

RUNX3 基因与胃癌的关系

黄大兵 综述 胡世莲 审校

(安徽医科大学附属省立医院老年病科,合肥 230001)

[摘要] RUNX3 基因是 RUNX 转录因子家族成员之一,其在胃黏膜上皮生长调控、脊神经节的神经发育和 T 细胞分化过程中发挥重要作用。在人类多种恶性肿瘤尤其是胃癌中发现 RUNX3 基因表达缺失或下调。目前发现有多种机制包括杂合性缺失、高甲基化和点突变等参与了 RUNX3 基因在胃癌中的表达缺失或下调,其中 RUNX3 启动子区域 CpG 岛的甲基化是导致其在胃癌中失活的主要机制。随着研究的不断深入,RUNX3 基因有望成为胃癌诊断的一个特异性生物学标志物和基因治疗的靶点。

[关键词] 胃癌; 甲基化; RUNX3 基因

[中图分类号] R735.2;R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2008)06-0487-04

Relationship between RUNX3 gene and gastric cancer

HUANG Da-bing, HU Shi-lian

(Department of Gerontology, Province Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

[Abstract] RUNX3, a member of RUNX family, plays important roles in the regulation of gastric epithelial growth, dorsal ganglion neural development and differentiation of T cells. The expression deficiency or down regulation of RUNX3 gene was detected in many malignant tumors especially in gastric cancer. Multiple mechanisms including heterozygosity deletion, hypermethylation and point mutation contribute to the expression deficiency or down regulation of RUNX3 in gastric cancer. The methylation of CpG Islands in RUNX3 promoter region is major mechanism which induces RUNX3 inactivation in gastric cancer. Along with the thorough research, RUNX3 may be a potential marker in the diagnosis and gene treatment of gastric cancer.

[Key words] gastric cancer; methylation; RUNX3 gene

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(6):0487-04]

胃癌是全球常见的恶性肿瘤之一,居消化道恶性肿瘤发病率和死亡率的首位。1994 年 Levanon 等^[1]发现 RUNX3 基因后,此基因曾先后被命名为多瘤病毒强化因子结合蛋白 2 基因、核心结合因子 α 3 基因、急性髓性白血病 2 基因。研究表明,RUNX3 基因的异常改变尤其是其异常甲基化与众多肿瘤如肝癌、胰腺癌、肺癌等的发生相关^[2,4]。Li 等^[5]报道 RUNX3 在 45% ~ 60% 的胃癌中表达缺失或下降。RUNX3 基因敲除(RUNX3^{-/-})小鼠胃黏膜上皮没

有发现凋亡细胞,并且对转化生长因子 β (TGF- β) 的凋亡诱导作用敏感性降低。虽然目前已发现胃癌的发生存在多种基因的异常,但 RUNX3 基因的异常与胃癌的发生具有明显的相关性,很可能是与胃癌发生相关的一个关键基因。

1 RUNX3 基因的结构和功能

1.1 RUNX3 基因结构 人类 RUNX3 基因位于染色体 1p36.1,基因全长约 67 kb,含有 6 个外显子、P1 和 P2 两个启动子以及 1 290 bp 的开放阅读框,

收稿日期:2008-07-09 修回日期:2008-10-07

作者简介:黄大兵(1980—),男,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事胃癌基因甲基化基础与临床方面的研究。

通讯作者:胡世莲,E-mail:hushilian78@163.com

基金项目:国家自然科学基金(30672383) This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (30672383)

两个启动子均含有数个转录起始点^[1]。RUNX3 基因是 RUNX 家族成员之一,在哺乳动物中目前已发现 RUNX 家族包括 3 个成员:RUNX1, RUNX2 和 RUNX3^[6]。在 RUNX 家族 3 个基因中,RUNX3 是最保守的同时含有的外显子数目是最少的^[7]。RUNX3 mRNA 主要来自于 P2 启动子的转录。P2 含有 CCAAT 盒、E 盒、SP1 以及 Egr-1 的结合位点。P1 和 P2 转录成 mRNA 时分别产生 373 bp 的 5'-非编码区(5'-UTR)和含有长 254 bp 的 3'-非编码区(3'-UTR)缺多聚 A 尾。两个启动子 GC 含量不同,P2 启动子 GC 含量比较高(64%)。人类和鼠的 RUNX3 基因围绕着外显子 2(相当于启动子 P2 的位置)和外显子 6 的起始部位均含有 2 个大的 CpG 岛。此外,人类 RUNX3 邻近外显子 5 部位还有 1 个明显的 CpG 岛^[1]。

