

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.014

原发灶 Runx3 基因表达对胃癌患者生存的影响

许洪卫¹,任峰¹,余燕民²,蔡诚忠³

Influence of Runx3 Gene Expression in Primary Tumor on Survival of Patients with Stomach Carcinoma

XU Hong-wei¹,REN Feng¹,YU Yan-min²,CAI Cheng-zhong³

1. Department of General Surgery, The Fourth Affiliated Hospital of Soochow University, Wuxi 214062, China; 2. Department of General Surgery, Huangpu Central Hospital of Shanghai; 3. Department of General Surgery, The Tenth People's Hospital of Shanghai Tongji University

Abstract: Objective To investigate the influence of Runx3 gene expression in the primary tumor on survival of patients with stomach carcinoma. **Methods** Semiquantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to measure the expression level of Runx3 mRNA in paired samples of primary gastric cancer and corresponding non-tumorous gastric mucosa, from 108 gastric cancer patients. Patients were following up more than five years after radical gastrectomy. **Results** The Runx3 mRNA was lower in the primary tumor than that in non-tumorous gastric mucosa (0.33 ± 0.12 vs. 0.65 ± 0.21 , $P < 0.01$). Runx3 mRNA levels (0.403) in primary tumors as a baseline 108 cases were separated into the low-expressing group (≤ 0.403) and high-expressing group (> 0.403). Comparing analysis found that the low-expression of Runx3 mRNA in the primary tumor was not only associated with the poor clinicopathological factors such as deep infiltration, distant organ metastasis, poorly differentiation, lymph metastasis and later clinicopathological stages, but also with the shorter median survival time ($P < 0.05 \sim 0.001$). **Conclusion** There was a significant correlation between low-expression of Runx3 gene in the primary tumor and invasion and poor prognosis of stomach carcinoma.

Key words: Stomach neoplasms; Runx3; Prognosis

摘要:目的 探讨 Runx3 表达对胃癌患者生存分析的影响。**方法** 应用半定量反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 108 例胃癌根治术患者原发灶及其非肿瘤组织的 Runx3 mRNA 表达水平,随访 5 年以上。**结果** 原发灶和非肿瘤组织中均可观察到与所设计片段大小一致的 Runx3 mRNA 扩增产物电泳条带,但原发灶的条带比较模糊,其扩增图像的灰度均值,原发灶组 (0.33 ± 0.12) 显著低于非肿瘤组织组 (0.65 ± 0.21 , $P < 0.001$);以原发灶 Runx3 mRNA 表达的中位数 0.403 为参考,将 108 例原发灶标本分为低表达 (≤ 0.403) 和高表达 (> 0.403) 两组,并进行 Kaplan-Meier、Cox 回归方法等统计学分析,发现原发灶 Runx3 mRNA 的低表达不仅与胃癌的深度浸润、远处器官转移、低分化程度、淋巴结转移及较晚临床病理分期等不良临床病理因素相关,还与胃癌患者较低的中位生存期和总生存率明显相关 ($P < 0.05 \sim 0.001$)。**结论** 原发灶 Runx3 基因的低表达与胃癌的高侵袭性及不良预后密切相关。

关键词: 胃肿瘤;Runx3;预后

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1272-04

收稿日期:2011-02-25;修回日期:2011-07-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30171039);江苏省自然科学基金资助项目 (BK2008115)

作者单位:1. 214062 江苏无锡,苏州大学附属第四医院、无锡市第四人民医院普通外科;2. 上海市黄浦区中心医院普外科;3. 上海市第十人民医院普外科

作者简介:许洪卫(1960-),男,博士,主任医师,主要从事胃肠肿瘤的防治研究和微创外科治疗

0 引言

胃癌的发生、浸润和转移是一个多因素多步骤的复杂过程^[1-2]。人类 runt 相关转录因子基因 3 (runt-related transcription factor gene3, Runx3) 是新近发现的一种肿瘤抑制基因,它的失活或甲基化可能参与了胃癌变和腹膜转移过程^[3-4]。迄今,Runx3 基因变化与胃癌患者生存率的相关性报道不多。本研究采用半定量 RT-PCR 方法,探讨胃癌原发灶中 Runx3 基因表达对患者预后的

