

FOXP3在激素受体阳性乳腺癌中的表达及其对MCF-7细胞侵袭和迁移的影响

李静平^{1,2}, 任晓菲^{1,2}, 刘北辰^{2,3}, 曹淼^{1,2}, 任曙光^{2,4}, 赵小涵⁵, 刘运江^{1,2*}, 张香梅^{2,6}

¹河北医科大学第四医院乳腺中心, 石家庄 050011; ²河北省肿瘤微环境与耐药重点实验室, 石家庄 050011; ³河北医科大学第四医院血液科, 石家庄 050011; ⁴河北医科大学第四医院动物中心, 石家庄 050011; ⁵河北医科大学第四医院放疗科, 石家庄 050011; ⁶河北医科大学第四医院科研中心, 石家庄 050011

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.03.0269

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

李静平, 任晓菲, 刘北辰, 等. FOXP3在激素受体阳性乳腺癌中的表达及其对MCF-7细胞侵袭和迁移的影响[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(3): 0269-0276.

[收稿日期] 2021-08-13

[录用日期] 2021-09-29

[上线日期] 2022-01-19

[摘要] 目的 探讨转录因子FOXP3在激素受体阳性乳腺癌组织中的表达及其对MCF-7细胞侵袭和迁移的影响。方法 收集2010年9月—2011年10月河北医科大学第四医院乳腺中心收治的66例激素受体阳性乳腺癌患者的石蜡标本, 采用免疫组化检测组织中FOXP3的表达情况, 分析FOXP3表达与临床病理特征的关系; 采用Kaplan-Meier法分析FOXP3表达与激素受体阳性乳腺癌预后的关系。采用qRT-PCR检测5种乳腺癌细胞系(MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-474、BR-3和MCF-7)中FOXP3 mRNA的相对表达量, 选取FOXP3表达量最高的MCF-7细胞系进行基因沉默。设置si-FOXP3转染组(转染si-FOXP3)、si-NC转染组(转染si-NC)与空白对照组(不做处理), 采用Western blotting检测FOXP3蛋白的表达, 划痕实验和Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力。结果 FOXP3蛋白在激素受体阳性乳腺癌细胞质和细胞核中均有表达, 细胞核FOXP3阳性表达率为40.9%(27/66), 且在无淋巴结转移、Ki-67低表达、Luminal A型及TNM分期I期乳腺癌组织中阳性表达率较高($P < 0.05$); 细胞质FOXP3阳性表达率为54.6%(36/66)。Kaplan-Meier生存分析显示, 细胞核FOXP3阳性组总生存率明显高于阴性组[96.30%(26/27) vs. 82.05%(32/39), $P = 0.042$], 而细胞质FOXP3阳性组与阴性组总生存率差异无统计学意义[88.89%(32/36) vs. 86.67%(26/30), $P = 0.715$]。qRT-PCR检测结果显示, MCF-7细胞系FOXP3 mRNA相对表达量最高($P < 0.05$); 沉默FOXP3后, MCF-7细胞的迁移和侵袭能力均较空白对照组明显增强($P < 0.05$)。结论 FOXP3在激素受体阳性乳腺癌中的预后意义与表达部位相关, 细胞核FOXP3的表达可提高总生存率, 但细胞质FOXP3的意义尚不明确。FOXP3在乳腺癌MCF-7细胞系中发挥抑制细胞迁移和侵袭的抑癌作用, 可作为激素受体阳性乳腺癌的潜在分子标志物。

[关键词] 乳腺癌; FOXP3; 预后; 迁移; 侵袭

FOXP3 expression in the hormone receptor positive breast cancer and its effect on invasion and migration of MCF-7 cell

Li Jing-Ping^{1,2}, Ren Xiao-Fei^{1,2}, Liu Bei-Chen^{2,3}, Cao Miao^{1,2}, Ren Shu-Guang^{2,4}, Zhao Xiao-Han⁵, Liu Yun-Jiang^{1,2*}, Zhang Xiang-Mei^{2,6}

¹Breast Center, ²Department of Hematology, ³Animal Center, ⁴Department of Radiotherapy, ⁵Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

²Hebei Provincial Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Drug Resistance, Shijiazhuang 050011, China

[基金项目] 河北省自然科学基金面上项目(H2019206368); 河北省重点研发计划项目民生科技专项(192777125D)

[作者简介] 李静平, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事乳腺肿瘤方面的研究

[通信作者] 刘运江, E-mail: lyj818326@outlook.com; 张香梅, E-mail: xiangmeizhang2001@hotmail.com

*Corresponding author. Liu Yun-Jiang, E-mail: lyj818326@outlook.com; Zhang Xiang-Mei, E-mail: xiangmeizhang2001@hotmail.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2019206368), and the Livelihood Technology Special Project in Key Project of Hebei Province (192777125D)

