

结直肠腺癌中 RUNX3 表达与微淋巴管密度的关系及临床意义

武雪亮¹, 王立坤², 薛军¹, 屈明¹, 贾光辉¹, 赵秀芳³

摘要 应用免疫组织化学方法检测 30 例正常结直肠组织、60 例结直肠腺癌中 RUNX3 的表达水平,同时以 D2-40 为标志物,检测结直肠腺癌组织微淋巴管密度(LMVD),分析 RUNX3 和 LMVD 与临床病理参数之间的关系,并对患者进行随访,分析两者与结直肠癌预后的关系。RUNX3 蛋白在结直肠腺癌中的阳性表达率明显低于正常结直肠组织 ($P < 0.01$);结直肠腺癌中的 LMVD 值明显高于正常结直肠组织 ($P < 0.01$);RUNX3 表达水平和 LMVD 与肿瘤浸润深度、肿瘤的肝转移、淋巴结转移和 TNM 分期具有相关性 ($P < 0.01$);本组患者中 51 例接受了随访,中位生存期为 25.5 个月(7~55 个月)。多因素预后分析结果显示,RUNX3 表达、LMVD、癌灶浸润深度、TNM 分期、肝转移及淋巴结转移是影响结直肠癌患者预后的独立危险因素。

关键词 结直肠腺癌; RUNX3; 微淋巴管密度; 免疫组织化学; 预后

中图分类号 R 735.37; R 735.35

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1825-04

淋巴结转移是肿瘤发生转移的重要途径,是影响患者术后生存的重要因素之一。微淋巴管密度(lymphatic microvessel density, LMVD)作为微淋巴管新生能力的重要指标,能够反映恶性肿瘤的进展程度^[1-2]。RUNX3 是新近发现的一种抑癌基因,通过参与 TGF- β 、Wnt 信号通路传导调控细胞的增殖和凋亡。D2-40 是高表达的淋巴管特异性标记,在所有淋巴管内皮细胞标志物中特异性最高^[3-4]。本研究采用免疫组织化学法,检测正常结直肠组织、结直肠腺癌中 RUNX3 的表达,同时采用 D2-40 标记结直肠腺癌组织中 LMVD,分析 RUNX3 和 LMVD 与病理参数与患者预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料来源

收集 2009 年 12 月~2011 年 6 月

2014-06-11 接收

基金项目:河北省卫生厅科研与发展指导计划资助项目(编号:072761262);张家口市科技局指令性计划(编号:1311055D)

作者单位:河北北方学院附属第一医院¹ 血管腺体外科、² 超声医学科、³ 病理科 张家口 075000

作者简介:武雪亮,男,主治医师;

薛军,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: yfyxuejun@163.com

河北北方学院附属第一医院普外科行手术治疗且经病理证实的结直肠癌组织标本 60 例,正常组织 30 例,所选病例均无其他部位原发肿瘤,为首次诊治患者,术前未行放疗、化疗生物治疗或免疫治疗。结直肠癌患者中,男 38 例,女 22 例,年龄 42~78 (56.1 \pm 4.9) 岁;正常结直肠组织中,男 16 例,女 14 例,年龄 40~76 (54.2 \pm 5.1) 岁,两组一般资料差异无统计学意义。标本取材后,部分置于液氮中速冻,然后转到 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存;部分标本用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,用于免疫组化和原位杂交染色,共收集所有制备好的蜡块并切片,切片厚度 4 μ m。并行 HE 染色,光镜下观察做出病理诊断。

