临床研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.026

# FOXC1在复发性乳腺浸润性导管癌中的表达及其意义

贾海全，赵国强

（郑州大学基础医学院病理学与病理生理学教研室，郑州 450000）

【摘 要】目的：探讨 FOXC1 蛋白表达与复发性乳腺浸润性导管癌的临床病理特征间相关性。方法：采用免疫组化 S-P 法检测 42 例复发性乳腺癌石蜡组织中 FOXC1 蛋白的表达。结果：FOXC1 蛋白在 21 例(50%)乳腺浸润性导管癌中表达，定位于胞核。FOXC1 阳性表达与乳腺浸润性导管癌组织学分级相关($P<0.05$)，与复发性乳腺癌患者的耐药情况及患者辅助化疗后的 PFS 相关($P<0.05$)，与乳腺癌患者的年龄，淋巴结转移的数量以及原发肿块的大小无明显的统计学相关性($P>0.05$)。结论：FOXC1 蛋白参与了复发性乳腺癌的耐药机制，但其可能与乳腺癌原发肿瘤的发生发展及淋巴结转移无关。

【关键词】复发性乳腺癌；转录因子 FOXC1；免疫组化

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-07-13

# FOXC1 expression in relapsing invasive ductal carcinoma

*JIA Hai-quan, ZHAO Guo-qiang*

(*Department Pathology and Pathophysiology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate potential correlations between FOXC1 expression and clinicopathologic features of relapsing invasive ductal carcinoma. *Methods*: FOXC1 protein expression in 42 cases of relapsing invasive ductal carcinoma were investigated with immunohistochemistry. *Results*: FOXC1 protein expression was observed in invasive ductal carcinoma tissues. Positive FOXC1 expression was revealed in 21(50.0 %)invasive ductal carcinoma. Significant correlation in retrospective study was observed between FOXC1 protein expression and histological grades($P<0.05$)as well as drug resistance and PFS after adjuvant chemotherapy($P<0.05$). No significant association was shown between FOXC1 protein expression in invasive ductal carcinoma and clinicopathological factors including pathological type, age, primary tumor size, TNBC and non-TNBC, lymph node metastasis, etc($P>0.05$). *Conclusion*: FOXC1 may play a role in malignant degree and drug resistance to relapsing invasive ductal carcinoma.

【Key words】relapsing invasive ductal carcinoma; transcriptional factor FOXC1; immunohistochemistry

目前，国内及国外女性乳腺癌的患病率持续增加，有关乳腺癌的系统治疗虽然在很大程度上提高了乳腺癌患者的生存率，但许多患者最后终因乳腺癌的复发或转移治疗无效而死亡。随着近年来乳腺癌分子分型的确立及研究的深入，利用各种乳腺癌中异常表达的基因分子对其准确的分型显得尤为重要[1-3]。转录因子 FOXC1 属 FOX 家族成员之一(以前称为 FREAC3 或者 FKHL7)，作为叉头框转录因子基因家族(FOX 家族)的一员，与家族其他成员一样，它具有由 100 个氨基酸残基组成的保守 DNA 结合区域，呈螺旋翼状结构。FOXC1 是 1 个长度为 1.6 kb 的外显基因，位于人染色体 6p25 基因编码区，编码的蛋白质共 553 个氨基酸残基[4]。本研究通过免疫组化的方法，研究 FOXC1 在复发性乳腺癌中的表达情况，并分析其与临床病理学特征的联系。