1.2 RUNX3 的功能 人类 RUNX3 蛋白由 415 个氨基酸残基构成,RUNX 家族蛋白产物均是由 α 亚单位和 β 亚单位构成的异二聚体,都含有一个位于 α 亚单位的由 128 个氨基酸组成的 RD(Runt 结构域)保守结构域,RD 位于 RUNX 蛋白的氨基末端,包含一个 S 型免疫球蛋白折叠。 α 亚单位介导 RD 与靶 DNA 基序 PyGPyGGT 的结合及蛋白之间的相互作用, β 亚单位能增强 RD 与靶 DNA 的结合力^[6]。RUNX 基因家族的 3 个成员是一些生长发育途径中基因表达的主要调节因子,在人类细胞增殖和分化中起着中枢的作用^[8]。其中 RUNX3 被认为是哺乳动物 3 个 RUNX 基因中最保守的基因,参与了胃上皮细胞增殖的抑制、背根神经节的神经发生以及 T 细胞的分化^[9]。

2 胃癌 RUNX3 基因的异常改变

2.1 杂合性缺失 有研究者应用荧光原位杂交技术(FISH)对 15 株胃癌细胞系和 46 例原发性胃癌的手术切除标本中的 RUNX3 基因型进行分析,发现其中 3 株胃癌细胞系和 14 例胃癌组织存在 RUNX3 杂合性缺失,杂合性缺失率随着肿瘤的演进有明显的增高($P < 0.01$)。同时上述标本 RUNX3 mRNA 的表达也有相应的改变,RUNX3 在 7 株胃癌(47%)细胞系中无或低表达(包括 3 例 RUNX3 杂合性丢失的细胞系),28 例胃癌组织中(61%)RUNX3 无或低表达,RUNX3 的表达下调从早期胃癌的 40% 到进展期胃癌的 90%,其下调的比例随着肿瘤的演进而显著上升($P < 0.01$)。在这 28 例不表达 RUNX3 的胃

癌病例中有 13 例存在其杂合性缺失。检测到杂合性缺失的 14 例胃癌组织中有 13 例都存在 RUNX3 表达缺失。以上结果提示 RUNX3 杂合性缺失是胃癌细胞 RUNX3 表达下调或缺失的原因之一。

2.2 高甲基化 启动子区域的异常甲基化与肿瘤基因编码区域的突变一样参与了肿瘤的发生^[10]。RUNX3 的启动子 P2 区域有一个典型的 CpG 岛。运用甲基化特异性 PCR 法(MSP)检测 6 株具有代表性的胃癌细胞系(3 株表达 RUNX3,另 3 例不表达 RUNX3)以及 3 例原发性胃癌标本和 3 例正常胃黏膜标本的甲基化状态。3 株胃癌细胞系(SNU1, MKN28 和 MKN74)和 3 例胃癌组织不表达 RUNX3,它们的 RUNX3 启动子 P2 区域的 CpG 二核苷酸中的 C 残基是完全甲基化的;3 株胃癌细胞系(MKN1, RF1 和 RF48)和 3 例正常胃黏膜标本表达 RUNX3,它们的 CpG 二核苷酸中 C 残基都是非甲基化的^[5]。上述结果提示胃癌细胞不表达 RUNX3 可能是其 P2 启动子区甲基化导致的。

