

# RUNX3 与 Survivin 在子宫内膜癌中的表达

张海凤 吕秀萍\* 徐咏莲 封 硕 刘 华

(山东省潍坊医学院附属医院妇科, 潍坊 261000)

**【摘要】 目的** 探讨 RUNX3 和 Survivin 在子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)组织中的表达。 **方法** 采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-peroxidase, SP)检测 20 例正常增生期子宫内膜、20 例非典型增生子宫内膜、60 例 EC 组织中 RUNX3 和 Survivin 蛋白的表达, 比较其差异。 **结果** 在 EC 中, RUNX3 和 Survivin 蛋白的阳性表达率分别是 25.0% (15/60) 和 91.7% (55/60), 随着组织学分级升高及分期进展, RUNX3 阳性表达率逐渐降低( $\chi^2 = 16.275, P = 0.000$ ), 而 Survivin 蛋白表达逐渐升高( $\chi^2 = 6.251, P = 0.044$ ), 两者阳性表达率均与肌层浸润深度、淋巴结转移及有无脉管浸润无关( $P$  均  $> 0.05$ )。Survivin 蛋白在 EC 中的阳性表达率 91.7% (55/60) 明显高于正常增生期 15.0% (3/20) 和非典型增生子宫内膜 65.0% (13/20) ( $\chi^2 = 44.221, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 8.848, P = 0.000$ ), 其中正常增生期与非典型增生子宫内膜 Survivin 蛋白表达阳性率有统计学差异( $\chi^2 = 8.640, P = 0.003$ )。RUNX3 蛋白在 EC 中的阳性表达率 25.0% (15/60) 明显低于正常增生期 90.0% (18/20) 和非典型增生子宫内膜 60.0% (12/20) ( $\chi^2 = 26.151, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 8.218, P = 0.004$ ), 正常增生期与非典型增生子宫内膜 RUNX3 蛋白阳性表达率无统计学差异( $\chi^2 = 3.333, P = 0.068$ )。 **结论** EC 中 RUNX3 蛋白表达较低或缺失, Survivin 蛋白表达较高。

**【关键词】** 子宫内膜癌; RUNX3; Survivin; 免疫组织化学

中图分类号: R737.33

文献标识: A

文章编号: 1009-6604(2012)05-0450-04

**Expression of RUNX3 and Survivin in Endometrial Carcinoma** Zhang Haifeng, Lü Xiuping, Xu Yonglian, et al. Department of Gynecology, Weifang Medical College Affiliated Hospital, Weifang 261000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of RUNX3 and Survivin protein in endometrial carcinoma (EC). **Methods** The expression of RUNX3 and Survivin protein in endometrial carcinoma (EC,  $n = 60$ ), atypical endometrial hyperplasia ( $n = 20$ ) and normal endometrial tissues ( $n = 20$ ) were examined by immunohistochemistry (SP method). **Results** In EC, the positive expression rates of RUNX3 and Survivin were 25.0% (15/60) and 91.7% (55/60), respectively. With the histological grade increasing and FIGO stage progressing, the positive expression rate of RUNX3 decreased ( $\chi^2 = 16.275, P = 0.000$ ), and that of Survivin increased ( $\chi^2 = 6.251, P = 0.044$ ). The expression of RUNX3 and survivin were not related to the depth of muscular invasion, lymph node metastasis and lymphatic vessel invasion (all  $P > 0.05$ ). The positive expression rate of Survivin protein in EC (91.7%, 55/60) was significantly higher than that in normal proliferative endometrium (15.0%, 3/20) and atypical endometrial hyperplasia (65.0%, 13/20) ( $\chi^2 = 44.221, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 8.848, P = 0.000$ ), and between normal endometrium and atypical endometrial hyperplasia, the positive expression rate of Survivin protein was also significant different ( $\chi^2 = 8.640, P = 0.003$ ). Whereas, the positive rate of RUNX3 in EC (25.0%, 15/60) was significantly lower than that in normal proliferative endometrium (90.0%, 18/20) and atypical endometrial hyperplasia (60.0%, 12/20) ( $\chi^2 = 26.151, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 8.218, P = 0.004$ ), and between normal proliferative endometrium and atypical endometrial hyperplasia, the positive expression rate of RUNX3 protein was not significantly different ( $\chi^2 = 3.333, P = 0.068$ ). **Conclusion** The expression of RUNX3 protein is lower or absent in EC, but the expression of Survivin protein is higher.

