



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.05.012  
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.05.012  
Chinese Journal of General Surgery, 2021, 30(5):591-599.

· 基础研究 ·

## Runt 相关转录因子 2 与基质金属蛋白酶 3 的表达 与乳腺癌侵袭性的关系

侯琛

(天津医科大学肿瘤医院 / 国家肿瘤临床医学研究中心 / 天津市“肿瘤防治”重点实验室 / 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津 300060)

### 摘要

**背景与目的:** Runt 相关转录因子 2 (RUNX2) 与其靶基因基质金属蛋白酶 3 (MMP-3) 在乳腺癌组织中高表达并均与肿瘤转移有关, 但 RUNX2 能否通过调节 MMP-3 基因转录影响乳腺癌细胞的侵袭能力尚不清楚。本研究通过生物信息学方法分析乳腺癌组织中 RUNX2 及 MMP-3 mRNA 水平间相关性, 并在乳腺癌细胞中观察 RUNX2 表达水平对 MMP-3 基因转录水平以及对细胞侵袭能力的影响。

**方法:** 通过 cBioPortal 数据库获取 1 092 例乳腺癌患者组织中 RUNX2 和 MMP-3 基因的 mRNA 表达数据及相关生存资料, 分析患者 RUNX2 及 MMP-3 mRNA 水平间相关性; 根据 RUNX2 及 MMP-3 mRNA 水平中位数, 将患者分为 RUNX2 及 MMP-3 高表达组和低表达组, 用 Kaplan-Meier Plotter 分别分析 RUNX2 和 MMP-3 表达水平与患者无远处转移生存率 (DMFS) 的关系; 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 与 BT-549 细胞中分别转染 RUNX2 siRNA 及 RUNX2 过表达质粒, qRT-PCR、Western blot 检测 RUNX2、MMP-3 mRNA 及蛋白质表达水平; 生物信息学软件预测 MMP-3 启动子上 RUNX2 潜在的结合位点, 并采用 ChIP-PCR 与双荧光素酶报告系统进行体外验证; 在 MDA-MB-231 及 BT-549 细胞中转染 RUNX2 过表达质粒及 MMP-3 siRNA, Transwell 实验观察 RUNX2 及 MMP-3 表达水平与乳腺癌细胞侵袭能力间关系。

**结果:** 在乳腺癌组织中, MMP-3 与 RUNX2 的 mRNA 水平呈正相关 ( $r=0.304 2, P<0.000 1$ ); 高表达 RUNX2 或高表达 MMP-3 乳腺癌患者的 DMFS 明显低于各自低表达患者 ( $P=0.034, P=0.013$ ); 在乳腺癌 MDA-MB-231 中, 下调 RUNX2 表达后, MMP-3 基因 mRNA 转录水平及蛋白质水平均明显降低, 在 MDA-MB-231 及 BT-549 细胞中上调 RUNX2 表达可增加 MMP-3 mRNA 转录水平及蛋白质水平 (均  $P<0.05$ )。生物信息学分析结果显示, MMP-3 启动子序列中可能存在 RUNX2 结合位点 (5'-ACCACA-3'), ChIP-PCR 与双荧光素酶报告系统实验进一步证实 RUNX2 可直接与 MMP-3 基因启动子区结合。RUNX2 过表达后乳腺癌 MDA-MB-231 及 BT-549 细胞侵袭能力明显增强, 该作用可以被同时下调 MMP-3 水平所取消 (均  $P<0.05$ )。

**结论:** RUNX2 可能通过调节 MMP-3 基因转录增强乳腺癌细胞侵袭能力, RUNX2 与 MMP-3 高表达乳腺癌患者预后较差。RUNX2 有望成为乳腺癌治疗的潜在靶点。

### 关键词

乳腺肿瘤; Runt 相关转录因子 2; 基质金属蛋白酶 3; 肿瘤浸润  
中图分类号: R737.9

收稿日期: 2020-02-07; 修订日期: 2020-06-16。

作者简介: 侯琛, 天津医科大学肿瘤医院 / 国家肿瘤临床医学研究中心 / 天津市“肿瘤防治”重点实验室 / 乳腺癌防治教育部重点实验室硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

通信作者: 侯琛, Email: 614989668@qq.com

## Association of expressions of runt-related transcription factor 2 and matrix metalloproteinase 3 with the invasiveness of breast cancer

HOU Chen

(Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University/National Clinical Research Center of Cancer/Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy/Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Tianjin 300060, China)

### Abstract

**Background and Aims:** Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and its target gene matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) are highly expressed in breast cancer tissue and related to tumor metastasis, but whether RUNX2 can affect the invasion and metastasis of breast cancer cells by regulating MMP-3 gene transcription is unclear. This study was conducted to analyze the relationship between RUNX2 and MMP-3 mRNA levels in breast cancer tissues by bioinformatics approaches, and observe the effect of RUNX2 expression on the transcription level of MMP-3 gene and the invasion ability in breast cancer cells.

**Methods:** The mRNA expression data of RUNX2 and MMP-3 as well as the relevant survival data in 1 092 breast cancer patients were obtained through cBioPortal database, and the correlation between RUNX2 and MMP-3 mRNA levels was analyzed. According to the median of RUNX2 and MMP-3 mRNA levels, the patients were divided into high and low RUNX2 or MMP-3 expression groups, and the association of RUNX2 and MMP-3 expression levels with the distant metastasis-free survival (DMFS) of the patients were analyzed by Kaplan Meier Plotter. The breast cancer MDA-MB-231 and BT-549 cells were transfected with RUNX2 siRNA or RUNX2 overexpression plasmids respectively, and then, the mRNA and protein expression levels were determined by qRT-PCR and Western blot. The potential binding site of RUNX2 in MMP-3 promoter was predicted by bioinformatics software, and then was verified in vitro by ChIP-PCR and double luciferase report system. The relations of RUNX2 and MMP-3 expression levels with the invasion ability of breast cancer cells were analyzed in MDA-MB-231 and BT-549 cells transfected with RUNX2 overexpression plasmid and MMP-3 siRNA by Transwell assay.

