

论著·临床研究

FOSB 与 P16 在乳腺浸润性导管癌各分子亚型中的表达及相关性

代新珍, 米贤军, 钟守军, 段立锋, 杨伟洪, 刘祥玉, 徐秀梅, 陈志强

广东省中山市博爱医院病理科, 中山 528403

[摘要] **目的** 分析原癌基因蛋白 FOSB 与细胞周期蛋白 P16 在乳腺浸润性导管癌不同分子亚型组织中的表达差异及相关性。**方法** 收集 2013 年 8 月—2019 年 3 月在中山市博爱医院行手术治疗且术后病理诊断为乳腺浸润性导管癌 138 例患者的肿瘤组织, 以正常乳腺组织作为对照。采用免疫组织化学法分别检测 FOSB 和 P16 的表达, 分析乳腺癌组织中两者表达水平的相关性, 以及它们在 Luminal A 型、Luminal B 型 [根据是否表达人表皮生长因子 2 (human epidermal growth factor 2, HER2) 又分为 HER2⁻ 和 HER2⁺]、HER2 阳性型及三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 中的表达情况及相关性。**结果** ① 在 138 例乳腺浸润性导管癌组织中 FOSB 与 P16 的表达水平呈负相关 ($r=-0.181$, $P=0.033$)。② FOSB 在 Luminal A 型乳腺癌组织中的阳性表达率显著高于其他亚型 ($P=0.028$, $P=0.033$, $P=0.001$, $P=0.010$), 而 P16 在 TNBC 中的阳性表达率显著高于其他亚型 ($P=0.025$, $P=0.005$, $P=0.008$, $P=0.011$)。③ FOSB 与 P16 的表达水平在 TNBC 组织中呈负相关 ($r=-0.566$, $P=0.018$)。**结论** FOSB 与 P16 在乳腺浸润性导管癌不同分子亚型组织中的表达存在差异, FOSB 在 Luminal A 型中表达水平较高, P16 在 TNBC 中表达水平较高; 两者在 TNBC 中的表达呈负相关。

[关键词] FOSB; P16; 乳腺浸润性导管癌; 分子亚型; 免疫组织化学

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.08.017 **[中图分类号]** R737.9 **[文献标志码]** A

Expressions of FOSB and P16 and their correlation in different molecular subtypes of breast invasive ductal cancer

DAI Xin-zhen, MI Xian-jun, ZHONG Shou-jun, DUAN Li-feng, YANG Wei-hong, LIU Xiang-yu, XU Xiu-mei, CHEN Zhi-qiang

Department of Pathology, Zhongshan Bo'ai Hospital, Guangdong Province, Zhongshan 528403, China

[Abstract] **Objective** To detect the expressions of proto-oncogene protein FOSB and cyclin protein P16 in the different molecular subtypes of breast invasive ductal cancer and their correlation. **Methods** The tumor tissues of 138 patients diagnosed with breast invasive ductal cancer by postoperative pathological examinations in Zhongshan Bo'ai Hospital from August 2013 to March 2019 were collected with normal breast tissues as control. Immunohistochemical staining was performed for the expressions of FOSB and P16 to investigate their correlation in the breast cancer. Besides, their expressions and their correlations in the different molecular subtypes of breast cancers, i.e. Luminal A, Luminal B [According to the expression of human epidermal growth factor 2 (HER2), it can be divided into HER2⁻ and HER2⁺], HER2 positive subtype, and triple-negative breast cancer (TNBC), were also detected. **Results** ① The expression level of FOSB in 138 cases of breast invasive ductal cancer tissues was negatively correlated with P16 ($r=-0.181$, $P=0.033$). ② The expression of FOSB was significantly higher in Luminal A than those in other subtypes ($P=0.028$, $P=0.033$, $P=0.001$, $P=0.010$), while the expression of P16 was significantly higher in TNBC than those in other subtypes ($P=0.025$, $P=0.005$, $P=0.008$, $P=0.011$). ③ The expression level of FOSB in TNBC was negatively correlated with the expression of P16 ($r=-0.566$, $P=0.018$). **Conclusion** The expressions of FOSB and P16 in the different molecular subtypes of breast invasive ductal cancer are different. The expression level of FOSB significantly increases in Luminal A, and that of P16 significantly increases in TNBC. There is a negative correlation between the expression levels of FOSB and P16 in TNBC.

