

# 转录因子 *Runx2* 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 上皮-间充质转化能力的影响\*

张萍<sup>1,2</sup>, 何晓刚<sup>1</sup>, 徐晓丹<sup>1</sup>, 张露<sup>1</sup>, 刘雪<sup>1</sup>, 刘亚坤<sup>1</sup>, 姜玉<sup>1</sup>, 汪思应<sup>1</sup>, 李菲菲<sup>1△</sup>  
(<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院, 安徽合肥 230032; <sup>2</sup>上海健康医学院附属周浦医院, 上海 201318)

**[摘要]** 目的: 建立稳定敲减 *Runx2* 相关转录因子 2 (*Runx2*) 表达的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系, 探讨 *Runx2* 对 MDA-MB-231 细胞上皮-间充质转化(EMT)、转移和侵袭能力的影响。方法: 利用 LV-*Runx2*-RNAi 慢病毒载体感染 MDA-MB-231 细胞, 构建稳定低表达 *Runx2* 的 MDA-MB-231 细胞株, 检测比较 *Runx2* 表达水平对 MDA-MB-231 细胞的形态及 E-cadherin、N-cadherin、 $\beta$ -catenin 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达的影响。侵袭实验和软琼脂集落形成实验分析比较抑制 *Runx2* 表达对乳腺癌细胞侵袭和非锚定生长能力的效应。结果: E-cadherin 蛋白表达在敲减 *Runx2* 表达的 MDA-MB-231 细胞中明显高于常规 MDA-MB-231 细胞 ( $P < 0.05$ ), 而 N-cadherin、 $\beta$ -catenin 和 MMP-9 蛋白表达在敲减 *Runx2* 表达的 MDA-MB-231 细胞中明显低于常规 MDA-MB-231 细胞 ( $P < 0.05$ )。敲减 *Runx2* 表达的 MDA-MB-231 细胞侵袭和非锚定生长能力明显低于常规 MDA-MB-231 细胞 ( $P < 0.05$ )。结论: 在人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中抑制 *Runx2* 表达可以通过调控 EMT 相关蛋白的表达进而抑制乳腺癌细胞的 EMT 过程, 从而对细胞的侵袭和转移起负调控作用。

**[关键词]** 乳腺癌; 肿瘤转移; 上皮-间充质转化; *Runx2* 相关转录因子 2

**[中图分类号]** R737.9; R730.23

**[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.04.001

## Influence of *Runx2* expression knock-down on epithelial-mesenchymal transition of human breast cancer MDA-MB-231 cells

ZHANG Ping<sup>1,2</sup>, HE Xiao-gang<sup>1</sup>, XU Xiao-dan<sup>1</sup>, ZHANG Lu<sup>1</sup>, LIU Xue<sup>1</sup>, LIU Ya-kun<sup>1</sup>, JIANG Yu<sup>1</sup>, WANG Si-ying<sup>1</sup>, LI Fei-fei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; <sup>2</sup>Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China. E-mail: feifeili717@ahmu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To construct a breast cancer cell line that stably interferes with *Runx2*-related transcription factor 2 (*Runx2*) expression, and to investigate the effect of *Runx2* expression knock-down on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion ability of human breast cancer MDA-MB-231 cells. **METHODS:** The lentiviral vector of LV-*Runx2*-RNAi was used to infect MDA-MB-231 cells to construct a stable breast cancer cell line MDA-MB-231 with *Runx2* expression knock-down, and the effects of *Runx2* expression level on the morphological changes and the protein expression of E-cadherin, N-cadherin,  $\beta$ -catenin and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the MDA-MB-231 cells with *Runx2* expression knock-down were determined. Invasion experiment and soft agar colony formation assay were used to measure the invasion and non-anchored growth abilities of the breast cancer cells. **RESULTS:** The protein expression of E-cadherin in the MDA-MB-231 cells with *Runx2* expression knock-down was significantly higher than that in normal MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ), while the protein expression of N-cadherin,  $\beta$ -catenin and MMP-9 was opposite ( $P < 0.05$ ). Compared with the normal MDA-MB-231 cells, the MDA-MB-231 cells with *Runx2* expression knock-down showed significantly attenuated invasion and non-anchored growth ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Knock-down of *Runx2* expression in breast cancer MDA-MB-231 cells inhibits the EMT process by regulating the expression of EMT-related proteins, thus negatively regulating the

[收稿日期] 2018-04-08 [修回日期] 2018-06-21

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81302319); 地方高校国家级大学生创新创业训练项目 (No. 201510366013); 安徽省教育厅重大研究项目 (No. KJ2018ZD018)

△通讯作者 Tel: 0551-65161129; E-mail: feifeili717@ahmu.edu.cn

invasion and metastasis of the cells.

