

Runx2 和 Slug 在乳腺癌中的表达及意义

周炳娟^{1,2}, 黄丽娟², 曹建江², 陈雪¹, 周星¹, 张金库¹, 孙哲¹

(1.保定市第一中心医院, 河北 保定 071000; 2.新疆生产建设兵团第二师库尔勒医院, 新疆 库尔勒 841000)

摘要: [目的] 探讨 Runx2 和 Slug 在乳腺癌组织中的表达及临床意义。[方法] 采用免疫组化法检测 Runx2 和 Slug 在 105 例乳腺浸润性导管癌和 105 例癌旁乳腺组织中的表达情况, 分析其与乳腺癌临床病理特征间的关系。[结果] 乳腺浸润性导管癌组织中 Runx2 及 Slug 的阳性表达率分别为 69.52% (73/105) 和 42.86% (45/105), 显著性高于癌旁乳腺组织 ($P < 0.05$)。Runx2 和 Slug 在乳腺浸润性导管癌中的表达均与 ER 呈负相关 ($r = -0.302, P < 0.01$; $r = -0.368, P < 0.01$)。Runx2 和 Slug 表达与乳腺癌的组织学分级、淋巴结转移和 pTNM 分期有关, 而与患者年龄及肿瘤大小无关。[结论] Runx2 及 Slug 可能成为预测乳腺癌恶性程度和评估乳腺癌患者预后的重要指标。

关键词: 乳腺肿瘤; Runx2; Slug; 免疫组织化学

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)07-0619-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.07.B012

Expression of Runx2 and Slug in Breast Cancer and Its Significance

ZHOU Bing-juan^{1,2}, HUANG Li-juan², CAO Jian-jiang², et al.

(1. The First Central Hospital of Baoding, Baoding 071000, China;

2. Second Hospital of Korla of Xinjiang Construction Corps, Korla 841000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of Runx2 and Slug in patients with breast cancer. [Methods] The expression of Runx2 and Slug was detected in 105 cases of primary breast invasive ductal carcinoma (IDC) and 105 cases of para-tumor breast tissues by immunohistochemistry, and the relationship between expression of Runx2 and Slug with the clinical pathological features of breast cancer was evaluated. [Results] The positive expression rates of Runx2 and Slug in IDC were 69.52% (73/105) and 42.86% (45/105) respectively, which were higher than those in para-tumor breast tissues ($P < 0.05$). The expression of Runx2 and Slug both negatively correlated with the expression of ER in IDC ($r = -0.302, P < 0.01$; $r = -0.368, P < 0.01$). Furthermore, Runx2 and Slug expression showed a significant relationship with histopathologic grade, lymph node metastasis and pTNM stage of IDC, but did not correlate with patients' age and tumor size. [Conclusion] Runx2 and Slug may be important factors to evaluate the malignant degree and assess the prognosis in patients with breast cancer.

Subject words: breast neoplasms; Runx2; Slug; immunohistochemistry

Runx2 是骨生成过程中关键的转录因子, 它不仅参与 DNA 损伤反应, 在癌症转换过程中发挥重要作用; 还能够与细胞周期调节因子相互作用, 参与多条信号转导途径^[1]。Slug 是一种具有锌指结构的转录因子, 参与调控胚胎的发育和肿瘤的发生, 在肿瘤上皮-间质转化、癌细胞侵袭、转移和干细胞样特性维持中起重要作用^[2]。

本研究采用免疫组织化学的方法检测 Runx2 及 Slug 在乳腺浸润性导管癌及癌旁乳腺组织中的表达情况, 分析其与乳腺癌临床病理特征间的关系, 以期探讨 Runx2 及 Slug 在乳腺组织癌变、转移及预后评估中的作用。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2010 年 1 月至 2015 年 12 月新疆生产建

通讯作者: 张金库, 主任, 主任医师, 硕士; 保定市第一中心医院病理科, 河北省保定市长城北大街 320 号 (071000); E-mail: zjkbk@sohu.com

收稿日期: 2016-12-07; **修回日期:** 2016-12-31

设兵团第二师库尔勒医院的乳腺病变存档石蜡切片,选取有完整临床病理资料的乳腺浸润性导管癌 105 例,癌旁乳腺组织(距肿瘤边缘 5cm 的乳腺组织) 105 例。所有乳腺癌患者均为女性,术前均未行放疗、化疗及内分泌治疗。年龄 27~69 岁,平均年龄 50.23 岁。 T_1 (直径 ≤ 2 cm)47 例, T_2 (直径 2~5cm)32 例, T_3 (直径 > 5 cm)26 例。组织学分级 I 级 36 例,II 级 43 例,III 级 26 例。无淋巴结转移(N_0)56 例,有淋巴结转移 49 例(N_1 36 例; N_2 13 例);临床分期 I 期 27 例,II 期 54 例,III 期 24 例。