作者介绍：贾海全(1972-)，男，主治医师，研究方向：乳腺癌的外科治疗。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集本院病理科 2004 年 01 月-2010 年 10 月诊断为乳腺浸润性导管癌的存档组织蜡块 42 例，患者术前均未接受任何化疗和放疗，术后均行辅助化疗。每例均有详细临床资料、手术记录及随访结果，随访采取信访结合电话的方式。截止到 2010 年 10 月 30 日，随访时间为 32~75 月，中位时间为 56 月。选取病理均为乳腺浸润性导管癌患者年龄 28~63 岁，平均年龄 43.2 岁，中位年龄 45 岁。标本均经 4%中性甲醛固定，病理类型为浸润性导管癌，Ⅰ级(高分化)11 例，Ⅱ级(中分化)18 例，Ⅲ级(低分化)13 例；按 TNM 分期，Ⅰ期 13 例，Ⅱ期 18 例，Ⅲ期 11 例；有淋巴结转移者 28 例，无淋巴结转移 14 例；在随访期间 42 例均出现骨、内脏器官转移病灶或有胸壁、浅表淋巴结转移灶，经病理细胞学或组织学证实为

乳腺癌转移，或有明确的临床诊断依据证实为发生癌症复发或转移，有 27 例仍生存。

1.2 试剂

试剂：兔抗人 FOXC1 多克隆抗体购自美国 Lifespan Biosciences 公司；DAB 显色剂（北京中杉金桥生物技术公司），S-P 抗山羊超敏试剂盒（KIT-9709）购自福州迈新生物技术开发有限公司；其余免疫组化常用试剂略

1.3 方法

采用免疫组织化学 SP 法进行石蜡肿瘤组织中抗原检测，所有肿瘤组织标本均经 4%甲醛固定，石蜡切片，连续 4 μm 切片。常规脱蜡至水，采用过氧化酶阻断溶液室温孵育 10 min，在高压锅抗原热修复 10 min，滴加多克隆抗体，阴性对照以 PBS 代替一抗，4℃过夜。次晨，37℃复温 45 min，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min，滴加生物素标记二抗室温孵育 10 min；加入链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液，室温作用 10 min；DAB 显色，苏木精复染，梯度酒精脱水，透明，封片，镜检。

1.4 结果判读

蛋白阳性部位主要在细胞浆及细胞核，以出现棕黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色者为阳性细胞；双盲法观察免疫组织化学结果。染色强度记分：无染色或与背景非特异性着色一致为 0 分，淡黄色及棕黄色记 1 分，棕褐色记 2 分；(2)阳性数记分：无阳性细胞记 0 分，阳性细胞数<50%记 1 分，阳性细胞数>50% 记 2 分。根据 2 项分数乘积判断阳性等级：阴性：0 分；阳性：1、2、4 分（1 分：低表达；2 分：中等表达；4 分：高表达）。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件包进行统计学处理，FOXC1 在不同组织中的表达及其与临床病理联系的参数采用 $\chi^2$ 检验或 *Fisher* 精确概率法进行统计学分析。患者 PFS 与 FOXC1 表达的关系则以 *Kaplanmeier* 生存曲线分析，*log-rank* 法计算统计学差异，以 $P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 FOXC1 蛋白在乳腺浸润性导管癌中的表达

