

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)22-2057-03

胃癌组织中 *runx3* mRNA 和蛋白的表达及其临床意义

李 华, 李 勇, 范立侨, 王力利, 赵 群, 赵雪峰, 焦志凯 (河北医科大学附属第四医院外三科, 河北 石家庄 050011)

Expression of *runx3* mRNA and protein in gastric carcinoma and its correlation with clinicopathological parameters

LI Hua, LI Yong, FAN Li-Qiao, WANG Li-Li, ZHAO Qun, ZHAO Xue-Feng, JIAO Zhi-Kai

Third Department of Surgery, Fourth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expression of *runx3* gene mRNA and protein in human gastric carcinoma and surrounding normal tissue and its correlation with clinicopathological parameters. **METHODS:** RNA and protein were extracted from 60 human gastric carcinoma and surrounding normal tissue specimens. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the *runx3* mRNA and protein level. **RESULTS:** The relative expression value of *runx3* mRNA found in human gastric carcinoma specimens was 0.7542 ± 0.1284 , and that did in surrounding normal tissue specimens was 0.8427 ± 0.0541 ($t = 4.941, P < 0.0001$). The integral optical density value of *runx3* protein confirmed in human gastric carcinoma specimens was 10828 ± 989.9 and that did in surrounding normal tissue specimens was 47833 ± 7566 ($t = 35.57, P < 0.0001$). RT-PCR and Western blot indicated expression of *runx3* in gastric carcinoma was significantly lower than that in corresponding normal stomach tissue respectively. **CONCLUSION:** Lower expression of *runx3* gene mRNA and its protein in the gastric carcinoma probably plays an important role in the tumorigenesis and development of gastric carcinoma.

【Keywords】 stomach neoplasms; *runx3* gene; blotting, western; reverse transcriptase polymerase chain reactor

【摘要】目的:探讨 *runx3* 基因 mRNA 及其蛋白在胃癌与正常胃粘膜组织中的表达差异及其临床病理相关因素之间的关系。方法:采用逆转录-多聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western Blot 技术对临床 60 例胃癌新鲜标本及其周围正常粘膜组织

中 *runx3* 基因和蛋白的表达进行检测,并对其表达和各临床病理参数的关系进行分析。结果:RT-PCR 结果显示 *runx3* mRNA 在胃癌组织标本中的表达量相对值(0.7542 ± 0.1284) 低于正常胃粘膜组织中的表达量(0.8427 ± 0.0541),两组比较差异有统计学意义($t = 4.941, P < 0.0001$);Western Blot 结果显示 *runx3* 蛋白在胃癌组织标本中的积分光密度值(10828 ± 989.9)明显低于在正常胃粘膜组织中的光密度值(47833 ± 7566),两组比较差异有统计学意义($t = 35.57, P < 0.0001$)。结论:*runx3* mRNA 及其蛋白在胃癌组织中的表达量明显低于正常组织。*runx3* 基因的表达异常在胃癌的发生发展过程中起着重要作用。

【关键词】胃肿瘤; *runx3* 基因; 印迹法; 蛋白质; 逆转录聚合酶链反应

【中图分类号】R735.2

【文献标识码】A

0 引言

人类 runt 相关转录因子 3(human runt-related transcription factor 3, *runx3*)是 runt 家族中新近受到广泛关注的基因,它是哺乳动物 RUNT 家族进化的基础^[1],定位于人染色体 1 号短臂 1p36 上。转化生长因子(transforming growth factor beta, TGF- β)是许多细胞的有效抑制因子其信号紊乱将导致许多肿瘤的发生。近年来研究发现, *runx* 蛋白可指导 TGF- β 信号转到过程中激活的 Smad 复合物从细胞质内转入细胞核内特定靶位点,加强 Smad 复合物与靶位点的结合强度并激活靶基因,从而对细胞的分化、细胞周期调控、凋亡和恶性转化起作用^[2]。在众多的肿瘤中均发现了染色体 1p36 的异常^[3-5],因此作为一种新的候选肿瘤抑制基因, *runx3* 受到广泛关注。为进一步明确 *runx3* 基因在胃癌发生、发展中的作用,本研究检测 60 例胃癌新鲜组织和正常胃粘膜组织中的 *runx3* 基因和其蛋白的表达,探讨 *runx3* 基因表达及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 60 例胃癌和其对应的正常胃粘膜组织取自我院自 2005-1/2005-08 的手术切除标本,并立即放于液氮中速冻, -80°C 冻存储存。年龄 28 ~ 80 (平均 57)岁,男 34 例,女 26 例,有淋巴结转移的 33

收稿日期 2006-04-13; 接受日期 2006-06-22

基金项目 河北省科技厅攻关课题(分子标志物联合检测对胃癌微转移的预警作用研究, No. 04276101D-37)

