

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170809.012

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170809.1108.024.html>

## 骨肉瘤组织中 Runt 相关转录因子 3 表达量与细胞增殖、血管新生的相关性

谢 斌

(陕西省延安市人民医院骨科三病区, 陕西 延安 716000)

**[摘要]** **目的:**探讨骨肉瘤组织中 Runt 相关转录因子 3(RUNX3)表达量与细胞增殖、血管新生的相关性。**方法:**收集 2014 年 2 月~2017 年 2 月间在本院接受治疗的骨肉瘤患者 80 例,检测肿瘤组织及肉瘤旁组织中 RUNX3 的表达量。进一步根据肿瘤组织 RUNX3 表达量分为 RUNX3 高表达组、RUNX3 低表达组,对比其增殖基因、血管新生基因表达量的差异。**结果:**骨肉瘤组织中 RUNX3、KISS-1、RanBP9 mRNA 表达量显著低于肉瘤旁组织,VCP、Six1、S100A6、IF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 表达量显著高于肉瘤旁组织;RUNX3 高表达组骨肉瘤组织中 KISS-1、RanBP9 mRNA 的表达量高于 RUNX3 低表达组,VCP、Six1、S100A6、HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 的表达量低于 RUNX3 低表达组。**结论:**骨肉瘤组织中 RUNX3 表达量减少,是导致肿瘤增殖活性增高、血管新生旺盛的直接原因之一。

**[关键词]** 骨肉瘤;Runt 相关转录因子 3;细胞增殖;血管新生

**[中图分类号]** R738.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)14-1983-04

### Correlation of Runt-related transcription factor gene 3 expression in osteosarcoma tissue with cell proliferation and angiogenesis

XIE Bin

(Orthopedics Department No. 3 Ward, Yan'an People's Hospital, Yan'an 716000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by Science and Technology Project of Yan'an City (Grant No. 2011ks-09)

[Author]: XIE Bin (1980-), Male, Yan'an Shaanxi, Attending Physician, M.B., Tel: 13992133651, E-mail: xiebin170622@163.com

Received: 2017-06-27 Revised: 2017-07-05

JHMC, 2017;23(14):1983-1986

**View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.**

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the correlation of Runt-related transcription factor gene 3 (RUNX3) expression in osteosarcoma tissue with cell proliferation and angiogenesis. **Methods:** A total of 80 patients with osteosarcoma who were treated in our hospital between February 2014 and February 2017 were collected, and RUNX3 expression in osteosarcoma tissue and adjacent tissue were detected. According to RUNX3 expression in tumor tissue, the 80 patients were further divided into high RUNX3 expression group and low RUNX3 expression group, and proliferation gene and angiogenesis gene expression of two groups were compared. **Results:** RUNX3, KISS-1 and RanBP9 mRNA expression in osteosarcoma tissue were significantly lower than those in adjacent tissue ( $P < 0.05$ ) while VCP, Six1, S100A6, IF-1 $\alpha$ , MMP-14, bFGF and Ang-2 mRNA expression were significantly higher than those in adjacent tissue ( $P < 0.05$ ); KISS-1 and RanBP9 mRNA expression in osteosarcoma tissue of high RUNX3 expression group were significantly higher than those of low RUNX3 expression group ( $P < 0.05$ ) while VCP, Six1, S100A6, IF-1 $\alpha$ , MMP-14, bFGF and Ang-2 mRNA expression were significantly lower than those of low RUNX3 expression group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The decrease of RUNX3 expression in osteosarcoma tissue is one of the direct causes

[基金项目] 延安市科技计划项目(2011KS-09)

[作者简介] 谢斌(1980-),男,陕西延安人,主治医师,学士,本科,电话:0911-2888164,13992133651,Email: xiebin170622@163.com。

[收稿日期] 2017-06-27 [修回日期] 2017-07-05 网络出版时间:2017-08-09 11:08:55

of the increased tumor proliferation activity and strong angiogenesis.

