

• 基础研究 •

FOXC2 对人食管癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及相关机制研究*

蒋琳, 廖君左, 赵妍丽, 商义, 沈俊[△]

637000 四川 南充, 川北医学院第二附属医院 内科(蒋琳、商义), 普外科(沈俊); 637000 四川 南充, 川北医学院附属医院 小儿外科(廖君左), 肿瘤科(赵妍丽)

[摘要] 目的: 探讨叉头框 C2 (forkhead box C2, FOXC2) 对食管癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响及机制。方法: 选择人食管癌细胞 CaES-17, Eca-109, TE13 及人食管上皮细胞; 选择 FOXC2 较高表达的食管癌细胞 (CaES-17) 作为转染细胞, 设 siRNA FOXC2 组、pcDNA-FOXC2 组及未转染组和转染阴性对照组。采用实时荧光定量 PCR 检测细胞 FOXC2 表达; CCK-8 检测细胞增殖; 划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力; Western blot 检测 MMP2、MMP9、E-钙黏附素、N-钙黏附素、Vimentin、Snail、Wnt3a、 β -catenin、p- β -catenin 的蛋白表达水平。结果: 食管癌细胞 FOXC2 蛋白表达明显高于食管上皮细胞; 与对照组相比, 上调 FOXC2 表达可使 MMP9、Snail 表达明显升高, 下调 FOXC2 表达可抑制食管癌细胞增殖, 并抑制食管癌细胞的迁移和侵袭能力及降低 Wnt3a 蛋白表达。结论: 下调 FOXC2 抑制食管癌细胞增殖、迁移和侵袭能力, 作用机制可能与调控 MMP-9、Snail 水平及 Wnt/ β -catenin 通路有关。

[关键词] 食管癌; 迁移; 侵袭; 叉头框 C2

[中图分类号] R735.1; R730.231 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2020.08.002

引文格式: Jiang L, Liao JZ, Zhao YL, et al. Effect of FOXC2 on proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells and its mechanisms[J]. J Cancer Control Treat, 2020, 33(8): 638-644. [蒋琳, 廖君左, 赵妍丽, 等. FOXC2 对人食管癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及相关机制研究[J]. 肿瘤预防与治疗, 2020, 33(8): 638-644.]

Effect of FOXC2 on Proliferation, Migration and Invasion of Esophageal Cancer Cells and Its Mechanisms

Jiang Lin, Liao Junzuo, Zhao Yanli, Shang Yi, Shen Jun

Department of Internal Medicine, The Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China (Jiang Lin, Shang Yi); Department of Surgery, The Second Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China (Shen Jun); Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China (Liao Junzuo); Department of Oncology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China (Zhao Yanli)

Corresponding author: Shen Jun, E-mail: 479331559@qq.com

This study was supported by grants from Bureau of Science & Technology Nanchong City (NO. 18SXHZ0509).

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of forkhead box C2 (FOXC2) on the proliferation, invasion and migration of esophageal cancer cells and relevant mechanisms. **Methods:** Human esophageal cancer cell line (CaES-17, Eca-109, TE13) and human esophageal epithelial cell line were selected. Esophageal cancer cells with high FOXC2 expression (CaES-17) were selected as transfected cells. CaES-17 cells were assigned to the siRNA FOXC2 group, the pcDNA-FOXC2 group, the untransfected group and the negative control group. The expression of FOXC2 was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR); the proliferation of cells

[收稿日期] 2019-12-19 **[修回日期]** 2020-04-14

[基金项目] *南充市 2018 年市校战略合作科技项目(编号:18SXHZ0509)

[通讯作者] [△]沈俊, E-mail:479331559@qq.com

the proliferation of cells

was detected by CCK-8; the ability of cell migration was detected by scratch test; the ability of cell invasion was detected by Transwell chamber test; and the expression levels of MMP2, MMP9, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail, Wnt3a, β -catenin and p- β -catenin were detected by Western blot. **Results:** The expression of FOXC2 protein in esophageal cancer cells was significantly higher than that in esophageal epithelial cells. Up-regulated FOXC2 expression significantly increased the expression of MMP9 and Snail; down-regulated FOXC2 expression remarkably decreased the proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells, and reduced the expression of Wnt3a protein. **Conclusion:** The inhibitory effect of FOXC2 on the proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells may be related to the regulation of MMP-9, Snail and Wnt/ β -catenin pathway.

