

[文章编号] 1000 - 4718(2005)10 - 1905 - 04

# RUNX3 基因 364 位点 C→T 突变与胃癌关系的研究

胡 胜<sup>1</sup>, 宋启斌<sup>1</sup>, 柯玉华<sup>1</sup>, 胡品津<sup>2</sup>, 曾志荣<sup>2</sup>( <sup>1</sup>湖北省肿瘤医院, 湖北 武汉 430079; <sup>2</sup>中山大学附属第一医院, 广东 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 研究 *RUNX3* 基因 C364T 突变在我国胃癌高、低发区普通人群和胃癌患者中的分布, *H. pylori* 感染者胃粘膜的 *RUNX3* 基因 C364T 突变率, 探讨此突变与我国胃癌发生的关系。方法: 采用 PCR - 限制性片段长度多态性(RFLP)分析法检测胃癌高发区 169 名普通人、86 例胃癌患者和胃癌低发区 192 名普通人和 92 例胃癌患者的 *RUNX3* 基因多态性。同时比较胃癌低发区普通人胃粘膜 *H. pylori* 阳性和阴性者的 *RUNX3* 突变率。结果: 在胃癌高、低发区, 胃癌患者 *RUNX3* 基因 C364T 突变频率与普通人群无显著差异 ( $\chi^2 = 0.57$  和  $0.16$ ,  $P > 0.05$ )。与肿瘤类型也无明显关系。低发区 *H. pylori* 阳性者粘液中, *RUNX3* 基因突变率也无显著增高。结论: *RUNX3* 基因 C364T 突变可能不是我国胃癌高、低发区胃癌的遗传易感因素。而且 *H. pylori* 感染导致胃癌形成可能不由 *RUNX3* 基因 C364T 突变参与。

[关键词] 基因, Runx3; 突变; 幽门螺杆菌; 胃肿瘤

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Relationship between *RUNX3* gene 364 locus C→T mutation and gastric cancer in Chinese

HU Sheng<sup>1</sup>, SONG Qi - bin<sup>1</sup>, KE Yu - hua<sup>1</sup>, HU Pin - jin<sup>2</sup>, ZENG Zhi - rong<sup>2</sup>( <sup>1</sup>The Oncology Hospital of Hubei Province, Wuhan 430079, China; <sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Sun Yat - sen University, Guangzhou 510080, China)

**[ABSTRACT]** AIM: To study the frequency difference of *RUNX3* gene 364 locus C→T mutation between normal people (controls) and gastric cancer (GC) patients, and mutation in gastric mucosa of subjects with *H. pylori* infection. **METHODS:** Genomic DNA was extracted from peripheral blood and gastric mucosal biopsy specimens of normal people and GC patients in lower or higher prevalence region. Gene mutation was analyzed by PCR - RFLP. **RESULTS:** The frequency of *RUNX3* T/T genotype was no significant difference between controls and GC in lower ( $\chi^2 = 0.57$ ,  $P > 0.05$ ) or higher prevalence region ( $\chi^2 = 0.16$ ,  $P > 0.05$ ). A higher mutation rate in mucosal tissue infected with *H. pylori* was not discovered. **CONCLUSION:** *RUNX3* gene C364T mutation may be not a genetic susceptibility to GC in Chinese. The mutation is possibly involved in the pathway of *H. pylori* infection resulting in gastric carcinoma.

[KEY WORDS] Genes, Runx3; Mutation; *H. pylori*; Stomach neoplasms

哺乳动物存在 3 种 Runt 相关基因 *RUNX1*, *RUNX2* 和 *RUNX3*。人类 *RUNX3* 基因位于 1 号染色体(1p36.11 - p36.13), 其翻译蛋白为 415 氨基酸的 2 聚体<sup>[1]</sup>。

Li 等<sup>[2]</sup>发现, *RUNX3* 基因敲除小鼠(*RUNX3*<sup>-/-</sup>)胃壁 2 倍厚于野生型小鼠, 提示 *RUNX3* 基因敲除可刺激胃粘膜细胞增殖和凋亡; 而且这种增殖和凋亡过程不受转化生长因子(transforming growth factor, TGF) -  $\beta 1$  的抑制。Li 等进一步研究 *RUNX3* 基因与胃癌的关系表明, 人类胃癌细胞中 *RUNX3* 基因存在