[KEY WORDS] Osteosarcoma; Runt-related transcription factor gene 3; Cell proliferation; Angiogenesis

骨肉瘤是 20 岁以下青少年多见的恶性骨肿瘤,多种基因突变参与其发生发展,近年较多学者认为 Runt 相关转录因子 3(RUNX3)的表达改变可能直接参与了骨肉瘤的恶性进展<sup>[1,2]</sup>。RUNX3 属于 Runt 相关转录因子家族,已经有细胞研究证实 RUNX3 基因敲除可导致多种肿瘤发生<sup>[3,4]</sup>,但是目前关于 RUNX3 与骨肉瘤相关关系的研究开展不多。为了明确 RUNX3 在骨肉瘤病情进展中扮演的角色,本次研究对比骨肉瘤组织、肉瘤旁组织中 RUNX3 基因的表达量差异,并进一步探讨骨肉瘤组织中 RUNX3 基因差异性表达对肿瘤增殖及血管新生等恶性行为的影响,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

纳入 2014 年 2 月~2017 年 2 月间在本院接受治疗的骨肉瘤患者 80 例作为研究对象,患者家属签署知情同意书。入组患者中男性 43 例、女性 37 例,年龄 11~25 岁,医院伦理委员会批准此研究实施。入组标准如下:(1)组织病理学确诊骨肉瘤;(2)首次入院接受检查及治疗,既往无手术及药物治疗史;(3)配合相关临床检查、数据完整。排除标准如下:(1)转移性骨肉瘤;(2)合并其他组织脏器恶性肿瘤。

### 1.2 RUNX3 表达量

取骨肉瘤组织、肉瘤旁组织,加入 Trizol 试剂(上海信帆生物科技有限公司,货号 15596-026)裂解细胞后高速离心取上层无色水相,等体积异丙醇(南京森贝伽生物科技有限公司,货号 0918)沉淀总 RNA 并清洗室温干燥。按照反转录试剂盒(Biomiga 公司,货号 RT021301)操作说明合成样品 cDNA。取 cDNA 标本 50  $\mu$ g,据荧光定量 PCR 试剂盒(深圳子科生物科技有限公司,货号 zk7340)操作说明,进行 RUNX3 mRNA 扩增。

### 1.3 增殖基因、血管新生基因表达量

取骨肉瘤组织,扩增增殖基因:KISS-1、VCP、RanBP9、Six1、S100A6;血管新生基因:HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 的 mRNA,具体步骤同 1.2。

### 1.4 统计学处理

统计软件选择 SPSS20.0。RUNX3 表达量、肿瘤细胞增殖基因表达量、血管新生基因表达量均属于计量资料,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,设置  $P<0.05$  为差异有统计学意义的标准。

## 2 结果

### 2.1 RUNX3 表达量

肉瘤旁组织中 RUNX3 mRNA 表达量为 (93.26  $\pm$  11.53),骨肉瘤组织中 RUNX3 mRNA 表达量为 (27.51  $\pm$

4.09)。骨肉瘤组织中 RUNX3 mRNA 表达量显著低于肉瘤旁组织。骨肉瘤组织、肉瘤旁组织中 RUNX3 mRNA 表达量的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.2 RUNX3 表达量与肿瘤细胞增殖

骨肉瘤组织和肉瘤旁组织中增殖基因 KISS-1、VCP、RanBP9、Six1、S100A6 mRNA 表达量的分析如下:骨肉瘤组织中 KISS-1、RanBP9 mRNA 的表达量显著低于肉瘤旁组织,VCP、Six1、S100A6 mRNA 的表达量显著高于肉瘤旁组织,骨肉瘤组织和肉瘤旁组织中 KISS-1、VCP、RanBP9、Six1、S100A6 mRNA 表达量的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

不同 RUNX3 表达量的骨肉瘤组织中增殖基因 KISS-1、VCP、RanBP9、Six1、S100A6 mRNA 表达量的比较如下:RUNX3 高表达组骨肉瘤组织中 KISS-1、RanBP9 mRNA 的表达量显著高于 RUNX3 低表达组,VCP、Six1、S100A6 mRNA 的表达量显著低于 RUNX3 低表达组。RUNX3 高表达组、RUNX3 低表达组中增殖基因 KISS-1、VCP、RanBP9、Six1、S100A6 mRNA 表达量的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1、2。

表 1 骨肉瘤组织和肉瘤旁组织中增殖基因表达量的比较( $n=80, \bar{x}\pm s$ )

组织来源	KISS-1	VCP	RanBP9	Six1	S100A6
骨肉瘤	45.37 $\pm$ 5.21	199.84 $\pm$ 22.16	61.75 $\pm$ 8.28	228.53 $\pm$ 30.47	203.21 $\pm$ 25.88
肉瘤旁	104.29 $\pm$ 13.73	101.73 $\pm$ 8.59	102.36 $\pm$ 12.51	101.48 $\pm$ 12.53	102.64 $\pm$ 11.52
<i>t</i>	12.487	9.948	8.671	13.048	10.586
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 不同 RUNX3 表达量的骨肉瘤组织中增殖基因表达量的比较( $n=40, \bar{x}\pm s$ )