[KEY WORDS] Breast cancer; Neoplasm metastasis; Epithelial-mesenchymal transition; Runt-related transcription factor 2

乳腺癌是影响全球女性最普遍的肿瘤之一,乳腺癌远处转移引起显著的病死率<sup>[1]</sup>。据统计,2015年美国报告的女性浸润性乳腺癌病例数为231 840例,其中40 290例死亡<sup>[2]</sup>。乳腺癌侵袭性转移的机制有很多,但近期大多数研究表明,在乳腺癌的侵袭性转移过程中乳腺癌细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)起重要作用<sup>[3-5]</sup>。肿瘤细胞发生EMT时细胞形态由上皮细胞形态变成梭形间充质细胞形态,细胞与细胞之间的黏附和极性丧失,并且伴有上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)表达降低,神经型钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(vimentin)表达增加,迁移和侵袭能力增加,加强了原发肿瘤的传播<sup>[6]</sup>。肿瘤细胞EMT的发生是由细胞、分子和肿瘤微环境共同参与的过程,不同的信号通路如转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、Notch和Wnt信号均可诱导EMT,它们的活性影响EMT相关转录因子的表达<sup>[7]</sup>。大量证据表明乳腺癌是一种侵袭性肿瘤,具有较高的EMT相关的转移能力<sup>[8]</sup>,探讨EMT的发生机制对于了解乳腺癌侵袭转移机制具有重要作用。

Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)是一种成骨细胞和骨组织形成的关键转录因子<sup>[9]</sup>,它通过结合成骨细胞特异性元件2(osteoblast-specific element 2, OSE2)调控几种与骨基质重建有关基因的表达<sup>[10-11]</sup>。Runx2及其靶基因在乳腺癌组织中高度表达,并且在乳腺癌骨转移中起着重要作用<sup>[12]</sup>。由于肿瘤的转移是一个源于EMT使肿瘤细胞从其起源部位形成多步骤的扩散过程,而EMT的发生使上皮细胞失去与周围环境的联系并获得一种间充质表型,协助肿瘤细胞从起源部位进入血液循环并迁移到远处的器官<sup>[13-14]</sup>,那么Runx2是否能够通过发生EMT使得乳腺癌细胞突破基底膜、定植到骨,从而引起乳腺癌的骨转移?为了明确Runx2与乳腺细胞EMT的关系,我们用RNA干扰技术建立了稳定敲减Runx2表达的高侵袭转移性乳腺癌细胞系MDA-MB-231,观察比较了该细胞株的EMT相关表型和细胞侵袭转移能力的改变,现将研究结果报告如下。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要细胞、试剂

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231由美国合作实验

室引进,用含10%胎牛血清的DMEM培养基(Gibco)培养。Runx2 RNA干扰慢病毒(上海吉凯基因化学有限公司);胎牛血清(天津康源生物技术公司);嘌呤霉素(Sigma);TRIzol Reagent(康为世纪生物科技有限公司)。PCR扩增仪(Biometra);荧光倒置显微镜(ZEISS);细胞培养箱和酶标仪(Thermo);琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad);凝胶成像仪FluorChem(上海晶檀生物有限公司)。

### 2 主要方法

**2.1 Runx2基因RNA干扰慢病毒载体的构建及包装** 由上海吉凯基因化学技术有限公司以GV248为载体,根据人Runx2基因序列(NM\_001024630)设计并合成3条靶向短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列[shRNA1(5'-TACCTATCACAGACAATT-3'), shRNA2(5'-CAGTGATTTAGGGCGCATT-3')和shRNA3(5'-GCACTCCATATCTCTACTA-3')]及1条阴性对照(control)shRNA序列(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'),并以此构建并包装3种慢病毒载体及空载慢病毒载体。

**2.2 慢病毒感染** 感染前一天将正常对数生长期的MDA-MB-231细胞用1 mL 0.25%胰蛋白酶消化1 min后,离心,计数,按每孔细胞以 $5 \times 10^4$ 个接种于24孔板中,当细胞融合度达到45%时开始病毒感染。病毒的MOI值为10(病毒滴度为 $1 \times 10^7$ )感染效果最佳。弃去原培养基,将440  $\mu$ L DMEM + 10  $\mu$ L Runx2-shRNA + 50  $\mu$ L polybrene加入1.5 mL EP管混匀后加入相应的孔中。12 h后,将培养基换成含10%胎牛血清的DMEM培养基。培养72 h后,荧光显微镜下观察细胞荧光表达。接着用浓度为0.5 mg/L的嘌呤霉素筛选,挑单个细胞克隆,进行扩大培养,建立低表达Runx2的稳定的MDA-MB-231细胞系。