[Key words] Esophageal cancer; Migration; Invasion; FOXC2

食管癌是世界上第 6 大癌症死亡原因和第 8 大常见癌症,5 年生存率约为 15%~25%,我国是食管癌最主要的高发地区之一,大多数患者在确诊时已经处于中晚期,耽误了最佳的治疗时机^[1]。探讨食管癌的发病机制,寻找有效的靶基因对治疗食管癌具有重要意义。叉头框 C2 (fork head box C2, FOXC2) 是一种转录因子,在胚胎发育中起到重要作用,并且 FOX 基因的突变或失调常常与疾病有关,包括癌症^[2]。FOX 蛋白 FOXM1 在胶质瘤和胰腺癌细胞中表达,通过调节血管内皮生长因子的表达可促进血管生成^[3]。叉头框转录因子 O (forkhead box O, FOXO) 是 FOX 蛋白家族中的一个重要的亚家族,包括 FOXO1、FOXO3a、FOXO 4、FOXO6, 研究显示 FOXO1/3a/4 在前列腺癌和白血病中起着肿瘤抑制因子的作用^[4]。证据表明 FOXC2 是肿瘤发生和疾病进展的关键因素,在结肠癌、大肠癌中均表达上调,并与癌症的预后、转移有关,在肿瘤细胞迁移、侵袭、上皮细胞间充质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 等过程中均具有调控作用^[5]。然而,FOXC2 对食管癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及相关机制研究尚不清晰。因此,本研究旨在探讨 FOXC2 对食管癌细胞的影响,明确 FOXC2 在食管癌细胞转移中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人食管癌细胞系 (CaES-17, Eca-109 和 TE13) 和人食管上皮细胞购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC; USA), 将细胞在含有 10% 胎牛血清 (FBS; Gibco, USA) 和 1% (v/v) 青霉素-链霉素 (SigmaAldrich, USA) 的 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM; Gibco, USA) 中进行培养,所有细胞在 37°C, 5% CO₂ 条件孵育。

1.2 细胞转染

人 FOXC2 全长基因序列设计的小干扰 RNA

(siRNA) 及纯化 FOXC2 cDNA 构建 pcDNA-FOXC2 重组质粒由上海吉玛生物技术有限公司设计,其碱基序列为 5'-GACCCAACCAGACAAUUAATT-3'。转染前 24 h, 胰蛋白酶消化细胞,按每孔 4×10^4 个细胞接种于 12 孔板。待细胞生长至 30%~50% 时采用 Lipofectamine2000 进行转染。每孔取 siRNA 或 pcDNA 50 nmol/L 与脂质体 2 μ L 分别溶于 100 μ L 无血清的 DMEM 培养基中,并在 5 min 内将以上两种液体轻轻混匀,室温下静置 20 min。在每孔中加入 DMEM 完全培养基 1 mL,再将以上混合物滴加至每孔中,轻轻摇匀,将细胞置于 37°C 培养过夜。设置未转染组 (control) 和转染空载体干扰组用于对照 (negative control), 转染 72 h 后用于后续实验。

1.3 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 检测

使用 TRIzol 试剂盒 (Invitgen, USA) 按照制造商说明从食管癌细胞中提取总 RNA。每个样品的总 RNA 约 5 μ g 被逆转录成第一链 cDNA 用于 qRT-PCR 分析。使用 SYBR PreMix Taq 在 ABI PRISM 7900 热循环器 (Applied Biosciences, USA) 上进行 PCR 扩增。引物序列: FOXC2: 5'-CCGAGAAGAAGATCACCTTGAA-3' (正向), 5'-GACACGTCCTCTTTTGAAGC-3' (反向), GAPDH: 5'-ATCCATCACCATCTTCCCAG-3' (正向), 5'-CCATCACGCCAGTTTTC-3' (反向)。以 GAPDH 内参。qRT-PCR 反应条件: 95°C 初始变性 10 min, 随后 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 10 s, 72°C 延伸 10 s, 45 个循环, 记录 CT 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分析相对表达水平。