明显的非整倍性和杂合丢失(loss of hemizygous, LOH), 而且 LOH 与肿瘤的分期存在联系。15 种胃癌细胞系中 7(47%)种几乎不存在 *RUNX3* 表达, 而临床标本则高达 60%。*RUNX3* 的下调在肿瘤早期阶段(肠上皮化生)即存在, 提示 *RUNX3* 具有肿瘤抑制作用。

Li 等<sup>[2]</sup>还发现, *RUNX3* 基因 364 位点 C→T 的突变可导致进化保守的 Runt 区域半胱氨酸代替精氨酸(R122C), *RUNX3* 结构改变使其肿瘤抑制作用消失。但此突变是否为单核苷酸多态性, 是否与幽门螺杆菌

[收稿日期] 2004 - 02 - 26 [修回日期] 2004 - 05 - 12

E - mail: ehsmn@163.com

菌(*H. pylori*)感染有关尚不清楚,因此本研究拟探讨 *RUNX3* 基因 364 位点 C→T 的突变与我国胃癌发生的关系。

## 材 料 和 方 法

### 1 研究对象

**1.1 普通人群** 胃癌低发区广东省(胃癌死亡率为男性 =  $7.9/1 \times 10^5$ , 女性 =  $3.5/1 \times 10^5$ <sup>[3]</sup>)普通人群 192 名,均为随机选取的中山大学医学院广东籍学生,其中男 73 人,女 119 人,平均年龄( $21.30 \pm 1.42$ )岁(19-24 岁)。胃癌高发区陕西省(胃癌死亡率为男性 =  $23.6/1 \times 10^5$ , 女性 =  $12.8/1 \times 10^5$ <sup>[3]</sup>)普通人群 169 名,为随机选取的西安交通大学医学院陕西籍学生,其中男 61 名,女 108 名,平均年龄( $21.80 \pm 1.95$ )岁(19-24 岁)。两地区普通人群之间和胃癌患者之间的年龄( $P > 0.05$ )、性别无明显差异( $P > 0.05$ ),均为汉族。普通人群系无胃病史、无系统性红斑狼疮、糖尿病、类风湿性关节炎、炎症性肠病病史,排除胃癌家族史。

255 名广东籍学生(包括第 1 部分的对照人群 192 名),其中男 132 人,女 123 人,平均年龄( $21.4 \pm 1.5$ )岁(19-24 岁),进行 *H. pylori* 抗体测定,然后随机选取 117 名(*H. pylori* 阳性 47 名、*H. pylori* 阴性 70 名)学生进行胃镜检查。胃镜取胃粘膜组织如下:胃窦、胃体各 2 块供 *RUNX3* 基因突变检测。

**1.2 胃癌患者** 胃癌低发区 92 例胃癌患者,男 51 例,女 41 例,平均年龄( $56.1 \pm 14.2$ )岁(31-87 岁)。为中山大学附属第一医院于 2001 年 6 月至 2002 年 4 月住院或门诊的胃癌患者。

胃癌高发区 86 例胃癌患者,男 55 例,女 31 例,平均年龄( $60.8 \pm 10.2$ )岁(30-75 岁)。为西安交通大学附属第一、第二医院、第四军医大学附属西京医院于 2001 年 7 月至 2002 年 5 月住院或门诊的胃癌患者。两地区胃癌患者之间的年龄( $P > 0.05$ )、性别无明显差异( $P > 0.05$ ),均为汉族。胃癌的诊断均经内镜检查或/和手术后病理证实,贲门癌、不典型增生、转移癌、粘膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤和平滑肌瘤除外。胃癌的病理分型依据 Lauren<sup>[4]</sup>标准,肠型胃癌:主要为高分化管状腺癌和乳头状腺癌,形态似大肠癌,组织化学染色 AB(A、B antigen)抗原(+);弥漫型胃癌:癌细胞分化较低,不呈腺管或仅有腺样趋势,呈浸润性生长。