RUNX3	KISS-1	VCP	RanBP9	Six1	S100A6
低表达组	20.12 $\pm$ 3.48	262.35 $\pm$ 31.58	42.31 $\pm$ 5.68	302.37 $\pm$ 48.84	264.41 $\pm$ 32.68
高表达组	79.41 $\pm$ 9.35	137.54 $\pm$ 15.69	77.65 $\pm$ 9.42	142.58 $\pm$ 19.39	141.25 $\pm$ 15.58
<i>t</i>	27.948	9.182	7.884	12.485	8.685
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.3 RUNX3 表达量与血管新生

骨肉瘤组织和肉瘤旁组织中血管新生基因 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 表达量的分析如下:骨肉瘤组织中 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 的表达量显著高于肉瘤旁组织,骨肉瘤组织和肉瘤旁组织中 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 表达量的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。不同 RUNX3 表达量的骨肉瘤组织中血管新生基因 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 表达量的比较如下:RUNX3 高表达组骨肉瘤组织中 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 的表达量均显著低于 RUNX3 低表达组。RUNX3 高表达组、RUNX3 低表达组中血管新生基因 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 表达量的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 3、4。

表 3 骨肉瘤组织和肉瘤旁组织中血管新生基因表达量的比较 ( $n=80, \bar{x} \pm s$ )

组织来源	HIF-1 $\alpha$	MMP-14	bFGF	Ang-2
骨肉瘤	205.61 $\pm$ 26.04	188.27 $\pm$ 20.15	191.47 $\pm$ 25.53	229.66 $\pm$ 32.23
肉瘤旁	99.37 $\pm$ 10.82	98.58 $\pm$ 9.71	102.16 $\pm$ 13.42	101.74 $\pm$ 10.53
<i>t</i>	11.487	9.192	9.372	13.028
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 不同 RUNX3 表达量的骨肉瘤组织中血管新生基因表达量的比较 ( $n=40, \bar{x} \pm s$ )

RUNX3	HIF-1 $\alpha$	MMP-14	bFGF	Ang-2
低表达组	276.54 $\pm$ 35.69	248.69 $\pm$ 29.58	262.38 $\pm$ 31.28	323.48 $\pm$ 42.59
高表达组	147.58 $\pm$ 17.84	132.51 $\pm$ 17.84	138.55 $\pm$ 17.84	140.39 $\pm$ 17.84
<i>t</i>	9.182	8.689	9.583	13.585
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 3 讨论

骨肉瘤是临床恶性程度较高的肿瘤,早期转移是导致患者死亡的重要原因之一,寻找与肿瘤恶性程度密切相关的基因是未来靶向治疗实践的关键。RUNX3 基因在胚胎发育过程中扮演重要角色,目前已经证实在宫颈癌、胃癌等肿瘤组织中表达减少甚至缺失,故有学者认为 RUNX3 是一种新的抑癌基因<sup>[5-7]</sup>。目前关于 RUNX3 在骨肉瘤组织中的表达改变及对肿瘤细胞恶性生物学行为的影响等研究开展较少,本次研究以此作为研究重点,在下文中就 RUNX3 表达改变与骨肉瘤发生发展的关系进行探讨,以期为远期骨肉瘤发生机制及基因治疗提供实践依据。本次研究首先对比骨肉瘤组织、肉瘤旁组织中 RUNX3 基因表达量的差异,发现:与肉瘤旁组织相比,骨肉瘤组织中 RUNX3 mRNA 表达量较低,这与宫颈癌中 RUNX3 基因表达改变趋势相同,证实 RUNX3 基因的表达减少参与了骨肉瘤的发生,但关于 RUNX3 基因表达改变对肿瘤组织恶性行为的影响有待下文进一步研究明确。

肿瘤细胞促增殖/抗增殖基因表达失衡是导致其无限增殖发生的根本原因,检测骨肉瘤组织中增殖相关基因的表达量可量化反应肿瘤增殖活性<sup>[8]</sup>。KISS-1 基因表达对肿瘤细胞增殖具有一定抑制作用,通过激活 Rho 及其相关激酶并诱导肿瘤坏死因子表达<sup>[9]</sup>。VCP 参与多种细胞增殖、凋亡活性的调控,研究显示沉默 VCP 表达后骨肉瘤细胞的增殖活性下降<sup>[10,11]</sup>。RanBP9 广泛表达于人类不同组织,与细胞黏附迁移密切相关,被发现在骨肉瘤细胞中呈低表达,可能作为一个抑癌基因参与骨肉瘤的发生<sup>[12]</sup>。Six1 基因主要参与眼耳、肌肉等组织发育,最新研究证实该基因在多种恶性肿瘤中呈高表达,抑制其表达可减弱肿瘤细胞的增殖转移能力<sup>[13]</sup>。