**【Key Words】** Endometrial carcinoma; RUNX3; Survivin; Immunohistochemistry

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖道三大恶性肿瘤之一,近年来发病率逐年升高,在美国,EC 与宫颈癌的发病率由 20 世纪 60 年代的 1:10 上升到现今的 1:1,在我国,其发病率居妇科恶性肿瘤的第 2 位<sup>[1]</sup>。关于 EC 的发病原因尚未明确,从基因水平上研究其发病机制及相关因子之间

的关系成为近年来的热点。RUNX3 基因是一个新型抑癌基因<sup>[2]</sup>,在控制细胞生长、增殖及分化中起十分重要的负调节作用,并能潜在抑制肿瘤生长,其功能失活可导致细胞恶性转化,肿瘤发生。Survivin 基因是新近发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)基因家族的新成员<sup>[3]</sup>,具有

\* 通讯作者, E-mail: xiuping927@163.com

抑制细胞凋亡和调节细胞有丝分裂的双重作用。近年来,许多研究显示抑癌基因(RUNX3)、凋亡抑制基因(Survivin)与多种恶性肿瘤如 EC、宫颈癌、卵巢癌<sup>[4]</sup>、胃癌<sup>[5]</sup>等的发生发展有密切关系,但关于两者在 EC 中的表达及与 EC 的关系国内外研究尚不多见。本研究应用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-peroxidase, SP)检测 RUNX3 和 Survivin 蛋白在 EC、非典型增生子宫内膜及正常增生期子宫内膜组织中的表达,并分析两者与 EC 临床病理参数的关系。

1 材料与方法

1.1 标本选择

选取潍坊医学院附属医院 2008 年 1 月~2010 年 12 月手术切除并经病理证实的 EC 存档标本 60 例,年龄 25~81 岁,平均 53 岁。选取非典型增生子宫内膜 20 例,增生期子宫内膜 20 例作为对照。依据 2009 年修订的国际妇产科联盟(FIGO)EC 的手术-病理分期标准进行分期:I 期 37 例,II 期 11 例,III 期 12 例;病理分级 G1 26 例,G2 18 例,G3 16 例;子宫肌壁浸润深度<1/2 36 例,≥1/2 24 例;淋巴结无转移 48 例,有转移 12 例;淋巴脉管无浸润 53 例,浸润 7 例。所选标本临床病历资料完整,术前均未接受放疗、化疗或激素治疗。所有标本诊断经 2 名病理医师再次审核。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化方法 RUNX3 抗体、Survivin 抗体、SP 试剂盒及 3-3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂均购自北京中杉生物制品有限公司。标本均经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋标本,连续切片,厚度为 4 μm。采用 SP 法,按试剂盒说明书操作步骤进行。DAB 显色,苏木素复染。用已知的阳性切片作为阳性对照,分别用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替 2 种一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

RUNX3 蛋白主要定位于细胞质,部分胞核表

达, Survivin 主要定位于细胞质,两者阳性细胞均呈现均匀的棕黄色或棕褐色颗粒。按半定量积分法<sup>[6]</sup>判定表达结果,该方法灵敏度高,非特异性干扰少,简便易行,结果可靠,尤其适用于比较实验的定量观察,具体方法:每张切片随机观察 10 个视野,高倍镜下(×400)计数 100~500 个细胞,先根据染色强度计分:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分,再根据阳性细胞百分率计分:≤25% 为 0 分,26%~50% 为 1 分,51%~75% 为 2 分,>75% 为 3 分,两项得分相乘,积分数≥2 分为阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,组间比较采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RUNX3 蛋白与 Survivin 蛋白在 EC 组织中的表达

