

# 全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义

王春玲, 姜相君

王春玲, 姜相君, 青岛市市立医院消化科 山东省青岛市 266011

作者贡献分布: 王春玲与姜相君对此文所作贡献均等; 此课题由姜相君与王春玲设计; 研究过程由姜相君与王春玲操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由姜相君提供; 数据分析由王春玲完成; 本论文写作由王春玲与姜相君完成。

通讯作者: 姜相君, 主任医师, 266011, 山东省青岛市, 青岛市市立医院消化科. drxj@163.com

电话: 0532-82789581

收稿日期: 2009-10-18 修回日期: 2009-11-17

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

## Significance of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma

Chun-Ling Wang, Xiang-Jun Jiang

Chun-Ling Wang, Xiang-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiang-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China. drxj@163.com

Received: 2009-10-18 Revised: 2009-11-17

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the significance of human runt-related transcription factor 3 (RUNX3) promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma.

**METHODS:** Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of RUNX3 promoter in DNA prepared from carcinoma tissue, adjacent tissue and whole blood samples taken from 80 gastric cancer patients.

**RESULTS:** The detection rates of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from gastric carcinoma tissue, adjacent tissue and whole blood samples were 45%, 0% and 40%, respectively. No significant difference was noted in the detection rate of RUNX3 promoter methylation between gastric carcinoma tissue and whole blood samples ( $P > 0.05$ ). The RUNX3 promoter

methylation status in gastric carcinoma was correlated with tumor differentiation and lymph node metastasis, but not with age, gender and tumor site.

**CONCLUSION:** RUNX3 promoter methylation status in DNA prepared from whole blood is closely associated with the oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma and has important significance for early diagnosis of gastric carcinoma.

**Key Words:** Whole blood; Gastric carcinoma; RUNX3 gene; DNA methylation; Methylation-specific PCR

Wang CL, Jiang XJ. Significance of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3653-3656

### 摘要

**目的:** 探讨全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义。

**方法:** 采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)法, 检测80例胃癌患者的癌组织及其对应的癌旁组织及全血中RUNX3启动子甲基化情况。

**结果:** 胃癌组织标本中RUNX3基因启动子甲基化率为45%, 癌旁组织中甲基化率为0%, 全血中甲基化率为40%。胃癌组织、全血中RUNX3基因启动子甲基化, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。全血标本中RUNX3启动子甲基化表达情况与分化程度、是否有淋巴结转移密切相关, 与年龄、性别、肿瘤部位浸润深度无关。

**结论:** 全血RUNX3启动子区甲基化对胃癌早期诊断有重要指导意义, 与胃癌的发生、发展密切相关。

**关键词:** 全血; 胃癌; RUNX3; DNA甲基化; 甲基化特异性聚合酶链反应

王春玲, 姜相君. 全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的

### 背景资料

Runx基因是近年来发现的一种新型抑癌基因, 与人类多种肿瘤的发生、发展有着极密切的关系。2002年日本学者Li *et al* 首例发现RUNX3还有调节胃上皮细胞的增生与凋亡平衡的作用, 说明RUNX3的失活与胃癌的发生发展密切相关, 可能是胃癌发生发展的关键性抑癌基因。

### 同行评议者

王晓艳, 副教授, 中南大学湘雅三医院消化内科

**研究前沿**  
在多种肿瘤中  
RUNX3甲基化成  
为最近几年研究  
的热点,采取简单  
易行的检测手段  
检测其甲基化成  
为进一步研究需  
要解决的问题。

意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3653-3656  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3653.asp>

## 0 引言

胃癌约占胃恶性肿瘤的95%以上,在癌症死亡率中居第2位<sup>[1]</sup>,严重威胁人类健康. 众多研究发现,在胃癌发生的分子机制中,遗传和表遗传机制均起着重要的作用. DNA甲基化是研究最多也最深入的一种表遗传学表达机制. RUNX3作为一个新发现的抑癌基因,作为转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号作用的靶点对胃癌细胞的生长有明显的抑制作用<sup>[2]</sup>,而DNA异常甲基化则是RUNX3基因在胃癌中失活的重要途径. 我们采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)方法检测胃癌患者癌组织、其对应癌旁组织及全血RUNX3启动子甲基化的情况,探讨全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2008-11/2009-08青岛市立医院普外科胃癌手术切除标本80例,包括胃癌组织及其对应的癌旁组织. 患者年龄为35-79(中位年龄56)岁,男44例,女36例. 术前取患者外周血5 mL,经EDTA抗凝. 胃癌组织取自肿块中央非坏死部分,癌旁组织取自距离肿块5 cm以上的正常胃黏膜组织. 患者术前未经辅助放疗、化疗及免疫治疗. 所有标本均经病理证实. 正常对照标本取自无消化系统疾病及任意肿瘤的正常青年人外周血,EDTA抗凝. 所有标本于-70℃冰箱保存. EZ DNA Methylation-Gold kit<sup>TM</sup>试剂盒购自北京天漠技术开发有限公司,甲基化转移酶Sss I为美国New England公司产品,引物委托大连宝生物公司合成. PCR Taq Mix酶及Marker购自东盛生物科技有限公司.

