

骨肉瘤外周血 Runx3 基因启动子甲基化检测及临床意义

刘 融¹, 陈令斌², 张 勇¹(武汉市普仁医院:1. 骨二科;2. 骨一科 430081)

【摘要】 目的 研究骨肉瘤患者外周血 Runt 相关转录因子 3(Runx3)基因启动子甲基化及临床意义。**方法** 选择骨肉瘤患者及健康人作为研究对象,采用甲基化特异性聚合酶链反应(MS-PCR)检测两组研究对象外周血 Runx3 基因启动子甲基化并比较其差异,分析骨肉瘤患者 Runx3 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系。**结果** 骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子甲基化率(57.1%)显著高于健康人(2.0%),差异有统计学意义($P<0.05$)。在不同性别、年龄、肿瘤部位和病理类型的骨肉瘤患者之间,外周血 Runx3 基因启动子甲基化率的差异无统计学意义($P>0.05$),在不同 KPS 评分、肿瘤最大径、病理性骨折、组织学分级和 Enneking 分期的骨肉瘤患者之间,差异均有统计学意义($P<0.05$)。KPS 评分低于 70 分、肿瘤最大径大于或等于 10 cm、有病理性骨折、组织学分级 G3+G4 及 Enneking 分期晚的骨肉瘤患者,其 Runx3 基因启动子甲基化率显著高于 KPS 评分大于或等于 70 分、肿瘤最大径小于 10 cm、无病理性骨折、组织学分级 G1+G2 及 Enneking 分期早的骨肉瘤患者。**结论** 骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子呈高甲基化状态,与 KPS 评分、肿瘤最大径、病理性骨折、组织学分级和 Enneking 分期密切相关,可用于评估骨肉瘤患者病情及预后。

【关键词】 骨肉瘤; Runx3; 启动子; 甲基化; 临床意义
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.07.044 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)07-0978-02

骨肉瘤的发病机制尚未完全明确,可能与环境及遗传因素密切相关,遗传因素包括基因突变及表观遗传学改变,其中甲基化异常是表观遗传学最常见的病因,越来越多的基因甲基化被发现参与骨肉瘤的发生和发展^[1-2]。Runt 相关转录因子 3(Runx3)为新近发现的抑癌基因,其甲基化表达失活与胃癌等肿瘤的发病机制紧密相关^[3],但在骨肉瘤中报道较少。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应(MS-PCR)检测骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子甲基化,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1 月至 2014 年 6 月诊治的骨肉瘤患者为研究对象,纳入标准:(1)初次就诊,既往未行手术、放疗或化疗等治疗;(2)均经 X 射线、CT、磁共振成像(MRI)和病

理组织学检查确诊;(3)排除合并其他肿瘤及多发患者。本组骨肉瘤患者共纳入 70 例,包括男 43 例,女 27 例;平均(24.1±5.8)岁。另选择门诊行健康体检的健康者 50 例为对照,其中男 30 例,女 20 例;平均(24.5±6.1)岁。两组研究对象在性别组成和年龄方面差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 Runx3 基因启动子甲基化检测 骨肉瘤患者和健康者空腹 8 h 后取静脉血检测 Runx3 基因启动子甲基化,检测方法为 MS-PCR。采用 MethPrimer([http://www. urogene. org/cgi-bin/methprimer/methprimer. cgi](http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi))设计 MS-PCR 引物,见表 1,反应体系为 25 μL,循环条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 1 min,63 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 40 s,30 个循环后最后一轮 72 ℃延伸 10 min。MS-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后检测。

表 1 Runx3 基因启动子甲基化 MS-PCR 检测引物序列

引物	甲基化引物(5'~3')	未甲基化引物(5'~3')
正向	GGG TAG AGA TTT TTA AGG GGA TGC	GGG TAG AGA TTT TTA AGG GGA TGT GT
反向	AAA TAA CAT TAC CAA CAC TCA CGC C	AAA ATA ACA TTA CCA ACA CTC ACA CC

1.3 统计学处理 采用 SigmaPlot12.0 进行统计学分析。不同临床病理因素中 Runx3 基因启动子甲基化率的差异采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Runx3 基因启动子甲基化对比 70 例骨肉瘤患者中有 40 例外周血基因启动子检测到甲基化,Runx3 基因启动子甲基化率为 57.1%;50 例健康者中有 1 例外周血基因启动子检测到甲基化,Runx3 基因启动子甲基化率为 2.0%,骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子甲基化率显著高于健康者($\chi^2=37.016, P<0.05$)。