影响。

1 资料与方法

1.1 标本来源

108 例胃癌原发灶标本取自上海市第十人民医院 2000 年 10 月—2002 年 10 月期间行胃癌根治术的患者,即刻置于液氮中速冻保存。其中男 73 例,女 35 例;平均年龄(64 ± 10.5)岁。病例入选标准:(1)108 例原发灶标本为胃腺癌,108 例非肿瘤组织标本均不包含癌细胞且取材距原发灶 5 cm 以上,所有标本术后均经病理证实;(2)患者术前未接受放、化疗,术后未行放疗、仅接受过 4~6 次以 5-Fu 为主的化疗;(3)有完整的临床、病理和随访资料;(4)患者的死亡原因仅为肿瘤复发或转移。

1.2 试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司,PCR purification kit 购自 Omega BioTek 公司,PCR 引物系列由上海英骏技术服务有限公司合成。

1.3 组织总 RNA 的抽提

组织标本剪碎、匀浆后,采用 Trizol 细胞裂解法参照药盒说明书提取组织样本总 RNA,并经 1% 琼脂糖电泳鉴定和紫外分光光度计定量。

1.4 RT-PCR 半定量检测 Runx3 mRNA 水平

在标准的电泳槽上应用 MLV 反转录酶将总 RNA 反转录成 cDNA,分别 PCR 扩增 Runx3 和内参基因 β -actin。Runx3 上游引物序列为 5'-AT-GACGAGAACTACTCCGCT-3',下游引物序列为 5'-GGTCGGAGAATGGGTTTCAGT-3',产物长度 396 bp; β -actin 上游引物序列为 5'-GACGAGGC-CCAGAGCAAGAGAGG-3',下游引物序列为 5'-GATCCACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3',产物长度 906 bp。上述引物设计时在 genomic 序列上均跨越多个外显子,以消除总 RNA 制备中带入的 genomic DNA 对 PCR 结果的影响^[5]。取 5 μ l 扩增产物用 1.5% 进口琼脂糖电泳分离,用凝胶图像分析仪拍摄并保存结果;采用 Syngene tool 软件,分析 RT-PCR 同管扩增图像的灰度均值,作为 mRNA 表达的半定量水平,选取各种参数进行自动测量,并以 β -actin 为内参,校正每个样品的灰度比值。

1.5 随访

所有患者术后均进行 5 年的定期随访,记录其完整的临床相关资料,随访截止日期为 2007 年 10 月 31 日,以此计算截尾数据。

1.6 统计学方法

计数资料采用 χ^2 检验,生存分析应用 SPSS

15.0 统计软件包进行统计学处理,采用 Kaplan-Meier 方法分析并绘制生存曲线,应用 Log-rank 方法比较生存率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Runx3 mRNA 在胃癌原发灶及其非肿瘤组织中的表达

原发灶和非肿瘤组织标本中均可观察到 Runx3 mRNA 扩增产物电泳条带,但非肿瘤组织中的条带非常清晰,原发灶的比较模糊;扩增片段大小与所设计的完全一致,为 396 bp;参照基因 β -actin mRNA 电泳条带在上述两种组织中均清晰表达,扩增片段长度为 906 bp,其典型凝胶图像,见图 1。

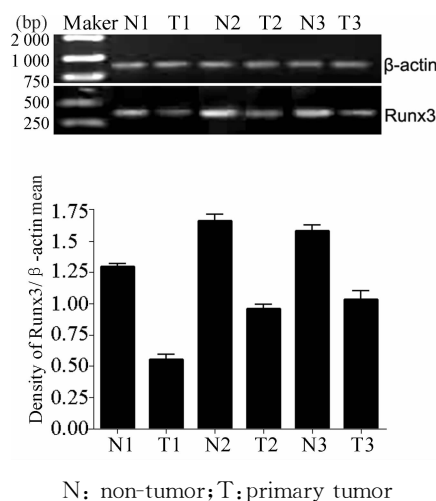


图 1 胃癌原发灶及其非肿瘤组织中 Runx3 mRNA 的表达

Figure 1 Expression of Runx3 mRNA in the primary tumor and non-tumor

半定量 RT-PCR 结果表明,原发灶组的 Runx3 mRNA 灰度均值(0.33 ± 0.12)显著低于非肿瘤组织组(0.65 ± 0.21, $P < 0.001$)。108 例原发灶组织 Runx3 mRNA 的灰度均值范围从 0.068 至 1.211,相差 17.8 倍,其中位数为 0.403,并据此将患者分为低表达(≤ 0.403)和高表达(> 0.403)两组。