1.2 免疫组化方法及试剂 采用免疫组化(SP-9000 通用型二步法检测):鼠抗人单克隆浓缩型 RUNX3 抗体(克隆号:ab40278 R3-5G4)购于香港 Abcam 公司;单克隆鼠抗人 D2-40 抗体购于北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤按试剂盒说明书操作。采用 PBS 液代替一抗作为阴性对照,采用已知的阳性片作为阳性对照。将标本置于 80 $^{\circ}$ C 烤箱中烤片 30 min;然后脱水、水化、高压蒸汽枸橼酸缓冲液修复,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶;PBS 洗 3 次,加一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗 3 次,加二抗。DAB 工作液室温显色,显微镜下观察,苏木精复染,1% 的盐酸乙醇分化、流水冲、梯度乙醇脱水、松节油透明,树脂封片。阴性对照为 PBS 代替一抗。RUNX3 免疫组化染色以细胞核中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.3 阳性结果的判定标准 RUNX3 表达的判定:RUNX3 的阳性表达定位于细胞核,免疫组化结果判定参考 Soong et al^[5] 的方法,结合阳性细胞数和染色强度来判定结果:计算阳性细胞百分数并赋予分值 0 分: \leq 5% ,1 分:6%~25% ,2 分:26%~50% ,3 分:51%~75% ,4 分: >75%;观察染色强度并赋予分值 0 分:无着色,2 分:黄色,3 分:棕黄色。两者相乘 0 分为(-),1~4 分为(+),5~8 分为(++),9~12 分为(+++),(+~(+++)) 均视为阳性。LMVD 检测: D2-40 阳性表达定位于淋巴管内皮细胞的胞质和(或)胞膜,阳性产物为清晰的棕黄色颗

粒,用于标记并计数 LMVD。先在 40 倍显微镜下选择脉管最密集的 4 个区域(热点区),然后在 400 倍显微镜下观察着色的内皮细胞簇和单个内皮细胞标记为微淋巴管,随机计数 5 个视野的微淋巴管数,取平均值作为组织的 LMVD。由 3 名有经验的病理医师独立阅片,共同确定判定结果。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计数资料以百分率表示,RUNX3 的表达与临床病理参数关系采用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,LMVD 值与临床病理参数的关系采用 t 检验,应用 Cox 风险模型进行预后多因素分析。

2 结果

2.1 免疫组化检测 RUNX3 蛋白及 LMVD 值的情况 在 30 例癌旁正常组织中 RUNX3 的阳性表达率是 86.67%,在 60 例结直肠癌组织中 RUNX3 的阳性表达率是 38.33%。在正常黏结直肠黏膜中 RUNX3 表达阳性率明显高于结直肠癌组织中的表达,差异有统计学意义($\chi^2 = 18.83, P = 0.000$);正常结直肠组织的 LMVD 值(以 D2-40 为标记)为 4.36 ± 1.21 ,而在结直肠癌组织中为 17.32 ± 2.12 ,差异有统计学意义($t = 31.00, P = 0.000$),见图 1。

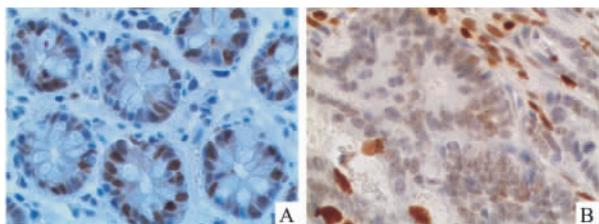


图 1 正常结直肠组织、结直肠腺癌组织中 RUNX3 的表达 SP×400
A: 正常结直肠组织; B: 结直肠腺癌组织

2.2 RUNX3 蛋白表达及 LMVD 值临床病理参数之间的关系 RUNX3 蛋白表达及 LMVD 值与患者年龄、性别、肿瘤大小、组织学类型、分化程度、病变部位等临床病理参数无关,而与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、肝转移、肿瘤的 TNM 分期有关($P < 0.01$),见表 1。

2.3 RUNX3 蛋白表达和 LMVD 与结直肠癌预后的关系 本组结直肠癌患者随访至 2013 年 8 月 1 日,期间有 9 例失访,具有完整随访资料的 51 例患者中男 32 例,女 19 例;年龄 46 ~ 71 (59.4 ± 8.1) 岁。TNM I 期 2 例、II 期 18 例、III 期 30 例、IV 期 1 例;淋巴结转移阳性者 32 例,阴性者 19 例;高分化 11 例、中分化 27 例、低分化 13 例。中位生存期为