2.2 Runx3 基因启动子甲基化与临床病理因素的关系 在不同性别、年龄、肿瘤部位和病理类型的骨肉瘤患者之间,外周血 Runx3 基因启动子甲基化率的差异无统计学意义($P>0.05$),在不同 KPS 评分、肿瘤最大径、病理性骨折、组织学分级和 Enneking 分期的骨肉瘤患者之间,差异均有统计学意义($P<$

0.05)。KPS 评分低于 70 分、肿瘤最大径大于或等于 10 cm、有病理性骨折、组织学分级 G3+G4 及 Enneking 分期晚的骨肉瘤患者 Runx3 基因启动子甲基化率显著高于 KPS 评分大于或等于 70 分、肿瘤最大径小于 10 cm、无病理性骨折、组织学分级 G1+G2 及 Enneking 分期早的骨肉瘤患者,见表 2。

表 2 不同临床病理因素骨肉瘤患者中 Runx3 基因启动子甲基化率比较(n)

临床病理因素		n	Runx3 基因启动子甲基化		χ^2	P
			甲基化	未甲基化		
性别	男	43	24	19	0.001	0.926
	女	27	16	11		
年龄	<24 岁	32	18	14	0.011	0.917
	≥24 岁	38	22	16		
KPS 评分	<70 分	15	13	2	5.347	0.021

续表 2 不同临床病理因素骨肉瘤患者中 Runx3 基因
启动子甲基化率比较(*n*)

临床病理因素	<i>n</i>	Runx3 基因		χ^2	<i>P</i>
		启动子甲基化			
		甲基化	未甲基化		
肿瘤部位	≥70 分	55	27	28	0.030 0.862
	上肢	30	18	12	
	下肢	40	22	18	
肿瘤最大径	<10 cm	25	9	16	5.819 0.016
	≥10 cm	45	31	14	
病理性骨折	有	20	17	3	7.351 0.007
	无	50	23	27	
病理类型	成骨型	18	11	7	0.203 0.904
	成软骨型	28	16	12	
	成纤维型	24	13	11	
组织学分级	G1+G2	31	12	19	6.428 0.011
	G3+G4	39	28	11	
Enneking 分期	I期	20	4	16	21.509 <0.001
	II期	28	16	12	
	III期	22	20	2	

3 讨 论

骨肉瘤的发病机制尚未完全明确,主要与基因突变及表观遗传学等遗传因素有关,表观遗传学因素主要包括甲基化,越来越多的基因甲基化表达沉默被证实参与了肿瘤的发生和发展^[4]。甲基化不依赖于 DNA 碱基突变,自身结构或结合甲基结合蛋白可调控基因表达,为基因转录前调控最常见的作用机制^[5],在越来越多的肿瘤中检测到甲基化改变,在肿瘤的早期诊断、病情及预后评估中扮演重要角色^[6]。Runx3 基因是新近发现的抑癌基因,主要通过调控 TGF-β 信号传导通路而发挥调控细胞周期的功能,其表达水平下降导致正常细胞失去调控而发生癌变,在越来越多的肿瘤中可检测到 Runx3 基因的甲基化表达失活状态^[7]。研究表明,与 Runx3 基因同家族的 Runx2 基因在骨肉瘤组织中 mRNA 表达低于健康人^[8],进一步研究发现其处于高甲基化沉默状态,基于 Runx3 基因与 Runx2 基因功能类似,推测 Runx3 基因启动子甲基化可能与骨肉瘤的发病机制密切相关。本研究中骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子甲基化率(57.1%)显著高于健康者(2.0%),差异有统计学意义($P<0.05$),证实了 Runx3 基因启动子甲基化与骨肉瘤发病机制的相关性。

