

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.12.009

文章编号: 1005-8982(2017)12-0046-04

临床研究·论著

膀胱尿路上皮癌中 PTEN 表达与其基因甲基化的关系*

尹永华¹,程文杰²,延敏博²

(1.广州医科大学附属深圳沙井医院 泌尿外科,广东 深圳 518104;

2.中山大学附属第五医院 泌尿外科,广东 珠海 519000)

摘要:目的 探讨膀胱尿路上皮癌(BUCC)中第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因(*PTEN*)表达与其基因启动子甲基化的关系。**方法** 应用 Western blot、甲基化特异性聚合酶链反应(MSP),检测 41 例 BUCC 和 18 例正常膀胱组织中 *PTEN* 蛋白的表达水平及其基因启动子甲基化状态,并分析两者的相关性。**结果** BUCC 中 *PTEN* 蛋白表达低于正常膀胱组织($P < 0.05$),而 BUCC 中 *PTEN* 基因启动子甲基化率为 53.66% (22/41),高于正常膀胱组织的 0.00%(0/18)($P < 0.05$);与甲基化阴性组的 BUCC 组织相比,22 例甲基化阳性组的 *PTEN* 表达水平降低($P < 0.05$)。**结论** BUCC 中 *PTEN* 蛋白的表达水平下调,这与其基因启动子高甲基化密切相关。

关键词: 膀胱尿路上皮癌;磷酸酶-张力蛋白基因;DNA 甲基化

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

Correlation between expression of *PTEN* and its promoter methylation in bladder urothelial cell carcinoma*

Yong-hua Yin¹, Wen-jie Cheng², Min-bo Yan²

(1. Department of Urology, Shenzhen Shajing People's Hospital, Guangzhou Medical University, Shenzhen, Guangdong 518104, China; 2. Department of Urology, the Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between expression of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten (*PTEN*) gene and its promoter methylation in bladder urothelial cell carcinoma (BUCC). **Methods** The protein expression and promoter methylation of *PTEN* gene were detected in 41 cases of BUCC and 18 normal bladder tissues using Western blot and Methylation Specific PCR (MSP) method respectively, and their correlation was analyzed. **Results** *PTEN* protein expression in the BUCC was lower than that in the normal bladder tissues ($P < 0.05$). And the promoter methylation rate of *PTEN* gene in the BUCC (53.66%, 22/41) was significantly higher than that (0.00%, 0/18) in the normal bladder tissues ($P < 0.05$). The expression level of *PTEN* protein in the BUCC of the methylation negative group was obviously lower than that of the methylation positive group ($P < 0.05$). **Conclusions** The low expression of *PTEN* protein in BUCC is closely related with the high methylation of *PTEN* gene promoter.

Keywords: bladder urothelial cell carcinoma; phosphate and tension homology deleted on chromosome ten; DNA methylation

收稿日期:2016-07-15

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(No: JCYJ20140414160300578)

[通信作者] 程文杰, E-mail: 602676045@qq.com; Tel: 18613150560

膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial cell carcinoma, BUCC)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。近期研究发现,DNA 甲基化导致的基因沉默或者低表达可能与其发生、发展有关^[1]。第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN)是第 1 个最早发现的具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,其编码产物可以使 PIP3 在 D3 位去磷酸化生成 PIP2,从而诱导细胞凋亡及细胞周期的阻滞,防止肿瘤的发生^[2]。PTEN 基因在多种恶性肿瘤中存在表达缺失或低表达,其中大部分与该基因启动子甲基化有关^[3],而在膀胱尿路上皮癌中相关的研究较少。本文应用 Western blot、甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测膀胱尿路上皮癌中 PTEN 基因的表达水平及其启动子甲基化状态,并分析两者的关系,为揭示膀胱癌发生的分子生物学机制提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2014 年 3 月-2015 年 11 月在中山大学附属第五医院就诊的膀胱尿路上皮癌患者手术标本 41 例。其中,男性 29 例,女性 12 例;平均年龄 59.5 (35~81)岁;临床分期:非肌层浸润性(Tis Ta, T₁) 26 例,肌层浸润性(T₂~T₄)15 例;病理分级:I 级 14 例,II 级 16 例,III 级 11 例;有淋巴结转移 11 例,无淋巴结转移 30 例;另取同期正常膀胱组织标本 18 例作为对照组,两组性别和年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。以上标本均经病理组织学检查证实,标本离体后立即置液氮冷冻,而后置入 -80℃冰箱中冷冻保存。在与患者沟通并征得其同意的情况下收集所有标本,符合本院医学伦理委员会的要求。