**2.3 基因表达检测** RT-PCR检测稳定敲减Runx2表达的MDA-MB-231细胞中Runx2的mRNA表达水平。Runx2的上游引物序列为5'-CCGGAATGCTCTGCTGTTATGA-3',下游引物序列为5'-ACTGAGCGGTGACAGAACT-3'(238 bp); $\beta$ -actin的上游引物序列为5'-ACTGGTCTCAGTCAGTGTA-CAGC-3',下游引物序列为5'-ACAGGAAGTCCCTT-GCCATC-3'。对数生长期细胞弃去原培养基,每小皿加入1 mL TRIzol Reagent,枪头反复吹打裂解细胞后移入1.5 mL EP管,分次加入氯仿、异丙醇和75%

DEPC 无水乙醇,提取 RNA。取适量 RNA 进行逆转录,逆转录体系为:template RNA 3  $\mu\text{g}$ , Oligo (dT) prime 1  $\mu\text{L}$ ,加入 DEPC 水至总体积为 12  $\mu\text{L}$ ;混匀,金属浴 65  $^{\circ}\text{C}$  5 min 后,加入 5  $\times$  reaction buffer 4  $\mu\text{L}$ 、RiboLock RNase inhibitor (20 U) 1  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTP Mix 2  $\mu\text{L}$  和 RevertAid M-MuLV RT (200 U) 1  $\mu\text{L}$ ,混匀,总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:42  $^{\circ}\text{C}$  60 min、70  $^{\circ}\text{C}$  5 min。PCR 体系为:2  $\times$  Es Taq MasterMix 12.5  $\mu\text{L}$ , 1  $\times$  forward primer 1  $\mu\text{L}$ , reverse primer 1  $\mu\text{L}$ , template DNA 2  $\mu\text{L}$ , DEPC 水 8.5  $\mu\text{L}$ ,总体积 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min;变性 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,退火 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s,延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,30 个循环,终延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min。取 PCR 产物进行凝胶电泳,凝胶成像仪拍片,计算不同条带灰度值,不同组间进行比较。

**2.4 Western blot 检测 Runx2 和 EMT 相关蛋白的表达** 收集对数生长期细胞,RIPA 裂解提取总蛋白、SDS-PAGE 分离及转膜、封闭及 I 抗(1:1 000)孵育过夜、次日 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再加入 II 抗(1:5 000),摇床上室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。化学发光检测,并测定灰度值。

**2.5 细胞侵袭实验** 实验前进行细胞饥饿处理 12 h。提前将基质胶于冰上融化成液态,将 150  $\mu\text{L}$  无血清的 DMEM 培养基和 50  $\mu\text{L}$  的基质胶混匀。每个小室上室均匀铺 30  $\mu\text{L}$  稀释的基质胶后,将小室置于 24 孔板里于孵箱中 30 min,使胶凝固。取处于对数生长期的细胞,胰酶消化并离心,制成单细胞悬液,调整浓度至  $1 \times 10^9/\text{L}$ 。待小室的胶凝固后,每组细胞设 2 个复孔,每孔  $3 \times 10^5$  cells,小室上室无血清的 DMEM 培养体系每孔 200  $\mu\text{L}$ ,加入相应体积的细胞悬液,下室加 500  $\mu\text{L}$  完全的 DMEM 培养基。将 24 孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后,收板。弃去上室培养液,棉签轻擦去上室中未穿过膜的细胞。加 4% 多聚甲醛结晶紫固定并染色 2 h 后。PBS 清洗上室 3 次,室温干燥后,显微镜下观察、拍摄图片,每孔随机选取 5 个视野拍照并计数。实验重复 3 次。

**2.6 软琼脂集落形成实验** 实验前将水浴锅设置为 60  $^{\circ}\text{C}$  (维持琼脂糖胶呈液态),按 1:1 比例使 1.2% 的琼脂糖和 2  $\times$  DMEM 完全培养基(含 20% 胎牛血清和 2% 青、链霉素)充分混合制备下层胶,每孔取 1.5 mL 铺于 6 孔板中(枪头稍留点,不全打完,避免产生气泡),封口膜封板,于平整冰面上冷却凝固(约 45 min)。在等待下层胶凝固的时间中,取对数生长期的细胞,胰酶消化离心,制成细胞悬液,调整

细胞浓度至  $1 \times 10^7/\text{L}$ 。铺上层胶,每孔 3 000 cells,每组细胞设 2 个复孔,取 900  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入到 600  $\mu\text{L}$  2  $\times$  DMEM 完全培养基中混匀,再加 1.5 mL 0.7% 的琼脂糖,充分混匀后取 1 mL 后注入铺有 1.2% 琼脂糖底层平皿中。冷却凝固后,加入 1 mL DMEM 完全培养基,保持琼脂的湿润度。置入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 14 d。收板,显微镜下观察、拍摄图片,每孔随机选取 5 个视野拍照并计数。实验重复 3 次。

