

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.004

· 基础研究 ·

FOXD1在食管鳞状细胞癌组织中表达的意义及其对TE1细胞恶性生物学行为影响的分子机制

王淑彬^a, 潘腾^a, 张跃华^a, 郭盛虎^a, 董稚明^b, 汪治宇^a, 吴峥^a(河北医科大学第四医院 a. 肿瘤免疫科; b. 肿瘤研究所, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 分析FOXD1在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达及其与临床病理特征和患者预后的关系, 探讨其对ESCC TE1细胞增殖、侵袭能力的影响及其对TGF- β 1诱导TE1细胞EMT进程的影响。**方法:** 采用qPCR和IHC法检测ESCC组织和细胞中FOXD1的表达, 并分析其与临床病理特征和患者预后的关系; 构建FOXD1敲减质粒并转染TE1细胞, 检测其对TE1细胞增殖、侵袭能力的影响; 用qPCR和WB法检测TGF- β 1处理前后FOXD1及EMT相关基因和蛋白的表达变化及敲减FOXD1对EMT相关基因和蛋白表达的影响。**结果:** ESCC组织和细胞中FOXD1均呈高表达(均 $P<0.01$), 并与患者OS呈负相关; FOXD1表达水平、肿瘤TNM分期以及淋巴结转移均是影响ESCC患者预后的独立危险因素(均 $P<0.01$)。TGF- β 1可促进TE1细胞FOXD1的表达, 并诱发其EMT进程(均 $P<0.05$); 敲减FOXD1可抑制TE1细胞的增殖和侵袭能力, 并可部分逆转由TGF- β 1诱发的TE1细胞EMT进程。**结论:** FOXD1在ESCC组织及TE1细胞中呈高表达且是影响ESCC患者预后的独立危险因素, 敲低FOXD1可显著抑制TE1细胞的增殖、侵袭及TGF- β 1介导的EMT进程。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; FOXD1; TGF- β 1; 增殖; 侵袭; 上皮间质转化; 预后

[中图分类号] R730.2; R735.1; R730.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)12-1087-07

Clinical significance of FOXD1 expression in esophageal squamous cell carcinoma and the mechanism of its effect on the malignant biological behaviors of TE1 cells

WANG Shubin^a, PAN Teng^a, ZHANG Yuehua^a, GUO Shenghu^a, DONG Zhiming^b, WANG Zhiyu^a, WU Zheng^a (a. Department of Oncology and Immunology; b. Institute of Oncology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the expression of FOXD1 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and its relationship with clinicopathological features and prognosis. To investigate the effect of FOXD1 on the proliferation and invasion of TE1 cells and its effect on TGF- β 1 induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** The expression of FOXD1 in ESCC tissues and cells was detected by qPCR and immunohistochemical method (IHC). The relationships between its expression level and clinicopathological characteristics and prognosis of patients were also analyzed. FOXD1 knockdown plasmid was constructed and transfected into TE1 cells to detect its effect on the proliferation and invasion of TE1 cells. qPCR and Western blotting were used to detect the expression levels of FOXD1 and EMT-related markers before and after TGF- β 1 treatment and the effect of knockdown FOXD1 on the expression of EMT-related markers. **Results:** FOXD1 was highly expressed in ESCC tissues and cells (all $P<0.01$), and negatively correlated with the overall survival of patients. FOXD1 expression level, tumor TNM stage, and lymph node metastasis were independent factors affecting the prognosis of ESCC patients (all $P<0.01$). TGF- β 1 treatment may raise the expression level of FOXD1 in TE1 cells and induce the expression of EMT-related markers (all $P<0.05$). Knockdown FOXD1 may suppress the proliferation and invasion ability of TE1 cells and can partially reverse the EMT process of TE1 cells induced by TGF- β 1. **Conclusion:** FOXD1, highly expressed in ESCC tissues and TE1 cells, is an independent factor affecting the prognosis of ESCC patients. Knockdown of FOXD1 can significantly inhibit the proliferation, invasion and TGF- β 1 mediated EMT process of TE1 cells.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); FOXD1; TGF- β 1; proliferation; invasion; epithelial mesenchymal transition (EMT); prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(12): 1087-1093. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.12.004]

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划资助项目(No. 20220154)

