

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.21.004

乳腺癌组织中叉头蛋白 F1 表达与乳腺癌临床生物学参数及预后的关系

王庆伟¹, 徐振雷^{2△}

(南京医科大学附属淮安第一医院:1. 检验科;2. 烧伤整形科, 江苏淮安 223001)

摘要:目的 探讨乳腺癌组织中叉头蛋白 F1(FOXF1)表达,以及其与乳腺癌临床生物学参数、预后的关系。方法 利用免疫组织化学法检测 139 对乳腺癌组织和对应癌旁组织中 FOXF1、钙黏附蛋白 E(E-cadherin)和钙黏附蛋白 N(N-cadherin)的表达,并分析不同临床生物参数的乳腺癌组织中 FOXF1 的表达阳性率,以及 FOXF1 表达对患者预后的影响。结果 乳腺癌组织中的 FOXF1、E-cadherin 阳性表达率分别为 28.8%和 33.8%,均低于癌旁组织的 80.6%和 79.1%,乳腺癌组织中的 N-cadherin 阳性表达率为 31.6%,高于癌旁组织的 10.8%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。不同肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期的乳腺癌组织中,FOXF1 的阳性率差异有统计学意义($P<0.05$)。FOXF1 阴性乳腺癌患者的总体生存率(72.73%)低于 FOXF1 阳性乳腺癌患者的总体生存率(95.00%),差异有统计学意义($\chi^2=8.113, P=0.004$)。FOXF1 阴性乳腺癌患者的无复发生存率(63.64%)低于 FOXF1 阳性乳腺癌患者的无复发生存率(95.00%),差异有统计学意义($\chi^2=4.396, P=0.036$)。结论 FOXF1 在乳腺癌组织中低表达,其低表达可能与肿瘤增殖、转移、患者预后有关。

关键词:叉头蛋白 F1; 乳腺癌; 表达; 转移; 预后**中图分类号:**R736.3**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)21-3175-04

Expression of forked protein F1 in breast cancer and its relationship with clinical biological behaviors and prognosis of breast cancer

WANG Qingwei¹, XU Zhenlei^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Huai'an No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu 223001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of forked protein F1 (FOXF1) protein in breast cancer and its relationship with clinical biological behaviors and prognosis of breast cancer. **Methods** The expression of FOXF1, E-cadherin, N-cadherin were detected in 139 pairs of breast carcinoma tissues by immunohistochemical staining. Then analyze the relationship between FOXF1 and clinicopathological characteristics in breast cancer, the effect of FOXF1 on the prognosis of breast cancer. **Results** Positive rates of FOXF1, E-cadherin expression in breast carcinoma tissues were 28.8%, 33.8%, which were significant lower than 80.6%, 79.1% in carcinomatous tissues ($P<0.05$). Positive rate of N-cadherin in breast carcinoma tissues was 31.6%, which was significant higher than 10.8% in carcinomatous tissues ($P<0.05$). The positive rate of FOXF1 in different tumor sizes, lympho node metastasis, TNM breast carcinoma tissues were significant different ($P<0.05$). Overall survival of negative FOXF1 expression-breast carcinoma tissues (72.73%) was significant lower than that of positive-breast carcinoma tissues (95.00%, $\chi^2=8.113, P=0.004$). The recurrence-free survival of negative FOXF1 expression-breast carcinoma tissues (63.64%) was significant lower than that of positive-breast carcinoma tissues (95.00%, $\chi^2=4.396, P=0.036$). **Conclusion** The low expression of FOXF1 in breast cancer might be associated with tumor proliferation, tumor metastasis and poor prognosis of breast carcinoma patients.