[Abstract] Objective To investigate the expression of FOXP3 in hormone receptor-positive breast cancer tissues and its effect on invasion and migration of MCF-7 cells. **Methods** Formalin-fixed, paraffin-embedded blocks from 66 hormone receptor-positive breast cancer patients who received surgery at Breast Center of the Fourth Hospital of Hebei Medical University from September 2010 to October 2011 were used in this study. The protein expression level of FOXP3 was detected by immunohistochemistry. The relationship between the FOXP3 expression levels and the clinicopathologic features was analyzed. Kaplan-Meier analysis was used to assess the overall survival rate, according to the presence or absence of FOXP3 expression. The expression levels of FOXP3 mRNA in breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-474, BR-3, and MCF-7) were detected by qRT-PCR. The MCF-7 cell line, with the highest expression level of FOXP3, was selected for the following gene silencing experiment. The si-FOXP3 transfection group (transfected with si-FOXP3), si-NC transfection group (transfected with si-NC), and blank control group (without treatment) were set. The expression of FOXP3 protein was detected by Western blotting, and the migration and invasion ability of cells was detected by scratch test and Transwell test. **Results** The FOXP3 exhibited a heterogeneous subcellular location in tumor cells. The positive expression ratio of FOXP3 in the nucleus was 40.90%(27/66), associated with negative lymph node metastasis, lower Ki-67 index, Luminal A typing, and TNM I stage ($P<0.05$); positive expression ratio of FOXP3 in the cytoplasm was 54.6%(36/66). Kaplan-Meier analysis indicated that nuclear FOXP3 expression correlated with better overall survival [96.30%(26/27) vs. 82.05%(32/39), $P=0.042$], but the cytoplasmic FOXP3 was not significantly associated with overall survival [88.89%(32/36) vs. 86.67%(26/30), $P=0.715$]. qRT-PCR results showed that the MCF-7 cell line has the highest expression level of FOXP3 mRNA in five breast cancer cell lines above ($P<0.05$). Thus, we performed the gene silencing experiment in the MCF-7 cell line. Compared with control group, knockdown of FOXP3 significantly enhanced the migration and invasion of MCF-7 cells ($P<0.05$). **Conclusion** In hormone receptor-positive breast cancer, the prognostic significance of FOXP3 expression is relevant to the different subcellular localization of FOXP3. Nuclear FOXP3 suggested an improved overall survival, whereas cytoplasmic FOXP3 was not significantly relevant to survival. FOXP3 may reduce the migration and invasion of MCF-7 cells, and it may be a prognostic marker for breast cancer.

[Key words] breast cancer; FOXP3; progression; migration; invasion

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,且发病率逐年升高,严重威胁女性的生命健康^[1]。激素受体阳性乳腺癌在所有乳腺癌中占比大于70%,是最常见的乳腺癌类型之一^[2]。随着治疗策略的不断更新,乳腺癌患者的总生存率和预后得到了很大程度的改善。有研究显示,2008—2016年人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)阳性乳腺癌患者总生存期明显延长,三阴性乳腺癌患者总生存期略有改善,但激素受体阳性乳腺癌患者总生存期未得到明显改善^[3-4]。内分泌治疗一直被认为是激素受体阳性乳腺癌治疗的基石,但目前传统化疗与内分泌治疗的高耐药率和高复发率是此类患者治疗的瓶颈^[5-7]。因此,寻找新的生物靶标、探讨新的治疗策略是激素受体阳性乳腺癌研究的重点。叉头框家族是一类参与肿瘤发生、胚胎生成和氧化应激等多种生理过程的转录因子^[8],其中叉头框转录因子3(forkhead box protein 3, FOXP3)作为叉头框家族成员,早期被认为特异性表达于免疫抑制性CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell, Treg)中,近年来研究发现其在包括乳腺癌在内的多种肿瘤细胞中均有

异常表达^[9],可影响肿瘤的发生和发展,但其在乳腺癌中的作用及其临床意义尚存在争议^[10]。本研究探讨了FOXP3在激素受体阳性乳腺癌中的表达情况及其对激素受体阳性乳腺癌细胞株生物学行为的影响,旨在为激素受体阳性乳腺癌的诊断、靶向治疗和预后评估提供新的分子标志物。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2010年9月—2011年10月河北医科大学第四医院乳腺中心收治的66例激素受体阳性乳腺癌患者进行回顾性分析,收集其乳腺癌组织标本。纳入标准:经本院2位以上病理科医师确诊为激素受体阳性乳腺癌,且术后行标准辅助化疗、内分泌治疗。排除标准:(1)特殊病理类型;(2)病理信息不全;(3)接受新辅助治疗(包括化疗、放疗及内分泌治疗等);(4)TNM分期IV期;(5)石蜡包埋组织质量差。66例均为女性,年龄30~81(48.0±11.1)岁。采用门诊、电话和查阅病历的方式进行随访,以病理确诊时开始计算生存时间,随访至2021年8月,终止事件为患者死亡。根据中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021年版)

分为Luminal A型和Luminal B型乳腺癌, 定义免疫组化指标Ki-67 \leq 30%为低表达, Ki-67 $>$ 30%为高表达^[11]。本研究获得河北医科大学第四医院伦理委员会批准(2018MEC116)。

