

文章编号:1000-5404(2012)19-1933-03

论著

## 原发性肝癌 RUNX3 基因启动子区甲基化及其意义

李建国<sup>1</sup>, 江小杰<sup>2</sup> (363000 福建 漳州, 福建医科大学附属漳州市医院肝胆外科<sup>1</sup>; 351100 福建 莆田, 莆田学院附属医院肿瘤外科<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 检测原发性肝癌(hepatocellular carcinomas, HCC)中人 RUNT 相关转录因子3(human runt-related transcription factor 3, RUNX3)基因启动子的甲基化情况,探讨其与患者临床特征的关系。方法 收集95例HCC患者的肿瘤标本及相应的癌旁肝组织、20例正常肝组织,95例HCC患者中合并肝硬化患者57例,按照肝硬化Child-Pugh肝功能分级标准,将57例患者分为A级36例,B级11例,C级10例,运用甲基化特异性PCR检测RUNX3基因启动子CpG岛甲基化状态,分析RUNX3甲基化情况与患者临床特征的关系。结果 95例HCC组织中,45.3%(43/95)存在RUNX3基因CpG岛的异常甲基化,癌旁肝组织中有9.5%(9/95)存在异常甲基化,而正常肝组织中未检测到RUNX3基因CpG岛的异常甲基化;RUNX3基因异常甲基化在HCC组织中的发生率与癌旁组织及正常肝组织比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),RUNX3基因CpG岛甲基化与患者肝硬化、门脉癌栓关系密切( $P < 0.05$ )。肝硬化Child-Pugh肝功能C级组RUNX3启动子甲基化水平明显高于A级组和B级组( $P < 0.05$ )。结论 HCC存在RUNX3基因CpG岛异常甲基化,CpG岛的甲基化可能是导致其基因表达降低的主要原因之一,并与患者肝硬化、门脉癌栓密切相关。

**[关键词]** 原发性;肝细胞癌;人RUNT相关转录因子3;甲基化

**[中图分类号]** R894.3; R730.23; R735.7

**[文献标志码]** A

## Methylation of RUNX3 gene promoter in HCC and its significance

Li Jianguo<sup>1</sup>, Jiang Xiaojie<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Zhangzhou Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou, Fujian Province, 363000; <sup>2</sup>Department of Tumor Surgery, Affiliated Putian Hospital of Putian College, Putian, Fujian Province, 351100, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the relation between methylation of human runt-related transcription factor 3 (RUNX3) gene promoter in hepatocellular carcinoma (HCC) and clinical characteristics of HCC patients. **Methods** Tumor tissue and its adjacent tissue samples were taken from 95 patients of HCC and 20 normal controls, respectively. Of the 95 HCC patients, 57 were complicated with cirrhosis and divided into group A ( $n = 36$ ), group B ( $n = 11$ ) and group C ( $n = 10$ ) according to their liver function Child-Pugh score. Methylation of RUNX3 gene promoter (CpG island) was detected by methylation-specific PCR and its relation with the clinical characteristics of HCC patients was analyzed. **Results** The abnormal methylation of RUNX3 gene promoter (CpG island) was detected in tumor tissue and its adjacent tissue samples from 45.3% (43/95) and 9.5% (9/95) patients, respectively ( $P < 0.01$ ), but not detected in normal liver tissue samples. The methylation of RUNX3 gene promoter (CpG island) was closely correlated with cirrhosis and cancer embolus formation in portal vein ( $P < 0.05$ ). The methylation level of RUNX3 gene promoter (CpG island) was significantly higher in group C than in groups A and B ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** One of the major reasons for the abnormal methylation of RUNX3 gene promoter (CpG island) in HCC patients is the down-regulated expression of CpG island due to its methylation. Abnormal methylation of RUNX3 gene promoter (CpG island) is closely correlated with cirrhosis and cancer embolus formation in portal vein.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; human runt-related transcription factor 3; methylation

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2009J01326). Corresponding author: Li Jianguo, E-mail: jjxln649@163.com

人RUNT相关转录因子3(human runt-related transcription factor 3, RUNX3)作为新发现的抑癌基因,其表达减少在乳腺癌、胃癌、结肠癌等多种恶性肿瘤中被相继报道<sup>[1-2]</sup>,本课题组前期研究也发现RUNX3

mRNA及蛋白在原发性肝癌(hepatocellular carcinomas, HCC)中表达水平明显减少<sup>[3]</sup>。本研究收集手术切除的95例HCC患者的标本及相应的癌旁肝组织,应用甲基化特异性聚合酶链式反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)检测HCC组织中RUNX3基因启动子区甲基化状态,探讨其与患者

