

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.09.009

文章编号: 1005-8982 (2018) 09-0050-05

E-Cad、EGFR 和 FOXA1 在三阴性乳腺癌中表达的临床意义

张言敏¹, 孙辉², 李玉军³

(1. 青岛大学医学部 病理系, 山东 青岛 266071; 2. 山东省潍坊市人民医院肿瘤外科, 山东 潍坊 261000; 3. 青岛大学附属医院 病理科, 山东 青岛 266000)

摘要: 目的 研究健康人群、三阴性乳腺癌 (TNBC) 与非三阴性乳腺癌 (NTNBC) 患者血清中可溶性 E-钙黏蛋白 (E-Cad)、表皮生长因子受体 (EGFR) 的表达和意义。**方法** 选取 49 例三阴性乳腺癌患者 (TNBC 组), 198 例非三阴性乳腺癌患者 (NTNBC 组) 和 50 例健康人群 (非患者组) 作为研究对象。采用酶联免疫吸附试验检测血清中 E-Cad 和 EGFR 表达水平, 免疫组织化学检测 FOXA1 表达。采用 ROC 曲线评价血清 E-Cad 和 EGFR 对乳腺癌或 TNBC 的临床诊断价值, 并以 Youden 指数作为诊断试验的准确度评价指标, 分别预测血清中 E-Cad 和 EGFR 的诊断阈值。**结果** 与非患者组比较, 乳腺癌患者 E-Cad、EGFR 和 FOXA1 表达升高 ($P < 0.01$)。与 NTNBC 组比较, TNBC 组 E-Cad 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 EGFR 表达升高 ($P < 0.01$), 且 FOXA1 表达降低 ($P < 0.01$)。E-Cad 和 EGFR 诊断乳腺癌的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.965 (95%CI: 0.944, 0.986), 0.758 (95%CI: 0.686, 0.830), 当 E-Cad 和 EGFR 的界值分别为 1 010.7 和 107.9 ng/ml 时, Youden 指数为 0.807 和 0.385, 诊断乳腺癌的敏感性为 92.7% 和 78.5%, 特异性为 88.0% 和 60%。EGFR 诊断 TNBC 的 ROC 曲线下面积为 0.776 (95%CI: 0.703, 0.848), 界值为 139.5ng/ml 时, Youden 指数为 0.473, 诊断 TNBC 的敏感性为 79.6%, 特异性为 67.7%。**结论** FOXA1 可作为乳腺癌或 TNBC 的辅助诊断指标; 血清 E-Cad 和 EGFR 检测可作为诊断乳腺癌的指标, 且 EGFR 可作为 TNBC 的诊断指标。

关键词: 三阴性乳腺癌; E-钙黏蛋白; 表皮生长因子受体; 叉头框蛋白 A1; 受试者工作特征曲线

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Clinical significance of E-Cad, EGFR and FOXA1 in triple-negative breast cancer

Yan-min Zhang¹, Hui Sun², Yu-jun Li³

(1. Department of Pathology, Qingdao University School of Medicine, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Department of Oncology, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261000, China; 3. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong, Qingdao 266000, China)

Abstract: Objectives To investigate the association of circulating E-cadherin (E-cad) and epidermal growth factor receptor (EGFR) with pathological behavior of breast cancer. **Methods** Totally 49 patients diagnosed with triple negative breast cancer (TNBC group), 198 patients diagnosed with non-triple negative breast cancer (NTNBC group) and 50 healthy subjects were involved in this study. Concentration of E-Cad and EGFR were obtained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of FOXA1 was measured by immunohistochemistry. The clinical diagnostic value of serum E-cad and EGFR in breast cancer or TNBC was

收稿日期: 2017-08-02

[通信作者] 李玉军, E-mail: liyujun.66@168.com

evaluated by ROC curve. The Youden index was utilized to evaluate the diagnostic threshold of E-cad and EGFR.