[Key words] FOSB; P16; breast invasive ductal cancer; molecular subtype; immunohistochemistry

乳腺癌的发生是一系列基因的渐进性累积过程, 在分子表型上存在高度异质性。2013 年 St Gallen 国际乳腺癌会议^[1]根据分子表型将乳腺癌分为 Luminal A 型、Luminal B 型 [根据是否表达人表皮生长因子 2 (human epidermal growth factor 2, HER2) 又分为 HER2⁻ 和 HER2⁺]、HER2 阳性

型及三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC)。目前国内外针对于乳腺癌不同分子亚型的个性化靶向治疗尚不完善。内分泌治疗及曲妥珠单抗等药物的应用虽然明显改善了一部分患者的预后, 但是仍然有部分患者, 特别是侵袭性较强的 TNBC 患者, 除了放射治疗和化学治疗

[基金项目] 中山市医学科研项目 (2017J112)。

[作者简介] 代新珍 (1986—), 女, 主治医师, 硕士; 电子信箱: daixz2010@163.com。

[通信作者] 代新珍, 电子信箱: daixz2010@163.com。

[Funding Information] Zhongshan Medical Research Project (2017J112)。

[Corresponding Author] DAI Xin-zhen, E-mail: daixz2010@163.com。



外, 缺乏特异有效的靶向治疗, 因此寻找新的治疗靶向基因是目前研究的重点。随着研究^[2-5]的不断深入, 发现细胞周期蛋白 P16 在乳腺癌中过表达, 其有可能成为乳腺癌发生、发展、预后及诊断的标志物, 并且 P16 往往是在侵袭性较强的乳腺癌中表达, 还可能参与了乳腺癌治疗相关调节通路。另有研究^[6-7]发现, 原癌基因蛋白 FOSB 作为 AP-1 转录因子的亚单位, 可以促进 TNBC 肿瘤细胞的死亡, 提示 FOSB 可能成为 TNBC 治疗中的靶点分子。Milde-Langosch 等^[8]的研究提示 FOSB 在乳腺癌中的表达与细胞周期蛋白特别是 P16 的表达存在一定的相关性, 但具体相关分子机制目前尚不清楚。本研究通过免疫组织化学法(免疫组化)检测 FOSB 与 P16 在乳腺浸润性导管癌各分子亚型中的表达, 分析其表达情况及相关性, 期望为乳腺浸润性导管癌各分子亚型的个性化靶向治疗提供新的靶点。

1 对象与方法

1.1 资料

病理组织来源于中山市博爱医院病理科。选取 2013 年 8 月—2019 年 3 月经手术切除且经 3 位病理医师确诊的乳腺浸润性导管癌患者 138 例, 以及作为对照的乳腺腺病者 10 例(标本为其乳腺腺病切除病灶周边的正常组织)。所有研究对象的临床病理资料完整, 乳腺浸润性导管癌组织均经免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法对雌激素受体[estrogen receptor (ER)]、孕激素受体[progesterone receptor (PR)]、人类表皮生长因子受体 2[human epidermal receptor2 (HER2)]、核增殖抗原 Ki-67 进行检测, 再次读片, 重新按照 2013 St Gallen 国际乳腺癌会议分子亚型标准^[1]核对分型。138 例乳腺浸润性导管癌组织中, Luminal A 型 11 例、Luminal B (HER2⁻) 型 26 例、Luminal B (HER2⁺) 型 66 例、HER2 阳性型 18 例、TNBC 17 例。本研究得到中山市博爱医院伦理委员会同意。

1.2 主要试剂

兔抗人 FOSB 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 鼠抗人 P16 多克隆抗体和 SP 试剂盒均购自罗氏诊断产品(上海)有限公司。

1.3 免疫组化检测

所有乳腺组织标本经常规石蜡包埋, 采用免疫组化 SP 法染色对 FOSB 和 P16 蛋白进行检测, 实验步骤按照试剂盒说明书进行。FOSB 抗体工作浓度为 1:200, P16 抗体为即用型抗体, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。