**[基金项目]** 福建省自然科学基金(2009J01326)

**[通信作者]** 李建国, E-mail: jjxln649@163.com

肝硬化等临床特征的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取福建医科大学附属漳州市医院2008年1月至2009年6月手术切除的肝癌标本95例,包括男性65例,女性30例,年龄24~73(56.8±4.3)岁,其中合并肝硬化患者有57例,按照肝硬化Child-Pugh肝功能分级标准分为A级36例,B级11例,C级10例;切取的标本均经病理证实为原发性肝细胞膜癌。标本取0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm小块组织后置于液氮,放-80℃冰箱保存。另收集2007年2月至2009年6月入本院因外伤行部分肝切除后的肝组织20例,其中男性14例,女性6例,年龄21~63岁,取0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm标本作为对照组,病理证实均为正常肝组织。对照组与实验组的年龄及性别差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。整个研究过程征求患者及家属同意,签署知情同意书并在医院伦理委员会批准情况下进行。

### 1.2 DNA提取及亚硫酸氢钠修饰

按照基因组DNA抽提试剂盒(上海生工生物技术有限公司)操作方法提取DNA,在紫外分光光度仪上测定 $D(260)/D(280)$ 值,经凝胶电泳鉴定。取500 ng基因组DNA,按照亚硫酸氢钠试剂盒EZ DNA Methylation-Gold™ kit(美国ZYMO research科技开发有限公司)的操作方法进行亚硫酸氢钠的转化。最后通过柱层析完成DNA的纯化和脱硫。

### 1.3 甲基化特异性聚合酶链式反应(MSP)

采用甲基化特异性PCR方法,引物序列(211 bp)参照文献[4]。甲基化引物:上游5'-GAGGGCGGTCGTACGCGG-3',下游5'-AAAACGACCGACGCGAAGCCTCC-3';非甲基化引物:上游5'-GAGGGGTGTTGTATGTGGG-3',下游5'-AAAACAACCAACACAAACACCTCC-3'。MSP反应体系(25 μl体系):DNA 1 μg,上、下游引物(10 μmol/L)各0.5 μl,PCR mix 12.5 μl,去离子水补足至25 μl。PCR仪上反应:4℃ 10 min→40个循环(94℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 30 s)→72℃ 10 min。同时设计空白对照组(用去离子水代替DNA模板),非甲基化对照组(正常人外周血淋巴细胞DNA为模板)及甲基化对照组[用经甲基化酶M.Sss I(New England BioLabs® Inc.)处理的正常人外周血淋巴细胞DNA],20例正常肝组织作为对照组。

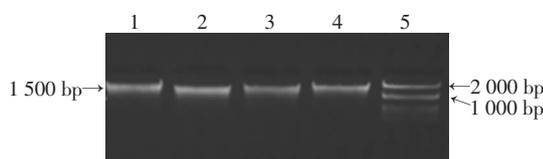
### 1.4 统计学分析

采用SPASS 17.0统计软件进行 $\chi^2$ 分析和Fisher的精确检验。

## 2 结果

### 2.1 提取的DNA质量鉴定

取5 μl DNA提取液,去离子水补足至50 μl,紫外分光光度仪检测其 $D(260)/D(280)$ 值,对部分比值小于1.6的样本进行再纯化、再提取,最终样本DNA比值均大于1.75,表明提取的DNA无RNA或蛋白质污染。取2 μl提取的DNA进行电泳,结果如图1。



1:正常肝组织;2,3:肝癌组织;4:癌旁组织;5:标准

图1 各组组织DNA凝胶电泳鉴定

### 2.2 RUNX3基因启动子区甲基化分析

对照组外周血淋巴细胞DNA只扩增出非甲基化产物,甲基化对照组DNA经M.Sss I处理后只扩增出甲基化产物,空白对照组既无甲基化产物也无非甲基化产物。MSP法检测RUNX3基因启动子区高甲基化,部分甲基化特异性PCR扩增结果如图2所示。95例HCC中43例(45.3%)存在高甲基化,癌旁肝组织9例(9.5%)存在异常甲基化;对照组中未检测到RUNX3基因启动子区的异常甲基化。RUNX3基因异常甲基化在HCC组织中的发生率与癌旁肝组织及正常肝组织相比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。



