

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.06.016

# 非小细胞肺癌患者血清 RUNX3 基因异常甲基化的检测及意义

鲁德玘,姬晓青,刘 伟

## Significance of RUNX3 Hypermethylation in Serum DNA of Non-small Cell Lung Cancer Patients

LU De-gan,JI Xiao-qing,LIU Wei

Department of Respiratory Medicine, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China

**Abstract: Objective** To detect the promoter hypermethylation status of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) gene in serum DNA of non-small cell lung cancer patients and to discuss its clinical significance. **Methods** Serum DNA was extracted from 62 patients with NSCLC 30 patients with benign pulmonary disease, and 16 health subjects with medical check-up. The methylation status of RUNX3 gene was detected by MSP and the correlation of methylation profiles with clinical characteristic was statistically analyzed. **Results** Aberrant promoter methylation of RUNX3 was found in 25 of 62 (40.32%) NSCLC patients, but in none of patients with benign pulmonary disease and health subjects with medical check-up (Fisher exact probabilities test,  $P < 0.05$ ). The promoter hypermethylation of RUNX3 correlated with histopathology ( $\chi^2 = 4.12, P < 0.05$ ) and clinical stages (Fisher exact probabilities test,  $P < 0.05$ ), but not with age, gender, smoking index or differentiation in NSCLC patients. **Conclusion** The promoter hypermethylation of RUNX3 may play an important role in the tumorigenesis and progression. It is hopeful to become a promising novel biomarker for diagnosis in NSCLC.

**Key words:** Lung neoplasms/non-small-cell; RUNX3 gene; DNA methylation; Polymerase chain reactions; Serum

**摘要:目的** 探讨非小细胞肺癌患者血清中 runt 相关转录因子 3 (runt-related transcription factor 3, RUNX3) 基因启动子区域甲基化状况及其临床意义。**方法** 甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 法检测 62 例 NSCLC 和 30 例肺部良性疾病患者和 16 例健康体检者血清中 RUNX3 启动子区域甲基化状况, 并分析其与临床特征的关系。**结果** RUNX3 甲基化检出率在 NSCLC 患者为 40.32% (25/62), 而肺部良性疾病患者和健康体检者血清未检出 (Fisher 精确检验,  $P < 0.05$ )。NSCLC 患者血清 RUNX3 基因甲基化在腺癌检出率高于鳞癌 (51.43% vs. 25.93%,  $\chi^2 = 4.12, P < 0.05$ ), I ~ II 期甲基化检出率 (8/11, 72.73%) 高于 III ~ IV 期 (17/51, 33.33%), 与 NSCLC 患者性别、年龄、吸烟指数、分化程度无明显相关 ( $P > 0.05$ )。**结论** RUNX3 异常甲基化可能在 NSCLC 发生、发展中起重要作用, 有望成为 NSCLC 辅助诊断的分子标志。

**关键词:** 肺肿瘤/非小细胞; RUNX3 基因; DNA 甲基化; 聚合酶链反应; 血清

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)06-0671-04

## 0 引言

研究证实, 异常甲基化造成的抑癌基因沉默在人类肿瘤中经常出现。runt 相关转录因子 3 (runt-related transcription factor 3, RUNX3) 是近几年来确定的一个抑癌基因, 高甲基化可使其失活<sup>[1]</sup>。RUNX3 甲基化在膀胱癌<sup>[2]</sup>等肿瘤的发生、发展中起重要作用, 通常具有肿瘤特异性, 可能用作肿瘤的

一个潜在的生物标志<sup>[3]</sup>。在肺癌组织中已检测到 RUNX3 启动子甲基化<sup>[4]</sup>, 鲜有肺癌患者血清中 RUNX3 甲基化研究。甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 是一种应用最广泛的测定甲基化水平的方法。MSP 只需要少量的 DNA, 可检测出给定的 CpG 岛 0.1% 的等位基因甲基化<sup>[5]</sup>。本研究采用 MSP 法检测 NSCLC 患者外周血清中 RUNX3 基因的甲基化状态, 分析其与临床病理之间的相关性, 探讨其临床意义。

