

同源盒基因 MEOX2 在乳腺癌中的表达及其临床意义

司 婧, 郭志琴, 左志博, 邬万新, 陆 翔, 陈彩萍
(嘉兴市第一医院, 嘉兴学院附属医院, 浙江 嘉兴 314000)

摘 要: [目的] 研究乳腺癌组织中 MEOX2 的表达水平与临床病理资料的相关性, 及其对患者预后的影响。[方法] 纳入 2010—2012 年嘉兴市第一医院乳腺病科就诊的乳腺癌患者 162 例, 免疫组化检测组织中 MEOX2 的表达水平, 将患者分为低表达组及高表达组。利用 Cox 回归模型进行多因素分析, 并应用 Kaplan-Meier 曲线评估患者无复发生存 (recurrence free survival, RFS) 和总生存 (overall survival, OS), Log-rank 检验比较生存曲线差异。[结果] MEOX2 主要定位于细胞核中, 在乳腺癌中表达的阳性率为 83.33% (135/162), 其中 MEOX2 低表达的患者有 50.62% (82/162), 高表达的患者有 49.38% (80/162)。MEOX2 低表达组患者脉管癌栓的发生率更高 ($P=0.029$)。预后分析结果显示 MEOX2 高表达与不良预后有关, MEOX2 高表达的患者 RFS 更差 ($P=0.028$), 但 OS 未见统计学差异 ($P=0.323$)。多因素分析显示淋巴结受累、Ki67 水平及 MEOX2 表达水平均为乳腺癌患者发生复发转移事件的独立预测因素。淋巴结受累是发生死亡事件的独立预测因素 ($P=0.001$)。在雌激素受体阴性人类表皮生长因子受体 2 阳性的乳腺癌患者中, MEOX2 高表达与较差的 RFS 有关 ($P=0.096$), 但未达统计学意义; 而在其他分型的患者中, MEOX2 与预后无明显相关性。[结论] 乳腺癌组织中 MEOX2 表达水平与脉管癌栓相关, 其高表达与患者的复发转移事件及不良预后相关, 这一相关性在 ER 阴性 Her-2 阳性的患者中较为明显。MEOX2 可作为乳腺癌患者复发转移事件的预测标志物。

关键词: 乳腺癌; MEOX2; 免疫组化; 生物标志物

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X (2021) 07-0531-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.07.B004

Expression of MEOX2 in Breast Cancer and Its Clinical Significance

SI Jing, GUO Zhi-qin, ZUO Zhi-bo, WU Wan-xin, LU Xiang, CHEN Cai-ping

(The First Hospital of Jiaxing & The First Affiliated Hospital of Jiaxing University, Jiaxing 314000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the correlation between MEOX2 expression and clinicopathological features in breast cancer patients, and the impact of MEOX2 on prognosis in these patients. [Methods] We included 162 patients who received surgical treatment from 2010 to 2012. Immunohistochemistry was used to examine the expression of MEOX2. Patients were divided into two groups according to MEOX2 expression. Univariate analysis and Cox regression multivariate analysis were used in order to analyze the correlation between MEOX2 expression and clinicopathological features. Kaplan-Meier curve and Log-rank analysis were used to evaluate recurrence free survival (RFS) and overall survival (OS). [Results] MEOX2 was mostly expressed in nuclear with expression rate of 83.33% (135/162). Of which, 50.62% (82/162) of patients were low MEOX2 expression and 49.38% (80/162) were high expression. Low MEOX2 expression was significantly correlated with more lymphovascular invasion ($P=0.029$). Increased MEOX2 was associated with poor prognosis. Compared with low expression, patients with high MEOX2 expression had worse RFS ($P=0.028$), while OS did not reach statistical difference ($P=0.323$). Multivariate analysis showed axillary status, Ki67 level and MEOX2 expression were independent predictors of recurrence and metastasis in breast cancer patients, and axillary status was the only independent predictor of death event ($P=0.001$). Subgroup analysis showed the high expression of MEOX2 was associated with poor prognosis in patients with ER- and Her-2+ ($P=0.096$), while did not reach statistical difference. No association between MEOX2 and prognosis was found in other subgroups. [Conclusion] MEOX2 expression is correlated with lymphovascular invasion in breast cancer patients. High expression is associated with recurrence, metastasis and poor prognosis. This correlation is more obvious in ER-Her-2+ patients. Thus, MEOX2 may be a potential biomarker on predicting recurrence, metastasis and prognosis in breast cancer patients.

