

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.035

Runx3 蛋白在卵巢上皮性癌中的表达及临床意义*

刘莉霞¹ 李 岩¹ 尹秀艳¹ 崔 莹¹ 何秀萍^{2△}

(1 牡丹江医学院红旗医院妇产科 黑龙江 牡丹江 157011; 2 哈尔滨医科大学附属第一医院妇科 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要 目的:探讨 Runx3 蛋白在卵巢癌的发生发展、浸润转移和化疗耐药中的作用,为以 Runx3 作为分子治疗靶点的抗肿瘤基因治疗提供理论依据。**方法:**运用组织芯片技术联合免疫组化法检测 27 例卵巢癌、20 例正常卵巢组织、30 例卵巢良性肿瘤中抑癌基因 Runx3 的表达情况,分析其与卵巢癌临床病理特征的关系,并进行临床随访分析 Runx3 基因与卵巢癌化疗耐药的关系。**结果:**1. Runx3 蛋白在卵巢癌组织中的表达明显低于正常卵巢组织及卵巢良性肿瘤中的表达,两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); Runx3 蛋白表达与肿瘤的临床分期和病理学分级有关,差异有显著性($P < 0.05$);与肿瘤的组织学类型、患者年龄、是否绝经、及有无腹水形成无关($P > 0.05$)。2. Runx3 蛋白在化疗敏感组中高表达。**结论:**Runx3 蛋白低表达对卵巢癌的发生发展及化疗耐药中起重要作用。

关键词:卵巢癌; Runx3; 组织芯片; 免疫组织化学

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3334-04

Expression of Runx3 in Epithelial*

LIU Li-xia¹, LI Yan¹, YIN Xiu-yan¹, CUI Ying¹, HE Xiu-ping^{2△}

(1 The Red Flag Clinical College of Mu dan jiang Medical College, Mudanjiang Heilongjiang, 157011, China;

2 Department of Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship of Runx3 with development, metastasis and the drug resistance of chemotherapy of ovarian cancer. **Methods:** Tissue microarray technology and immunohistochemical technique were used to detect the expression of Runx3 in ovarian tumor tissues. The relationship among Runx3 clinicopathological features and drug resistance were analysed. **Results:** ① The positives rates of Runx3 in ovarian cancer were lower than those in normal ovaries and in ovarian benign tumor ($P < 0.05$). The expression of Runx3 was significantly correlated with the clinical stage and pathological grade of ovarian carcinoma ($P < 0.05$). However, it was not correlated with histological type, age, menopause and ascites formation ($P > 0.05$). ② Expression rate of Runx3 in drug resistance group was lower than that in sensitive group. **Conclusion:** The low Runx3 expression may be related with the growth of ovarian cancer, lymph node metastasis and drug resistance.

Key words: Ovarian Carcinoma; Runx3; Tissue microarray; Immunohistochemical

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3334-04

前言

正常情况下人体细胞维持一种动态平衡 (homeostasis),即细胞的增殖与凋亡的平衡,人体的正常生理功能正是依靠这种动态平衡保持着。而一旦细胞发生异常增殖,这种平衡将被破坏,肿瘤的发生发展与细胞的增殖紧密相连^[1]。抑癌基因具有抑制细胞的生长、增殖及分化的作用,能显著地抑制癌细胞的增殖,而当其功能失活时,细胞生长失去控制,将导致肿瘤的发生。卵巢癌目前呈高发趋势,与抑癌基因失活密切相关^[2]。Runx3 基因(runt. related transcription factor 3 gene)是 1994 年发现的一个新型肿瘤抑制基因,可抑制细胞的异常生长,促进细胞的凋亡。导致 Runx3 失活的原因很多,有学者发现 Runx3 的失活与细胞的周期调控因子及异常甲基化密切相关^[3]。

Runx3 的失活将直接引起 TGF- β 信号通路停止传导,使细胞缺乏凋亡信号的促凋亡作用,从而促使细胞发生恶性变^[4]。

卵巢癌的发生发展是一个非常繁琐的过程,因而探讨抑癌基因在卵巢癌发生发展过程中的表达,及其与卵巢癌化疗耐药间的关系具有重要意义。有关 Runx3 蛋白在卵巢癌中的表达以及在化疗耐药中作用的研究目前鲜见报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 标本资料 术前所有的患者均未行化疗及放疗。取正常卵巢 20 例,良性卵巢组织 30 例,卵巢癌 27 例,其中卵巢浆液性囊腺癌 20 例,卵巢粘液性囊腺癌 5 例,其它类型 2 例。按 WHO 分类标准,包括高分化 6 例,中低分化 21 例。根据 2000

