

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.06.013

文章编号: 1005-8982(2016)06-0059-05

临床论著

FRY 蛋白在不同恶性程度乳腺肿瘤中的表达与意义*

费帆¹, 张辰子², 赵进明³, 陈华军⁴, 李海南⁴, 杨林², 任雪峰², 卫秦芝¹, 唐小江²
(1.南方医科大学公共卫生与热带医学学院, 广东 广州 510515; 2.广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248; 3.中山大学附属第六医院, 广东 广州 510655;
4.广东省韶关市第一人民医院, 广东 韶关 512000)

摘要: 目的 研究不同恶性程度的乳腺肿瘤病例中 FRY 蛋白的表达情况及其与临床病理参数之间的关系。**方法** 对收集的 104 例乳腺肿瘤病例(其中纤维囊性乳腺病 11 例, 不同分级的乳腺浸润性导管癌 93 例)中 FRY 蛋白的表达情况进行免疫组织化学检测, 比较 FRY 蛋白表达情况与乳腺肿瘤恶性程度及不同临床病理参数之间的关系。**结果** 11 例纤维囊性乳腺病与 93 例乳腺浸润性导管癌病例中 FRY 蛋白表达阳性率分别为 90.9% 和 54.8%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 93 例乳腺癌病例中, FRY 蛋白在乳腺癌不同组织分级、不同 TNM 分期、肿瘤直径大小、PR 水平间的表达均有显著性差异($P < 0.05$)。**结论** FRY 蛋白的表达与乳腺肿瘤的恶性程度相关, 恶性程度越高, FRY 蛋白表达越少, 同时 FRY 蛋白的表达与体内激素受体水平也存在一定联系。

关键词: FRY; 抑癌蛋白; 乳腺肿瘤; 恶性程度; 免疫组织化学

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Expression of FRY and its significance in breast carcinomas with different degree of malignancy*

Fan Fei¹, Chen-zi Zhang², Jin-ming Zhao³, Hua-jun Chen⁴, Hai-nan Li⁴,
Lin Yang², Xue-feng Ren², Qin-zhi Wei¹, Xiao-jiang Tang²

(1. School of Public Health and Tropical Medicine, South Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan, Guangdong 528248, China; 3. The Sixth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510655, China; 4. The First People's Hospital of Shaoguan, Shaoguan, Guangdong 512000, China)

Abstract: Objective To study the expression level of FRY protein in breast carcinomas of various degree of malignancy and its relationship with clinical pathological parameters. **Methods** One hundred and four cases of breast carcinomas were studied using immunohistochemical method, among which 11 cases had fibrocystic breast disease and 93 cases had invasive ductal carcinomas of breast. The expression level of FRY protein was determined, and the possible relationships between the FRY expression and a number of clinical pathological parameters were investigated. **Results** There was a significant difference in the positive rate of FRY expression between the fibrocystic breast disease cases and the breast invasive ductal carcinoma cases (90.9% vs 54.8%, $P < 0.05$). In the breast invasive ductal carcinomas, FRY expression was positively correlated with histological grades, TNM stages, tumor diameter and PR expression ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of FRY protein is strongly correlated with the malignant degree of breast carcinomas; the higher the malignancy of the carcinomas, the lower the expression level of FRY protein. Meanwhile, FRY expression is also related to progesterone receptor level in the body.

Keywords: FRY; tumor suppressor protein; breast neoplasm; malignant degree; immunohistochemistry

收稿日期: 2015-11-17

* 基金项目: 国家自然科学基金项目资助(No: 81272904)

