

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.15.008
文章编号: 1005-8982 (2018) 15-0037-04

FOXO3a 与乳腺浸润性导管癌血管生成的相关性

常艳华, 梁加贝, 周志毅, 蔡颖

(南京医科大学附属无锡市人民医院 病理科, 江苏 无锡 214023)

摘要: 目的 探讨转录因子 FOXO3a 的表达与乳腺浸润性导管癌血管生成的相关性。**方法** 选择该院行手术切除的乳腺浸润性导管癌组织(乳腺癌组)及相应的癌旁正常组织(癌旁组)各 102 例,用免疫组织化学法(免疫组化)检测 FOXO3a 在两组中的表达情况,用 CD34 标记微血管的内皮细胞,测定微血管密度(MVD),并分析 FOXO3a 在乳腺癌组织细胞质、细胞核的不同定位与 MVD 的关系。**结果** ① FOXO3a 在乳腺癌中的表达(70.59%, 72/102) 低于癌旁组织(84.31%, 86/102) ($P < 0.05$)。FOXO3a 在乳腺癌组织细胞核表达的阳性率为(15.69%, 16/102), 低于癌旁组织(81.37%, 83/103) ($P < 0.05$); 而在细胞质表达的阳性率(63.73%, 65/102) 高于癌旁组(14.71%, 15/102) ($P < 0.05$); ② 乳腺癌组织中 MVD 的水平(27.46 ± 5.87) 高于癌旁组(17.25 ± 3.61) ($P < 0.05$)。乳腺癌组织细胞核 FOXO3a 阳性者 MVD 的水平(23.19 ± 4.00) 低于 FOXO3a 阴性者(28.24 ± 5.84) ($P < 0.05$); 细胞质 FOXO3a 阳性者 MVD 的水平(26.39 ± 3.12) 与 FOXO3a 阴性者(27.90 ± 4.37) 比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** FOXO3a 在细胞核的表达增加可能对乳腺癌组织中微血管的生成起抑制作用。

关键词: 乳腺; 浸润性导管癌; 转录因子 FOXO3a; 微血管密度

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Effect of FOXO3a on angiogenesis in breast invasive ductal carcinoma

Yan-hua Chang, Jia-bei Liang, Zhi-yi Zhou, Ying Cai

(Department of Pathology, Wuxi People's Hospital affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

Abstract: Objectives To investigate the correlation between expression of FOXO3a and angiogenesis in breast invasive ductal carcinoma. **Methods** A total of 102 cases of breast invasive ductal carcinoma tissue (cancer group) and nearby normal tissue group (peri-carcinoma group) were involved in this study. Expression of FOXO3a was detected by immunohistochemistry. CD34 was stained as a marker of microvascular endothelial cells. Microvessel density (MVD) was evaluated and correlation between MVD and FOXO3a was analyzed. **Results** Expression of FOXO3a in breast cancer cells was significantly lower than that of peri-carcinoma group (70.59% vs 84.31%, $P < 0.05$). The positive rate of FOXO3a in nucleus of breast cancer cells was decreased (15.69% vs 81.37%, $P < 0.05$) while that in cytoplasm increased dramatically (63.73% vs 14.71%, $P < 0.05$) compared with peri-carcinoma group. MVD in breast cancer tissues and cancer tissues with expression of FOXO3a in nucleus was upregulated obviously when compared with peri-carcinoma group and cancer tissues without expression of FOXO3a in nucleus, respectively [(27.46 ± 5.87 vs 17.25 ± 3.61 , $P < 0.05$), (23.19 ± 4.00 vs 28.24 ± 5.84 , $P < 0.05$), respectively]. MVD in cancer tissues with expression of FOXO3a in cytoplasm was not significantly different compared with that in cancer tissue cells without expression of FOXO3a in cytoplasm (26.39 ± 3.12 vs 27.90 ± 4.37 , $P > 0.05$). **Conclusion** Expression of FOXO3a in nucleus of cancer tissue cells plays an important role in angiogenesis inhibition in breast invasive

收稿日期: 2017-07-13

[通信作者] 蔡颖, E-mail: cy3163@163.com; Tel: 13861746727

ductal carcinoma.