在消化系统和生殖系统肿瘤中可检测到 Runx3 基因的高甲基化状态,进一步发现其甲基化水平与临床病理因素相关,可作为其诊断、病情及预后评估的标志物,较蛋白质标志物具有更高的灵敏度及特异性^[9],基于这些证据,推测 Runx3 基因启动子甲基化可能与骨肉瘤的病情及预后密切相关。在不同性别、年龄、肿瘤部位和病理类型的骨肉瘤患者之间,外周血 Runx3 基因启动子甲基化率的差异无统计学意义($P>0.05$);在不同 KPS 评分、肿瘤最大径、病理性骨折、组织学分级和 Enneking 分期的骨肉瘤患者之间,差异均有统计学意义($P<0.05$)。KPS 评分低于 70 分、肿瘤最大径大于或等于 10 cm、有病理性骨折、组织学分级 G3+G4 及 Enneking 分期晚的骨肉瘤患者 Runx3 基因启动子甲基化率显著高于 KPS 评分大于或等于 70 分、肿瘤最大径小于 10 cm、无病理性骨折、组织学分级 G1+G2 及 Enneking 分期早的骨肉瘤患者。这些证据表明,Runx3 基因启动子甲基化与其他肿瘤类似,在骨肉瘤的病

情及预后评估中扮演重要角色。本研究仅检测骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子甲基化,推测骨肉瘤组织中可能存在 Runx3 基因启动子甲基化状态,与手术切除标本对比,外周血标本可能更具有前瞻性的优点,在临床应用中更具有价值。

吴同申等^[9]采用流式细胞仪检测了骨肉瘤中 Runx3 蛋白质的表达水平,发现 Runx3 在骨肉瘤中的表达水平明显低于良性肿瘤,骨肉瘤中 Runx3 表达水平在不同软组织浸润及不同 Enneking 分期的比较中有显著差异,说明 Runx3 蛋白质检测对判断预后有一定价值。进一步研究发现,除 Hs888T 细胞系的 Runx3 基因的启动子区域 CpG 岛可发生广泛甲基化外, MG63、G292、Hs919T、saos2、Hs860T、Hs707A、HOS 等细胞系的 Runx3 启动子区域 CpG 岛仅发生部分甲基化^[10];实时荧光定量 PCR 显示, MG63、saos2、G292 等骨肉瘤细胞系可见明显的 Runx3 表达, Hs919T、Hs707A、HOS 等骨肉瘤细胞系也有不同程度的 Runx3 表达,实验结果表明在骨肉瘤细胞系中未见明显的 Runx3 表达异常,在 Runx3 启动子区域 CpG 岛没有发生广泛甲基化等表观遗传学异常改变,但本研究中骨肉瘤患者外周血 Runx3 基因启动子甲基化率显著高于健康者,证实了 Runx3 基因启动子甲基化与骨肉瘤发病机制的相关性,与前述研究结论相反,可能与细胞和人体表达不一致有关,有待于进一步研究证实。

参考文献

[1] 章振华. 骨肉瘤蜡块组织中 RASSF1A, DAPK 基因启动子区域的甲基化研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.

[2] 罗一. PTEN 甲基化在骨肉瘤发生中的作用及 5-Aza-CdR 去甲基化对其 MG-63 细胞生物学行为的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2013.

[3] 杨国祥, 杜寒松, 张万里, 等. 淋巴结 RUNX3 基因甲基化与胃癌临床病理因素的关系研究[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(6): 801-802.

[4] 侯贝贝, 王妍, 张娟, 等. 软骨肉瘤 WIF-1 基因甲基化及 Wnt-5a 蛋白表达的临床病理意义[J]. 山东大学学报: 医学版, 2013, 51(2): 70-74.

[5] 赵丹, 郑威强, 张万里. 外周血 RUNX3 基因甲基化在胃癌中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(18): 2451-2453.

[6] 李琦, 胡昌华, 张婧. 宫颈脱落细胞 RASSF1A 基因甲基化在宫颈癌中的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(12): 1518-1519.

[7] 唐国华, 孙少卫, 贺修胜. Runx3 基因 CpG 岛甲基化与胃癌发生的关系[J]. 中华病理学杂志, 2012, 41(5): 314-319.

[8] 张洁林, 闵大六, 姚阳. Runx2 基因与骨肉瘤研究进展[J]. 癌症进展, 2011, 9(3): 274-278.

[9] 吴同申, 彭圣智, 孟彦. 流式细胞术检测骨肉瘤中 RUNX3 和 β-catenin 的表达及意义[J]. 中国现代医生, 2013, 50(32): 4-5.

[10] 张海元, 刘娟. 骨肉瘤细胞系中 Runx3 及 Runx2 基因表达分析[J]. 长江大学学报 自然科学版: 医学卷, 2008, 4(4): 325-327.