

Runx3 基因甲基化与胃癌发生和转移的关系

李 华, 李 勇, 范立侨, 赵雪峰, 宋振川, 赵 群, 王力利, 焦志凯, 刘 羽

Relationship between Hypermethylation of Runx3 Gene in Promoter Region and Cogenesis, Metastasis of Gastric Carcinoma

LI Hua, LI Yong, FAN Li-qiao, ZHAO Xue-feng, SONG Zhen-chuan, ZHAO Qun, WANG Li-li, JIAO Zhi-kai, LIU Yu

Department of Surgery, The Forth Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding Author: LI Yong, E-mail: li_yong@inhe.net

Abstract :Objective To investigate the relationship of methylation of human runt-related transcription factor 3 (Runx3) gene on metastasis and oncogenesis of gastric carcinoma. **Methods** Using RT-PCR technique, specimens from 80 gastric cancer patients (tumor tissues, adjacent tissues) were detected for their expression of the Runx3 gene. Meanwhile, Methylation-specific PCR was used to detect methylation of Runx3 promoter region. **Results** The expression of Runx3 gene mRNA detected in gastric carcinoma (0.5971 ± 0.1013) was lower than that in adjacent tissues samples (0.8297 ± 0.2912) ($t = 6.7480$, $P < 0.05$). No methylation of Runx3 promoter was found in adjacent tissues samples. But it was found in 43 cases in 80 gastric carcinoma specimens. The rate of methylation of Runx3 promoter in gastric carcinoma was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The Runx3 mRNA were down-regulated in lymphnode metastasis or poorly differentiated groups, but the Runx3 promoter methylation were detected in those groups markedly. A significant difference was noted between two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypermethylation was one of reasons which induced Runx3 gene inactivation in human gastric carcinoma. Methylation of Runx3 promoter maybe correlated to oncogenesis, metastasis of gastric carcinoma.

Key words: Gastric carcinoma; Runx3 gene; RT-PCR; DNA methylation

摘要:目的 探讨 Runx3 基因启动子甲基化与胃癌发生发展过程的关系。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 80 例胃癌组织及肿瘤周围粘膜组织中 Runx3 mRNA 的表达,同时用甲基化特异性 PCR(MSP)方法检测 Runx3 基因启动子甲基化情况。结果 80 例胃癌组织标本中 Runx3 基因的表达(0.5971 ± 0.1013)较肿瘤周围组织中表达明显下调(0.8297 ± 0.2912),差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常粘膜组织中未发现有 Runx3 基因启动子的甲基化,80 例胃癌组织中有 43 例检测到 Runx3 基因启动子的甲基化,胃癌组织 Runx3 基因启动子甲基化率显著增高($P < 0.05$)。胃癌标本中 Runx3 mRNA 的表达与其病理临床特征密切相关,在低分化和有淋巴结转移胃癌组织标本中 Runx3 mRNA 的表达显著下调($P < 0.05$)。结论 Runx3 基因启动子甲基化是导致 Runx3 基因失活的主要原因之一并且与胃癌的发生、发展密切相关。

关键词:胃癌;Runx3 基因;RT-PCR;DNA 甲基化

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)07-0508-03

0 引言

人类 Runt 相关转录因子 3 (human runt-related transcription factor 3, Runx3)是 runt 家族中新近受到广泛关注的基因,它是哺乳动物 Runt 家族

进化的基础^[1],定位于人染色体 1 号短臂 1p36 上。近年来研究发现,Runx 蛋白可指导转化生长因子(transforming growth factor beta, TGF- β)信号转道过程中激活的 Smad 复合物从细胞质内转入细胞核内特定靶位点,加强 Smad 复合物与靶位点的结合强度并激活靶基因,从而对细胞的分化、细胞周期调控、凋亡和恶性转化起作用^[2]。TGF- β 因子信号紊乱将导致许多肿瘤的发生。研究发现,染色体 1p36 的异常与肿瘤发生发展有着密切的关系^[3-5],为深入探讨 Runx3 基因在胃癌发生、发展中的作用,本研究利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检

收稿日期:2006-06-08;修回日期:2007-01-04
基金项目:河北省科技厅攻关课题资助项目(04276101D-37)
作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院外三科
通讯作者:李勇, E-mail:li_yong@inhe.net
作者简介:李华(1969-),男,博士,副主任医师,主要从事消化道肿瘤的基础与临床研究