1.2 免疫组化检测乳腺癌组织中FOXP3的表达 采用Max Vision™一步法免疫组织化学检测试剂二甲胺基偶氮苯(DAB)显色试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)检测乳腺癌组织中FOXP3的表达情况。石蜡切片(厚度4 μ m)常规脱蜡至水, 以3% H₂O₂室温孵育10 min阻断内源性过氧化物酶的活性; 浸入柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)热抗原修复3 min, 自然冷却20 min; 滴加鼠抗FOXP3单克隆抗体(1:50; 236A/E7, 英国Abcam公司)4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 滴加酶标记的二抗, 室温湿盒中孵育30 min; DAB显色, 苏木精复染, 常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片, 光镜下观察。用富含Treg的慢性扁桃体炎组织切片作为阳性对照。鼠源IgG1代替一抗作为同种型阴性对照。

阳性结果判断: FOXP3以乳腺癌细胞核和(或)细胞质中出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性表达, 每张切片随机选择5个高倍视野(\times 400), 按阳性细胞数占同类细胞的百分比分类, 阳性细胞百分比 \geq 25%为FOXP3阳性切片^[10]。

1.3 细胞株及主要试剂 人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-474、BR-3和MCF-7购自美国ATCC细胞库; 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)通过采集健康人的清晨空腹静脉外周血, 将血液标本置于抗凝管内, 以3000 r/min离心10 min分离获得。RPMI 1640培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国Gibco公司; Trizol购自美国Invitrogen公司; Platinum SYBR Super MiX试剂、Fu GENE HD转染试剂及反转录试剂盒购自美国Promega公司; PCR引物购自上海英潍捷基贸易有限公司; Transwell小室(孔径3.0 μ m)购自美国Corning公司; Matrigel基质胶购自美国BD公司。siRNA由上海吉玛制药技术有限公司合成并提供。

1.4 细胞培养 乳腺癌细胞于含10%胎牛血清、100 μ g/ml链霉素及100 U/ml青霉素的DMEM培养液中培养, 培养条件为37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。当细胞融合度达80%时, 用胰蛋白酶消化, 以1:3比例传代。取第5~15代对数生长期细胞进行后续实验。

1.5 不同乳腺癌细胞FOXP3 mRNA相对表达量检测 乳腺癌细胞用Trizol裂解后提取总RNA, 按照Promega反转录试剂盒说明书反转录为cDNA, 然后进行qRT-PCR扩增, 以GAPDH为内参。GAPDH引物序列: 正义链5'-CAAGGCTGAGAACGGGAA-3',

反义链5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3'; FOXP3引物序列: 正义链5'-GTGGCCCGGATGAGAAG-3', 反义链5'-GGAGCCCTTGTCGGATGATG-3'。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性10 min; 95 $^{\circ}$ C变性15 s、58 $^{\circ}$ C退火30 s、72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min, 4 $^{\circ}$ C保存。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法分析FOXP3 mRNA相对表达量。

1.6 细胞分组及处理 根据上述实验选取FOXP3表达量最高的细胞进行后续实验, 将细胞接种于6孔板中, 待细胞融合度达80%时, 参照Fu GENE HD转染试剂说明书进行转染, 设置空白对照组、si-NC转染组(阴性对照)与si-FOXP3转染组。用100 μ l无血清培养基稀释10 μ l Fu GENE HD试剂和10 μ l si-FOXP3(或si-NC), 静置5 min后混匀, 分别加入si-FOXP3转染组和si-NC转染组, 空白对照组不做任何处理。转染后6 h更换为完全培养基, 24 h后显微镜下观察细胞形态, 进行后续实验。

1.6.1 Western blotting检测细胞中FOXP3的表达水平 收集各组细胞, 采用RIPA强效裂解液提取细胞总蛋白, BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 取80 μ g蛋白行SDS-PAGE电泳, 转膜(90 V, 3 h)。加入鼠抗人MCF-7单克隆抗体(1:500)、兔抗人GAPDH多克隆抗体(1:10 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; TBST洗膜10 min \times 3次, 加入荧光二抗(兔抗或鼠抗)室温避光孵育1 h; 洗膜, 在Odyssey红外显像系统中成像并进行分析, 目的基因相对表达量以目的基因灰度值与GAPDH灰度值的比值表示。

1.6.2 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 取各组对数生长期细胞, 常规消化、离心后制备成细胞悬液, 调整细胞密度为5 \times 10⁵个/ml, 接种于6孔板中, 24 h后用无菌枪头垂直划线; PBS洗涤3次, 加入无胎牛血清培养液, 于0、24 h在倒置显微镜下观察细胞向划痕中间迁移的距离并拍照, 利用ImageJ软件测量划痕区域宽度, 计算细胞迁移百分率。每组设置3个复孔。细胞迁移百分率(%)=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 \times 100%。

1.6.3 Transwell实验检测细胞侵袭能力 取各组对数生长期细胞悬液, 加入Transwell小室的上室(1 \times 10⁵个/小室), 小室上铺胶检测侵袭能力; 下室加入600 μ l含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液, 常规培养48 h; PBS清洗, 结晶紫染色, 倒置相差显微镜下观察并拍照, 随机选取5个视野, 计数穿膜细胞数。