* 基金项目:黑龙江省科技攻关资助项目(GB07C32303)

作者简介:刘莉霞 (1981-),女,硕士,妇产科医师,主要从事妇科肿瘤临床研究,

电话:13359567256, E-mail:65680304@qq.com

△ 通讯作者:何秀萍, E-mail:xiuping_he@live.cn

(收稿日期:2013-11-23 接受日期:2013-12-19)

年FIGO分期标准,其中I期+II期7例,III期+IV期20例。按年龄分类,其中小于50岁的患者10例,大于50岁的患者17例。搜集11例绝经前的患者,16例绝经后的患者。无腹水形成的患者18例,有腹水形成的患者9例。标本均在术中采集后,放入10%福尔马林溶液内固定,并于24小时内切成大小约为1cm×1cm×0.3cm的组织块。

1.1.2 主要试剂 组织芯片由陕西艾莉娜生物科技有限公司制作。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化方法 组织芯片切片常规脱蜡至水,PBS液浸泡5分,蒸馏水冲洗。将切片浸入0.01M枸橼酸盐缓冲液,微波修复15分钟,凉至室温,3%过氧化氢溶液浸泡20分钟,PBS中浸泡,滴入正常山羊血清封闭液半小时,加Runx3抗体4℃过夜,滴加标记二抗,放入湿盒,水浴30分钟,PBS液冲洗3次,DAB显色,镜下观察3-5分钟,阳性者出现棕黄色颗粒。流水冲洗后苏木复染,依次脱水,中性树胶封片。

1.2.2 免疫组化阳性结果判定 Runx3蛋白的阳性产物位于细胞浆或胞核,阳性判断标准为该位置出现了较清晰的棕黄色或棕褐色颗粒。随即观察10个高倍视野下的细胞数,每个视野下各计数100个细胞,根据其中阳性细胞出现的比率,可分为以下4级:阳性细胞数<5%为(-);阳性细胞数在5%-25%为($\bar{x} \pm s$);阳性细胞数在25%-50%范围为(+);阳性细胞数在50%-75%区间内为(++);阳性细胞数>75%定为(+++)。

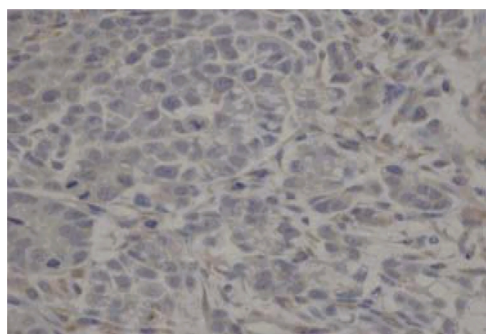


图1 Runx3在卵巢癌中的表达(H&E×400)

Fig.1 The expression of Runx3 in ovarian cancer. Cytoplasm staining of the carcinomas cells (original magnification,×400)

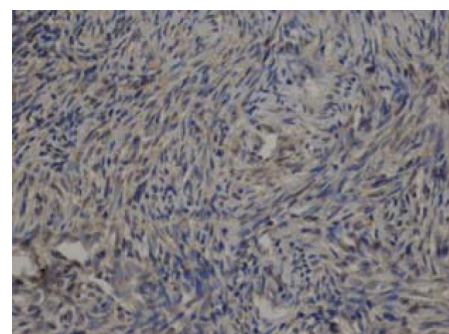


图2 Runx3在正常卵巢中的表达(H&E×400)

Fig.2 The expression of Runx3 in normal ovarian tissues. Cytoplasm staining of the normal (original magnification,×400)

表1 Runx3蛋白在卵巢组织中的表达情况

Table 1 Expression of Runx3 Protein in ovarian tissue

Group	Numer	Positive number	percentae	P-value
Normal tissue	20	16	80%	P=0.0015
Benign tissue	30	22	73.3%	P=0.0025
Ovarian cancer	27	9	33.3%	
Total	77			