[通信作者] 唐小江, E-mail: river-t@126.com, 卫秦芝, E-mail: cnwei99@163.com

乳腺癌是世界上第二常见的癌症疾病,是女性最常见的癌症疾病,近年来其发生率以每年约 3%~4%的速度增长^[1]。乳腺癌相关分子标志物的检测对于乳腺癌的诊断及预后和治疗都有着重要的指导意义,通常根据雌激素受体(estrogen receptor,ER)、孕激素受体(progesterone receptor,PR)和人类表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2)等的表达选择不同方案进行系统性治疗^[2]。同时钼靶 X 线及 MRI 检查等影像技术的发展也为乳腺癌的早期诊断提供了有力的手段^[3]。但乳腺癌的病因尚不完全清楚,因此还没有确切从根本上预防乳腺癌的方法,加上其预后转归情况复杂,近年来寻找新的能对乳腺癌进行早期诊断和提示预后的分子标志物成为了研究热点。

FRY 基因是果蝇的 *furry* 基因在哺乳动物中的同源基因,与果蝇的毛发生长有关^[4]。FRY 基因在细胞增殖和分裂^[5]、上皮细胞极化^[6]以及细胞形态^[7]等方面起调节作用。有研究表明,人 FRY 基因有可能成为一种新的乳腺癌抑癌基因,它的表达水平与乳腺癌的发生发展及恶性程度密切相关^[8],但目前 FRY 与乳腺肿瘤恶性程度的关系仍存在许多未知。故采用免疫组织化学方法对不同恶性程度乳腺肿瘤中 FRY 蛋白的表达进行检测,探究 FRY 蛋白的表达与乳腺癌恶性程度及临床病理参数之间的关系。

1 资料与方法

1.1 样本收集

收集广东省韶关市第一人民医院及中山大学附属第六医院乳腺科 2010 年 1 月-2012 年 11 月收治并经确诊的乳腺肿瘤石蜡组织标本 104 例。其中纤维囊性乳腺病 11 例,乳腺浸润性导管癌病例 93 例,所有患者术前均未进行放化疗,采用正电荷防脱玻片行常规 4 μ m 石蜡切片。

收集石蜡标本对应患者的基本信息及临床资料。在 104 例病例中,乳腺非癌病例主要为纤维囊性乳腺病,11 例,年龄 24~50 岁,平均 45.32 岁;乳腺癌病例主要为乳腺浸润性导管癌,93 例,年龄 32~80 岁,平均 50.81 岁;乳腺癌病例中,组织学分级参照病理报告信息,其中 I 级 7 例,II 级 47 例,III 级 39 例;记录肿瘤直径、淋巴结转移、远处转移等情况,根据美国国立综合癌症网络(NCCN)指南 TNM 分期标准对各病例进行分期:I 期 27 例,II 期 33 例,III 期 22 例,其中 11 例有部分信息缺失未能进行分

期。记录 ER、PR、HER2 等免疫组织化学结果,对各病例进行分子病理分型,其中管腔上皮 A 型(Luminal A 型)23 例,管腔上皮 B 型(Luminal B 型)47 例,HER2 过表达型 13 例,三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer,TNBC 型)10 例。

1.2 材料与试剂

FRY 单克隆抗体为本课题组前期研究制备,经前期实验验证适用于免疫组织化学检测,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)、枸橼酸钠缓冲液购自武汉博士德公司,SP-9000 免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(Diaminobenzidine,DAB)显色液、苏木素染液购自北京中杉金桥生物技术公司,乙醇、二甲苯购自广州中南化工试剂厂。

1.3 方法步骤

SP 法免疫组织化学检测:60 $^{\circ}$ C 烤片 1 h,置于二甲苯及梯度乙醇中脱蜡至水,于 3%过氧化氢 H₂O₂ 内 10 min 灭活组织内源性过氧化物酶活性;枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)中进行微波修复,室温自然冷却,1 \times PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;滴加山羊血清封闭,倾倒封闭液,不洗,滴加制备的 FRY 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,1 \times PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;滴加生物素化二抗,孵育 15 min,1 \times PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素工作液,孵育 15 min,1 \times PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,脱水透明,并用中性树胶封片。阴性对照选用 1 \times PBS 缓冲液代替一抗。