收稿日期: 2010-05-14; 修回日期: 2010-11-12

作者单位: 252000 山东聊城, 聊城市人民医院呼吸科

作者简介: 鲁德玘 (1971-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事肺癌基础和临床研究

# 1 资料与方法

## 1.1 资料

以 2007 年 9 月至 2008 年 12 月间于我院呼吸内科住院治疗的 62 例 NSCLC 患者为研究对象,其中男 40 例,女 22 例;年龄 42~75 岁,平均 59.6 岁。所有患者均经组织病理学证实,其中鳞癌 27 例,腺癌 35 例,均未行放化疗。TNM 分期<sup>[6]</sup>: I 期 1 例, II 期 10 例, III 期 24 例, IV 期 27 例。肺部良性疾病患者系我院呼吸内科同期住院治疗的 30 例患者,其中肺部感染 8 例,慢性阻塞性肺疾病 15 例,气胸 7 例,16 例健康志愿者为我院查体中心体检者。

## 1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有患者均于确诊后、手术或放化疗前凌晨空腹采集外周静脉血 5 ml,健康志愿者血液标本由我院查体中心提供。标本 4℃ 静置 2 h,3 000 r/min 离心 10 min,留取血清,将血清标本置 -80℃ 保存。

1.2.2 血清 DNA 提取 采用 QIAamp Blood Mini Kit DNA 抽提试剂盒(QIAGEN 公司,德国)提取血清 DNA。每份标本使用 2 ml 血清,按照说明成比例地增大所需的反应试剂用量,多次过离心柱,最后以 50 μl 灭菌去离子水洗脱 DNA, -80℃ 保存。

1.2.3 亚硫酸氢钠修饰 参照 Zimm 等<sup>[7]</sup>的方法,对所提取的血清 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰,将 DNA 序列中未甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U)。

1.2.4 DNA 纯化及脱磺基反应 在提取所得的 DNA 中,加入 1 μg 鲑鱼精 DNA(Sigma 公司产品)作为载体,以终浓度为 0.3 mol/L 的 NaOH 于 40℃ 反应 15 min 变性解链,依次加入新鲜配制的对苯二酚(Sigma 公司产品)30 μl 和 pH 5.0 的 NaHSO<sub>3</sub>(Sigma 公司产品)520 μl,轻柔混匀,以石蜡油覆盖,55℃ 避光反应 14 h。吸除石蜡油,采用美国 Promega 公司生产的 Wizard DNA Clean-Up System 提纯 DNA,以终浓度为 0.3 mol/L 的 NaOH 于室温处理 10 min 脱磺,最后冷乙醇沉淀,所得 DNA 溶于 30 μl 灭菌去离子水中, -80℃ 保存。

1.2.5 甲基化特异性 PCR 参照文献<sup>[8]</sup>设计 RUNX3 引物,分别识别甲基化特异性(M)和非甲基化特异性序列(U)。RUNX3 具体序列为: M 正义引物: 5'-GCGGTAAGATGGGCGAGAATA-3', M 反义引物: 5'-CACGAACTCGCCTACGTAATC-3'; 扩增产物大小 234 bp。 U 正义引物: 5'-TGTAAGATGGGTGAGAATA-3', U 反义引物: 5'-CACAACTCACCTACATAATCC-3'; 扩增产物大小 234 bp。

PCR 反应体系 20 μl,其中去离子水 14.95 μl,

10×PCR 缓冲液 2 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.2 μl, dNTPs (10 mmol/L) 0.25 μl, 上下游引物各 0.2 μl (25 pmol), 修饰后的 DNA 模板 1 μl, Taq DNA 聚合酶(10 U/μl) 0.2 μl, 充分混匀后置 DNA 扩增仪中扩增。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。

取扩增产物 5 μl 行 2% 的琼脂糖凝胶电泳(10 V/CM, 20 min), 溴化乙锭染色后凝胶成像系统拍照。以正常人外周血淋巴细胞 DNA 作为非甲基化阳性对照, 过量 CpG(Sss I) 甲基化酶(美国 NEB 公司产品)修饰的淋巴细胞 DNA 作为甲基化阳性对照, 水空白代替 DNA 作为阴性对照。

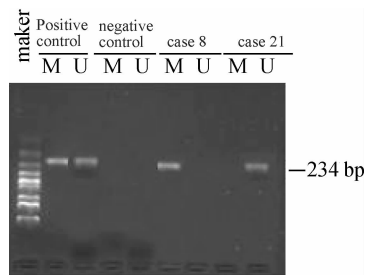
## 1.3 统计学方法

定量资料采用 *t* 检验, 分类资料采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验。以 *P* < 0.05 认为差异有统计学意义。统计学分析在 SPSS 12.0 版软件包上完成。

