

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.07.006

· 临床研究 ·

FOXK1通过上调AKT2促进喉鳞状细胞癌进展的机制研究

徐玉茹¹, 路广², 刘猛¹, 胡国斌¹, 刘胜辉¹, 赵瑞力¹, 兰利利¹ (1. 河北医科大学第四医院 耳鼻咽喉头颈外科, 河北 石家庄 050010; 2. 河北医科大学第一医院 组织人事部, 河北 石家庄 050010)

[摘要] **目的:** 探讨叉头框K1(FOXK1)在喉鳞状细胞癌(LSCC)中的表达、临床意义及对细胞增殖、迁移、侵袭的影响,并阐明其分子机制。**方法:** RT-qPCR、免疫组化检测LSCC组织及LSCC细胞TU177中FOXK1表达,分析其与临床病理参数及预后的相关性;通过瞬时转染构建FOXK1过表达与敲低细胞模型,通过MTS法、克隆形成实验、划痕愈合实验和Transwell实验检测细胞恶性生物学行为的变化;采用RT-qPCR检测上皮-间充质转化(EMT)相关因子mRNA的表达;采用WB法检测PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达;结合生物信息学预测与功能回复实验,验证FOXK1对AKT2的调控作用。**结果:** FOXK1在LSCC组织及细胞中高表达($P < 0.01$),且主要定位于细胞核;FOXK1高表达与较晚TNM分期相关($P < 0.05$),且FOXK1高表达患者5年生存率较低($P < 0.05$);过表达FOXK1显著增强TU177细胞增殖、迁移与侵袭能力并诱导EMT($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),敲低FOXK1则产生相反的效应;FOXK1可上调AKT2表达并激活PI3K/AKT信号通路;敲低AKT2可部分逆转FOXK1过表达对细胞增殖、迁移、侵袭及EMT进程的促进作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:** FOXK1在LSCC中高表达,与肿瘤进展及不良预后密切相关。FOXK1可能通过上调AKT2激活PI3K/AKT信号通路,诱导EMT,从而促进LSCC细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 喉鳞状细胞癌;叉头框K1;AKT2;恶性生物学行为;预后

[中图分类号] R739.65;R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)07-0754-09

Mechanistic study of FOXK1 in promoting laryngeal squamous cell carcinoma progression by upregulating AKT2 expression

Xu Yuru¹, Lu Guang², Liu Meng¹, Hu Guobin¹, Liu Shenghui¹, Zhao Ruili¹, Lan Lili¹ (1. Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050010, Hebei, China; 2. Department of Human Resources, The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050010, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of FOXK1 on the proliferation, migration and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and the prognosis of patients, as well as its molecular mechanism. **Methods:** RT-qPCR and immunohistochemistry were applied to determine FOXK1 expression in LSCC tissues and TU177 cells, with subsequent analysis of its association with clinicopathological parameters and patient prognosis. FOXK1 overexpression and knockdown vectors were constructed and transfected into LSCC cell line TU177. MTS assay, colony formation assay, scratch wound healing assay, and Transwell assay were employed to detect changes in the malignant biological behaviors of cells. RT-qPCR was employed to detect the mRNA expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related factors, and Western blotting was used to detect the protein expression of PI3K/AKT signaling pathway-related proteins. Combined with bioinformatics prediction and functional rescue experiments, the regulatory effect of FOXK1 on AKT2 was verified. **Results:** FOXK1 was highly expressed in LSCC tissues and cells ($P < 0.01$), and was mainly localized in the cell nucleus; high FOXK1 expression was associated with a higher TNM stage ($P < 0.05$), and a lower 5-year survival rate ($P < 0.05$); FOXK1 overexpression significantly promoted the proliferation, migration and invasion of TU177 cells and induced EMT ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), whereas FOXK1 knockdown produced the opposite effects; FOXK1 upregulated AKT2 expression and activated the PI3K/AKT signaling pathway; knockdown of AKT2 partially reversed the promoting effects of FOXK1 overexpression on proliferation, migration, invasion and EMT progression ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** FOXK1 is highly expressed in LSCC and is closely associated with tumor progression and poor prognosis. FOXK1 may activate the PI3K/AKT pathway by upregulating AKT2 expression, thereby inducing EMT and promoting the malignant biological behaviors of LSCC cells.

[Key words] laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC); forkhead box K1 (FOXK1); AKT2; malignant biological behaviors; prognosis

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(7): 754-762. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.07.006]

[基金项目] 河北省医学科学研究课题计划(20250114)

[作者简介] 徐玉茹,女,硕士,主治医师

[通信作者] 兰利利(扫码获取作者通信方式)



喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)作为头颈部常见的恶性肿瘤^[1],其临床治疗仍面临诸多困境。尽管外科手术联合放化疗的综合治疗方案在临床应用已久,且近年来免疫治疗、靶向治疗等新兴手段逐渐进入临床实践,但晚期或复发患者的5年生存率仍未得到实质性提升^[2]。此外,现有治疗手段常对言语、吞咽等重要生理功能造成不可逆损伤^[3]。因此,探寻LSCC发生发展过程中的关键分子靶点,对于改善患者预后和优化个体化治疗策略具有重要的理论与临床意义。

叉头框K1(forkhead box K1, FOXC1)是叉头框转录因子家族的成员,通过特异性识别DNA序列调控靶基因的转录,在细胞生长、分化、胚胎发育等生理过程中发挥核心调控作用^[4]。研究^[5]证实,FOXC1可通过调控p21、c-MYC、CDK1等关键基因的表达,参与肿瘤细胞的周期进程、增殖和侵袭等恶性生物学行为。目前,FOXC1已被证实在肝癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌等多种恶性肿瘤组织中高表达,并可作为关键癌基因参与肿瘤的发生发展^[5-9]。此外,现有研究^[10]已证实FOXC1可参与调控肿瘤细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程,影响肿瘤的迁移与侵袭能力,但FOXC1在LSCC中调控EMT的具体作用及分子机制尚不明确。