Key words: forked protein F1; breast cancer; expression; metastasis; prognosis

乳腺癌在女性中是发病率很高的肿瘤,并且其发病率逐年上升,得益于治疗手段的综合运用和治疗水平的提高,近年来乳腺癌患者的预后得到较大的改善,但仍不容乐观,因此寻求乳腺癌新的治疗手段迫在眉睫,近年来生物学标志物和功能基因一直是乳腺

肿瘤研究领域的热点^[1]。转录因子叉头蛋白 F1(FOXF1)是肺发育和肺损伤/修复的关键调节因子,已有研究在有肺静脉错位的肺泡毛细血管发育不良患者中发现 FOXF1 基因位点杂合缺失或点突变,此疾病是罕见的先天性疾病,其特点是肺泡毛细血管网

严重发育缺陷^[2-3]。FOXF1 的异常表达与结肠癌、肺癌、前列腺癌的进展密切相关^[4-6]。目前,FOXF1 在乳腺癌中的研究很少^[7],本研究拟观察乳腺癌组织中 FOXF1 的表达水平,并且研究乳腺癌组织中 FOXF1 的表达与临床病理参数及患者预后之间的关系。

1 资料与方法

1.1 标本来源 139 对乳腺癌组织及对应癌旁组织的芯片为上海芯超生物科技有限公司产品,包括完整的临床病理资料,如年龄、性别、淋巴结转移、肿瘤大小、TNM 分期、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、原癌基因人类表皮生长因子受体-2(HER-2)染色和随访资料等信息。

1.2 仪器与试剂 免疫组织化学试剂盒购自上海吉泰生物科技有限公司,鼠抗人 FOXF1 抗体购自美国西格玛(sigma)公司,兔抗鼠二抗及鼠抗人钙黏附蛋白 E(E-cadherin)、钙黏附蛋白 N(N-cadherin)检测试剂盒购自美国 CST 公司。

1.3 方法 免疫组织化学检测:芯片经 10%的甲醛固定后使用乙醇脱水,石蜡包埋后采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)法染色,根据试剂盒说明书严格控制染色过程,使用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照,每次试验用已知阳性片作为阳性对照。

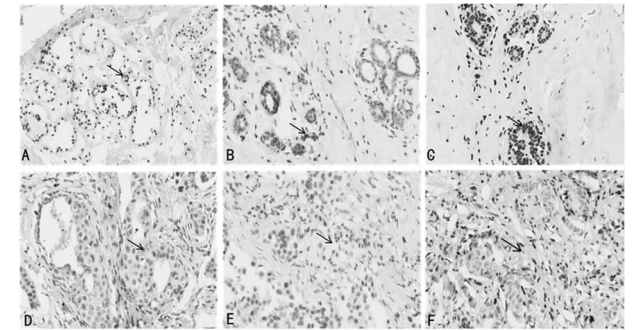
免疫组织化学结果判定:将组织切片放置在光学显微镜下进行观察和评分,并且进行病理图像采集。FOXF1 主要定位在细胞核中,综合高倍镜下染色强度和阳性细胞百分率进行阴阳性判断^[8]。染色强度方面,基本未着色评分为 0 分,着色为淡黄色评分为 1 分,着色为棕黄色评分为 2 分,着色为黄褐色评分为 3 分。阳性细胞百分率评分标准为芯片置于显微镜下计数 500 个细胞,阳性细胞百分率<10%评为 0 分;10%~<40%评为 1 分;40%~<70%评为 2 分,≥70%评为 3 分。将染色强度和阳性细胞百分率评分相加后得到的总分作为阴阳性判断的依据,0~2 分评定为阴性;≥2~6 分评定为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以例数或百分率表示,2 组间及多组间比较采用 χ^2 检验,多组间中的 2 组比较采用 Fisher 检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 法;采用 Log-Rank 检验比较 FOXF1 阴性患者和阳性患者之间总体生存率及无复发生存率的差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肿瘤组织与癌旁组织中 FOXF1、E-cadherin 和 N-cadherin 的表达情况 139 份肿瘤组织中 FOXF1 和 E-cadherin 的阳性率低于癌旁组织($\chi^2=75.248, P=0.001; \chi^2=58.082, P=0.001$),肿瘤组织中 N-cadherin 的阳性率高于癌旁组织($\chi^2=9.616, P=0.002$)。见表 1、图 1。

组织类型	表 1 FOXF1、E-cadherin 及 N-cadherin 的表达情况[n(%)]		
	FOXF1	E-cadherin	N-cadherin
肿瘤组织	40(28.8)	47(33.8)	44(31.6)
癌旁组织	112(80.6)	110(79.1)	22(10.8)
χ^2	75.248	58.082	9.616
P	0.001	0.001	0.002