Results Expression levels of E-Cad, EGFR and FOXA1 in breast cancer patients were significantly increased ($P < 0.01$) compared with healthy volunteers. No statistically significant difference in E-Cad was observed between TNBC group and NTNBC group ($P > 0.05$). Concentration of EGFR increased ($P < 0.01$) while FOXA1 decreased ($P < 0.01$) significantly in TNBC group when compared with NTNBC group. ROC curve showed that AUC of E-Cad and EGFR for breast cancer was 0.965 (95% CI: 0.944, 0.986) and 0.758 (95% CI: 0.686, 0.830), respectively. At the threshold of 1 010.7 ng/ml for E-Cad and 107.9 ng/ml EGFR, the Youden index was 0.807 and 0.385, sensitivity for diagnosis of breast cancer was 92.7% and 78.5%, and the specificity was 88.0% and 60%, respectively. AUC of EGFR for diagnosis of TNBC was 0.776 (95% CI: 0.703, 0.848). At the threshold of 139.5 ng/ml, the largest Youden index was 0.473, the sensitivity was 79.6%, and the specificity was 67.7%. **Conclusion** E-cad and EGFR can be used as indicators of diagnosis for breast cancer while FOXA1 and EGFR can be a diagnostic candidate for diagnosis of TNBC.

Keywords: triple-negative breast cancer; e-cadherin; epidermal growth factor receptor; fork head box protein a1; receiver operating characteristic curve

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)特指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)表达均为阴性的乳腺癌,其发病率占所有乳腺癌的10%~20%^[1]。与非三阴性乳腺癌(non-tri-negative breast cancer, NTNBC)比较, TNBC具有侵袭性强、预后差、易复发及内分泌治疗不敏感等特点,已成为医疗领域广泛研究的对象^[2]。临床研究发现,乳腺癌的10年存活率平均为60%,一期乳腺癌治疗后的存活率达80%,零期乳腺癌治疗后的存活率更接近100%,因此乳腺癌的早期诊断并及时治疗非常重要^[3]。由于TNBC的治疗相比于NTNBC更为棘手,所以早期诊断出乳腺癌的同时并发现TNBC的意义更为重要。

研究发现, E-钙黏蛋白(E-cadherin, E-Cad)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在健康人群和乳腺癌患者中表达有差异,且在TNBC和NTNBC中, E-Cad、EGFR以及组织中叉头框蛋白A1(fork head box protein A1, FOXA1)的表达也有不同^[4-5],但关于血清中E-Cad和EGFR的研究较少,国内外鲜有报道。因此,本研究通过收集乳腺癌患者和健康人群血液样本,比较血清中E-Cad和EGFR的差异,并通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线评价血清E-Cad和EGFR对乳腺癌及TNBC的临床诊断价值,同时预测血清中E-Cad和EGFR的诊断界值。FOXA1在TNBC的发病、治疗和预后等方面起到重要作用,故通过检测乳腺癌患者组织中FOXA1的表达,进一步研究TNBC和

NTNBC中FOXA1的表达差异,为TNBC的早期诊断、治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 患者组 选取2015年7月-2016年8月我院经病理检测确诊为浸润性乳腺癌的247例女性患者。其中,三阴性乳腺癌患者(TNBC组)49例(19.80%),中位年龄47岁(23~71岁)。非三阴性乳腺癌患者(NTNBC组)198例(80.20%),中位年龄51岁(26~75岁)。研究符合伦理委员会相关规定,经本院医学伦理委员会批准。

