

RUNX3 基因甲基化与鼻咽癌的临床生物学行为关系

倪海峰 李 勇 黄光武 施紫光

摘 要 **目的** 探讨 RUNX3 基因甲基化与鼻咽癌临床生物学行为关系。**方法** 运用甲基化特异性 PCR 对 54 例鼻咽癌组织、18 例慢性鼻咽炎症组织和 20 例正常鼻咽上皮组织的 RUNX3 基因启动子区甲基化状态进行检测。**结果** RUNX3 基因在鼻咽癌组织中启动子甲基化频率为 59% (32/54);而在慢性鼻咽炎症组织和正常鼻咽上皮组织中均未检测到 RUNX3 基因启动子甲基化。RUNX3 基因启动子区甲基化与患者临床生物学行为无明显相关关系。**结论** RUNX3 基因甲基化具有肿瘤特异性, RUNX3 基因甲基化参与鼻咽癌发生发展,但目前尚不能作为判断鼻咽癌临床预后预测指标。

关键词 RUNX3 鼻咽癌 甲基化

Relationship Between Methylation of RUNX3 Gene and Biological Behavior of Nasopharyngeal Carcinoma. Ni Haifeng, Li Yong, Huang Guangwu, Shi Ziguang. Department of Otolaryngology, Hangzhou First People's Hospital, Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To assess the relations between methylation of RUNX3 gene and the biological behavior of nasopharyngeal carcinoma. **Methods** The methylation - specific PCR (MSP) was used to detect methylation level of RUNX3 tumor suppressor gene in 54 cases of nasopharyngeal carcinoma and 18 cases of chronic nasopharyngitis and 20 cases of normal nasopharyngeal epithelia tissues. **Results** The methylation expression rates of RUNX3 gene in nasopharyngeal carcinoma tissues were 59% (32/54), while there were no methylation in 18 cases of chronic nasopharyngitis and 20 cases of normal nasopharyngeal epithelia. It has no close correlation between methylation of RUNX3 gene and the biological behavior of nasopharyngeal carcinoma. **Conclusion** Methylation of RUNX3 gene has high specificity in distinguishing cancers from normal tissues. It is closely associated with the tumorigenesis and development of nasopharyngeal carcinoma, but it may not be used as a parameter in evaluating the clinical prognosis of nasopharyngeal carcinoma.

Key words Human runt - related transcription factor 3; Nasopharyngeal carcinoma; Methylation

TGF- β 信号转导通路的紊乱与多种肿瘤的发生密切相关, RUNX3 为 TGF- β 信号转导通路的重要组成成员,对细胞的分化、周期调控、凋亡和恶性转化起负性调节作用,研究报道包括鼻咽癌在内的多种肿瘤中发现 RUNX3 基因表达下调,而近年来研究发现启动子高甲基化是 RUNX3 基因失活的重要机制, RUNX3 基因甲基化与肿瘤发生关系密切,本实验通过分析 RUNX3 基因启动子甲基化与鼻咽癌临床生物学行为关系,探讨其在预测鼻咽癌临床预后中的作用。

材料与方 法

1. 材料:本实验所有组织标本来源于广西医科大学第一附属医院和杭州市第一人民医院自 2006~2008 年初次确诊的患者,20 例正常鼻咽上皮组织选用组织来源相同的鼻中隔矫正手术患者的鼻腔后上段近鼻咽部组织替代,取 1 例健康

青年外周血淋巴细胞做阳性对照用。54 例鼻咽癌标本中男性 39 例,女性 15 例;年龄 20~78 岁,平均年龄 45.6 岁。病理诊断(参照 1991 年 WHO 分型):低分化鳞癌 48 例;未分化癌 6 例。临床 TNM 分期(参照 1992 年福州分期):TNM 分期:Ⅰ期 4 例,Ⅱ期 15 例,Ⅲ期 23 例,Ⅳa 期 12 例;淋巴结转移 36 例;咽旁浸润 32 例,颅内转移 18 例;远处转移 0 例。