[作者简介] 王淑彬(1990—), 女, 博士, 主治医师, 主要从事肿瘤病因学和肿瘤免疫治疗学的研究, E-mail: 1012028545@qq.com

[通信作者] 吴峥, E-mail: 20181107@stu.hebmu.edu.cn

食管癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 患者的生存率较差^[1]。国内 80%~90% 的食管癌病理分型为食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC), 因此, 揭示 ESCC 的发病机制有利于新治疗方法的开发。叉头框(forkhead box, FOX)蛋白家族是一种相对保守的转录调节因子, 在多种功能活动中发挥作用。越来越多的证据表明 FOX 基因家族中许多成员与癌症发生发展相关^[2-3]。FOXD1 是 FOX 家族重要的转录因子之一, 定位于 5q13.2, 编码一个含有 465 个氨基酸的 DNA 结合蛋白, 参与多种生物学功能^[4-5]。此外, FOXD1 在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用, 主要与肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程有关^[6-7]。有研究表明, FOXD1 在前列腺癌 EMT 进程中发挥重要作用, 敲低 FOXD1 可以抑制前列腺癌细胞的迁移^[8]。然而, 关于 FOXD1 在 ESCC 中的作用及其机制尚不清楚。本研究着重探讨 FOXD1 在 ESCC 组织和细胞中的表达及其临床意义, 分析 FOXD1 对 ESCC TE1 细胞增殖、侵袭和 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程的影响及分子机制, 以期为 ESCC 的治疗和预后评估提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞和试剂

本研究选取的 76 例 ESCC 组织及其癌旁组织标本均由河北医科大学第四医院生物样本库收集, 患者术前均未接受放疗、化疗等治疗。本实验研究方案获本院伦理委员会批准(批准号: No.2021KY351), 患者已签署知情同意书。每例组织标本包括 ESCC 组织及癌旁组织。每例标本均分为两部分, 一部分在 -80 °C 低温冰箱保存用于提取 RNA; 另一部分制作成蜡块保存, 行 H-E 染色, 由两位病理医师确诊为 ESCC, 同时癌旁组织镜下未见浸润肿瘤细胞。

ESCC 细胞 KYSE150、KYSE170、TE1、ECA109 和 YES2 均由河北医科大学第四医院肿瘤研究所病理研究室保留并传代。TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自美国 BI 公司, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, LipofectamineTM2000 购自美国 Thermo 公司, 反转录 PCR 试剂盒购自瑞士 Roche 公司, MTS 试剂购自 Promega 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, 人重组 TGF- β 1、基质胶购自美国 BD 公司。兔抗人 FOXD1 的抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗 SNAI1、 β -catenin 及 vimentin 抗体均购自北京博奥森公司, 兔抗 E-cadherin 及 N-cadherin 抗体购自武汉伊莱瑞特公司, 鼠抗 β -actin 抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗兔或鼠二抗均购自 Abcam 公司。qPCR 引物购自上海捷瑞有限公司。

1.2 细胞培养及 TGF- β 1 处理

KYSE150、KYSE170、TE1、ECA109 和 YES2 等 ESCC 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。TGF- β 1 对 TE1 细胞处理方法: 取状态良好处于对数生长期的细胞常规培养, TGF- β 1 处理组用 10 ng/mL 重组 TGF- β 1 (溶解于 10 mmol/L 枸橼酸钠) 处理, 每 2 d 更换 1 次培养基并加入 TGF- β 1, 培养 21 d; 对照组用相同条件培养, 但只加入相同体积的 10 mmol/L 枸橼酸钠溶液。

1.3 细胞分组及转染

取处于对数生长期的 TE1 细胞 (2×10^5 个/孔) 接种于 6 孔板中, 按说明书将对照质粒 si-NC、敲减质粒 (si-FOXD1-1、si-FOXD1-2、si-FOXD1-3) 分别转染 TE1 细胞, 标记为 si-NC 组、si-FOXD1-1 组、si-FOXD1-2 组和 si-FOXD1-3 组。转染 48 h 后收集细胞, 提取总 RNA, 用 qPCR 法验证转染后 FOXD1 的敲减效率。

1.4 qPCR 法检测 ESCC 组织及细胞中 FOXD1 及 EMT 相关基因的表达

用 TRIzol 试剂提取 ESCC 细胞、ESCC 组织及癌旁组织中的总 RNA, 用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。qPCR 采用两步法, 反应条件: 95 °C 2 min, 95 °C 15 s、60 °C 30 s, 共计 40 个循环。引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参照基因, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 FOXD1 及 EMT 相关基因的相对表达量。

表 1 qPCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
FOXD1	F: TGAGCACTGAGATGTCCGATG R: CACCACGTCGATGTCTGTTTC
E-cadherin	F: CGAGAGCTACACGTTACCGG R: GGCCTTTTGACTGTAATCACACC
N-cadherin	F: CAACTTGCCAGAAACTCCAGG R: ATGAAACCGGGCTATCTGCTC
Vimentin	F: CGCCTGCAGGATGAGATTACAG R: TCAGGGAGGAAAAGTTTGGAAGA
SNAI1	F: ACGAGGTGTGACTAATACTAT R: CGACAAGTGACAGCCATT
β -catenin	F: GCTTGTTCGTGCACATCAGGATA R: GGCTCCGGTACAACCTTCAACTA
GAPDH	F: AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG R: AGGGGTCATTGATGGCAACA