本研究通过临床样本检测、细胞功能实验及分子机制验证,探究FOXC1在LSCC组织及人LSCC细胞中的表达水平,分析其与患者临床病理特征及预后状况的关联,并初步探索FOXC1是否通过上调蛋白激酶B2(v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2, AKT2)表达激活磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号通路,诱导EMT进程,进而促进肿瘤进展,以期为LSCC的分子靶向治疗提供潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞及主要试剂

选取2014年至2018年在河北医科大学第四医院行LSCC根治术的60例患者作为研究对象,术中收集肿瘤组织及对应的癌旁正常组织(与癌灶边缘 ≥ 2 cm,经病理学确认证实为正常鳞状上皮)。收集患者临床资料(年龄、吸烟史、TNM分期、淋巴结转移情况)。纳入标准:①术后病理证实为LSCC;②术前未接受放化疗、靶向治疗或免疫治疗;③临床资料完整;④有足够组织用于后续分子检测。排除标准:①合并其他原发恶性肿瘤;②接受过新辅助治疗;③组织样本质量不符合检测要求。肿瘤的TNM分期依据美国癌症联合委员会(AJCC)制定的LSCC相关分期标准^[11]进行判

定,吸烟史阳性定义为每日吸烟数量 ≥ 5 根且吸烟持续时间 ≥ 2 年^[12]。本研究获医院伦理委员会审核批准(2023KS246),所有患者均签署知情同意书。

本研究入组LSCC患者术后均接受规律随访,其中失访2例(3.3%),其余58例纳入生存分析。术后采用门诊复查、电话随访及住院病历追溯相结合的方式定期进行随访。总生存期定义为自手术之日起至因任何原因死亡的时间,将失访患者及至随访截止日期仍存活的患者归为删失数据,主要结局指标为术后5年总生存率。

人LSCC细胞AMC-HN-8、TU177、TU686与人牙龈上皮细胞HEG购自北京北纳创联生物技术研究。RPMI 1640培养基和DMEM培养基购自美国Gibco公司,Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Thermo公司,GoTaq[®]qPCR Master Mix和MTS细胞增殖试剂盒购自美国Promega公司,反转录试剂盒购自瑞士Roche公司,动物总RNA快速提取试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司,兔抗人FOXC1单克隆抗体、兔抗人 β -actin抗体和HRP标记山羊抗兔IgG二抗购自英国Abcam公司,羊抗兔二抗购自美国KPL公司,常规PCR引物和RT-qPCR引物均由上海生工生物工程有限公司合成,FOXC1过表达质粒pcDNA3.1-FOXC1及相应对照pcDNA3.1-NC、AKT2靶向siRNA及阴性对照siControl由苏州吉玛基因股份有限公司合成。

1.2 FOXC1表达及靶基因预测的生物信息学分析

检索GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>),分析FOXC1在头颈肿瘤、肾上腺皮质癌、膀胱尿路上皮癌、乳腺浸润癌等30余种肿瘤的表达情况,利用生物信息学软件(GEPIA1 v1.0)预测FOXC1在PI3K/AKT信号通路中的潜在下游基因,明确FOXC1与AKT2的潜在调控关系。通过JASPAR数据库(<https://jaspar.elixir.no/>)的FOXC1模体(MA0852.2),以相对阈值 ≥ 0.8 扫描人AKT2基因转录起始位点上游1 000 bp启动子区域(GRCh38),预测潜在结合位点。

1.3 免疫组织化学染色检测临床样本中FOXC1的表达情况

临床肿瘤组织的石蜡切片经脱蜡、水化后,置于枸橼酸缓冲液(pH = 6.0)中高压抗原修复10 min,应用3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶。滴加FOXC1一抗(1:100),于37℃反应3 h,阴性对照组以PBS替代一抗。滴加反应增强液、增强酶标山羊抗兔IgG二抗,于37℃反应2 h,加入DAB试剂显色。

由3名资深病理科医师在不知晓临床资料的情况下独立阅片,根据阳性细胞比例评分(0%记为0分,1%~25%记为1分,26%~50%记为2分,51%~

100%记为3分)和染色强度评分(阴性记为0分,弱阳性记为1分,中等阳性记为2分,强阳性记为3分)相乘得出FOXK1免疫组织化学评分,0~4分为低表达、5~9分为高表达。

1.4 细胞培养、转染及分组

AMC-HN-8细胞及TU686、TU177、HEG细胞分别用含10%胎牛血清的DMEM培养液(AMC-HN-8细胞)和含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液(TU686、TU177、HEG细胞)培养,置于37℃、5% CO₂恒温培养箱中常规培养。

取对数生长期的TU177细胞,接种于6孔板,待汇合度达70%~80%时按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书进行转染。单转染部分,分别将pcDNA3.1-FOXK1、pcDNA3.1-NC、siFOXK1和siControl转染至TU177细胞,命名为pcDNA3.1-FOXK1组、pcDNA3.1-NC组、siFOXK1组及siControl组。共转染部分,分别将等量的质粒和siRNA按以下组合转染至TU177细胞:pcDNA3.1-NC + siControl组、pcDNA3.1-FOXK1 + siControl组、pcDNA3.1-NC + siAKT2组、pcDNA3.1-FOXK1 + siAKT2组。转染后置于培养箱中培养48 h,用于后续实验。

1.5 RT-qPCR检测临床样本及细胞中mRNA的表达

按照动物总RNA快速提取试剂盒说明书,分别提取LSCC组织、癌旁正常组织及各组细胞中的总RNA,按照反转录试剂盒说明书将总RNA逆转录为cDNA,以cDNA为模板进行RT-qPCR扩增。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性15 s、60℃退火30 s、72℃延伸30 s,共40个循环,最后72℃延伸10 min。以GAPDH为内参基因,采用2^{-ΔΔCT}法^[13]计算FOXK1、AKT2及EMT相关标志物[钙黏蛋白2(cadherin 2, CDH2)、纤连蛋白1(fibronectin 1, FN1)、波形蛋白(vimentin, VIM)、ZEB1、E-钙黏蛋白(E-cadherin)和蜗牛蛋白(Snail)]的相对表达量。