1.4 免疫组织化学染色结果判定

选取 400 倍镜下 5 个清晰视野进行观察拍照,细胞的染色强度分为 4 级,0 分:无染色;1 分:弱染色;2 分:中度染色;3 分:强染色。阳性细胞数也分 4 级,0 分:染色阳性细胞 <5%;1 分:染色阳性细胞 5%~25%;2 分:染色阳性细胞 26%~50%;3 分:染色阳性细胞 >50%。每张切片计分为染色阳性细胞数计分与染色强度计分之和,0 分为阴性 -,1、2 分为 +,3、4 分为 ++,5、6 分为 +++,取 5 个视野的平均值,以 1、2 分为 FRY 蛋白阴性表达,3、6 分为 FRY 阳性表达。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件对结果进行数据分析,采用 χ^2 检验(或 Fisher 精确概率法)比较不同临床参数之间 FRY 蛋白的表达差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同恶性程度乳腺肿瘤中 FRY 蛋白的表达情况

免疫组织化学结果显示如附图,FRY 蛋白的表达主要在细胞核,染色为浅黄色至棕黄色不等。在良性乳腺肿瘤细胞中可见细胞核呈深棕黄色,且染色细胞比例较大;在乳腺癌组织中,癌细胞棕黄色较浅或不明显,染色细胞较少;阴性对照全片无染色。

104 例乳腺肿瘤中,11 例纤维囊性乳腺病中 FRY 蛋白阳性表达为 10 例,阳性率 90.9%;93 例乳腺浸润性导管癌中为 51 例,阳性率 54.8%,乳腺良性肿瘤中 FRY 蛋白的阳性率明显高于乳腺癌,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 乳腺癌不同临床病理参数与 FRY 蛋白的表达情况

如表 2 所示,93 例乳腺癌病例中,I 级、II 级、III 级 FRY 蛋白的阳性率分别为 57.1%、72.3%及

33.3%,不同分级间 FRY 蛋白的表达水平差异有统计学差异($P < 0.01$)。在 TNM 分期中,分期较低的 I 期与分期较高的 II 期、III 期的 FRY 蛋白阳性率分别为 74.1%和 47.3%,不同分期间 FRY 蛋白的表达水平有显著性差异($\chi^2=5.282, P < 0.01$)。在分子亚型中,Luminal A 型、Luminal B 型、HER2 过表达型、TNBC 型的 FRY 蛋白阳性率分别为 52.2%、61.7%、38.5%及 50.0%,各组间差异无统计学意义($\chi^2=2.462, P > 0.05$)。肿瘤直径大小 ≤ 3 cm 的组中 FRY 蛋白阳性率比直径大小 > 3 cm 的组高,差异有统计学意义($\chi^2=8.939, P < 0.01$)。不同年龄段 FRY 蛋白的表达差异无统计学意义($\chi^2=0.031, P > 0.05$)。发生

表 1 良恶性乳腺肿瘤中 FRY 蛋白的表达情况

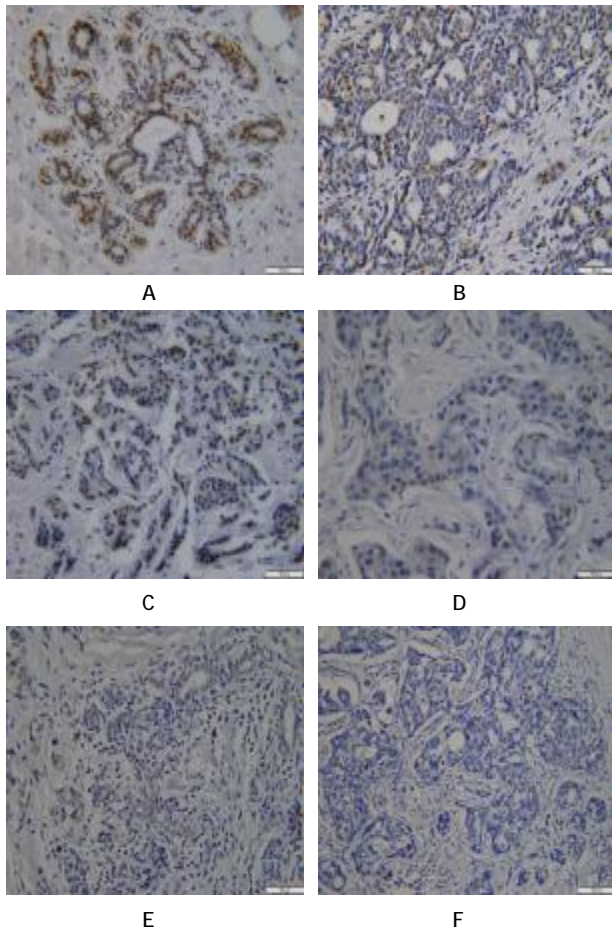
组别	例数	FRY 表达情况		P 值
		阳性数/例	阳性率/%	
纤维囊性乳腺病	11	10	90.9	0.024 [†]
乳腺浸润性导管癌	93	51	54.8	