RUNX3 蛋白阳性表达为正常子宫内膜或 EC 细胞质内呈现均匀的棕黄色或棕褐色颗粒,少量胞核表达。RUNX3 表达在增生期内膜组、内膜非典型增生组、EC 组逐渐下降,阳性率分别为 90.0% (18/20)、60.0% (12/20)、25.0% (15/60),3 组比较差异有显著性( $\chi^2=27.879, P=0.000$ ),见表 1 和图 1~3。Survivin 蛋白阳性表达在增生期子宫内膜或 EC 细胞质内呈现均匀的棕黄色或棕褐色颗粒。Survivin 蛋白阳性率在增生期内膜组、内膜非典型增生组及 EC 组中呈逐渐升高趋势,阳性率分别为 15.0% (3/20)、65.0% (13/20)、91.7% (55/60),3 组比较有显著性差异( $\chi^2=43.175, P=0.000$ ),见表 1 和图 4~6。

2.2 RUNX3 与 Survivin 的表达与 EC 临床病理参数的关系

EC 中 RUNX3 与 Survivin 的表达率均与组织学分级及手术-病理分有关( $P<0.05$ ),而与肌层浸润、淋巴结转移及淋巴脉管浸润均无关( $P>0.05$ ),见表 2。

表 1 EA 组织中 RUNX3 与 Survivin 的表达

组别	RUNX3 蛋白			Survivin 蛋白		
	阴性	阳性	阳性率(%)	阴性	阳性	阳性率(%)
EC 组( $n=60$ )①	45	15	25.0	5	55	91.7
增生期内膜组( $n=20$ )②	2	18	90.0	17	3	15.0
内膜非典型增生组( $n=20$ )③	8	12	60.0	7	13	65.0
$\chi^2, P$ 值	27.879, 0.000			43.175, 0.000		
$\chi^2_{1-2}, P$ 值	26.151, 0.000			44.221, 0.000		
$\chi^2_{1-3}, P$ 值	8.218, 0.004			8.848, 0.003		
$\chi^2_{2-3}, P$ 值	3.333, 0.068			8.640, 0.003		