Subject words: breast cancer; MEOX2; immunohistochemistry; biomarker

乳腺癌的治疗中已有多种小分子酪氨酸激酶类

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81902674); 嘉兴市创新学科项目 (2019cx04); 嘉兴市第一医院“壹计划”项目 (2019YA01)

通信作者: 陈彩萍, 科主任, 主任医师, 本科; 嘉兴市第一医院乳腺病科, 浙江省嘉兴市南湖区中环南路 1882 号 (314000); E-mail: luyun6@163.com

收稿日期: 2021-01-17; **修回日期:** 2021-03-06

抗血管生成药物应用于临床, 比如索拉非尼、舒尼替尼及阿帕替尼等^[1,2]。血管生成在肿瘤局部进展和转移方面占据重要的地位。因此, 寻找潜在抗血管生成的治疗靶点成为近年研究热点。既往研究发现, 同源盒基因 MEOX2 对心血管系统起重要调控作用, 可

通过上调 p21 转录,影响细胞周期进程,抑制内皮细胞增殖,还可下调 NF κ B 信号通路的活性,抑制炎症反应,最终抑制血管生成^[3]。近年研究显示 MEOX2 不仅在正常胚胎发育和细胞增殖分化中发挥调控作用,而且在多种肿瘤组织中表达,提示 MEOX2 在肿瘤的发生发展中可能起到重要作用。本研究通过收集临床病理资料完整的乳腺癌患者资料,采用免疫组化检测乳腺癌组织 MEOX2 的表达情况,分析其与乳腺癌患者临床病理特征之间的相关性,对 MEOX2 在乳腺癌中的临床价值进行探讨,以期对乳腺癌的靶向治疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究回顾性分析了 2010 年 1 月至 2012 年 12 月在嘉兴市第一医院乳腺病科就诊并进行手术治疗的乳腺浸润性导管癌患者,纳入标准:①首诊于嘉兴市第一医院乳腺病科的患者;②术后石蜡病理诊断为乳腺浸润性导管癌。排除标准:①乳腺癌新辅助治疗后;②合并同期原位癌/分叶状肿瘤/小叶癌/黏液腺癌等;③既往乳腺恶性肿瘤病史。共纳入 162 例患者,年龄 31~79 岁,中位年龄 52 岁。本研究已经过知情同意及伦理审批(审批号:LS2019-056)。

1.2 免疫组织化学染色及结果判读标准

选取石蜡包埋的乳腺癌组织制作 4 μ m 厚的切片,烤片后进行免疫组化染色(SP 法)。使用兔抗人 MEOX2 多克隆抗体(Thermo 公司,货号 PA5-51005)作为目标抗体,以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照,按试剂盒说明书进行操作。免疫组化结果由两位高年资病理医师在光镜下独立阅片评分判定。MEOX2 以细胞核出现着色颗粒为阳性,以磷酸盐缓冲液作为阴性对照,结果采用半定量评分标准判断。根据组织着色强度计分标准如下:无着色为 0 分,着色较弱为 1 分,着色中等强度为 2 分,着色较强为 3 分;根据着色细胞在视野中百分比计分标准如下:无着色为 0 分,着色少于 10%为 1 分,着色 10%~50%为 2 分,着色 50%~100%为 3 分。每张切片选取不少于 2 个癌组织视野进行评分,每种计分标准取平均值,两种计分标准平均值相加的结果为免疫组化的最终结果。总分值小于 4 分为低表达,大于等于 4 分

为高表达。

1.3 随访

患者随访由医院信息科及乳腺病科共同完成,每年至少随访 1 次,随访截止时间为 2019 年 12 月 31 日。本研究中术后随访次数少于 2 次的患者不纳入生存分析。末次随访时间早于 2019 年 1 月 1 日的患者定义为失访。对患者的局部区域复发事件(包括同侧乳房、胸壁、皮肤、腋窝淋巴结及锁骨上淋巴结的复发)、远处转移事件及死亡事件进行随访。复发转移的时间定义为初次外科治疗至首次出现复发转移表现(包括首次出现有临床症状的复发转移灶或在辅助检查上首次检测到无症状复发转移灶)的时间。