### 2 *RUNX3* 基因多态性的检测

**2.1 基因组 DNA 的提取** 取静脉血 1 mL,采用 6 mol/L 的碘化钠(NaI) 200  $\mu$ L,氯仿:异戊醇(400  $\mu$ L)提取 100  $\mu$ L 外周抗凝血白细胞基因组 DNA。胃粘膜 DNA 使用 Trizol(Invitrogen, Lifetech) + 乙醇提取(按产品说明书操作,略有改动, www.lifetech.com)。

**2.2 PCR 扩增** PCR 反应条件为:94  $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,65  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s  $\times$  5 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s  $\times$  30 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s  $\times$  5 个循环,72  $^{\circ}$ C 引伸 7 min。引物序列 P<sub>1</sub>(GenBank 登录号 NM\_004350,位点 288-307)5' - caggtggtggcattggggga - 3', P<sub>2</sub>(位点 464-483)5' - caatgctgaaatggcgaggc - 3', 扩增产物为 196 bp。反应体系 50  $\mu$ L,含 1.5 U Taq 酶(TaKaRa)、10 mmol/L Tris-HCl,50  $\mu$ mol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,200  $\mu$ mol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 以及引物 80 ng。

**2.3 限制性内切酶消化 *RUNX3* 扩增片段** *RUNX3* 364 位点存在 Nsbl(识别序列为 TGC $\nabla$ GCA,位于 362-367 序列)酶切位点,将扩增产物用苯酚、氯仿和异戊醇(25:24:1)纯化,然后在 20  $\mu$ L 反应体系中用 *Nsbl* 30  $^{\circ}$ C 消化 3 h。*RUNX3*T/T 基因型不能被 *Nsbl* 酶切,而 C/C 型能被切为 110 bp 和 86 bp 两片段,C/T 基因型则为 196 bp、110 bp 和 86 bp 3 种产物。

*RUNX3* 基因的酶切产物以 3.0% 琼脂糖凝胶电泳,为 100 V 25 min,然后 0.5 mg/L 溴乙锭染色,在紫外灯下观察结果,如图 1。

### 3 *H. pylori* 抗体测定

使用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 *H. pylori* IgG 抗体<sup>[3]</sup>,所有标本均检测双份,并使用内参照。在 450 nm 的酶标仪上读取吸光度值(absorbency value, A),依据 A 值作出标准曲线,在标准曲线上读取对应的 *H. pylori* IgG 浓度值。*H. pylori* IgG > 20 kU/L 为阳性。检测步骤按 BioChek 公司说明书进行。

### 4 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料的比较和基因型 Hardy-weinberg 平衡采用  $\chi^2$  检验和精确概率法。

各组人群率的标准化依据 2000 年人口普查数据,其中男性为 51.63%;女性为 48.37%<sup>[5]</sup>。均数的比较采用 *t* 检验或 ANOVA。风险因素 OR 值及 95% 的可信区间采用 Logistic 回归分析,数据处理采用 SPSS 10.0 统计软件(SSPS Inc)。

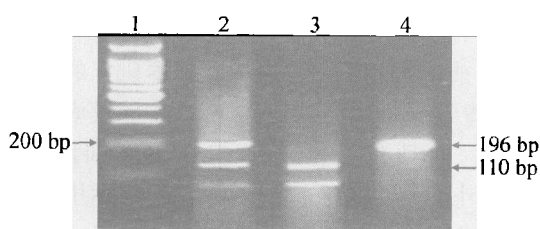


Fig 1 *RUNX3* gene polymorphism. Lane 1: a standard DNA ladder; Lane 2: C/T genotype; Lane 3: C/C genotype; Lane 4: T/T genotype.