注:† 为 Fisher 确切概率法计算所得 P 值

表 2 FRY 表达与乳腺癌临床病理参数的关系

项目	例数	FRY 表达		P 值
		阳性数/例	阳性率/%	
年龄				
≤ 50 岁	50	27	54.0	0.861
> 50 岁	43	24	55.8	
肿瘤直径				
≤ 3 cm	56	38	67.9	0.003
> 3 cm	36	13	36.1	
淋巴结				
未转移	49	30	61.2	0.249
转移	35	17	48.6	
组织学分级				
I	7	4	57.1	0.001 [†]
II	47	34	72.3	
III	39	13	33.3	
TNM 分期				
I	27	20	74.1	0.022
II + III	55	26	47.3	
分子亚型				
Luminal A	23	12	52.5	0.482
Luminal B	47	29	61.7	
HER2 过表达	13	5	38.5	
TNBC	10	5	50.0	

注:† 为 Fisher 确切概率法计算所得 P 值



A:纤维囊性乳腺病;B:乳腺浸润性导管癌 I 级;C:乳腺浸润性导管癌 II 级;D、E:乳腺浸润性导管癌 III 级;F:阴性对照

附图 不同组织学分级中 FRY 蛋白的表达情况 (× 400)

淋巴结转移的病例比未发生淋巴结转移的病例 FRY 蛋白表达水平要低, 但无显著性差异 ($\chi^2=1.326, P>0.05$)。

2.3 FRY 蛋白表达与乳腺癌相关分子标志物水平的关系

在 93 例乳腺癌病例中, FRY 蛋白表达在 ER 阳性组和 ER 阴性组的阳性率分别为 58.0% 和 45.8%, 阳性组表达高于阴性组 ($\chi^2=1.059, P>0.05$); 在 PR 阳性组和 PR 阴性组的阳性率分别为 63.5% 和 35.7%, PR 阳性组明显高于 PR 阴性组 ($\chi^2=5.905, P<0.05$); 在 HER2 阳性组和 HER2 阴性组的阳性率分别为 56.7% 和 51.5% ($\chi^2=0.228, P>0.05$), 在 P53 阳性组和阴性组的阳性率分别为 62.8% 和 76.9% ($P>0.05$)。见表 3。

表 3 FRY 表达与乳腺癌相关蛋白水平的关系

组别	例数	FRY 表达		P 值
		阳性数/例	阳性率/%	
ER				
(-)	24	11	45.8	0.303
(+)	69	40	58.0	
PR				
(-)	30	11	35.7	0.015
(+)	63	40	63.5	
HER-2				
(-)	33	17	51.5	0.633
(+)	60	34	56.7	
P53				
(-)	13	10	76.9	0.507 [†]
(+)	43	27	62.8	

注: † 为 Fisher 确切概率法计算所得 P 值

3 讨论

乳腺癌的发生、发展是一个多因素参与和多阶段的复杂过程^[9]。乳腺癌作为一种异质性肿瘤, 主要体现在临床表现的多样性、治疗反应的不一致性及预后转归的差异性。通过对乳腺癌患者的临床表现、生物学特征等各种因素的分析, 从差异中找出规律, 为临床改进治疗手段、改善预后转归提供有力的支持。

