

乳腺癌组织中 RunX2 基因的表达水平及临床意义分析

胡 滨^{1,2} 范楚苓¹ 徐晓军^{1,3} 赵 明¹ 刘亚坤¹ 李菲菲¹

摘要 目的 探讨乳腺癌和癌旁组织中核心结合因子 (RunX2) 基因的表达差异及其与乳腺癌患者的临床特征和预后的关系。方法 选择 75 例乳腺癌患者癌组织标本,所有患者术前未经放疗和化疗,采用免疫组化法检测乳腺癌组织和癌旁组织 RunX2 的表达情况。分析乳腺癌患者 RunX2 基因的表达与年龄、病理分型、术后分期、淋巴转移、肿瘤大小、雌激素受体 (ER) 表型、孕激素受体 (PR) 表型、人类表皮生长因子 2 (HER2) 表型、ki67 表达水平以及生存率的关系。结果 75 例患者的癌组织中有 44 例乳腺癌组织高表达 RunX2, 31 例组织低表达 RunX2; 而癌旁组织仅 23 例高表达, 52 例均表达较低。癌组织和癌旁组织中 RunX2 的表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RunX2 基因的表达高低与患者年龄、术后分期、淋巴结转移、病理类型、PR 表型、HER2 表型无明显相关性,但是与患者的 ER 表型和 ki67 表达相关 ($P < 0.05$), 并且高表达 RunX2 患者术后 3 年的总体生存率较低表达患者差。结论 乳腺癌组织中 RunX2 基因高表达与患者的 ER 表型和临床预后呈正相关性,进一步证实了 RunX2 在乳腺癌发生发展中起到重要作用。

关键词 乳腺癌; RunX2; 雌激素受体; 临床预后

中图分类号 R 365

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)09-1356-04

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,全球每年约有 170 万新发病例,约 50 万人死亡,居癌症发生率和死亡率的首位^[1]。RunX2 又称核心结合因子 (core binding factor- α , RunX2), 属于 runt 域基因家族,是一种参与骨髓间质干细胞成骨分化和骨发育的重要转录因子^[2]。研究^[3-4]表明 RunX2 和多种肿瘤的发生密切相关,已被证明在成骨与骨肉瘤的发生发展过程中起重要作用,是骨髓间质干细胞成骨分化和骨发育的重要转录因子,通过促进溶骨

作用、促进肿瘤血管新生等多个途径转移癌细胞的生长。除了骨组织外,乳腺是 RunX2 的表达量最高的组织之一,报道^[5]显示在临床预后差的乳腺癌中异常高表达,为进一步了解 RunX2 与乳腺癌之间的关系,该研究采用免疫组化法检测 RunX2 基因在乳腺癌和癌旁正常组织中的表达情况,并且分析其表达与年龄、病理分型、术后分期、淋巴转移、肿瘤大小、雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 表型、孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 表型、人类表皮生长因子 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 表型、ki67 表达水平以及生存率的关系。为进一步揭示 RunX2 与乳腺癌的发生、发展和预后之间联系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2009 年 1 月~2012 年 12 月间于安庆市第一人民医院胃肠甲乳外科及安徽医科大学第一附属医院乳腺外科确诊为乳腺癌患者的乳腺癌组织标本 75 例。所有患者为女性,年龄 33~81 (65.60 \pm 0.78) 岁。术前未行放疗和化疗。术后分期 I~II 期 39 例, III~IV 期 36 例。导管浸润癌 53 例,非导管浸润癌 22 例。有淋巴结转移 42 例,无淋巴结转移 33 例。75 例乳腺癌组织中, ER 阳性 34 例, PR 阳性 36 例, HER2 阳性 39 例, ki67 高表达 46 例。

1.2 免疫组化 采用 SP 法将肿瘤固定后,脱水,制成蜡块,标本蜡块连续切片,确保切片厚度不大于 2 μ m,常规二甲苯脱蜡,使用 H₂O₂ 去离子水消除内源性过氧化物酶活性, PBS 冲洗 2 次,一抗 1:500 配置, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,孵育结束后使用 PBS 清洗 3 次,室温使用与一抗对应二抗孵育 15~20 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,辣根酶标记链霉素卵白素工作液滴加至标本,室温孵育 15 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min, DAB 显色,使用苏木精染色,然后盐酸乙醇分化,酒精按梯度脱水,二甲苯透明后,封片,至显微镜下观察,拍照分析。

1.3 结果判定 采用双盲法阅片,细胞染色成棕黄

2016-06-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81302319)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

