

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.03.012

抑癌基因 runx3 与原发性肝癌关系的 Meta 分析

张雪妍¹, 郭文杰², 周永康³

Meta-analysis on Relationship between runx3 Gene and Hepatocellular Carcinoma

Zhang Xueyan¹, Guo Wenjie², Zhou Yongkang³

1. Department of Pathology, Medical and Nursing School, Chengdu University, Chengdu 610106, China, 2. Department of Anatomy; 3. Department of Pediatrics, The Fifth People's Hospital of Chengdu

Abstract: Objective To study the relationship between aberrant methylation and expression of runx3 gene and susceptibility of primary hepatocellular carcinoma. **Methods** Research literature of cancer suppressor gene runx3 and primary hepatocellular carcinoma susceptibility home and abroad. **Results** A total of 841 cases and 800 controls from 14 studies were included. Expression of runx3 gene was different in hepatocellular carcinoma and its para cancer tissue, $OR = 0.10 (95\% CI: 0.04 - 0.23)$, so was methylation of runx3 $OR = 21.62 (95\% CI: 8.06 - 57.98)$. **Conclusion** The positive expression ratio of runx3 gene in the HCC tissue was significantly lower than those in para-cancer tissue. And methylation of runx3 gene was significantly higher than those in para-cancer tissue. Methylation of cancer suppressor gene runx3 will lead to abnormal expression of hepatoma carcinoma cells. Occurrence and development of hepatoma carcinoma has correlation to abnormal expression and methylation of runx3. Detection of expression missing and abnormal methylation of runx3 could be the early auxiliary diagnosis means for hepatoma carcinoma patients, which could also become the molecular therapy target.

Key words: runx3 gene; DNA methylation; Primary hepatocellular carcinoma; Meta-analysis

摘要:目的 探索抑癌基因 runx3 异常甲基化及表达与原发性肝癌易感性的关系。**方法** 采用 Meta 分析对国内外 2004—2011 年关于抑癌基因 runx3 与原发性肝癌易感性的研究文献进行综合计数分析。**结果** 共收集相关文献 14 篇, 累计原发性肝癌病例 841 例, 对照病例 800 例。runx3 基因在肝癌患者癌组织与癌旁组织中的表达有差异, OR 值为 0.10 ($95\% CI: 0.04 \sim 0.23$), 癌组织中 runx3 基因甲基化程度与癌旁组织有差异, OR 值为 21.62 ($95\% CI: 8.06 \sim 57.98$)。**结论** runx3 基因在肝癌组织表达阳性率明显低于癌旁组织, 而 runx3 基因甲基化明显高于癌旁组织, 抑癌基因 runx3 甲基化可导致肝癌细胞表达异常, 肝癌的发生发展与 runx3 基因表达异常及甲基化相关。runx3 表达缺失及异常甲基化检测可作为肝癌患者的一种早期辅助诊断指标, 而且可能成为分子治疗的靶点。

关键词: runx3 基因; DNA 甲基化; 原发性肝癌; Meta 分析

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

0 引言

原发性肝癌的发生和发展涉及到多种基因的正常改变, CpG 岛胞嘧啶及启动子高甲基化可以导致抑癌基因转录抑制, 从而致表达失活。基因甲基化状态(表基因)异常与基因突变、缺失等一级结构的变异是恶性肿瘤发生的重要原因。runx3 (PEBP2aC/CBFA3/AML2)是近年新发现的一种

抑癌基因。研究表明, 该基因在人类多种肿瘤中存在甲基化异常^[1-3]或表达缺失。本文收集了国内外 8 年来有关 runx3 基因与原发性肝癌关系的 14 个病例对照研究, 对其结果进行了 Meta 分析, 综合评价 runx3 基因甲基化及表达与肝癌的关系。

1 资料与方法

1.1 文献检索策略

中文以 runx3 基因、肝细胞癌、甲基化、基因表达, 英文以“runx3 gene”、“Hypermethylation”、“Hepatocellular Carcinoma”、“runx3 expression”等为主题词、关键词, 通过 CBM、CNKI、VIP 和 PubMed、Medline、Ovid 等数据库进行检索, 收集