通讯作者:李 勇. Tel: 13931116966 Email: li_yong@inhe.net

作者简介:李 华. 副主任医师,博士研究生(导师李 勇). Tel: 13191753308 Email: lihuatsr@126.com

例。所有标本术后均经病理证实。

1.1.2 试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。cDNA 第一链反应试剂盒购自 Fermentas 公司。PCR 引物序列由上海生工生物工程公司合成。考马斯亮蓝蛋白分析试剂盒购自南京建成生物公司。*runx3* 兔单克隆抗体购自 Abcom 公司, Actin 小鼠单克隆抗体购自 Lab Vision 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 和组织蛋白提取 将组织标本研磨后,采用 Trizol 细胞裂解法按照说明书提取组织样本总 RNA 和组织蛋白,备用。

1.2.2 逆转录-多聚合酶链反应(RT-PCR) 紫外分光光度计定量总 RNA,调整浓度为 1 g/L 。按 cDNA 第一链反应试剂盒说明书采用随机引物法合成 cDNA。用 GAPDH 做为内参照进行 PCR。*runx3* 的引物序列:上游:5'-GATGCCAGGCAATGACGA-3',下游:5'-TGCTGAAGTGGCTTGTGGT-3',扩增长度 353 bp。GAPDH 的引物序列:上游:5'-AACGGATTTGGTCTG-TATTG-3',下游:5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3',扩增长度:208 bp。PCR 参数:94℃ 5 min 变性 94℃ 45 s,55℃ 55 s,71℃ 45 s 32 个循环,72℃ 延伸 7 min。PCR 产物于 20 g/L 琼脂糖电泳,电压 60 V,55 min。Gel ID 凝胶图像分析系统摄片并测定分析其光密度。计算各个样本 *runx3* 表达水平,表达量的相对值(relative expression value) = 待测基因扩增条带的灰度值/GAPDH 基因扩增条带的 A 值。

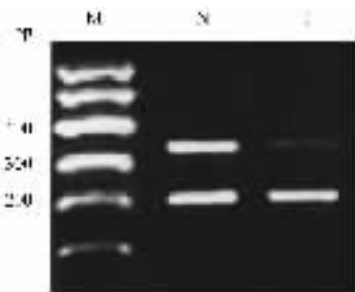
1.2.3 Western Blot 检测 *runx3* 蛋白在肿瘤组织和正常组织中表达的差异 将组织总蛋白用考马斯亮蓝试剂盒定量。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后,100 V 转膜 120 min。凝胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,按照 $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 加入 1:80 用 1×TBS 稀释的一抗 4℃ 过夜。1×TBS 漂洗硝酸纤维素膜 5 min × 3。按照 $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 加入 1:800 用 1×TBS 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃ 1 h。用 1×TBS 漂洗膜 5 min × 3 次。最后用 DAB 显色 8~10 min 至膜上出现红棕色条带,显色适度时蒸馏水漂洗中止显色反应,拍摄滤膜照片。并用 Gel ID 凝胶图像分析系统测 A 值。分析计算各个样本 *runx3* 蛋白的 A 值。

统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件对胃癌和正常粘膜组织间的 *runx3* 表达量及光密度行配对 *t* 检验,对临床病理因素间 *runx3* 的表达行成组 *t* 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *runx3* mRNA 在胃癌和正常粘膜组织中的表达

正常粘膜组织中扩增产物电泳条带比胃癌组织中较清晰,扩增片段大小与所设计的大小完全一致,分别为 353 bp 和 208 bp。*runx3* 表达量相对值在胃癌组织和正常粘膜组织中分别是 (0.7542 ± 0.1284) 和 (0.8427 ± 0.0541) ,两者差异有统计学意义($t = 4.941, P < 0.0001$)。

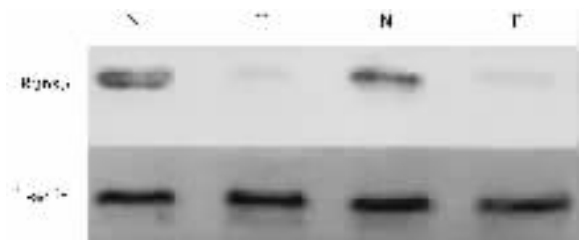


M Marker; N 正常组织 T 肿瘤。

图 1 RT-PCR 分析 *runx3* mRNA 在胃癌组织和正常粘膜内的表达

2.2 *runx3* 蛋白在胃癌和正常粘膜组织中的表达

runx3 A 值在胃癌组织和正常粘膜组织中分别为 (10828 ± 989) 和 (47833 ± 7566) (图 2),两组相比有统计学意义($t = 35.57, P < 0.0001$)。