### 3 统计学处理

用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示。多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),用 Bonferroni 校正的  $t$  检验进行各组间均数的两两比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 成功建立 Runx2 表达抑制的乳腺癌细胞系

慢病毒转染 72 h 后,在荧光显微镜下观察细胞荧光表达,并用嘌呤霉素筛选 2 ~ 3 周,直至荧光倒置显微镜下观察所有的细胞均能够稳定表达 GFP 荧光时,说明成功建立了稳定敲低 Runx2 表达的细胞株,见图 1。敲低 Runx2 表达的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株(Runx2-shRNA3)中 Runx2 的 mRNA 和蛋白含量明显低于常规 MDA-MB-231 乳腺癌细胞和转染慢病毒阴性载体的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞( $P < 0.05$ ),提示在本实验中 Runx2-shRNA3 组干扰效率高,并应用于后续实验中;未转染(control)组和阴性对照(NC)组的差异无统计学显著性,见图 2。

### 2 敲减 Runx2 表达抑制乳腺癌细胞 EMT 过程

与正常 MDA-MB-231 细胞相比,敲减 Runx2 表达的 MDA-MB-231 细胞呈多边形,细胞之间变得更加紧密,呈现上皮样改变,这一现象提示敲减 MDA-MB-231 细胞中 Runx2 的表达可能抑制 EMT 过程,促使细胞发生间充质细胞上皮化,见图 3A;随后我们采用 Western blot 检测不同组中 EMT 相关标志物 E-cadherin、N-cadherin、 $\beta$ -catenin 和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的蛋白表达,结果显示敲减 Runx2 表达的 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin 蛋白明显高于常规 MDA-MB-231 细胞和转染慢病毒阴性载体的 MDA-MB-231 细胞( $P < 0.05$ ),未转染组和阴性对照组的差异无统计学显著性,见图 3B;敲减 Runx2 表达的 MDA-MB-231 细胞的 N-cadherin、 $\beta$ -catenin 和 MMP-9 蛋白水平明显低于常规 MDA-MB-231 细胞和转染慢病毒阴性载体的

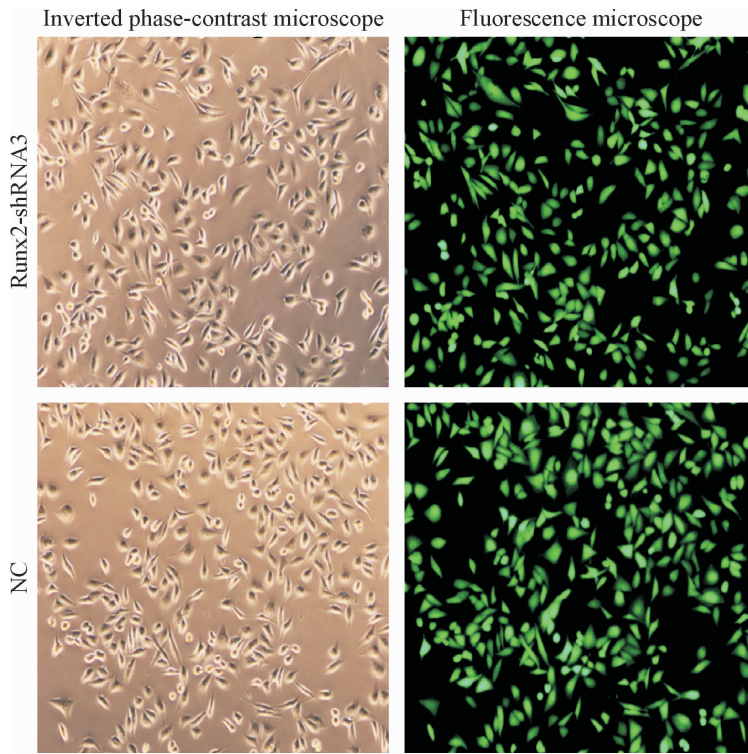


Figure 1. Knock-down of *Runx2* expression by lentiviral vector infection in MDA-MB-231 cells (×200).