M1:标准;1:非甲基化对照;2:甲基化对照;3:空白对照;4:对照组;5:癌旁组织;6~11:肝癌组织;U:未甲基化条带;M:甲基化条带

图2 MSP检测各组组织RUNX3基因启动子甲基化

### 2.3 RUNX3启动子区甲基化与临床特征的关系

RUNX3基因启动子甲基化状态与患者年龄、性别、肿瘤直径、血清HbsAg、组织分化水平及临床分期等临床特征均无明显的相关( $P>0.05$ ),但与患者肝硬化及门脉癌栓状态明显相关( $P<0.05$ ,表1)。

表1 肝癌组织RUNX3启动子区甲基化与临床特征的关系

| 临床特征    | n  | 启动子甲基化(例) |    | P值    |
|---------|----|-----------|----|-------|
|         |    | +         | -  |       |
| 性别      |    |           |    | 0.852 |
| 男       | 65 | 29        | 36 |       |
| 女       | 30 | 14        | 16 |       |
| 年龄(岁)   |    |           |    | 0.572 |
| <50     | 39 | 19        | 20 |       |
| ≥50     | 56 | 24        | 32 |       |
| 血清HbsAg |    |           |    | 0.752 |
| +       | 58 | 27        | 31 |       |
| -       | 37 | 16        | 21 |       |
| 肿瘤直径    |    |           |    | 0.824 |
| <5 cm   | 52 | 23        | 29 |       |
| ≥5 cm   | 43 | 20        | 23 |       |
| 临床分期    |    |           |    | 0.069 |
| I~II    | 56 | 21        | 35 |       |
| III~IV  | 39 | 22        | 17 |       |
| 肝硬化     |    |           |    | 0.042 |
| 有       | 57 | 31        | 26 |       |
| 无       | 38 | 12        | 26 |       |
| 门脉癌栓    |    |           |    | 0.047 |
| 有       | 34 | 20        | 14 |       |
| 无       | 61 | 23        | 38 |       |
| 组织分化    |    |           |    | 0.112 |
| 高分化     | 25 | 7         | 18 |       |
| 中分化     | 43 | 21        | 22 |       |
| 低分化     | 27 | 15        | 12 |       |

### 2.4 RUNX3启动子甲基化水平在肝硬化Child-Pugh不同分级的检测

Child-Pugh A级组RUNX3甲基化率为41.7%,Child-Pugh B级组为63.6%,Child-Pugh C级组为90.0%。C级RUNX3启

动子甲基化水平明显高于 A 组和 B 组( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

我国是肝细胞癌高发国家,其死亡率约占全世界肝癌死亡率的一半,其发病机制非常复杂、预后凶险,迫切需要对其确切的分子机制进行探讨。研究认为抑癌基因的异常失活和(或)癌基因的激活是细胞恶变的分子基础<sup>[5-6]</sup>。抑癌基因启动子的甲基化属于表观遗传学的范畴,是目前各种肿瘤研究中的热点问题。研究发现,在肿瘤的发展过程中,普遍存在 DNA 甲基化水平和模式的紊乱,启动子的异常甲基化一方面可激活癌基因,另一方面可使抑癌基因表达失活<sup>[7]</sup>。RUNX3 作为新发现的一个抑癌基因,因其启动子的异常甲基化在人类多种肿瘤中被发现,推测其在肿瘤的发展中起着重要的作用而备受关注<sup>[8]</sup>。李青等<sup>[9]</sup>应用 MSP 技术对 37 例胃癌患者手术切除的肿瘤组织及其癌旁组织 RUNX3 基因启动子区域甲基化进行检测,结果 RUNX3 基因在胃癌及其癌旁组织中甲基化率分别为 40.5% 和 8.1%,提示 RUNX3 基因启动子区甲基化可能是肿瘤特异性的。本组 95 例 HCC 患者中 45.3% 存在高甲基化,癌旁肝组织 9.5% 存在异常甲基化,对照组中未检测到 RUNX3 基因启动子区的异常甲基化。RUNX3 基因异常甲基化在 HCC 组织、癌旁组织及正常组织中的发生率差别有统计学意义,说明 RUNX3 基因的甲基化可能参与了 HCC 的发生、发展,这与李青等的研究基本一致。RUNX3 基因 CpG 岛的异常甲基化可能与 RUNX3 基因的表达降低有关,推测 RUNX3 的表达缺失可能使得 HCC 细胞失去了 RUNX3 对其的正常生长调控而致过度增生,最终导致 HCC 的发生、发展。