**Results:** There was a positive correlation between the mRNA levels of MMP-3 and RUNX2 in breast cancer ( $r=0.304\ 2$ ,  $P<0.000\ 1$ ). The DMFS in patients with high RUNX2 expression or high MMP-3 expression was lower than in patients with the corresponding low expression ( $P=0.034$ ,  $P=0.013$ ). In MDA-MB-231 cells, both mRNA transcription level and protein level of MMP-3 were decreased after down-regulating RUNX2 expression; and the MMP-3 mRNA and protein levels were increased in MDA-MB-231 and BT-549 cells after up-regulating RUNX2 expression. Results of bioinformatics analysis show that there was a possible binding site of RUNX2 in MMP-3 promoter sequence (5'-ACCACA-3'), and direct binding of RUNX2 to MMP-3 gene promoter region was confirmed by ChIP-PCR and double luciferase report system. The invasion abilities of both MDA-MB-231 and BT-549 cells were significantly increased after RUNX2 overexpression, and these effects were abolished by simultaneous down-regulation of MMP-3 expression (all  $P<0.05$ ).

**Conclusion:** RUNX2 enhances the invasion ability of breast cancer cells possibly by regulating the transcription of MMP-3 gene, and the patients with high RUNX2 and MMP-3 expressions may face a poor prognosis. RUNX2 may be a potential target for the treatment of breast cancer.

### Key words

Breast Neoplasms; Runt-Related Transcription Factor 2; Matrix Metalloproteinase 3; Neoplasm Invasiveness

**CLC number:** R737.9

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤,具有较高的发生率和病死率<sup>[1]</sup>。肿瘤转移是导致乳腺癌患者发生转移的主要原因<sup>[2]</sup>,其中以骨转移最为常见,严重影响患者的生活质量。Runt相关转录因子2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)能够促进成骨细胞分化与形成<sup>[3]</sup>,参与调节细胞外基质 (ECM) 重塑相关基因转录<sup>[4-5]</sup>,其高表达与乳腺癌骨转移密切相关<sup>[6]</sup>。基质金属蛋白酶3 (matrix metalloproteinase 3, MMP-3) 作为 RUNX2 的靶基因,可以降解多种ECM底物<sup>[7]</sup>,在肿瘤侵袭、转移中起促进作用<sup>[8]</sup>。

早期研究发现RUNX2可调节MMP家族成员的表达,如MMP-9、MMP-13<sup>[9-10]</sup>,但有关RUNX2调节乳腺癌中MMP-3表达的研究非常有限。本研究将进一步探讨RUNX2表达水平对MMP-3基因转录的影响及其机制,为乳腺癌的靶向治疗研究提供潜在的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

乳腺癌细胞MDA-MB-231、BT-549和人胚胎肾上皮细胞293T购于ATCC细胞库; Opti-MEM、胎牛血清、RPMI-1640以及DMEM高糖培养基购于美国Gibco公司; Lipofectamine 2000、逆转录试剂盒以及Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG试剂盒购于美国Invitrogen公司; 氨苄青霉素购自上海生工公司; RUNX2、MMP-3抗体购于Santa Cruz公司,  $\beta$ -actin抗体购于美国Abcam公司; T4 DNA连接酶、限制性内切酶Hind III酶、Xho I酶、GeneJET Plasmid Miniprep Kit试剂盒和GeneJET Gel Extraction试剂盒购于美国Thermo公司; 感受态细胞DH-5 $\alpha$ 、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、DNA Marker购自日本TaKaRa公司; Dual-Luciferase Reporter Assay System购自Promega公司; 染色质免疫共沉淀试剂盒购自美国Millipore公司。

### 1.2 RUNX2 和 MMP-3 基因靶向关系以及无远处转移生存 (DMFS) 的生物信息学预测

利用cBioPortal数据库 (<http://www.cbioportal.org>) 根据Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016) 数据集分析1 902例乳腺癌患者组织中RUNX2和MMP-3 mRNA水平间相关性; 在Kaplan Meier Plotter数据库

(<http://kmplot.com/analysis>) 中下载乳腺癌患者基因表达数据及生存信息,分析基因表达谱与预后间关系 (<http://kmplot.com/analysis>); 生物信息学方法 (<http://www.cbioportal.org>; <http://jaspar.genereg.net>; <http://kmplot.com/analysis>) 预测乳腺癌中RUNX2与MMP-3的相关性和启动子区结合的保守序列以及其在乳腺癌患者中与DMFS的相关性<sup>[11]</sup>。

### 1.3 染色质免疫共沉淀 (ChIP)

在MDA-MB-231细胞中转染带有His标签的RUNX2过表达质粒,并用His抗体特异性结合于RUNX2结合的基因启动子序列。收集ChIP-DNA产物并利用GeneJET PCR Purification Kit试剂盒纯化。引物设计软件 (NCBI中Primer Blast) 设计扩增引物序列 (MMP-3基因启动子区), 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应和琼脂糖凝胶电泳分析RUNX2对MMP-3启动子DNA片段的结合。ChIP引物上游序列: 5'-ATA GGG ATC TTA TTG C-3', 下游序列: 5'-GAACATCTTGGGAGTA-3'; 空白对照引物上游序列: 5'-GAA TGT TTG GAA ATG GTC CT-3', 下游序列: 5'-TC TCTA TGC CTT GCT GTC-3'。PCR反应扩增模板即ChIP DNA。反应体系为: 10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP (25 mmol/L) 2  $\mu$ L, 其中,上下游引物 (10 mmol/L) 各0.5  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L, Taq酶2.5 U, 补充水至25  $\mu$ L。PCR扩增条件: 95  $^{\circ}$ C预变性4 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 最适退火温度30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共37个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,在成像仪中观察RUNX2在MMP-3基因启动子区序列是否存在结合。