表 1 RUNX3、LMVD 在结直肠癌组织中的表达与临床病理参数之间的关系

项目	n	RUNX3		LMVD 值	t 值	P 值
		阳性率(%)	χ^2 值			
性别						
男	38	15(39.47)	0.057	12.84 ± 1.77	1.91	0.061
女	22	8(36.36)	0.517	11.87 ± 2.09		
年龄(岁)						
<60	28	10(35.71)	0.152	17.12 ± 2.98	1.20	0.234
≥60	32	13(40.62)	0.451	16.14 ± 3.15		
肿瘤大小(cm)						
<5	35	14(40.00)	0.099	11.29 ± 2.51	1.34	0.185
≥5	25	9(36.00)	0.484	12.01 ± 1.10		
病变部位						
结肠	26	9(34.61)	0.268	15.51 ± 2.01	1.68	0.099
直肠	34	14(41.18)	0.402	14.50 ± 2.52		
组织学类型						
乳头腺癌	32	12(37.50)	0.219	12.21 ± 1.45	1.79	0.079
管状腺癌	19	8(42.11)	0.896	11.50 ± 1.21		
黏液腺癌	9	3(33.33)		12.98 ± 1.05		
浸润深度						
未及浆膜	39	21(53.85)	11.344	8.15 ± 2.14	21.43	0.000
浸及浆膜	21	2(9.52)	0.001	19.01 ± 1.21		
分化程度						
高分化	12	5(41.66)	3.005	13.05 ± 1.16	0.28	0.782
中分化	30	14(46.67)	0.217	12.95 ± 1.01		
低分化	18	4(22.22)		13.98 ± 2.05		
肝转移						
有	18	2(11.11)	8.061	19.99 ± 2.14	32.05	0.000
无	42	21(50.00)	0.005	6.51 ± 1.12		
淋巴结转移						
有	43	12(27.91)	6.979	22.05 ± 3.84	15.56	0.000
无	17	11(64.71)	0.008	7.15 ± 1.34		
TNM 分期						
I + II	38	21(52.63)	12.566	8.03 ± 1.29	21.99	0.000
III + IV	22	2(13.64)	0.000	21.98 ± 3.55		

33.5 个月(10 ~ 61 个月),1、3 年生存率分别为 91.60% 和 75.15%;多因素预后分析显示:癌灶浸润深度、肝转移、淋巴结转移、TNM 分期及 LMVD 值是影响患者预后的独立危险因素,而 RUNX3 表达水平是影响患者预后的独立保护性因素,见表 2。

表 2 51 例结直肠癌患者预后的多因素分析

危险因素	回归系数	标准误	统计值	P 值	风险比 HR	95% CI
性别	0.1322	0.5537	0.0570	0.8113	1.141	0.386 ~ 3.378
年龄	-0.2083	0.5340	0.1522	0.6965	0.812	0.285 ~ 2.312
肿瘤大小	0.1699	0.5410	0.0986	0.7535	1.185	0.410 ~ 3.422
组织学类型	-0.0241	0.3631	0.0044	0.9471	0.976	0.479 ~ 1.989
分化程度	0.1615	0.3338	0.2339	0.6286	1.175	0.611 ~ 2.261
浸润深度	2.4054	0.8098	8.8230	0.0030	11.083	2.266 ~ 54.198
淋巴结转移	1.5552	0.6109	6.4815	0.0109	4.736	1.430 ~ 15.682
TNM 分期	2.5139	0.8102	9.6271	0.0019	12.353	2.524 ~ 60.453
肝转移	2.0794	0.8110	6.5742	0.0103	8.000	1.632 ~ 39.212
RUNX3 表达	-1.6189	0.5483	8.7185	0.0032	0.198	0.068 ~ 0.580
LMVD 值	1.2392	0.6152	4.0571	0.0440	3.453	1.034 ~ 11.532

3 讨论

淋巴道转移在结直肠癌恶性肿瘤各种转移途径中占首要地位,癌组织能够使其周围淋巴管数目增加,且新生淋巴管管壁薄尚无连续的基膜,这些特性都使癌细胞进入淋巴系统致淋巴结转移成为可能^[6]。研究^[7-8]表明 D2-40 只特异性地于淋巴管内皮细胞中表达,而不在血管内皮细胞中表达,因而 D2-40 被认为是淋巴管内皮细胞特异性的标志物。

RUNX3 是由 α 、 β 亚单位构成的包含 415 个氨基酸残基的异二聚体,分子量约为 44 ku,参与细胞的分化、增殖及细胞凋亡的调控。RUNX3 能够通过 Smad3 直接结合来参与 TGF- β 信号通路从而诱导细胞的生长抑制过程;RUNX3 还可以与 Wnt 通路的关键效应器 TCF4 和 β -catenin 形成复合物,抑制 TCF4- β -catenin 与靶 DNA 的结合,从而减弱目标基因的转录^[9-10]。