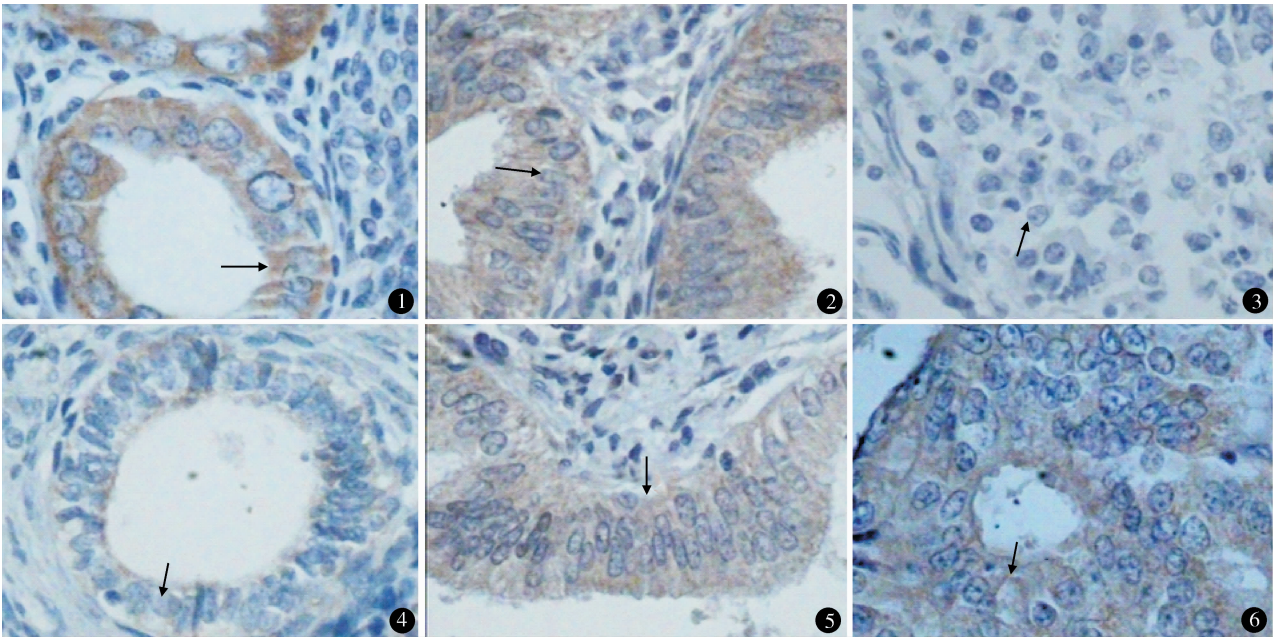


图 1 ~ 3 RUNX3 分别在增生期子宫内膜、不典型增生子宫内膜及 EC 组织中表达,棕黄色或棕褐色颗粒代表 RUNX3 阳性表达 免疫组化 SP 染色 ×400 图 4 ~ 6 Survivin 分别在增生期子宫内膜、不典型增生子宫内膜及 EC 组织中表达,棕黄色或棕褐色颗粒代表 Survivin 阳性表达 免疫组化 SP 染色 ×400

表 2 RUNX3 和 Survivin 与 EC 临床病理学参数的关系			
临床病理学参数	n	RUNX3 阳性率	Survivin 阳性率
组织分级			
G1	26	61.5% (16/26)	65.3% (17/26)
G2	18	33.3% (6/18)	88.9% (16/18)
G3	16	0 (0/16)	93.8% (15/16)
$\chi^2, P$ 值		16.275, 0.000	6.251, 0.044
手术 - 病理分期			
I	37	59.4% (22/37)	64.9% (24/37)
II	11	36.4% (4/11)	81.9% (9/11)
III	12	16.7% (2/12)	100.0% (12/12)
$\chi^2, P$ 值		7.241, 0.027	6.300, 0.043
肌层浸润深度			
< 1/2	36	58.3% (21/36)	77.8% (28/36)
≥ 1/2	24	37.5% (9/24)	91.7% (22/24)
$\chi^2, P$ 值		2.500, 0.114	1.125, 0.289
淋巴结转移			
无	48	47.9% (23/48)	79.2% (38/48)
有	12	25.0% (3/12)	100.0% (12/12)
$\chi^2, P$ 值		2.053, 0.152	1.000 *
脉管浸润			
无	53	52.8% (28/53)	86.8% (46/53)
有	7	28.6% (2/7)	100.0% (7/7)
$\chi^2, P$ 值		0.647, 0.421	0.584 *

\* Fisher's 检验

3 讨论

RUNX3 基因是近年来发现的一种新型抑癌基因,定位于染色体 1p36.1 上,含有 P1 和 P2 2 个启动子、6 个外显子和 1290 bp 的开放阅读框,总长约 67 kb<sup>[2]</sup>。RUNX3 蛋白作为转化生长因子 β (transforming growth factor β, TGF-β) 信号转导通路下游的一个转录因子<sup>[7]</sup>,在功能上是承上启下的

