荧光实验,并在激光共聚焦显微镜下观察结果。显微图像显示,在上述两种细胞系中,FoxO1 在细胞质和细胞核中均呈弥散分布,但细胞质的表达水平显著高于细胞核( $P < 0.01$ ),结果与组织中的免疫组化结果一致。

**2.6 FoxO1 siRNA 对 A549 和 Eca109 细胞中 FoxO1 的转录水平和蛋白表达水平的影响** 为了进一步了解 FoxO1 在肿瘤细胞中的功能,该实验使用 siRNA 干扰技术敲低 A549 和 Eca109 细胞的 FoxO1 的表达。Western blot 检测转染 FoxO1 siRNA 后 A549 和 Eca109 细胞中 FoxO1 蛋白表达水平(图 4A~D);提取细胞总 mRNA,qRT-PCR 检测转染

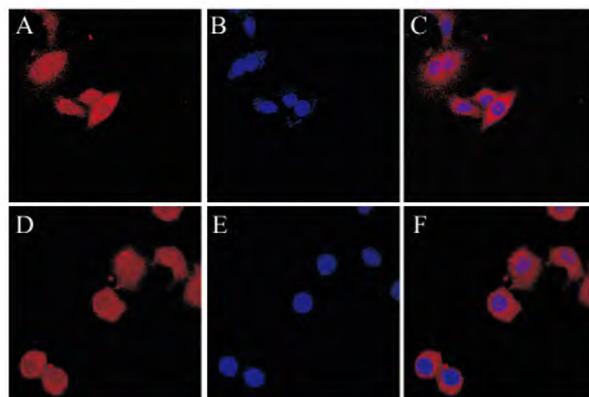


图 3 FoxO1 在 A549 和 Eca109 细胞中的定位 ×400

A~C: FoxO1 在 A549 细胞中的定位; D~F: FoxO1 在 Eca109 细胞中的定位; 红色显示 FoxO1,蓝色显示细胞核

FoxO1 siRNA 后 A549 和 Eca109 细胞中 FoxO1 mRNA 表达水平(图 4E、F)。结果显示,在成功转染 siRNA 后,细胞内 FoxO1 的 mRNA 和蛋白水平的表达均明显受到抑制( $P < 0.01$ )。

**2.7 A549 和 Eca109 细胞系中 FoxO1 的敲低对细胞增殖的影响** 为了探索 FoxO1 能否影响肿瘤细胞的增殖能力,该实验在 A549 细胞系(图 5A)和 Eca109 细胞系(图 5B)中瞬时转染 FoxO1 siRNA,随后进行相应的克隆形成实验。实验结果显示,在上述两种细胞系中,FoxO1 敲低组相对于阴性对照组的细胞克隆数明显降低( $P < 0.01$ ),提示 FoxO1 的敲低抑制了肿瘤细胞的增殖。

### 3 讨论

在早期阶段,采用免疫组化实验研究蛋白分子在组织中的表达时,各样本组织贴附在多张载玻片上,在 DAB 显色操作时,各标本显色时间不易控制在相同时间,造成最终的组织显色存在误差,对染色结果产生较大的影响。近年来,利用组织芯片技术将多个样本组织贴附在同一张载玻片上制作成组织芯片,随后进行免疫组化实验,可有效避免显色时间差异的弊端,各组织样本间的差异性得到可靠体现。

该研究利用肺癌和食管癌组织芯片,使用兔 FoxO1 多克隆抗体检测肺癌和食管癌组织细胞质中 FoxO1 的表达情况,根据染色强弱和阳性细胞率形成综合评分并与临床病理多个指标进行相关性分析。该实验的免疫组化结果显示,在正常支气管上皮细胞中,FoxO1 在细胞核和细胞质中都有表达;在肺癌细胞中,FoxO1 主要在细胞质中表达。在正常食管上皮细胞中,FoxO1 主要表达在细胞核内,细胞