读片采用双盲法。FOSB 和 P16 免疫组化染色结果评分依据染色阳性的强度及面积, 采用二级积分法^[9]。染色范围: 阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为 0 分, $>5\%$ 且 $\leq 25\%$ 为 1 分, $>25\%$ 且 $\leq 50\%$ 为 2 分, $>50\%$ 且 $\leq 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分。染色强度: 淡黄色为 1 分, 黄或棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。最后计算两者得分的乘积即为总分。根据文献^[9]将 FOSB 总分分为 0~1 分、2~6 分、7~12 分, 将 P16 总分分为 0~1 分、2~7 分、8~12 分; FOSB 总分 ≥ 7 分, P16 总分 ≥ 8 分判定为阳性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 定性资料用 n (%) 表示, FOSB 与 P16 在不同分子亚型乳腺癌中的表达组间比较采用 χ^2 检验或确切概率法, 相关性检验采用 Spearman 相关性分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

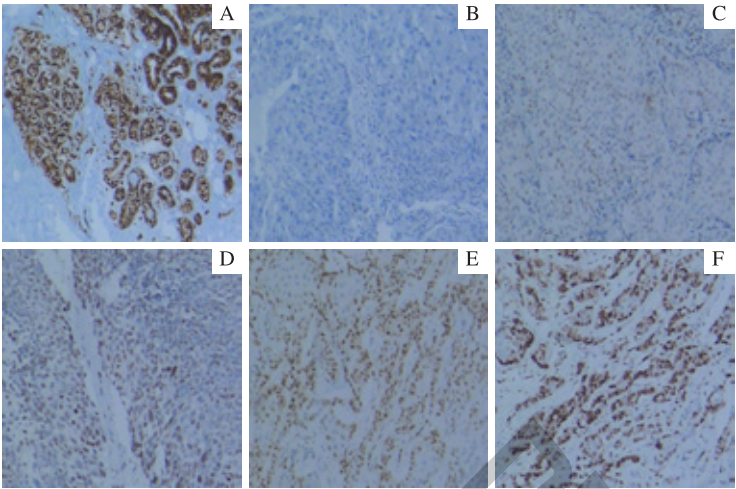
2 结果

2.1 FOSB 与 P16 在正常乳腺组织及乳腺癌中的表达

FOSB 在乳腺组织的表达定位于细胞核, P16 为细胞核和(或)细胞质。FOSB 和 P16 在正常乳腺组织中染色一般为棕褐色或黑色, 染色范围大于 50%, 乳腺部分间质细胞中也可见少许几个细胞染色为棕褐色。FOSB 和 P16 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达差异较大。FOSB 和 P16 在正常乳腺组织及乳腺癌中不同染色强度及范围见图 1、图 2。

2.2 FOSB 与 P16 在乳腺癌组织中的表达相关性

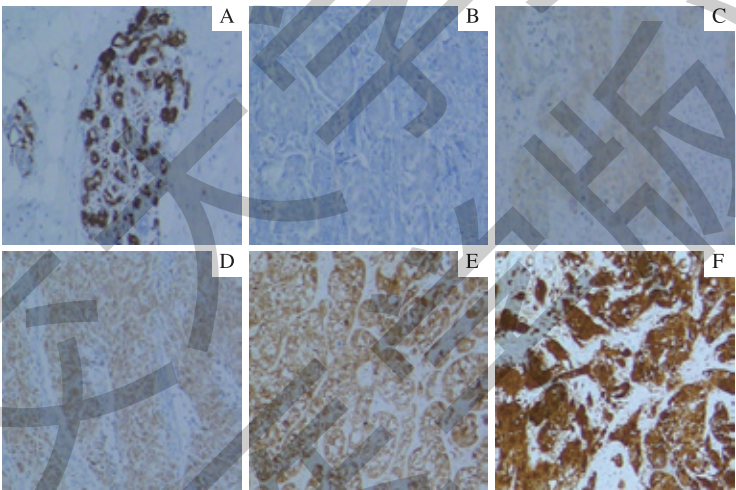
根据免疫组化染色情况计算总分^[10], 138 例乳腺癌标本中 FOSB 0~1 分 80 例, 2~6 分 24 例, 7~12 分 34 例; P16 0~1 分 48 例, 2~7 分 41 例, 8~12 分 49 例(表 1)。经 Spearman 相关分析结果显示, FOSB 在乳腺癌组织中的表达水平与 P16 呈负相关 ($r = -0.181$, $P = 0.033$)。