在收集的病例中, 纤维囊性乳腺病的 FRY 蛋白阳性率要低于乳腺浸润性导管癌, 两者差异有统计学意义, 表明在乳腺良性肿瘤中 FRY 蛋白的表达要高于乳腺恶性肿瘤, 结合 FRY 基因在细胞增殖和分

裂、细胞形态等方面的调节作用, 提示 FRY 基因可能是正常乳腺细胞中不可缺少的, FRY 蛋白的表达有助于乳腺细胞的正常分化和增殖, 乳腺癌病例中癌细胞的形成和发生可能与 FRY 蛋白表达偏低有关。

乳腺癌的组织学分级具有重要的预后意义^[10], 分级越高肿瘤的分化越差, 提示乳腺癌预后不良。各不同组织学分级间 FRY 蛋白的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但由于组织学 I 级的病例仅有 7 例, 在阳性表达率上并未高于 II 级, 考虑在后续工作中继续增加这一部分样本的收集和检测; 在例数相当的 II、III 级病例中, 分级越高, FRY 表达明显降低。乳腺癌 TNM 分期也是临床上较成熟的评估指标^[11]。在已分期的 82 例乳腺癌病例中, 随着 TNM 分期的升高, FRY 蛋白的阳性率均降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 进一步验证了在不同恶性程度的乳腺癌中, FRY 蛋白的表达存在规律性, 分级高、分期晚的乳腺癌 FRY 蛋白表达低。

目前临床主要根据 ER、PR 及 HER2 的免疫组织化学检测结果将乳腺癌分为 4 种分子亚型, 即 Luminal A 型 (ER+/PR+/HER2-), Luminal B 型 (ER+/PR+/HER2+), HER2 过表达型 (ER-、PR-、HER2+), 三阴型乳腺癌 (TNBC, ER-、PR-、HER2-)。其中, Luminal A 型和 Luminal B 型的预后较好, 而三阴型乳腺癌和 HER-2 过表达型则预后较差^[12]。结果虽然显示 FRY 蛋白表达在各分子分型间的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 考虑到样本收集的均衡性, 样本来源于两个不同地区的医院, 各医院的检测条件及评判程序可能存在差异性。但从 FRY 蛋白表达的阳性率可以看出 Luminal A 型和 Luminal B 型要高于三阴型乳腺癌和 HER-2 过表达型, 仍可提示 FRY 蛋白表达在乳腺癌分子亚型中可能存在的趋势性。

雌激素受体 (ER) 和孕激素受体 (PR) 是评价乳腺癌预后和指导内分泌治疗的指标, ER、PR 阴性者, 属于非激素依赖型, 一般分化较差; HER2 表达与 ER、PR 表达呈负相关, 表达越高, 乳腺癌的复发率越高, 预后越差^[13]。结果显示 PR 阳性组中 FRY 蛋白表达率明显高于 PR 阴性组 ($P<0.05$), ER 阳性组也高于 ER 阴性组 ($P>0.05$), HER2 阴性组与 HER2 阳性组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。虽然 ER 的 FRY 表达差异无统计学意义, 但从数据可以看出, 纳入分析的病例中 ER 与 PR 均为 93 例, 且 ER、PR 阴性组中 FRY 蛋白的阳性例数均为 11 例, ER、PR

阳性组中 FRY 蛋白的阳性例数均为 40 例, 具有高度的一致性, 提示 ER 可能与 PR 跟 FRY 的关系一致。P53 也是临床上与乳腺癌关系较大的分子标志物之一^[14], 收集的乳腺癌样本中有 56 例病例具有 P53 检查结果, 但 FRY 表达情况在不同 P53 水平组见并未见显著差异 ($P>0.05$)。

肿瘤大小和淋巴结转移情况是乳腺癌的重要预后指标^[15], 肿瘤越大出现转移的时间越短^[16]。收集的乳腺癌样本中有 1 例肿瘤直径大小资料缺失, 9 例淋巴结转移资料缺失, 在剩余的乳腺癌病例中, 肿瘤直径小的 FRY 蛋白表达率高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 未发生淋巴结转移的表达率比发生淋巴结转移的高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