S100A6 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进骨肉瘤细胞增殖、侵袭<sup>[14]</sup>。本文通过分析骨肉瘤组织中上述增殖基因的表达量可知:骨肉瘤组织中 KISS-1、RanBP9 mRNA 的表达量显著低于肉瘤旁组织, VCP、Six1、S100A6 mRNA 的表达量显著高于肉瘤旁组织,进一步分析不同 RUNX3 表达量的骨肉瘤组织中上述增殖基因表达量的差异可知:与 RUNX3 低表达组, RUNX3 高表达组肿瘤组织中 KISS-1、RanBP9 mRNA 表达量较高, VCP、Six1、S100A6 mRNA 的表达量较低,结合各个基因的生理学作用,证实低表达的 RUNX3 可促进骨肉瘤细胞的增殖活性。

旺盛的血管新生为肿瘤细胞的增殖侵袭提供氧气及养分,故肿瘤组织中促血管新生指标表达量可间接反映肿瘤恶性程度。肿瘤组织内部处于缺氧状态,可诱导 HIF-1 $\alpha$  过量表达并诱导 VEGF 基因表达,加速肿瘤内部血管形成<sup>[15]</sup>。MMP-14 是一种跨膜蛋白水解酶,在降解细胞外基质的同时具有一定促肿瘤血管生成的作用。bFGF 是最重要的血管生成因子之一,与肿瘤血管生成的关系十分密切,随肿瘤恶性程度增加、bFGF 表达量上升<sup>[16]</sup>。Ang-2 是对血管内皮细胞具有专一性的促血管生成因子,可促进血管内皮细胞存活并诱导血管成熟<sup>[17]</sup>。本文通过分析骨肉瘤组织中上述血管新生基因的表达量可知:骨肉瘤组织中 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 的表达量显著高于肉瘤旁组织。进一步分析不同 RUNX3 表达量的骨肉瘤组织中上述血管新生因子基因表达量的差异可知:与 RUNX3 低表达组相比, RUNX3 高表达组肿瘤组织中血管新生基因 HIF-1 $\alpha$ 、MMP-14、bFGF、Ang-2 mRNA 表达量较低。由此证实低表达的 RUNX3 可促进骨肉瘤血管新生。

综上所述,骨肉瘤组织中 RUNX3 基因表达量减少,且 RUNX3 基因表达量与肿瘤细胞增殖活性、血管新生活性均呈负相关。

### 参考文献

- Osati E, Kaijage A, Muta R, et al. Osteosarcoma of the lower limb metastasized to the septum and right side of the heart: a case report[J]. J Med Case Rep, 2017, 11(1): 156.
- Mehdinejad M, Sobhan MR, Mazaheri M, et al. Genetic association between ERCC2, NBN, RAD51 gene variants and osteosarcoma risk: a systematic review and Meta-analysis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(5): 1315-1321.
- Heng L, Jia Z, Bai J, et al. Molecular characterization of metastatic osteosarcoma: Differentially expressed genes, transcription factors and microRNAs [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(5):