本研究显示,在正常结肠组织中 RUNX3 的阳性表达率远高于结直肠癌组织中的表达;正常结肠组织的 LMVD 值远低于结直肠癌组织中 LMVD 值,提示 RUNX3 蛋白的低表达可能与结直肠癌的发生、浸润、淋巴结转移等方面具有密切相关性,RUNX3 蛋白能够抑制淋巴管的生成,使肿瘤内淋巴管密度减少,从而为抑制肿瘤的淋巴结转移提供了重要的途径。研究^[11-12]显示,肿瘤细胞通过已有的局部淋巴管转移到区域淋巴结再到广泛淋巴结,其中淋巴管内皮细胞只是起到被动作用,随着淋巴管生成因子,如 VEGF-C、VEGF-D 和淋巴管内皮特异性标志物,如 VEGFR-3、CD34、podoplanin、LYVE-1、D2-40 等的发现,肿瘤新生淋巴管已在多项研究中得到证实。

本实验结果显示:RUNX3 蛋白表达及 LMVD 值与患者性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型、分化程度、病变部位等临床病理参数无关,而与肿瘤浸润深度、淋巴结转移、肝转移、肿瘤的 TNM 分期密切相关,这与研究^[13-14]结果基本一致。通过多因素预后分析表明,高 LMVD 值的结直肠癌患者术后生存率明显低于低 LMVD 值的患者,提示 LMVD 与结直肠癌的预后密切相关。

综上所述,RUNX3 在结直肠癌中的表达与肿瘤淋巴管生成有着密切的关系,其通过抑制肿瘤新生淋巴管的生成,参与调控肿瘤的生长、浸润和淋巴结转移。RUNX3 和 LMVD 是结直肠癌患者的独立预后指标,通过检测结直肠癌患者 RUNX3 和 LMVD

的水平有助于判断肿瘤的恶性程度及进展情况,从而指导术后辅助治疗;同时,RUNX3 的抗肿瘤淋巴管生成作用以及 RUNX3 的基因治疗可能为结直肠癌治疗提供新的治疗靶点。然而,作为在多种细胞信号通路中发挥重要调控作用的 RUNX3 如何抑制肿瘤微淋巴管生成的机制尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 周柏涛,杨伟,徐小华,等.食管癌组织中环氧化酶 2 表达与微淋巴管密度的关系及其临床意义[J].中华胃肠外科杂志,2010,13(9):699-702.
- [2] Yasuoka H, Kodama R, Himkawa M, et al. Neupilin-2 expression in papillary thyroid carcinoma: correlation with VEGF-D expression, lymph node metastasis, and VEGF-D-induced aggressive cancer cell phenotype [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(11):E1857-61.
- [3] 詹彦平,吕新玲,叶尔布拉提,等.微淋巴管密度与乳腺浸润性导管癌淋巴结转移的相关性研究[J].重庆医科大学学报,2011,17(8):1246-9.
- [4] Saad R S, Kordunsky L, Liu Y L, et al. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer [J]. Mod Pathol, 2006, 19(10):1317-23.
- [5] Soong R, Shah N, Peh B K, et al. The expression of RUNX3 in colorectal cancer is associated with disease stage and patient outcome [J]. Br J Cancer, 2009, 100(5):676-9.
- [6] He Y, Rajantie I, Ilmonen M, et al. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis [J]. Cancer Res, 2004, 64(11):3737-40.
- [7] Kozhłowski M, Naumnik W, Niklifski J, et al. lymphatic vessel invasion detected by the endothelial lymphatic marker D2-40 (podoplanin) is predictive of regional lymph node status and an independent prognostic factor in patients with resected esophageal cancer [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(1):90-7.
- [8] Longatto Filho A, Oliveira T G, Pinheiro C, et al. How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? [J]. World J Surg Oncol, 2007, 5:140.
- [9] Ito K. RUNX3 in oncogenic and anti-oncogenic signaling in gastrointestinal cancers [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(5):1243-9.
- [10] 贾光辉,薛军,武雪亮,等. RUNX3、Survivin 在结直肠腺癌、腺瘤、正常黏膜中表达的临床意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(10):1228-31.
- [11] Da M X, Wu X T, Wang J, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-C correlates with lymphangiogenesis and lymphatic invasion in human gastric cancer [J]. Arch Med Res, 2008, 39(1):92-9.
- [12] Hoshida T, Isaka N, Hagendoom J, et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications [J]. Cancer Res, 2006, 66(16):8065-75.