1.4 Western blot 检测

收集细胞用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤 3 次, 然后在 RIPA 裂解液 (Cell Signal Technology, USA) 中用蛋白酶和磷酸酶抑制剂在冰上溶解 10 min, 蛋白质浓度用 Bio-Rad 蛋白质测定法 (Hercules, USA) 测定, 等量的蛋白质样品用 12% SDS-PAGE 分离, 并转移到聚偏二氟化膜

(Millipores, USA) 上, 然后用 5% 脱脂牛奶封闭 1h。随后用一抗 FOXC2 (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-515472, Santa Cruz)、MMP2 (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-13595, Santa Cruz)、MMP9 (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-393859, Santa Cruz)、E-钙黏附素 (E-cadherin) (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-8426, Santa Cruz)、N-钙黏附素 (N-cadherin) (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-59987, Santa Cruz)、Vimentin (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-6260, Santa Cruz)、Snail (稀释比: 1: 1000, 货号: 3879S, Santa Cruz)、Wnt3a (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-136163, Santa Cruz)、 β -catenin (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-7963, Santa Cruz)、p- β -catenin (稀释比: 1: 1000, 货号: sc-57535, Santa Cruz) 和 β -catin (稀释比: 1: 2000; 货号: sc-47778, Santa Cruz) 4℃ 孵育过夜, 随后与辣根过氧化物酶偶联的二级抗体孵育 (1: 3000; Santa Cruz), 室温孵育 1 h。ECL 暗室显色, 显色后的蛋白使用 Bio-Rad 多功能成像系统采集图像, Image-ProPlus 分析光密度, 以 β -actin 为内参, 对照组目标蛋白质相对含量为 1, 计算各组蛋白质的相对表达量, 实验重复 3 次。实验根据 western blot 检测 FOXC2 表达结果, 选择 FOXC2 相对高表达食管癌细胞 (本实验是 CaES-17 细胞) 进行细胞转染及后续实验。

1.5 细胞增殖实验 (CCK-8)

使用细胞 CCK-8 试剂盒说明 (Beyotime Technology, 江苏) 评估细胞增殖。将转染的 CaES-17 细胞接种到 96 孔板 (1×10^4 细胞/孔) 中, 在 37℃ 培养箱中培养 24 h, 培养结束前每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂后继续培养 3 h, 肉眼观察细胞孔中颜色由黄色变成深橙色, 通过酶标仪 (Bio-Rad) 在 450 nm 处测定吸光度。

1.6 细胞划痕实验

细胞接种于 6 孔板, 恒温细胞培养箱中培养, 用 10 μ L 无菌枪头在 6 孔板底部轻划一条角度一致、粗细均匀的直线 (每组设 3 个重复, 每组实验重复 3 次)。分别于 0、48 h 在倒置相差显微镜下观察同一视野划痕的宽度并拍照。

1.7 细胞侵袭实验

将转染的 CaES-17 细胞经胰蛋白酶消化后, 用不含血清的细胞培养液把细胞浓度调整为 1×10^4 个/mL, 在实验前 3 h, 取基质胶加入到 Transwell 小室中, 于 37℃ 孵育湿化 3 h, 待基质胶凝固后, 在小室中加入不含胎牛血清的细胞培养液继续孵育 40 min, 取适量的细胞悬浮液加入 Transwell 小室中, 放在 24 孔板中, 小室外侧加入细胞培养液, 37℃ 孵育 48 h 后, 用 PBS 洗涤 Transwell 小室, 把没有穿膜的细胞用棉签擦掉, 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色 30 min, 随机选取每孔 6 个视野, 并通过显微镜 (Olympus, Japan) 观察侵袭细胞数。

1.8 统计分析

使用 SPSS 22.0 进行数据统计分析, 数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 使用单因素方差分析确定结果是否具有统计学意义, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXC2 在食管癌细胞中的表达

检测结果显示, FOXC2 在人食管癌细胞 CaES-17、Eca-109、TE-13 中的表达明显高于人食管上皮细胞 ($P < 0.05$), 其中人食管癌细胞 CaES-17 中 FOXC2 表达相对较高 (图 1)。