### 1.4 细胞转染、qRT-PCR 和 Western blot

分别收集转染了siRUNX2、RUNX2过表达质粒的MB-MDA-231及BT549细胞并提取RNA,使用逆转录试剂盒将所提取的RNA反转为cDNA; 随后,通过qRT-PCR检测干扰RUNX2处理后的MMP-3的mRNA表达水平。RUNX2的上游引物序列: 5'-CTC TGC ACC AAG TCC TTT TAA TC-3', 下游引物序列: 5'-AGG AGG GGT AAG ACT GGT CAT AG-3', 探针序列: 5'-TGC CTG GGG TCT GTA ATC TGAC-3'; MMP-3上游引物序列: 5'-TGC CCA CTT TGA TGA TGA G-3', 下游引物序列: 5'-GTT GGC TGA GTG AAA GAG ACC-3', 探针序列: 5'-GAC AAA GGA TAC AAC AGG

GAC CAA T-3'。TaqMan PCR反应体系：10  $\mu$ L SuperMix, 0.4  $\mu$ L Rox, 0.6  $\mu$ L上下游引物, 1  $\mu$ L模板cDNA, 加水补至20  $\mu$ L。PCR反应条件：95  $^{\circ}$ C预变性30 s; 95  $^{\circ}$ C变性30 s, 65  $^{\circ}$ C (RUNX2)或57  $^{\circ}$ C (MMP-3)延伸30 s, 共40个循环。以GAPDH为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示目的基因的相对表达水平。

分别收集转染了siRUNX2、RUNX2过表达质粒的MB-MDA-231及BT549细胞, PBS冲洗2次后置于裂解液中冰上裂解30 min, 随后, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心15 min, 吸取上清于新EP管中进行蛋白质浓度测定。10% SDS-PAGE分离蛋白并转膜, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 按比例稀释一抗,  $\beta$ -actin (1:7 000)、RUNX2 (1:1 000)、MMP-3 (1:1 000), 4  $^{\circ}$ C过夜孵育; TBST洗膜3次 (7 min/次)后室温孵育二抗1 h, 再用TBST洗膜3次 (7 min/次), 加入ECL发光工作液后显影观察。

### 1.5 PCR法扩增目的DNA片段及纯化

以收取细胞基因组DNA为模板, 运用PCR法扩增MMP-3基因包含结合序列以及空白对照的两个不同片段大小的启动子区目的基因。双荧光引物空白对照上游序列: 5'-GGA GGT ACC CTA TTC TGC CCA TGA GGT TT-3', 下游序列: 5'-GCA GAT CTC TGC CTC CTT GTA GGT CCA A-3'; 双荧光包含RUNX2结合位点的引物上游序列5'-GGA GGT ACC GGG CAT CTT CAG TCAT AGG G-3'下游序列5'-GCA GAT CTC TGC CTC CTT GTA GGT CCA A-3'。PCR的反应条件: 98  $^{\circ}$ C预变性3 min; 98  $^{\circ}$ C变性10 s, 60  $^{\circ}$ C退火5 s, 72  $^{\circ}$ C延伸15 s, 共35个循环。PCR的反应体系: 2 $\times$  PrimeSTAR Max Premix 25  $\mu$ L; DNA 2  $\mu$ L; 上、下游引物各1  $\mu$ L; 加水补至50  $\mu$ L。

### 1.6 MMP-3基因启动子荧光素酶报告基因质粒的构建

应用特异的限制性内切酶Xho I和Hind III对PGL3-Basic质粒以及合成的启动子基因片段进行双酶切反应。反应物37  $^{\circ}$ C水浴过夜, 琼脂糖凝胶电泳切取回收目的片段进行DNA纯化, 同时利用T4 DNA连接酶在PGL3-Basic载体中插入DNA片段, 并将所得反应物置于4  $^{\circ}$ C过夜连接。随后将10  $\mu$ L的连接产物加入120  $\mu$ L感受态细胞DH5  $\alpha$ 中, 冰上放置30 min后, 42  $^{\circ}$ C的水浴90 s, 再次置于冰上10 min。随后, 复加 (无氨苄霉素抗性) LB的培养基1 mL进行混匀, 并置于37  $^{\circ}$ C轻摇1 h,

吸取100  $\mu$ L涂抹在含氨苄霉素抗性LB平板中 (在37  $^{\circ}$ C的环境平板倒置过夜培养)。从中选取单个菌落加入培养基中并在37  $^{\circ}$ C的摇动12 h, 经过菌液PCR鉴定 (反应体系同1.5), 将实验所得的质粒送达北京金唯智公司进行测序鉴定, 测序结果应用UCSC基因组浏览器与NCBI软件所获的启动子区序列, 从比对中确认克隆片段序列的正确性。

### 1.7 双荧光素酶活性测定

参照生产商说明书, 通过24孔板转染双荧光质粒24 h后, 去除孔内培养基, PBS洗涤两次, 每孔内添加100  $\mu$ L裂解液, 室温摇动20 min至充分裂解; 随后吸取10  $\mu$ L裂解产物与50  $\mu$ L底物进行混合, 检测萤火虫荧光素酶活性随后加入50  $\mu$ L的Stop&Glo Reagent, 检测海肾荧光素酶活性, 计算上述两种荧光素酶活性的比值。