2. 方法:(1)DNA 的提取:采用 DNA 提取试剂盒(大连宝生物工程公司)分别从鼻咽癌组织、慢性鼻咽炎症组织、正常鼻咽上皮组织及外周血白细胞中提取 DNA。(2)外周血 DNA 的 CpG 甲基化酶修饰:按甲基化酶试剂盒(NEB 公司产品)说明书操作,具体实验步骤参照文献[1]。完后再进行下一步 DNA 的亚硫酸氢盐修饰,作为甲基化的阳性对照模板。(3)DNA 的亚硫酸氢盐修饰:将鼻咽癌组织、慢性鼻咽炎症组织、正常鼻咽上皮组织及外周血淋巴细胞中提取 DNA 及经 CpG 甲基化酶处理的 DNA 分别做亚硫酸氢盐修饰(所需试剂 Hydroquinone、低熔点琼脂糖、矿物油、Sodium metabisulphite 等为美国 Sigma 公司产品),其详细的实验步骤参照文献[2]。外周血淋巴细胞中提取 DNA 经亚硫酸氢盐修饰后用于非甲基化阳性对照模板。(4)甲基化特异性 PCR:本实验引物序列来源于 <http://genome.ucsc.edu/>, RUNX3 甲基化

作者单位:310006 南京医科大学附属杭州市第一人民医院耳鼻喉科(倪海峰、李勇、施紫光);广西医科大学第一附属医院耳鼻喉头颈外科(黄光武)

特异性引物上游引物序列为 5' - TTACGAGGGGCGGTGCTG-TACGCGGG - 3', 下游引物为 5' - AAAACGAC-CGACGCGAAGCGCTCC - 3', 扩增片段为 220 bp。RUNX3 非甲基化特异性引物上游序列为 5' - TTATGAGGGGTGGTTG-TATGTGGG - 3', 下游引物为 5' - AAAACAACCAACACAAA-CAACTCC - 3', 扩增片段为 220bp, 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。甲基化特异性 PCR 程序: 95℃ 预变性 3min, 94℃ 30s, 59℃ 20s, 72℃ 20s 37 个循环, 最后延伸 72℃ 5min。非甲基化特异性 PCR 程序: 95℃ 预变性 3min; 94℃ 30s, 57℃ 20s, 72℃ 20s, 37 个循环; 最后延伸 72℃ 5min。2% 的琼脂糖凝胶电泳分析。正常外周血淋巴细胞 DNA 做非甲基化阳性对照, CpG 甲基化酶修饰后正常外周血淋巴细胞 DNA 模板做甲基化阳性对照, 水做空白对照。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 统计软件, 以 χ^2 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. RUNX3 基因的甲基化状态: 阳性(甲基化)标本: 用甲基化和非甲基化引物扩增均有特异性扩增产物; 阴性(非甲基化)标本: 仅有非甲基化引物扩增的产物。54 例鼻咽癌组织中 RUNX3 甲基化频率为 59% (32/54), 而慢性鼻咽炎症组织、正常鼻咽上皮组织均未检测到 RUNX3 基因甲基化; 3 组对照比较有统计学差异 ($P < 0.01$) (图 1)。

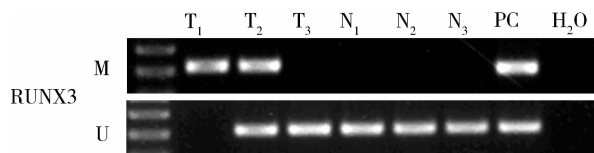


图 1 RUNX3 基因的甲基化状态

M. 甲基化特异性 PCR; U. 非甲基化特异性 PCR; T₁、T₂、T₃. 鼻咽癌组织; N₁、N₂. 慢性鼻咽炎症组织; N₃. 正常鼻咽上皮组织; PC (positive control). 阳性对照; H₂O. 阴性对照; T₁、T₂. 甲基化标本; T₃、N₁、N₂、N₃. 非甲基化标本

2. RUNX3 基因甲基化与临床生物学行为关系: RUNX3 甲基化与鼻咽癌的生物行为均无明显相关 ($P > 0.05$) (表 1)。

讨 论

越来越多研究倾向于认为鼻咽癌是一种表观遗传学疾病。鼻咽癌表观遗传学改变, 尤其是甲基化改变, 涉及包括细胞周期调控、DNA 修复、细胞凋亡及肿瘤的浸润转移的全过程^[3]。

