

RUNX3 基因启动子甲基化与早期 非小细胞肺癌的预后

唐艳^{1,2}, 吴芳¹, 胡春宏¹

(1. 中南大学湘雅二医院肿瘤科, 长沙 410011; 2. 长沙市八医院肿瘤科, 长沙 410001)

[摘要] 目的:探讨 *RUNX3* 基因启动子甲基化与非小细胞肺癌(NSCLC)预后的关系。方法:酚/氯仿法提取 80 例术后接受顺铂辅助化疗 NSCLC 患者的肺癌组织标本 DNA, 巢氏甲基化特异性 PCR (nMSP) 检测 *RUNX3* 启动子甲基化状态, 并回顾性分析甲基化状态与临床病理特征、术后无病生存、总生存的关系。结果:80 例 NSCLC 肿瘤样本中 20 例检测到 *RUNX3* 基因启动子甲基化(25.0%)。 *RUNX3* 启动子基因甲基化与病理类型相关($P=0.020$), 且腺癌(36%) 高于鳞癌(11%)。 N 分期(OR:4.898, $P<0.001$)、*RUNX3* 基因启动子甲基化(OR:20.293, $P=0.011$) 是影响术后无病生存的独立危险因素。单因素 K-M 生存分析、Cox 多因素分析表明 *RUNX3* 基因甲基化(RR:2.345, 95% CI:1.130~4.865, $P=0.022$) 是影响总生存的独立危险因素。结论:*RUNX3* 基因甲基化是影响术后 NSCLC 无病生存和总生存的独立影响因素。

[关键词] *RUNX3* 基因; DNA 甲基化; 预后; 非小细胞肺癌; 表观遗传

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2011.07.012

RUNX3 promoter hypermethylation and prognosis of early surgically resected non-small cell lung cancers

TANG Yan^{1,2}, WU Fang¹, HU Chunhong¹

(1. Department of Oncology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011;

2. Department of Oncology, The Eighth Hospital of Changsha, Changsha 410001, China)

Abstract: Objective To determine the relation between the promoter methylation status of *RUNX3* gene and clinicopathological parameters, prognosis of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** We collected 80 formalin-fixed paraffin-embedded lung cancer tissue samples from NSCLC patients who received postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin. Genomic DNA was extracted through phenol/chloroform extraction. The methylation status of *RUNX3* was determined by nested methylation-specific PCR (nMSP). We investigated the pathological and prognostic characteristics of NSCLC stratified by methylation status. **Results** The *RUNX3* promoter methylation was observed in 20 of the 80 NSCLC samples (25.0%). Methylation of *RUNX3* was more frequent in adenocarcinomas (36%) than in squamous cell carcinomas (11%) ($P=0.020$). In multivariate Logistic regression, positive *RUNX3* methylation status ($P=0.011$) was found to be independent disease-free survival factor as was N stage ($P<0.001$). Kaplan-Meier curves showed patients with *RUNX3* methylation had a significantly poorer overall survival than those without methylation ($P=0.003$; log-rank test). In multivariate Cox proportional hazards regression analysis, *RUNX3* methylation (RR:2.345, 95% CI:1.30~4.865, $P=0.022$) was a significant independent prognostic factor for the overall survival. **Conclusion** *RUNX3* methylation is a significant independent prognostic factor for disease-free survival and overall survival.