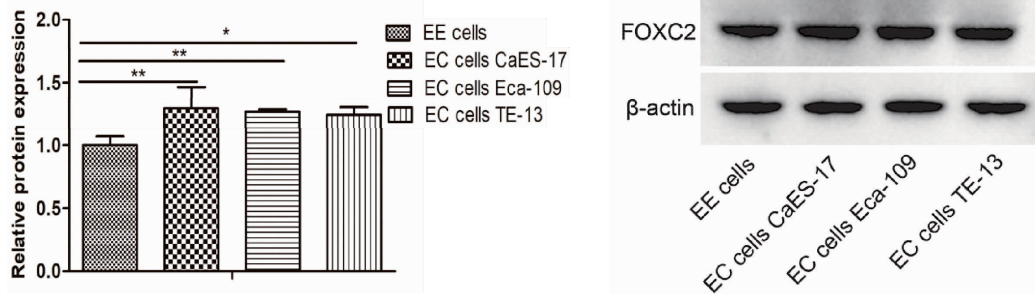


图 1 FOXC2 在食管癌细胞中的表达 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Figure 1. Expression of FOXC2 in Esophageal Cancer Cells (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Human esophageal epithelial cells: As a control group, it was verified that FOXC2 expression increased in human esophageal cancer cells.

EE: Esophageal epithelial; EC: Esophageal cancer.

2.2 FOXC2 对食管癌细胞生物学行为的影响

Western blot 检测结果显示 si-FOXC2 组的 FOXC2 表达明显低于对照组, pcDNA-FOXC2 组的 FOXC2 表达明显高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2A); qRT-PCR 检测结果显示 si-FOXC2 组的 FOXC2 mRNA 表达明显低于对照组, pcDNA-FOXC2 组的 FOXC2 mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2B); CCK-8 检测细胞增殖结果显示 si-FOXC2 组细胞增殖较对照组明显降低 ($P < 0.01$), pcDNA-FOXC2 组细胞增殖增加, 但差异无统计学意义 ($P >$

0.05) (图 2C); 细胞划痕实验结果显示与 0 h 相比较, pcDNA-FOXC2 组 48 h 后细胞划痕愈合能力明显增强, 相对宽度较对照组窄 (图 2D); Transwell 细胞侵袭实验显示, 与对照组比较, si-FOXC2 组穿过基膜的细胞数明显降低 (图 2E、F); Western blot 检测迁移及 EMT 相关蛋白显示, 与对照组相比, pcDNA-FOXC2 组的 MMP2、MMP9、N-cadherin、Vimentin、Snail 表达均升高, 但仅 MMP9、Snail 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), E-cadherin 表达降低, 较对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 2G)。