Guo 等^[11]应用 N-甲基-N-亚硝基脲诱导鼠胃癌并建立 4 株胃癌细胞系,它们均不表达 RUNX3,并且用 MSP 方法证实因为 RUNX3 的启动子区域的甲基化作用导致了 RUNX3 的表达沉默,接着在 5-氮-2-脱氧胞苷(AZA)和曲古抑菌素(TSA)的共同作用下使 RUNX3 重新表达。Kim 等^[12]检测 75 例胃癌以及各种胃癌前期病变组织(胃腺瘤 77 例、慢性胃炎伴肠上皮化生 32 例和慢性胃炎不伴肠上皮化生 99 例)RUNX3 的甲基化状态,发现 64% 胃癌组织存在 RUNX3 的甲基化,胃癌前期病变组织中也存在不同程度的 RUNX3 甲基化,其中胃腺瘤(27.3%)、慢性胃炎伴肠上皮化生(28.1%)和慢性胃炎不伴肠上皮化生(8.1%)。在正常胃黏膜标本中,RUNX3 的甲基化仅见于 77 岁以上的老年人,除了胃黏膜 RUNX3 在其他非肿瘤组织的甲基化作用很罕见。以上的研究结果提示,RUNX3 的甲基化作用随着胃癌的演进而增加且是一种肿瘤特异性的改变,可以探索以 RUNX3 为治疗的靶点,恢复沉默的 RUNX3 的表达对胃癌进行基因治疗,这也许为临床上胃癌的诊断和治疗提供了一种新思路。

Homma 等^[13]应用 MSP 方法检测 10 株胃癌细胞系、45 例胃癌标本以及相应癌旁正常组织中 RUNX3 启动子区 CpG 岛内连续 10 个位点的甲基化状态,结果发现上述标本最靠近 5' 端的 CpG 岛的甲

基化阳性率分别是 90%、96% 和 96%，而靠近转录起始点的 CpG 岛的甲基化阳性率分别是 40%、53% 和 11%，从最靠近 5' 端的 CpG 岛到跨越转录起始点的甲基化阳性率逐渐降低，因此认为 RUNX3 的甲基化作用最初发生在最靠近 RUNX3 的 5' 端的 CpG 岛，然后逐渐扩展至转录起始点直至最终关闭 RUNX3 的 mRNA 的表达。提示 RUNX3 启动子区跨越转录起始点的甲基化作用最具有肿瘤特异性，此位点的甲基化检测可用于胃癌的诊断。此外，年龄和肿瘤部位与基因的甲基化作用密切相关，非肿瘤上皮的甲基化作用随着年龄的增长而增加^[14]。研究证实，幽门螺杆菌感染是胃癌中 RUNX3 异常甲基化的独立的危险因素。胃体中下部持续幽门螺杆菌感染很可能导致胃上皮细胞中 RUNX3 的甲基化。RUNX3 主要是因为表遗传机制而不是基因突变或缺失而失活^[15]，提示 RUNX3 可以被再活化，同时可能是一个基因治疗的靶点。

2.3 点突变 基因突变是导致基因表达沉默的原因之一，在肿瘤的发生中具有重要作用。为了探讨胃癌组织中 RUNX3 的表达下调是否由突变引起，有研究者检测 118 例胃癌组织中 RUNX3 的突变情况，结果仅发现 1 例存在 RUNX3 的突变，突变位点位于 RUNX 保守区域 373C→T 的转换导致第 122 位点的精氨酸转变成半胱氨酸 (R122C)^[5]，但未做正常对照研究。Guo 等^[11]进一步研究 RUNX3 基因 R122C 突变的功能和意义，分别将突变型 (R122C) 和野生型 RUNX3 基因转染细胞系 MKN74 (RUNX3^{-/-})，发现 RUNX3 野生型转染组细胞增殖受到抑制，而 RUNX3 (R122C) 转染组以及对照的单纯转染空载体组不能抑制细胞的增殖，提示 RUNX3 的突变型 (R122C) 使其活性降低或缺失。由于目前发现的 RUNX3 突变率很低，因此还很难正确评价其突变与胃癌的关系，有待进一步的研究。