RUNX3 基因位于人染色体 1p36.1, 全长约 67 kb, 含有 P1、P2 两个启动子, 6 个外显子和 1290bp 的开放阅读框, RUNX3 基因的转录主要由启动子 P2 操纵。RUNX3 是 TGF- β 信号通路下游的一个重要

表 1 鼻咽癌中 RUNX3 基因甲基化与临床生物学行为关系

临床病理因素	n	RUNX3 甲基化[n(%)]	P
咽旁浸润			
有	32	19 (59.38)	>0.05
无	22	13 (59.09)	
颅内转移			
有	15	11 (73.33)	>0.05
无	39	21 (53.85)	
T 分期			
T ₁ ~ T ₂	35	19 (54.29)	>0.05
T ₃ ~ T ₄	19	13 (68.42)	
N 分期			
N ₀	18	9 (50.00)	>0.05
N ₁ ~ N ₃	36	23 (63.89)	
TNM 分期			
I、II	19	10 (52.63)	>0.05
III、IV	35	22 (62.86)	
病理类型			
低分化鳞癌	48	27 (56.25)	>0.05
未分化癌	6	5 (83.33)	

转录调节因子, 引导 TGF- β /Smad 复合物从胞质转入核内特定靶位点, 并促使 TGF- β /Smad 复合物和靶位点结合, 共同激活靶基因转录, 指导细胞分化、细胞周期调控、细胞凋亡和恶性转化, 参与 TGF- β 对上皮细胞生长负性调控, 在 TGF- β 信号途径中发挥关键作用^[4]。

近年来研究发现胃癌、腺样囊性癌、肺癌、食管癌等恶性肿瘤中存在 RUNX3 启动子高甲基化, 且异常甲基化是 RUNX3 基因失活的重要机制^[4~6]。而有关鼻咽癌中 RUNX3 基因甲基化及转录调节机制研究鲜有报道。张勇等^[7]检测 50 例鼻咽组织发现 1 例 RUNX3 基因的甲基化, 20 例慢性鼻咽炎症组织中未检测到 RUNX3 基因甲基化, 并推测鼻咽组织中 RUNX3 表达下调与甲基化无关。Tan 等^[8]研究发现在 19 例鼻咽组织中没有检测到 RUNX3 基因甲基化。章华等^[9]研究发现鼻咽癌组织中 RUNX3 蛋白表达下调, 但下调机制未做研究。

然而本实验研究结果发现 RUNX3 基因在鼻咽癌组织中启动子甲基化频率为 59% (32/54); 在慢性鼻咽炎症组织和正常鼻咽上皮组织中均未检测到 RUNX3 基因启动子甲基化。表明 RUNX3 基因甲基化具有肿瘤特异性, RUNX3 基因甲基化参与鼻咽癌发生发展。本实验甲基化检测结果与 Tan 及张勇等报道的检测结果存在较大差异的原因可能与检测样本量、DNA 亚硫酸氢盐修饰方法以及检测的甲基化位点不同有关。

Tan 等检测样本量偏少,检测的甲基化位点位于第 2 外显子区,使用常规 DNA 亚硫酸氢盐修饰方法,其敏感度和重复性较差,且同时检测的其他 4 个基因(P16、RASSF1A、CDH1、hMLH1)甲基化频率均明显低于其他学者的研究结果。张勇等^[7]检测样本量及检测的甲基化位点(位于 P2 启动子区)和本实验相同,但其使用常规 DNA 亚硫酸氢盐修饰方法敏感度和重复性较差。目前使用常规的 DNA 亚硫酸氢盐修饰技术操作复杂,DNA 降解明显,敏感度和重复性差,要求 DNA 量大,从微量组织中检测非常困难。本实验采用优化的基于琼脂糖珠包裹的微量 DNA 亚硫酸氢盐修饰技术进行 DNA 的修饰反应,可保持 DNA 于亚硫酸氢盐敏感的单链状态,并且免去了 DNA 纯化回收的步骤,大幅度减少了亚硫酸氢盐修饰反应中 DNA 的降解,从而提高了敏感度,使从微量组织中检测多基因甲基化成为可能。利用该技术已经能检测到至少 2.5 个肿瘤细胞内的多个肿瘤相关基因的甲基化改变,具有极高的敏感度和特异性。因此本实验检测的甲基化的阳性率会偏高。Homma 等^[10]报道 RUNX3 基因 CpG 岛从 5' 区向转录起始点方向各位点甲基化的阳性率逐渐降低,本研究检测的甲基化位点位于 P2 启动子区较 Tan 等检测的甲基化位点位于第 2 外显子区更靠近 5' 区,因此本实验甲基化的阳性率会偏高。