收稿日期: 2012-06-18; 修回日期: 2012-10-16

基金项目: 成都大学校级自然科学基金资助项目(2010 XJZ33)

作者单位: 1. 610106 成都, 成都大学医学院病理教研室, 2. 解剖教研室; 3. 成都市第五人民医院儿科

作者简介: 张雪妍(1975-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤治疗基础和临床研究

2004—2011 年间国内外公开发表的关于 runx3 基因甲基化及表达与肝癌易感性的病例对照研究资料。

1.2 文献纳入标准

(1)国内外公开发表的关于 runx3 基因在患者肝癌细胞中的表达及甲基化情况分析性研究的一次文献;(2)符合国内外普遍认可的研究方法:即采用 DNA 甲基化特异性 PCR (MSP) 技术检测启动子甲基化、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测基因表达,数据为计数资料;(3)各文献直接提供病例组和对照组的详细数据,分析资料完整;(4)肝癌病例组诊断明确:病理学诊断阳性、 α -胎蛋白 ≥ 400 ng/ml 和 CT 诊断阳性;(5)样本人群相同而文献多于 1 篇者,则选择其中 1 篇,以避免 Meta 分析存在抽样偏倚,即同一样本人群观察结果被作者分为 2 篇或多篇论文发表可使 Meta 分析产生研究对象重复使用偏倚。

1.3 文献排除标准

根据每篇文献的质量评价,对以下文献进行剔除:(1)动物实验;(2)综述文献、无对照组文献、病例报告、会议类文章;(3)相同作者相似内容的重复报告、报告信息太少、质量差以及数据描述不详的文献;(4)样本例数小于 10 例的文献。

1.4 文献质量评价

每篇 RCT 质量的评价由两位评价员参照英国牛津循证医学中心文献严格评价项目(Oxford crit-

ical appraisal skillprogram, Oxford CASP, 2004) 来评价纳入病例对照研究的质量,对各独立研究进行方法学质量评估,主要从样本量、原发性肝癌诊断标准、分组匹配、组间可比性、基因检测方法 & 数据完整性等六个方面进行评价,以上 6 项,每满足一项计为 1 分,总分 ≥ 3 分者,质量可靠。由两名评价员独立地进行质量评分和资料提取,而后交叉核对,如遇分歧,通过讨论或提交第三位研究者协助解决。

1.5 统计学方法

采用 RevMan 5.1 软件进行 Meta 分析。如果各个文献的研究结果之间差异无统计学意义则用固定效应模型,计算合并效应指标值及 95%CI。若存在异质性则尝试分析找出异质性来源,采用随机效应模型计算或分亚组分析。研究间的异质性采用 χ^2 评价,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 文献检索结果

初检出相关文献 41 篇,通过阅读文题与摘要排除 11 篇文献,初步纳入文献 30 篇;剔除重复数据、未能获取数据和不符合纳入标准的研究 16 篇,最终纳入 14 篇,其中中文文献 6 篇,英文文献 8 篇,共累积肝癌病例 841 例,对照病例 800 例。纳入文献的基本情况见表 1。

表 1 runx3 基因与原发肝癌相关性研究纳入 Meta 分析及质量评分

Table 1 Studies about the relationship between runx3 and hepatocellular carcinoma into Meta-analysis and quality score