1.7 统计学处理 应用SPSS 21.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本t检验, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用LSD检验; 计数资料以率(%)表示, 组间

比较采用 χ^2 检验。生存分析采用Kaplan-Meier法,通过log-rank法进行生存率差别检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FOXP3在乳腺癌组织中的表达及其与临床病

理特征的关系 免疫组化检测结果显示,FOXP3在乳腺癌组织中呈弥漫性分布,少数病例呈灶性分布。FOXP3在激素受体阳性乳腺浸润性导管癌实质的细胞核和细胞质均有表达(图1、表1),其中细胞质FOXP3阳性表达率为54.6%(36/66),细胞核FOXP3阳性表达率为40.9%(27/66)。

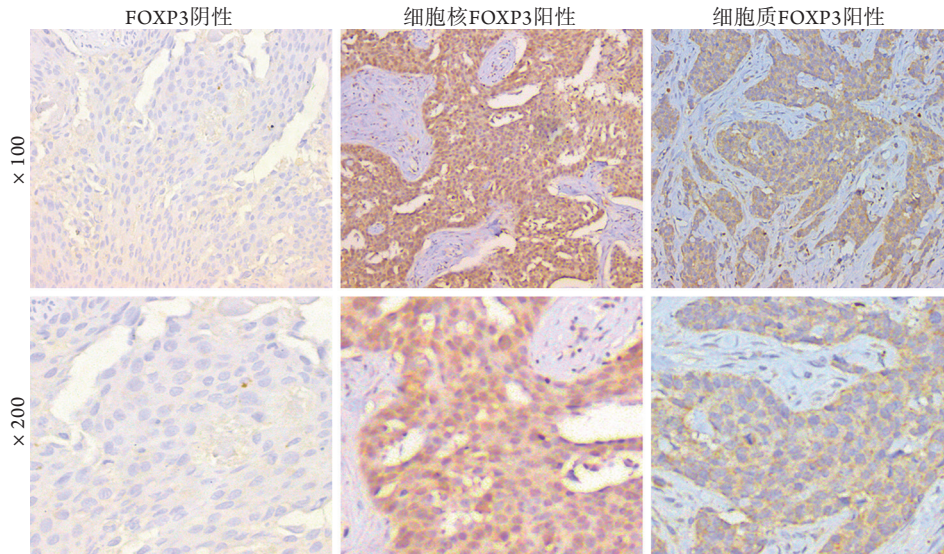


图1 免疫组化检测激素受体阳性乳腺癌组织中FOXP3的表达情况

Fig.1 Immunohistochemical detection of FOXP3 staining in hormone receptor positive breast cancer tissues

根据FOXP3在细胞核和细胞质中的表达情况,分析FOXP3表达与患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、TNM分期、组织学分级、脉管瘤栓、Ki-67表达及Luminal分型的关系,结果显示,细胞核FOXP3在Luminal A型、无淋巴结转移、Ki-67低表达及TNM分期I期乳腺癌患者中阳性表达率较高($\chi^2=10.154$, $P=0.001$; $\chi^2=5.516$, $P=0.019$; $\chi^2=5.649$, $P=0.017$; $\chi^2=8.781$, $P=0.012$)。细胞质FOXP3阳性表达率在各临床病理分组中差异均无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

2.2 FOXP3表达与激素受体阳性乳腺癌预后

的关系 66例激素受体阳性乳腺癌患者中,61例随访资料完整,死亡8例,失访5例,随访率92.4%(61/66);中位随访约10年(121个月),总生存率为87.88%(58/66)。对FOXP3细胞核和细胞质表达患者进行Kaplan-Meier生存分析,结果显示,细胞核FOXP3阳性组总生存率明显高于细胞核FOXP3阴性组[96.30%(26/27) vs. 82.05%(32/39), $\chi^2=4.147$, $P=0.042$],细胞质FOXP3阳性组与细胞质FOXP3阴性组总生存率差异无统计学意义[88.89%(32/36) vs. 86.67%(26/30), $\chi^2=0.133$, $P=0.715$, 图2]。

2.3 乳腺癌细胞系FOXP3表达及si-FOXP3敲低

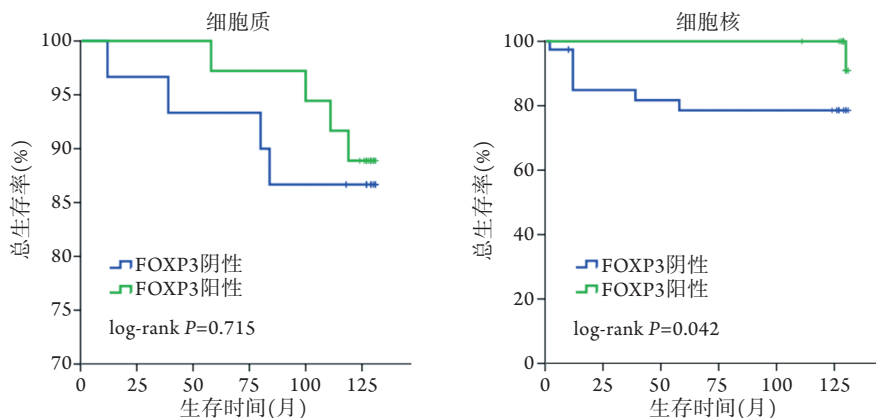


图2 FOXP3表达与激素受体阳性乳腺癌患者预后的关系

Fig.2 Relationship of FOXP3 expression with prognosis of patients with hormone receptor positive breast cancer