1.5 IHC 法检测 ESCC 组织中 FOXD1 蛋白的表达

石蜡切片常规脱蜡入水, 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 加入 FOXD1 抗体 (1:300) 4 °C 下处理过夜。次日, 加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗室温下处理 1 h, DAB 显色, H-E 复染、脱水、封片。采用半定量双

评分标准进行评分, 每张切片随机选取 5 个不重叠的高倍视野($\times 400$), 根据染色深浅和阳性细胞所占的百分率进行评分。(1)染色强度评分: 没有着色为 0 分, 浅着色为 1 分, 中等着色为 2 分, 强着色为 3 分; (2)阳性细胞百分率评分: $0\% \sim \leq 25\%$ 为 1 分, $>25\% \sim \leq 50\%$ 为 2 分, $>50\% \sim \leq 75\%$ 为 3 分, $>75\% \sim 100\%$ 为 4 分; (3)正式评分为染色强度评分 $\times$ 阳性细胞百分率: $0 \sim 1$ 分为阴性; $2 \sim 4$ 分为弱阳性; $5 \sim 8$ 分为中等阳性; $9 \sim 12$ 分为强阳性, 将其中弱阳性、中等阳性及强阳性定义为阳性^[9]。所有切片均由 2 位有经验的临床病理医师采用双盲法阅片评估, 根据评分的平均值来确定判定结果。

1.6 MTS 法检测转染后各组 TE1 细胞的增殖能力

将转染 24 h 后的细胞(1×10^3 个/孔)接种于 96 孔板中, 在细胞贴壁后 0、24、48、72、96 h 时, 每孔中加入 MTS 试剂 20 μ L (500 μ g/mL), 继续培养 2 h, 用酶标仪测定 490 nm 处的光密度(D)值, 以 D 值表示细胞的增殖能力。

1.7 Transwell 小室实验检测转染后各组 TE1 细胞的侵袭能力

吸取 50 μ L 稀释的基质胶加入小室内, 37°C 恒温培养箱内放置过夜。转染细胞培养 24 h 后, 向上室内加入含有 1×10^5 个细胞的无血清培养基 200 μ L, 下室加入含 10% 胎牛血清的培养基 600 μ L。常规培养细胞 24 h 后固定、染色, 倒置显微镜($\times 200$)观察下拍照、计数。

1.8 WB 法检测转染后 TE1 细胞中 EMT 相关蛋白的表达

取转染后各组细胞提取总蛋白, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样本经 SDS-PAGE 分离、转膜, 在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBS 洗膜后加入一抗(均为 1:1 000 稀释)于 4°C 下处理过夜, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:10 000 稀释) 37°C 下处理 1.5 h, 使用增强型化学发光检测试剂盒进行显影, 用凝胶成像仪捕获条带图像, 以 β -actin 作为内参照, 计数出目的蛋白相对表达量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 相关图表使用 GraphPad Prism 8.0 软件完成。所有实验均独立重复 3 次, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用 t 检验; 计数资料以率表示, 比较采用卡方检验; 采用 Kaplan-Meier 和 COX 比例风险回归模型对 ESCC 患者生存和预后影响因素进行分析。以上均为双尾侧检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCC 组织及细胞中 FOXD1 mRNA 呈高表达

qPCR 检测结果(图 1)显示, 与癌旁组织相比, ESCC 癌组织中 FOXD1 mRNA 呈高表达(图 1A, $P < 0.05$)。随机选取 10 例 ESCC 患者的癌旁组织 mRNA 混合后作为对照(Pool)组, 与此对照组相比, KYSE150、KYSE170、TE1、ECA109 和 YES2 细胞中 FOXD1 mRNA 均呈高表达(图 1B, 均 $P < 0.01$)。