Included in the study	Study sites	Gene	Sample number	Case group	Control group	Quality score(points)
Mori T 2005 ^[4]	Japan	runx3	82	41	41	5
Li XH 2008 ^[5]	China	runx3	146	73	73	5
Liu R 2009 ^[6]	China	runx3	100	50	50	5
Gao FL 2010 ^[7]	China	runx3	86	43	43	4
Zhang HY 2010 ^[8]	China	runx3	104	52	52	3
Nakanishi Y 2011 ^[9]	Japan	runx3	102	51	51	5
Jiang XJ 2011 ^[10]	China	runx3	130	65	65	4
Lu YH 2011 ^[11]	China	runx3	102	51	51	4
Kim TY 2004 ^[12]	Korea	runx3	88	48	40	5
Xiao WH 2004 ^[13]	China	runx3	124	62	62	5
Park WS 2005 ^[14]	Korea	runx3	146	73	73	5
Nomoto S 2007 ^[15]	Japan	runx3	91	62	29	4
Nishida N 2008 ^[16]	Japan	runx3	154	77	77	5
Zhang HY 2009 ^[17]	China	runx3	104	52	52	4

2.2 统计分析结果

2.2.1 HCC 患者肝癌组织与癌旁组织 runx3 基因表达情况的对照 runx3 基因表达与肝癌的关系共纳入 8 篇文献^[4-11], 讨论了 runx3 基因表达与肝癌易感性的关系, 各研究间差异存在统计学意义 ($P < 0.0001$, $I^2 = 79.8\%$), 故采用随机效应模型进行 Meta 分析。结果显示, runx3 mRNA 在肝癌患者癌组织与癌旁组织中的表达差异有统计学意义 [$OR = 0.10, 95\%CI(0.04 \sim 0.23), P < 0.00001$], 见图 1。在肝癌患者中, 癌组织 runx3 mRNA 表达阳性率明显低于癌旁组织。

2.2.2 HCC 患者肝癌组织与癌旁组织 runx3 基因甲基化情况的对照 runx3 基因甲基化与肝癌的关系共纳入 7 篇文献^[4,12-17], 讨论了 runx3 基因甲基化与肝癌易感性的关系。各研究间差异存在统计学

意义 ($P = 0.04, I^2 = 54.5\%$), 故采用随机效应模型进行 Meta 分析。结果显示, runx3 基因甲基化在肝癌患者癌组织与癌旁组织中的差异有统计学意义 [$OR = 21.62, 95\%CI(8.06 \sim 57.98), P < 0.00001$], 见图 2, 肝癌患者癌组织 runx3 基因的甲基化明显高于癌旁组织。

2.2.3 敏感度分析 应用随机效应模型和固定效应模型分别计算, 并比较其结果。根据 runx3 基因表达与肝癌易感性的关系固定效应模型估计出合并的 $OR = 0.12, 95\%CI(0.08 \sim 0.16)$; 根据 runx3 基因甲基化与肝癌易感性的关系固定效应模型估计出合并的 $OR = 20.60, 95\%CI(11.84 \sim 35.84)$ 。两项统计采用的固定效应模型分析结果均与随机效应模型分析结果非常接近。

Review: Meta-analysis on the expression of runx3 gene in hepatocellular carcinoma
 Comparison: 01 hepatocellular carcinoma versus para-cancer tissue
 Outcome: 01 runx3 gene expression in hepatocellular carcinoma and its para-cancer tissue