1.4 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计学软件对数据进行分析,采用卡方检验进行单因素分析,单因素分析有统计学意义的变量进入回归模型,采用 Cox 和 Logistic 回归进行多因素分析。采用 Kaplan-Meier 曲线评估无复发生存(recurrence free survival, RFS)和总生存(overall survival, OS),Log-rank 检验比较生存曲线差异。采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MEOX2 在乳腺癌组织中的表达及与临床病理指标的相关性

MEOX2 主要定位于细胞核中(Figure 1),不同患者之间的表达水平差异较大。162 例乳腺癌患者中,27 例患者评分为 0 分,MEOX2 表达的阳性率为 83.33%(135/162)。MEOX2 低表达(小于 4 分)的患者占 50.62%(82/162),高表达(大于等于 4 分)的患者占 49.38%(80/162)。

将患者按组织 MEOX2 表达水平进行分组,免疫组化评分小于 4 分为低表达组,大于等于 4 分为高表达组,对患者年龄、组织学分级、肿瘤大小、淋巴结受累、脉管癌栓、ER 及 Her-2 状态、Ki67 水平等变量进行单因素分析,MEOX2 低表达组脉管癌栓的发生率更高($P=0.029$)。MEOX2 高表达组年龄更小($P=0.085$)、更倾向于 Her-2 阳性($P=0.075$),但结果均未达到统计学意义(Table 1)。

2.2 MEOX2 表达水平对乳腺癌患者预后的影响

纳入的 162 例患者中,24 例患者失访,失访率为

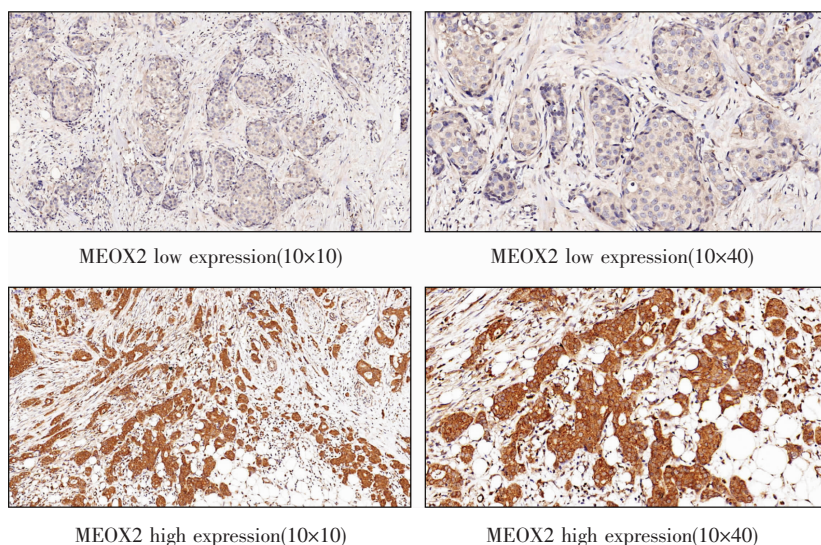


Figure 1 Expression of MEOX2 in breast cancer tissues

Table 1 Clinicopathological characteristics of breast cancer patients in different expression levels of MEOX2

Variables	N	Low MEOX2 expression (n=82)	High MEOX2 expression (n=80)	P
Age(years old)				0.085
≤50	72	31	41	
>50	90	51	39	
Grade				0.740
I ~ II	89	44	45	
III	73	38	35	
Tumor size(cm)				0.883
≤2	76	38	38	
>2	86	44	42	
Axillary status				0.782
Negative	109	56	53	
Positive	53	26	27	
Lymphovascular invasion				0.029
Negative	133	62	71	
Positive	29	20	9	
ER status				0.861
Negative	72	37	35	
Positive	90	45	45	
Her-2 status				0.075
Negative	108	60	48	
Positive	54	22	32	
Ki67 level				0.352
≤15%	48	27	21	
>15%	114	55	59	

14.81%,中位随访时间为 97.55 个月。在 138 例在访患者中,29 例复发转移,复发转移发生率为 21.01%,中位复发转移时间为 49.88 个月。以局部区

域复发为首发事件的有 7 例,其中同侧胸壁复发 4 例,同侧腋窝淋巴结复发 2 例,同侧锁骨上淋巴结复发 1 例;以远处转移为首发事件的有 20 例,其中内脏转移 11 例,骨转移 9 例;另有 2 例患者同时发生局部区域复发和远处转移。纳入患者中有 18 例患者发生死亡事件,其中 14 例患者因乳腺癌死亡。