# 2 结果

## 2.1 血清 RUNX3 基因启动子区甲基化检测结果

62 例 NSCLC 患者中, 有 25 例患者血清 DNA RUNX3 基因甲基启动子区域 CpG 岛发生了异常的过度甲基化, 检出率为 40.32%, 而良性肺部疾病患者和健康体检者血清未检出 RUNX3 基因甲基化, 差异有统计学意义 (Fisher 精确检验, *P* < 0.05), 见图 1。



M: methylated U: unmethylated

图 1 NSCLC 患者血清 RUNX3 基因甲基化检测电泳图

Figure 1 Gel electrophoresis of RUNX3 gene methylation in serum of NSCLC patients

## 2.2 RUNX3 基因启动子区甲基化状态与临床病理的相关性

NSCLC 患者血清 RUNX3 基因甲基化在腺癌检出率高于鳞癌 (51.43% vs. 25.93%,  $\chi^2 = 4.12$ , *P* < 0.05), I ~ II 期甲基化检出率 (8/11, 72.73%) 高于 III ~ IV 期 (17/51, 33.33%), 与 NSCLC 患者性别、年龄、吸烟指数、分化程度无明显相关 (*P* > 0.05), 见表 1。

表 1 RUNX3 基因启动子区甲基化状态与临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between methylation status of RUNX3 gene and clinicopathological features

Clinicopathological features	Methylation status of RUNX3		Statistics	P
	Methylated(25)	Unmethylated(37)		
Gender				
Male	16	24		
Female	9	13	$\chi^2 = 0.01$	0.94
Age(years)				
<60	10	13		
≥60	15	24	$\chi^2 = 0.15$	0.70
Smoking index	435.46 ± 130.79	423.67 ± 120.58	$t = 0.37$	0.86
Pathology type				
Squamous carcinoma	7	20		
Adenocarcinoma	18	17	$\chi^2 = 4.12$	0.04
Stage				
I ~ II	8	3		
III ~ IV	17	34		0.02*
Differentiation degree				
Well	6	7		
Moderate	9	8	$\chi^2 = 2.40$	0.30
Poor or undifferentiated	10	22		

Note: \* :Fisher exact probabilities test

### 3 讨论

DNA 甲基化是基因修饰的重要方式,真核生物 DNA 的甲基化位点主要是 CpG 岛中的胞嘧啶(C)。在肿瘤中,尽管全局上呈现低甲基化,但是在 CpG 岛区域基因组是高甲基化的,且常常与启动子相关<sup>[9]</sup>。CpG 岛区域启动子异常甲基化是肿瘤相关抑癌基因的一种主要的失活机制<sup>[10]</sup>,与一些肿瘤的演进直接相关。

RUNX3 基因位于人染色体 1p36.1<sup>[11]</sup>,全长约 67 kb,含有 P1、P2 两个启动子,6 个外显子和 1 290 bp 的开放阅读框,两个启动子区域均含数个分离的转录起始点,均具有转录活性。两个启动子序列均缺乏 TATA 盒,但包含 CCAAT 盒。TGF-β(transforming growth factor-β,TGF-β)信号通路的配体、受体和胞内信号转导分子 Smad 蛋白共同组成一个肿瘤信号的通路。通路异常即可引起信号紊乱,促进多种肿瘤的发生和发展<sup>[12]</sup>。RUNX3 是 TGF-β 信号通路不可或缺的组成部分,RUNX3 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。研究表明,启动子区域 CpG 岛的异常甲基化可导致转录阻遏<sup>[13]</sup>,是导致 RUNX3 基因沉默的主要机制,在肺癌的早期即可出现<sup>[14]</sup>。

研究表明,肿瘤患者外周血中存在一定数量的 DNA,并且含量远高于健康者,可能来源于肿瘤细胞坏死释放<sup>[15]</sup>。从外周血中提取并且作为肿瘤

DNA 的代表,在肿瘤相关的分子生物学研究方面开启了一个新的领域。血清易于取得,因此是理想的 DNA 甲基化检测标本。MSP 法是一项应用最广泛的检测甲基化水平的技术,常规 MSP 的敏感度可达 1 : 2 000<sup>[5]</sup>。本研究中,NSCLC 患者 RUNX3 基因甲基化检出率为 40.32%,略低于 Tan 等<sup>[8]</sup>报道的结果,与 Yanagawa 等<sup>[16]</sup>研究结论相近。由于在肺部良性疾病患者和健康体检者外周血血清中未检测到 RUNX3 基因启动子的异常甲基化,因此,NSCLC 患者外周血血清中 RUNX3 基因启动子的异常甲基化具有肿瘤特异性。