### 1.8 Transwell实验

首先将Matrigel Invasion Chamber (BD Biosciences公司)从-20  $^{\circ}$ C冰箱放置4  $^{\circ}$ C过夜, 用50 mg/L Matrigel 1:8稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面, 37  $^{\circ}$ C培养箱放置5 h使其凝固。之后分别在上室和下室中加入500  $\mu$ L无血清培养基, 然后放置于37  $^{\circ}$ C培养箱2 h。用移液器移除上下室中的培养基, 下室中加入750  $\mu$ L含20%血清的培养基。胰酶消化细胞, 终止消化后1 000 r/min离心5 min弃去培养基, 用PBS洗1~2遍, 用无血清培养基配制细胞浓度为 $5 \times 10^4$ 个/mL的单细胞悬液, 取500  $\mu$ L细胞悬液缓慢加入上室, 轻轻混匀, 定时观察细胞穿过小室的侵袭情况。小室分别用棉签小心擦去其上层的细胞。之后用配制好的4%甲醛室温固定细胞30 min, 用Giemsa染液对细胞进行染色, 室温30 min, 清水冲洗, 室温风干, 用刀片将膜部分小心割下, 中性树胶固定封片。显微镜下观察穿过孔的染色细胞, 随机选取的5个视野拍照并统计细胞数。

### 1.9 统计学处理

SPSS 21.0软件用于统计学分析, Transwell实验采用独立样本t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 RUNX2与MMP-3高表达乳腺癌患者DMFS降低

1 902例原发性乳腺癌患者肿瘤组织中, RUNX2与MMP-3的mRNA水平呈正相关 ( $r=0.3042$ ,



$P < 0.0001$ ) (图1A)。在Kaplan Meier Plotter数据库, RUNX2或MMP-3低表达患者的DMFS (黑色

曲线) 明显高于RUNX2或MMP-3高表达患者 (红色曲线) ( $P=0.034$ ,  $P=0.013$  (图1B))。

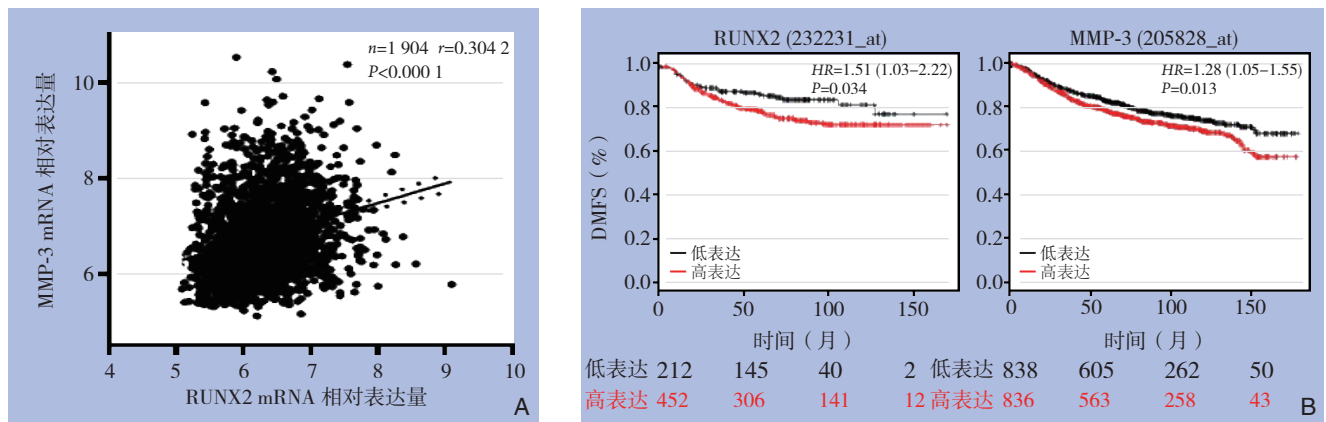


图1 数据库资料分析 A: RUNX2 与 MMP-3 在乳腺癌中相关性分析; B: RUNX2 与 MMP-3 在乳腺癌患者中与 DMFS 相关性分析  
Figure 1 Database analysis A: Correlation analysis of the relationship between RUNX2 and MMP-3 in breast cancer; B: Correlation analysis of RUNX2 and MMP-3 with DMFS in breast cancer patients

### 2.2 RUNX2 可调节 MDA-MB-231 细胞中 MMP-3 表达水平

qRT-PCR结果显示, 干扰RUNX2后, MDA-MB-231 细胞MMP-3 mRNA水平下调 (均 $P < 0.05$ ) (图2A)。Western blot检测结果显示, 干扰RUNX2后, MDA-MB-231 与 BT-549 细胞中 RUNX2 和 MMP-3

蛋白表达水平均明显下调, 而转染RUNX2过表达质粒后, MDA-MB-231 与 BT-549 细胞中 RUNX2 与 MMP-3 蛋白表达水平均明显上调 (均 $P < 0.05$ ) (图2B)。以上结果证实, 在 MDA-MB-231 细胞中 RUNX2 水平可以影响 MMP-3 表达。

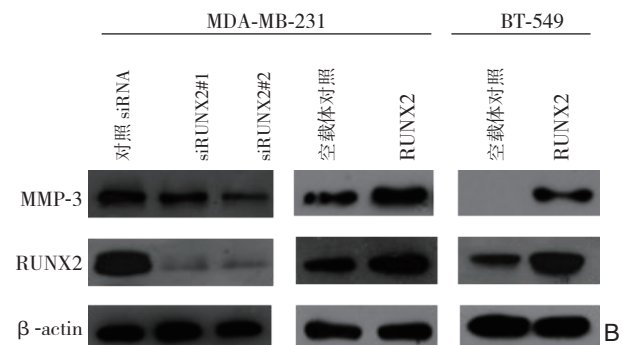
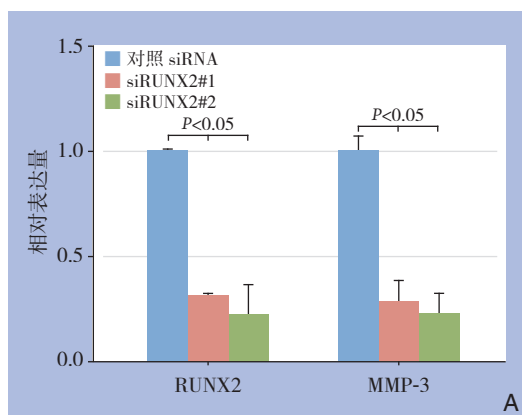