1.1.2 非患者组 随机选取来我院体检的健康人群50例,将血清保存备用。

1.2 方法

1.2.1 E-Cad和EGFR的检测 取患者清晨空腹静脉血3 ml, 4 000 r/min、4℃离心15 min,常规分离血清,备用进行细胞因子的检测。血清可溶性E-Cad和EGFR的含量测定采用酶联免疫吸附试验,试剂盒由上海钰博生物科技有限公司提供。E-Cad和EGFR检测均采用双抗体夹心ELISA法,各孔加入标准品或样品100 μl, 37℃避光孵育90 min,然后弃去孔内液体,甩干后直接加入生物素化抗体工作液,继续孵育1 h,然后洗板3次,最后1次洗板甩干后加入酶结合物工作液,孵育30 min后洗板5次,甩干后加入底物溶液,标准孔出现梯度时,加入终止液,使用酶标仪于450 nm处测定光密度值,绘制标准曲线并计算样本中E-Cad和EGFR的含量。

1.2.2 ROC曲线的建立及界值预测 采用SPSS 19.0

软件进行非参数法建立 E-Cad 和 EGFR 的 ROC 曲线, 计算 ROC 曲线下面积; 并以 Youden 指数最大值作为临界点, 计算血清中 E-Cad 和 EGFR 的界值, 以及灵敏度和特异性。

1.2.3 FOXA1 的检测 取 TNBC 组和 NTNBC 组乳腺癌患者病理石蜡标本及正常乳腺组织标本, 分别进行连续切片 6 张 (8 μm /张)。具体操作步骤按照试剂盒说明书进行操作, 用 5% 血清进行室温封闭 40 min 后, 分别加入 1 : 1 000 的 FOXA1 单克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。隔天加入 1 : 1 000 的二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 清洗后加入 SP 后进行恒温反应 30 min, 加入 DAB 显色液进行显色, 中性树脂封片后用 $\times 10$ 、 $\times 40$ 物镜显微镜进行观察。阳性染色: FOXA1 的阳性表达主要表现为细胞内出现棕黄色颗粒。 $\times 40$ 显微镜下观察, 随机选择 5 个高倍视野, 采用 IPP 软件进行图像扫描分析, 收集数据并计算图片中 FOXA1 蛋白表达的平均光密度。用于反应组织中 FOXA1 蛋白的表达含量。平均光密度 = 累积光密度与面积的比值。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或中位数及四分位数 [M (P25,

P75)] 表示, 组间比较采用方差分析或 Kruskal-Wallis H 检验, 方差分析采用 LSD- t 检验, 秩和检验两两比较采用 Mann-Whiney U 检验, 采用 ROC 曲线评价血清 E-Cad 和 EGFR 对乳腺癌或 TNBC 的临床诊断价值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同人群中 E-Cad 和 EGFR 表达情况

3 组人群 E-Cad、EGFR 秩和检验分析结果显示, 3 组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与非患者组比较, NTNBC 组和 TNBC 组血清中 E-Cad、EGFR 表达升高 ($P < 0.01$); 与 NTNBC 组比较, TNBC 组血清中 E-Cad 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), EGFR 表达升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。见附表。

2.2 血清 E-Cad、EGFR 对乳腺癌和 TNBC 诊断的 ROC 曲线

结果可见, E-Cad 和 EGFR 对于诊断乳腺癌的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.965 (95%CI: 0.944, 0.986), 0.758 (95%CI: 0.686, 0.830)。当 E-Cad 和 EGFR 的界值分别为 1010.7 和 107.9 ng/ml 时, Youden 指数最大为 0.807 和 0.385, 此时, 诊断乳腺癌的敏感

附表 不同人群中 E-Cad 和 EGFR 表达比较 [M (P25, P75), ng/ml]

组别	例数	E-Cad	EGFR
非患者组	50	779.5 (707.5, 891.8)	97.9 (78.7, 128.9)
NTNBC 组	198	1 938.1 (1 689.4, 2 269.3) ¹⁾	125.8 (106.1, 148.4) ¹⁾
TNBC 组	49	1 932.5 (1 506.9, 2 278.0) ¹⁾	158.5 (139.7, 171.8) ¹⁾²⁾
Z 值		7.432	6.521
P 值		0.000	0.000