注:FOXF1 主要定位于细胞核,A、B、C 为癌旁组织,D、E、F 为肿瘤组织,其中 A、D、E 为 FOXF1 阴性,B、C、F 为 FOXF1 阳性,箭头所指为典型区域

图 1 FOXF1 在乳腺癌组织和癌旁组织中的表达(SP,×200)

2.2 乳腺癌组织中 FOXF1 的表达与肿瘤生物参数的关系 不同肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期的乳腺癌组织中,FOXF1 的阳性率差异有统计学意义($P<0.05$);不同年龄,PR、ER、HER-2 表达,组织学类型的乳腺癌组织中 FOXF1 的阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 乳腺癌组织中 FOXF1 的表达与乳腺癌临床生物参数的关系[n(%)]

参数	n	FOXF1		χ^2	P
		阴性	阳性		
年龄(岁)				1.870	0.171
>60	43	34(79.1)	9(20.9)		
≤60	96	65(67.7)	31(32.3)		
肿瘤大小				44.931	0.001
T1	57	23(40.4)	34(59.6)		
T2~T3	82	76(92.7)	6(7.3)		
淋巴结转移				22.759	0.001
N0	74	40(54.1)	34(45.9)		
N1~N3	65	59(90.8)	6(9.2)		
TNM 分期				74.339	0.001
I期	33	4(12.1)	29(87.9)		
II期	60	52(86.7)	8(13.3)		
III期	46	43(93.5)	3(6.5)		
ER				3.330	0.068
阳性	77	50(64.9)	27(35.1)		

续表 2 乳腺癌组织中 FOXF1 的表达与乳腺癌临床生物参数的关系[n(%)]

参数	n	FOXF1		χ^2	P
		阴性	阳性		
PR				3. 802	0. 051
阴性	62	49(79. 0)	13(21. 0)		
阳性	52	32(61. 5)	20(38. 5)		
HER-2				0. 893	0. 345
阴性	87	67(77. 0)	20(23. 0)		
阳性	24	19(79. 2)	5(20. 8)		
组织学类型				0. 749	
阴性	115	80(69. 6)	35(30. 4)		
浸润性导管癌	129	91(70. 5)	38(29. 5)		
浸润性小叶癌	3	2(66. 7)	1(33. 3)		
黏液腺癌	6	5(83. 3)	1(16. 7)		
高度上皮内瘤变	1	1(100. 0)	0(0. 0)		

2. 3 乳腺癌组织中 FOXF1 的表达与患者预后的关系 FOXF1 阳性及阴性表达患者总体生存率分别为 95. 00%、72. 73%，FOXF1 阴性乳腺癌患者的总体生存率低于 FOXF1 阳性乳腺癌患者的总体生存率，差异有统计学意义(Log-Rank 检验， $\chi^2 = 8. 113$ ， $P = 0. 004$)，见图 2。同样，FOXF1 阳性、阴性表达患者无复发生存率分别为 95. 00%、63. 64%，FOXF1 阴性乳腺癌患者的无复发生存率低于 FOXF1 阳性乳腺癌患者的无复发生存率，差异有统计学意义(Log-Rank 检验， $\chi^2 = 4. 396$ ， $P = 0. 036$)。见图 3。