表1 FOXP3在激素受体阳性乳腺癌组织中的表达与临床病理特征的关系[例(%)]

Tab.1 Relationship of FOXP3 expression in hormone receptor positive breast cancer tissues with clinicopathologic parameters [n(%)]

临床病理参数	细胞质		χ^2	P	细胞核		χ^2	P
	FOXP3阴性组 (n=30)	FOXP3阳性组 (n=36)			FOXP3阴性组 (n=39)	FOXP3阳性组 (n=27)		
年龄(岁)			3.383	0.066			0.548	0.459
<50	16(53.3)	27(75.0)			24(61.5)	19(70.4)		
≥50	14(46.7)	9(25.0)			15(38.5)	8(29.6)		
肿瘤大小(cm)			0.002	0.964			0.895	0.344
≤2.0	19(63.3)	23(63.9)			23(59.0)	19(70.4)		
>2.0	11(36.7)	13(36.1)			16(41.0)	8(29.6)		
淋巴结转移			0.203	0.652			5.516	0.019
否	15(50.0)	20(55.6)			16(41.0)	19(70.4)		
是	15(50.0)	16(44.4)			23(59.0)	8(29.6)		
TNM分期			2.725	0.256			8.781	0.012
I	8(26.7)	15(41.7)			8(20.5)	15(55.6)		
II	16(53.3)	18(50.0)			24(61.5)	10(37.0)		
III	6(20.0)	3(8.3)			7(17.9)	2(7.4)		
组织学分级			1.667	0.435			0.731	0.694
1	4(13.3)	8(22.2)			8(20.5)	4(14.8)		
2	22(73.3)	23(63.9)			25(64.1)	20(74.1)		
3	4(13.3)	5(13.9)			6(15.4)	3(11.1)		
脉管瘤栓			0.554	0.457			0.183	0.669
无	20(66.7)	27(75.0)			27(69.2)	20(74.1)		
有	10(33.3)	9(25.0)			12(30.8)	7(25.9)		
Ki-67			0.100	0.752			5.649	0.017
低表达	13(43.3)	17(47.2)			13(33.3)	17(63.0)		
高表达	17(56.7)	19(52.8)			26(66.7)	10(37.0)		
Luminal分型			0.275	0.600			10.154	0.001
A型	9(30.0)	13(36.1)			7(17.9)	15(55.6)		
B型	21(70.0)	23(63.9)			32(82.1)	12(44.4)		

效率检测结果 qRT-PCR检测结果显示, MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-474、BR-3和MCF-7乳腺癌细胞系及PBMC中FOXP3 mRNA相对表达水平分别为 0.88 ± 0.03 、 0.64 ± 0.11 、 3.96 ± 0.14 、 3.58 ± 0.27 、 13.21 ± 0.61 、 162.37 ± 11.78 , 数据符合正态分布, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。MCF-7乳腺癌细胞FOXP3 mRNA相对表达水平高于MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-474、BR-3细胞($P < 0.05$), 后续实验选择MCF-7乳腺癌细胞系。

qRT-PCR检测si-FOXP3敲低效率, 结果显示, si-FOXP3转染组FOXP3 mRNA表达水平明显低于si-NC转染组和空白对照组(0.49 ± 0.10 vs. 1.03 ± 0.08 vs. 0.90 ± 0.04), 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

采用Western blotting在蛋白水平检测si-FOXP3敲低效率, 结果显示, si-FOXP3转染组FOXP3蛋白

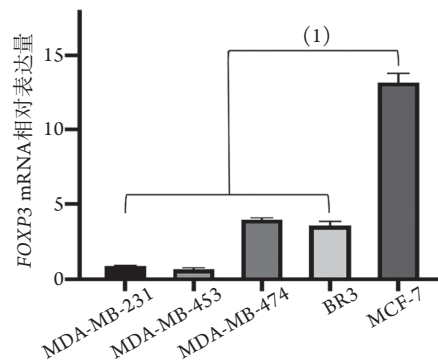


图3 qRT-PCR检测不同乳腺癌细胞系中FOXP3 mRNA的表达

Fig.3 Expression of FOXP3 mRNA in breast cancer cell lines detected by qRT-PCR

(1) $P < 0.01$

相对表达水平明显低于si-NC转染组和空白对照组(0.15 ± 0.03 vs. 1.02 ± 0.05 vs. 1.07 ± 0.09), 数据符合

正态分布, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$, 图4), 表明FOXP3在MCF-7细胞中被成功沉默。