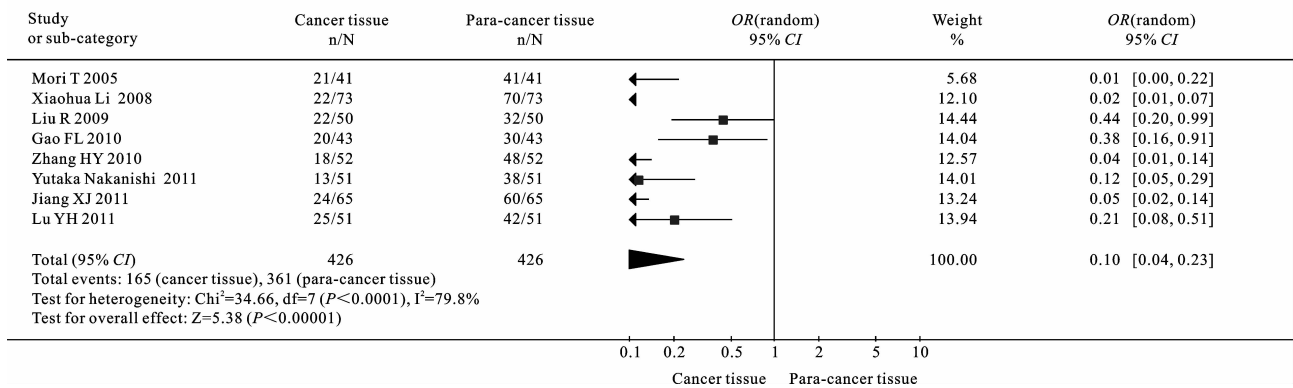


图 1 runx3 基因表达与原发性肝癌关系的 Meta 分析

Figure 1 Meta-analysis on relationship of expression of runx3 gene and primary hepatocellular carcinoma

Review: Meta-analysis on the expression of runx3 gene in hepatocellular carcinoma
 Comparison: 01 hepatocellular carcinoma versus para-cancer tissue
 Outcome: 01 runx3 gene expression in hepatocellular carcinoma and its para-cancer tissue

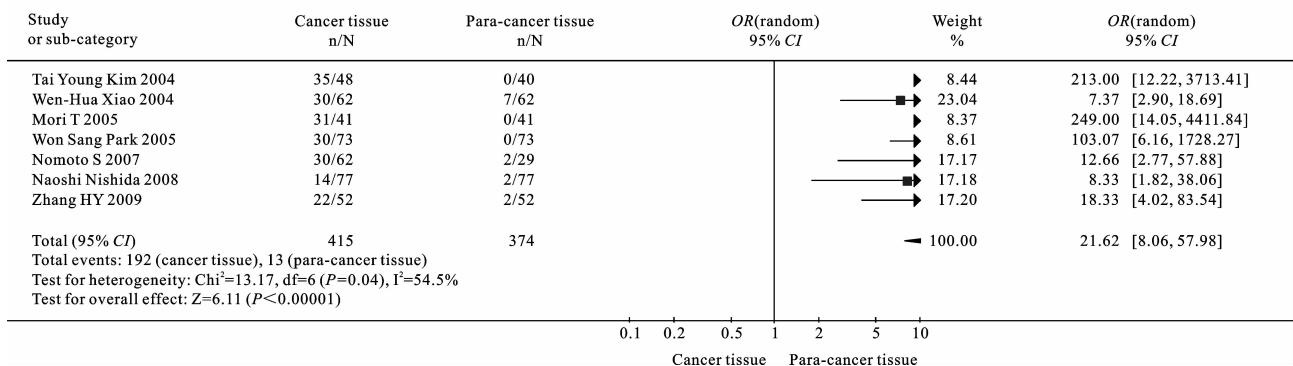


图 2 runx3 基因甲基化与原发性肝癌关系的 Meta 分析

Figure 2 Meta-analysis on the relationship of methylation of runx3 gene and primary hepatocellular carcinoma

3 讨论

runx3 是最近新发现的一个肿瘤抑制基因,其在小鼠胚胎发育过程及人类多种恶性肿瘤的发生过程中扮演重要角色。RUNX3 蛋白是 TGF- β 信号通路下游的一个转录因子,RUNX 蛋白负责结合 DNA,在 TGF- β /BMP 信号转导中起重要作用。在 RUNX 蛋白(包括 RUNX3 蛋白)的指导下,Smad 复合物才能从细胞质内转入特定的靶位点,当 runx 基因表达受抑制时,影响 TGF- β 信号通路的转导,从而诱导肿瘤的发生。同时 runx3 调控 p21 基因的下游,当 runx 结合域突变时,p21 启动子的活性明显降低,而 runx3 和 SMAD3 协同表达时 p21 启动子被激活,从而使细胞对 TGF- β 1 反应增强,runx3 的抑癌活性与其诱导 p21 表达的能力相关,此外有研究显示恢复 runx3 表达可导致 cyclin D 表达下调,而上调 p27 和 caspase 3、7 和 8 的表达。cyclin D 可促进细胞增殖,而 p27 是重要的细胞生长周期抑制因子,caspase 3、7、和 8 直接参与凋亡的起始与执行^[1]。