我们进一步比较了 NSCLC 患者血清 RUNX3 基因甲基化检出率与其临床特征的关系,发现 NSCLC 患者血清 RUNX3 基因甲基化检出率与患者年龄、性别、吸烟状况分化程度无明显相关,腺癌组甲基化率明显高于鳞癌组,与 Yanagawa 等<sup>[17]</sup>在肺癌组织中研究结论相似。研究还发现: I ~ II 期患者甲基化率明显高于 III ~ IV 期,提示 RUNX3 基因异常甲基化可能发生在肿瘤发生的早期。在一些肿瘤的癌前病变如:前列腺上皮内瘤变<sup>[18]</sup>、慢性萎缩性胃炎<sup>[3]</sup>、Barrett's 食管<sup>[19]</sup> 等均已检测到 RUNX3 基因异常甲基化。众所周知,吸烟是肺癌的危险因素之一,也与 DNA 甲基化有关<sup>[20]</sup>。我们的研究中,RUNX3 甲基化组和非甲基化组吸烟指数无差异,尚无明确的解释,可能与病例选择有关,

也可能系除吸烟以外的致癌因素诱导了分子变化而致。

Licchesi 等<sup>[14]</sup>报道, RUNX3 甲基化造成的基因沉默发生在肿瘤进展早期, 检测血清抑癌基因 DNA 启动子甲基化可能有助于早期识别肺癌。Yanagawa 等<sup>[16]</sup>研究发现, RUNX3 甲基化阳性患者生存期短于甲基化阴性患者, RUNX3 甲基化状况是 NSCLC 预后的独立预测因子。Araki 等<sup>[21]</sup>研究发现, 肺腺癌 RUNX3 蛋白的低表达和 5 年生存率降低相关。因此, 检测 RUNX3 基因启动子异常甲基化状况有望用于 NSCLC 的预后判断。

总之, NSCLC 患者外周血中 RUNX3 基因有较高的异常甲基化检出率。RUNX3 基因异常甲基化可能在 NSCLC 发生、发展中起重要作用, 有望成为 NSCLC 辅助诊断和预后判断的分子标志。有必要进行进一步的研究评估, 以使其将来在临床应用成为可能。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Wolff EM, Liang G, Cortez CC, et al. RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15):6208-6214.
- [3] 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):479-484.
- [4] Li QL, Kim HR, Kim WJ, 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.
- [5] Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(18):9821-9826.
- [6] Watanabe Y. TNM classification for lung cancer[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 9(6):343-350.
- [7] Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, et al. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(1):194-201.
- [8] Tan SH, Ida H, Lau QC, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3[J]. *Oncol Rep*, 2007, 18(5):1225-1230.
- [9] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(6):465-476.
- [10] Yoshino M, Suzuki M, Tian L, et al. Promoter hypermethylation of the p16 and Wif-1 genes as an independent prognostic marker in stage IA non-small cell lung cancers[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(5):1201-1209.
- [11] Zhang S, Wei L, Zhang A, et al. RUNX3 gene methylation in epithelial ovarian cancer tissues and ovarian cancer cell lines[J]. *OMICS*, 2009, 13(4):307-311.
- [12] Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors[J]. *Cancer Sci*, 2003, 94(3):230-234.
- [13] Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2):384-390.
- [14] Licchesi JD, Westra WH, Hooker CM, et al. Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(5):895-904.
- [15] Widschwendter M, Menon U. Circulating methylated DNA: a new generation of tumor markers[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(24):7205-7208.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Kang GH, Lee S, Lee HJ, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia[J]. *Pathol*, 2004, 202(2):233-240.
- [19] Schulmann K, Sterian A, Berki A, et al. Inactivation of p16, RUNX3, and HPP1 occurs early in Barrett's-associated neoplastic progression and predicts progression risk[J]. *Oncogene*, 2005, 24(25):4138-4148.
- [20] Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors[J]. *Mutagenesis*, 2007, 22(2):91-103.
- [21] 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.

[编辑:安 凤;校对:黄园玲]