图1 *RUNX3* 各基因型的电泳结果

### 结 果

#### 1 胃癌高、低发区胃癌和普通人群 *RUNX3* 各基因型频率分布及比较

在胃癌低发区, *RUNX3* 基因 364 位点 T/T 基因型频率(性别配对)在普通人群和胃癌患者之间无显著差异。同样在胃癌高发区, 普通人群和胃癌患者

的 T/T 基因型频率也是相似的。胃癌高、低发区之间, 普通人群的 T/T 基因型频率也无明显差异(表 1)。

#### 2 不同病理类型与 *RUNX3* 基因 364 位点 C→T 的突变的关系

低发区肠型胃癌占 82.6% (76/92), 高发区肠型胃癌占 70.9% (61/86), 比较无明显差异 ( $\chi^2 = 0.7, P = 0.4$ )。低发区和高发区肠型胃癌患者中, *RUNX3* 基因 T/T 基因型频率与普通人群一致(图 2),  $\chi^2 = 0.94$  和 0.70, 均  $P > 0.05$ 。提示在胃癌高、低发区, 即使按病理分型, *RUNX3* 基因多态性也与胃癌发生无关。

#### 3 *H. pylori* 感染与 *RUNX3* 基因 364 位点 C→T 的突变的关系

在 *H. pylori* 感染者的胃窦和胃体粘膜, 其 *RUNX3* 基因 364 位点 C→T 的突变率(T 等位基因频率)并未明显增加(图 3)。

表 1 *RUNX3* 基因多态性在胃癌高、低发区的普通人群和胃癌患者的分布

Tab 1 Comparison between *RUNX3* genotypic frequencies in controls and gastric cancer cases in low - prevalence region and high - prevalence region

Loci	Genotype	Genotype frequency of controls and patients in two regions			
		L - controls (n = 192)	L - patients (n = 92)	H - controls (n = 169)	H - patients (n = 86)
<i>RUNX3</i>	C/C	184	86	161	82
	C/T	6	4	7	3
	T/T	2(1.0%)	2(2.2%)	1(0.6%)	1(1.2%)
Sex - adjusted	T/T	1.0%	2.4% <sup>#</sup>	0.7% <sup>*</sup>	1.3% <sup>^</sup>

L: lower prevalence region; H: higher prevalence region. <sup>#</sup> L - controls vs L - patients,  $\chi^2 = 0.57, P > 0.05$ ; <sup>\*</sup> H - controls vs H - patients,  $\chi^2 = 0.16, P > 0.05$ ; <sup>^</sup> L - controls vs H - controls,  $\chi^2 = 0.23, P > 0.05$ .

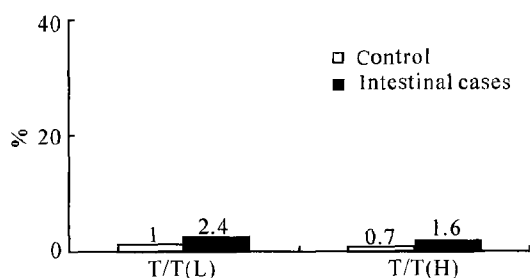


Fig 2 The frequency of *RUNX3* T allele in intestinal gastric cancer and controls in high and low prevalence regions.

图2 肠型胃癌患者 *RUNX3* 基因型 T 等位基因频率分布

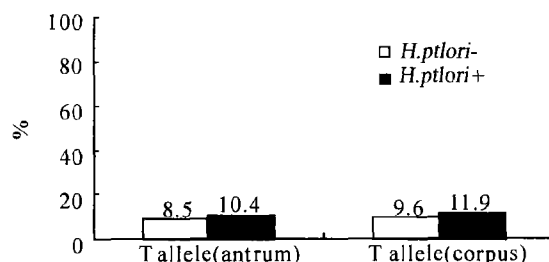


Fig 3 A comparison of *RUNX3* T allele between with *H. pylori* and without *H. pylori* infection in gastric antrum or corpus.