1.2 试剂与方法

鼠抗人 Runx2 单克隆抗体购自台湾 Abnova 公司,鼠抗人 Slug 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。即用型快捷免疫组织化学 MaxVision™ 检测试剂盒和氨基联苯胺显色试剂盒均购自福州迈新生物生物科技有限公司。标本经 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋、4 μ m 厚连续切片、采用免疫组化 MaxVision 两步法染色(具体操作步骤参照试剂盒说明书进行),以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知 Runx2 和 Slug 阳性组织为阳性对照。

1.3 免疫组化染色结果判定

Runx2 阳性表达为棕黄色颗粒,主要位于细胞核(Figure 1)。Slug 蛋白阳性表达也为棕黄色颗粒,主要位于细胞核和细胞质(Figure 2)。采取双盲法阅片,每张切片随机选择 10 个高倍镜视野,结合阳性细胞比例和阳性细胞着色强度进行判定。Runx2:阳性细胞率 $< 10\%$ 为 0 分;阳性细胞率 11%~25%为 1 分;阳性细胞率 26%~50%为 2 分;阳性细胞率 $> 50\%$

为 3 分。Slug:阳性细胞率 $< 1\%$ 为 0 分,1%~10%为 1 分,11%~50%为 2 分, $> 50\%$ 为 3 分。无着色为 0 分;浅黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;棕褐色为 3 分。最后根据阳性细胞率与染色强度评分的乘积进行最后评分,Runx2:0 分为阴性, ≥ 1 分为阳性。Slug: ≥ 4 分为阳性,0~3 分为阴性^[3,4]。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析,计数资料采用卡方检验和 Fisher 确切概率检验,相关性采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Runx2 及 Slug 在各组的表达情况

Runx2 及 Slug 在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率分别为 69.52%(73/105)和 42.86%(45/105),在癌旁乳腺组织中的阳性表达率分别为 8.57%(9/105)和 20.95%(22/105),两者在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率明显高于癌旁乳腺组织,差异具有统计学意义($\chi^2=81.951, P=0.000; \chi^2=11.595, P=0.001$)。

2.2 Runx2 及 Slug 表达与乳腺癌临床病理特征间的关系

Runx2 及 Slug 的表达与乳腺浸润性导管癌组织学分级、淋巴结转移及 pTNM 分期相关($P < 0.05$),而与乳腺癌患者年龄及肿瘤大小无关。两者表达均与 ER 呈负相关($r=-0.302, P=0.002; r=-0.368, P=0.000$)(Table 1)。

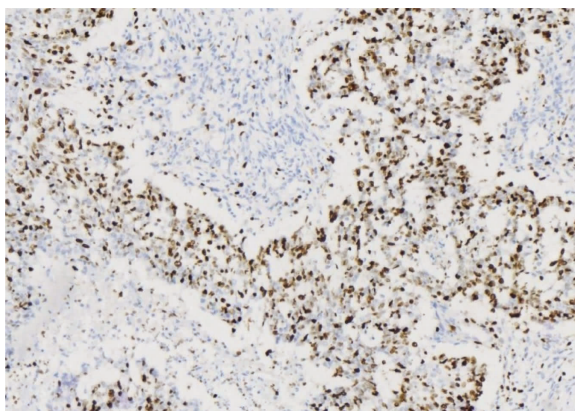


Figure 1 Positive expression of Runx2 in IDC (IHC $\times 200$)

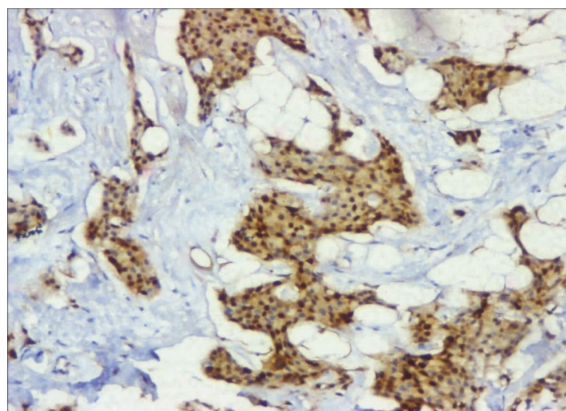


Figure 2 Positive expression of Slug in IDC (IHC $\times 200$)

