

淋巴结 RUNX3 基因甲基化与胃癌临床病理因素的关系研究

杨国祥¹, 杜寒松², 张万里², 金鑫², 张娟^{3△} (1. 长江航运总医院普外科, 武汉 430010; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心, 武汉 430022; 3. 湖北省襄阳市中心医院肿瘤科 441021)

【摘要】目的 研究胃癌患者淋巴结 RUNX3 基因甲基化与临床病理的关系。**方法** 选择 2010 年 1 月至 2013 年 1 月长江航运总医院手术治疗的 60 例胃癌患者为研究对象, 采用甲基化特异性 PCR(MSP)检测胃癌患者病理组织学证实肿瘤转移的淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化状态, 分析在不同临床病理因素中 RUNX3 基因启动子甲基率的差异。**结果** RUNX3 基因启动子甲基化率为 66.7%, 其在性别、年龄、吸烟史、酗酒史、家族史、幽门螺旋杆菌(HP)感染和肿瘤部位中的差异无统计学意义($P>0.05$), 在 Lauren's 分型、组织学分级、肿瘤最大径、远处转移、TNM 分期和手术方式中的差异有统计学意义($P<0.05$), 弥漫型、G3~G4、肿瘤最大直径大于或等于 5 cm、有远处转移、TNM 分期晚和姑息手术患者淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化率明显高于肠型、G1~G2、肿瘤最大径小于 5 cm、无远处转移、TNM 分期早和根治手术患者($P<0.05$)。**结论** 胃癌淋巴结 RUNX3 甲基化与 Lauren's 分型、组织学分级、肿瘤最大径、远处转移、TNM 分期和手术方式密切相关, 可作为胃癌病情及预后评估的标志物。

【关键词】 胃癌; RUNX3; 甲基化; 临床病理因素

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.06.036 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)06-0801-02

RUNX3 通过调控细胞的凋亡而抑制正常细胞癌变, 其 mRNA 及蛋白质在胃癌组织中呈低表达状态, 且其表达水平与病理类型及临床分期密切相关, 可作为胃癌诊断、病情及预后评估的标志物^[1-2]。但这些研究均限于手术切除后肿瘤标本的检测, 而对手术切除标本淋巴结 RUNX3 甲基化与临床病理因素的关系研究较少^[3]。本研究采用甲基化特异性 PCR(MSP)检测胃癌患者手术切除淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化状态, 以探讨 RUNX3 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 1 月至 2013 年 1 月长江航运总医院手术治疗的 60 例胃癌患者为研究对象, 其中男 36 例, 女 24 例; 年龄 30~75 岁, 平均(56.2±11.9)岁; 幽门螺旋杆菌

(HP)感染阳性 21 例, 阴性 39 例。入选标准: (1)经体格检查、影像学检查、内镜活检和(或)术后病理组织学检查确诊为胃癌患者; (2)初治患者, 术前未接受放疗或化疗。所有患者取经病理组织学检查证实为胃癌转移的淋巴结, 保存于液氮中, 用于 RUNX3 基因甲基化检测。

1.2 方法 根据 DNA 提取试剂盒说明提取胃癌患者淋巴结基因组 DNA。采用 MSP 法检测 RUNX3 基因启动子甲基化状态。引物采用 Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)设计, 序列见表 1, PCR 扩增体系为 25 μL, 循环条件为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 1 min, 65 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 35 s, 共 30 个循环, 最后一轮 72 °C 延伸 10 min。MSP 产物经琼脂糖凝胶电泳后显影检测。

表 1 RUNX3 基因启动子甲基化 MSP 引物序列

引物	甲基化引物	非甲基化引物
Forward	5'-GGATTCGTAGAGGTTATTTTTATTTC-3'	5'-TTGGATTGTAGAGGTTATTTTTATTT-3'
Reverse	5'-CATATAACCACGATCCTACATCGTA-3'	5'-CATATAACCACAATCCTACATCATA-3'

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料进行 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法计算 P 值, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

60 例胃癌患者中淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化 40 例, 甲基化率为 66.7%。RUNX3 基因启动子甲基化率在性别、年龄、吸烟史、酗酒史、家族史、HP 感染和肿瘤部位中的差异无统计学意义(均 $P>0.05$); 在 Lauren's 分型、组织学分级、肿瘤最大径、远处转移、TNM 分期和手术方式中的差异有统计学意义($P<0.05$)。弥漫型、G3~G4、肿瘤最大径大于或等于 5 cm、有远处转移、TNM 分期晚和姑息手术患者淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化率显著高于肠型、G1~G2、肿瘤最

大径小于 5 cm、无远处转移、TNM 分期早和根治手术患者($P<0.05$), 具体结果见表 2。

表 2 胃癌患者 RUNX3 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系

临床病理因素	n	RUNX3 基因启动子甲基化[n(%)]	χ^2	P	
性别	男	36	25(69.4)	0.078	0.780
	女	24	15(62.5)		
年龄	<55 岁	27	16(59.3)	0.682	0.409
	≥55 岁	33	24(72.7)		