Note: A. Normal breast tissue (strong positive expression). B–F. Breast invasive ductal carcinoma. (B. Negative expression. C. Weak positive expression in the 5% cancer cells. D. Weak positive expression in the 60% cancer cells. E. Moderate positive expression in the cancer cells. F. Strong positive expression in the cancer cells and in some stromal fibroblasts).

图 1 FOSB 在正常乳腺组织及乳腺浸润性导管癌中的免疫组化染色情况 (SP, ×100)

Fig 1 Immunohistochemical staining of FOSB in normal breast tissue and breast invasive ductal carcinomas (SP, ×100)



Note: A. Normal breast tissue (strong positive expression). B–F. Breast invasive ductal carcinoma. (B. Negative expression. C. Weak positive expression in the 50% cancer cells. D. Weak positive expression in the 80% cancer cells. E. Moderate positive expression in the cancer cells. F. Strong positive expression in the cancer cells and in some stromal fibroblasts).

图 2 P16 在正常乳腺组织及乳腺浸润性导管癌中的免疫组化染色情况 (SP, ×100)

Fig 2 Immunohistochemical staining of P16 in normal breast tissue and breast invasive ductal carcinomas (SP, ×100)

表 1 FOSB 与 P16 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达关系 (n)

Fig 1 Correlation of the expressions between FOSB and P16 in breast invasive ductal carcinomas (n)

P16 score/score	FOSB score/score		
	0–1 (n=80)	2–6 (n=24)	7–12 (n=34)
0–1 (n=48)	31	9	8
2–7 (n=41)	22	7	12
8–12 (n=49)	27	8	14

2.2 FOSB 在不同分子亚型乳腺癌中的表达

FOSB 在 Luminal A 型、Luminal B (HER2⁺) 型、Luminal B (HER2⁻) 型、HER2 阳性型和 TNBC 的阳性表达率分别为 63.6% (7/11)、23.1% (6/26)、26.3% (18/66)、5.6% (1/18) 和 11.8% (2/17), 各分子亚型间差异有统计学意义 ($P=0.005$); 两两比较发现, 与 Luminal A 型相比, Luminal B (HER2⁺) 型 ($P=0.033$)、Luminal B (HER2⁻) 型 ($P=0.028$)、HER2 阳性型 ($P=0.001$) 和 TNBC ($P=0.010$) 中 FOSB 的阳性表达率显著较低, 其余各亚型间差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。



2.3 P16 在不同分子亚型乳腺癌中的表达

P16 在 Luminal A 型、Luminal B (HER2⁺) 型、Luminal B (HER2⁻) 型、HER2 阳性型和 TNBC 的阳性表达率分别为 27.3% (3/11)、29.6% (7/26)、34.8% (23/66)、27.8% (5/18)、70.6% (12/17), 各分子亚型间差异有统计学意义 ($P=0.030$); 两两比较发现, 与 TNBC 型相比, Luminal A 型 ($P=0.025$)、Luminal B (HER2⁻) 型 ($P=0.005$)、Luminal B (HER2⁺) 型 ($P=0.008$)、HER2 阳性型 ($P=0.011$) 中 P16 的阳性表达率显著较低, 其余各亚型间差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。

2.4 P16 与 FOSB 在不同分子亚型乳腺癌中的表达相关性分析

FOSB 与 P16 的表达水平在不同分子亚型之间相关性分析发现, 仅在 TNBC 中 FOSB 表达水平与 P16 的表达水平呈负相关 ($r=-0.566$, $P=0.018$, 表 2); 而在其他 4 个亚型中两者的表达水平无明显相关性 (均 $P>0.05$)。