1.6 WB法检测FOXK1蛋白及AKT2蛋白的表达

各组TU177细胞用RIPA裂解缓冲液裂解并经超声破碎,调整样本体积和蛋白浓度一致后,经10% SDS-PAGE分离蛋白,转膜后用5%脱脂牛奶封闭1 h,加入FOXK1、AKT2、p-PI3K、p-AKT及β-actin一抗(1:100),置于4℃作用过夜,TBST洗涤后加入HRP标记的对应二抗,室温作用1 h,TBST洗涤后加入ECL试剂显色。使用ImageJ软件对蛋白条带的灰度值进行定量分析,以β-actin为内参,计算目的蛋白的相对表达水平。

1.7 MTS实验检测各组TU177细胞的增殖能力

取转染后培养24 h的各组TU177细胞,胰酶消化后,用完全培养基重悬并计数,接种于96孔板中

(1 × 10³个/孔,每孔体积100 μL),每组设6个复孔。分别在接种后的0、24、48、72和96 h,每孔加入20 μL MTS试剂,避光培养2 h后,用酶标仪测定490 nm波长处各孔的光密度(D)值,以时间为横轴、D值为纵轴绘制细胞增殖曲线。

1.8 克隆形成实验检测各组TU177细胞的增殖能力

取转染后培养24 h的各组TU177细胞,胰酶消化后,用完全培养基重悬并计数,接种于6孔板中(3 × 10³个/孔),置于培养箱中常规培养。待培养至每个克隆团中的细胞数 > 50个时,终止培养,PBS清洗2次,4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色20 min,PBS清洗后晾干,光学显微镜下计数克隆数,计算克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) × 100%。

1.9 划痕愈合实验检测各组TU177细胞迁移能力

取转染后培养24 h的各组TU177细胞,胰酶消化后,以5 × 10⁵个/孔接种于6孔板中,培养至细胞汇合度达90%以上时,用200 μL移液器吸头尖端垂直于孔板进行划痕,PBS冲洗3次以去除脱落的细胞。每孔加入2 mL无血清培养基,置于培养箱中继续培养,于0和24 h在倒置显微镜下对划痕同一位置拍照,每组随机选取5个视野,采用ImageJ软件测量划痕的宽度,取平均值,计算细胞迁移率 = (0 h划痕宽度 - 24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 × 100%。

1.10 Transwell实验检测各组TU177细胞迁移和侵袭能力

取转染后培养24 h的各组TU177细胞,胰酶消化后,用无血清培养基重悬并计数,调整密度为5 × 10⁵个/mL。

迁移实验:取200 μL细胞悬液(细胞浓度为1 × 10⁵个/孔)接种于Transwell小室的上室,下室加入600 μL含10%胎牛血清的培养基,置于培养箱中培养24 h。

侵袭实验:将Matrigel基质胶与无血清培养基按1:15混合,取50 μL稀释后的基质胶预铺于Transwell小室的上室,于培养箱中放置4~6 h至胶凝固,后续步骤同迁移实验。

培养结束后,用棉签轻轻擦去上室未穿膜的细胞,PBS清洗3次,4%多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色20 min,清洗晾干后,在倒置显微镜下随机选取5个视野,分别计数迁移细胞数和侵袭细胞数。

1.11 统计学处理

采用SPSS 26.0统计软件和GraphPad Prism 10.0绘图软件进行数据分析及图形绘制。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA);计数资料以n(%)表示,FOXK1表达与患者临床病理特征

的相关性采用 χ^2 检验,患者生存率分析采用Kaplan-Meier法和Log-rank检验;MTS增殖曲线采用重复测量方差分析(two-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