Keyword: breast; invasive ductal carcinoma; FOXO3a; MVD

乳腺癌是威胁女性健康的常见恶性肿瘤,其发病率在全世界呈上升趋势。临床上治疗乳腺癌的常见方法是手术切除和辅助化疗,由于乳腺癌容易转移和复发,给治疗带来了巨大挑战。肿瘤的复发和转移是由多种复杂因素造成的,其中,肿瘤组织中新生血管数量的增加,为肿瘤组织的生长提供了必需的营养物质,使肿瘤得以快速生长,导致肿瘤易复发、易转移的重要因素之一。

FOXO3a 是 FOX 蛋白家族的重要成员,在哺乳动物的多种器官的细胞中均有表达。有研究表明^[1],FOXO3a 转录因子可抑制血管内皮细胞的迁移及新生血管的形成。由此提出假设,FOXO3a 可能抑制乳腺癌组织中新生血管形成,进而抑制肿瘤的生长。本研究通过检测乳腺癌组织中 FOXO3a 的表达,分析其亚细胞定位与肿瘤内微血管密度的关系,探讨其在乳腺癌新生血管形成中可能存在的作用和意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2014 年 1 月-2014 年 12 月南京医科大学附属无锡市人民医院乳腺浸润性导管癌患者的癌组织(乳腺癌组)及相应癌旁 >2 cm 的组织(癌旁组)各 102 例。所有病例经病理证实,且术前均未接受过放疗、化疗及生物学治疗。

1.2 试剂

FOXO3a 兔抗人单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology (CST, #12829, 稀释度 1:100), CD34 鼠抗人单克隆抗体购自福州迈新公司(MAB-0034), EnVision 试剂盒和 DAB 显色剂购自福州迈新公司。

1.3 方法

石蜡包埋组织,4 μm 厚切片,分别行 HE 染色和免疫组织化学(简称免疫组化)染色(采用 EnVision 两步法)。实验均设阳性对照和阴性对照。FOXO3a 阳性定位于细胞核/质;CD34 定位于血管内皮细胞的细胞膜/质,将 CD34 阳性的内皮细胞形成的管状、窄裂隙状、囊状和空泡状的结构,判定为可计数的微血管。微血管密度(microvessel density, MVD)计数采 WEIDNER^[2]的方法,先于低倍(100 倍)光镜下确定至少 5 个脉管着色最密集的区域,然后在高倍(400

倍)光镜下计数目标区域的微血管数,取计数最高的 3 个视野的均值作为该标本的 MVD。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS18.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;比较用 *t* 检验,计数资料以率(%)表示,比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXO3a 在乳腺癌组及癌旁组的表达

FOXO3a 在乳腺癌组表达的总阳性率为 70.59% (72/102), 72 例阳性病例中有 7 例仅细胞核阳性, 56 例仅细胞质阳性, 9 例细胞核与细胞质均阳性;癌旁组表达的总阳性率为 84.31% (86/102), 86 例阳性病例中有 71 例仅细胞核阳性, 3 例仅细胞质阳性, 12 例细胞核与细胞质均阳性;乳腺癌组 FOXO3a 总阳性率低于癌旁组 ($\chi^2=5.501, P=0.019$);乳腺癌组及癌旁组 FOXO3a 在细胞核表达的阳性率分别为 15.69% (16/102) 和 81.37% (83/102), 在细胞质表达的阳性率分别为 63.73% (65/102) 和 14.71% (15/102);两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2_{\text{核}}=88.096, P=0.000$; $\chi^2_{\text{胞质}}=51.411, P=0.000$)。见图 1 和附表。