3 RUNX3 基因的抑制机制

3.1 RUNX3 基因与凋亡 肿瘤细胞普遍存在抗凋亡的特性^[16]。研究证明 RUNX3 通过调节对 TGF-β 途径的敏感性来调控胃上皮的生长和分化。TGF-β 途径是一种较常见的肿瘤抑制途径，TGF-β 与其跨膜受体 TGF-β 受体 1,2 结合，诱导这两种受体产生一种活性异四聚体复合物，该复合物激活固定在细胞膜上的受体调控型蛋白 Smad (Smad2 和 Smad3)，后者与辅助型蛋白 Smad4 结合并转移至细

胞核内，与转录因子 RUNX3 一起共同调控靶基因的转录，从而产生抑制细胞生长和促进上皮细胞凋亡的生物学作用^[18-20]。Chi 等^[21]研究发现 TGF-β 诱导 P21 的表达是通过 RUNX3 介导的，P21 启动子包含 5 个 RUNX3 结合域。当 P21 启动子区域的 RUNX3 结合位点发生突变时，RUNX3 活化 P21 表达的活性显著降低。并且 RUNX3 诱导 P21 的表达呈剂量依赖性。RUNX3 基因具有调节细胞周期的作用。在体外研究中，上调 RUNX3 的表达可使细胞周期蛋白 D1 的表达下调而 p27 以及 caspase-3, -7, -8 的表达上调，细胞周期停滞、发生凋亡^[22]。最近发现，在表达 RUNX3 的胃癌细胞系 MKN-1 中，RUNX3 通过线粒体中死亡受体途径如上调 ING1 和 ING4 以及下调 TXN2 和 HSPD1 的转录使细胞生长抑制和发生凋亡^[23]。以上研究结果均支持 RUNX3 表达缺失或降低使胃上皮黏膜的正常凋亡受到抑制，从而参与胃癌的发生和发展。

同时有研究发现 RUNX3 与转录因子 FoxO3a/FKHRL1 相互作用诱导凋亡。RUNX3 诱导的凋亡依赖于 Bim。RUNX3 和 FoxO3a/FKHRL1 在 Bim 启动子区域的相互作用活化了 Bim 的表达^[24]。在胃癌细胞株 SNU16 中，RUNX3 失活的情况下，Bim 的表达是被抑制的。在 RUNX3^{-/-} 的鼠胃上皮，Bim 的表达是下调的，并且细胞凋亡减少^[25]。这些研究结果提示 RUNX3 对 Bim 的转录上调起作用且 RUNX3 与 FoxO3a/FKHRL1 相互作用诱导 Bim 的表达从而参与胃黏膜上皮的凋亡调控。

3.2 其他机制 研究发现 RUNX3 蛋白的胞核易位与胃癌的发生关系密切。Ito 等^[26]研究了 RUNX3 蛋白在 97 例胃癌标本和 6 株胃癌细胞株中的表达和分布情况，结果发现其中 5 株胃癌细胞株 RUNX3 蛋白位于细胞质，然后选择 1 株对 TGF-β 敏感的 SNU16 加入 TGF-β，RUNX3 在细胞核内积聚，细胞生长受到明显抑制；与此相一致的是研究者还发现 56% 表达 RUNX3 蛋白的胃癌标本中有 68% RUNX3 蛋白定位于细胞质，只有 32% 定位于细胞核。转录因子局限在细胞质被认为是一种基本失活的状态。以上研究结果提示，RUNX3 蛋白局限于细胞质使其失去抑制细胞生长的活性，并且 TGF-β 是 RUNX3 蛋白胞核易位的一个诱导因素。提示胃癌细胞中 RUNX3 蛋白由细胞核易位到细胞质可能是导致 RUNX3 失活的新机制。EZH2 (enhancer of zeste

homologue 2 或果蝇基因增强子)是参与调节细胞增殖和周期的一种蛋白,阻断 EZH2 的表达可延缓细胞增殖和诱导细胞周期停滞于 G₂-M 期。最近有研究表明^[15],EZH2 在转录水平上抑制 RUNX3 的表达。胃癌细胞系、胃癌组织中 RUNX3 的表达量因为 EZH2 的过量表达而显著降低,EZH2 的组蛋白修饰是导致 RUNX3 表达下调的关键因素,提示 RUNX3 的表达量与 EZH2 的表达量呈负相关,EZH2 的组蛋白修饰导致的 RUNX3 表达下调可能是导致 RUNX3 在胃癌细胞中表达下调的又一机制。