收稿日期 (Date of reception) 2011-05-02

作者简介 (Biography) 唐艳, 硕士研究生, 医师, 主要从事恶性肿瘤综合治疗研究。吴芳, 博士, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤综合治疗研究。吴芳为本文并列第一作者。

通信作者 (Corresponding author) 胡春宏, E-mail: huchunh5829@yahoo.com.cn

Key words: *RUNX3* gene; DNA methylation; prognosis; non-small cell lung cancer; epigenomics

肺癌的发病率和病死率目前已居恶性肿瘤之首。尽管近年来小分子靶向药物的问世带来了新的希望,但肺癌的生存仍无明显提高。正确评估术后复发转移的危险性,并给予不同的辅助治疗对改善患者预后非常重要。近年来,有关肿瘤基因甲基化的研究^[1-2]表明:某些抑癌基因 CpG 岛甲基化的失活在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,其检测对于肿瘤的早期诊断、治疗疗效及预后预测有重要意义。2007 年在芝加哥召开的美国国家肺癌协会年会提出:DNA 过甲基化可作为肺癌的诊断、预后、预测治疗效果的有用的生物标记^[3]。本研究采用了改进的巢氏甲基化特异性 PCR (nested methylation specific polymerase chain reaction, nMSP) 检测 80 例手术并接受顺铂辅助化疗的非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 患者的肺癌组织 *RUNX3* 基因甲基化状态,旨在探讨 *RUNX3* 甲基化检测在肺癌预后中的临床意义,以指导临床术后辅助治疗。

1 材料与方法

1.1 临床病理资料和标本来源

选取 2004 年 8 月至 2009 年 3 月在中南大学湘雅二医院接受手术联合顺铂辅助化疗的部分 NSCLC 患者的手术病理标本和临床资料,共 80 例。入选标准为:1) 术后标本病理切片明确诊断为 NSCLC; 2) 术前均未进行任何抗肿瘤治疗; 3) 肿瘤均于外科手术完全切除,切缘阴性 (R_0); 4) 术后进行 4~6 个周期顺铂为基础的辅助化疗。

1.2 主要试剂

EZ DNA 甲基化试剂盒 (EZ DNA methylation-gold kitTM) 为美国 Zymo Research 生物科技公司产品; CpG 甲基化酶为美国 NEB 公司产品; 2 × Tag PCR MasterMix 为北京天根生化科技公司产品。

1.3 引物合成

用于 *RUNX3* 基因 nMSP 的 3 对引物由 Invitrogen 公司合成,具体引物序列见表 1。

1.4 实验方法

蛋白酶消化-酚/氯仿法提取 DNA,按照 EZ DNA 甲基化试剂盒说明书进行 DNA 甲基化修饰。由于考虑到甲醛固定石蜡包埋肿瘤组织中 DNA 提取量小,普通 MSP 难以扩增出目的基因条带,故采

用 nMSP。以甲基化转移酶处理后的正常人血基因组 DNA 作阳性对照,未经甲基化转移酶处理的正常人血基因组 DNA 作阴性对照,灭菌双蒸水作空白对照。第 1 轮 PCR 反应体系: 2 × Tag PCR MasterMix 12.5 μL,上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL,修饰后 DNA 2.0 μL,灭菌双蒸水 (ddH₂O) 9.5 μL,总体积 25 μL。第 1 轮 PCR 反应条件为 95 °C 预变性 8 min 后 95 °C 变性 30 s, 46 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 40 次,再 72 °C 总延伸 7 min, 最后 4 °C 下保存; 第 2 轮 PCR 反应体系: 2 × Tag PCR MasterMix 12.5 μL,上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL,第 1 轮产物 2.0 μL,灭菌双蒸水 (ddH₂O) 9.5 μL,总体积 25 μL。第 2 轮 PCR 反应条件为 95 °C 预变性 8 min 后 95 °C 变性 30 s, 56 °C (U) 或 60 °C (M) 退火 30 s, 72 °C 总延伸 30 s, 循环 40 次,再 72 °C 总延伸 7 min, 最后 4 °C 下保存。

表 1 nMSP 引物序列

Tab. 1 Sequence of nMSP primer

引物名称	引物序列	片段大小/bp
外围引物	5'-ATTTTTTAGAATTAAGTGG-3'	233
	5'-AACCCCTAAACTATAACACTAAA-3'	
M 引物	5'-GCGTCGTATAGTTAATCGGC-3'	123
	5'-CTCCTCCGCGAAATAACG-3'	
U 引物	5'-GTGTTGTATAGTTAATTGGT-3'	123
	5'-CTCCTCCACAAAATAACA-3'	