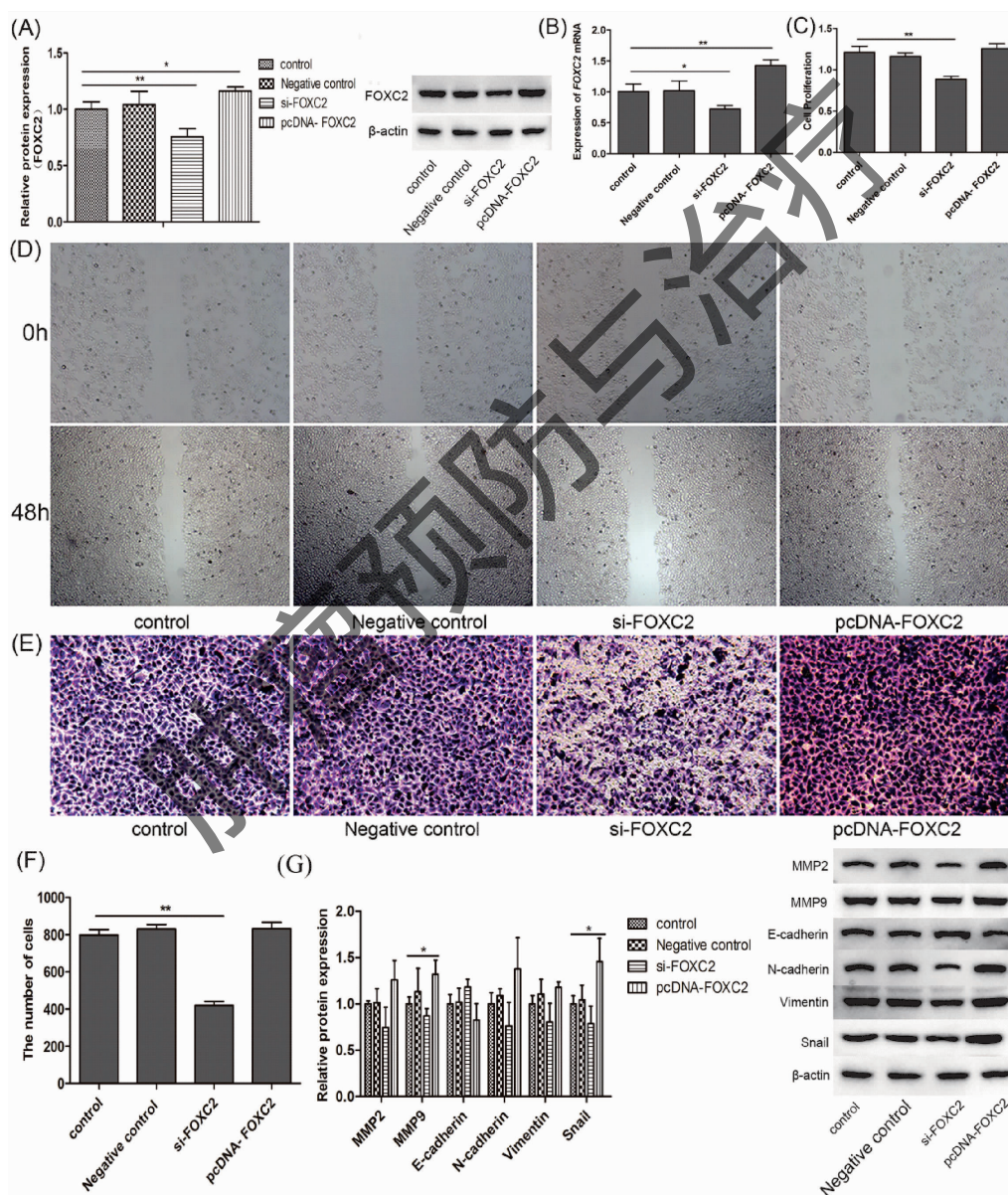


图 2 FOXC2 对食管癌细胞生物学行为的影响 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Figure 2. Effect of FOXC2 on the Biological Behavior of Esophageal Cancer Cells (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

A. Expression of FOXC2 protein and protein bands; B. FOXC2 mRNA expression; C. Cell proliferation; D. Cell scratch test; E. Transwell invasion assay (crystal violet staining, 400 ×); F. Number of si-FOXC2 squeezing through basement membrane; G. Protein bands and expression of migration-or EMT-related protein. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. EMT: Epithelial-mesenchymal transition. EMT: Epithelial-mesenchymal transition.

2.3 FOXC2 对食管癌细胞 Wnt/ β -catenin 通路的影响

检测结果显示 si-FOXC2 组 Wnt3a 表达较对照组明显降低 ($P < 0.05$), β -catenin、p- β -catenin 较对

照组表达降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); pcDNA-FOXC2 组 Wnt3a、 β -catenin、p- β -catenin 表达均升高,较对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 3)。