图2 RUNX2 对 MMP-3 表达的影响 A: qRT-PCR 检测转染 siRUNX2 的 MDA-MB-231 中 RUNX2 与 MMP-3 mRNA; B: Western blot 检测转染 siRUNX2 及 RUNX2 过表达质粒后 MDA-MB-231 与 BT-549 细胞中 RUNX2 与 MMP-3 蛋白表达水平

Figure 2 The effect of RUNX2 on MMP-3 expression A: The mRNA levels of RUNX2 and MMP-3 in MDA-MB-231 transfected with siRUNX2 detected by qRT-PCR; B: The protein levels of RUNX2 and MMP-3 in MDA-MB-231 and BT-549 cells transfected with siRUNX2 or RUNX2 over-expressed plasmid detected by Western blot

### 2.3 RUNX2 可以与 MMP-3 基因启动子序列结合

通过生物信息学分析获得MMP-3转录起始位点上游2 kb的启动子区序列, 发现MMP-3启动子

序列中存在RUNX2结合位点 (5'-ACCACA-3') (图3A)。利用ChIP实验在MDA-MB-231细胞中进行验证。采用脂质体法用带有His标签的RUNX2

过表达质粒转染MDA-MB-231细胞,并用His抗体特异性结合于RUNX2结合的基因启动子序列,之后进行PCR反应和琼脂糖凝胶电泳,分析RUNX2

对MMP-3启动子DNA片段的结合。结果显示,在MDA-MB-231细胞中,RUNX2可以与MMP-3基因启动子序列结合(图3B)。

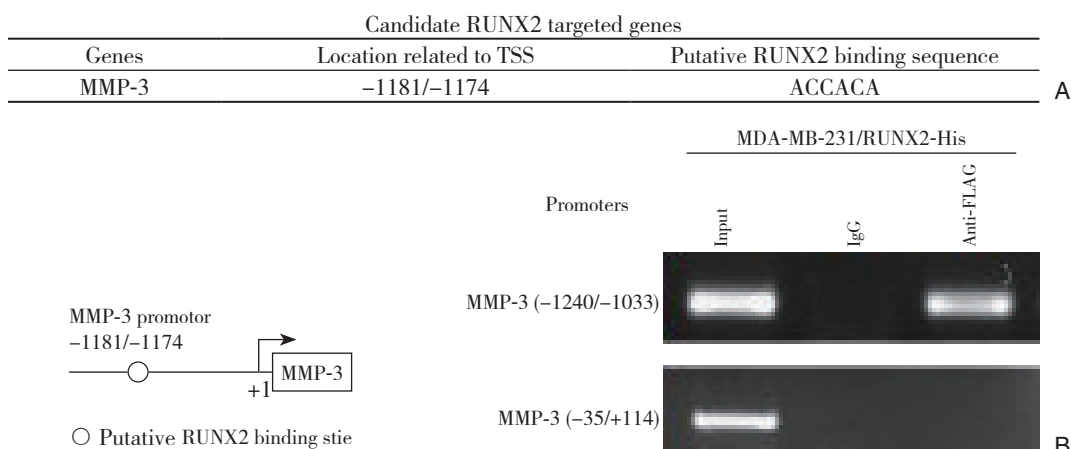


图 3 RUNX2 与 MMP-3 相关性验证 A: Jaspas 预测 RUNX2 在 MMP-3 基因启动子区的结合位点; B: ChIP 实验检测 RUNX2 与含有或缺乏 RUNX2 结合序列的 MMP-3 基因启动子区的结合作用

**Figure 3 Verification of the correlation between RUNX2 and MMP-3** A: Predicting the binding site of RUNX2 in the MMP-3 gene promoter using Jaspas; B: The binding of RUNX2 to the MMP-3 promoters containing or lacking RUNX2-binding sequences assessed by ChIP assays

#### 2.4 启动子区扩增产物鉴定

为进一步验证,构建含有或缺乏RUNX2结合位点的MMP-3启动子区双荧光报告质粒。以293T细胞基因组DNA为模板,通过PCR法获得MMP-3启动子区DNA片段,随后采用1.5%琼脂糖凝胶电泳对其进行检测,可见扩增出两条条带的状态呈单一性,分别位于601 bp和1 346 bp处,根据条带

位置可初步判断出扩增所得的DNA片段为所需的目的DNA片段(图4)。

#### 2.5 重组质粒的酶切鉴定

通过琼脂糖凝胶电泳对重组质粒进行双酶切鉴定,结果显示,克隆片段与目的序列的理论序列大小一致,初步判断质粒构建正确(图5)。

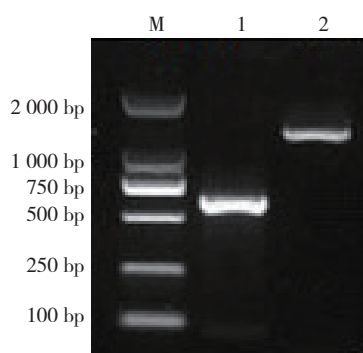


图 4 MMP-3 基因包含 RUNX2 结合序列启动子区及其空白对照 PCR 扩增产物电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: 不含 RUNX2 结合位点 MMP-3 基因启动子 PCR 产物; 2: 含 RUNX2 结合位点 MMP-3 基因启动子 PCR 产物