“桥梁”,负责结合 DNA,指导活化的细胞内信号转导分子 Smad 复合物从细胞质内转入到细胞核内的特定靶位点,并与 RUNX3 转录因子相互作用共同调控靶基因的转录,指导细胞分化、周期调控、凋亡和恶性转化,参与 TGF-β 对上皮细胞生长的负性调控。Smad 蛋白为 Smads (drosophila mothers against decapentaplegic protein) 家族中的一员,与 TGF-β 信号转导通路的配体、受体组成 TGF-β/Smad 肿瘤抑制信号通路。因此, RUNX3 低表达可导致 TGF-β/Smad 信号途径紊乱,进而引发细胞的凋亡障碍,导致肿瘤的发生<sup>[8]</sup>。郭真理等<sup>[9]</sup>、乔玉环等<sup>[10]</sup>的研究表明 RUNX3 蛋白在正常子宫内膜中表达显著高于内膜非典型增生及 EC ( $P < 0.01$ ),并且表达水平从正常内膜到各型增生再到 EC 组织呈递减趋势。提示从正常子宫内膜经过癌前病变发展为 EC 是一个逐步的移行过程,癌组织中明显下调的 RUNX3 表达有促进 EC 发生发展的作用,这可能因为 RUNX3 基因失活导致 TGF-β 信号传导紊乱,失去对细胞生长、增殖的负性调节及诱导凋亡的作用,从而使子宫内膜腺上皮过度增生和分化异常并促进 EC 的发生。随着 EC 的组织学分级升高和手术 - 病理分期进展, RUNX3 表达缺失趋于明显 ( $P < 0.05$ ),与 Yoshizaki 等<sup>[11]</sup>的研究结果相似,即 8 例增殖期子宫内膜组织中均阳性表达 RUNX3 蛋白, 21 例 EC 组织中 9 例 (42.9%) 阳性表达 RUNX3 蛋白, RUNX3 蛋白的阳性表达率随 EC 的组织学分级的增高而降低,尤其在低分化 EC 中, RUNX3 蛋白表达完全缺失。本研究显示, RUNX3 蛋白在 EC 中的表

达显著低于增生期内膜和非典型增生内膜( $\chi^2 = 26.151, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 8.218, P = 0.000$ ),且随肿瘤组织分级升高及手术-病理分期进展,RUNX3 表达缺失趋于明显( $\chi^2 = 16.275, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 7.241, P = 0.027$ ),这与上述学者的研究结果均相似,提示 RUNX3 表达下调可导致细胞恶性转化并可能促使肿瘤细胞生长、侵袭及转移,是 EC 发生发展的重要因素。

Survivin 基因是 IAPs 家族中的新成员,定位于 17 号染色体 q25 区,基因全长 14.7 kb,编码产生由 142 个氨基酸组成的相对分子质量为 16.5 的 Survivin 蛋白<sup>[3]</sup>,该蛋白出现在胚胎发育过程中,在成人组织中低表达或无表达,但人体几乎所有的恶性肿瘤中均呈高表达。Survivin 这种选择性的表达特点使其在肿瘤发生、发展及治疗中的研究日益受到重视。其在细胞周期 G2/M 期,通过与细胞有丝分裂纺锤体的微管结合,参与对细胞基因转录的调节,并间接抑制半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(caspase)对纺锤体的水解作用,可保护有丝分裂细胞器的完整性,从而抑制细胞凋亡。Survivin 的过度表达尚可使细胞失去正常增殖周期凋亡关卡的限制,促进细胞的异常增殖。本研究显示,EC 组和内膜非典型增生组中 Survivin 的表达率分别为 91.7% (55/60) 和 65.0% (13/20),均明显高于增生期内膜组( $\chi^2 = 44.221, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 8.640, P = 0.003$ ); EC 组与内膜非典型增生组相比有显著性差异( $\chi^2 = 8.848, P = 0.003$ )。Survivin 的表达强度与 EC 组织学分级和手术-病理分期有关( $\chi^2 = 6.251, P = 0.044$ ;  $\chi^2 = 6.300, P = 0.043$ ),与肌层浸润、淋巴结转移及有无脉管浸润无关( $\chi^2 = 1.125, P = 0.289$ ; Fisher's 检验,  $P = 1.000$ ; Fisher's 检验,  $P = 0.584$ );Ⅲ期的表达率明显高于Ⅰ期(Fisher's 检验,  $P = 0.014$ ),即肿瘤分化越差,分期越晚,Survivin 蛋白的表达越高,提示 Survivin 蛋白在肿瘤形成的早期阶段和中晚期进展阶段都发挥着重要作用。Erkanli 等<sup>[12]</sup>认为 Survivin 过表达可能是 EC 形成过程中的早期事件。因此,我们推测 Survivin 蛋白可能通过抑制细胞凋亡并为存在基因缺陷的细胞提供生存优势,进一步促使基因突变的积聚和细胞恶性转化,在 EC 的发生、发展中发挥重要作用。