FOXC1 蛋白在 21 例（50%）乳腺浸润性导管癌中，表达定位于细胞核，图 2 示 FOXC1 蛋白细胞核的表达。

2.2 FOXC1 蛋白的表达与乳腺浸润性导管癌的临床病例特征关系

对 42 例乳腺浸润性导管癌的临床病案资料的回顾性分析见表 1 及表 2。42 例乳腺浸润性导管癌中，按 50 岁区分的年龄段 FOXC1 蛋白表达阳性率之间的差异无统计学意义（$P>0.05$）。原发肿块体积按照 20 mm 界限值区分，分为 2 组：肿块大小≤20 mm 和 20 mm，此 2 组间 FOXC1 蛋白表达阳性率之间的差异无统计学意义（$P=0.197$）。在按照淋巴结数量 0、1~3、>3 区分的 3 个亚组之间 FOXC1 蛋白表达阳性率之间的差异无统计学意义(0.170)。组织学分级上，浸润性导管癌Ⅰ级乳腺癌 FOXC1 蛋白表达阳性率为 27.3%，组织学Ⅱ级为 72.7%，组织学Ⅲ级为 84.6%，各组间差值具有统计学意义（$P<0.01$）。患者复发后的治疗情况中，按照复发治疗缓解明显和不明显或无效分为 2 组，在 FOXC1 表达阳性的组别，出现耐药的比例高达 47.6%，而在表达阴性组出现耐药的比例仅为 14.3%，2 组间 FOXC1 蛋白表达阳性率之间的差异具有统计学意义（$P=0.012$），见表 2。根据免疫组化结果，乳腺癌各亚型之间 FOXC1 蛋白表达率差异无统计学意义（$P=0.052$）。但在 FOXC1 阳性组，患者的无病生存率明显受到影响，而在 FOXC1 表达阳性的组别，患者复发之后的解救治疗后出现耐药的比例高达 47.6%；PFS 与 FOXC1 表达阳性及阴性以 *Kaplanmeier* 生存曲线分析，*log-rank* 法计算具有统计学差异（$P<0.05$）。

**表 1 FOXC1 的表达和乳腺癌临床属性之间的关系**

| 变量 | FOXC1的表达情况 | | *P*值 |
|---|---|---|---|
| | 阳性（21 例） | 阴性（21 例） | |
| 年龄 | | | |
| ≤50 | 14 | 11 | 0.346 |
| >50 | 7 | 10 | |
| 肿块大小 | | | |
| ≤20 mm | 11 | 16 | 0.197 |
| >20 mm | 10 | 5 | |
| 淋巴结转移数量 | | | |
| 0 | 10 | 4 | 0.170 |
| 1~3 | 8 | 11 | |
| 3< | 3 | 6 | |

**表 2 FOXC1 表达情况与复发性乳腺癌发生耐药的比例**

| FOXC1表达情况 | 有效 | 耐药 | 合计 |
|---|---|---|---|
| FOXC1阴性表达 | 18（85.7%）[a] | 3（14.3%）[b] | 21（100%） |
| FOXC1阳性表达 | 11（52.4%）[a] | 10（47.6%）[b] | 21（100%） |
| 总表达情况 | 69.0% | 31.0% | 100% |