2.2.2 Runx3蛋白的表达与卵巢癌临床病理特征的关系 Runx3蛋白的表达与卵巢癌的组织类型、患者年龄、是否绝经及有无腹水形成无显著相关;Runx3蛋白在高分化卵巢癌中的阳性表达显著低于中低分化者($P<0.05$);卵巢癌中随着临床分期的进展Runx3蛋白的表达显著降低($P<0.05$)(表2)。

2.2.3 Runx3蛋白与化疗耐药的关系 化疗有效组中Runx3蛋

1.2.3 耐药判断 每个疗程开始前均行妇科检查、妇科彩超、X线胸片、血清CA125等检查。依据化疗疗效评定标准^[5]:(1)化疗敏感性卵巢癌:在化疗早期就获得完全缓解,并且停药半年以上也未复发;(2)耐药性卵巢癌:早期疗效虽然达到完全缓解,但半年内便出现肿块、CA125逐渐升高、肠梗阻的发生、胸水腹水等;(3)持续性卵巢癌:在化疗早期虽有反应,但检查发现残余病灶体积增大25%;(4)难治性卵巢癌:化疗药物对肿瘤无效果。我们将第1项归为化疗敏感,后3项归为化疗耐药,这样实验中患者分为化疗敏感组和化疗耐药组。

1.2.4 统计学处理 以 $P<0.05$ 为差别显著性标准。

2 结果

2.1 组织芯片结果

组织芯片合格的标准为非目标组织点数+组织脱点数≤5%。卵巢癌组织芯片进行切片HE染色,结果显示切片所有位点的组织结构保存良好,组织芯整齐地排列。

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 Runx3蛋白在卵巢组织中的表达 Runx3在卵巢癌中低表达(图1),在正常卵巢中高表达(图2)。Runx3在卵巢癌、正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤中的表达阳性率分别为33.3%(9/27),80%(16/20)及73.3%(22/30),差异有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

白的表达阳性率为70%(7/10),耐药组中Runx3蛋白的表达阳性率为11.1%(1/9),分析显示化疗有效组Runx3蛋白的阳性率显著高于耐药组($P=0.01977<0.05$)。

3 讨论

组织芯片(tissue chip)又称组织微阵列(tissue microarray,

表 2 Runx3 蛋白表达与卵巢癌临床病理特征的关系

Table 2 clinicopathological features relation of Runx3 protein in Ovarian cancer

Group	Number	Positive number	percentae	P-value
Histological type				
Serous	20	6	30%	0.799
Mucinous	5	2	40%	
Other	2	1	50%	
Histological grade				
G1	6	4	66.7%	0.0495
G2 G3	21	5	23.8%	
FIGO stage				
I +II	7	5	71.4%	0.013
III+IV	20	4	20%	
Age				
≤ 50	10	3	30%	0.778
> 50	17	6	35.3%	
Premenopausal	11	4	36.4%	
Postmenopausal wome	16	5	31.2%	0.782
Ascites				
Without ascites	18	6	33.3%	1
ascites	9	3	33.3%	

TMA), 1998 年由 Kononen 等发现这一技术^[6]。组织芯片技术可一次性大量检测出组织样本中不同因子的表达。有研究得出组织芯片技术可为肿瘤的早期诊断筛选分子标志物^[7]。但组织芯片用机器制作时也有其局限性,因所取样本太小不能很好的代表原组织,所以我们用手工进行取样,取组织块直径大小 1.5 mm,配合较好的组织定位,可以很好的用于实验研究。有学者发现小供体组织也能够很好的代替原肿瘤组织标本用于基因的原位表达分析^[8]。

卵巢癌是妇科恶性肿瘤之一,严重危害女性的健康,该肿瘤具有起病隐匿、缺乏早期诊断、易侵袭及远处转移、预后较差等特点。近几年卵巢癌的复发率及病死率不断增高,而化疗耐药可能是导致卵巢癌治疗失败的重要原因^[9]。本文主要探讨抑癌基因 Runx3 在卵巢癌发生发展中的作用及与化疗耐药的关系。