2.4 敲低FOXP3对MCF-7乳腺癌细胞迁移、侵袭能力的影响 划痕实验结果显示, si-FOXP3转染组细胞迁移百分率为 $38.12\% \pm 3.87\%$, 明显高于空白对照组($17.82\% \pm 8.61\%$)和si-NC转染组($18.76\% \pm 7.17\%$), 差

异有统计学意义($P < 0.05$, 图5)。

Transwell实验结果显示, si-FOXP3转染组穿膜细胞数为(61.67 ± 8.17)个, 明显多于空白对照组[(25.56 ± 5.74)个]和si-NC转染组[(32.56 ± 7.24)个], 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图6)。

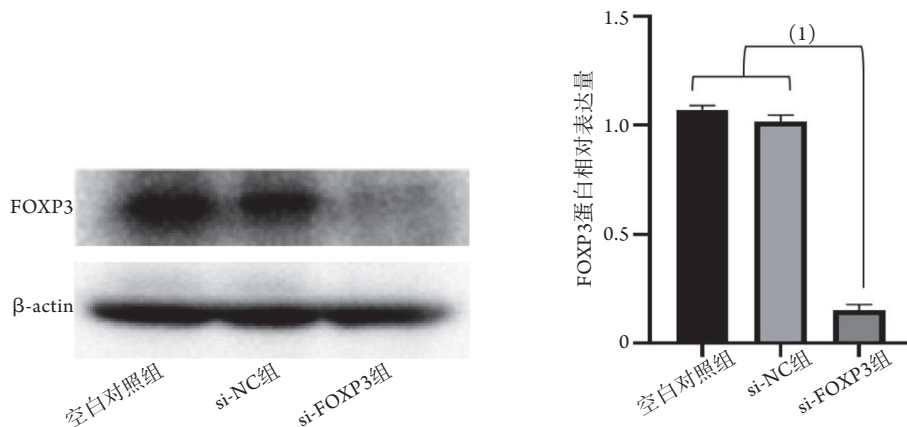


图4 沉默FOXP3表达对乳腺癌MCF-7细胞FOXP3蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of silencing FOXP3 on FOXP3 protein expression in breast cancer MCF-7 cells (1) $P < 0.01$

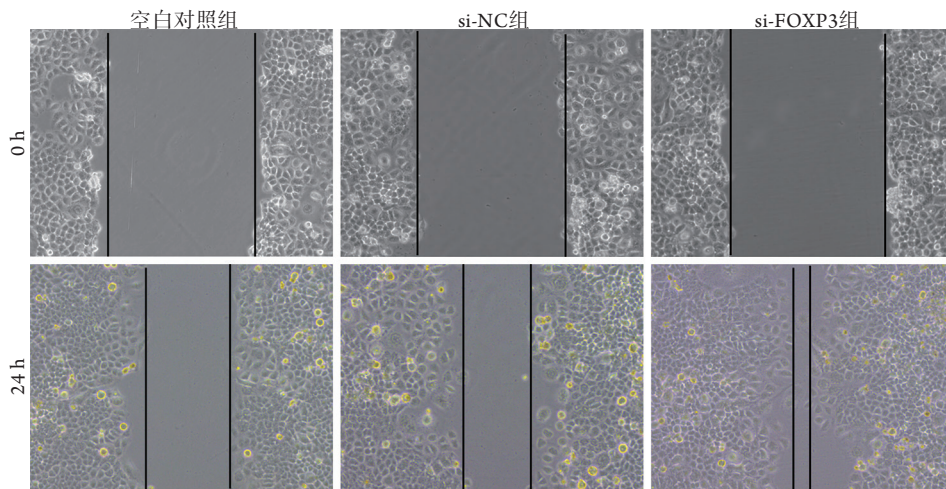


图5 划痕实验检测沉默FOXP3对乳腺癌MCF-7细胞迁移的影响($\times 200$)

Fig.5 Effect of silencing FOXP3 on migration of breast cancer MCF-7 cells detected by cell scratch test ($\times 200$)

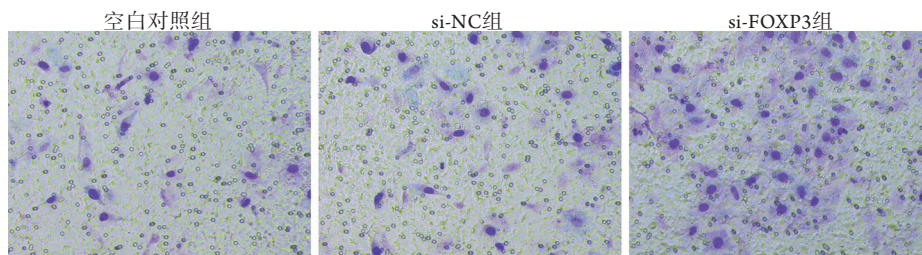


图6 Transwell实验检测沉默FOXP3对乳腺癌MCF-7细胞侵袭的影响($\times 200$)

Fig.6 Effects of silencing FOXP3 on invasion of breast cancer MCF-7 cells detected by Transwell test ($\times 200$)