表 2 FOSB 与 P16 在乳腺癌 TNBC 亚型组织中的相关性 (n)
Fig 2 Correlation of expressions between FOSB and P16 in TNBC cancer tissues (n)

P16	FOSB	
	Positive	Negative
Positive	0	12
Negative	2	3

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 其发生、发展是一系列基因分子相互作用的结果, 乳腺癌在分子水平上存在高度异质性, 相同病理形态的乳腺癌在治疗以及预后方面存在很大的差异。将乳腺浸润性导管癌进行分子分型为其预后的判断和治疗方法的选择上提供了重要依据。Luminal A 型除了化疗外, 还可以从内分泌治疗中获益, 预后较好; Luminal B 型则内分泌治疗效果较差; HER2 阳性型与 TNBC 型的恶性程度较高, 容易复发及早期转移,

目前曲妥珠单抗靶向治疗对 HER2 阳性型有一定的效果, 但 TNBC 仍缺乏行之有效的治疗方法^[11]。随着分子生物学的发展, 越来越多的分子被发现在乳腺癌发生发展中起着重要作用, 为乳腺癌的分子分型以及治疗方案的选择提供了更多的可能性。

FOSB 作为 AP-1 家族成员中重要的一员, 参与了肿瘤细胞的增殖、凋亡及迁移, 在肿瘤的发生、发展过程中充当重要角色。P16 作为重要的细胞周期调控蛋白, 参与多种肿瘤的发生、发展。研究^[8, 10, 12]发现, FOSB 和 P16 在乳腺正常组织中的表达水平均较高, 而在乳腺癌组织中的表达水平较低, 并且在乳腺癌中 FOSB 调控着细胞周期相关蛋白 P16 的表达, FOSB 表达强阳性的乳腺癌组织 P16 表达无或者弱阳性, 而 FOSB 无表达或者弱阳性时, P16 的表达呈现强阳性。本研究通过免疫组化法检测 FOSB 和 P16 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达, 发现 FOSB 高表达的组织 P16 往往呈低表达, 两者表达水平呈负相关, 与上述文献报道结果一致。然而对于 FOSB 和 P16 在乳腺浸润性导管癌各分子亚型中的表达情况及关系的研究, 国内外鲜有报道。

本研究结果显示, FOSB 在 Luminal A 型组织中的表达水平显著高于 Luminal B (HER2⁺) 型、Luminal B (HER2⁻) 型、Her2 阳性型和 TNBC 组织; 这可能是因为 FOSB 在乳腺癌中的表达与 ER、PR 的表达均呈正相关^[13-15], 而 Luminal A 型正是 ER、PR 同时高表达的分子亚型。另有研究^[6-8]发现, FOSB 在 TNBC 中低表达, 但本研究未发现该蛋白在 TNBC 中与在 Luminal B (HER2⁺) 型、Luminal B (HER2⁻) 型、HER2 阳性型中表达的差异。本研究结果还发现 P16 在 TNBC 组织中的表达水平显著高于 Luminal A 型、Luminal B (HER2⁺) 型、Luminal B (HER2⁻) 型、HER2 阳性型, 也与以往的研究^[16-19]结果一致。通过在乳腺癌不同分子亚型中分析 FOSB 与 P16 的表达水平发现, 两者仅在 TNBC 中呈负相关; 因此我们推测这 2 种蛋白在 TNBC 中可能同时参与了某种基因调节途径, 影响肿瘤的发生、发展。深入研究 FOSB 与 P16 在 TNBC 中的相关作用机制, 有望对该型的个性化分子靶向治疗研究提供新的思路。

参 · 考 · 文 · 献

[1] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the ST. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011[J]. Ann Oncol, 2011, 22(8): 1736-1747.

[2] Chae SW, Sohn JH, Kim DH, et al. Overexpressions of cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications[J]. Yonsei Med J, 2011, 52(3): 445-453.

[3] Halvorsen OJ, Høstmark J, Haukaas S, et al. Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized prostate carcinoma[J]. Cancer, 2000, 88(2): 416-424.