2.2 原发灶 Runx3 mRNA 表达水平与胃癌患者临床病理因素的关系

将 108 例胃癌患者的不同临床病理因素与相应的原发灶 Runx3 mRNA 表达水平配对,结果发现,其高表达组与低表达组之间差异有统计学意义,即不同的 Runx3 mRNA 表达水平与胃癌的浸润深度、远处器官有否转移、分化程度、淋巴结有否转移及 TNM 分期等因素显著或明显相关($P < 0.001 \sim 0.05$),而与其性别、年龄和生长方式相关性不明显($P > 0.05$),见表 1。

表 1 Runx3 mRNA 表达与胃癌患者临床病理因素的关系

Table 1 Association between expression of Runx3 mRNA and clinicopathological features of patients with gastric cancer

Cinicopathological Parameters	Cases	mRNA expression(cases)		P
		≤0.403	>0.403	
Gender				
Male	73	40	33	
Female	35	19	16	>0.05
Age(years)				
<60	49	28	21	
≥60	59	31	28	>0.05
Growth pattern				
Expansive	42	24	18	
Infiltrative	66	36	30	>0.05
Histologic grade				
WD and MD	59	35	24	
PD	49	39	10	<0.05
Infiltrative depth				
T1 + T2	47	24	23	
T3 + T4	61	50	11	<0.001
LN metastasis				
Absence	34	19	15	
Presence	74	57	17	<0.05
Distant metastasis				
Absence	77	43	34	
Presence	31	28	3	<0.001
TNM stages				
I and II	27	15	12	
III and IV	81	65	16	<0.05

2.3 原发灶 Runx3 mRNA 表达与胃癌患者的生存分析

截至随访日,108 例胃癌患者中,有 70 例存活,其余 38 例因肿瘤复发或转移死亡。原发灶 Runx3 mRNA 高表达组和低表达组的中位生存期分别为 1 345天和 909 天,差异有统计学意义($P<0.001$)。Kaplan-Meier 生存分析显示,Runx3 mRNA 高表达组的总生存率显著高于低表达组($P<0.001$),见图 2。

此外,按 $\alpha=0.01$ 为标准,经 Cox 多因素回归分析表明,原发灶 Runx3 mRNA 高表达、肿瘤的浸润深度、远处器官有否转移、分化程度、淋巴结有否转移及 TNM 分期等因素($P<0.001\sim 0.05$)是影响患者生存的独立预后因素。

3 讨论

胃癌是我国发病率最高的恶性肿瘤之一,其生物学恶性程度高,转移扩散严重,五年生存率约为

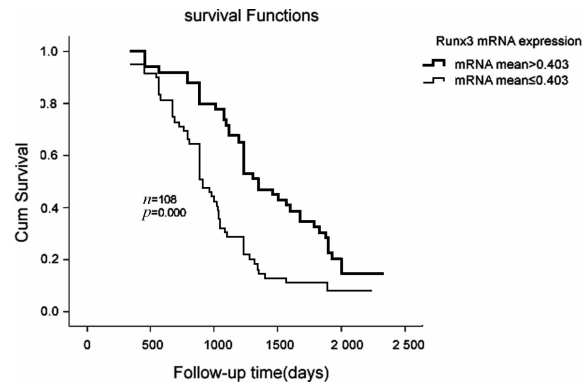


图 2 Runx3 mRNA 不同程度表达的胃癌患者生存曲线
Figure 2 The survival curves of patients analysis according to the expression of Runx3 mRNA

20%。我们先前的研究提示,抑瘤基因 E-钙黏附素的变化影响着胃癌侵袭性^[6]。作为新近被公认的肿瘤抑制基因,Runx3 调控着细胞的信号转导、生长发育和凋亡,它的缺失或失活可致胃黏膜癌变。Runx3 在大多数实体肿瘤的表达都降低^[1,4],其机制的研究也很深入^[7-10],但针对原发灶组织中肿瘤抑制基因变化与胃癌患者预后的问题,国内外的研究报道较少。

3.1 原发灶 Runx3 mRNA 低表达与胃癌的不良临床病理因素密切相关

新近文献报道,Runx3 mRNA 及其蛋白在胃癌组织中的表达量明显低于正常组织^[1,4];Runx3 敲除小鼠的胃黏膜上皮细胞发生恶性转化,激活胃癌细胞的 Runx3 表达可以显著抑制胃癌细胞的生长和成瘤性;在胃癌肝转移细胞中 Runx3 的两等位基因全部缺失;随着胃癌分期进展 Runx3 缺失的比例增加;胃癌原发灶 Runx3 蛋白表达与浸润深度、分化程度和 TNM 分期有关,而与患者性别、年龄和肿瘤大小无关^[11-12];这些均提示原发灶组织 Runx3 表达下降或缺失在胃癌的发生和进展中具有重要作用。