N 正常胃粘膜组织 T 肿瘤组织。

图 2 Western Blot 分析 *runx3* 蛋白在胃癌组织和正常粘膜内的表达

2.3 *runx3* 的表达与胃癌临床病理因素的关系

runx3 mRNA 的表达与胃癌的分化程度及淋巴结转移有关($P < 0.01$),而与性别、肿瘤大小无关($P > 0.05$ 表 1)。

3 讨论

Runt 家族包括 3 个基因其家族成员均具有含 123 个氨基酸 Runt Domain (RD 区域),*runx* 蛋白与 Smad2, Smad3 形成复合物传递 TGF- β /activin 信号,都与人类疾病的发生密切相关。*runx3* 含有 2 个高度保守的 CpG 岛,其中一个大的 CpG 岛位于 *runx3* 基

因启动子 P2 周围,其内富含 GC 启动子的特征控制 *runx3* 基因的转录^[1]。目前研究发现消化道肿瘤如胃癌、胆管癌、胰腺癌和肝细胞癌中均有染色体 1p36 异常^[6-7]。*runx3* 基因则作为一种肿瘤抑制基因,与多种肿瘤的发生发展相关。

表 1 *runx3* mRNA 表达与其临床病理因素的关系 (A, $\bar{x} \pm s$)

临床/病理	n	<i>runx3</i> mRNA	t	P	
性别	男	34	0.7380 ± 0.1350	1.143	0.2579
	女	26	0.7755 ± 0.1184		
肿瘤大小 (cm)	≥5	38	0.7527 ± 0.1365	0.1256	0.9006
	<5	22	0.7569 ± 0.1162		
分化程度	低分化	36	0.6977 ± 0.09681	4.696	<0.0001
	高分化	24	0.8391 ± 0.1246		
淋巴结转移	有	33	0.7100 ± 0.1189	3.160	<0.0001
	无	27	0.8083 ± 0.1204		

在 45% ~ 60% 的胃癌细胞系和胃癌组织中,有紧邻 P2 启动区的 CpG 岛的甲基化^[8-9]。研究发现在 30% 的胃癌中有 1p36.1 的杂合性缺失,而 *runx3* 的点突变则为 0.8%^[10]。本研究结果表明胃癌中 *runx3* 的表达量明显低于正常粘膜组织,由此可见,在胃癌发生、发展过程中 *runx3* 基因表达在低分化和伴有淋巴结转移组中明显低于中高分化和未转移组。因此,近年来部分学者更倾向于 *runx3* 基因是一种抑癌基因,在胃癌发生中起重要作用。

runx3 蛋白作为 TGF- β 信号通路下游的一个转录因子其内部的 RD 区域 β 亚单位可与蛋白结合,阻止了 runt 区域的泛素化且稳定 *runx* 蛋白,增加其与 DNA 的亲合力。本研究结果发现胃癌组织中 *runx3* 蛋白的表达低于正常粘膜组织,说明在胃癌的发生发展过程中可能由于 *runx3* 基因的失活导致了其编码的蛋白不能够表达,影响了其功能的发挥从而导致胃癌的发生。

runx3 在胃癌中存在异常表达,在胃癌的发生、发展中起一定作用,*runx3* 基因作为胃癌的一种新的抑癌基因,对其参与胃癌发生、发展的具体机制的进一

步研究必将对胃癌的临床早期诊断和治疗带来新的启示。

【参考文献】

- [1] Bangsow C, Rubins N, Glusman G, et al. The RUNX3 gene-sequence, structure and regulated expression [J]. *Gene*, 2001, 279 (2): 221-232.
- [2] Zaidi SK, Sullivan AJ, van Wijnen AJ, et al. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8048-8053.
- [3] Tokumaru Y, Nomoto S, Jeronimo C, et al. Biallelic inactivation of the RIZ1 gene in human gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (44): 6954-6958.
- [4] Kang YK, Kim YI, Kim WH. Allelotype analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2000, 13(6): 627-631.
- [5] Fang W, Piao Z, Simon D, et al. Mapping of a minimal deleted region in human hepatocellular carcinoma to 1p36.13-p36.23 and mutational analysis of the RIZ1 (PRDM2) gene localized to the region [J]. *Genes Chromosomes Cancer* 2000, 28(3): 269-275.
- [6] Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PERP2/CBF [J]. *Genes Cells*, 1999, 4(12): 685-696.
- [7] Warren AJ, Bravo J, Williams RL, et al. Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBFbeta [J]. *EMBO J*, 2000, 19(12): 3004-3015.
- [8] Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. *Ce11*, 2002, 109 (1): 113-124.
- [9] Waki T, Tamura G, Sato M, et al. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(4): 360-364.
- [10] Miyazono K, Suzuki H, Imamura T, et al. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(3): 230-234.
- [11] Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and pre-malignant stages of gastric carcinoma [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(4): 479-484.
- [12] Levanon D, Brenner O, Otto F, et al. Runx3 knockouts and stomach cancer [J]. *EMBO Rep*, 2003, 4(6): 560-564.

编辑 许福明