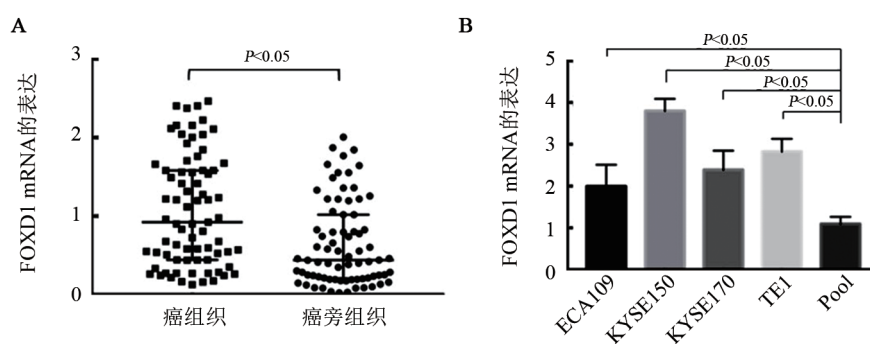


图1 FOXD1 mRNA 在 ESCC 组织(A)细胞(B)中的表达

2.2 ESCC 组织中 FOXD1 蛋白的表达及其与患者临床病理特征和预后的关系

IHC 法检测结果(图 2)显示, 与癌旁组织相比, ESCC 组织中 FOXD1 细胞阳性率显著升高[(65.8% (50/76) vs 30.3% (23/76); $\chi^2 = 19.214$, $P < 0.01$)]。根据 FOXD1 在 ESCC 组织中表达的平均值(1.09)将患者分为 FOXD1 高表达组(50 例)和低表达组(26 例)。结合临床病理资料(表 2)分析发现, ESCC 组织中 FOXD1 表达水平与患者有无淋巴结转移($\chi^2 = 5.216$,

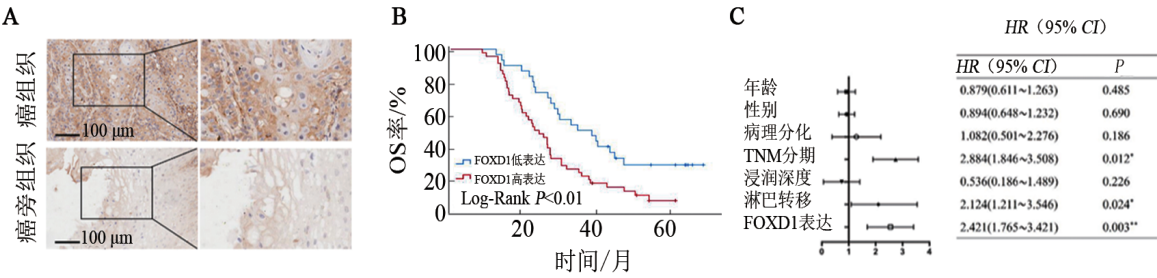
$P = 0.020$)和肿瘤 TNM 分期($\chi^2 = 5.322$, $P = 0.019$)有关联, 与患者的年龄、性别及病理分化程度均无关联(均 $P > 0.05$)。应用 Kaplan-Meier 方法分析 FOXD1 的表达水平对 ESCC 患者预后的影响, 结果显示, FOXD1 低表达组患者的 5 年 OS 率为 28.6%(中位 OS 为 34.6 个月), 高表达组患者 5 年 OS 率为 12.4%(中位 OS 为 22.9 个月), FOXD1 高表达患者的 5 年 OS 率明显低于低表达患者(图 2B, $P < 0.01$)。COX 多因素回归分析发现, FOXD1 表达水平、肿瘤 TNM 分期以及

淋巴结转移是影响 ESCC 患者预后的独立危险因素 (图 2C, $P<0.01$)。

表 2 FOXD1 在 ESCC 组织中的表达与患者临床病理特征的关系 [$N=76, n(\%)$]

临床病理特征	分组例数	FOXD1 表达		<i>P</i>
		低($n=26$)	高($n=50$)	
年龄/岁				0.931
<55	20	7(35.0)	13(65.0)	
≥55	56	19(33.9)	37(66.1)	
性别				0.301
男	47	14(29.8)	33(70.2)	
女	29	12(41.4)	17(58.6)	
TNM 分期				0.008**
I+II	31	16(51.6)	15(48.4)	
III+IV	45	10(22.2)	35(77.8)	
淋巴结转移				0.036*
无转移(N0)	37	17(45.9)	20(54.1)	
有转移(N1~3)	39	9(23.1)	30(76.9)	
病理学组织分级				0.149
高/中分化	41	17(41.5)	24(58.5)	
低分化	35	9(25.7)	26(74.3)	