3 讨 论

激素受体阳性乳腺癌是女性最常见的乳腺癌分

子分型之一, 通常对内分泌治疗有效^[12], 但若发生远处转移和耐药, 将无法治愈。转移仍是肿瘤患者死亡的最主要原因, 而约10%的乳腺癌患者在确诊

时已发生转移^[13]。因此,深入研究乳腺癌侵袭、转移的机制非常重要,其中转录因子驱动乳腺癌发展的信号逐级传递网络得到了广泛研究。作为X-连锁转录因子,FOXP3表达异常可导致一系列癌基因和抑癌基因的表达紊乱,从而促进肿瘤的发生、发展、侵袭和转移。但目前FOXP3在乳腺癌中表达的意义仍存在矛盾和争议,具体分子机制尚未明确。

本研究采用免疫组化从蛋白水平进行检测发现,FOXP3在激素受体阳性乳腺癌组织细胞核和细胞质中均有表达;对其表达部位分别进行分析发现,细胞核FOXP3在无淋巴结转移、Ki-67低表达、Luminal A型和TNM分期I期乳腺癌组织中阳性表达率较高,而细胞质FOXP3在各临床病理分组中表达无明显差异;生存分析发现,乳腺癌中不同表达部位的FOXP3具有不同的预后价值,FOXP3在细胞核中发挥抑癌作用,而细胞质FOXP3并无此作用,提示FOXP3作为转录因子,在细胞核中才可发挥抑癌调控作用,这与Takenaka等^[14]的研究结果相似。体外细胞学实验发现,FOXP3 mRNA相对表达水平在MCF-7细胞系中最高,通过转染si-FOXP3敲低FOXP3后,MCF-7细胞的迁移和侵袭能力明显增强,表明FOXP3在乳腺癌细胞中发挥抑癌基因的作用。目前多项体外研究发现,野生型FOXP3可抑制HER2、SKP2、SATB1、Runx1等原癌基因的转录^[15-16]。但本研究未发现FOXP3在Luminal B⁺(HER2阳性)和Luminal B⁻(HER2阴性)组间的表达差异及其预后意义的差别,可能与样本量较小或Luminal B⁺患者未进行标准靶向治疗有关,后续将扩大样本量进一步分析HR⁺HER2⁺与HR⁺HER2⁻的差异,并通过多种细胞系及动物实验对其信号转导通路等分子机制进行深入研究。Zhang等^[17]发现,FOXP3可通过下调乳腺癌细胞中细胞黏附分子CD44的表达来抑制乳腺癌细胞的黏附、侵袭和转移。另有研究发现,FOXP3作为转录因子可调控TP53^[18]和CXCR4^[19]等基因靶点,从而影响细胞周期、DNA修复等过程;或通过FOXP3-KAT2B轴^[20]调节miR-141和miR-200c的表达或FOXP3-BRCA1-miR-155轴^[21]来参与乳腺癌的发生和发展进程。FOXP3亦可通过下调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达来抑制肿瘤血管的形成^[22],或通过下调NCKAP1的表达抑制乳腺癌转移^[23]。

目前多数学者认为,FOXP3属于乳腺癌抑癌基因,但不同表达部位的FOXP3具有不同的预后价值:FOXP3在细胞核中发挥抑癌作用,而细胞质FOXP3并无此作用。细胞质FOXP3失活可能是因为FOXP3的FKH区发生基因突变、缺失,受转录调节、表观遗传、翻译后修饰等复杂调控,导致

FOXP3蛋白未定位到细胞核而仅表达在细胞质中,继而丧失抑癌活性^[24-25]。Gao等^[26]的研究发现,胞核半乳糖凝集素(galectin-1, Gal-1)可与FOXP3的FKH区结合,使FOXP3无法正常调控下游基因,继而丧失其原本的抑癌作用。但尚有待更多的研究深入探讨FOXP3作为抑癌基因参与乳腺癌侵袭转移的信号转导通路及其失活机制。

综上所述,本研究发现,FOXP3在激素受体阳性乳腺浸润性导管癌中的预后意义与表达部位相关,细胞核FOXP3可提高乳腺癌总生存率,但细胞质FOXP3的预后意义尚不明确。不同表达部位的FOXP3的作用不同,可能与基因突变、缺失、翻译后修饰或基因启动子区CpG岛异常甲基化等表观遗传学修饰等机制相关,后续可通过免疫荧光、核质分离实验、基因全编码序列的突变检测、基因启动子区甲基化状态检测等进行深入探讨。本研究体外细胞学实验仅证实了FOXP3在MCF-7乳腺癌细胞株中的抑癌作用,而FOXP3作为抑癌基因在乳腺癌中的具体作用机制及其失活机制有待更多的体内、体外实验深入研究,FOXP3有望成为激素受体阳性乳腺癌新的分子标志物及治疗靶点。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Burstein HJ. Systemic therapy for estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 383(26): 2557-2570.
- [3] Delaloge S, Antoine A, Debled M, et al. 279MO Divergent evolution of overall survival across metastatic breast cancer (MBC) subtypes in the national ESME real life cohort 2008-2016[J]. Ann Oncol, 2020, 31(Suppl 4): S352-S353.
- [4] Cao ZY, Zhang QJ, Wu YJ, et al. Clinical effect of breast-conserving surgery in early triple negative breast cancer[J]. Med J Chin PLA, 2020, 45(9): 986-989. [曹志宇, 张庆军, 吴有军, 等. 早期三阴性乳腺癌保乳手术治疗的临床效果[J]. 解放军医学杂志, 2020, 45(9): 986-989.]
- [5] Cejalvo JM, Pascual T, Fernández-Martínez A, et al. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2018, 67: 63-70.
- [6] Giuliano M, Schettini F, Rognoni C, et al. Endocrine treatment versus chemotherapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, HER2-negative, metastatic breast cancer: A systematic review and network meta-analysis[J]. Lancet Oncol, 2019, 20(10): 1360-1369.
- [7] A Di Lai AS, Zhao J, Yuan Y. Research progress on the mechanism of resistance in endocrine therapy for breast cancer[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(7): 702-709. [阿迪莱·艾萨, 赵菁, 袁瑛. 乳腺癌内分泌治疗耐药机制的研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(7): 702-709.]