²安庆市第一人民医院胃肠甲乳外科, 安庆 246004

³安徽医科大学第一附属医院乳腺外科, 合肥 230022

作者简介: 胡 滨, 男, 主治医师, 硕士研究生;

李菲菲, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

13965021937@163.com

表1 RunX2 表达水平高低和乳腺癌患者临床病理特征的关系(n)

项目	RunX2 高表达	RunX2 低表达	χ^2 值	P 值
年龄(<50岁/≥50岁)	16/28	11/20	7.82	0.530
病理分型(导管浸润型/非导管浸润型)	38/6	15/16	11.46	0.082
术后分期(I~II期/III~IV期)	21/23	18/13	9.63	0.226
淋巴转移(有/无)	25/19	17/14	12.36	0.078
肿瘤大小(<20cm/21~50cm/>50cm)	21/15/8	13/10/8	5.89	0.892
ER表型(ER+/ER-)	16/28	18/13	15.51	0.027
PR表型(PR+/PR-)	20/24	16/15	12.29	0.076
HER2表型(HER2+/HER2-)	21/23	18/13	8.98	0.227
ki67表达(低/高)	8/36	21/10	17.47	0.019

色为阳性细胞。RunX2 基因阳性染色主要定位在细胞核。根据阳性细胞个数占整个肿瘤细胞的百分率计分, <5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, >75% 为 4 分。再根据阳性细胞染色深浅计分, 不着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分, 最后将两者分数相乘, 0 分为阴性(-), 1~4 分为阳性(+), 5~8 分为弱阳性(++), 9~12 分为强阳性(+++), 以(-)和(+)视为阴性/低表达, (++)以上表达者视为高表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。临床指标相关性分析采用 χ^2 检验, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析生存率差异。

2 结果

2.1 癌组织和癌旁组织中 RunX2 基因的表达水平分析 75 例乳腺癌组织中有 44 例乳腺癌组织中 RunX2 高表达, 高表达率为 58.7%; 31 例阴性/低表达, 阴性/低表达率 41.3%。与此同时, 癌旁组织中 23 例高表达, 52 例阴性/低表达, χ^2 检验表明癌组织和癌旁组织 RunX2 高表达率明显增加 ($\chi^2 = 14.67, P < 0.05$)。

2.2 RunX2 基因的表达与乳腺癌临床病理特征和患者预后的关系 RunX2 基因的表达与乳腺癌患者的年龄、术后分期、病理类型、淋巴结转移间差异无统计学意义。在分子表型上, RunX2 基因的表达与乳腺癌组织中 ER 表型及 ki67 的表达相关(图 2), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与 PR、HER2 的表达差异无统计学意义, 见表 1。

75 例乳腺癌患者术后均接受化疗, 其中 49 例可作生存期分析。Log-Rank 检验显示 49 例患者 RunX2 高表达和低表达患者术后 3 年总生存率分别为 70% (95% 置信区间: 0.51 ~ 0.83) 和 43% (95%

置信区间: 0.32 ~ 0.54), Log-Rank 检验分析显示 RunX2 高、低表达组在生存过程中存在明显差异 ($\chi^2 = 27.99, P < 0.05$) (图 3), 高表达组患者总体预后较差。

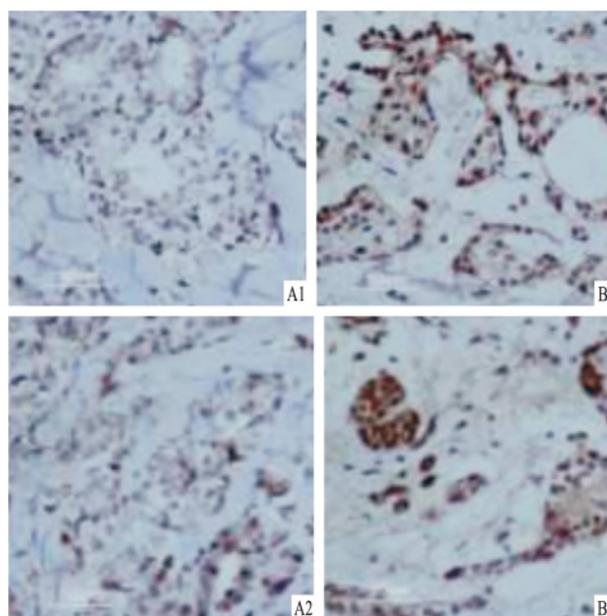


图1 免疫组化法检测患者乳腺癌组织和癌旁组织中 RunX2 的表达水平 $\times 20$
A: 癌旁组织; B: 乳腺癌组织; 1、2 代表两个不同的患者组织