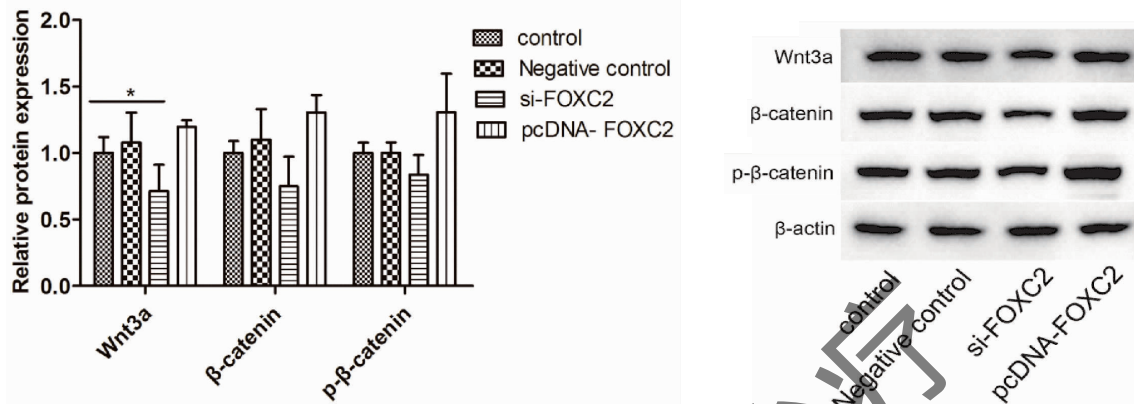


图 3 食管癌细胞 Wnt/ β -catenin 通路相关因子表达 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Figure 3. Expression of Wnt/ β -catenin Pathway Related Factors in Esophageal Cancer Cells (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

3 讨论

近年来,化疗加放疗越来越多地被作为常规手术切除食管癌的补充或辅助治疗手段,使早期食管癌的临床结果逐渐改善。然而,在晚期病例中,即使食管癌没有转移,其预后仍然很差,癌细胞直接侵袭邻近的重要器官或淋巴结转移是食管癌根治性切除的严重障碍之一,也提高了食管癌局部复发率^[6-7]。虽然已经发现多种分子与食管癌的转移相关,但是其特异性及敏感性不能满足对食管癌诊断和治疗的要求,因此,迫切需要研究食管癌转移的分子机制。

FOXC2 属人类 forkhead 家族,是由人类染色体 16q24.3 区编码的一种转录因子,其编码的蛋白共有 494 个氨基酸残基,具有显著的 forkhead 结构域。研究报道其与血管淋巴管的形成、肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗以及 II 型糖尿病等密切相关^[8-9]。研究证实,宫颈癌中 FOXC2 高表达并与肿瘤的增殖及转移能力有关^[10]。乳腺癌中 FOXC2 通过血小板衍生生长因子受体的表达影响 EMT^[11]。Cui 等^[12]证实结肠直肠癌中 FOXC2 高表达并通过激活 MAPK 和 AKT 通路促进肿瘤增殖。Agnihotri 等^[13]报道口腔鳞状细胞癌中 FOXC2 可促进肿瘤血管形成。胃癌中 FOXC2 高表达且对患者预后有影响^[14]。而关于 FOXC2 对食管癌的作用机制目前尚不清晰。本实验检测 FOXC2 在食管癌细胞中的表达结果表明,人食管癌细胞 FOXC2 的表达较人食管上皮细胞明显

升高 ($P < 0.05$),提示其可能与食管癌相关,可能是食管癌进展的关键分子。

研究证实 EMT 在肿瘤发展中具有尤为重要的作用,其通过增强癌细胞的侵袭性和迁移来促进肿瘤的进展,是肿瘤发生过程中促进侵袭和转移的主要分子机制之一。在 EMT 过程中,多种作用于 EMT 诱导因子的下游分子如 E-cadherin、整合素和 MMPs 已被确定为食管癌恶性潜能的指标^[15-16]。这些发现表明 EMT 调控基因可能在食管癌的侵袭和转移中起关键作用。研究报道,FOXC2 可特异性地促进间充质分化^[17]。此外,研究表明 FOXC2 的表达与高度侵袭性的基底样乳腺癌显著相关,并且 FOXC2 的过度表达增加了小鼠乳腺癌细胞向肺的转移潜能^[18]。FOXC2 可以允许癌细胞获得更好的侵袭和转移环境,而由于食道缺乏浆膜,癌细胞直接侵入附近气管、胸膜或心包等结构从而可能导致预后不良^[19]。本实验结果表明,低表达 FOXC2 可使食管癌细胞增殖及侵袭能力明显降低 ($P < 0.01$)。表明 FOXC2 的低表达与食管癌细胞迁移和侵袭性相关,在肿瘤转移过程中发挥抑制作用。