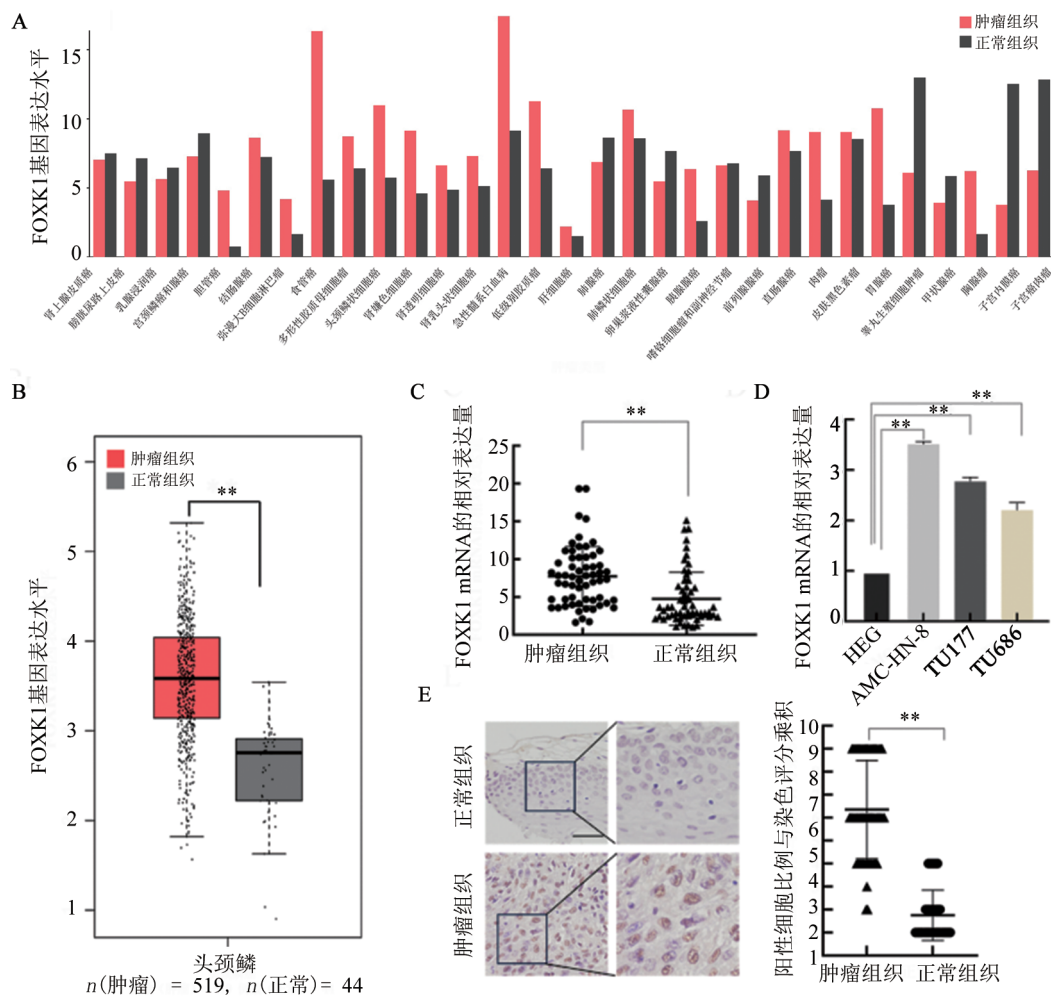
2 结果

2.1 FOXK1 在多种肿瘤及LSCC组织中呈高表达

GEPIA数据库结果显示,FOXK1在多种肿瘤组织中呈现高表达(图1A)。与癌旁正常组织相比,

头颈鳞癌组织中的FOXK1表达显著上调(图1B, $P < 0.01$)。

RT-qPCR结果(图1C、D)显示,FOXK1在LSCC组织及LSCC细胞AMC-HN-8、TU686、TU177中表达显著升高(均 $P < 0.01$)。免疫组织化学染色结果(图1E)显示,FOXK1主要定位于细胞核,且FOXK1在LSCC肿瘤组织中表达水平显著高于癌旁正常组织($P < 0.01$)。



A:GEPIA数据库分析FOXK1在头颈肿瘤等不同肿瘤组织中的表达情况;B:GEPIA数据库分析FOXK1在头颈鳞癌组织与癌旁正常组织中的表达情况;C:RT-qPCR法检测FOXK1在LSCC组织及配对癌旁正常组织中的表达情况;D:RT-qPCR检测FOXK1在人LSCC细胞AMC-HN-8、TU177、TU686与人牙龈上皮细胞HEG中的表达情况;E:免疫组化法检测FOXK1蛋白在LSCC组织中的表达情况($\times 200, \times 400$)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图1 FOXK1在多种肿瘤及LSCC组织、细胞中呈高表达

2.2 FOXK1 表达与LSCC患者肿瘤分期及预后相关
单因素分析(表1)显示,III/IV期LSCC患者的FOXK1高表达率显著高于I/II期患者($\chi^2 = 5.038$, $P < 0.05$)。

Kaplan-Meier生存分析(表2)共纳入58例患者(失访2例)。FOXK1高表达患者5年生存率为

47.3%,显著低于低表达患者($P < 0.05$);肿瘤TNM分期III/IV期患者的5年生存率为38.1%,显著低于I/II期患者($P < 0.05$)。提示FOXK1高表达与LSCC患者较晚TNM分期及不良预后有关。

2.3 FOXK1 促进TU177细胞恶性生物学行为

RT-qPCR与WB结果(图2A、B)显示,瞬时转染

可有效上调或下调 TU177 细胞中 FOXK1 的 mRNA 及蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。MTS 细胞增殖实验与细胞克隆形成实验结果(图 2C、D)显示,FOXK1 过表达可显著提升 TU177 细胞的增殖能力 ($P < 0.01$);而敲低 FOXK1 表达可显著抑制细胞增殖 ($P < 0.01$)。

表1 LSCC 肿瘤组织中 FOXK1 的表达情况与临床病理特征之间的关联性

临床指标	<i>n</i>	FOXK1 表达水平		χ^2	<i>P</i>
		高表达 <i>n</i> (%)	低表达 <i>n</i> (%)		
年龄/岁					
< 60	29	16(55.1)	13(44.9)	1.001	0.317
≥ 60	31	21(67.7)	10(32.3)		
吸烟史					
否	34	23(67.6)	11(32.4)	1.187	0.276
是	26	14(53.8)	12(46.2)		
TNM 分期					
I / II	39	20(51.2)	19(48.8)	5.038	0.024
III/IV	21	17(80.9)	4(19.1)		
淋巴结转移					
N0	49	28(57.1)	21(42.9)	2.314	0.128
N1/2/3	11	9(81.8)	2(18.2)		

表2 FOXK1 表达及临床病理特征与 LSCC 患者术后 5 年生存率之间相关性的单因素分析

临床指标	<i>N</i>	<i>n</i> (%)	<i>P</i>
FOXK1 表达			
高表达	38	18(47.3)	0.016
低表达	20	16(80.0)	
年龄/岁			
< 60	29	20(68.9)	0.110
≥ 60	29	14(48.2)	
吸烟史			
否	32	19(59.3)	0.897
是	26	15(57.6)	
TNM 分期			
I / II	37	26(70.2)	0.017
III/IV	21	8(38.1)	
淋巴结转移			
N0	47	28(59.5)	0.760
N1/2/3	11	6(54.5)	

划痕愈合实验及 Transwell 实验结果(图 2E、F)

进一步证实,FOXK1 过表达后细胞迁移率、迁移细胞数及侵袭细胞数显著增加,敲低 FOXK1 后上述指标则显著降低(均 $P < 0.01$)。上述结果表明,FOXK1 可显著促进 LSCC 细胞 TU177 增殖、迁移与侵袭等恶性生物学行为。

2.4 FOXK1 诱导 TU177 细胞发生 EMT

RT-qPCR 检测结果(图 3)显示,与 pcDNA3.1-NC 组相比,pcDNA3.1-FOXK1 组 TU177 细胞间充质标志物 CDH2、FN1、VIM、ZEB1 mRNA 表达水平均显著上升 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.05$),上皮标志物 E-cadherin mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.01$);敲低 FOXK1 则呈相反趋势 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。上述结果表明,FOXK1 可诱导 LSCC 细胞 TU177 发生 EMT。