注: 1) 与非患者组比较, $P < 0.01$; 2) 与 NTNBC 组比较, $P < 0.01$

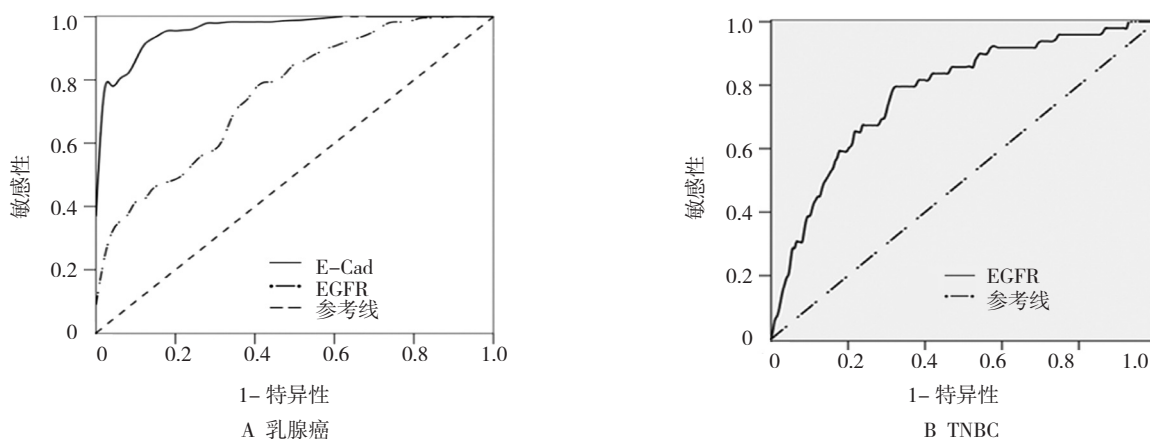


图 1 血清 E-Cad、EGFR 对乳腺癌和 TNBC 诊断的 ROC 曲线

性为 92.7% 和 78.5%, 特异性为 88.0% 和 60%。由于 NTNBC 组和 TNBC 组血清中 E-Cad 表达差异无统计学意义, 所以只对 EGFR 诊断 TNBC 进行研究 (见图 1B), ROC 曲线下面积为 0.776 (95%CI: 0.703, 0.848)。当 EGFR 界值为 139.5 ng/ml 时, Youden 指数最大为 0.473, 此时, 诊断 TNBC 的敏感性为 79.6%, 特异性为 67.7%。见图 1。

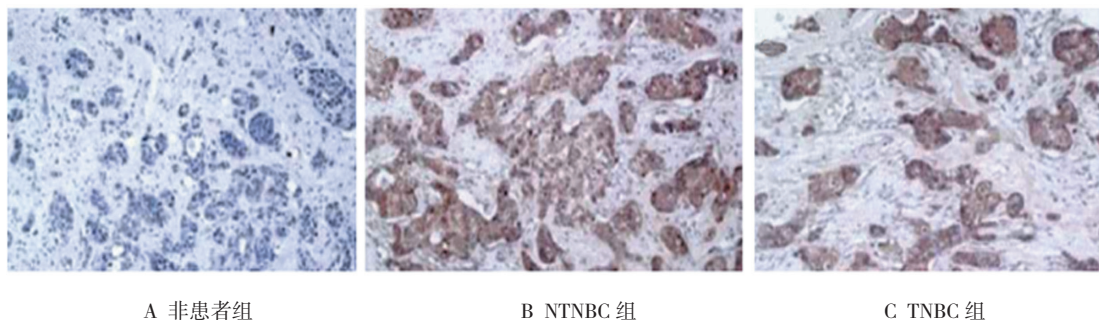


图 2 各组 FOXA1 蛋白表达情况 (×400)