1.5 统计学处理

数据分析均采用 SPSS13.0 统计软件包进行。率的比较采用 χ^2 检验; 无病生存分析采用二分类 Logistic 分析, 总体生存的单因素分析采用 Kaplan-Meier 模型分析 (Log-rank 检验); 多因素总生存分析采用 Cox 分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 nMSP 法检测 *RUNX3* 基因启动子甲基化

应用 nMSP 法检测 80 例 NSCLC 患者的肺癌组织标本, 其中 20 例 (25.0%) 检测到 *RUNX3* 基因启动子区甲基化, 60 例癌组织未检测到异常甲基化。部分样本电泳结果见图 1。

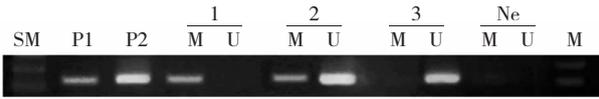


图 1 *RUNX3* 基因 nMSP 产物琼脂糖凝胶电泳图。SM: 50 bp DNA Marker; M: 甲基化条带; U: 未甲基化条带; P1: 甲基化阳性对照; P2: 未甲基化阳性对照; 1: 甲基化肺癌组织标本; 2: 部分甲基化肺癌组织标本; 3: 未甲基化肺癌组织标本; Ne: 空白对照。

Fig. 1 Electrophoregram of nMSP products of *RUNX3* gene. SM: 50 bp DNA marker; M: Methylation bands; U: Non-methylated bands; P1: Methylated positive control; P2: Unmethylated positive control; 1: Methylated lung tissue of NSCLC; 2: Partial methylated lung tissue of NSCLC; 3: Non-methylated lung tissue of NSCLC; Ne: Negative control.

2.2 随访结果

随访至 2011 年 3 月 30 日,死亡 41 例,截尾值 39 例(包括存活 36 例,失访 3 例),随访率 96.25%,失访者按上次随访时间为准。生存期最短 7 月,最长 82 月,3 年生存率 57.5%。在 *RUNX3* 甲基化的 20 例中,死亡 15 例,3 年生存率 35.0%。未甲基化的 60 例中,死亡 27 例,3 年生存率 65.0%。

2.3 *RUNX3* 基因启动子甲基化与肺癌临床病理特征的关系

结果表明:44 例腺癌患者甲基化 16 例,36 例鳞癌患者甲基化 4 例,腺癌组较鳞癌组 *RUNX3* 基因甲基化率高($P=0.020$),差异有统计学意义;*RUNX3* 基因启动子甲基化与 80 例 NSCLC 患者的临床病理特征关系具体见表 2。*RUNX3* 基因启动子甲基化与患者的年龄、性别、T(原发肿瘤)N(淋巴结)M(远处转移)分期、淋巴结转移、吸烟史、病理分化程度、胸膜侵犯无明显相关性,与病理类型相关,腺癌患者的 *RUNX3* 基因甲基化率高于鳞癌。

2.4 *RUNX3* 基因启动子甲基化与 NSCLC 复发转移的多因素分析

因为部分患者术后辅助治疗后未严格遵照医嘱定期复查,复发转移的时间不确切,而应用 Logistic 二分类回归分析方法。选取年龄、性别、病理类型、T 分期、N 分期、病理分化程度、胸膜侵犯、术后放疗、甲基化状态、吸烟史 10 个可能与复发转移有关的因素进入 Logistic 进行无病生存的回归分析,结果显示:年龄、性别、病理类型、T 分期、病理分化程度、胸膜侵犯、术后放疗、吸烟史对术后 NSCLC 的复发转移无明显影响($P>0.05$),N 分期($P<0.001$)、甲基化状态($P=0.011$)分别是术后 NSCLC 预后的独立影响因素。N 分期的优势比(OR)估计值为 4.898;