与低表达组比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

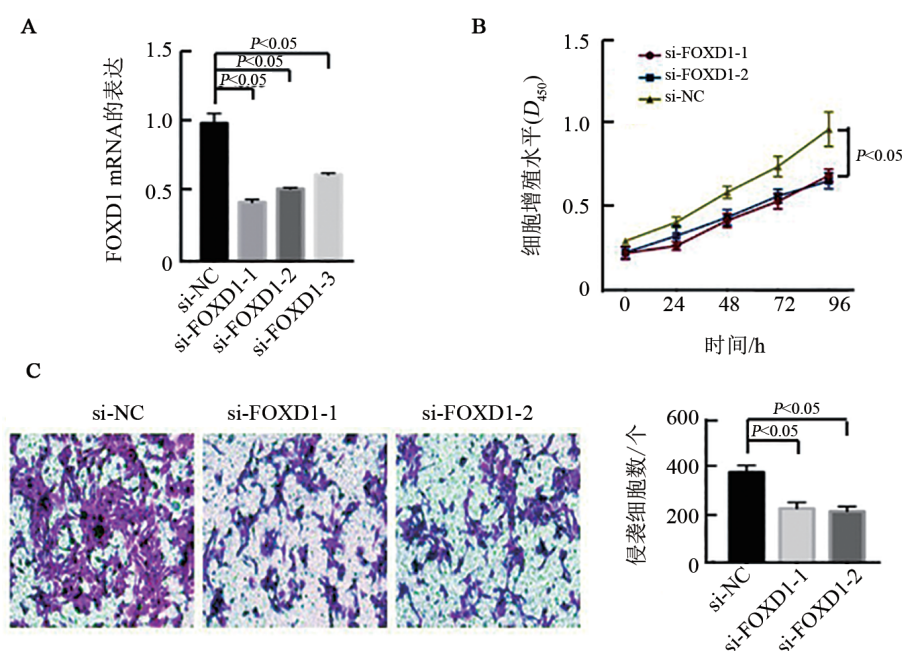


与低表达组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

图 2 ESCC 组织中 FOXD1 蛋白的表达(A)及其与患者 OS(B)的关系和预后危险因素分析(C)

2.3 敲低 FOXD1 能抑制 TE1 细胞的增殖和侵袭能力
qPCR 法检测结果(图 3)显示,与 si-NC 组相比, si-FOXD1-1~3 组 TE1 细胞中, FOXD1 mRNA 表达水平均降低(图 3A, 均 $P<0.05$), 实验说明转染后的 TE1 细胞中被成功地敲减了 FOXD1 mRNA 的表达。在敲减结果中以 si-FOXD1-1~2 组降低最为明显, 因此, 选择 si-FOXD1-1~2 进行后续实验。MTS 实验结果(图 3B)显示, 与 si-NC 组相比, si-FOXD1-1~2 组 TE1 细胞的增殖活性均显著降低(均 $P<0.05$)。Transwell 小室实验结果(图 3C)显示, 与 si-NC 组相比, si-FOXD1-1~2 组侵袭的 TE1 细胞数均显著降低(均 $P<0.05$)。实验结果说明, 敲减 FOXD1 能有

效抑制 TE1 细胞的增殖、侵袭能力。
2.4 TGF-β1 促进 TE1 细胞中 FOXD1 和 EMT 相关蛋白的表达
经过 10 ng/mL 的 TGF-β1 连续处理 21 d 后, 显微镜下可见 TE1 细胞变为纺锤形、细长成纤维样, 呈现出典型的间充质细胞形态, 而 TGF-β1 未处理的 TE1 细胞仍为鹅卵石样(图 4A)。qPCR 法(图 4B)和 WB 法(图 4C)检测结果显示, 与未处理组相比, TGF-β1 处理组 TE1 细胞中 FOXD1 表达水平显著升高($P<0.05$), E-cadherin 表达水平明显下调(均 $P<0.05$), 而 N-cadherin、vimentin、SNAIL 和 β-catenin 表达水平均明显上调(均 $P<0.05$)。



A: 在 TE1 细胞中敲减 FOXD1 效率的鉴定; B: MTS 法检测敲减 FOXD1 表达对 TE1 细胞增殖的影响;

C: Transwell 小室实验检测敲减 FOXD1 表达对 TE1 细胞侵袭能力的影响($\times 200$)