Runx3 基因是一个刚被发现的非常重要的抑癌基因,属 Runx 家族成员之一^[10]。抑癌基因的主要功能是抑制细胞的生长甚至增殖及分化,显著抑制肿瘤细胞的生长。激活癌细胞中 Runx3 的表达,结果癌细胞的生长将被显著的抑制^[11],这说明 Runx3 具有明显的抑制癌症发生的作用。而抑癌基因失去活性可导致癌症的发生。Li^[12]等发现缺乏 Runx3 基因作用的小鼠胃粘膜呈现异常增生,发生恶变。

本研究结果表明 Runx3 蛋白在正常卵巢组织、良性卵巢肿瘤、卵巢癌组织中的阳性表达率分别为 80%(16/20)、73.3%(22/30)、33.3%(9/27),发现 Runx3 蛋白的阳性表达率逐渐降低,且差异有显著意义($P < 0.05$)。卵巢癌组织中 Runx3 蛋白的低

表达或表达缺失,将导致卵巢癌上皮细胞异常增生失去 Runx3 基因的控制,可推测 Runx3 蛋白的低表达可能是卵巢癌发生发展的重要原因。也有学者研究发现^[13]在女性子宫内膜癌中Runx3的低表达导致的癌症发生。因此 Runx3 基因可作为肿瘤早期诊断的重要指标。Kodach^[14]研究检测到癌细胞内 Runx3 基因低表达的原因主要在高甲基化。本研究结果也得出随着 Runx3 蛋白表达的逐渐降低卵巢癌也随之进一步恶性发展,如 Runx3 蛋白在卵巢癌III+IV 期的阳性表达率明显低于 I +II 期的表达率,且 Runx3 蛋白在中低分化组中的阳性表达率显著低于高分化组的阳性表达率,且差异有显著意义($P < 0.05$)。有研究^[15]得出 Runx3 可显著促进肿瘤细胞凋亡,抑制癌症发生。可推测 Runx3 基因的失活可能与卵巢癌的浸润及转移密切相关,检测卵巢癌组织发现 Runx3 的表达降低或缺失可能预示卵巢癌患者预后不良,Peng 等^[16]研究发现 Runx3 显著促进肿瘤细胞的凋亡。因此 Runx3 可成为一个新的判断患者预后的分子标志物。位玲霞等^[17]研究得出 Runx3mRNA 在人卵巢癌细胞株中弱表达,而经过药物 5-氮-2'-脱氧胞苷使 Runx3 去甲基化作用后 Runx3 表达显著增加,同时卵巢癌细胞的生长速率也随之下降,癌细胞发生凋亡。这说明 Runx3 基因是卵巢癌中非常重要的抑癌基因,Runx3 基因甲基化是卵巢癌发生的主要原因之一。

癌细胞的凋亡是多种化疗药物发挥作用的一个共同目的,能耐受化疗药物诱导细胞凋亡的癌细胞最终形成了对抗癌药物的耐药。有 90%的卵巢癌患者由于化疗耐药会导致癌症的复发^[18]。Runx3 基因是一种刚被发现的且作用重大的抑癌基因,

Runx3 基因的异常表达对肿瘤的发生、发展及化疗耐药起着非常重要的作用。上调 Runx3 基因在癌细胞内的表达,将使癌细胞对化疗药物更加敏感^[9]。因此可推测增强 Runx3 的表达可使癌细胞对化疗药物敏感性增加,提高疗效,相反 Runx3 的表达降低或失活将导致化疗耐药。朴瑛^[20]等发现干扰 Runx3 基因在癌细胞内的表达,使多药耐药基因表达增强,发生耐药。若抗凋亡因素被激活和凋亡因素被抑制,就可使细胞过度增殖而不能启动凋亡信号,这也是许多癌细胞对化疗药物不敏感产生耐药的原因之一^[21]。

随着卵巢癌发病率及病死率的逐年增高,探索卵巢癌的发生发展机制如今备受关注,特别是卵巢癌化疗耐药已成为目前国内外的研究热点,本实验得出抑癌基因 Runx3 与卵巢上皮性癌的发生发展及化疗耐药密切相关。

参考文献(References)