本研究结果表明,原发灶 Runx3 mRNA 表达显著低于非肿瘤组织,并且其低表达水平与胃癌的深度浸润、远处器官转移、低分化程度、淋巴结转移及较晚临床病理分期等因素密切相关。提示 Runx3 影响着胃癌的侵袭转移。可能与 Runx3 启动子区域的 CPG 岛过甲基化有关,因为 Runx3 mRNA 表达缺失和高转移潜能的胃癌细胞株 SGC-7901,经去甲基化药物 5-aza-2'-deoxycytidin 处理后,能够重新表达 Runx3 mRNA,并且在裸鼠体内的致瘤性明显降低^[13]。此外,本结果提示胃癌生长方式与原发灶 Runx3 mRNA 的表达无明显相关性。

3.2 原发灶 Runx3 mRNA 低表达影响着胃癌患者的不良预后

肝癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌等实体肿瘤中都发现有不同比例的 Runx3 表达缺失,其中 60%~90% 的胃癌病灶存在 Runx3 的缺失,并与胃癌患者的预后负相关^[4]。Wei 等^[14]报道,86 例胃癌标本中 Runx3 蛋白表达缺失或者下降,且与其低生存率有关。本研究发现,原发灶 Runx3 mRNA 低表达患者的中位生存期和总生存率均明显低于高表达者。提示原发灶 Runx3 基因的低表达与胃癌患者的不良预后密切相关。从而在临床随访患者的层面上进一步证实了 Runx3 是胃癌肿瘤抑制基因的结论。与 Hsu 等^[12]报道一致,他们应用免疫组织化学方法对 95 例胃癌患者研究发现,原发灶 Runx3 蛋白低表达与胃癌淋巴结转移和不良预后高度相关。

总之,本研究发现,原发灶 Runx3 mRNA 的低表达不仅与胃癌的深度浸润、远处器官转移、低分化程度、淋巴结转移及较晚临床病理分期等不良临床病理因素相关,还与胃癌患者较低的中位生存期和总生存率明显相关,进一步从临床预后角度证实了 Runx3 是胃癌肿瘤抑制基因。

参考文献:

- [1] Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, et al. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2): 315-331.
- [2] 许洪卫. 细胞黏附力和黏附分子对癌侵袭性影响的研究展望[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(17): 2057-2060.
- [3] Kim JH, Jung EJ, Lee HS, et al. Comparative analysis of DNA methylation between primary and metastatic gastric carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(5): 1251-1259.
- [4] 余燕民, 李小英, 许洪卫. RUNX3 基因失活与胃癌变[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(20): 1190-1192.
- [5] Oshimo Y, Oue N, Mitani Y, et al. Frequent loss of RUNX3 expression by promoter hypermethylation in gastric carcinoma[J]. *Pathobiology*, 2004, 71(3): 137-143.
- [6] 许洪卫, 蔡诚忠, 谭龙益. 胃癌根治术与血清、组织 E-钙粘附素变化的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(8): 751-752.
- [7] Ito Y. RUNX genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of RUNX family genes[J]. *Adv Cancer Res*, 2008, 99: 33-76.
- [8] Hiraki M, Kitajima Y, Sato S, et al. Aberrant Gene Methylation in the lymph nodes provides a possible marker for diagnosing micrometastasis in gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(4): 1177-1186.
- [9] Lee SH, Kim J, Kim WH, et al. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells[J]. *Oncogene*, 2009, 28(2): 184-194.
- [10] Kim JH, Jung EJ, Lee HS, et al. Comparative analysis of DNA methylation between primary and metastatic gastric carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(5): 1251-1259.
- [11] 高楠, 陈卫昌, 岑建农. 胃癌组织 runt 相关转录因子 3 基因表达与其甲基化状态的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(5): 361-364.
- [12] Hsu PI, Hsieh HL, Lee J, et al. Loss of RUNX3 expression correlates with differentiation, nodal metastasis, and poor prognosis of gastric cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(6): 1686-1694.
- [13] 李勇, 李华, 范立桥, 等. 去甲基化 Runx3 基因对荷人胃癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(3): 364.
- [14] 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.

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]