△ 通讯作者, E-mail: xianfeng7hao@sina.com。

续表 2 胃癌患者 RUNX3 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系

临床病理因素	n	RUNX3 基因启动子甲基化[n(%)]	χ^2	P
吸烟史	有	32 22(68.8)	0.008	0.927
	无	28 18(64.3)		
酗酒史	有	20 14(70.0)	0.009	0.923
	无	40 26(65.0)		
家族史	有	15 12(80.0)	0.900	0.343
	无	45 28(62.2)		
HP 感染	阳性	22 15(68.2)	0.009	0.925
	阴性	38 25(65.8)		
肿瘤部位	贲门	19 13(68.4)	0.072	0.965
	胃体	11 7(63.6)		
	胃窦	30 20(66.7)		
Lauren's 分型	肠型	39 22(56.4)	4.038	0.044
	弥漫型	21 18(85.7)		
组织学分级	G1~G2	35 19(54.3)	4.534	0.033
	G3~G4	25 21(84.0)		
肿瘤最大径	<5 cm	20 8(40.0)	7.884	0.005
	≥5 cm	40 32(80.0)		
远处转移	无	48 28(58.3)	—	0.005
	有	12 12(100.0)		
TNM 分期	I	8 3(37.5)	13.905	0.003
	II	22 11(50.0)		
	III	17 14(82.4)		
	IV	12 12(100.0)		
手术方式	胃癌根治术	46 27(58.7)	—	0.023
	姑息手术	14 13(92.9)		

注：— 表示无数据。

3 讨 论

RUNX3 通过调控 TGF-β 通路抑制正常细胞癌变,在肿瘤的发病机制、诊断、病情和预后评估中具有重要作用。研究表明,导致 RUNX3 表达下降的机制包括基因突变及表观遗传学修饰。表观遗传学是不依赖于 DNA 序列改变的转录前调控方法,其中甲基化是表观遗传学最重要的调控机制,在越来越多的肿瘤中被发现呈高甲基化状态,可作为肿瘤诊断、病情及预后评估的生物标志物,其灵敏度及特异性普遍高于目前传统的标志物^[4]。研究表明,RUNX3 在胃癌组织中的表达低于正常组织。Osaki 等^[5]采用 AS251 多抗检测胃癌细胞 RUNX3 蛋白质表达,发现 6 种胃癌细胞株中 RUNX3 蛋白质均呈低表达状态。陈晓宇等^[6]检测 RUNX3 蛋白在胃癌组织中的表达,其阳性表达率低于其在癌旁组织,同时低分化胃癌组织中的阳性表达率低于高、中分化胃癌组织,认为 RUNX3 蛋白表达降低与胃癌分化程度有密切关系。基于基因表达法则,目前认为 RUNX3 基因缺失或甲基化修饰是其 mRNA 及蛋白质表达下降的原因,该推测得到越来越多的研究证实^[7]。本研究中,胃

癌患者手术切除淋巴结中 RUNX3 基因启动甲基化率为 66.7%,与报道的手术切除标本 RUNX3 基因启动子甲基化率基本一致,表明淋巴结与手术切除标本具有一致性。

进一步研究表明 RUNX3 基因启动子甲基化与胃癌的临床病理因素密切相关,这些因素包括淋巴结转移、远处转移及临床分期^[8],但这些研究均局限于对手术后切除肿瘤的研究。本研究中,胃癌患者手术切除淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化率在 Lauren's 分型、组织学分级、肿瘤最大径、远处转移、TNM 分期和手术方式中的差异有统计学意义($P < 0.05$)。弥漫型、G3~G4、肿瘤最大径大于或等于 5 cm、有远处转移、TNM 分期晚和姑息手术患者淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化率显著高于肠型、G1~G2 级、肿瘤最大径小于 5 cm、无远处转移、TNM 分期早和根治手术患者($P < 0.05$)。

综上所述,Lauren's 分型、组织学分级、肿瘤最大径、淋巴结转移、远处转移和 TNM 分期均是胃癌的预后影响因素,所以手术切除后淋巴结 RUNX3 基因启动子甲基化可作为胃癌病情及预后评估的标志物,与手术后切除的肿瘤一样均可作为胃癌的病情及预后提供客观证据。

参考文献

- [1] Chuang LS, Lai SK, Murata-Hori M, et al. RUNX3 inter-actome reveals novel centrosomal targeting of RUNX family of transcription factors [J]. Cell Cycle, 2012, 11 (10): 1938-1947.
- [2] 沈建军, 胡世莲, 沈干, 等. RUNX3、DAPK 基因甲基化及其蛋白表达与胃癌病情的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(5): 613-617.
- [3] 许洪卫, 余燕民, 蔡诚忠, 等. 淋巴结 Runx3 基因表达对胃癌患者生存的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(3): 364-366.
- [4] Peters I, Eggers H, Atschekzei F, et al. GATA5 CpG island methylation in renal cell Cancer; a potential biomarker for metastasis and disease progression [J]. BJU Int, 2012, 110(2): 144-152.
- [5] Osaki M, Moriyama M, Adachi K, et al. Expression of RUNX3 protein in human gastric mucosa, intestinal metaplasia and carcinoma [J]. Eur J Clin Invest, 2004, 34(9): 605-612.
- [6] 陈晓宇, 朱兴国, 陈晓蓉, 等. RUNX3 蛋白在不同分化胃癌、直肠癌组织中的表达变化 [J]. 解剖学杂志, 2012, 35 (1): 27-30.
- [7] Li WQ, Pan KF, Zhang Y, et al. RUNX3 methylation and expression associated with advanced precancerous gastric lesions in a Chinese population [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(3): 406-410.
- [8] Fan XY, Hu XL, Han TM, et al. Association between RUNX3 promoter methylation and gastric Cancer; a meta-analysis [J]. BMC Gastroenterol, 2011, 11: 92.