急性心肌梗死并发室间隔穿孔的临床分析

何进舟 王爱玲 郭杰 王春苗

摘要 回顾性分析 22 例急性心肌梗死(AMI)并发室间隔穿孔(VSR)患者的临床资料特点。AMI 并发 VSR 患者多合并高血压、高脂血症、2 型糖尿病史。梗死部位以前壁或广泛前壁心肌梗死为主,部分患者合并室壁瘤形成。心功能 Killip 分级主要以心功能 II 级、III 级为主。超声心动图示室间隔缺损直径为 4~19 mm,穿孔部位大多位于室间隔近心尖部,部分为后间隔、肌部、室间隔多个穿孔,1 例合并心脏破裂。单纯内科保守治疗及主动脉内球囊反搏术支持治疗的

患者均死亡,1 例室间隔封堵术后择期行支架植入术及 4 例外科手术治疗均存活。

关键词 急性心肌梗死;室间隔穿孔;临床分析;预后

中图分类号 R 542.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1828-03

2014-07-14 接收

基金项目: 安徽省教育厅高等教育振兴计划项目(编号: 2013zdjy066);安徽省教育厅高等学校教学研究委托重大项目(编号: 2012jyzd09w)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

作者简介: 何进舟,男,硕士研究生,副主任医师;

王爱玲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wal@ah.edu.cn

室间隔穿孔(ventricular septal rupture, VSR)是急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后最严重的机械性并发症之一,一旦发生,病情非常凶险,往往很快发展至急性心力衰竭,甚至心源性休克而死亡,内科保守治疗病死率极高、预后差,介入或外科手术治疗能够挽救更多患者的生命,并且大大提高了患者的生存率,改善患者预后。因此临床工作中对于 AMI 并发 VSR 患者能够做到早期发现、尽早诊断、及时采取积极有效的治疗措施尤为重要。

[13] 严茂军,陆红梅,孙庆绪,等. RUNX3 基因甲基化在结直肠癌发生中的作用及与预后的关系[J]. 中华普通外科杂志, 2012, 27(8): 664-7.

[14] 徐卫国,王宇鹏,郭志义,等. 大肠癌组织中神经纤毛蛋白 2 的表达及其与肿瘤淋巴管生成和淋巴道转移的相关性[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(46): 3274-8.

Correlation of RUNX3 expression with microlymphatic density in colorectal adenocarcinoma tissues and its clinical significance

Wu Xueliang¹, Wang Likun², Xue Jun¹, et al

(¹Dept of Vascular Gland Surgery, ²Dept of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract The expressions of RUNX3 and LMVD in 30 specimens of normal colorectal tissues and 60 specimens colorectal adenocarcinoma tissues were detected by immunohistochemistry technique. We also investigated the correlation between their expression and the clinicopathologic features. Follow up was available in selected patients. Multivariable Cox regression was used to analyze the association between the laboratory indices and overall survival of patients with colorectal carcinoma. The positive rates of RUNX3 in colorectal adenocarcinoma tissues were significantly lower than those in normal colorectal tissues ($P < 0.01$); the positive rates of LMVD in colorectal adenocarcinoma tissues were significantly higher than those in normal colorectal tissues ($P < 0.01$). Expression of RUNX3 and LMVD value was correlated with liver metastasis, lymph node metastasis, TNM stage and the depth of tumor invasion. In the 51 patients with followed up, the median survival was 25.5 months. Cox regression showed that RUNX3 expression, LMVD, the depth of tumor invasion, TNM stage, liver metastasis, and lymph node metastasis were independent risk factors of overall survival of colorectal carcinoma.

Key words colorectal neoplasms; RUNX3; microlymphatic density; immunohistochemistry; prognosis