**Figure 4 Electrophoretogram of PCR amplification product of the promoter region of MMP-3 gene containing RUNX2 binding sequence and its blank control**

M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR products of MMP-3 gene promoter containing no Runx2 binding site; 2: PCR products of MMP-3 gene promoter containing Runx2 binding site

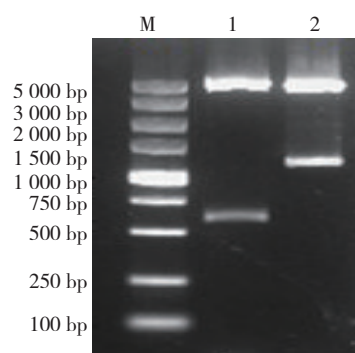


图 5 琼脂糖凝胶电泳双酶切鉴定 M: DL5000 DNA marker; 1: 空白对照质粒双酶切产物; 2: 含 RUNX2 结合位点质粒双酶切产物

**Figure 5 DNA plasmid identified by restriction endonucleases digestion** M: DL5000 DNA marker; 1: Double digestion products of the empty control plasmids; 2: Double digestion products of the plasmids containing RUNX2 binding site

### 2.6 RUNX2 可调节 MMP-3 双荧光质粒转录活性

将含有RUNX2结合位点的MMP-3启动子序列克隆到pGL3-Basic质粒, 构建pGL3-MMP-3及其空白对照荧光报告质粒。通过siRNA沉默MDA-MB-231细胞中RUNX2后, 再分别转染pGL3-MMP-3质粒, 同时转染空白质粒作为对照, 双荧光报告素酶系统检测启动子转录活性。在沉默RUNX2表达的细胞中pGL3-MMP-3转录活性低于对照组(图6), 证实RUNX2能够促进MMP-3启动子的转录活性。

### 2.7 RUNX2 和 MMP-3 过表达促进乳腺癌细胞侵袭

Transwell方法检测细胞的侵袭能力发现, RUNX2过表达的MDA-MB-231、BT-549与对照细胞相比侵袭能力增加, 而同时沉默MMP-3表达之后, 过表达RUNX2的两种细胞侵袭能力降低(均 $P < 0.05$ ) (图7)。

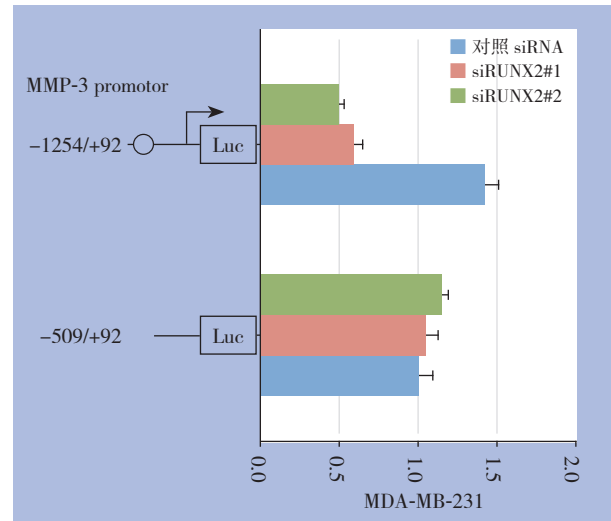


图6 RUNX2对MMP-3启动子双荧光报告质粒转录活性影响  
Figure 6 Effects of RUNX2 on transcriptional activity of MMP-3 promoter luciferase reporter plasmids