*Pearson Chi-Square test*，$P<0.05$

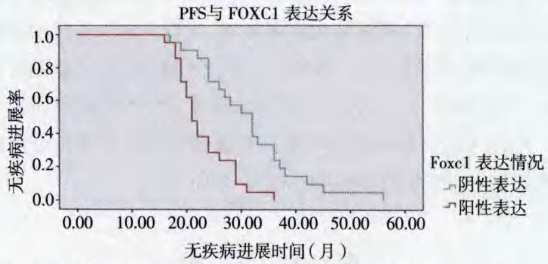



**图 1 患者辅助化疗后的无病生存率与 FOXC1 表达的关系**

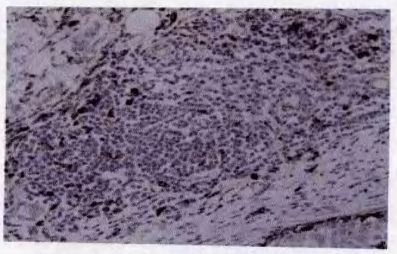


**图 2 FOCX1 在乳腺癌中的阳性表达**

## 3 讨 论

有研究证实 FOXC1 蛋白是一种核定位的磷蛋白，其定位是由位于叉头框翼状螺旋域 C 端的核定位信号所决定的[12]。然而与 FOXC1 同家族的另一成员 FOXO1，未磷酸化时定位在细胞核内，而磷酸化后则定位在细胞浆内。当 FOXO1 受到上游因子 AKt 作用后，发生磷酸化失活，从而从细胞核向细胞浆转位，并作为包括 FAS 配体(TNF 家族亚成员 6)在内的多种基因的转录因子在信号通路中发挥作用[5]。在 ER 阴性的乳腺癌肿瘤中，包含有 FOXC1 基因染色体 6p25 区域，常常呈现出扩增的表现[6]，这提示 FOXC1 可能参与到激素受体的表达调节过程中，本例研究中，虽然在三阴性乳腺癌与非 TN 组别中，FOXC1 的表达与否未呈现统计学意义，但是也可以看到其表达与 TN 存在关联，本实验研究报道运用免疫组化的方法检测了乳腺癌浸润性导管癌复发病例中 FOXC1 蛋白的表达，并回顾性分析了 FOXC1 蛋白表达其各项临床病理特征之间的相关性。结果证实 FOXC1 蛋白在复发性乳腺癌中的表达与癌组织的分级高度相关，而 TN 乳腺癌往往与组织的分级高度相关联，本实验中 FOXC1 与 TN 的关系有待进一步的扩大样本的研究。在最近的一份多中心合作有关乳腺癌分子亚型中的 basal-like 乳腺癌的研究中则指出，FOXC1的表达作为基底样乳腺癌区分的一个标志[7]。研究者利用 CK5/6、CK14、EGFR 等标记基底样乳腺癌[8,9]，发现 FOXC1 的表达与他们呈现出高度的相关性。一般来说，基底样乳腺癌往往预后比较差，短期会出现复发和转移，且与三阴性乳腺癌有交叉覆盖[10-12]。本次研究中，FOXC1 的表达与患者辅助化疗后的复发时间有明显的统计学意义，其可能在一定程度上，反应了基底样乳腺癌的临床病理学特征。

一些体外实验研究认为，FOXC1 是一种抑制乳腺癌细胞转移的因素[13]，这与本实验的研究结果不同，可能是由于细胞试验无法完全模拟体内疾病环境，或者有更深层次的细胞生物学作用尚需要进一步探索。综上所述，FOXC1 基因可能在人乳腺癌的发生、发展过程中发挥着重要作用并可能作为一个临床肿瘤指标来指导临床判断预后及可能成为今后的治疗靶点，但其作用机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] Bergamaschi A, Hjortland G O, Triulzi T, et al. Molecular profiling and characterization of luminal-like and basal-like in vivo breast cancer xenograft models[J]. Mol Oncol, 2009, 3(5-6): 469-482.

[2] Perou C M, Sφrlie T, Eisen M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797): 747-752.

[3] Mears A J, Jordan T, Mirzayans F, et al. Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger anomaly [J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(5): 1316-1328.

[4] Gould D B, Mears A J, Pearce W G, et al. Autosomal dominant Axenfeld-Rieger anomaly maps to 6p25[J]. Am J Hum Genet, 1997, 61(3): 765-768.

[5] Kops G J, de Ruiter N D, De Vries-Smits A M, et al. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B[J]. Nature, 1999, 398(6728): 630-634.

[6] Bergamaschi A, Kim Y H, Wang P, et al. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2006, 45(11): 1033-1040.

[7] Ra P S, Wang J, Qu Y, et al. FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer[J]. Cancer Res, 2010, 70(10): 3870-3876.

[8] Chean M C, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5): 1368-1376.

[9] Arne J B, Bégin L R, Stefansson I, et al, Expression of epidermal growth factor receptor in relation to BRCA1 status, basal-like markers and prognosis in breast cancer[J]. Journal of Clinical Pathology, 2009, 62(2): 139-146.

[10] Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy[J]. Breast Cancer, 2011, 18(3): 165-173.

[11] Ba S Y, Lee S K, Koo M Y, et al. The prognoses of metaplastic breast cancer patients compared to those of triple-negative breast cancer patients[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(2): 471-478.

[12] Sabatie R, Finetti P, Cervera N, et al. A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 126(2): 407-420.

[13] Du J, Li L, Ou Z, et al. FOXC1, a target of polycomb, inhibits metastasis of breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, Apr 5 http://www.springer.com/medicine/oncology/journal/10549.

（责任编辑：冉明会）