Table 1 Relationship of Runx2 and Slug expression with features in breast cancer

Features	N	Runx2				Slug			
		+	-	χ^2	P	+	-	χ^2	P
Age(years old)									
≤50	47	35	12	0.982	0.322	17	30	1.554	0.213
>50	58	38	20			28	30		
Tumor size									
T ₁	47	30	17	1.475	0.478	16	31	5.261	0.072
T ₂	32	23	9			13	19		
T ₃	26	20	6			16	10		
Histological grade									
I	36	15	21	25.069	<0.001	5	31	24.891	<0.001
II	43*	32	11			20*	23		
III	26 [△] *	26	0			20 [△] *	6		
Lymph node metastasis									
No	56	33	23	6.358	0.012	19	37	3.906	0.048
Yes	49	40	9			26	23		
pTNM stage									
I ~ II	81	49	32	13.638	<0.001	30	51	4.902	0.027
III ~ IV	24	24	0			15	9		
ER									
+	68	40	26	9.383	0.002	20	48	14.525	<0.001
-	37	33	4			25	12		

Runx2: *vs histological grade I ($\chi^2=8.722, P=0.003$); [△]vs histological grade I ($\chi^2=22.935, P=0.000$), * vs histological grade II (Fishers' $P=0.005$).

Slug: *vs histological grade I ($\chi^2=9.641, P=0.002$); [△]vs histological grade I ($\chi^2=24.927, P=0.000$), * vs histological grade II ($\chi^2=6.150, P=0.013$).

2.3 Runx2 及 Slug 在乳腺癌中表达的相关性分析

Runx2 及 Slug 在乳腺浸润性导管癌中的表达呈正相关关系($r=0.166, P<0.01$)(Table 2)。

Table 2 Correlation of Runx2 and Slug in breast cancer

Slug	Runx2		<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-		
+	90	69	0.166	<0.001
-	263	381		

3 讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,乳腺癌致死的最主要原因是肿瘤复发和转移,而复发和转移与上皮-间质转化、信号转导途径的失调及致癌转录因子的异位表达等多因素密切相关^[5]。

Runx2 是转录因子 Runx 家族成员之一,在骨的形成过程中发挥重要的作用。Runx2 在小鼠正常乳腺上皮细胞中表达,在多种恶性肿瘤,包括乳腺癌中表达异常,并与患者预后不良有关^[6,7]。Runx2 参与调节乳腺特异性 β -casein 基因及骨桥蛋白的表达;

参与调节转移性乳腺癌细胞中甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)的表达及细胞周期调控;参与多种转移相关因子如 VEGF、MMP 及骨涎蛋白的表达^[8-11]。本研究结果显示,Runx2 蛋白在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率显著性高于癌旁乳腺组织,而且组织学分级越高,pTNM 分期越晚的乳腺癌组织,Runx2 的阳性表达率越高,进一步证实 Runx2 在乳腺癌变过程中发挥重要作用。

Slug 又称 Snail2,是具有锌指结构的转录因子 Snail 超家族的成员之一,能够通过抑制凋亡^[12]、调节细胞运动、粘附、增殖^[13]及干细胞表型^[14]参与肿瘤发

生发展;通过抑制 E-cadherin 表达参与上皮间质转化(EMT)^[15]。Slug 在多种恶性肿瘤中过表达,而且与患者预后欠佳有关^[16-18]。本研究结果显示,Slug 蛋白在乳腺浸润性导管癌中的阳性表达率显著性高于癌旁乳腺组织,而且 Slug 与乳腺癌组织学级、淋巴结转移及 pTNM 分期有关,进一步证实 Slug 在乳腺癌变过程中发挥重要作用并与乳腺癌的恶性程度及侵袭、转移能力有关,可能成为乳腺癌患者预后评估的重要标志物。

雌激素、雌激素受体 α (ER α)及 Runx2 及 Slug 之间存在复杂的相互作用关系。研究发现,乳腺癌细胞株中 Runx2 与 ER 的表达呈负相关^[19],而且 Slug 过表达与乳腺癌较高的肿瘤组织学分级及 ER 阴性密切相关^[20]。本研究结果与既往研究结果一致,提示 Runx2 及 Slug 可能在 ER 阴性的乳腺癌的发生发展中发挥了重要的作用。