甲基化状态的 OR 估计值为 20.293。

2.5 *RUNX3* 基因启动子甲基化与 NSCLC 总体生存的单因素分析和多因素分析

2.5.1 单因素 Kaplan-Meier 分析

使用 Log-rank 检验进行 Kaplan-Meier 生存分析,结果如图 2。2 组曲线分离,未甲基化组生存率高于甲基化组,2 组生存率差异有统计学意义($P=0.003$)。*RUNX3* 基因甲基化组生存时间(31.380 ± 5.048)月,95% CI 为 21.485 ~ 41.275,中位生存时间 22 月;*RUNX3* 基因未甲基化组生存时间(55.560 ± 3.945)月,95% CI 为 47.827 ~ 63.292,中位生存时间 79 月。

表 2 *RUNX3* 甲基化与肺癌临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationship between *RUNX3* methylation and clinical pathological characteristics of NSCLC patients

临床特征	<i>n</i>	甲基化例数	甲基化率%	χ^2	<i>P</i>
年龄/岁					
<60	52	11	21		
≥60	28	9	32	1.172	0.279
性别					
女	21	5	24		
男	59	15	25	0.022	0.883
病理学类型					
腺癌	44	16	36		
鳞癌	36	4	11	5.455	0.020
TNM 分期					
I	28	7	25		
II	20	4	20		
III	32	9	28	0.442	0.802
淋巴结转移					
有(N ₁₋₂)	44	11	25		
无(N ₀)	36	9	25	0.000	1.000
吸烟史					
有	58	15	26		
无	22	5	23	0.084	0.772
病理分化					
高中分化	49	15	31		
低分化	31	5	16	2.124	0.145
胸膜侵犯					
+	32	10	31		
-	48	10	21	1.111	0.292

2.5.2 NSCLC 患者 Cox 多因素生存分析

选取年龄、性别、病理类型、T 分期、N 分期、病理分化程度、胸膜侵犯、术后放疗、甲基化状态、吸烟史 10 个与生存可能相关的因素进入 Cox 风险回归模型进行总生存分析,结果显示:N 分期($P < 0.001$)、甲基化状态($P = 0.022$)分别是术后 NSCLC 预后的独立影响因素。N 分期的相对危险度(RR) 2.393, 95% CI 为 1.518 ~ 3.771; 甲基化状态的 RR 为 2.345, 95% CI 为 1.130 ~ 4.865。

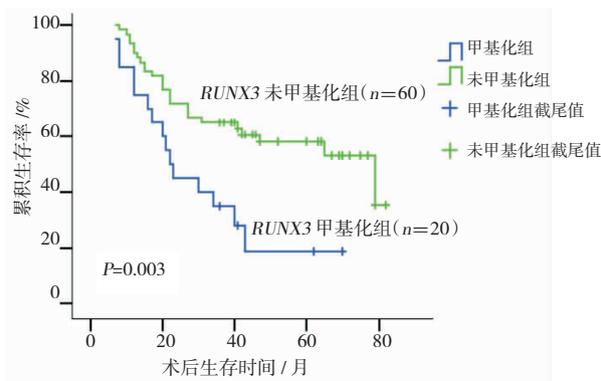


图2 *RUNX3* 基因甲基化组与非甲基化组总体生存时间比较 K-M 曲线。

Fig. 2 Correlation between the methylation status of *RUNX3* and overall survival of 80 NSCLC patients using the Kaplan-Meier method. The survival curves show the patients with all stages of disease.