2.2 两组 MVD 值及其与 FOXO3a 在乳腺癌组织中亚细胞定位的关系

两组 MVD 的水平分别为 (27.46 ± 5.87) 和 (17.25 ± 3.61), 差异有统计学意义 ($t=22.224, P=0.000$)。见图 2。乳腺癌组织中胞核 FOXO3a 阳性者 MVD 的水平 (23.19 ± 4.00) 低于胞核 FOXO3a 阴性者 (28.24 ± 5.84) ($t=3.314, P=0.001$);而胞质 FOXO3a 阳性者 MVD 的水平 (26.39 ± 3.12) 与 FOXO3a 阴性

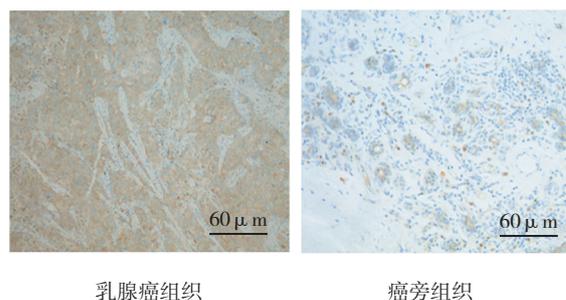
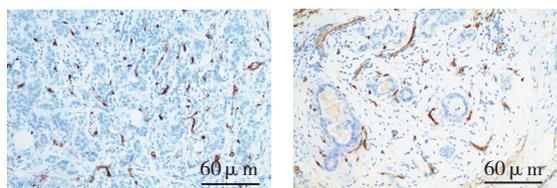


图 1 两组 FOXO3a 的表达 (免疫组化)

附表 两组 FOXO3a 的表达比较 [n=102, 例 (%)]

组别	FOXO3a		
	总阳性	胞核阳性	胞质阳性
乳腺癌组	72 (70.59)	16 (15.69)	65 (63.73)
癌旁组	86 (84.31)	83 (81.37)	15 (14.71)



乳腺癌组织

癌旁组织

图 2 两组 CD34 的表达 (免疫组化)

者 (27.90 ± 4.37) 比较, 差异无统计学意义 ($t=0.827$, $P=0.795$)。

3 讨论

Forkhead 转录因子是 2000 年被正式命名的新转录因子家族, 该家族庞大, 有 17 个亚家族, 其中对 FOXO 亚家族的研究最为深入。目前在哺乳动物中已发现的 FOXO 家族成员有 4 个, 为 FOXO1、FOXO3a、FOXO4 和 FOXO6, 其在细胞增殖、分化及凋亡等方面起重要作用^[3-5]。FOXO3a 广泛表达于人的胃、结肠、直肠、肝、肺、乳腺和前列腺等各种组织器官中, 作为重要的转录因子参与多种生理病理过程, 调控细胞增殖、凋亡、氧化应激及内环境的稳态等过程^[6-8]。

FOXO3a 是胰岛素 PI3K-Akt 信号通路的重要作用底物。胰岛素样生长因子能诱导 PI3K/Akt 级联反应, 蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 可使 FOXO3a 磷酸化, 磷酸化后的 FOXO3a 与核 DNA 亲和力下降, 而与伴侣蛋白 14-3-3 的亲和力增加, FOXO3a/14-3-3 蛋白结合体从细胞核转位至细胞质, 并阻止复合物逆转运至细胞核内, FOXO3a 滞留于细胞质中, 无法激活下游的靶因子, 而失去活性^[9-10]。多个研究表明 PI3K/Akt/FOXO3a 信号通路参与乳腺癌的发生^[11-12], 进一步研究发现, FOXO3a 的活性高低、亚细胞定位以及参与的细胞信号转导通路均与肿瘤的发生发展密切相关。本研究发现, FOXO3a 在乳腺癌组的表达低于癌旁组, 且 FOXO3a 主要表达于乳腺癌细胞的细胞质中, 提示癌细胞中的 FOXO3a 定位出现异常, 癌细胞质中的 FOXO3a 处于去活化状态, 失去对细胞增殖、凋亡相关因子的转录调节作用^[9-10], FOXO3a 的异