Slug(Snail2)位于 Runx2 的下游,是介导 Runx2 发挥促转移特性的必需靶基因。Runx2 可能通过 Wnt 和 TGF- β 途径激活 Snail2 的表达,诱导 EMT 过

程,使乳腺癌细胞获得间质表型、E-cadherin 表达降低, Vimentin 表达增高, 增强乳腺癌侵袭能力; 而且 E2 抵抗 Runx2 诱导的 EMT 和体外乳腺癌细胞转移的中心环节就是转录因子 Snail2, 敲除 Snail2 后, Runx2 的作用受到抑制^[19]。本研究结果显示, Runx2 和 Slug 表达呈正相关, 提示乳腺癌的发生、发展、浸润和转移过程中可能存在 Runx2 和 Slug 相互作用, 两者可能存在相互调节机制, 协同参与了乳腺癌的进展。随着分子靶向治疗研究的深入, 以抗 Runx2/Slug 为靶点的乳腺癌治疗可能会成为新的途径, 有效改善患者预后。

参考文献:

- [1] Valenti MT, Serafini P, Innamorati G, et al. Runx2 expression; a mesenchymal stem marker for cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 4167–4172.
- [2] Liu JH, Tang XD. Molecular mechanisms of regulation of Slug [J]. *Chemistry of Life*, 2013, 33 (5): 554–562. [刘锦华, 唐旭东. Slug 的分子调控机制 [J]. *生命化学*, 2013, 33(5): 554–562.]
- [3] Min DL, Shen Z, Lin F. Clinical significances of Runx2 and Ezrin expressions in osteosarcoma [J]. *China Oncology*, 2012, 9(22): 685–689. [闵大六, 沈赞, 林峰, 等. Runx2 和 Ezrin 基因在骨肉瘤组织中的表达及其临床意义 [J]. *中国癌症杂志*, 2012, 9(22): 685–689.]
- [4] Liu T, Zhang X, Shang M, et al. Dysregulated expression of Slug, vimentin, and E-cadherin correlates with poor clinical outcome in patients with basal-like breast cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2013, 107(2): 188–194.
- [5] Huber MA, Kraut N, Beug H, et al. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [J]. *Cur Opin Cell Biol*, 2005, 17(5): 548–558.
- [6] Owens TW, Rogers RL, Best SA, et al. Runx2 is a novel regulator of mammary epithelial cell fate in development and breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18): 5277–5286.
- [7] Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, et al. Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2670–2675.
- [8] Pratap J, Wixted JJ, Gaur T et al. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7795–7802.
- [9] De Souza Nunes LS, De Oliveira RV, Holgado LA, et al. Immunoexpression of Cbfa-1/Runx2 and VEGF in sinus lift procedures using bone substitutes in rabbits [J]. *Clin Oral Implants Res*, 2010, 21(6): 584–590.
- [10] Zeng H, Xu X. RUNX2 RNA interference inhibits the invasion of osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(6): 2455–2458.
- [11] Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, et al. Different methylation patterns of RUNX2, OSX, DLX5 and BSP in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Cell J*, 2015, 17(1): 71–82.
- [12] Kim S, Yao J, Suyama K, et al. Slug promotes survival during metastasis through suppression of puma-mediated apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(14): 3695–3706.
- [13] Phillips S, Kuperwasser C. Slug: critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer [J]. *Cell Adh Migr*, 2014, 8(6): 578–587.
- [14] Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, et al. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state [J]. *Cell*, 2012, 148(5): 1015–1028.
- [15] Pan Y, Li J, Zhang Y, et al. Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25798.
- [16] Zhao W, Zhou Y, Xu H, et al. Snail family proteins in cervical squamous carcinoma: expression and significance [J]. *Clin Invest Med*, 2013, 36(4): E223–E233.
- [17] Zhou L, Hu YL, Wu SW, et al. Expressions of Slug, ZEB1 and KISS-1 in gastric adenocarcinoma and their clinical significance [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2016, 36(4): 532–537.
- [18] Luanpitpong S, Li J, Manke A, et al. Slug is required for SOX9 stabilization and functions to promote cancer stem cells and metastasis in human lung carcinoma [J]. *Oncogene*, 2016, 35(22): 2824–2833.
- [19] Chingme NO, Baniwal SK, Little GH, et al. Regulation of breast cancer metastasis by Runx2 and estrogen signaling: the role of SNAI2 [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(6): R127.
- [20] Cao YW, Wan GX, Sun JP, et al. Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(2): 70–76.