图1 建立稳定表达 GFP 荧光的乳腺癌细胞系

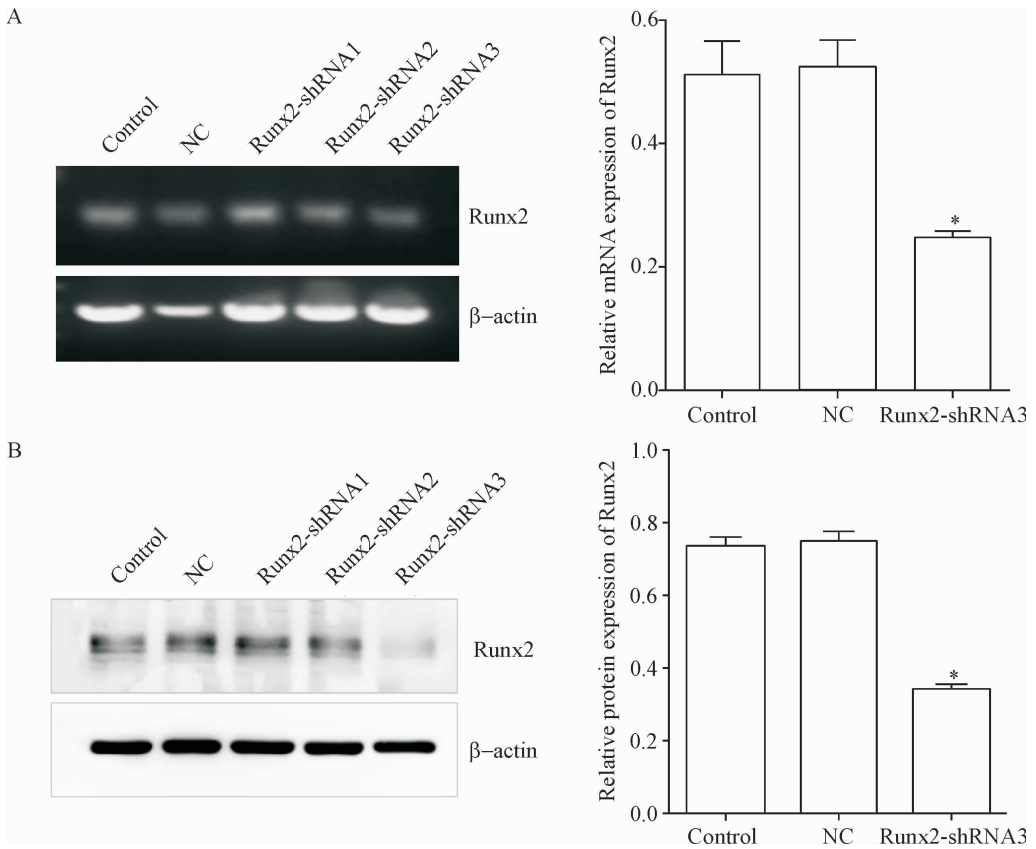


Figure 2. The mRNA and protein expression of Runx2 with or without infection with lentiviral vector in MDA-MB-231 cells detected by RT-PCR and Western blot. A: the mRNA expression of Runx2 was obviously inhibited in Runx2-shRNA3 group; B: the protein expression of Runx2 was obviously inhibited in Runx2-shRNA3 group. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group and NC group.