Kaplan -Meier 生存曲线及 Log-rank 检验结果显示,MEOX2 高表达与患者不良预后有关。相较于 MEOX2 高表达的患者,低表达 MEOX2 的患者有更好的 RFS

($P=0.028$),但 OS 未见统计学差异(Figure 2)。高表达 MEOX2 患者的 10 年 RFS 及 OS 分别为 70.13%和 84.06%,低表达患者的 10 年 RFS 及 OS 分别为 86.15%和 89.86%。

Cox 回归模型分析临床病理特征(包括年龄、组织学分级、肿瘤大小、淋巴结受累、脉管癌栓、ER、Her-2、Ki67 水平及 MEOX2 表达)与乳腺癌患者复发转移事件及死亡事件的相关性,发现淋巴结受累($P=0.005$)、Ki67 水平($P=0.050$)及 MEOX2 表达($P=0.010$)为乳腺癌患者发生复发转移事件的独立预测因素(Table 2);淋巴结受累是发生死亡事件的独立预测因素($P=0.001$)(Table 2)。

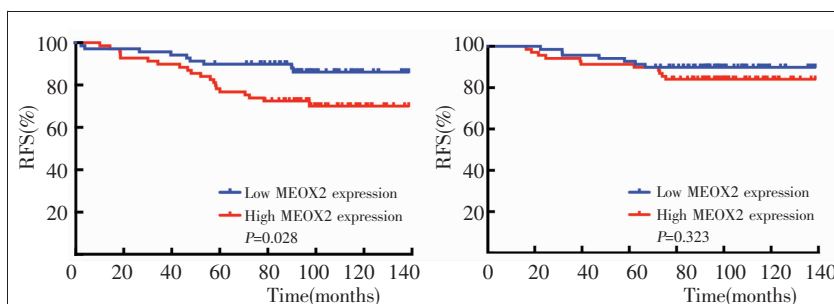
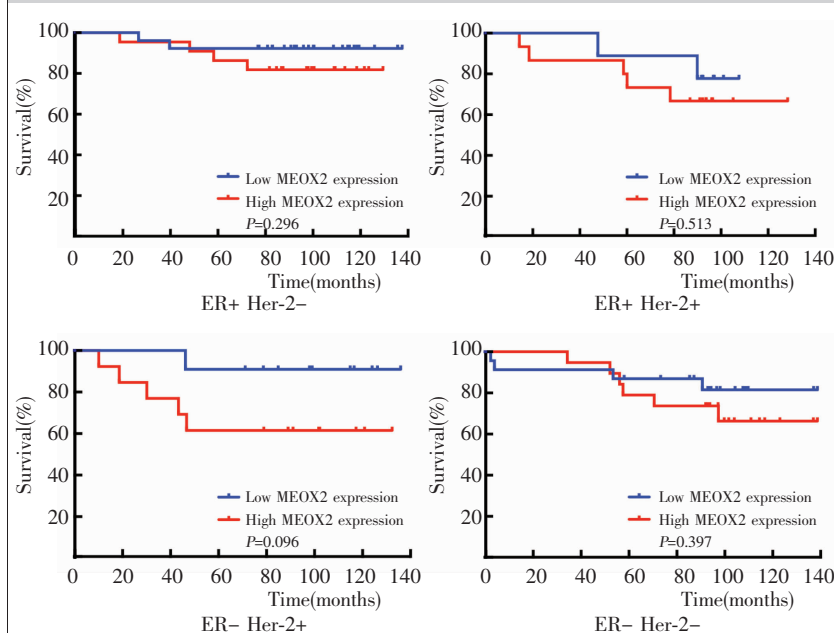
在 ER 阴性 Her-2 阳性的乳腺癌患者中,MEOX2 高表达与较差的 RFS 有关($P=0.096$),但未达统计学意义,而在其他分型的患者中,MEOX2 与预后无明显相关性(Figure 3)。

3 讨论

同源盒基因是参与调控胚胎发育的重要转录因子,该基因家族均含有一段 183 bp 高度保守的同源结构域,MEOX2 作为其中的成员之一,参与了大量信号转导过程,可影响许多重要的生物学过程,比如胚胎形成、器官发生、细胞增殖和细胞分化等^[4-5]。MEOX2 在肿瘤组织中的表达具有高度异质性,并且与肿瘤发生发展及预后密切相关。

Table 2 Multivariate Cox regression analysis of independent predictors on recurrence/death event in breast cancer patients