FOXC2 是 EMT 的重要调节因子,EMT 是肿瘤进展和转移过程中经常激活的关键过程。研究表明,FOXC2 可通过激活多种 EMT 转录因子促进乳腺癌细胞的浸润和转移,其中包括 Snail、Twist、Goosecoid 等^[20];并且 FOXC2 过度表达促进间充质分化,以及诱导 MMP2、MMP9 表达,MMP2 和 MMP9

是降解 IV 型胶原的酶, IV 型胶原是基底膜的主要成分, 与人类肿瘤的侵袭潜力和血管化有关^[21]。此外, FOXC2 间接抑制上皮标记物 E-cadherin 的表达, 其缺失被认为是 EMT 的标志, 并直接下调 p120catenin; p120catenin 是一种在上皮细胞的粘附连接处稳定 E-cadherin 的调节蛋白^[22]。因此, 积累的的证据表明, EMT 诱导的信号分子, 刺激癌细胞中 FOXC2 的表达以及其他 EMT 促进转录因子的表达, 并介导间充质分化, 从而导致 EMT 和转移。由此可见, EMT 在恶性肿瘤的侵袭转移过程中发挥着关键的作用。本实验结果表明高表达 FOXC2 可促进 MMP2、MMP9 的表达, 但仅 MMP9 表达较对照组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 FOXC2 可能通过 MMP9 修饰细胞外基质, 参与局部侵袭; 此外, 高表达 FOXC2 可使 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达升高, E-cadherin 表达降低, 但仅 Snail 表达较对照组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示下调 FOXC2 可能通过作用于 Snail 影响食管癌细胞侵袭过程, FOXC2 可能是 EMT 的关键介质。

食管癌等恶性肿瘤的发生发展与抑癌基因的下调或失活、癌基因表达的上调或激活、致癌信号通路的激活以及抑癌信号通路的失活密切相关^[23]。Wnt/ β -catenin 信号通路是最经典的致癌信号通路之一, Wnt/ β -catenin 信号通路的过度激活通常伴随着诸如食管癌等恶性肿瘤的发展^[24]。尽管 Wnt/ β -catenin 信号通路对于胚胎是必不可少的, 然而, 当 Wnt/ β -catenin 信号通路过度激活时, 与细胞增殖和迁移相关的靶基因表达上调, 这促进了细胞的增殖和迁移, 导致细胞的恶性转化^[25]。研究表明淋巴管内皮细胞中 Wnt/ β -catenin 信号传导可诱导淋巴水肿相关转录因子 FOXC2 的表达, 此外, 转录因子 PROX1 与 β -catenin 和 Tcf/lef 转录因子 TCF7L1 形成复合物, 以增强 Wnt/ β -catenin 信号转导并促进 FOXC2 的表达^[26]。本实验研究表明 FOXC2 低表达可明显降低 Wnt3a 表达, β -catenin、p- β -catenin 表达较对照组降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 FOXC2 可能抑制食管癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路的活性。

综上所述, 本研究发现 FOXC2 在人食管癌细胞中表达较高, 沉默 FOXC2 明显抑制食管癌细胞的增殖、迁移和侵袭。此外, FOXC2 的低表达下调了食管癌细胞中 Wnt/ β -catenin 通路相关因子 Wnt3a 的表达, FOXC2 可能是食管癌中有意义的预后标记物。

作者声明: 本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任; 并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存, 可接受核查。

学术不端: 本文在初审、返修及出版前均通过中国知网 (CNKI) 科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议: 经同行专家双盲外审, 达到刊发要求。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权: 本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Chen YH, Deng GL, Fu YJ, et al. FOXC2 promotes oxaliplatin resistance by inducing epithelial-mesenchymal transition via MAPK/ERK signaling in colorectal cancer[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 1625-1635.
- [3] Wang Z, Banerjee S, Kong D, et al. Retraction: Down-regulation of forkhead box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells[J]. Cancer Res, 2018, 78(18): 5470.
- [4] Dong XY, Chen CS, Sun XD, 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.
- [5] Nishida N, Mimori K, Yokobori T, et al. FOXC2 is a novel prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(2): 535-542.
- [6] Markar SR, Lagergren J. Surgical and surgeon-related factors related to long-term survival in esophageal cancer: A review[J]. Ann Surg Oncol, 2020, 27(3): 718-723.
- [7] 李石, 宋晓玉, 张莉, 等. 外周血红细胞宽度检测在食管癌患者临床诊断中的应用价值[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32(5): 429-433.
- [8] Li CJ, Ding HJ, Tian J, et al. Forkhead Box Protein C2 (FOXC2) promotes the resistance of human ovarian cancer cells to cisplatin in vitro and in vivo[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 242-252.
- [9] 沈洪洲, 司家文, 沈国芳. Foxc2 生理功能研究进展[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2018, 16(2): 188-192.
- [10] Zheng CH, Quan Y, Li YY, et al. Expression of transcription factor FOXC2 in cervical cancer and effects of silencing on cervical cancer cell proliferation[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(4): 1589-1595.
- [11] Yang HS, Chen TX, Xu S, et al. Long noncoding RNA FOXC2-