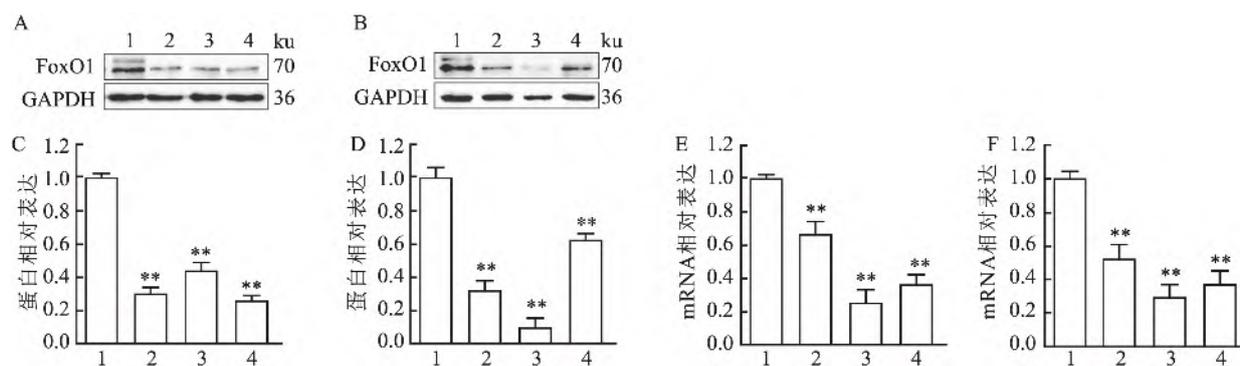


图4 FoxO1 siRNA knockdown后 FoxO1 mRNA 和蛋白表达水平检测

A、C: A549 细胞中的 FoxO1 蛋白水平的敲低效果检测; B、D: Eca109 细胞中的 FoxO1 蛋白水平的敲低效果检测; E: A549 细胞中的 FoxO1 mRNA 水平的敲低效果检测; F: Eca109 细胞中的 FoxO1 mRNA 水平的敲低效果检测; 1: 阴性对照组; 2~4: FoxO1 的 3 个序列敲低组; 与阴性对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

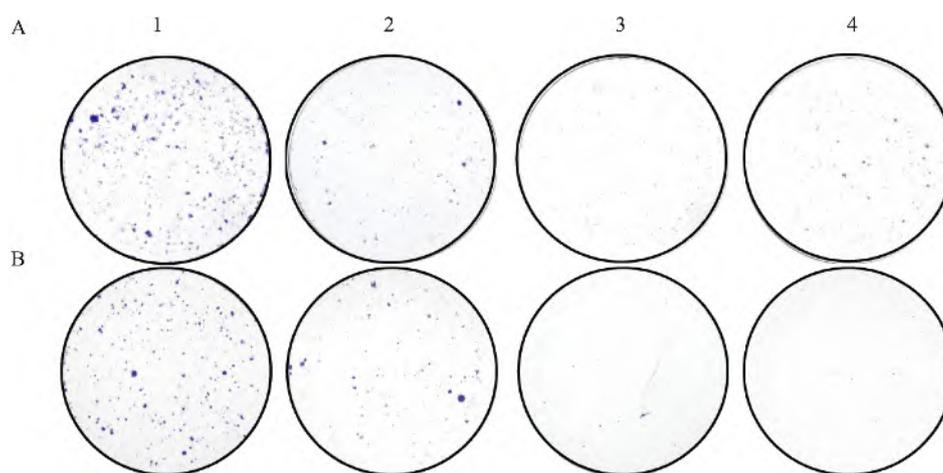


图5 A549 和 Eca109 细胞系 FoxO1 的 siRNA 敲低抑制细胞增殖

A: A549 细胞系; B: Eca109 细胞系; 1: 阴性对照组; 2~4: 3 个 siRNA 敲低组

质中不表达或低表达; 在食管癌细胞中, FoxO1 主要表达在胞质中。可见, FoxO1 在肿瘤细胞中的表达分布发生了明显的改变, 即在细胞核中表达减少, 而更多地发生了细胞核向细胞质的转位。通过内源性免疫荧光实验, 可以清晰观察到, FoxO1 在肺癌细胞系 A549 和食管癌细胞系 Eca109 细胞核中的表达显著低于细胞质。在缺乏外界应激刺激因子、存活因子或生长因子时, FoxO1 定位在细胞核中并发挥转录因子活性。而在肿瘤细胞中, PI3K/AKT 信号通路被组成性激活, 随后 AKT 磷酸化 FoxO1, 进而促进 FoxO1 转移至细胞质中失去转录调节活性<sup>[4]</sup>。用 PI3K/AKT 信号通路特异性抑制剂 LY294002 和 MAPK/ERK 信号通路特异性抑制剂 UO126 分别处理 A549 细胞, 均可导致 FoxO1 从细胞质向细胞核的转位, 进而能够抑制细胞增殖<sup>[14]</sup>。因此, 该结果提示, FoxO1 在细胞核中发挥抑制肿瘤细胞增殖的

作用。随后进行的 siRNA 敲低及相应克隆形成实验表明, 细胞质中高表达 FoxO1 的 A549 和 Eca109 细胞中, FoxO1 的敲低能够抑制细胞增殖, 结合免疫组化结果即肿瘤组织细胞质中 FoxO1 普遍高表达, 提示肿瘤细胞质中高表达的 FoxO1 可能发挥促癌作用。