测 80 例胃癌组织及肿瘤周围正常粘膜组织中 Runx3 mRNA 的表达,同时用甲基化特异性 PCR (MSP) 方法检测 Runx3 基因启动子甲基化情况。阐明 Runx3 基因启动子甲基化与胃癌发生、发展过程的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 标本 80 例胃癌组织标本取自我院 2005 年 1 月~8 月的手术切除标本,立即放液氮中速冻,-80 冻存备用。同时选取癌旁 5 cm 组织作为对照。年龄 28~80 岁,中位年龄 57 岁,男 45 例,女 35 例,有淋巴结转移 45 例。所有标本术后均经病理证实。

1.1.2 试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。cDNA 第一链反应试剂盒购自 Fermentas 公司。PCR 引物序列由上海生工生物工程公司合成。DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司,氢酯和亚硫酸氢钠购自 SIGMA 公司。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取 将组织标本研磨后,采用 Trizol 试剂按照说明书提取组织样本总 RNA,备用。

1.2.2 逆转录-多聚合酶链反应(RT-PCR) 紫外分光光度计定量总 RNA,调整浓度为 1 μg/μl。按 cDNA 第一链反应试剂盒说明书采用随机引物法合成 cDNA。用 GAPDH 做为内参照进行 PCR。Runx3 的引物序列:上游:5'-GATGGCAGGCAATGACGA-3',下游:5'-TGCTGAA GTGGCTTGTGGT-3',扩增长度:353 bp。GAPDH 的引物序列:上游:5'-AACGGATTTGGTCGTATTG-3',下游:5'-GGAA GATGTGTATGGGATT-3',扩增长度:208 bp。PCR 参数:94 5 min 变性;94 45 s,55 55 s,71 45 s,32 个循环;72 延伸 7 min。PCR 产物于 2% 琼脂糖电泳,电压 60 V,55 min。Gel ID 凝胶图像分析系统摄片分析测定其光密度。计算各个样本 Runx3 积分光密度(条带强度 × 条带面积)与 GAPDH 内对照积分光密度的比值,反映 Runx3 mRNA 表达的变化。

1.2.3 DNA 提取、纯化和亚硫酸盐修饰 称取 150 mg 标本在未解冻时迅速用眼科剪剪碎,然后按 DNA 纯化试剂盒说明书提取 DNA。取 1 μg DNA 加入 50 μl 总体积中,加 2 mol/L NaOH 使其终浓度为 0.2 mol/L,37 变性处理 10 min。再加入新鲜配制 10 mmol/L 氢酯 20 μl,520 μl 的亚硫酸氢钠,置于 50 水浴 16 h,修饰后的 DNA 用 Wizard

DNA clean up system 纯化,加入 NaOH (终浓度 0.3 mol/L)室温变性 5 min,加入 3 mol/L 的醋酸钠中和后,乙醇沉淀回收 DNA,此 DNA 溶于 50 μl TE 缓冲液中,-20 贮存备用。

1.2.4 甲基化特异性 PCR (Methylation 2specific PCR, MSP) 甲基化特异性引物上游引物序列为 5'-TTACGAGGGGCGGTCTACGCGGG-3',下游引物为 5'-AAAACGACCGACGCGAACGCCTCC-3',扩增片段为 210 bp。非甲基化特异性引物上游序列为 5'-TTATGAGGGGTGGTTGTATGTGGG-3',下游引物为 5'-AAAACAACCAACACAAACA ACTCC-3',扩增片段为 210 bp,反应体系总体积为 25 μl,甲基化反应条件为 94 5 min 预变性,94 30 s,65.6 45 s,72 55 s,共 35 个循环,72 延伸 5 min。非甲基化反应条件为 94 5 min 预变性,94 30 s,61.2 45 s,72 55 s,共 35 个循环,72 延伸 5 min。PCR 产物 5 μl 于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外线下观察拍照分析。

1.3 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Runx3 mRNA 在胃癌和癌旁组织中的表达

Runx3 和 GAPDH 引物的扩增基因片段经电泳和 EB 染色后,电泳结果显示扩增片段大小分别为 353 bp 和 208 bp。Runx3 表达量相对值在胃癌及癌旁组织中的表达,见表 1。

表 1 Runx3 基因 mRNA 在胃癌及癌旁组织中的表达

Table with 4 columns: 组织来源, 表达相对值(x̄ ± s), t, P. Rows: 胃癌组织, 癌旁组织.

表 2 Runx3 基因甲基化在胃癌及癌旁组织中的表达

Table with 5 columns: 组织来源, 甲基化表达(n), 非甲基化表达(n), t, P. Rows: 胃癌组织, 癌旁组织.