1.2 实验试剂与仪器

兔抗人 PTEN 单克隆抗体及 HRP 标记的羊抗兔抗体购自广州齐云生物有限公司,动物组织 DNA 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 试剂盒购自美国 Zymo Research 公司,引物合成由上海生工生物工程有限公司提供,紫外分光光度仪计购自美国贝克曼公司(型号:DU800),酶标仪 MK3 购自芬兰 Thermo lab-systems 公司,PTC-220-聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪购自美国 Zymo Research 公司,2020D 紫外荧光数字成像仪(日本岛津

公司)。

1.3 Western blot 检测

取 -80℃保存的新鲜膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱组织,提取总蛋白并检测其浓度。每孔上样量为 30 μg,电泳、转膜,含 10%脱脂奶粉封闭液中封闭 2 h;在装有稀释好的一抗工作液的杂交袋中过夜,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗膜 5 次,15 min/次;加二抗于室温孵育 2 h,将其置于暗室,取医用 X 线底片覆盖,曝光 1 min 后,依次显影、定影;并予 Image-Pro Plus 软件进行灰度分析。

1.4 MSP 法

使用动物组织 DNA 试剂盒从膀胱尿路上皮癌和正常组织中提取基因组 DNA,紫外分光光度计检测 DNA 含量和纯度,予 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 试剂盒进行亚硫酸氢盐修饰并纯化,置于 -20℃冷冻保存备用。

利用 Methprimer 软件进行设计,并由上海生工生物工程有限公司合成。甲基化正向引物:5'-GTAT TTCGAGTAAAGGAAGAAGACG-3',反向引物:5'-G ATAAAAAACTACAACCCAACGAA-3';非甲基化正向引物:5'-TATTTTGGAGTAAAGGAAGAAGATGA-3',反向引物:5'-CAATAAAAACTACAACCCAACAAA-3';扩增产物长度均为 200 bp;PCR 反应体系为 50 μl,含 500 ng/μl 模板 DNA 1 μl,10 × LA PCR™ Buffer (Mg²⁺ plus) 5 μl, dNTP Mixture 8 μl, 20 μmol/L 正反向特异性引物各 0.5 μl, ddH₂O 34.5 μl,日本 TaKaRa LA Taq™ 0.5 μl。循环参数:95℃预变性 5 min, 94℃变性 45 s, 55℃退火 30 s, 74℃延伸 30 s, 共循环 30 次, 74℃继续延伸 10 min。取 PCR 反应产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,以 ddH₂O 作空白对照,电压 100 V, 30 min 后在紫外灯下观察结果并照相。

1.5 统计学方法

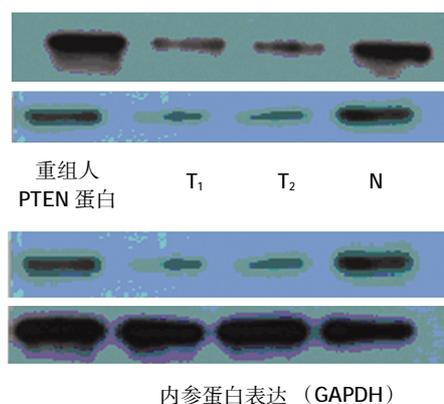
数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计数资料以率或百分比表示,用 χ^2 检验,两变量非配对比较用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN 蛋白的表达

用 Western blot 定量检测膀胱尿路上皮癌组织和正常膀胱组织中 PTEN 的表达,并以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)表达为内参蛋白。两组 PTEN 蛋白表