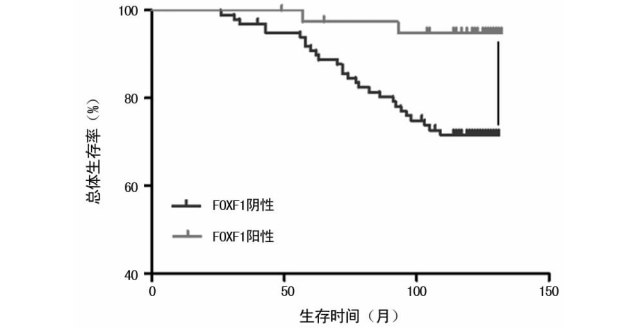


图 2 不同 FOXF1 表达的乳腺癌患者总体生存率生存曲线

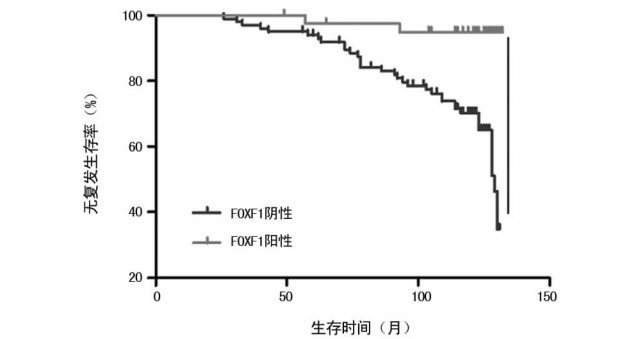


图 3 不同 FOXF1 表达的乳腺癌患者无复发生存率生存曲线

3 讨 论

FOX 基因家族编码一组拥有叉头结构域的转录因子，这类转录因子在胚胎发育过程中有重要作用，同时也调控着细胞周期、细胞生长、细胞代谢和免疫反应等过程^[2]。FOX 家族的调控失调与许多肿瘤的进展密切相关^[6,9-10]。其中 FOXF1 是 FOX 家族重要的成员，FOXF1 阴性表达小鼠可出现肺部、胆囊、食管、气管的间充质发育的异常^[11-13]。

乳腺癌是一种严重威胁女性健康的疾病，随着现代医疗手段的进步，乳腺癌患者总体的预后较以往有很大的改善。但是仍有部分乳腺癌容易转移和复发，且缺乏有效的治疗手段，这类患者的病死率很高，因此，揭示乳腺的发病机制，寻找防治的方法具有重要意义。FOXF1 在乳腺癌中的研究很少，探讨 FOXF1 在乳腺癌中的作用是一项有创新性的工作。

本研究结果显示，乳腺癌组织中 FOXF1 的表达明显低于癌旁组织，这与其他研究者在前列腺癌、肺癌中的研究结果类似^[5,10]。进一步的统计分析结果显示，139 份肿瘤组织中 FOXF1 和 E-cadherin 的阳性率低于癌旁组织，肿瘤组织中 N-cadherin 的阳性率高于癌旁组织，且不同肿瘤大小、淋巴结转移、TNM 分期的肿瘤组织 FOXF1 的阳性率差异有统计学意义($P < 0. 05$)。FOXF1 可能与肿瘤增殖有关，与 PK 等^[7]报道在乳腺癌中 FOXF1 参与调节细胞周期类似；限于患者资料中 TNM 分期只有 I ~ III 期的资料，没有远处转移的资料，FOXF1 表达越低，肿瘤越趋于淋巴结转移，肿瘤组织中 FOXF1 表达越低，E-cadherin 表达越低，N-cadherin 表达越高。最近的研究表明，上皮-间质转化(EMT)在乳腺癌转移过程中发挥了关键作用，EMT 的特征在于上皮标志物如 E-cadherin 的减少和间质标志物如 N-cadherin、波形蛋白和纤连蛋白的诱导增加^[14-15]，提示 FOXF1 可能具有通过 EMT 过程来抑制肿瘤淋巴结转移的作用；TNM 分期越高，肿瘤组织中 FOXF1 的阳性表达率也高。以上结果均提示 FOXF1 参与了乳腺癌的发生、发展。

生存分析结果表明，FOXF1 阴性患者总体生存率和无复发生存率明显低于 FOXF1 阳性患者，提示 FOXF1 表达越低，患者预后越差。这些研究结果表明，FOXF1 可作为判断乳腺癌患者预后的标志物。乳腺癌的评估系统结合 FOXF1 的检测可能会为准确预测患者的预后和个性化治疗方案的制订提供新的途径。

参考文献

[1] LI Y P, HUANG R X, WANG L, et al. microRNA-762 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by targeting IRF7 expression[J]. Cell Prolif, 2015, 48(6): 643-649.