EC 中的 Survivin 蛋白表达率升高,RUNX3 表达率降低,提示 EC 中 Survivin 抑制细胞凋亡的同时,还存在抑癌基因 RUNX3 的表达降低或缺失,从而使细胞持续增殖,导致肿瘤的发生、发展。随着 EC 的发展,Survivin 的表达越来越强,RUNX3 的表达却越来越弱。Survivin 和 RUNX3 表达的异常,可能是导致细胞的凋亡和增殖失控重要因素,Survivin 表达的异常,使细胞凋亡抑制失控,同时 RUNX3 表达降低使细胞增殖能力加强和诱导凋亡能力的减弱,两者共同作用,诱发肿瘤的发生,并可能促进肿

瘤的发展。Survivin 可通过直接抑制凋亡通路下游蛋白酶 caspase-3 和 caspase-7 发挥抗凋亡作用<sup>[13]</sup>,亦有研究<sup>[14]</sup>显示恢复 RUNX3 表达可导致 cyclinD 表达下调,而上调 p27 和 caspase-3, caspase-7 的表达, cyclinD 可促进细胞增殖,而 p27 是重要的细胞生长周期抑制因子, caspase-3, caspase-7 直接参与凋亡的起始与执行,提示 RUNX3 诱导凋亡的潜在机制。

综上所述,处在上游的 RUNX3 蛋白功能的改变可能影响了 TGF- $\beta$  超家族的活性,进而通过一系列连锁反应影响到下游的 Survivin 蛋白,导致细胞的凋亡和增殖失控,说明 Survivin 和 RUNX3 可能均参与了 EC 的发生、发展过程,且在此过程中两者可能既有协同作用又存在拮抗作用,但两者具体的作用机制有待进一步的研究和探讨。

## 参考文献

- 1 Kellert IM, Botterweck AA, Huveneers JA, et al. Trends in incidence of and mortality from uterine and ovarian cancer in Mid and South Limburg, The Netherlands, 1986 - 2003. *Eur J Cancer Prev*, 2009, 18(1): 85 - 89.
  - 2 Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, et al. AML1, AML2 and AML3, the Human Member of the Runt Domain gene family: cDNA structure, expression and chromosomal localization. *Genomic*, 1994, 23(2): 425 - 432.
  - 3 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene Survivin expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917 - 921.
  - 4 杨琼娇, 许淑媛, 黄晓明, 等. RUNX3 和 Survivin 在卵巢上皮性癌中的表达及其临床意义. *临床和实验医学杂志*, 2011, 10(2): 87 - 89.
  - 5 孙 健. RUNX3 和 Survivin 及 p27 蛋白在胃癌中的表达及相关性研究. *中国自然医学杂志*, 2010, 12(3): 170 - 172.
  - 6 Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1983, 15: 10 - 17.
  - 7 Fukamachi H. Runx3 controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals. *Dev Growth Differ*, 2006, 48(1): 1 - 13.
  - 8 Li J, Kleeff J, Guweidhi A. RUNX3 expression in primary and metastatic pancreatic cancer. *J Clin Pathol*, 2004, 57(3): 294 - 299.
  - 9 郭真理, 陈 柯, 王晓秋, 等. 子宫内膜样腺癌中 MDM2、EZH2 和 RUNX3 的表达及其相关性. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(6): 688 - 691.
  - 10 乔玉环, 冯秀丽. RUNX3 和 EZH2 蛋白在子宫内膜腺癌组织中的表达. *郑州大学学报*, 2010, 30(5): 90 - 93.
  - 11 Yoshizaki T, Enomoto T, Fujita M, et al. Frequent inactivation of RUNX3 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2008, 110(3): 439 - 444.
  - 12 Erkanli S, Bolat F, Kayaselcuk F, et al. COX-2 and survivin are overexpressed and positively correlated in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2007, 104(2): 320 - 325.
  - 13 Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, 1998, 396(6711): 580 - 584.
  - 14 Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- $\beta$  superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(1): 43 - 47.
- (收稿日期: 2012-02-06)  
(修回日期: 2012-04-11)  
(责任编辑: 李贺琼)