**1.2 方法** 采用酚-氯仿抽提,冰乙醇沉淀方法回收提纯DNA, -20℃保存. 紫外分光光度计测其纯度. 按照EZ DNA Methylation-Gold kit<sup>TM</sup>试剂盒说明进行DNA甲基化修饰. DNA甲基化、非甲基化引物参照文献<sup>[2]</sup>合成,扩增片段212 bp. 5M: 5'-TTACGAGGGGCGGTCTCGTACGCGGG-3', 3M: 5'-AAAACGACCGACGCGAACGCC-TCC-3'; 非5U: 5'-TTATGAGGGGTGGTTGTATGTGGG-3', 3U: 5'-AAAACAACCAACACAAACA CCTCC-3'. PCR反应体系为25  $\mu$ L,包括Taq Mix酶12.5  $\mu$ L,上、下游引物各1  $\mu$ L,模板(以上修

饰的DNA)2  $\mu$ L,双蒸水8.5  $\mu$ L. 循环参数为:甲基化反应条件: 95℃预变性3 min, 95℃变性30 s, 64.5℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35个循环,最后延伸5 min; 非甲基化反应条件: 95℃预变性3 min, 95℃变性30 s, 63℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35个循环,最后延伸5 min. 2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外光灯检测结果(M为甲基化引物, U为非甲基化引物). 每批标本均同时扩增甲基化酶Sss I修饰和未修饰的提取的正常青年人外周血DNA作为甲基化阳性和非甲基化阳性对照. 阴性对照为双蒸水. 分别只有M引物和U引物得到预期大小的扩增片段,阴性对照未得到任何产物,提示实验技术及所用引物和试剂正确,实验结果可信.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件对数据进行统计学处理,两样本率的比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 RUNX3启动子甲基化在胃癌、其对应癌旁组织及全血中的表达** RUNX3在胃癌组织中的甲基化率为45%(36/80),对应癌旁组织中的甲基化率为0%(0/80),全血中的甲基化率为40%. 胃癌组织及全血中的甲基化表达,两者差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表1).

**2.2 胃癌组织、全血RUNX3启动子甲基化表达与临床及病理特征的关系** 胃癌组织、全血中RUNX3启动子甲基化表达与患者性别、年龄、肿瘤部位之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表2). 有淋巴转移组的RUNX3启动子甲基化表达高于无转移组( $P < 0.05$ ,表2). 分化程度高的实验组RUNX3启动子甲基化表达低于分化程度低的实验组( $P < 0.05$ ,表2).

**2.3 RUNX3甲基化在胃癌组织及其对应癌旁组织、全血中的表达MSP检测结果** 在电泳图中,同一标本胃癌组织检测到甲基化和非甲基化两种结果,可能与取材有关;对应癌旁组织未检测到甲基化,全血中检测到甲基化(图1).

## 3 讨论

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶DNMTs(DNA methyltransferases)的介导下,二核苷酸中胞嘧啶(C)的第5位C原子上的H被S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基取代,使之变成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m5C)的化学修饰过程. DNA基因组异常甲基化在肿瘤发生、发展中起重要作用.

表 1 RUNX3启动子甲基化在胃癌组织及其对应全血中的表达

组织	甲基化表达	非甲基化表达	$\chi^2$ 值	P值
癌组织	36	44	14.48	>0.05
全血	32	48		

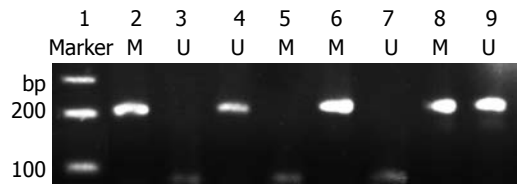


图 1 RUNX3甲基化在胃癌组织及其对应癌旁组织、全血中的表达MSP检测结果. 1: Marker; 2: 甲基化阳性对照; 3: 非甲基化阳性对照; 4-5: 癌旁组织; 6-7: 全血; 8-9: 癌组织.

RUNX3基因是Levanon *et al*于1994年发现的,最初被命名为急性髓性白血病2基因<sup>[3]</sup>,以后又被称作多瘤病毒强化因子结合蛋白2基因、核心结合因子 $\alpha$ 3基因<sup>[4-5]</sup>. RUNX3基因家族是一类具有RUNX保守域的转录因子家族,在哺乳动物中该家族包括基因runx1、runx2和runx3<sup>[6]</sup>. runx1是人类白血病常见的突变基因,是闭锁颅骨发育异常的有关基因<sup>[6-7]</sup>. 已发现RUNX3在神经发生过程中发挥关键性作用. 2002年日本学者Li *et al*首例发现RUNX3有调节胃上皮细胞的增生与凋亡平衡的作用. 人类RUNX3位于染色体1p36.1,是runx家族中最小也是迄今对其研究最少的基因,全长67 kb,含有6个外显子和p1和p2 2个启动子,2个启动子富含GC, p2启动子GC含量达到64%,易发生甲基化变化.