2.5 FOXK1 激活 PI3K/AKT 信号通路并上调 AKT2 表达

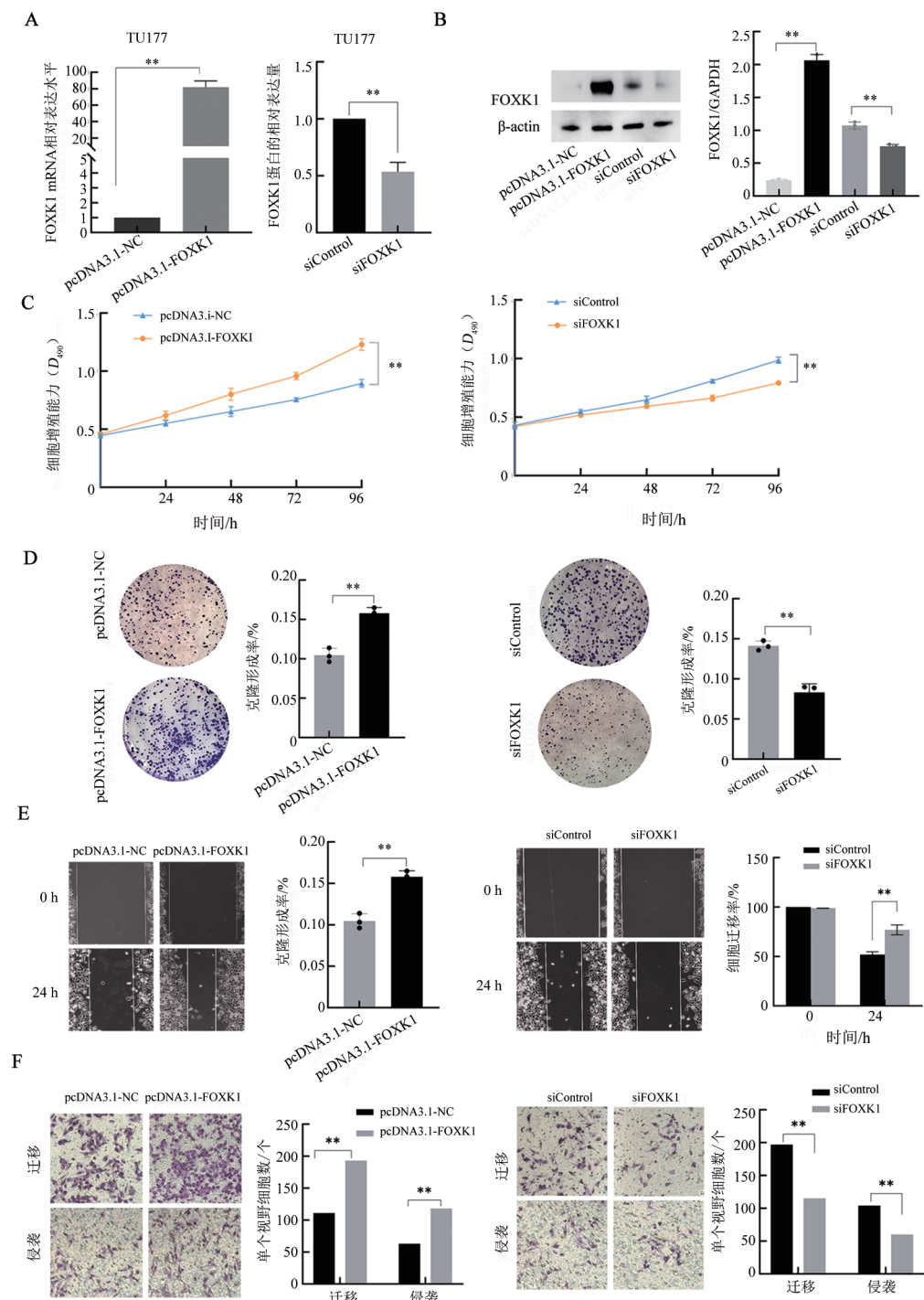
WB 结果(图 4A)显示,相较于 pcDNA3.1-NC 组,pcDNA3.1-FOXK1 组 TU177 细胞中 p-PI3K、p-AKT 的磷酸化水平均显著上调,提示 FOXK1 可激活 PI3K/AKT 信号通路。生物信息学分析(图 4B、C)发现 AKT2 作为 PI3K/AKT 信号通路的关键分子,其基因启动子区存在多个 FOXK1 保守结合位点 (GTAAACA),且 FOXK1 与 AKT2 在头颈部鳞癌组织中的表达水平呈正相关关系 ($r = 0.38$, $P < 0.001$)。WB 结果(图 4D)进一步证实,FOXK1 过表达可上调 TU177 细胞中 AKT2 蛋白表达水平。以上结果表明,FOXK1 可通过正向调控 AKT2 的表达,激活 LSCC 细胞内 PI3K/AKT 信号通路。

2.6 敲低 AKT2 可部分逆转 FOXK1 过表达诱导的 TU177 细胞的恶性生物学行为

与 pcDNA3.1-FOXK1 + siControl 组相比,pcDNA3.1-FOXK1 + siAKT2 组 TU177 细胞的增殖能力、克隆形成能力均显著降低(图 5A、B, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);划痕愈合及 Transwell 实验(图 5C、D)进一步证实,敲低 AKT2 可显著降低 FOXK1 过表达细胞的迁移率及迁移、侵袭细胞数 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。上述结果证实,敲低 AKT2 可有效逆转 FOXK1 过表达对 LSCC 细胞恶性生物学行为的促进作用。

RT-qPCR 结果(图 5E)显示,敲低 AKT2 后,FOXK1 过表达 TU177 细胞中间充质标志物 CDH2、VIM 及 EMT 关键转录因子 Snail 的 mRNA 水平均显著下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而上皮标志物 E-cadherin 的 mRNA 表达水平显著上升 ($P < 0.01$)。

上述结果证实,敲低 AKT2 可有效逆转 FOXK1 过表达对 LSCC 细胞恶性生物学行为及 EMT 进程的促进作用,表明 AKT2 可能是 FOXK1 调控 LSCC 细胞恶性生物学行为的重要下游分子。



A: RT-qPCR 验证 FOXK1 在 TU177 细胞中的过表达(左)或敲低(右)效率; B: WB 法验证 FOXK1 在 TU177 细胞中的过表达或敲低效率; C: MTS 实验检测过表达(左)或敲低(右)FOXK1 对 TU177 细胞增殖能力的影响; D: 克隆形成实验检测过表达(左)或敲低(右)FOXK1 对 TU177 细胞增殖能力的影响; E: 划痕愈合实验检测过表达(左)或敲低(右)FOXK1 对 TU177 细胞迁移能力的影响 ($\times 100$); F: Transwell 实验检测过表达(左)或敲低(右)FOXK1 对 TU177 细胞迁移及侵袭能力的影响 ($\times 100$)。* $P < 0.01$ 。