- [1] Tanaka Y, Imamura J, Kanai F, et al. Runx3 interacts with DNA repair protein Ku70[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(15):3251-3260
- [2] 项永兵, 张薇, 高立峰. 恶性肿瘤发病率的时间趋势分析方法[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 2(25):137-142
Xiang Yong-bing, Zhang Wei, Gao Li-feng. The analysis of timetrend in incidence of Malignant tumor [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2004, 2(25):137-142
- [3] Chi XZ, Yang JO, Lee KY, et al. RUNX3 suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p21 (WAF1/Cip1) expression in cooperation with transforming growth factor beta-activated SMAD [J]. *MolCellBio*, 2009, 25(18):8097-8107
- [4] Snove O Jr, Holen T. Many commonly used siRNAs risk Off-target activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(1): 256-263
- [5] 沈铿, 郎景和. 复发性卵巢癌恶性肿瘤的诊治规范[J]. *中华妇产科杂志*, 2003, 38(11):717-720
Shen Keng, Lang Jing-he. Ovarian malignant tumor cancerdiagnosis and treatment standards [J]. *Chinese Journal of Obstetrics and gynecology*, 2003, 38(11): 717-720
- [6] Kononen J, Bubendoff L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-through put molecular profiling of tumor specimens[J]. *Nat Med*, 1998, 4(7):844-847
- [7] Gillett CE, Springall RJ, Barnes DM, et al. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study [J]. *J Pathol*, 2010, 192(4):549-553
- [8] 徐丽娜, 范松青. 组织芯片技术在肿瘤分子标志物研究中的应用[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, 29(3):240-244
Xu Li-na, Fan Song-qing. Tissue microarray technology in cancer biomarker research in the application [J]. *International Journal of pathology and clinical medicine*, 2009, 29 (3):240-244
- [9] Ramirez PT, Deavers M, Gershenson DM. Efficacy of letrozole in the treatment of recurrent platinum-and taxane-resistant high-grade cancer of the ovary or peritoneum [J]. *Gynecologic Oncology*, 2008, 110(1): 56-59
- [10] Bangsow C, Rubins N, Clusman G, et al. The Runx3 gene sequence structure and regulated expression[J]. *Gene*, 2001, 279(2): 221-232
- [11] Subramaniam MM, Clam JJ, Yeoh KG, et al. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 179(6):315-333
- [12] Li WQ, Pan KF, Zhang Y, et al. Runx3 methylation and expression associated with advanced precancerous gastric lesions in a Chinese population[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(3): 406-410
- [13] Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancer and premalignant stages of gastric carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(4): 479-484
- [14] Kodach L L, Jacobs R J, Heijmans J, et al. The role of EZH2 and DNA methylation in the silencing of the tumour suppressor RUNX3 in colorectal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(9): 1567-1575
- [15] Yasuko Yamamura, Lee WL, Inoue KI, et al. RUNX3 cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 5267-5276
- [16] Peng Z, Tang H, Wang X, et al. Inhibition of the growth and metastasis of human colon cancer by restoration of RUNX3 expression in cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(5):979-984
- [17] 位玲霞, 张雪玉, 张师前. 5-Aza-CdR 对人卵巢癌 3AO、SKOV3 细胞增殖凋亡及抑癌基因 Runx3 表达的影响 [J]. *山东医药*, 2007, 47(11):21-23
Wei Ling-xia, Zhang Xue-yu, Zhang Shi-qian. 5-Aza-CdR influences on human ovarian cancer 3AO, SKOV3 cell proliferation apoptosis and expression of tumor suppressor gene Runx3[J]. *Shandong medical journal*, 2007, 47 (11): 21-23
- [18] Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art[J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2005, 15(6):212-220
- [19] Guo CC, Ding J, Yao LP, et al. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bcl-2, MDR-1 and MRP-1 [J]. *Int J Cancer*, 2009, 116(1): 155-160
- [20] 朴瑛, 谢晓冬, 洪流. Runx3 基因对人乳腺癌细胞 BCAP.37 药物敏感性作用的实验研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(10):750-754
Pu Ying, Xie Xiao-dong, Hong Liu, experimental study of effects of RUNX3 gene on drug sensitivity of breast cancer cells BCAP. 37[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2008, 15 (10): 750-754
- [21] 陈春燕, 贾继辉, 潘祥林, 等. 高三尖杉酯碱对 HL60 细胞凋亡的影响及机制的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(7):1183-1186
Chen Chun-yan, Jia Ji-hui, Pan Xiang-lin, et al. Study on the effect of homoharringtonine on apoptosis of HL60 cells and its mechanism [J]. *Chinese Journal of pathophysiology*, 2004, 20 (7):1183-1186