图2 成功建立 *Runx2* 表达抑制的乳腺癌细胞系

MDA-MB-231 细胞 ( $P < 0.05$ ), 未转染组和阴性对照

组的差异无统计学显著性, 见图 3B。

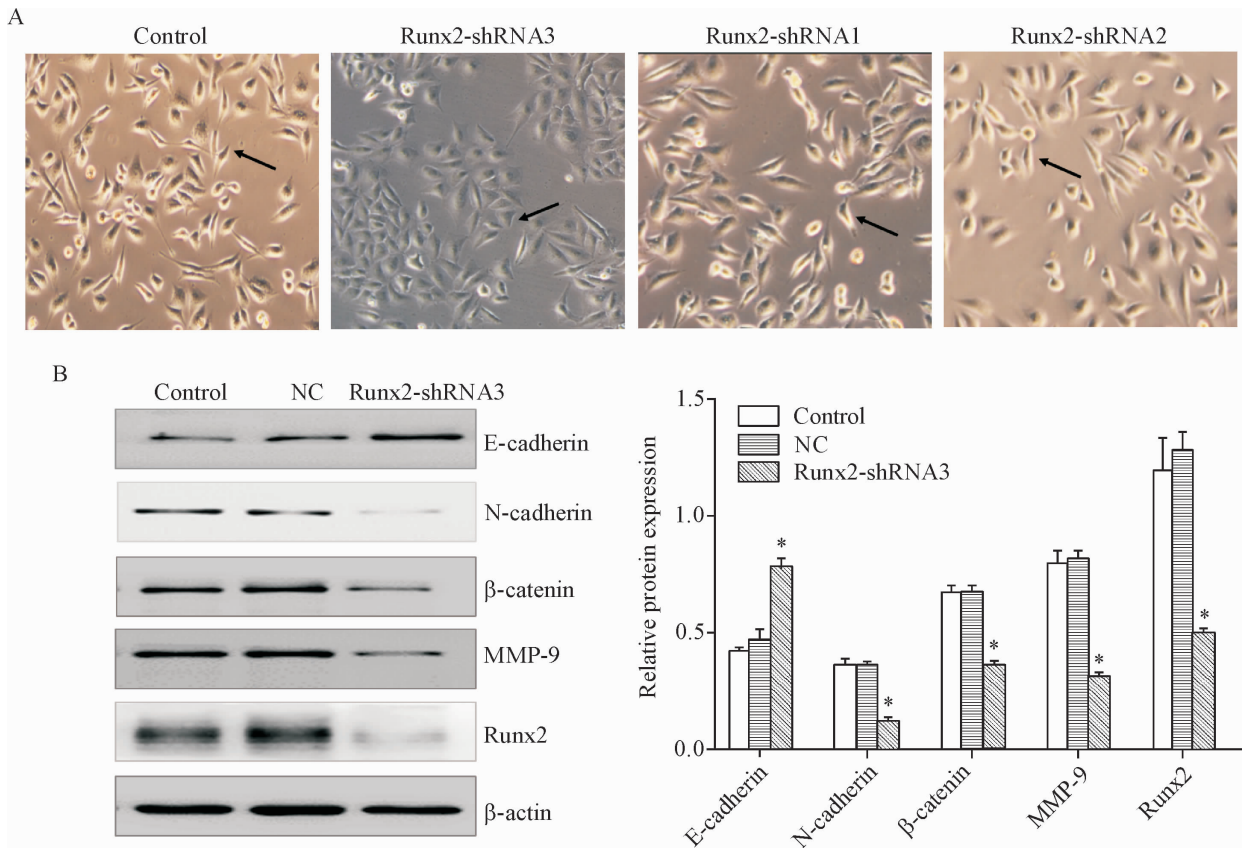


Figure 3. Mesenchymal-to-epithelial transition of MDA-MB-231 cells after down-regulating the expression of *Runx2*. A: the cell morphological changes were observed under reverted microscope ( $\times 200$ ); B: the relative protein expression of *Runx2* and the EMT markers E-cadherin, N-cadherin,  $\beta$ -catenin and MMP-9 in the MDA-MB-231 cells detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group and NC group.

图 3 *Runx2* 低表达抑制乳腺癌细胞 EMT 过程

### 3 抑制 *Runx2* 表达可以抑制高侵袭转移性乳腺癌细胞的侵袭能力

通过以上研究我们发现, 下调 *Runx2* 的表达可致 MDA-MB-231 细胞的 EMT 也受到抑制, 因此我们进一步检测了敲减 *Runx2* 表达后细胞的侵袭转移能力是否也受到了抑制。通过细胞侵袭实验, 我们发现敲低 *Runx2* 表达的 MDA-MB-231 细胞与正常 MDA-MB-231 细胞相比, 侵袭能力明显下降 ( $P < 0.05$ ), 未转染组和阴性对照组的差异无统计学显著性, 见图 4A, 说明抑制 *Runx2* 表达可以抑制高侵袭转移性乳腺癌细胞的侵袭能力。

通过软琼脂集落形成实验, 我们检测了敲减 *Runx2* 表达后细胞的非锚定生长能力, 发现敲减 *Runx2* 表达的 MDA-MB-231 细胞与正常 MDA-MB-231 细胞相比, 细胞形成集落的数目以及体积明显降低 ( $P < 0.05$ ), 未转染组和阴性对照组的差异无统计学显著性, 见图 4B, 说明抑制 *Runx2* 表达可以抑制高侵袭转移性乳腺癌细胞的非锚定生长能力, 降低了肿瘤细胞的恶性生物学行为, 进而影响了肿瘤细

胞侵袭转移能力。

## 讨 论

*Runx2* 是属于 *Runx* 基因家族的转录因子, 有一个保守的 Runt DNA 结合域, 编码与果蝇同源的蛋白<sup>[15]</sup>。最初, *Runx2* 被认为是骨骼发育的一个主要的调节因子<sup>[16]</sup>。迄今为止, 大量的证据表明 *Runx2* 和乳腺癌转移密切相关<sup>[17]</sup>。*Runx2* 高表达于更倾向骨转移的乳腺癌细胞系和乳腺原发组织中<sup>[18-19]</sup>。有证据表明在乳腺癌细胞中, *Runx2* 能够调节与骨转移有关的基因和基质金属蛋白酶的表达, 促进乳腺癌降解细胞基质, 破坏基底膜侵入血管或淋巴管, 有利于肿瘤细胞在远处转移部位的定植<sup>[20-21]</sup>。而上皮间充质化是恶性肿瘤进展过程中肿瘤获得浸润、迁移和远处转移能力的重要机制<sup>[22]</sup>。EMT 的发生是上皮细胞通过复杂的细胞和微环境改变获得间充质表型, 比如上皮标志物的降低, 间充质样标志物的表达上调, 细胞骨架的重组和基底膜的降解导致细胞间连接丢失, 从而促进这些细胞的侵袭和运动能力<sup>[3]</sup>。