- 2829-2836.
- 4 Lin Z, Luo M, Chen X, et al. Combined detection of plasma ZIC1, HOXD10 and RUNX3 methylation is a promising strategy for early detection of gastric cancer and precancerous lesions [J]. *J Cancer*, 2017, 8(6): 1038-1044.
  - 5 Li H, Li D, Meng N. Effects of RUNX3 mediated Notch signaling pathway on biological characteristics of colorectal cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 2059-2068.
  - 6 Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, et al. Cytoplasmic localization of RUNX3 via histone deacetylase-mediated SRC expression in oxidative-stressed colon cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(7): 1914-1921.
  - 7 Kim BR, Kang MH, Kim JL, et al. RUNX3 inhibits the metastasis and angiogenesis of colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5): 2601-2608.
  - 8 Yuan Z, Mo H, Mo L, et al. Suppressive effect of microRNA-138 on the proliferation and invasion of osteosarcoma cells via targeting SIRT1 [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3417-3423.
  - 9 Yin Y, Tang L, Shi L. The metastasis suppressor gene KISS-1 regulates osteosarcoma apoptosis and autophagy processes [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3): 1286-1290.
  - 10 He JY, Xi WH, Zhu LB, et al. Knockdown of Aurora-B alters osteosarcoma cell malignant phenotype via decreasing phosphorylation of VCP and NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3895-3902.
  - 11 Long XH, Zhou YF, Peng AF, et al. Demethylation-mediated miR-129-5p up-regulation inhibits malignant phenotype of osteogenic sarcoma by targeting Homo sapiens valosin-containing protein (VCP) [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3799-3806.
  - 12 Dai H, Lv YF, Yan GN, et al. RanBP9/TSSC3 complex cooperates to suppress anoikis resistance and metastasis via inhibiting Src-mediated Akt signaling in osteosarcoma [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2572.
  - 13 Chao L, Liu J, Zhao D. Increased Six1 expression is associated with poor prognosis in patients with osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 2891-2896.
  - 14 Li Y, Wagner ER, Yan Z, et al. The calcium-binding protein S100A6 accelerates human osteosarcoma growth by promoting cell proliferation and inhibiting osteogenic differentiation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6): 2375-2392.
  - 15 Zhang XD, Wu Q, Yang SH. Effects of siRNA-mediated HIF-1 $\alpha$  gene silencing on angiogenesis in osteosarcoma [J]. *Pak J Med Sci*, 2017, 33(2): 341-346.
  - 16 Zhao J, Zhang ZR, Zhao N, et al. Retraction note to: VEGF silencing inhibits human osteosarcoma angiogenesis and promotes cell apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2017, 75(2): 255.
  - 17 Tsai HC, Tzeng HE, Huang CY, et al. WISP-1 positively regulates angiogenesis by controlling VEGF-A expression in human osteosarcoma [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(4): e2750.
- 
- (上接第 1982 页)
- 9 Bandiera E, Zanotti L, Fabricio AS, et al. Cancer antigen 125, human epididymis 4, kallikrein 6, osteopontin and soluble mesothelin-related peptide immunocomplexed with immunoglobulin M in epithelial ovarian cancer diagnosis [J]. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM/FESCC*, 2013, 51(9): 1815-1824.
  - 10 于俊丽. 紫杉醇联合卡铂不同给药途径治疗卵巢癌 52 例疗效分析 [J]. *中国现代药物应用*, 2015, 9(3): 134-135.
  - 11 谭理慧, 吕燕华, 王喜华. 紫杉醇联合顺铂不同给药途径治疗晚期卵巢癌的疗效观察 [J]. *肿瘤药学*, 2012, 2(1): 16-64.
  - 12 Gislefoss RE, Langseth H, Bolstad N, et al. HE4 as an Early Detection Biomarker of Epithelial Ovarian Cancer: Investigations in Prediagnostic Specimens From the Janus Serumbank [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2015, 25(9): 1608-1615.
  - 13 宋晓翠, 张文珺, 滕洪涛, 等. 血清 HE4、CA125 联合检测在卵巢癌术后复发诊断中的应用 [J]. *山东医药*, 2012, 52(14): 75-76.
  - 14 McIntosh MW, Drescher C, Karlan B, et al. Combining CA125 and SMR sera markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 95(1): 9-15.
  - 15 张春艳. 卵巢癌患者手术治疗前后血清 CA125、CA19-9、CEA 和 SA 检测的临床评价 [J]. *放射免疫学杂志*, 2011, 24(4): 389-390.
  - 16 张丽丽, 邵淑丽, 武燕. OPN 和 B7-H4 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及意义 [J]. *癌症*, 2010, 29(1): 25-29.
  - 17 Van Dalen A, Favier J, Burges A, et al. Prognostic significance of CA 125 and TPS levels after 3 chemotherapy courses in ovarian cancer patients [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 79(3): 444-450.
  - 18 姚永良, 刘琴, 李祥元等. 血清 HE4、TPS 和 CA125 联检在卵巢癌诊断中的应用价值 [J]. *放射免疫学杂志*, 2010, 23(4): 409-411.
  - 19 Crispin TH, Louisa SC, Rathi G, et al. Vascular endothelial growth factor a promotes vaccinia virus entry into host cells via activation of the akt pathway [J]. *J Virol*, 2013, 87(5): 2781 - 2790.
  - 20 Fluegen G, Jankowiak F, Foehrding LZ, et al. Intrahepatic endometriosis as differential diagnosis: case report and literature review [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2013, 19(29): 4818-4822.