图3 敲减 FOXD1 对 TE1 细胞增殖、侵袭能力的影响

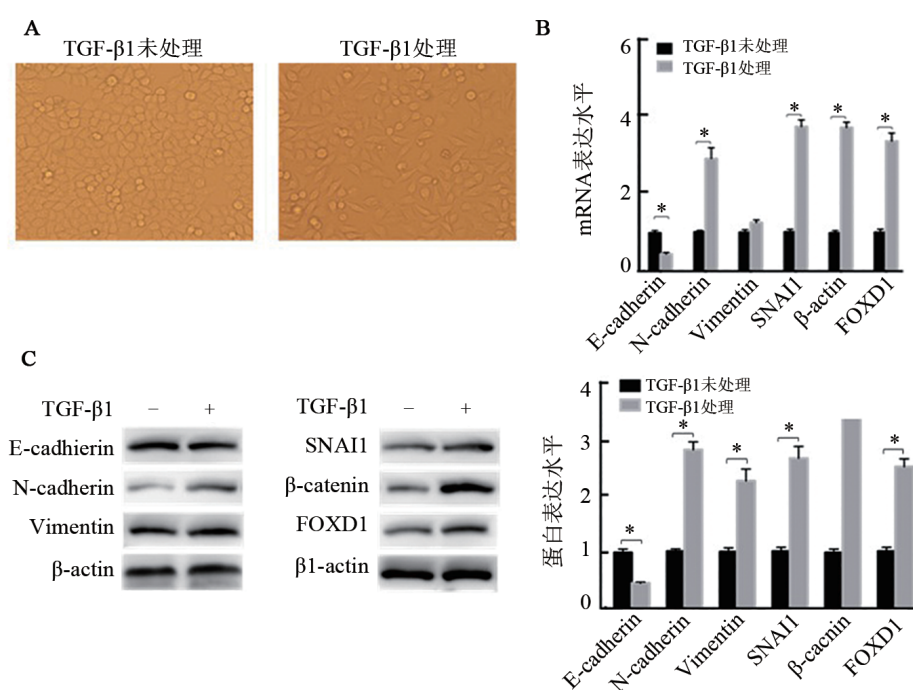
* $P < 0.05$ A: TGF-β1 处理 21 d 后 TE1 细胞形态的改变($\times 200$); B: 应用 qPCR 法检测 TGF-β1 处理前后 FOXD1 以及 EMT 相关 mRNA 表达水平的变化; C: 应用 WB 法检测 TGF-β1 处理前后 FOXD1 以及 EMT 相关蛋白表达水平的变化

图4 TGF-β1 对 TE1 细胞中 FOXD1 的表达和 EMT 相关基因表达水平的影响

2.5 敲减 FOXD1 能部分逆转 TGF-β1 诱导的 TE1 细胞 EMT 进程

WB 法结果(图5)显示,与 si-NC 组相比, si-FOXD1 组 TE1 细胞中 E-cadherin 表达水平明显升高, SNAIL 和 β-catenin 表达水平均明显降低(均 $P < 0.05$),说明敲

减 FOXD1 能抑制 TE1 细胞的 EMT 进程; TGF-β1 处理后,敲减 FOXD1 能部分抑制 TGF-β1 对 E-cadherin 表达的抑制作用和对 SNAIL 和 β-catenin 表达的促进作用(均 $P < 0.05$)。实验结果表明,敲减 FOXD1 可部分逆转 TGF-β1 诱发的 TE1 细胞的 EMT 进程。

3 讨论

FOXD1 隶属于 FOXD 亚族蛋白, 又称为脑因子 2 (brain factor-2, BF-2), 最早由 HATINI 等^[10]描述并定义, 最初的研究主要集中在其在胚胎发育中的作用, 参与肾的早期发育和视网膜的形成^[11-12]。近年来的研究提示 FOXD1 在癌症进程中也发挥着重要作用, 其异常表达可调控肿瘤的细胞增殖、侵袭、转移和血管生成等生物学功能。多数研究^[7, 13-16]发现, FOXD1 基因在宫颈癌、乳腺癌、口腔鳞状细胞癌、肝细胞癌和胰腺导管癌等多种癌组织中呈高表达, 且与较差的预后相关。然而 WANG 等^[17]发现, FOXD1 在卵巢癌中表达下调, FOXD1 的高表达是良好预后的预测因子。以上研究充分证明了 FOXD1 与肿瘤的发生发展密切相关。本研究发现 FOXD1 在 ESCC 组织及 5 种 ESCC 细胞中均呈高表达, 生存分析表明 FOXD1 的表达与 ESCC 患者的 OS 呈负相关, 反映了其在 ESCC 中发挥的促癌特性; 该结果与以往大多数研究结果相似。

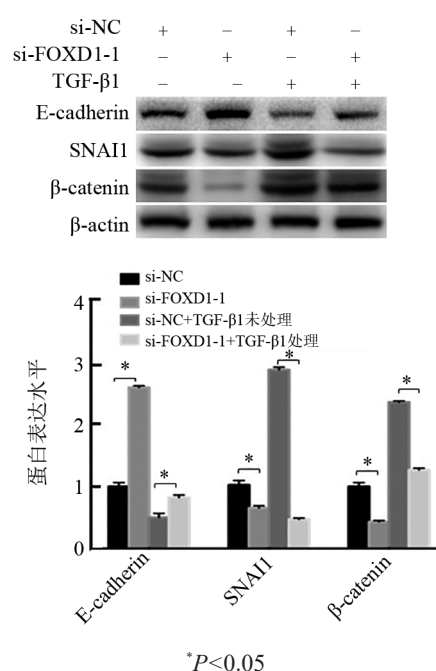


图5 敲低 FOXD1 对 TE1 细胞中 TGF-β1 介导的 EMT 相关蛋白表达的影响

FAN 等^[18]发现, FOXD1 可与 ZNF532 启动子结合并激活其转录, 靶向调控喉鳞状细胞癌的 EMT 进程, 增强喉癌 AMC-HN-8 和 TU212 细胞的侵袭能力; CHEN 等^[14]发现, 口腔鳞状细胞癌中 FOXD1 通过激活 SNAIL2 促进细胞的 EMT 进程和干细胞特性; 另外, FOXD1 可与 CTGF 启动子直接结合并调节其表达水平, 以促进黑色素瘤的去分化和靶向治疗的耐药^[19]。