达降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义, 见图 2。

3 讨论

乳腺癌作为一种恶性肿瘤, 严重危害女性身体健康, 未及时诊断乳腺癌会拖延治疗的最佳时间和治疗效果, 因此在乳腺癌研究中, 除化疗或手术外, 尽早发现及确诊肿瘤已成为其治疗的关键^[6]。血清指标检查是早期无创性诊断肿瘤的常用手段, 能够极大提高诊断方法的顺应性, 为尽早发现肿瘤提供重要参考^[7]。E-Cad 是一种细胞黏附分子, 具有维持组织结构完整等功能, 在肿瘤侵袭转移中起到重要作用^[8]。LIANG 等的研究结果表明^[9], 相对于健康人群, 乳腺癌患者血清中可溶性 E-Cad 表达升高; LI 等的研究表明^[10], 与 NTNBC 患者比较, TNBC 组织中 E-Cad 表达降低, 但未见 NTNBC 患者与 TNBC 患者血清中 E-Cad 含量比较的研究。EGFR 是一类跨膜糖蛋白, 具有酪氨酸激酶活性, 并调控细胞增殖作用, 高表达的 EGFR 可促进乳腺癌细胞增殖、转移, 并促进肿瘤血管生成^[11]。TAS 等的研究表明^[12], 乳腺癌患者血清中 EGFR 表达升高, 且与 NTNBC 患者比较, TNBC 中 EGFR 表达较高。本研究结果表明, 乳腺癌患者血清中 E-Cad 和 EGFR 表达相对健康人群升高, 且在 TNBC 患者中 EGFR 表达高于 NTNBC 患者, 而 E-Cad 表达无差异。ROC 曲线结果表明, 血清 E-Cad 和 EGFR 均具有一定的乳腺癌诊断价值, E-Cad (曲线下面积为 0.965) 诊断价值高于

2.3 FOXA1 的检测结果

3 组人群 FOXA1 平均光密度表达分析结果显示, 3 组比较差异有统计学意义 ($F = 6.432, P = 0.000$)。与非患者组 FOXA1 蛋白含量 (0.31 ± 0.04) 比较, NTNBC 组 FOXA1 蛋白含量 (1.67 ± 0.11) 和 TNBC 组组织中 FOXA1 蛋白含量 (0.87 ± 0.12) 表达均上升 ($P < 0.01$); 与 NTNBC 组比较, TNBC 组组织中 FOXA1 表

达降低 (曲线下面积为 0.758), 但在乳腺癌患者中, 由于 TNBC 和 NTNBC 患者血清中 E-Cad 表达无差异, 不具备 TNBC 诊断价值, 而 EGFR 具有中等的 TNBC 诊断价值。本研究以 Youden 指数作为评价准确度的指标, 当 E-Cad 和 EGFR 的界值分别为 1010.7 和 107.9 ng/ml 时, 对于乳腺癌具有较高的诊断价值。当 EGFR 的界值为 139.5 ng/ml 时, 适用于三阴性乳腺癌的诊断。

ER 在乳腺癌的临床进展、诊断及治疗中均有着极其重要的作用, 研究表明 ER 已成为评价患者是否需要内分泌治疗的重要指标。但由于 ER 在三阴性乳腺癌中呈现阴性表达, TNBC 患者对内分泌治疗敏感性较低, 因此 TNBC 临床治疗效果常常不佳^[13-14]。FOXA1 是一类由 472 个氨基酸残基组成的转录辅助因子, 主要受体内激素调控。ER 可诱导乳腺癌细胞表达 FOXA1, 同时 FOXA1 又可促进 ER 转录复合物与染色质的结合上调 ER 表达, 从而提高内分泌治疗的效果^[15]。研究表明, FOXA1 与乳腺癌患者的预后存在相关性, 可作为评价治疗效果良好的标志物^[16]。DREW 等的研究表明, 与 NTNBC 患者比较, TNBC 中 FOXA1 表达阳性率降低^[17], 但相关研究文献较少, 缺乏文献支持。本研究结果表明, TNBC 患者 FOXA1 表达降低, 表明 FOXA1 可作为 TNBC 的诊断指标, 更为重要的是, FOXA1 有可能成为治疗 TNBC 的关键靶点。但本研究还未对 FOXA1 与患者化疗效果及预后的相关性