常表达与乳腺癌的发生、进展有相关性。

对血管内皮细胞的基因谱分析显示, FOXO3a 是血管内皮细胞中重要的转录因子, FOXO3a 的活性下降可促进血管过度生成^[13]。有研究表明, FOXO3a 过表达与非小细胞肺癌组织中的微血管密度呈负相关^[14]; FOXO3a 与乳腺癌组织中血管生成的关系在国内外文献中尚未见报道。本研究中, 癌旁组织的 FOXO3a 主要表达细胞核中, 可以发挥其抑制血管内皮细胞增殖的正常功能, 从而抑制新生血管的形成; 而在乳腺癌组织, FOXO3a 在细胞核表达阳性者的微血管密度值低于胞核阴性者, 胞质阳性者癌组织微血管密度值与胞质阴性者比较无差异。提示癌细胞中 FOXO3a 定位异常 (从胞核转位于胞质), 其正常活性受抑制, 不能发挥其限制内皮细胞增殖和迁移的能力^[15], 间接促进新生血管的过度生成。

肿瘤的生长依赖新生血管的形成, 而血管的形成与血管内皮的增殖密切相关。本研究表明, 处于活性状态的 FOXO3a 可负性调节血管内皮细胞因子的增殖。因此, 通过调控 FOXO3a 的活性, 促进 FOXO3a 活化而发挥其抑制血管形成的作用, 有望为肿瘤治疗提供新的思路。

参 考 文 献:

- [1] PENG C M, MA J L, GAO X, et al. High glucose induced oxidative stress and apoptosis in cardiac microvascular endothelial cells are regulated by FoxO3a[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79739.
- [2] WEIDNER N, FOLKMN J, POZZA F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 1992, 84(24): 1875-1877.
- [3] MARTINS R, LITHGOW G J, LINK W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity[J]. Aging Cell, 2016, 15(2): 196-207.
- [4] WANG F, MARSHALL C B, IKURA M. Forkhead followed by disordered tail: The intrinsically disordered regions of FOXO3a[J]. Intrinsically Disordered Proteins, 2015, 3(1): e1056906.
- [5] LEE S, DONG H H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism[J]. J Endocrinol, 2017, 233(2): R67-R79.
- [6] MYATT S S, LAM E W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(11): 847-859.
- [7] FU Z, TINDALL D J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis[J]. Oncogene, 2008, 27(16): 2312-2319.
- [8] DANSEN T B, BURGEFING B M. Unravelling the tumor-suppressive functions of FOXO proteins[J]. Trends Cell Biol, 2008, 18(9): 421-429.
- [9] KIM H J, LEE S Y, KIM C Y, et al. Subcellular localization of FOXO3a as a potential biomarker of response to combined

- treatment with inhibitors of PI3K and autophagy in PIK3CA-mutant cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6608-6622.
- [10] FANG L, WANG H, ZHOU L, et al. Akt-FOXO3a signaling axis dysregulation in human oral squamous cell carcinoma and potent efficacy of FOXO3a-targeted gene therapy[J]. *Oral Oncol*, 2011, 47(1): 16-21.
- [11] SMIT L, BERNS K, SPENCE K, et al. An integrated genomic approach identifies that the PI3K/AKT/FOXO pathway is involved in breast cancer tumor initiation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2596-2610.
- [12] BULLOCK M. FOXO factors and breast cancer: outfoxing endocrine resistance[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(2): R113-R130.
- [13] POTENTE M, URBICH C, SASAKI K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2382-2392.
- [14] 任昭军, 柳红. 非小细胞肺癌中 FOXO3a 蛋白的表达及意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(12): 1365-1368.

(王荣兵 编辑)