综上所述,RUNX3 是一个在细胞生长、凋亡、分化以及肿瘤发生过程中起着重要作用的基因。RUNX3 的缺失或失活可导致胃黏膜上皮的过度增生和凋亡减少,参与了胃癌的发生和发展。RUNX3 启动子区 CpG 岛的甲基化是导致其在胃癌中失活的主要原因。深入研究 RUNX3 基因在胃癌发生发展中的作用,有利于阐明胃癌的发病机制,从而为胃癌的诊断和治疗提供更为有效的方法。

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] Xiao WH, Liu WW. Hemizygous deletion and hypermethylation of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 376-380.
- [3] Wada M, Yazumi S, Takaishi S, et al. Frequent loss of RUNX3 gene expression in human bile duct and pancreatic cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 2004, 23(13):2401-2407.
- [4] Li QL, Kim HR, Lee YH, et al. Transcriptional silencing of the Runx3 gene by CPG hypermethylation is associate with lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(1): 223-228.
- [5] Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer[J]. *Cell*, 2002, 109(1):113-124.
- [6] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and RUNX proteins[J]. *Oncogene*, 2004, 23(24): 4232-4237.
- [7] Levanon D, Groner Y. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes[J]. *Oncogene*, 2004, 23(24): 4211-4219.
- [8] Coffman JA. RUNX transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation[J]. *Cell Biol Int*, 2003, 27(4): 315-324.
- [9] Bae SC, Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3[J]. *Oncogene*, 2004, 23(24): 4336-4340.
- [10] 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.
- [11] Guo WH, Weng LQ, Ito K, et al. Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by RUNX3, a novel tumor suppressor[J]. *Oncogene*, 2002, 21(54):8351-8355.
- [12] Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, et al. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(4): 479-484.
- [13] Homma N, Tamura G, Honda T, et al. Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(1): 51-56.
- [14] Kitajima Y, Ohtaka K, Mitsuno M, et al. Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for RUNX3 methylation in gastric cancer[J]. *Oncol Rep*, 2008, 19(1):197-202.
- [15] Fujii S, Ito K, Ito Y, et al. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(25): 17324-17332.
- [16] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1):57-70.
- [17] Fukamachi H. RUNX3 controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals[J]. *Develop Growth Differ*, 2006, 48(1):1-13.
- [18] Siegel PM, J. Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(11): 807-820.
- [19] Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF- β signaling and its roles progression of tumors[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(3): 230-234.
- [20] Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins[J]. *Cell Biochem*, 2003, 89(1):9-18.
- [21] Chi XZ, Yang JO, Lee KY, et al. RUNX3 suppresses gastric epithelial cell growth by inducing P21 WAF1/Cip1 expression in cooperation with transforming growth factor β -activated SMAD [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(18): 8097-8107.
- [22] Wei D, Gong W, Oh SC, et al. Loss of RUNX3 expression significantly affects the clinical outcome of gastric cancer patients and its restoration causes drastic suppression of tumor growth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11): 4809-4816.
- [23] Nagahama Y, Ishimaru M, Osaki M, et al. Apoptotic pathway induced by transduction of RUNX3 in the human gastric carcinoma cell line MKN-1[J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(1):23-30.
- [24] Yamamura Y, Lee WL, Inoue K, et al. RUNX3 Cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8):5267-5276.
- [25] Yano T, Ito K, Fukamachi H, et al. The RUNX3 tumor suppressor upregulates bim in gastric epithelial cells undergoing transforming growth factor β -induced apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(12):4474-4488.
- [26] Ito K, Liu Q, Salto-tellez M, et al. RUNX3, a novel tumor suppressor, is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17):7743-7750.