HCC 组织中 RUNX3 启动子区甲基化与临床特征的关系如何? 本研究发现,有明显肝硬化的 HCC 患者 RUNX3 的启动子区甲基化显著高于无肝硬化的 HCC 患者,且肝硬化的患者 RUNX3 启动子甲基化水平在肝功能分级中呈现 Child C 级 > Child B 级 > Child A 级,说明肝硬化患者 RUNX3 甲基化水平愈高,肝细胞的损伤程度愈深。肝硬化患者 RUNX3 启动子甲基化水平明显升高可能与乙肝病毒感染并持续存在,导致肝内长时间的炎症反应有关。提示 RUNX3 基因可能是一个重要的抑癌基因,其异常失活可能作为 HCC 发生、发展过程中的早期事件,在肝脏慢性纤维化过程中就已经开始发挥重要作用,RUNX3 基因的失活导致 TGF- $\beta$  信号通路的紊乱,从而丧失对肝细胞分化、恶性转化的有效调控。这与 2005 年 Park 等<sup>[10]</sup>的研究结果不同,该研究表明肝癌 RUNX3 启动子甲基化与患者有无肝硬化无明显关系,导致研究结果不一致的主

要原因:肝癌的主要发病机制不同,在我国肝硬化、肝癌主要与乙肝病毒感染有关,而在国外主要与长期大量饮酒密切相关。本研究不仅发现在我国 RUNX3 基因启动子区异常甲基化与患者肝硬化密切相关,还进一步分析了 RUNX3 启动子区甲基化与肝硬化 Child-Pugh 不同分级中的关系,便于临床通过检测肝组织中 RUNX3 基因的甲基化程度判断肝细胞的损害程度。

细胞的迁移运动能力增强是肿瘤细胞转移的重要特点:Dominguez-Soto 等<sup>[11]</sup>在树突状细胞的研究中发现 RUNX3 可促进成熟的树突状细胞运动穿过血管内皮的迁移能力,Sun 等<sup>[12]</sup>也发现 RUNX 蛋白可以调节细胞的运动能力。本研究发现 HCC 组织中 RUNX3 启动子区甲基化与门脉癌栓的形成密切相关,估计抑癌基因 RUNX3 与肝癌细胞的运动迁移能力有关,需进一步的体内外研究证实。

### 参考文献:

- [1] Ito Y, Chuang L S, Ito T, *et al.* Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(5): 1536 - 1546.
- [2] Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, *et al.* Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2011, 10(2): 134 - 141.
- [3] 江小杰, 李建国. 原发性肝癌中 RUNX3 的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(1): 48 - 52.
- [4] Kim E J, Kim Y J, Jeong P, *et al.* Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor[J]. *J Urol*, 2008, 180(3): 1141 - 1145.
- [5] Taby R, Issa J P. Cancer epigenetics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(6): 376 - 392.
- [6] 方赞熙, 张忠英, 黄如欣, 等. 实时荧光定量 PCR 技术检测 IASPP 基因在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(1): 102 - 103.
- [7] Robertson K D, Jones P A. DNA methylation: past, present and future directions[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 461 - 467.
- [8] 郭元红, 陈伟庆, 房殿亮. Runx3 基因对 HepG2 细胞顺铂耐药性的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(9): 813 - 816.
- [9] 李青, 赵丽珍, 王永福, 等. Runx3 基因启动子区甲基化与胃癌的关系 [J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(2): 152 - 154.
- [10] Park W S, Cho Y G, Kim C J, *et al.* Hypermethylation of the RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(4): 276 - 281.
- [11] Dominguez-Soto A, Relloso M, Vega M A, *et al.* RUNX3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters[J]. *Immunobiology*, 2005, 210(2/4): 133 - 139.
- [12] Sun L, Vitolo M, Passaniti A. Runt-related gene 2 in endothelial cells: inducible expression and specific regulation of cell migration and invasion[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(13): 4994 - 5001.

(收稿:2012-04-04;修回:2012-06-01)

(编辑 龙 亮)