- ASI predicts poor survival in breast cancer patients and promotes cell proliferation[J]. *Oncol Res*, 2019, 27(2) : 219-226.
- [12] Cui YM, Jiang D, Zhang SH, *et al.* FOXC2 promotes colorectal cancer proliferation through inhibition of FOXO3a and activation of MAPK and AKT signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2014, 353(1) : 87-94.
- [13] Agnihotri NS, Astekar M. The role of novel prognostic markers PROX1 and FOXC2 in carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma[J]. *J Exp Ther Oncol*. 2018, 12(3) : 171-184.
- [14] 吴琼. 转录因子 FOXC2 与胃癌发生发展的相关性研究[D]. 滨州: 滨州医学院, 2018.
- [15] Hu XL, Zhai YF, Kong PZ, *et al.* FAT1 prevents epithelial mesenchymal transition (EMT) via MAPK/ERK signaling pathway in esophageal squamous cell cancer[J]. *Cancer Lett*, 2017, 397 : 83-93.
- [16] Li J, Peng W, Yang P, *et al.* MicroRNA-1224-5p inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer by targeting SP1-mediated NF- κ B signaling pathways[J]. *Front Oncol*, 2020, 10 : 294.
- [17] Pham TND, White BEP, Zhao H, *et al.* Protein kinase C α enhances migration of breast cancer cells through FOXC2-mediated repression of p120-catenin[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1) : 832.
- [18] Xia S, Menden HL, Korfhagen TR, *et al.* Endothelial immune activation programmes cell-fate decisions and angiogenesis by inducing angiogenesis regulator DLL4 through TLR4-ERK-FOXC2 signalling[J]. *J Physiol*, 2018, 596(8) : 1397-1417.
- [19] Li CJ, Ding HJ, Tian J, *et al.* Forkhead box protein C2 promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line (SKOV3/CDDP) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(3) : 1098-1110.
- [20] Dominguez C, David JM, Palena C. Epithelial-mesenchymal transition and inflammation at the site of the primary tumor[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 47 : 177-184.
- [21] Yang F, Lv LZ, Zhang K, *et al.* Elevated FOXC2 expression promotes invasion of HCC cell lines and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(1) : 99-109.
- [22] Ferreira C, Lobo J, Antunes L, *et al.* Differential expression of E-cadherin and P-cadherin in pT3 prostate cancer: Correlation with clinical and pathological features[J]. *Virchows Arch*, 2018, 473(4) : 443-452.
- [23] Im WR, Lee HS, Lee YS, *et al.* A regulatory noncoding RNA, nc886, suppresses esophageal cancer by inhibiting the AKT pathway and cell cycle progression[J]. *Cells*, 2020, 9(4) : 801.
- [24] Zhu LN, Zhang XD, Fu XR, *et al.* TIPE2 suppresses progression and tumorigenesis of esophageal carcinoma via inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *J Transl Med*. 2018, 16(1) : 7.
- [25] Sun NH, Zhang L, Zhang CG, *et al.* miR-144-3p inhibits cell proliferation of colorectal cancer cells by targeting BCL6 via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25 : 19.
- [26] Wang Q, Lv Q, Bian H, *et al.* A novel tumor suppressor SPINK5 targets Wnt/ β -catenin signaling pathway in esophageal cancer[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5) : 2360-2371.