3 讨论

RUNX3 基因是新近发现的一种肿瘤抑制基因,其能调控细胞的生长发育和凋亡,对细胞的信号转导和其他生物学效应有着重要而复杂的转录调控作用。目前 *RUNX3* 基因的抑瘤机制尚不完全清楚。其可能机制是:TGF- β 是许多细胞生长的有效抑制因子,TGF- β 信号通路的紊乱可导致多种肿瘤的发生^[4],*RUNX3* 蛋白是 TGF- β 信号通路中非常重要的调节因子,*RUNX3* 表达缺失将直接影响 TGF- β 信号通路的生物活性,导致肿瘤的发生发展。

大量的研究^[5-7]发现:CpG 岛高甲基化所致的 *RUNX3* 表达下降和缺失广泛存在于肺癌、乳腺癌、胰腺癌、膀胱癌等中。本研究结果显示 80 例 NSCLC 患者肺癌组织中检测到 *RUNX3* 启动子甲基化 20 例(25.0%),与文献^[8]报道相似,表明 *RUNX3* 启动子甲基化也普遍存在于 NSCLC 中。还有研究^[9]报道 *RUNX3* 基因在 20% ~ 24% NSCLC 组织及 19% 肺癌

细胞系中有 P2 启动子区 CpG 岛的甲基化,而在非肿瘤肺组织中甲基化率仅为 0 ~ 3%,提示 *RUNX3* 基因甲基化是肿瘤特异的,*RUNX3* 基因高甲基化所致的表达缺失与肺癌的发生发展密切相关。

Sato 等^[10]和 Yanagawa 等^[11-12]的研究均指出 *RUNX3* 甲基化与吸烟相关,且发生率腺癌高于鳞癌。Yanagawa 等^[8]的研究发现 NSCLC I 期甲基化率高于 II/III 期,认为 *RUNX3* 甲基化影响了早期 NSCLC 的疾病进展和远处转移。本研究结果显示:腺癌的甲基化率明显高于鳞癌,与目前的研究一致,表明不同病理学类型的 NSCLC *RUNX3* 甲基化存在明显差异。烟草是诱发肺癌的主要危险因素,烟草中的致癌物是否直接导致基因发生甲基化,目前尚无定论。本研究结果得出 *RUNX3* 甲基化与吸烟无明显相关性,III 期患者的甲基化率略高于 I/II 期,但无统计学意义,这可能与样本量不足有关,可加大样本量进一步研究,探讨两者之间的关系。未发现胸膜侵犯与 *RUNX3* 甲基化存在相关性,推测 *RUNX3* 甲基化可能通过影响胸膜侵犯之外的其他因素影响预后。

目前研究表明 *RUNX3* 甲基化与预后存在相关性。Yanagawa 等^[8]研究了 10 种肿瘤抑制基因(*DAPK*, *FHIT*, H-cadherin, *MGMT*, *p14*, *p16*, *RAR-beta*, *RASSF1A*, *RUNX3*, *TIMP-3*)的甲基化状态与 NSCLC 患者临床病理特征、生存期的关系,*RUNX3* 甲基化状态与 TNM 分期、胸膜侵犯都是预后的独立影响因素,特别是 *RUNX3* 基因甲基化可用于腺癌预后的预测。Araki 等^[13]报道了 *RUNX3* 高水平表达的患者 5 年生存期明显高于 *RUNX3* 低水平表达的患者,*RUNX3* 表达的下降是肺腺癌预后不良的标志,肺腺癌中的 *RUNX3* 蛋白表达可能对肿瘤进展和患者的生存期起重要作用。本研究结果表明 *RUNX3* 甲基化组总生存时间明显较未甲基化组短,TNM 分期中的 N 分期、*RUNX3* 甲基化状态是术后无病生存以及总生存的独立危险因素,与目前的研究报道一致,推测由于 *RUNX3* 甲基化患者容易出现术后的复发转移,从而导致预后不良。目前 *RUNX3* 基因对肿瘤生物学行为影响的作用机制仍不清楚。