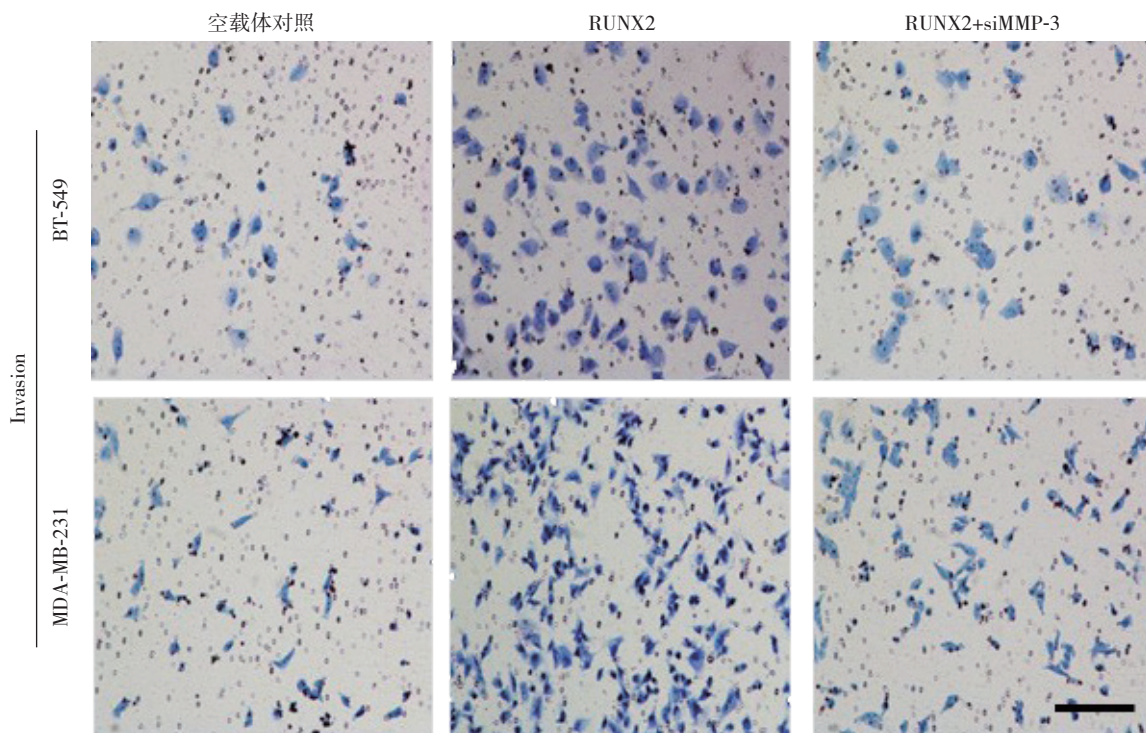


图7 RUNX2和MMP-3过表达对乳腺癌细胞侵袭能力的影响  
Figure 7 Effect of overexpression of RUNX2 and MMP-3 on the invasion ability of breast cancer cells

## 3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 尽管在诊断、治疗及预后评估方面已经取得较大进展, 但病死率仍然没有明显改善。乳腺癌的发生发展与癌基因激活与抑癌基因失活密切相关。因此,

筛选出与乳腺癌发生发展相关的分子遗传学改变, 对于早期诊断、个体化治疗及预后分层至关重要。本研究采用多种生物信息学分析方法, 发现乳腺癌患者组织中RUNX2和MMP-3 mRNA水平呈正相关, 且高表达RUNX2或MMP-3患者具有更短的DMFS。进一步的分子生物学实验证实,



RUNX2表达水平可以调节乳腺癌细胞中MMP-3基因的转录水平,且两者过表达可以增强肿瘤细胞的迁移能力,上述结果为乳腺癌的临床研究提供了潜在的理论基础。

RUNX2属于RUNX转录因子家族成员,通过调控下游基因表达参与细胞增殖分化等过程。RUNX2通过维持成骨细胞和破骨细胞的生成,调节骨发育<sup>[12-14]</sup>。早期研究发现,RUNX2可参与多种肿瘤的发生与发展,包括乳腺癌、胰腺癌、肝癌等<sup>[15-18]</sup>,其中越来越多的证据支持RUNX2在浸润性乳腺癌中发挥重要作用。与正常乳腺上皮细胞相比,RUNX2在浸润性乳腺癌细胞系中被发现上调<sup>[19]</sup>,是浸润性和非浸润性乳腺癌细胞比较筛选中确定的基因之一<sup>[20]</sup>。RUNX2过表达与乳腺癌的侵袭以及骨转移有关<sup>[5]</sup>。

侵袭和转移是导致乳腺癌进展及患者死亡的主要原因<sup>[21-22]</sup>。肿瘤细胞启动转移时,细胞首先要失去黏附力,运动并侵入ECM,随后进入循环系统,最终在远处的组织和器官中定植形成转移灶<sup>[23-24]</sup>。ECM的蛋白水解是肿瘤侵袭及转移过程中的关键步骤,也是血管生成和肿瘤细胞浸润的重要因素。研究<sup>[26-28]</sup>表明MMP在负责ECM的降解中起到关键作用<sup>[25]</sup>,MMP-1,-2,-3,-7,-9,-13和-14的上调与乳腺癌细胞的侵袭有关。早期研究<sup>[26]</sup>发现MMP-3过表达可导致小鼠乳腺肿瘤的形成。此外,据报道<sup>[27]</sup>MMP-3的表达水平在乳腺癌细胞中上调并与乳腺癌存活率相关。

尽管RUNX2和MMP-3在乳腺癌进展中发挥重要的促进作用,但有关两者间相互作用关系的研究非常有限。本研究联合数据库分析发现,乳腺癌组织RUNX2 mRNA与MMP-3 mRNA表达水平呈正相关,高表达RUNX2或MMP-3的乳腺癌患者的DMFS均显著降低,提示RUNX2和MMP-3能提高乳腺癌患者的复发与转移。RUNX2能够促进乳腺癌细胞MMP-3表达,提示RUNX2很可能通过调节MMP-3表达增强乳腺癌细胞侵袭能力。经过Transwell实验验证发现,过表达RUNX2可以增强肿瘤细胞的侵袭能力,若在过表达RUNX2的乳腺癌细胞中下调MMP-3表达,则可以抑制细胞侵袭。由此,笔者推测RUNX2很可能通过调节MMP-3的表达参与乳腺癌细胞的侵袭。早期研究发现,RUNX2还可调节MMP2、MMP9和MMP13表达参与肿瘤的转移和侵袭<sup>[29-30]</sup>。由于MMP-3可以激活多种MMP,包括proMMP-1、-3、-7、-8、-9

和-13<sup>[28]</sup>,因此,RUNX2除了结合到MMP9、MMP13启动子区并直接调控其转录,还可能间接通过促进MMP-3的表达进而激活MMP9以及MMP13。因此,尽管单个金属蛋白酶的表达虽然不足以使乳腺癌进展为侵袭性和转移性表型,但是可以通过多种基质金属酶的协作促进乳腺癌侵袭过程,而这个阶段正是针对乳腺癌疾病治疗的关键环节,应引起足够重视。