展开研究,这可作为下一步的研究方向。

研究健康人群、TNBC 与 NTNBC 患者血清中 E-Cad、EGFR,并结合 ROC 曲线探讨血清 E-Cad 和 EGFR 的临床诊断意义,并预测诊断界值,为临床 TNBC 的诊断提供无创、便捷的血清检测手段;并通过检测 FOXA1 的表达,为 NTNBC 的诊断和靶点治疗提供参考。

参 考 文 献:

- [1] ANDREOPOULOU E, KELLY C M, MCDAID H M. Therapeutic advances and new directions for triple-negative breast cancer[J]. *Breast Care(Basel)*, 2017, 12(1): 21-28.
- [2] SATO N, WAKABAYASHI M, NAKATSUJI M, et al. MEK and PI3K catalytic activity as predictor of the response to molecularly targeted agents in triple-negative breast cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 489(4): 484-489.
- [3] TEZUKA K, TAKASHIMA T, KASHIWAGI S, et al. Phase I study of nanoparticle albumin- bound paclitaxel, carboplatin and trastuzumab in women with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer[J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, 6(4): 534-538.
- [4] XU H, TIAN Y, LIU Q, et al. CD44 correlates with clinicopathological characteristics and is upregulated by EGFR in breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(4): 1343-1350.
- [5] SHEN T, ZHANG K, SIEGAL, et al. Prognostic value of E-cadherin and β -catenin in triple-negative breast cancer[J]. *Am J Clin Pathol*, 2016, 146(5): 603-610.
- [6] ORUCEVIC A, CURZON M, CURZON C, et al. Breast cancer in elderly caucasian women-an institution-based study of correlation between breast cancer prognostic markers, TNM stage, and overall survival[J]. *Cancers(Basel)*, 2015, 7(3): 1472-1483.
- [7] 龙璐,陈贞,王堃,等.血清 GPC3、GP73、AFP-L3 和 AFP 检测对原发性肝癌诊断的价值 [J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(28): 46-50.
- [8] CHRISTOU N, PERRAUD A, BIONDY S, et al. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4571-4576.
- [9] LIANG Z, SUN X Y, XU L C, et al. Abnormal expression of serum soluble E-Cadherin is correlated with clinicopathological features and prognosis of breast cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2014, 20: 2776-2782.
- [10] LI P, SUN T, YUAN Q, et al. The expressions of NEDD9 and E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis in triple-negative breast cancer patients[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 5751-5759.
- [11] COSTA R, SHAH A N, SANTA-MARIA C A, et al. Targeting epidermal growth factor receptor in triple negative breast cancer: New discoveries and practical insights for drug development[J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 53: 111-119.
- [12] TAS F, BILGIN E, KARABULUT S, et al. Clinical significance of serum epidermal growth factor receptor (EGFR) levels in patients with breast cancer[J]. *Cytokine*, 2015, 71(1): 66-70.
- [13] NAGINI S. Breast cancer: current molecular therapeutic targets and new players[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(2): 152-163.
- [14] 杨虹,曾福仁,刘剑仑,等. ER、PR、HER-2、Ki-67 与乳腺癌新辅助化疗疗效相关性分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(24): 54-57.
- [15] ZHANG X L, WANG H S, LIU N, et al. Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 585: 10-16.
- [16] HU Q, LUO Z, XU T, et al. FOXA1: a promising prognostic marker in breast cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(1): 11-16.
- [17] DAVIS D G, SIDDUQUI M T, OPREA-ILIES G, et al. GATA-3 and FOXA1 expression is useful to differentiate breast carcinoma from other carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2016, 47(1): 26-31.

(王荣兵 编辑)