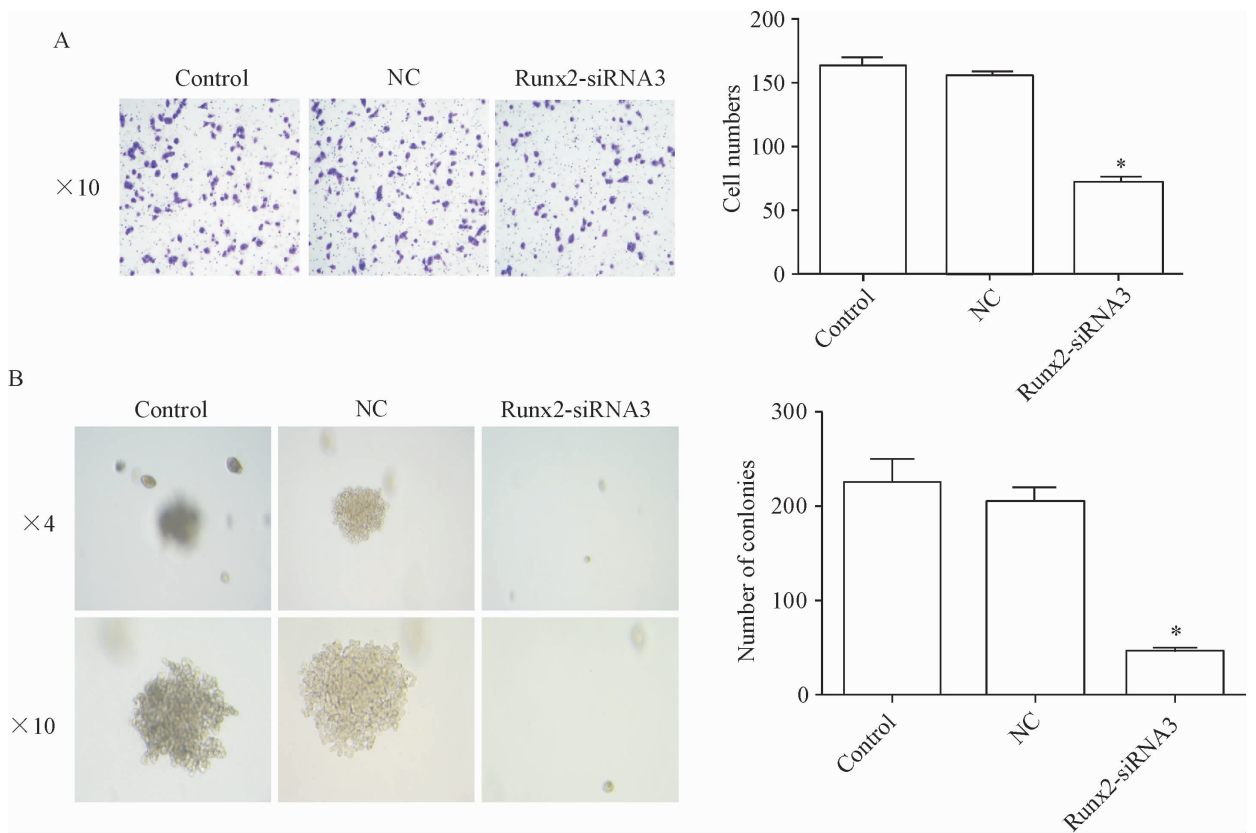


Figure 4. Inhibition of *Runx2* expression decreased the invasion ability of high invasive metastatic breast cancer MDA-MB-231 cells. A: the invasion ability of MDA-MB-231 cells was inhibited after *Runx2* expression knock-down; B: inhibition of *Runx2* expression inhibited anchorage-independent growth of human breast cancer MDA-MB-231 cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group and NC group.

**图4 抑制 *Runx2* 表达可以抑制高侵袭转移性乳腺癌细胞的侵袭能力**

因此,我们推测 *Runx2* 除了对肿瘤相关转移骨定植和基底膜突破发挥作用外,是否能够参与肿瘤细胞诱导 EMT 的发生,从而最终影响细胞的侵袭和转移能力。

本研究中我们选取 *Runx2* 表达水平较高的 MDA-MB-231 细胞,转染敲减 *Runx2* 表达的慢病毒载体。通过 Western blot 和 RT-PCR 验证了 *Runx2* 的敲减效率,结果显示敲减 *Runx2* 表达的 MDA-MB-231 细胞中上皮标志物 E-钙黏蛋白被诱导,间充质标志物 N-钙黏蛋白被明显抑制,降解细胞基底膜的蛋白酶 MMP-9 被抑制,参与诱导 EMT 的经典 WNT 信号通路的  $\beta$ -catenin 蛋白表达被抑制。这些结果表明敲低 *Runx2* 的表达能够抑制 EMT。同时我们通过侵袭实验和软琼脂集落形成实验结果显示,干扰 *Runx2* 可抑制细胞 EMT 的过程,从而抑制了细胞的侵袭转移能力。我们的研究提示,抑制 *Runx2* 的表达可以有效地干扰侵袭性较高的乳腺癌细胞的 EMT 过程,从而对乳腺癌细胞的侵袭能力起到抑制作用。但 *Runx2* 通过转录激活下游何种蛋白来影响 EMT 的过程仍在进一步研究中,我们初步的研究结果发现这