许多研究表明,runx3 基因在胃癌、肝癌、结肠癌、肺癌、婴儿睾丸内胚窦瘤等人类多种肿瘤中存在启动子区域甲基化异常,这是抑癌基因 runx3 失活的主要机制。DNA 甲基化是表观遗传修饰的一个重要方式,肿瘤抑制基因的异常甲基化能促进肿瘤的发生,导致恶性表型。除 runx3 基因甲基化外,Xiao 等^[13]研究发现该基因等位缺失与甲基化共同促进了肝细胞癌 runx3 基因的失活,致表达下调,这可能在肝癌的发生中扮演重要角色。

本研究通过搜索国内外所有公开发表杂志,研究在肝癌患者中 runx3 基因甲基化状态分析与 runx3 表达情况,采用 Meta 分析证实,runx3 基因在肝癌组织表达阳性率明显低于癌旁组织,其差异有统计学意义 $[OR = 0.10, 95\%CI(0.04 \sim 0.23), P < 0.00001]$,肝癌患者癌组织 runx3 基因甲基化明显高于癌旁组织,其差异有统计学意义 $[OR = 21.62, 95\%CI(8.06 \sim 57.98), P < 0.00001]$ 。许多医学研究因其研究结果可能有偶然性,且单个研究中样本量局限,因此每个研究结果都可能不一致或者相反,从单个研究结果来看,很难对研究结果下准确的结论。本实验通过 Meta 分析,表明肝癌的发生发展与 runx3 基因甲基化及表达异常相关。而且据此推断 runx3 基因启动子区域的异常甲基化可能

是导致该基因转录失活及其表达下调的主要原因,从而与肝细胞癌的发生早期密切相关。runx3 异常甲基化检测可作为肝癌患者的一项早期辅助诊断指标。

DNA 甲基化转移酶(DNMT)是目前 DNA 去甲基化恢复抑癌基因功能的热点靶分子,通过 DNMT 抑制剂,可重新激活肿瘤中许多过甲基化的基因。在我们以前的研究中发现^[18],通过 DNMT 抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷可以诱发因高甲基化封闭的 runx3 基因重获表达,该药物可能逆转具有生长调控作用的 runx3 基因再次表达,从而促使 RUNX3 蛋白结合 DNA,在 RUNX3 蛋白的指导下,Smad 复合物从细胞质内转入特定的靶位点,通过 TGF- β /BMP 信号转导途径引发周期阻滞,从而抑制肝癌细胞生长,同时还可增强肝癌细胞对化疗药物的敏感度^[19]。如上所述,可以考虑使用 DNMT 抑制剂去甲基化,从而恢复 runx3 基因的表达,抑制肝癌细胞的生长,这提示可能为原发性肝癌患者的治疗提供一种全新的用药方案。

导致肝癌 runx3 基因失表达的原因尚在研究中,目前主要的观点倾向于甲基化及等位缺失导致其失活,因此 runx3 基因作为早期辅助检测及治疗的靶基因给我们提供了一个全新的探索道路。由于各种偏倚的存在,且分析中还有各种混杂因素的存在,因此对于 runx3 基因在原发性肝癌易患性中的作用,还需要更多的资料、更详实的数据来研究和证实。

参考文献:

- [1] 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): 4809-16.
- [2] Guo C, Ding J, Yao L, et al. Tumor suppressor gene Runx3 sensitizes gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs by downregulating Bcl-2, MDR-1 and MRP-1[J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(1): 155-60.
- [3] Sato k, Tomaizawa Y, Iijima H, et al. Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer[J]. *Oncol Rep*, 2006, 15(1): 129-35.
- [4] Mori T, Nomoto S, Koshikawa K, et al. Decreased expression and frequent allelic inactivation of the RUNX3 gene at 1p36 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2005, 25(2): 380-8.