FoxO1 蛋白的表达和活性受到转录与翻译以及翻译后的乙酰化、磷酸化或泛素化修饰的多重调节<sup>[15]</sup>。鉴于 FoxO1 在细胞内的不同定位、作用及其自身活性调节的复杂性, 其在肿瘤发生、发展中的确切作用机制有待进一步揭示。

### 参考文献

- [1] Poudel S B, Dixit M, Neginskaya M, et al. Effects of GH/IGF on the aging mitochondria [J]. Cells, 2020, 9(6): 1384.
- [2] Genin E C, Caron N, Vandenbosch R, et al. Concise review: forkhead pathway in the control of adult neurogenesis [J]. Stem

- Cells, 2014, 32(6): 1398–407.
- [3] 夏温舒, 柴可夫, 毛竹君. 运脾和络汤调控 SIRT1-FoxO1 通路改善 2 型糖尿病大鼠胰腺脂肪异位沉积的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1731–4.
- [4] Farhan M, Silva M, Xing X, et al. Role of FOXO transcription factors in cancer metabolism and angiogenesis [J]. Cells, 2020, 9(7): 1586.
- [5] Webb A E, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control [J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4): 159–69.
- [6] Li C, Zhang W, Liu M, et al. Aquaporin 9 inhibits hepatocellular carcinoma through up-regulating FOXO1 expression [J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 44161–70.
- [7] Link W, Fernandez-Marcos P J. FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer [J]. Int J Cancer, 2017, 141(12): 2379–91.
- [8] Maiese K. FoxO transcription factors and regenerative pathways in diabetes mellitus [J]. Curr Neurovasc Res, 2015, 12(4): 404–13.
- [9] Guttilla I K, White B A. Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2009, 284(35): 23204–16.
- [10] Zhang B, Gui L, Zhao X, et al. FOXO1 is a tumor suppressor in cervical cancer [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 6605–16.
- [11] Kojima T, Shimazui T, Horie R, et al. FOXO1 and TCF7L2 genes involved in metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2010, 49(4): 379–89.
- [12] Fendler A, Jung M, Stephan C, et al. The antiapoptotic function of miR-96 in prostate cancer by inhibition of FOXO1 [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80807.
- [13] Guo Y, Liu H, Zhang H, et al. miR-96 regulates FOXO1-mediated cell apoptosis in bladder cancer [J]. Oncol Lett, 2012, 4(3): 561–5.
- [14] 张洪开, 具英花, 徐韬钧, 等. PI3K 和 MAPK 信号通路对 A549 细胞 FOXO1 蛋白表达及其亚细胞定位的调节 [J]. 解剖科学进展, 2012, 18(2): 126–9, 133.
- [15] 曹自为, 李传文, 刘学春, 等. 白藜芦醇通过 SIRT1/FoxO1 途径改善大鼠脑缺血/再灌注损伤机制研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(5): 719–23.

## The differential expression and function of cytoplasmic FoxO1 in cancer cells

Chen Jie<sup>1</sup>, Geng Huiwu<sup>2</sup>, Wang Fengjie<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Geriatric Respiratory and Critical Care, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>2</sup>Dept of Biology, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the differential expression and distribution of forkhead-box O class 1 (FoxO1) protein in lung cancer and esophageal carcinoma tissues, and to explore the association between subcellular distribution and function of FoxO1. **Methods** Immunohistochemistry was conducted to evaluate the cytoplasmic expression of FoxO1 in tissue microarray (TMA) of clinical lung cancer and esophageal carcinoma samples. The differential expression of FoxO1 in pattern and distribution between cancer and normal tissues were analyzed. Statistical analyses were performed to explore the correlation between the cytoplasmic FoxO1 protein and the clinicopathological characteristics of patients; the expression and localization of FoxO1 in lung cancer cell line A549 and esophageal carcinoma cell line Eca109 were analyzed by immunofluorescence; the siRNA knockdown and subsequent colony formation experiments were performed to investigate the effect of FoxO1 on tumor cell proliferation. **Results** The cytoplasmic FoxO1 expression in lung cancer and esophageal carcinoma tissues was higher than that in the corresponding paracancerous tissues ( $P < 0.05$ ), and there was no significance in the differential expression of cytoplasmic FoxO1 between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma tissues; FoxO1 was dominantly localized to the cytoplasm, with less in the nucleus ( $P < 0.05$ ); the FoxO1 knockdown in A549 and Eca109 cells inhibited cell proliferation. **Conclusion** The expression of FoxO1 in lung cancer and esophageal carcinoma tissues is upregulated in the cytoplasm, while downregulated in the nucleus; the increased cytoplasmic expression of FoxO1 in cancer cells may promote cell proliferation.

**Key words** FoxO1; lung cancer; esophageal carcinoma; immunohistochemistry; differential expression