Li *et al*<sup>[2]</sup>采用PCR-SSCP方法检测119例胃癌组织中RUNX3的基因编码区域,结果发现仅1例(1/119)胃癌组织存在RUNX3突变. Li *et al*发现联合应用DNA甲基化转移酶抑制剂5-氮唑2-脱氧胞苷、组蛋白去乙酰酶抑制剂曲古抑菌素可以使RUNX3失表达的胃癌细胞系恢复表达活性,进一步证实了是RUNX3基因启动子区甲基化导致了RUNX3基因的失表达,而不是基因本身的突变和基因杂合性缺失所致. 表明RUNX3基因在胃癌中很少发生突变, RUNX3基因启动子区异常甲基化是主要失活机制.

Lee *et al*<sup>[8]</sup>检测胃癌患者肿瘤和血液中基因(DAP2Kinase、E2cadherin、GSTP1、p15、p16)启动子甲基化情况,发现血液中细胞异常甲基化能如实反映肿瘤中基因异常甲基化情况. 由此可见,基因启动子甲基化对于胃癌的早期诊

表 2 胃癌组织及其对应全血RUNX3启动子甲基化表达与临床及病理特征的关系

临床因素	n	癌组织			全血		
		甲基化(n)	$\chi^2$ 值	P值	甲基化(n)	$\chi^2$ 值	P值
性别							
男	44	24	3.60	>0.05	22	0.57	>0.05
女	36	12			10		
年龄(岁)							
>50	58	24	1.10	>0.05	24	0.09	>0.05
50	22	12			8		
淋巴结转移							
有	54	26	10.20	<0.05	27	6.92	<0.05
无	26	10			5		
浸润深度							
T1-T2	31	11	1.85	>0.05	8	4.25	>0.05
T3-T4	49	25			24		
肿瘤部位							
胃窦	48	24	1.24	>0.05	23	3.24	>0.05
胃体	16	6			5		
贲门	16	6			4		
分化程度							
高中	38	10	10.10	<0.05	7	6.40	<0.05
低	42	26			25		

断、高危人群的检测、肿瘤风险的评估具有重要意义. 本研究胃癌组织中有36例发生甲基化,甲基化率为45%,对应全血中有32例,甲基化率为40%,癌旁组织中未检测到发生甲基化. 全血中甲基化的检出率为88.9%. 胃癌组织中与全血中甲基化率差异,可能是肿瘤细胞尚未脱落入血或是末梢血液肿瘤细胞数量太少,未达到实验检测水平. 但在癌组织中未检测出甲基化的在全血中也未检测出,说明全血中甲基化特异性为100%. 因甲基化发生在胃癌的早期,为提高检出率,对于高危人群可采取同一患者同时检测多份血样或是短时间内复查血样.

同时,分析胃癌组织及全血中甲基化情况与临床及病理特征的关系,显示甲基化率与年龄、性别、肿瘤发生部位及肿瘤浸润深度无关,与肿瘤的分化程度、有无淋巴结转移相关. 提示RUNX3基因启动子甲基化情况可用于判断肿瘤的转移情况,预测胃癌的手术、放化疗疗效等.

胃癌的早期诊断对于改善预后至关重要,胃癌相关基因启动子异常甲基化是细胞癌变过程中的一个早期事件、频发事件,且经研究RUNX3对胃癌的特异性高于其他胃癌相关基因,所以RUNX3有可能成为胃癌早期诊断的特异性基因.

**名词解释**  
DNA甲基化:指在DNA甲基转移酶(DNMTs)的介导下,二核苷酸中胞嘧啶(C)的第5位C原子上的H被S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基取代,使之变成5-甲基胞嘧啶(m5C)的化学修饰过程. 人类RUNX3位于染色体1p36.1,是runx家族中最小也是迄今对其研究最少的基因,全长67 kb,含有6个外显子和p1、p2两个启动子,两个启动子富含GC, p2启动子GC含量达到64%,易发生甲基化变化.

同行评价  
本研究选题较好,  
设计合理, 结果可  
信, 有较好的参考  
价值。

由于DNA甲基化异常不仅可在手术标本中检测到, 还能从各种体液中检测到, 如外周血清/血浆及唾液、痰等, 给检测带来极大便利。基因的异常甲基化是可逆的过程, 通过甲基化酶抑制剂使沉默的基因重新表达, 成为肿瘤治疗的一种新手段。

#### 4 参考文献

- 1 陆再英, 钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 396-401
- 2 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 3 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y,

Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232

- 4 Bae SC, Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* 2004; 23: 4336-4340
- 5 Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 1999; 4: 685-696
- 6 Nam S, Jin YH, Li QL, Lee KY, Jeong GB, Ito Y, Lee J, Bae SC. Expression pattern, regulation, and biological role of runt domain transcription factor, run, in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 547-554
- 7 Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 43-47
- 8 Lee TL, Leung WK, Chan MW, Ng EK, Tong JH, Lo KW, Chung SC, Sung JJ, To KF. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1761-1766

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》名词术语标准

**本刊讯** 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD<sub>50</sub>, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(科学编辑: 李军亮 2009-12-18)