- [8] Wang Y, Qiu W, Liu N, *et al.* Forkhead box K1 regulates the malignant behavior of gastric cancer by inhibiting autophagy[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(4): 107.
- [9] Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, *et al.* FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(1): 30-35.
- [10] Lin SC, Gan ZH, Yao Y, *et al.* The prognostic value of forkhead box P3 expression in operable breast cancer: A large-scale meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136374.
- [11] Breast Cancer Professional Committee of Chinese Anti-Cancer Society. Guidelines and norms for diagnosis and treatment of breast cancer by Chinese Anti-cancer Association 2021[J]. *China Oncology*, 2021, 31(10): 954-1040. [中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2021年版)[J]. *中国癌症杂志*, 2021, 31(10): 954-1040.]
- [12] Guo JB, Qian HL, Ma F, *et al.* Clinicopathological characteristics and prognosis of breast cancer patients with a history of endometrial cancer[J]. *Med J Chin PLA*, 2020, 45(1): 92-96. [郭建宾, 钱海利, 马飞, 等. 子宫内膜癌患者再发乳腺癌的临床病理特征及预后分析[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(1): 92-96.]
- [13] Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, *et al.* 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5)[J]. *Ann Oncol*, 2020, 31(12): 1623-1649.
- [14] Takenaka M, Seki N, Toh U, *et al.* FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis[J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1(4): 625-632.
- [15] McInnes N, Sadlon TJ, Brown CY, *et al.* FOXP3 and FOXP3-regulated microRNAs suppress SATB1 in breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2012, 31(8): 1045-1054.
- [16] Recouvreux MS, Grasso EN, Echeverria PC, *et al.* RUNX1 and FOXP3 interplay regulates expression of breast cancer related genes[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 6552-6565.
- [17] Zhang C, Xu Y, Hao Q, *et al.* FOXP3 suppresses breast cancer metastasis through downregulation of CD44[J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(6): 1279-1290.
- [18] Won KY, Kim HS, Sung JY, *et al.* Tumoral FOXP3 has potential oncogenic function in conjunction with the p53 tumor suppressor protein and infiltrated Tregs in human breast carcinomas[J]. *Pathol Res Pract*, 2013, 209(12): 767-773.
- [19] Douglass S, Meeson AP, Overbeck-Zubrzycka D, *et al.* Breast cancer metastasis: Demonstration that FOXP3 regulates CXCR4 expression and the response to CXCL12[J]. *J Pathol*, 2014, 234(1): 74-85.
- [20] Zhang G, Zhang W, Li B, *et al.* MicroRNA-200c and microRNA-141 are regulated by a FOXP3-KAT2B axis and associated with tumor metastasis in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 73.
- [21] Gao S, Wang Y, Wang M, *et al.* MicroRNA-155, induced by FOXP3 through transcriptional repression of, BRCA1, is associated with tumor initiation in human breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 41451-41464.
- [22] Li X, Gao Y, Li J, *et al.* FOXP3 inhibits angiogenesis by downregulating VEGF in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 744.
- [23] Han J, Zhang C, Hu YL, *et al.* FOXP3 inhibits breast cancer metastasis by down-regulating NCKAP1[J]. *J Shanxi Med Univ*, 2020, 51(3): 191-197. [韩俊, 张存, 胡艳立, 等. FOXP3通过下调NCKAP1的表达抑制乳腺癌转移[J]. *山西医科大学学报*, 2020, 51(3): 191-197.]
- [24] Buchynska LG, Iurchenko NP, Verko NP, *et al.* FOXP3 gene promoter methylation in endometrial cancer cells[J]. *Exp Oncol*, 2015, 37(4): 246-249.
- [25] Wang CM, Yang WH, Liu R, *et al.* UBC9FOXP3 activates SUMO-conjugating gene in MCF7 breast cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): E2036.
- [26] Gao Y, Li X, Shu Z, *et al.* Nuclear galectin-1-FOXP3 interaction dampens the tumor-suppressive properties of FOXP3 in breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(4): 416.

(责任编辑: 纪方方)