Clinicopathological features	Value	Recurrence event		Death event	
		OR(95%CI)	P	OR(95%CI)	P
Age(years old)	>50 vs ≤50	0.900(0.439~1.845)	0.774	0.533(0.194~1.464)	0.222
Grade	III vs I~II	0.823(0.368~1.837)	0.634	0.445(0.155~1.279)	0.133
Tumor size	>2cm vs ≤2cm	0.829(0.401~1.715)	0.613	0.765(0.288~2.027)	0.589
Axillary status	Positive vs Negative	2.847(1.365~5.937)	0.005	6.381(2.212~18.411)	0.001
Lymphovascular invasion	Positive vs Negative	0.876(0.362~2.122)	0.769	0.698(0.206~2.363)	0.563
ER status	Positive vs Negative	0.998(0.467~2.136)	0.997	0.722(0.257~2.034)	0.538
Her-2 status	Positive vs Negative	1.188(0.553~2.554)	0.659	1.033(0.352~3.033)	0.952
Ki67 level	>15% vs ≤15%	3.031(1.001~9.179)	0.050	2.790(0.734~10.600)	0.132
MEOX2 expression	High vs Low	3.004(1.308~6.900)	0.010	1.509(0.548~4.156)	0.426

**Figure 2 MEOX2 expression on prognosis of breast cancer patients****Figure 3 Influence of MEOX2 expression on prognosis of breast cancer patients with different ER and Her-2 status**

既往研究发现,MEOX2在肿瘤中的调控作用成两极化。日本 Ohshima 等^[6]通过高通量的方法筛选出 MEOX2,并验证了其抑癌作用,湘雅医院的研究显示低表达 MEOX2 与肝细胞肝癌患者更差的无病生存及总生存相关^[7];瑞典 Valcourt 等^[8]的研究结果

显示,MEOX2可能参与 TGF- β 通路抑制肿瘤发生上皮间质化;武汉人民医院的研究表示过表达的 MEOX2 可通过抑制 PI3K/Akt 通路促进喉癌细胞的凋亡^[9]。研究证实,MEOX2 基因过表达可以诱导肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的增殖,因此被认为是肿瘤诊断和治疗的新的理想靶点。但是,近年的研究却得到了相反的结果,墨西哥的研究显示,高表达 MEOX2 与肺癌的耐药及较差的预后相关,Armas-López 等也阐述了 MEOX2 在肺癌转移中的作用机制,发现 MEOX2 作为 GLI1 转录因子,通过上调 GLI1 的表达促进非小细胞肺癌的发展与耐药^[10-11];湘雅医院研究者通过高通量筛选的方法发现 MEOX2 是预测神经胶质瘤预后的分子标志物之一^[12];法国的 Tachon 等^[13]也在神经胶质瘤中发现,MEOX2 高表达的患者预后较差,特别是低级别神经胶质瘤患者。因此,MEOX2 可作为神经胶质瘤预后预测的指标之一。

目前,MEOX2 在乳腺癌中的调控机制较少报道。仅有的研究显示,

MEOX2 可作为 PI3K/Akt 信号通路的上游因子,影响乳腺癌细胞的周期,减少细胞的有丝分裂,进而抑制乳腺癌细胞的增殖^[14]。我们的研究纳入了 162 例乳腺癌患者,发现 MEOX2 低表达组患者脉管癌栓的发生率更高 ($P=0.029$),MEOX2 高表达的患者

RFS 更差 ($P=0.028$), 特别是在 ER 阴性 Her-2 阳性的乳腺癌患者中 ($P=0.096$); 多因素分析也显示 MEOX2 表达水平是乳腺癌患者发生复发转移事件的独立预测因素之一 ($P=0.010$)。通过检索 Kaplan-Meier Plotter 数据库, 我们也发现 MEOX2 在不同分子分型的乳腺癌中与患者预后的相关性并不一致, 在 Her-2 阳性的患者中, MEOX2 过表达与不良预后显著性相关。我们认为这样的差异可能是因为乳腺癌的肿瘤异质性较强, 影响血管生成的肿瘤微环境差异较大, 且不同分子分型乳腺癌发生发展的关键信号通路存在差异等。