图2 FOXK1 过表达或敲低表达对 LSCC 细胞增殖、迁移与侵袭的影响

3 讨论

LSCC 的发生发展是一个多基因、多信号通路共同参与的复杂过程,转录因子的异常表达及调控紊乱在其中发挥着核心作用^[4]。FOXK1 作为 FOX 转录因子家

族中重要的癌基因,在多种恶性肿瘤中的促肿瘤作用已得到证实^[5-9],但在 LSCC 中的研究鲜有报道。

本研究通过 GEPIA 数据库、临床样本及细胞实验,证实 FOXK1 在 LSCC 组织中及人喉癌细胞中高表达。

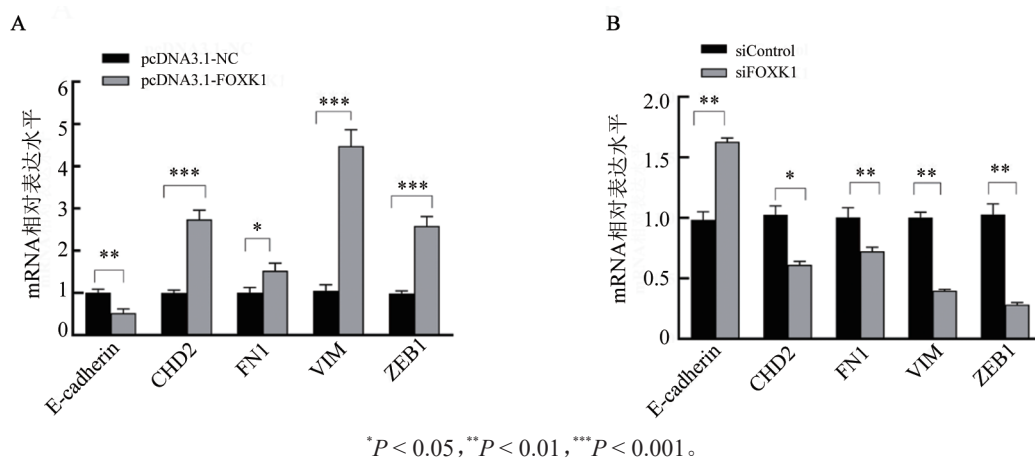
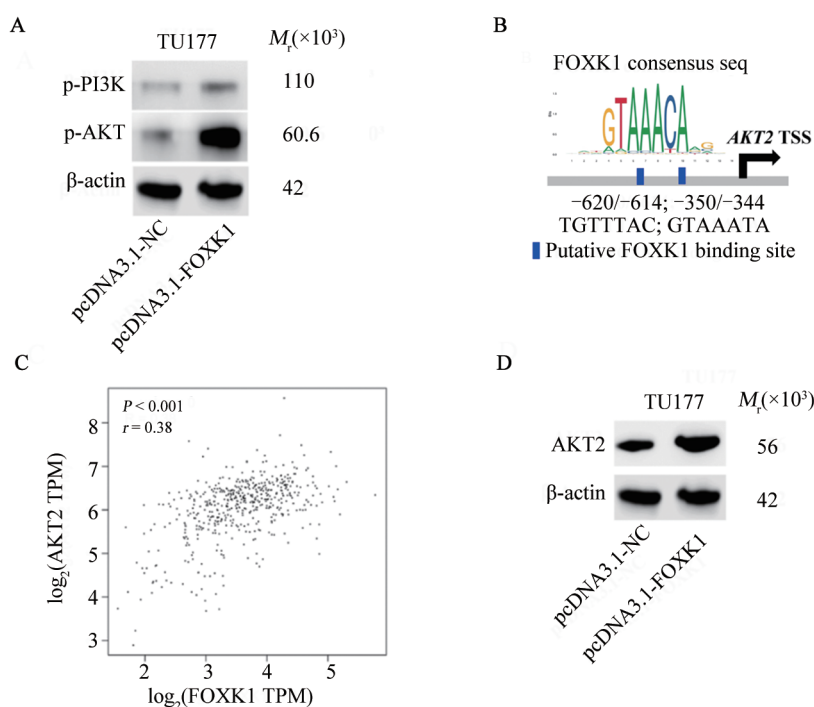


图3 FOXK1过表达(A)或敲低(B)对TU177细胞中EMT相关标志物表达情况的影响



A: WB检测FOXK1过表达对TU177细胞中p-PI3K、p-AKT蛋白表达的影响; B: 生物信息学预测AKT2启动子区中FOXK1的保守结合基序; C: 头颈部鳞癌组织中FOXK1与AKT2表达的相关性分析; D: WB检测FOXK1过表达对TU177细胞中AKT2蛋白表达的影响。

图4 FOXK1激活PI3K/AKT信号通路并上调AKT2表达

本研究对LSCC患者进行随访,发现FOXK1高表达与患者更高的TNM分期和更低的5年生存率显著相关。这与邓素华等^[15]在乳腺癌中发现的结论一致,即FOXK1高表达与患者病理分级、TNM分期密切相关,是影响患者预后的独立危险因素。