图3 胃窦和胃体粘膜 *RUNX3* 基因 373C→T 的突变率的比较(%)

### 讨 论

多病毒增强结合蛋白 2 (polyomavirus enhancer binding protein 2, PEBP2) 是 TGF -  $\beta$  超家族的重要靶因子, 在哺乳动物的生长发育中具有决定性意义。

PEBP2 含有  $\alpha, \beta$  两个亚单位,  $\alpha$  亚单位与 DNA 结合,  $\beta$  亚单位促进  $\alpha$  亚单位与 DNA 的亲和力。  $\alpha$  亚单位的进化保守区域因与果蝇 *Runt* 基因产物具有同源性, 故 PEBP2 亦称为 *Runt* 区域翻译因子 (runt domain transcription factor)<sup>[3]</sup>。 *RUNX3* 基因是 3 个 *Runt* 相关

基因之一。

Li等最近研究 *RUNX3* 的肿瘤抑制作用发现,肿瘤细胞对裸鼠的致癌作用与 *RUNX3* 的表达呈负相关,进一步研究发现,来源于 *p53*<sup>-/-</sup> 小鼠腺胃的 *RUNX3*<sup>-/-</sup> 正常上皮细胞可在裸鼠体内诱导形成肿瘤,而 *RUNX3*<sup>+/+</sup> 上皮细胞则不能。因此作者认为 *RUNX3* 的功能与人类胃癌的发展存在因果关系<sup>[2]</sup>, Balmain 亦称 *RUNX3* 为新时代的肿瘤抑制基因,可引导未来肿瘤化疗药物(尤其是抑制甲基化的药物)的开发<sup>[6]</sup>。

*RUNX3* 基因进化保守序列 364 位点 C→T 突变会导致翻译的蛋白质 122 位置的精氨酸被半胱氨酸取代(R122C)。在胃癌细胞系 MKN28,表达 *RUNX3* 基因半胱氨酸(R122C)的细胞比其原代细胞增殖迅速,而表达未突变 *RUNX3* 蛋白的细胞则比原代细胞生长缓慢。在胃癌组织标本,也存在极少的 364 位点 C→T 突变,而配对的组织却没有。这些结果提示,*RUNX3* 基因 364 位点的突变可明显影响 *RUNX3* 蛋白的肿瘤抑制作用<sup>[2,6]</sup>。

胃癌发生的病因主要有环境因素和饮食习惯,如吸烟、腌制食物、外源和胃内的化学致癌物、幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染,但遗传因素也占重要位置<sup>[7]</sup>。

然而,本研究发现,*RUNX3* 基因的突变与我国胃癌低、高发区的正常人胃癌发生无关,而且也与胃癌高发区的形成无关,提示 *RUNX3* 基因突变不是我国正常人的遗传易感因素。同时发现,*H. pylori* 感染也不会促进 *RUNX3* 基因的明显突变,提示 *H. pylori* 感

染参与胃癌的发生可能不是通过 *RUNX3* 基因突变的通路,目前国内外尚未见报道。但本研究的研究对象为年青学生,将结论扩展至所有年龄段尚待进一步研究。而且在无 *RUNX3* 表达胃癌细胞系中,*RUNX3* 外显子 1 存在完全的甲基化,提示甲基化可使 *RUNX3* 表达下降<sup>[8]</sup>,因此不排除 *H. pylori* 感染可由非突变通路影响 *RUNX3* 的肿瘤抑制作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] Bae SC, Takahashi E, Zhang YW, et al. Cloning, mapping and expression of PEBP2αC, a third gene encoding the mammalian Runt domain[J]. *Gene*, 1995, 159(2): 245 - 248.
- [2] 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.
- [3] Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, et al. The association of interleukin - 1β gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China[J]. *Gut*, 2003, 52(12): 1684 - 1689.
- [4] Meireles SI, Cristo EB, Carvalho AF, et al. Molecular classifiers for gastric cancer and nonmalignant diseases of the gastric mucosa[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1255 - 1265.
- [5] [www.stats.gov.cn/tjgh/rkpcgh/index.htm](http://www.stats.gov.cn/tjgh/rkpcgh/index.htm)
- [6] Balmain A. Cancer: new - age tumour suppressors[J]. *Nature*, 2002, 417(6886): 235 - 237.
- [7] Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2003, 362(9380): 305 - 315.
- [8] 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.