达比较,经秩和检验,差异有统计学意义($Z=5.350$, $P=0.000$),PTEN 表达水平在膀胱尿路上皮癌组织中低于正常膀胱组织。见图 1。



T₁、T₂:膀胱尿路上皮癌组织;N:正常膀胱组织

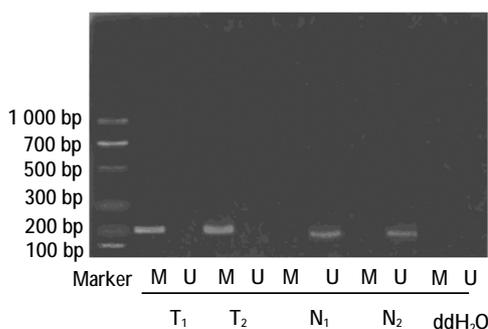
图 1 膀胱尿路上皮癌和正常膀胱组织中 PTEN 蛋白的表达

2.2 PTEN 基因启动子甲基化状态

41 例膀胱尿路上皮癌标本中,22 例标本中的 PTEN 基因启动子区发生甲基化(出现甲基化条带),其 PTEN 基因启动子区发生甲基化阳性率为 53.66%(22/41),而 18 例正常膀胱组织标本均未发生甲基化(只有非甲基化条带),其 PTEN 基因启动子区发生甲基化阳性率为 0%(0/18),经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=15.401$, $P=0.000$),PTEN 基因启动子区发生甲基化率在膀胱尿路上皮癌组织中高于正常膀胱组织。见图 2。

2.3 PTEN 表达与其基因甲基化的关系

按照 PTEN 基因启动子甲基化状态,将 41 例膀胱尿路上皮细胞癌组织分为甲基化阳性组(22 例)及阴性组(19 例),两组 PTEN 表达水平比较,经秩和检验,差异有统计学意义($Z=16.751$, $P=0.000$),



M:加入甲基化引物;U:加入非甲基化引物;T₁、T₂:膀胱尿路上皮癌组织;N₁、N₂:正常膀胱组织

图 2 膀胱尿路上皮癌和正常膀胱组织中 PTEN 基因启动子甲基化状态

启动子甲基化阳性组 PTEN 表达水平低于甲基化阴性组。

3 讨论

膀胱癌是我国发病率最高的泌尿系恶性肿瘤,在西方发达国家其发病率也高居泌尿生殖系肿瘤的第 2 位,仅次于前列腺癌^[4],60 岁以后,男性膀胱癌死亡率即超过肾肿瘤,居男性泌尿系恶性肿瘤第 1 位^[5]。膀胱尿路上皮癌是膀胱癌中最常见的病理类型,近年来不但发病率持续上升,而且膀胱尿路上皮癌的复发率也逐渐增高^[6]。

PTEN 是具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,其编码产物是一种 PIP3 磷酸酶,通过减少 PIP3 生成,抑制细胞迁移,抑制血管生成等起到抗肿瘤的作用。目前发现,PTEN 蛋白在多种恶性肿瘤组织中均存在表达下降,并认为 PTEN 基因低表达可能与其启动子甲基化有关^[7]。

DNA 甲基化属于表观遗传学的一种类型,其可直接干扰特异转录因子与启动子上识别位点的结合从而阻止转录因子与基因形成转录复合物,进而影响基因表达,因此,DNA 甲基化与癌症的发生、发展密切相关。国内外研究者已从膀胱癌患者的标本中发现多种抑癌基因与修复基因的甲基化改变,如 p14、p15、Rb、RASSF1A 等,而关于膀胱尿路上皮癌中 PTEN 的甲基化研究较少^[8-11]。

笔者运用 Western blot 检测及 MSP 技术进行研究,对比 PTEN 基因表达水平及其启动子甲基化状态在膀胱尿路上皮癌和正常膀胱组织中的差异。实验结果显示,膀胱尿路上皮癌中 PTEN 蛋白表达低于正常膀胱组织。这与一些学者的研究结果基本相符^[12-15]。41 例膀胱尿路上皮癌组织中有 53.66%(22/41)发生 PTEN 基因启动子甲基化改变,而在正常膀胱组织均未发生甲基化,两者差异有统计学意义。这证实膀胱尿路上皮癌中的确存在 PTEN 基因启动子的高甲基化改变。

而膀胱癌中 PTEN 基因高甲基化原因是什么呢?目前相关研究较少,但有学者对人直肠癌细胞系进行研究发现,同时阻断 DNA 甲基化转移酶(DNMT1 和 DNMT3b)会使整个基因组甲基化水平下降 >95%,说明 DNMT1 和 DNMT3b 共同维持 DNA 甲基化和基因沉默^[16]。该机制在 PTEN 基因中是否存在,有待今后进一步研究;另外,PTEN 高甲基化可能还与饮食、环境及病毒感染等因素相关。