本研究未得出胸膜侵犯是术后 NSCLC 预后的独立影响因素,但是大量研究^[8,14]报道胸膜侵犯与 NSCLC 预后相关。Jones 等^[15]在单因素分析中指出脏层胸膜侵犯是影响预后的因素,多因素分析中则未得出脏层胸膜侵犯是影响预后的独立因素。结论尚不一致,需要进一步的研究。

综上所述,*RUNX3* 甲基化在 NSCLC 发生、发展、术后复发转移中有重要的作用,预示了术后 NSCLC

的复发转移、预后不良。*RUNX3* 甲基化有望作为预测术后 NSCLC 预后的生物指标。由于甲基化这种表观遗传改变具有可逆性,故可以通过去甲基化状态^[16-17]进行临床治疗延缓复发转移、改善预后,目前比较明确的去甲基化药物是 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂胞苷和 5-杂氮-2'-脱氧胞苷,但在实体瘤尚未显现出明显疗效^[18],因此需要进一步大量的研究,这将给 NSCLC 的基因靶向治疗带来新的希望。

参考文献:

- [1] Anglim P P, Alonzo T A, Laird-Offringa I A, et al. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update[J]. *Mol Cancer*, 2008, 7:81.
- [2] Khandige S, Shanbhogue V V, Chakrabarty S, et al. Methylation markers: a potential force driving cancer diagnostics forward [J]. *Oncol Res*, 2011, 19(3/4):105-110.
- [3] Vidaver R M, Schachter B S. 2007 Annual Meeting of the National Lung Cancer Partnership: a summary of meeting highlights [J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(2): 190-193.
- [4] Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in p rogression of tumors [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94 (3):230-234.
- [5] Jiang Y, Tong D, Lou G, et al. Expression of *RUNX3* gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines [J]. *Pathobiology*, 2008, 75 (4):244-251.
- [6] Kim E J, Kim Y J, Jeong P, et al. Methylation of the *RUNX3* promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor [J]. *Urol*, 2008, 180(3): 1141-1145.
- [7] Nomoto S, Kinoshita T, Mori T, et al. Adverse prognosis of epigenetic inactivation in *RUNX3* gene at 1p36 in human pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(10):1690-1695.
- [8] Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, et al. Promoter hypermethylation of *RASSF1A* and *RUNX3* genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers [J]. *Lung Cancer*, 2007, 58(1): 131-138.
- [9] Li QL, Kim H R, Kim W J, et al. Transcriptional silencing of the *RUNX3* gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314 (1):223-228.
- [10] Sato K, Tomizawa Y, Iijima H, et al. Epigenetic inactivation of the *RUNX3* gene in lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2006, 15 (1):129-135.
- [11] Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, et al. Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(7): 589-592.
- [12] Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, et al. Inverse correlation between EGFR mutation and FHIT, RASSF1A and *RUNX3* methylation in lung adenocarcinoma: Relation with smoking status [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(4):1211-1214.
- [13] Araki K, Osaki M, Nagahama Y, et al. Expression of *RUNX3* protein in human lung adenocarcinoma: implications for tumor progression and prognosis [J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(4):227-231.
- [14] Inoue M, Minami M, Shiono H, et al. Clinicopathologic study of resected, peripheral, small-sized, non-small cell lung cancer tumors of 2 cm or less in diameter: pleural invasion and increase of serum carcinoembryonic antigen level as predictors of nodal involvement [J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, 131 (5): 988-993.
- [15] Jones D R, Daniel T M, Denlinger C E, et al. Stage IB non-small cell lung cancers: are they all the same [J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 81(6):1958-1962.
- [16] Herranz M, Esteller M. DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 361: 25-62.
- [17] Fojtova M, Piskala A, Votruba I, et al. Efficacy of DNA hypomethylating capacities of 5-aza-2'-deoxycytidine and its alpha anomer [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 55(1): 16-22.
- [18] Mack G S. Epigenetic cancer therapy makes headway [J]. *Natl Cancer Inst*, 2006, 98(20):1443-1444.

(本文编辑 郭征)