一过程可能与一种重要的细胞因子——TGF- $\beta$  有关,相关实验仍在进行中。本研究为今后以 *Runx2* 为核心,发现有效治疗靶点,干预乳腺癌的侵袭和转移提供了重要的思路和研究方向。

**[参 考 文 献]**

- [1] Zong JC, Wang X, Zhou X, et al. Gut-derived serotonin induced by depression promotes breast cancer bone metastasis through the RUNX2/PTHrP/RANKL pathway in mice [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2):739-748.
- [2] Siegel RL, DMiller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(1):5-29.
- [3] Neelakantan D, Zhou H, Oliphant MUJ, et al. EMT cells increase breast cancer metastasis via paracrine GLI activation in neighbouring tumour cells [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15773.
- [4] Roy SS, Gonugunta VK, Bandyopadhyay A, et al. Significance of PELP1/HDAC2/miR-200 regulatory network in EMT and metastasis of breast cancer [J]. *Oncogene*, 2014, 33(28):3707-3716.
- [5] Sethi N, Dai X, Winter CG, et al. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast

- cancer by engaging notch signaling in bone cells [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(2):192-205.
- [6] Brivio S, Cadamuro M, Fabris L, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer invasiveness; what can we learn from cholangiocarcinoma? [J]. *Clin Med*, 2015, 4(12):2028-2041.
- [7] Liu F, Gu LN, Shan BE, et al. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: an update[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6):4869-4876.
- [8] Smith BN, Bhowmick NA. Role of EMT in metastasis and therapy resistance[J]. *J Clin Med*, 2016, 5(2):E17.
- [9] Cox TR, Rumney RMH, Schoof EM, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase [J]. *Nature*, 2015, 522(7554):106-110.
- [10] Fradet A, Sorel H, Bouazza L, et al. Dual function of  $ERR\alpha$  in breast cancer and bone metastasis formation; implication of VEGF and osteoprotegerin [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17):5728-5738.
- [11] Martin JW, Zielenska M, Stein GS, et al. The role of RUNX2 in osteosarcoma oncogenesis[J]. *Sarcoma*, 2011, 2011:282745.
- [12] Wang W, Chen B, Zou R, et al. Codonolactone, a sesquiterpene lactone isolated from *Chloranthus henryi Hemsl*, inhibits breast cancer cell invasion, migration and metastasis by downregulating the transcriptional activity of Runx2 [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(5):1891-1900.
- [13] Bill R, Christofori G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis; correlation or causality? [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(14):1577-1587.
- [14] Sengupta S, Jana S, Biswas S, et al. Cooperative involvement of NFAT and SnoN mediates transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induced EMT in metastatic breast cancer (MDA-MB 231) cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2013, 30(8):1019-1031.
- [15] Buo AM, Tomlinson RE, Eidelman ER, et al. Connexin43 and Runx2 interact to affect cortical bone geometry, skeletal development, and osteoblast and osteoclast function [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32(8):1727-1738.
- [16] Vishal M, Swetha R, Thejaswini G, et al. Role of Runx2 in breast cancer-mediated bone metastasis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 99:608-614.
- [17] Tandon M, Chen Z, Othman AH, et al. Role of Runx2 in IGF-1R $\beta$ /Akt- and AMPK/Erk-dependent growth, survival and sensitivity towards metformin in breast cancer bone metastasis [J]. *Oncogene*, 2016, 35(36):4730-4740.
- [18] Li XQ, Du X, Li DM, et al. ITGBL1 is a Runx2 transcriptional target and promotes breast cancer bone metastasis by activating the TGF $\beta$  signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(16):3302-3313.
- [19] Owens TW, Rogers RL, Best S, et al. Runx2 is a novel regulator of mammary epithelial cell fate in development and breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18):5277-5286.
- [20] Gokulnath M, Swetha R, Thejaswini G, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 regulation of ATF-3, c-Jun and JunB proteins for activation of matrix metalloproteinase-13 gene in human breast cancer cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 94(Pt A):370-377.
- [21] Arumugam B, Vairamani M, Partridge NC, et al. Characterization of Runx2 phosphorylation sites required for TGF- $\beta$ 1-mediated stimulation of matrix metalloproteinase-13 expression in osteoblastic cells [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(2):1082-1094.
- [22] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3):178-196.

(责任编辑: 陈妙玲, 罗 森)