- [5] Li X, Zhang Y, Zhang Y, et al. RUNX3 inhibits growth of HCC cells and HCC xenografts in mice in combination with adriamycin[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(5): 669-76.
- [6] Liu R, Liu Q, Li ZY, et al. Expression and clinical significance of RUNX3 in primary hepatocellular carcinoma[J]. *Ningxia Yi Xue Za Zhi*, 2009, 31(4): 305-6. [刘瑞, 刘清, 李昭宇, 等. RUNX3 蛋白在原发性肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. *宁夏医学杂志*, 2009, 31(4): 305-6.]
- [7] Gao FL, Wang HQ, Liu R, et al. Expression and clinical significance of Runt-related transcription factor 3 genes in primary hepatocellular carcinoma[J]. *Ningxia Yi Xue Za Zhi*, 2010, 32(6): 488-91. [高锋利, 王海泉, 刘瑞, 等. RUNX3 在人类原发性肝细胞癌中的表达[J]. *宁夏医学杂志*, 2010, 32(6): 488-91.]
- [8] Zhang HY, Xiong W, Ren SS. Analysis and prognostic significance of expression status of the Runx3 gene in hepatocellular carcinoma [J]. *Changjiang Da Xue Xue Bao(Zi Ke Ban) Yi Xue Juan*, 2010, 7(3): 15-7. [张海元, 熊维, 任松森. 肝细胞癌中 Runx3 基因表达状态分析及预后评估价值的研究[J]. *长江大学学报(自科版)医学卷*, 2010, 7(3): 15-7.]
- [9] Nakanishi Y, Shiraha H, Nishina S, et al. Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11:3.
- [10] Jiang XJ, Li JG. The expression of RUNX3 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance[J]. *Zhongguo Pu Tong Wai Ke Za Zhi*, 2011, 20(1): 48-52. [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.]
- [11] Lu YH, Zheng RD, Chen J, et al. The expression of RUNX3 in hepatic cell carcinoma and its relationship with clinical pathological parameters[J]. *Gan Zang*, 2011, 16(1): 27-30. [卢燕辉, 郑瑞丹, 陈洁, 等. 肝癌组织中 RUNX3 表达及其与临床病理因素的相关性[J]. *肝脏*, 2011, 16(1): 27-30.]
- [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): 479-84.
- [13] Xiao WH, Liu WW. Hemizygous deletion and hypermethylation of RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(3): 376-80.
- [14] Park WS, Cho YG, Kim CJ, et al. Hypermethylation of the RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Mol Med*, 2005, 37(4): 276-81.
- [15] Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, et al. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2007, 97(9): 1260-5.
- [16] Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 908-18.
- [17] Zhang HY, Liu J, Xie TB. Promoter hypermethylation of the Runx3 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao(Yi Xue Ban)*, 2009, 38(1): 23-6. [张海元, 刘娟, 解庭波. 肝细胞癌中 Runx3 基因启动子区甲基化研究[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2009, 38(1): 23-6.]
- [18] Zhang XY, Zhang X. Effect of 5-Aza-CdR on RUNX3 Expression and the proliferation of Human hepatocarcinoma Cell Line HepG2[J]. *Ji Chu Yi Xue Yu Lin Chuang Za Zhi*, 2007, 27(3): 314-8. [张雪妍, 张煦. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对 HepG2 细胞 RUNX3 基因表达及细胞增殖的影响[J]. *基础医学与临床杂志*, 2007, 27(3): 314-8.]
- [19] Zhang XY, Pu CX, Zhang X. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces RUNX3 expression of HepG2 and increase the sensitivity to chemotherapeutic drugs[J]. *Ji Chu Yi Xue Yu Lin Chuang Za Zhi*, 2010, 30(4): 421-3. [张雪妍, 蒲春霞, 张煦. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷诱导肝癌细胞 HepG2 RUNX3 基因表达及增强药物敏感性[J]. *基础医学与临床杂志*, 2010, 30(4): 421-3.]

[编辑: 黄园玲; 校对: 刘红武]