KANG^[7]和 HINO 等^[8]检测 66 例胃癌组织,发现其中 26 例启动子甲基化组织中又有 73%(19/26)存在 PTEN 表达缺失,认为在胃癌中 PTEN 失活与其启动子甲基化有关。国内学者检测 83 例手术切除的肺癌标本组织,发现肺癌组织中 PTEN 基因启动子甲基化率为 57.8%(48/83),明显高于癌旁组织的 30.1%(25/83);肺癌组织中的 PTEN mRNA 的阳性表达率为 32.5%(27/83),明显低于癌旁组织的 55.4%(46/83),认为肺癌组织中 PTEN 基因失表达与其启动子甲基化有关,可能是肺癌发生、发展的原因之一^[9]。膀胱尿路上皮癌中是否存在类似情况呢?通过分析笔者发现,与甲基化阴性组的膀胱尿路上皮癌组织相比,22 例甲基化阳性组的 PTEN 表达水平降低。这与 KANG 等^[7]结果相符,证实膀胱尿路上皮癌中 PTEN 表达降低与其启动子甲基化密切相关。

在本研究中,膀胱尿路上皮癌中 PTEN 基因启动子存在高甲基化改变,而且该区域高甲基化可能会下调 PTEN 蛋白表达水平,这可能与膀胱癌的发生、发展密切相关,这是基因甲基化与肿瘤发病相关的又一佐证,也为探讨膀胱尿路上皮癌发生机制提供新的研究方向,并为今后肿瘤基因靶向治疗提供新的靶点,有一定的临床应用价值。

参 考 文 献:

- [1] EGGER G S, LIANG G, APARICIO A, et al. Epigenetics in human diseases and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429(6990): 457-463.
- [2] GOAL A, ARNOLD C N, NIEDZWIECKI D, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9): 3014-3021.
- [3] LIU L H, LOU L G. Recent advance in the regulation of PTEN's function[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2005, 21(7): 778-781.
- [4] 叶章群,曾晓勇. 当前膀胱癌研究热点与争论[J]. *临床外科杂志*, 2009, 17(11): 723-724.
- [5] 韩苏军. 中国膀胱癌死亡现状及流行趋势分析[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2013(3): 228-232.
- [6] PECTASIDES D, PECTASIDES M, ECONOMOPOULOS T. Systemic chemotherapy in locally advanced and metastatic bladder cancer[J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(6): 456-470.
- [7] LI J, YEN C, LIAW D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275(5308): 1943-1947.
- [8] WILHELM C, SKELSEY K, TBUTLER R, et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5): 1682-1689.
- [9] 孙静哲,杨学习. 抑癌基因甲基化异常在肝癌中的研究进展及临床应用[J]. *广东医学*, 2011, 32(4): 519-521.
- [10] TAN J, GU Y, ZHANG X, et al. Hypermethylation of CpG islands is more prevalent than hypomethylation across the entire genome in breast carcinogenesis[J]. *Clin Exp Med*, 2012, 102(38): 1-9.
- [11] GUO W, DONG Z, CHEN Z, et al. Aberrant CpG island hypermethylation of RASSF1A in gastric cardia adenocarcinoma[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(4): 459-465.
- [12] 毕玉东,王宝森. PTEN 和 Survivin 在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2011, 32(4): 452-455.
- [13] AHMAD I, MORTON J P, SINGH L B, et al. Beta-catenin activation synergizes with PTEN loss to cause bladder cancer formation[J]. *Oncogene*, 2011, 30(2): 178-189.
- [14] 余惠. P16 和 PTEN 在人膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义[J]. *中国医学工程*, 2013, 21(11): 82-83.
- [15] 金鹏飞,谭操,毛平花,等. PTEN 蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义[J]. *浙江临床医学*, 2015, 17(1): 12-13.
- [16] RHEE I, BAHMAN K E, PARK B, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells[J]. *Nature*, 2002, 416(6880): 552-556.
- [17] KANG Y H, LEE H S, KIM W H. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(3): 285-291.
- [18] HINO R, UOZAKI H, MURAKAMI N, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 2766-2774.
- [19] 鲍振学,刘云云,毛桂玲. PTEN 基因甲基化及其表达与非小细胞肺癌侵袭转移的关系[J]. *河北医药*, 2013, 35(10): 1452-1454.

(童颖丹 编辑)