2.2 Runx3 基因启动子甲基化在胃癌和癌旁组织中的发生率

Runx3 基因甲基化检测电泳染色后显示,癌旁组织内未发现 Runx3 基因启动子甲基化而胃癌组织标本中有 53.75% (43/80) 被检测到,见表 2。

2.3 Runx3 的表达与胃癌临床病理相关因素的关系

表 3 结果显示,Runx3 mRNA 的表达与胃癌



的分化程度及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$), 而与肿瘤部位及大小无关 ($P > 0.05$)。

表 3 胃癌组织 Runx3 基因 mRNA 表达与临床病理特征的关系

临床病理因素	例数	Runx3 mRNA	χ^2 值和 P
分化程度			
低分化	31	4	$\chi^2 = 3.950$
高分化	49	16	$P = 0.047$
淋巴结转移			
有	38	5	$\chi^2 = 5.414$
无	42	15	$P = 0.020$
肿瘤大小			
< 5 cm	50	12	$\chi^2 = 0.071$
> 5 cm	30	8	$P = 0.790$
肿瘤部位			
胃窦	44	10	$\chi^2 = 0.269$
胃体	36	10	$P = 0.604$

3 讨论

Runt 家族包括 3 个基因,其家族成员均具有含 123 个氨基酸的 Runt Domain (RD 区域),Runx 蛋白与 Smad2、Smad3 形成复合物传递 TGF- β /activin 信号,与人类疾病的发生密切相关。Runx3 含有 2 个高度保守的 CpG 岛,其中一个富含 GC 启动子的特征 CpG 岛较大,位于 Runx3 基因启动子 P2 周围,控制 Runx3 基因转录^[1]。目前研究发现消化道肿瘤,如胃癌、胆管癌、胰腺癌和肝细胞癌中均有染色体 1p36 异常^[6-7]。Runx3 基因作为一种肿瘤抑制基因,与多种肿瘤的发生、发展相关。

在 45%~60% 的胃癌细胞系和胃癌组织中,有紧邻 P2 启动区的 CpG 岛的甲基化^[8,9]。Li 等研究发现在 30% 胃癌中有 1p36.1 的杂合性缺失,而 Runx3 的点突变则为 1/119^[10]。本研究结果表明胃癌中 Runx3 的表达量明显低于正常粘膜组织,Runx3 在伴有淋巴结转移组中明显低于未转移组。说明在胃癌发生、发展过程中 Runx3 基因表达有缺失并且与胃癌分期有关,因此,近年来部分学者更倾向于 Runx3 基因是一种抑癌基因,在胃癌发生中起重要作用。

Runx3 基因表达缺失主要是由于 Runx3 基因启动子甲基化所造成。本研究在正常粘膜组织中未

发现有 Runx3 基因启动子的甲基化,而在胃癌组织中有 53.75% 检测到甲基化存在,这与文献报道相似^[11]。因此 Runx3 基因启动子区域的高甲基化 (CpG 岛甲基化) 可能是导致基因转录失活及其表达下调的主要原因。

Runx3 基因启动子区域高甲基化导致其在胃癌组织中表达明显下调且与胃癌发生、发展密切相关。因此,利用药物对 Runx3 基因进行去甲基化处理的进一步研究必将对胃癌的临床诊断和治疗带来新的启示。

参考文献:

- [1] Bangsow C, Rubins N, Glusman G, et al. The Runx3 gene sequence, structure and regulated expression[J]. Gene, 2001, 279(2):221-232.
- [2] Zaidi SK, Sullivan AJ, van Wijnen AJ, et al. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(12): 8048-8053.
- [3] Tokumaru Y, Nomoto S, Jeronimo C, et al. Biallelic inactivation of the RIZ1 gene in human gastric cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(44):6954-6958.
- [4] Kang YK, Kim YI, Kim WH. Allelotype analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Mod Pathol, 2000, 13(6):627-631.
- [5] Fang W, Piao Z, Simon D, et al. Mapping of a minimal deleted region in human hepatocellular carcinoma to 1p36.13-p36.23 and mutational analysis of the RIZ(PRDM2) gene localized to the region[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2000, 28(3): 269-275.
- [6] Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PERP2/CBF[J]. Genes Cells, 1999, 4(12):685-696.
- [7] Warren AJ, Bravo J, Williams RL, et al. Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBF beta[J]. EMBO J, 2000, 19(12):3004-3015.
- [8] Li QL, Ito K, Sakakura C, et al. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer[J]. Cell, 2002, 109(1):113-124.
- [9] Waki T, Tamura G, Sato M, et al. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia[J]. Cancer Sci, 2003, 94(4):360-364.
- [10] Miyazono K, Suzuki H, Imamura T, et al. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors[J]. Cancer Sci, 2003, 94(3):230-234.
- [11] 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.

[编辑:贺文;校对:马福元]