综上所述,本实验样本量大于 40、采用优化的 DNA 亚硫酸氢盐修饰技术及使用位于 P2 启动子区甲基化位点检测是甲基化的阳性率高的主要原因。肿瘤相关基因的甲基化,作为一种新的肿瘤分子标记,已开始逐渐应用于肿瘤的早期诊断、鉴别诊断和判断预后、预测复发^[11-13]。对舌癌、乳腺癌等^[11,12]研究报道 RUNX3 基因甲基化与淋巴结转移、肿瘤高分期等不良预后密切相关,认为 RUNX3 基因甲基化可以作为判断预后的预测指标。而本实验虽然发现 RUNX3 基因甲基化更常见于有颅内转移、有淋巴结转移、未分化癌、高 T 分期及晚期患者,但统计学分析均无统计学差异,因此 RUNX3 基因甲基化目前尚不能作为判断鼻咽癌临床预后的预测指标。

综上所述,RUNX3 基因甲基化参与鼻咽癌发生

发展,但能否作为判断鼻咽癌临床预后的预测指标,需要扩大样本研究进一步验证,RUNX3 基因甲基化是否是 RUNX3 基因表达下调的重要机制,有待进一步实验研究证实。

参考文献

- 1 倪海峰,黄光武,张哲,等. P27^{KIP1} 基因甲基化在鼻咽癌发生发展中作用[J]. 解放军医学杂志,2010,35(2):126-129
- 2 Zhang Z, Sun D, Van do N, *et al.* Inactivation of RASSF2A by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Cancer*,2007,120(1):32-38
- 3 Tao Q, Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2007, 9 (12):1-24
- 4 Chuang LS, Ito Y. RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors[J]. *Oncogene*,2010,29(18):2605-2615
- 5 Chen W, Gao N, Shen Y, *et al.* Hypermethylation downregulates Runx3 gene expression and its restoration suppresses gastric epithelial cell growth by inducing p27 and caspase3 in human gastric cancer [J], *J Gastroenterol Hepatol*,2010,25(4):823-831
- 6 Ge MH, Chen C, Xu JJ, *et al.* Critical regions and spreading of runt-related transcription factor-3 C-phosphate-G (CpG) island methylation in human salivary gland adenoid cystic carcinoma[J]. *Hum Pathol*,2011,7[Epub ahead of print]
- 7 张勇,秦娜,曹骥,等. 鼻咽癌中 RUNX3 基因的甲基化初探[J]. 广西医科大学学报,2009,26(2):191-193
- 8 Tan SH, Ida H, Goh BC, *et al.* Analyses of promoter hypermethylation for RUNX3 and other tumor suppressor genes in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Anticancer Res*,2006,26(6B):4287-4292
- 9 章华,赵素萍,马丽娟,等. 组织微阵列技术检测鼻咽癌组织中蛋白的表达[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,42(10):779-780
- 10 Homma N, Tamura G, Honda T, *et al.* Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer[J]. *Cancer Sci*,2006,97(1):51-56
- 11 Supic G, Kozomara R, Jovic N, *et al.* Hypermethylation of RUNX3 but not WIF1 gene and its association with stage and nodal status of tongue cancers[J]. *Oral Dis*,2011,17(8):794-800
- 12 Jiang Y, Tong D, Lou G, *et al.* Expression of RUNX3 gene, methylation status and clinicopathological significance in breast cancer and breast cancer cell lines[J]. *Pathobiology*, 2008,75(4):244-251
- 13 Nishio M, Sakakura C, Nagata T, *et al.* RUNX3 promoter methylation in colorectal cancer: its relationship with microsatellite instability and its suitability as a novel serum tumor marker[J]. *Anticancer Res*, 2010,30(7):2673-2682

(收稿:2011-11-11)