- [4] Gavressea T, Kalogeras KT, Koliou GA, et al. The prognostic value of the immunohistochemical expression of phosphorylated RB and p16 proteins in association with cyclin D1 and the p53 pathway in a large cohort of patients with breast cancer treated with taxane-based adjuvant chemotherapy[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(6): 2947-2957.
- [5] Kavanagh EL, Lindsay S, Halasz M, et al. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(10): e388.
- [6] Ting CH, Chen YC, Wu CJ, et al. Targeting FOSB with a cationic antimicrobial peptide, TP4, for treatment of triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40329-40347.
- [7] Takeda S, Okajima S, Noguchi M, et al. Possible involvement of FosB in (-)-xanthatin-mediated anti-proliferative effects in human cancer MDA-MB-231 cells[J]. *Fundam Toxicol Sci*, 2016, 3(3): 115-119.
- [8] Milde-Langosch K, Bamberger AM, Methner C, et al. Expression of cell cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members[J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(4): 468-472.
- [9] Milde-Langosch K, Kappes H, Riethdorf S, et al. FosB is highly expressed in normal mammary epithelia, but down-regulated in poorly differentiated breast carcinomas[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 77(3): 265-275.
- [10] 徐如君, 王伟. 《乳腺癌 HER2 检测指南 (2019 版)》中更新部分的解读与探讨[J]. *浙江医学*, 2019, 41(14): 1461-1463, 1476.
- [11] 叶辉, 徐明, 叶曼娜, 等. CD147 在乳腺浸润性导管癌分子亚型中的表达与临床意义[J]. *上海交通大学学报 (医学版)*, 2016, 36(4): 518-522.
- [12] 王阳, 徐细明, 邓君健, 等. p16 及 cyclin D1 在乳腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *医学综述*, 2014, 20(23): 4358-4360.
- [13] Bamberger AM, Methner C, Lisboa BW, et al. Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype[J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(5): 533-538.
- [14] López-Knowles E, Gao Q, Cheang MC, et al. Heterogeneity in global gene expression profiles between biopsy specimens taken peri-surgically from primary ER-positive breast carcinomas[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 39.
- [15] Bamberger AM, Milde-Langosch K, Schulte HM, et al. Progesterone receptor isoforms, PR-B and PR-A, in breast cancer: correlations with clinicopathologic tumor parameters and expression of AP-1 factors[J]. *Horm Res*, 2000, 54(1): 32-37.
- [16] 苏东玮, 施俊义, 盛湲, 等. P53、P16、Ki-67 对三阴乳腺癌预后的相关性研究[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(5): 894-895, 913.
- [17] Abou-Bakr AA, Eldweny HI. P16 expression correlates with basal-like triple-negative breast carcinoma[J]. *Ecancermedicalscience*, 2013, 7: 317.
- [18] Kozomara Z, Supic G, Krivokuca A, et al. Promoter hypermethylation of p16, *BRCA1* and *RASSF1A* genes in triple-negative breast cancer patients from Serbia[J]. *J BUON*, 2018, 23(3): 684-691.
- [19] Hashmi AA, Naz S, Hashmi SK, et al. Prognostic significance of p16 & p53 immunohistochemical expression in triple negative breast cancer[J]. *BMC Clin Pathol*, 2018, 18: 9.

[收稿日期] 2019-10-14

[本文编辑] 瞿麟平

学术快讯

上海交通大学医学院附属瑞金医院提出糖皮质激素治疗重型、危重型新型冠状病毒肺炎的理论依据

2020 年 7 月 1 日, 上海交通大学医学院附属瑞金医院急诊科杨之涛副主任医师、消化外科研究所于颖彦教授和朱正纲教授在 *International Journal of Biological Sciences* 在线发表了糖皮质激素通过激活血管紧张素转化酶 2 并抑制白介素 6 水平改善重型及危重型新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的研究成果。

该研究由上海交通大学医学院附属瑞金医院第四批援鄂医疗队员、急诊科杨之涛医师, 瑞金医院消化外科研究所的于颖彦教授和朱正纲教授为共同通信作者, 普外科博士研究生向臻和重症医学科援鄂医疗队员刘嘉琳医师及医院感染管理科的石大可医师为共同第一作者。该研究是瑞金医院援鄂医疗队救治一线医师与后方基础医疗团队紧密合作共同努力的成果。