- [2] KALINICHENKO V V, REN X, USTIYAN V, et al. Foxf1 transcription factor is required for formation of embryonic vasculature by regulating VEGF signaling in endothelial cells[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189(8):709-720.
- [3] PRADHAN A, USTIYAN V, ZHANG Y F, et al. Forkhead transcription factor FoxF1 interacts with Fanconi anemia protein complexes to promote DNA damage response[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2):1912-1926.
- [4] PK L K, LEE J S, CHEN H, et al. Cytoplasmic mislocalization of overexpressed FOXF1 is associated with the malignancy and metastasis of colorectal adenocarcinomas [J]. *Exp Mol Pathol*, 2013, 94(1):262-269.
- [5] WEI H J, NICKOLOFF J A, CHEN W H, et al. FOXF1 mediates mesenchymal stem cell fusion-induced reprogramming of lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(19):9514-9529.
- [6] FULFORD L, MILEWSKI D, USTIYAN V A, et al. The transcription factor FOXF1 promotes prostate cancer by stimulating the mitogen-activated protein kinase ERK5 [J]. *Sci Signal*, 2016, 9(427):ra48.
- [7] PK L K, LEE J S, LIANG X, et al. Epigenetic inactivation of the potential tumor suppressor gene FOXF1 in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(14):6047-6058.
- [8] YOO Y G, KONG G, LEE M O. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase 1 [J]. *EMBO J*, 2006, 25(6):1231-1241.
- [9] MATSUSAKA S, WU A H, CAO S, et al. Prognostic impact of FOXF1 polymorphisms in gastric cancer patients [J]. *Pharmacogenomics J*, 2017, 18(2):262-269.
- [10] NILSSON G, KANNIUS-JANSON M. Forkhead box F1 promotes breast cancer cell migration by upregulating lysyl oxidase and suppressing Smad2/3 signaling[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):142.
- [11] MAHLAPUU M, ENERBACK S, CARLSSON P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations[J]. *Development*, 2001, 128(12):2397-2406.
- [12] KALINICHENKO V V, ZHOU Y, BHATTACHARYYA D, et al. Haploinsufficiency of the mouse forkhead box f1 gene causes defects in gall bladder development[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(14):12369-12374.
- [13] KALINICHENKO V V, BHATTACHARYYA D, ZHOU Y, et al. Foxf1 $+/ -$ mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl₄ injury [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1):107-117.
- [14] MA F, LI W J, LIU C X, et al. MiR-23a promotes TGF- β 1-induced EMT and tumor metastasis in breast cancer cells by directly targeting CDH1 and activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41):69538-69550.
- [15] STARK T W, HENSLEY P J, SPEAR A, et al. Predictive value of epithelial-mesenchymal-transition (EMT) signature and PARP-1 in prostate cancer radioresistance[J]. *Prostate*, 2017, 77(16):1583-1591.

(收稿日期:2018-01-28 修回日期:2018-05-20)

(上接第 3174 页)

- et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975—2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels[J]. *J Nat Can Inst*, 2013, 105(3):175-201.
- [2] 张文晶, 刘志强. 宫颈癌筛查方法及其应用现状[J]. *医学综述*, 2017, 23(9):1732-1736.
- [3] VAN DOORSLAER K, TAN Q, XIRASAGAR S, et al. The papillomavirus episteme: a central resource for papillomavirus sequence data and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41:D571-D578.
- [4] SHEN-GUNTHER J, YU X. HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 123(2):263-271.
- [5] PETT M, COLEMAN N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? [J]. *J Pathol*, 2007, 212(4):356-367.
- [6] 田红英, 符兆英. 人乳头瘤病毒的流行特征和致癌机制 [J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(24):4021-4023.
- [7] FEOLI-FONSECA J C, OLIGNY L L, BROCHU P, et al. Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach[J]. *J Med Virol*, 2001, 63(4):284-292.
- [8] VAN DEN BRULE A J, MEIJER C J, BAKELS V, et al. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction[J]. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(12):2739-2743.
- [9] 范飞, 柳欣林, 李智海, 等. 人乳头瘤病毒衣壳蛋白结构生物学研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(5):20-23.
- [10] 黄莎莎, 郝登再, 张岩, 等. 高危型 HPV DNA 整合导致宫颈癌的作用机制和临床检测进展[J]. *遗传*, 2017, 39(9):775-783.
- [11] 刘志敏, 唐双阳, 万艳平. 人乳头瘤病毒感染与肿瘤的相关性研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(2):54-58.

(收稿日期:2018-01-12 修回日期:2018-05-04)