上述多项研究证实, FOXD1 在多种实体瘤中通过不同作用机制参与肿瘤发生发展过程。本研究在 FOXD1 高表达的 TE1 细胞中敲减 FOXD1 表达, 可显著抑制 TE1 细胞的增殖和侵袭能力, 提示 FOXD1 可能在 ESCC 侵袭、转移等恶性生物学进程中扮演重要角色, 与既往研究结果^[20-21]一致。

EMT 促进肿瘤细胞的运动、侵袭能力, 在肿瘤侵袭转移过程中发挥关键作用, 表明 EMT 进程在恶性肿瘤的发生发展过程中被激活^[22]。在肿瘤微环境中 EMT 可由特定的几个细胞外信号诱导, 其中 TGF-β 是诱导 EMT 进程最有效的刺激因子^[23]。TGF-β 除了激活经典 Smad 通路外, 还可以激活 Ras/MAPK、Rho 样 GTPase 及 PI3K/AKT 等旁路途径, 介导 EMT 进程^[24]。本研究应用 EMT 最有效的刺激因子 TGF-β1 处理 TE1 细胞, 成功诱导 TE1 细胞发生 EMT, 敲减 FOXD1 表达可部分逆转 TGF-β1 诱发的 TE1 细胞的 EMT 进程。

综上所述, 本研究结果表明 FOXD1 在 ESCC 组织及细胞中呈高表达并与患者预后不良相关, 是影响 ESCC 患者预后的独立因素。敲低 FOXD1 可显著抑制 TE1 细胞的增殖、侵袭及 TGF-β1 介导的 TE1 细胞的 EMT 进程, 提示 FOXD1 在 ESCC 中发挥促癌作用。本研究结果为寻求 ESCC 的潜在预后标志物及治疗靶标提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 张丽亚, 张成娟. 单细胞测序技术在食管癌研究中的应用的进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2022, 29(4): 360-366. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.04.014.
- [2] LING Z, ZHANG J, LIU Q. Oncogenic forkhead box D3 antisense RNA 1 promotes cell survival and confers temozolomide resistance in glioblastoma cells through the miR-128-3p/WEE1 G2 checkpoint kinase axis[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 6012-6023. DOI: 10.1080/21655979.2022.2042133.
- [3] LI J, YAN T, WU X, *et al.* Aberrant overexpression of transcription factor forkhead box D1 predicts poor prognosis and promotes cancer progression in HNSCC[J/OL]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1205[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34772357/>. DOI: 10.1186/s12885-021-08868-4.
- [4] ERNSTSSON S, PIERROU S, HULANDER M, *et al.* Characterization of the human forkhead gene FREAC-4. Evidence for regulation by Wilms' tumor suppressor gene (WT-1) and p53[J]. J Biol Chem, 1996, 271(35):21094-21099. DOI: 10.1074/jbc.271.35.21094.
- [5] QIU S, LI D, SHEN Z, *et al.* Diagnostic and prognostic value of FOXD1 expression in head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Cancer, 2021, 12(3):693-702. DOI: 10.7150/jca.47978.
- [6] CHEN S, YANG M, WANG C, *et al.* Forkhead box D1 promotes EMT and chemoresistance by upregulating lncRNA CYTOR in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. Cancer Lett, 2021, 503:43-53[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33352248/>. DOI: 10.1016/