总之,本研究首次报道了RUNX2可以通过调节MMP-3表达影响乳腺癌细胞侵袭能力,为乳腺癌治疗的临床及基础研究提供了潜在的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
- [2] Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis[J]. *J Intern Med*, 2013, 274(2):113-126. doi:10.1111/joim.12084.
- [3] Karsenty G, Kronenberg H M, Settembre C. Genetic control of bone formation[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009, 25:629-648. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113308.
- [4] Takahashi A, de Andrés MC, Hashimoto K, et al. DNA methylation of the RUNX2 P1 promoter mediates MMP13 transcription in chondrocytes[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):7771. doi: 10.1038/s41598-017-08418-8.
- [5] Wang Q, Yu W, Huang T, et al. RUNX2 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by upregulating MMP9 expression[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(5):2777-2784. doi:10.3892/or.2016.5101.
- [6] Kim B, Kim H, Jung S, et al. A CTGF-RUNX2-RANKL Axis in Breast and Prostate Cancer Cells Promotes Tumor Progression in Bone[J]. *J Bone Miner Res*, 2020, 35(1):155-166. doi: 10.1002/jbmr.3869.
- [7] Swarnakar S, Paul S, Singh LP, et al. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin[J]. *J Pineal Res*, 2011, 50(1):8-20. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00812.x.
- [8] Shoshan E, Braeuer R R, Kamiya T, et al. NFAT1 directly regulates IL8 and MMP-3 to promote melanoma tumor growth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(11):3145-3155. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2511.
- [9] Kim KY, Oh TW, Ma JY, et al. Ethanol Extract of *Lycopus lucidus* Turcz. ex Benth Inhibits Metastasis by Downregulation of Runx-2 in Mouse Colon Cancer Cells[J]. *Evid Based Complement Alternat*



- Med, 2018, 2018:9513290. doi:10.1155/2018/9513290.
- [10] Selvamurugan N, Shimizu E, Lee M, et al. Identification and characterization of RUNX2 phosphorylation sites involved in matrix metalloproteinase-13 promoter activation[J]. FEBS Lett, 2009, 583(7):1141–1146. doi:10.1016/j.febslet.2009.02.040.
- [11] 刘壮. 抑制PTOV1通过减弱肿瘤细胞的干细胞样特性使非小细胞肺癌细胞化疗增敏[D]. 天津: 天津医科大学, 2019.
- Liu Z. Depleting PTOV1 sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy through attenuating cancer stem cell traits[D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2019.
- [12] Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation[J]. Oral Dis, 2002, 8(3):147–159. doi:10.1034/j.1601-0825.2002.01829.x.
- [13] Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. RUNX2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005, 75(3):213–225. doi:10.1002/bdrc.20043.
- [14] Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in RUNX2-dependent bone development[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2013, 19(3):254–263. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0527.
- [15] Sun SS, Zhang L, Yang J, et al. Role of runt-related transcription factor 2 in signal network of tumors as an inter-mediator[J]. Cancer Lett, 2015, 361(1):1–7. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.042.
- [16] Lau QC, Raja E, Salto-Tellez M, et al. RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein mislocalization and promoter hypermethylation in breast cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(13):6512–6520. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0369.
- [17] Nagaraja GM, Othman M, Fox BP, et al. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics[J]. Oncogene, 2006, 25(16):2328–2338. doi:10.1038/sj.onc.1209265.
- [18] Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, et al. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro[J]. Clin Exp Metastasis, 2000, 18(2):171–178. doi:10.1023/a:1006762425323.
- [19] Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, et al. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion[J]. J Biol Chem, 1999, 274(19):13066–13076. doi:10.1074/jbc.274.19.13066.
- [20] Hotary K, Li XY, Allen E, et al. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program[J]. Genes Dev, 2006, 20(19):2673–2686. doi:10.1101/gad.1451806.
- [21] Zhao M, Ang L, Huang J, et al. MicroRNAs regulate the epithelial-mesenchymal transition and influence breast cancer invasion and metastasis[J]. Tumour Biol, 2017, 39(2):1010428317691682. doi:10.1177/1010428317691682.
- [22] Watkins EJ. Overview of breast cancer[J]. JAAPA, 2019, 32(10):13–17. doi:10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d.
- [23] Yuzhalin AE, Lim SY, Kutikhin AG, et al. Dynamic matrixome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2018, 1870(2):207–228. doi:10.1016/j.bbcan.2018.09.002.
- [24] Mohan V, Das A, Sagi I. Emerging roles of ECM remodeling processes in cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 62:192–200. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.004.
- [25] Young D, Das N, Anowai A, et al. Matrix Metalloproteases as Influencers of the Cells' Social Media[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16):3847. doi:10.3390/ijms20163847.
- [26] Sternlicht MD, Lochter A, Sympon CJ, et al. The stromal proteinase MMP-3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis[J]. Cell, 1999, 98(2):137–146. doi:10.1016/s0092-8674(00)81009-0.
- [27] Aroner SA, Rosner BA, Tamimi RM, et al. Plasma matrix metalloproteinase 1, 3, and 7 levels and breast cancer risk in the Nurses' Health Study[J]. Cancer Causes Control, 2014, 25(12):1717–1723. doi:10.1007/s10552-014-0462-7.
- [28] McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore![J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(5):534–540. doi:10.1016/s0955-0674(00)00248-9.
- [29] 曹自, 孙保存, 赵秀兰, 等. RUNX2通过促进MMP9的表达增强肝细胞肝癌迁移侵袭能力[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(9):424–428. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2017.09.046.
- Cao Z, Sun BC, Zhao XL, et al. RUNX2 promotes migration and invasion abilities of hepatocellular carcinoma by inducing MMP9 expression[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2017, 44(9):424–428. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2017.09.046.
- [30] Komori T. RUNX2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation[J]. Histochem Cell Biol, 2018, 149(4):313–323. doi:10.1007/s00418-018-1640-6.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 侯琛. Runt相关转录因子2与基因基质金属蛋白酶3的表达与乳腺癌侵袭性的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2021, 30(5):591–599. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.05.012

Cite this article as: Hou C. Association of expressions of runt-related transcription factor 2 and matrix metalloproteinase 3 with the invasiveness of breast cancer [J]. Chin J Gen Surg, 2021, 30(5):591–599. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.05.012