3 讨论

研究^[6]显示 RunX2 为骨母细胞特异性转录因子, 在骨母细胞的发育、分化和骨形成过程中起着重要的作用。随后的一系列研究^[7-8]表明 RunX2 在多种肿瘤的发生发展中也发挥了重要作用, 已被证明在成骨与骨肉瘤的发生发展过程中起重要作用, 通过促进溶骨作用对肿瘤血管新生等多个途径促进癌细胞的生长转移。尤其是近年来 RunX2 被证明与乳腺癌的发展密切相关, 多个研究^[9-10]均报道在临

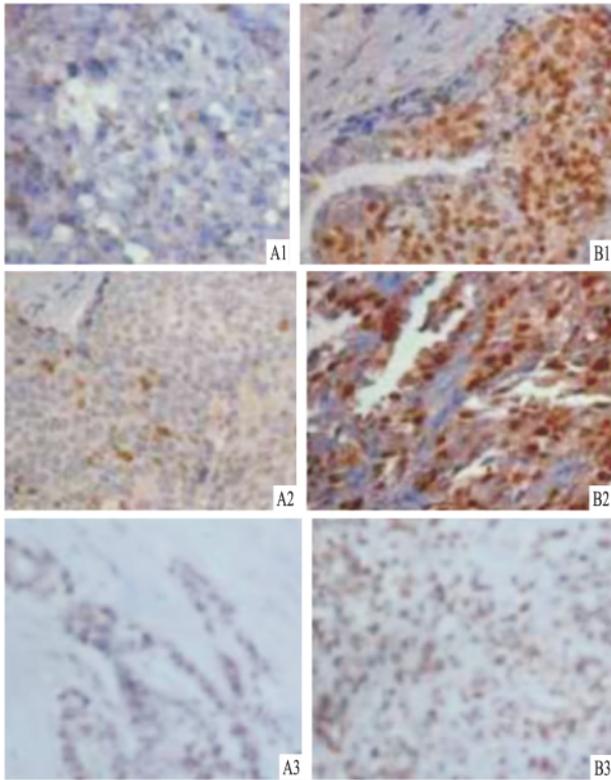


图2 免疫组化分析不同乳腺癌患者组织中 ER、ki67 与 RunX2 表达的相关性 ×40

A: 低表达 RunX2 的患者; B: 高表达 RunX2 的患者; 1: ER; 2: ki-67; 3: RunX2

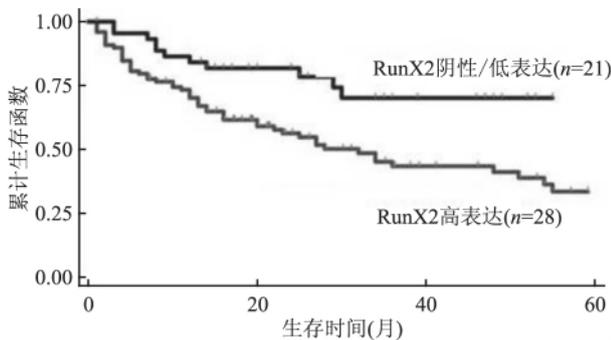


图3 49 例患者 RunX2 表达水平相关的生存曲线分析

床预后差的乳腺癌中 RunX2 高表达,并且可能与乳腺癌的 ER、PR 和 HER2 分子亚型密切相关。但是 RunX2 的表达水平、与临床病理特征的关系以及对患者预后的影响的研究一直不确切。这使得是否能将 RunX2 作为诊断、治疗和预后的分子标记物等带来了争议。