- j.canlet.2020.11.046.
- [7] ZHANG D, ZHANG Y, SUN X. LINC01133 promotes the progression of cervical cancer *via* regulating miR-30a-5p/FOXD1[J]. Asia Pac J Clin Oncol, 2021,17(3):253-263. DOI: 10.1111/ajco.13451.
- [8] DONMEZ C, KONAC E. Silencing effects of FOXD1 inhibit metastatic potentials of the PCa *via* N-cadherin-Wnt/beta-catenin crosstalk[J/OL]. Gene, 2022,836:146680[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35738443/>. DOI: 10.1016/j.gene.2022.146680.
- [9] LIANG M, YANG M, WANG F, *et al.* Near-infrared fluorescence-guided resection of micrometastases derived from esophageal squamous cell carcinoma using a c-Met-targeted probe in a preclinical xenograft model[J/OL]. J Control Release, 2021, 332: 171-183[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33636245/>. DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.02.019.
- [10] HATINI V, TAO W, LAI E. Expression of winged helix genes, BF-1 and BF-2, define adjacent domains within the developing forebrain and retina[J]. J Neurobiol, 1994,25(10): 1293-1309. DOI: 10.1002/neu.480251010.
- [11] FETTING J L, GUAY J A, KAROLAK M J, *et al.* FOXD1 promotes nephron progenitor differentiation by repressing decorin in the embryonic kidney[J]. Development, 2014,141(1):17-27. DOI: 10.1242/dev.089078.
- [12] NEWMAN E A, KIM D W, WAN J, *et al.* Foxd1 is required for terminal differentiation of anterior hypothalamic neuronal subtypes[J]. Dev Biol, 2018,439(2):102-111. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.04.012.
- [13] BAI J, LUO Y, ZHANG S. Microarray data analysis reveals gene expression changes in response to ionizing radiation in MCF7 human breast cancer cells[J/OL]. Hereditas, 2020,157(1): 37[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32883354/>. DOI: 10.1186/s41065-020-00151-z.
- [14] CHEN Y, LIANG W, LIU K, *et al.* FOXD1 promotes EMT and cell stemness of oral squamous cell carcinoma by transcriptional activation of SNAI2[J/OL]. Cell Biosci, 2021,11(1): 154[2022-08-10]. DOI: 10.1186/s13578-021-00671-9.
- [15] SUN D S, GUAN C H, WANG W N, *et al.* LncRNA NORAD promotes proliferation, migration and angiogenesis of hepatocellular carcinoma cells through targeting miR-211-5p/FOXD1/VEGF-A axis[J/OL]. Microvasc Res, 2021,134:104120[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33309645/>. DOI: 10.1016/j.mvr.2020.104120.
- [16] WU L, LIU Y, GUO C, *et al.* LncRNA OIP5-AS1 promotes the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma *via* regulating miR-429/FOXD1/ERK pathway[J/OL]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 296[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32669972/>. DOI: 10.1186/s12935-020-01366-w.
- [17] WANG Y, QIU C, LU N, *et al.* FOXD1 is targeted by miR-30a-5p and miR-200a-5p and suppresses the proliferation of human ovarian carcinoma cells by promoting p21 expression in a p53-independent manner[J]. Int J Oncol, 2018, 52(6): 2130-2142. DOI: 10.3892/ijo.2018.4359.
- [18] FAN L, WANG J, DENG P, *et al.* Foxhead box D1 promotes the partial epithelial-to-mesenchymal transition of laryngeal squamous cell carcinoma cells *via* transcriptionally activating the expression of zinc finger protein 532[J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 3057-3069. DOI: 10.1080/21655979.2021.2024978.
- [19] SUN Q, NOVAK D, HUSER L, *et al.* FOXD1 promotes dedifferentiation and targeted therapy resistance in melanoma by regulating the expression of connective tissue growth factor[J]. Int J Cancer, 2021, 149(3): 657-674. DOI: 10.1002/ijc.33591.
- [20] LI Z, YAN T, WU X, *et al.* Increased expression of FOXD1 is associated with cervical node metastasis and unfavorable prognosis in oral squamous cell carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2020, 49(10): 1030-1036. DOI: 10.1111/jop.13098.
- [21] BOND K H, FETTING J L, LARY C W, *et al.* FOXD1 regulates cell division in clear cell renal cell carcinoma[J/OL]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 312[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33761914/>. DOI: 10.1186/s12885-021-07957-8.
- [22] XIE F, LI Y, LIANG B. The expression and survival significance of FOXD1 in lung squamous cell carcinoma: a Meta-analysis, immunohistochemistry validation, and bioinformatics analysis [J/OL]. Biomed Res Int, 2022,2022: 7798654[2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35607308/>. DOI: 10.1155/2022/7798654.
- [23] MOUSTAKAS A, HELDIN C H. Mechanisms of TGF beta-induced epithelial-mesenchymal transition[J/OL]. J Clin Med, 2016, 5(7) [2022-08-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27367735/>. DOI: 10.3390/jcm5070063.
- [24] UNGEFROREN H, WITTE D, LEHNERT H. The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF-beta-induced EMT and cell motility in cancer[J]. Dev Dyn, 2018, 247(3): 451-461. DOI: 10.1002/dvdy.24505.
- [收稿日期] 2022-08-01 [修回日期] 2022-11-09
[本文编辑] 向正华, 沈志超