综上, FRY 蛋白在正常乳腺组织中的表达率比乳腺癌组织高, 并且与乳腺癌组织学分级、TNM 分期、肿瘤直径大小及激素受体水平相关, 表明 FRY 蛋白与乳腺肿瘤恶性程度存在一定的关系, 提示它在细胞内的表达可对乳腺癌起抑制作用。对于认识 FRY 蛋白在乳腺癌预后判断、指导临床治疗方面的作用提供了线索, 为后续进一步研究 FRY 蛋白与乳腺肿瘤恶性程度的关系指明了方向。

参 考 文 献:

- [1] Youlten DR, Cramb SM, Yip CH, et al. Incidence and mortality of Female breast cancer in the Asia-Pacific region[J]. *Cancer Biol Med*, 2014, 11(2): 101-115.
- [2] Ignatiadis M, Buyse M, Sotiriou C. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015[J]. *Ann Oncol*, 2015 Aug, 26(8): 1533-1546.
- [3] 余立君. 乳腺癌早期诊断设备及其技术进展—超声、磁共振、核医学乳腺成像技术进展(二)[J]. *中国医疗设备*, 2010, 25(8): 51-53.
- [4] Nagai T, Mizuno K. Multifaceted roles of furry proteins in invertebrates and vertebrates[J]. *J Biochem*, 2014, 155(3): 137-146.
- [5] Ikeda M, Chiba S, Ohashi K, et al. Furry protein promotes aurora A-mediated Polo-like kinase 1 activation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27670-27681.
- [6] Chiba S, Ikeda M, Katsunuma K, et al. MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes[J]. *Curr Biol*, 2009, 19(8): 675-681.
- [7] Verde F, Wiley DJ, Nurse P. Fission yeast orb6, a ser/thr protein kinase related to mammalian rho kinase and myotonic dystrophy kinase, is required for maintenance of cell polarity and coordinates cell morphogenesis with the cell cycle[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(13): 7526-7531.
- [8] Ren X, Graham JC, Jing L, et al. Mapping of Mcs30, a new mammary carcinoma susceptibility quantitative trait locus (QTL30) on rat chromosome 12: identification of fry as a candidate Mcs gene[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e70930.
- [9] Van-Ewijk RJ, Schwentner L, Wöckel A, et al. Trends in patient characteristics, treatment and survival in breast cancer in a non-selected retrospective clinical cohort study of 2,600 patients [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013 Jan, 287(1): 103-110.
- [10] Page DL, Ellis IO, Elston CW. Histologic grading of breast cancer: Let' s do it (editorial)[J]. *Am J Clin Pathol*, 1995, 103(1): 123-124.
- [11] Borges GS, Colchon PH, Staak MC J. et al. Analysis of disease-free survival and overall survival in patients with luminal a breast cancer stratified according to TNM[J]. *Klin Onkol*, 2014, 27(3): 178-182.
- [12] Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival[J]. *Clin Med Res*. 2009 Jun, 7(1-2): 4-13.
- [13] Joensuu K, Leidenius M, Kero M, et al. ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early and Late Relapsing Breast Cancer-Reduced CK5 Expression in Metastases[J]. *Breast Cancer (Auckl)*, 2013, (7): 23-34.
- [14] Peng Y. Potential prognostic tumor biomarkers in triple-negative breast carcinoma[J]. *Journal of Peking University*, 2012 Oct, 44(5): 666-672.
- [15] 郭雅明, 吴万敏, 李艳杰. 乳腺癌预后相关因素研究进展[J]. *内蒙古医学杂志*, 2008, 40(1): 71-73.
- [16] Fleming ST, Rastogi A, Dmitrienko A, et al. A comprehensive prognostic index to predict survival based on multiple comorbidities: a focus on breast cancer [J]. *Med Care*, 1999, 37(6): 6012.

(张蕾 编辑)