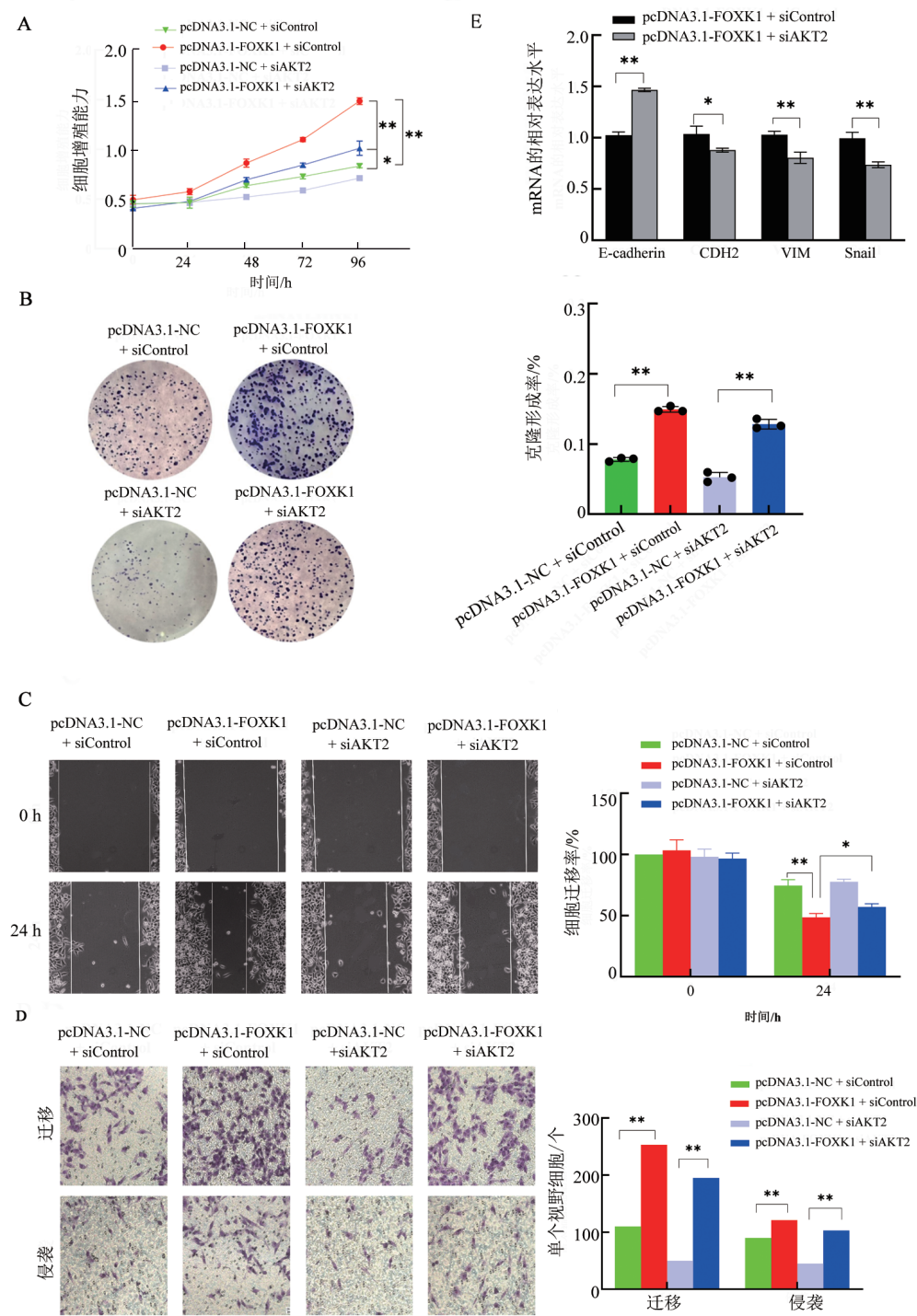
体外功能实验表明,过表达FOXK1可显著增强TU177细胞的增殖、迁移与侵袭能力,而敲低FOXK1产生相反的效应。这与Feng^[16]等、Wang^[17]等的研究结果一致,提示了FOXK1在LSCC中具有促肿瘤作用。进一步研究发现,过表达FOXK1可显著下调上皮标志物E-cadherin、上调CDH2、FN1、VIM、ZEB1等间充质标志物的表达,敲低后效应则相反。这提示

FOXK1可能通过诱导EMT促进LSCC细胞迁移与侵袭。这与FOXK1在胃癌^[18]中的调控机制相似,暗示FOXK1在肿瘤EMT进程中具有保守的调控作用。

PI3K/AKT信号通路是调控肿瘤恶性生物学行为的核心通路^[19-20]。现有研究已证实FOXK1可通过调控PI3K/AKT信号通路介导乳腺癌、肝癌等多种肿瘤的恶性进展^[21-22]。AKT2作为该通路的关键下游分子,其异常扩增与高表达已被证实与肺癌、结直肠癌等肿瘤的侵袭、迁移及增殖进程密切相关^[23-24]。本研究通过生物信息学分析发现,AKT2基因启动子区存在FOXK1保守结合位点,且二者在头颈部鳞癌组织中表达呈显著正相关;细胞实验证实,FOXK1过表达

可显著上调 TU177 细胞中 p-PI3K、p-AKT 的蛋白水平, 敲低 FOXK1 则可抑制 PI3K/AKT 通路的激活。而功能回复实验进一步证实, 敲低 AKT2 可部分逆转 FOXK1 过表达对 LSCC 细胞增殖、迁移、侵袭以及 EMT 进程的促进作用。作为 EMT 核心转录因子,

Snail 可抑制 E-cadherin、上调 CDH2 及 VIM 等间充质标志物, 驱动 EMT 表型转化^[25]。综上, 本研究提示 FOXK1 可能通过上调 AKT2 的表达, 激活 PI3K/AKT 信号通路, 并进一步调控下游 Snail/EMT 轴, 诱导 LSCC 细胞发生 EMT, 最终促进 LSCC 的恶性进展。



A、B:MTS 实验(A)和克隆形成实验(B)检测敲低 AKT2 对过表达 FOXK1 的 TU177 细胞增殖能力的影响;C:划痕愈合实验检测敲低 AKT2 对过表达 FOXK1 的 TU177 细胞迁移能力的影响($\times 100$);D:Transwell 实验检测敲低 AKT2 对过表达 FOXK1 的 TU177 细胞迁移和侵袭能力的影响($\times 100$);E:RT-qPCR 检测敲低 AKT2 对过表达 FOXK1 的 TU177 细胞中 EMT 相关因子的 mRNA 表达水平的影响。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图5 敲低 AKT2 可逆转 FOXK1 过表达诱导的恶性表型

本研究存在一定局限性:仅通过体外实验验证了FOXK1/AKT2轴的促肿瘤功能,尚未开展动物实验及独立临床队列验证;尚需染色质免疫沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)及双荧光素酶实验确认FOXK1与AKT2启动子的直接结合。后续将构建裸鼠移植瘤模型进行体内验证,并扩大临床样本量,进一步评估FOXK1/AKT2的预后价值,为临床转化提供依据。