本研究通过对 75 例乳腺癌患者组织的检测,结果显示癌组织中有 44 例高表达 RunX2、31 例组织

低表达 RunX2;而癌旁组织仅 23 例高表达、52 例均表达较低。癌组织和癌旁组织中 RunX2 的表达差异有统计学意义。这一结果进一步支持了 RunX2 表达上调与乳腺癌的发生发展相关。随后对 RunX2 基因的表达高低与患者的临床病理特征进行分析,结果显示在这 75 例患者中 RunX2 表达水平与年龄、术后分期、淋巴结转移、病理类型无明显相关性,但是与患者的 ER 表型和患者术后生存率相关。ER 是乳腺细胞生长、分化的重要调节因子,雌激素信号通路参与乳腺上皮细胞增殖和分化,特异性表达雌激素信号通路,增加细胞增殖率,提高了患乳腺癌的风险^[11-12]。ER 的表达量为乳腺癌治疗和判断预后的重要指标,因此了解 ER 信号的调控对于乳腺癌发病和预后机制的阐明至关重要。研究^[13]表明,在 ER 阳性乳腺癌组织中,ER mRNA 的表达量明显升高,而且 ER 突变率也明显增加,ER 对雌激素的敏感性增强,诱发乳腺癌。研究^[14]表明,ERs 通过雌激素活化后引发的细胞内级联信号反应,包括胰岛素样生长因子受体(IGFR)活化,产生基质金属蛋白酶,进而使肝素结合样生长因子(HB-EGF)释放。激活 EGFR 诱导 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)信号通路。但是 ER 信号通路为何异常活化,机制尚不清楚。本研究显示 RunX 表达与 ER 表达相关,这进一步支持了 RunX2 对乳腺癌发生发展具有重要影响作用。与此同时,也提示,作为一种重要的转录因子,RunX2 可能参与了 ER 的调节,具体调节机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome[J]. Epigenetics, 2011, 6(7): 804-19.

[2] Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development[J]. J Cell Biochem 2011, 112(3): 750-5.

[3] Mego M, Mani S A, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications [J]. Nat Rev Clin Oncol 2010, 7(12): 693-701.

[4] Barnes G L, Javed A, Waller S M, et al. Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells[J]. Cancer Res 2003, 63(10): 2631-7.

[5] Chingme N O, Baniwal S K, Little G H, et al. Regulation of breast cancer metastasis by Runx2 and estrogen signaling: the role of SNAI2[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(6): R127.

[6] Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, et al. Runx2 in human breast car-

- cinoma: its potential roles in cancer progression [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2670–5.
- [7] Ding M, Lu Y, Abbassi S, et al. Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(10): 3446–56.
- [8] Dave B, Mittal V, Tan N M, et al. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance [J]. *Breast Cancer Res* 2012, 14(1): 202.
- [9] Huang T H, Morrison S L. A trimeric anti-HER2/neu ScFv and tumor necrosis factor- α fusion protein induces HER2/neu signaling and facilitates repair of injured epithelia [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 316(3): 983–91.
- [10] Reddy S D, Ohshiro K, Rayala S K, et al. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions [J]. *Cancer Res* 2008, 68(20): 8195–200.
- [11] Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, et al. MicroRNA expression analysis in triple-negative (ER, PR and Her2/neu) breast cancer [J]. *Cell Cycle* 2011, 10(3): 507–17.
- [12] Webster R J, Giles K M, Price K J, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7 [J]. *J Biol Chem* 2009, 284(9): 5731–41.
- [13] Tong J S, Zhang Q H, Wang Z B, et al. ER- α 36, a novel variant of ER- α , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKC δ /ERK pathway [J]. *PLoS One*, 2010, 5(11): e15408.
- [14] Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization [J]. *Nature* 2011, 481(7379): 85–9.

RunX2 expression level and its association with clinical characteristics in patients with breast cancer

Hu Bin^{1,2}, Fan Chuling¹, Xu Xiaojun³, et al

(¹Basic Medical School of Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Gastrointestinal Thyroid Breast Surgery, The First People's Hospital of Anqing, Anqing 246004;

³Dept of Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the expression level of RunX2 gene in breast cancer patients and to investigate its relationship with patients' clinical characteristics and outcomes. **Methods** Tissue samples were selected from 75 breast cancer patients without radiation and chemotherapy before surgery. Immunohistochemistry was used to compare the expression level of RunX2 between cancer and para-carcinoma tissues. The relationship was analyzed between RunX2 expression and age, pathological type, postoperative stage, lymph node metastasis, tumor size, ER, PR, HER2 and ki67 expression and the overall survival rate. **Results** In 75 patients' tumor tissues, there were 44 cases with high expression of RunX2 in breast cancer, 31 cases with low expression of RunX2. Meanwhile, in patients' adjacent tissues, there were only 23 cases of adjacent tissues with high RunX2 expression, the rest of 52 were low or negative RunX2 expression. The expression level of RunX2 in cancer tissues and para-carcinoma tissues had significantly difference ($P < 0.05$). The expression level of RunX2 was not correlated with age, the postoperative stage, lymph node metastasis, pathologic types, PR and HER2 expression. But high RunX2 expression was significantly associated with ER and ki67 expression. Patients with high RunX2 expression had a poorer survival rate than those with negative or low expression. **Conclusion** The elevated RunX2 expression may be related to breast cancer ER phenotype and clinical outcomes. It provides further evidence that this gene might have an important, context-dependent role in breast cancer.

Key words breast cancer; RunX2; estrogen receptor; clinical outcomes