本研究是基于免疫组化检测的回顾性研究, 具有一定局限性。首先, 本研究为回顾性研究, 证据等级有限, 但纳入患者资料客观完整, 研究结果相对可靠; 其次, 本研究仅进行了免疫组化检测, 未在其他层面检测 MEOX2 与乳腺癌发生发展及患者预后的相关性; 最后, 本研究中各分子分型的乳腺癌患者数量有限, 统计结果可能存在偏倚。因此, MEOX2 在不同分子分型乳腺癌中的作用及分子层面对乳腺癌发生发展的影响, 仍需要进一步研究。

综上所述, 乳腺癌组织中 MEOX2 表达与脉管癌栓有相关性, MEOX2 高表达与不良预后相关, 特别是 ER 阴性 Her-2 阳性的乳腺癌患者中。因此, MEOX2 可作为乳腺癌患者预后预测的标志物。目前有关 MEOX2 基因如何调控并促进乳腺癌发生发展的分子机制还有待进一步探索, 我们相信, 随着对 MEOX2 研究的不断深入, 在不久的将来, MEOX2 可能成为肿瘤治疗的潜在的新靶点。

参考文献:

- [1] Qin S, Li A, Yi M, et al. Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy[J]. J Hematol Oncol, 2019, 12(1):27.
- [2] Zhou Z, Yao H, Hu H. Disrupting tumor angiogenesis and "the Hunger Games" for breast cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1026(1): 171-195.
- [3] Chen Y, Rabson AB, Gorski DH. MEOX2 regulates nuclear factor-kappaB activity in vascular endothelial cells through interactions with p65 and IkappaBbeta [J]. Cardiovasc Res, 2010, 87(4): 723-731.
- [4] 夏世金, 邵先桃, 钱桂生. Cox 基因对细胞增殖的负性调

控及机制[J]. 生物医学工程学杂志, 2009, 26(1):206-210.
Xia SJ, Tai XT, Qian GS. Negative regulation of cells proliferation by Cox gene and its mechanisms [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2009, 26(1):206-210.

- [5] Northcott JM, Czubyrt MP, Wigle JT. Vascular senescence and ageing: a role for the MEOX proteins in promoting endothelial dysfunction [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(10):1067-1077.
- [6] Ohshima J, Haruta M, Arai Y, et al. Two candidate tumor suppressor genes, MEOX2 and SOSTDC1, identified in a 7p21 homozygous deletion region in a Wilms tumor[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(12):1037-1050.
- [7] Zhou P, Chen Z, Chang RM, et al. Growth arrest-specific homeobox is associated with poor survival in patients with hepatocellular carcinoma [J]. Med Oncol, 2012, 29 (5): 3063-3069.
- [8] Valcourt U, Thuaud S, Pardali K, et al. Functional role of MEOX2 during the epithelial cytoskeletal response to TGF-beta[J]. Mol Oncol, 2007, 1(1):55-71.
- [9] Tian L, Tao ZZ, Ye HP, et al. Over-expression of MEOX2 promotes apoptosis through inhibiting the PI3K/Akt pathway in laryngeal cancer cells [J]. Neoplasma, 2018, 65(5): 745-752.
- [10] Armas-López L, Pina-Sanchez P, Arrieta O, et al. Epigenomic study identifies a novel mesenchyme homeobox-2-GLI1 transcription axis involved in cancer drug resistance, overall survival and therapy prognosis in lung cancer patients[J]. Oncotarget, 2017, 8(40):67056-67081.
- [11] Avila-Moreno F, Armas-López L, Alvarez-Moran AM, et al. Overexpression of MEOX2 and TWIST1 is associated with H3K27me3 levels and determines lung cancer chemoresistance and prognosis[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e114104.
- [12] Cheng Q, Huang C, Cao H, et al. A novel prognostic signature of transcription factors for the prediction in patients with GBM[J]. Front Genet, 2019, 10(1):906.
- [13] Tachon G, Maslantiyev K, Rivet P, et al. Prognostic significance of MEOX2 in gliomas [J]. Mod Pathol, 2019, 32(6): 774-786.
- [14] 唐铁雷, 李有怀, 杨文强, 等. Meox2 调控 PI3K/AKT 信号通路对乳腺癌细胞的增殖及机制的影响[J]. 中国现代普通外科进展, 2019, 22(3): 173-177.
Tang TL, Li YH, Yang WQ, et al. Impact of Meox2 regulating PI3K/AKT signaling on proliferation of breast cancer cells and its mechanism [J]. Chinese Journal of Current Advances in General Surgery, 2019, 22(3): 173-177.