综上所述,本研究证实FOXK1在LSCC中高表达,并与不良预后密切相关;FOXK1可能通过上调AKT2激活PI3K/AKT通路,诱导EMT并促进LSCC恶性进展。FOXK1/AKT2调控轴可能成为LSCC预后评估的潜在分子标志物及靶向治疗的候选靶点,并为LSCC的临床转化提供新的思路和初步实验依据。

利益冲突声明:全体作者声明,本研究不存在任何经济或非经济的利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] 陈文杰,王斌全,高伟,等. 喉癌流行病学特征及影响因素分析[J]. 中国当代医药, 2015, 22(12): 43-46.
- [2] Smith J D, Gensterblum-Miller E, Fomer D W A, et al. Tumor hypoxia and CD8⁺ T-cell infiltration in patients with advanced laryngeal cancer [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2025, 173(3): 645-650. DOI:10.1002/ohn.1291.
- [3] Saito K, Inagaki K, Kamimoto T, et al. microRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71480. DOI:10.1371/journal.pone.0071480.
- [4] Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, et al. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes[J]. Cancer Lett, 2013, 328 (2): 198-206. DOI:10.1016/j.canlet.2012.09.017.
- [5] Chen F, Xiong W, Dou K, et al. Knockdown of FOXK1 suppresses proliferation, migration, and invasion in prostate cancer cells[J]. Oncol Res, 2017, 25(8): 1261-1267. DOI:10.3727/096504017X14871164924588.
- [6] Zhang P, Tang W M, Zhang H, et al. miR-646 inhibited cell proliferation and EMT-induced metastasis by targeting FOXK1 in gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2017, 117(4): 525-534. DOI:10.1038/bjc.2017.181.
- [7] Li P K, Yu Z S, He L, et al. Knockdown of FOXK1 inhibited the proliferation, migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 270-276. DOI:10.1016/j.biopha.2017.05.087.
- [8] Xie R Y, Wang J, Liu X H, et al. RUFY3 interaction with FOXK1 promotes invasion and metastasis in colorectal cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7: 3709. DOI:10.1038/s41598-017-04011-1.
- [9] Yamashita H, Amponsa V O, Warrick J I, et al. On a FOX hunt: functions of FOX transcriptional regulators in bladder cancer[J]. Nat Rev Urol, 2017, 14(2): 98-106. DOI:10.1038/nrurol.2016.239.
- [10] Huang X T, Xiang L, Li Y Q, et al. Snail/FOXK1/Cyr61 signaling axis regulates the epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(2): 590-603. DOI:10.1159/000490015.
- [11] Amin M B, Edge S B, Greene F L, et al. AJCC Cancer Staging Manual[M]. 8th ed. New York: Springer, 2017: 149-161.
- [12] Gao S, Wang Y H, Li M. Cigarette smoking increases levels of retinol-binding protein-4 in healthy men with normal glucose tolerance[J]. Chinese Medical Journal, 2012, 125(10): 1686-1689. PMID:22800884.
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.
- [14] 咎雨欣, 丁妍. 基于加权基因共表达网络探索喉癌干性关键基因 [J]. 数理医药学杂志, 2024, 37(3): 171-179. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202312091.
- [15] 邓素华. 乳腺癌组织中ELMO3、FOXK1的表达及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(4): 744-751. DOI:10.3978/j.issn.2095-6959.2019.04.009.
- [16] Feng Y J, Bai Z G, Song J N, et al. FOXK1 plays an oncogenic role in the progression of hilar cholangiocarcinoma[J]. Mol Med Rep, 2020, 23(2): 91. DOI:10.3892/mmr.2020.11730.
- [17] Wang Y X, Sun L B, Qiu W S, et al. Inhibiting Forkhead box K1 induces autophagy to reverse epithelial-mesenchymal transition and metastasis in gastric cancer by regulating Myc-associated zinc finger protein in an acidic microenvironment[J]. Aging, 2020, 12 (7): 6129-6150. DOI:10.18632/aging.103013.
- [18] Zhang H, Wu X S, Xiao Y Z, et al. Coexpression of FOXK1 and vimentin promotes EMT, migration, and invasion in gastric cancer cells[J]. J Mol Med, 2019, 97(2): 163-176. DOI: 10.1007/s00109-018-1720-z.
- [19] Zhu Q W, Zhang X Y, Lu F, et al. RUNX1-BMP2 promotes vasculogenic mimicry in laryngeal squamous cell carcinoma via activation of the PI3K-AKT signaling pathway[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 227. DOI:10.1186/s12964-024-01605-x.
- [20] Wang Y X, Rozen V, Zhao Y Q, et al. Oncogenic activation of PIK3CA in cancers: emerging targeted therapies in precision oncology[J]. Genes Dis, 2025, 12(2): 101430. DOI: 10.1016/j.gendis.2024.101430.
- [21] Garry D J, Maeng G, Garry M G. Foxk1 regulates cancer progression [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(17): 1041. DOI:10.21037/atm-2020-94.
- [22] Wang Y F. FOXK1-induced upregulation of NXPH4 predicts poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma progression via PI3K/Akt pathway[J]. Am J Cancer Res, 2025, 15(7): 3164-3187. DOI:10.62347/zlos1416.
- [23] Liu T, Zhu J J, Du W W, et al. AKT2 drives cancer progression and is negatively modulated by miR-124 in human lung adenocarcinoma[J]. Respir Res, 2020, 21(1): 227. DOI:10.1186/s12931-020-01491-0.
- [24] Rychahou P G, Kang J, Gulhati P, et al. Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51): 20315-20320. DOI: 10.1073/pnas.0810715105.
- [25] Zhao X, Yu D, Yang J P, et al. Knockdown of Snail inhibits epithelial-mesenchymal transition of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells through the vitamin D receptor signaling pathway[J]. Biochem Cell Biol, 2017, 95(6): 672-678. DOI: 10.1139/bcb-2017-0039.

【收稿日期】 2026-03-26

【修回日期】 2026-06-29

【本文编辑】 邢一凡