论著

文章编号:1000-5404(2011)15-1602-04

前列腺癌组织中DNMT1的表达与GSTP1、APC甲基化状态的关系及临床意义

张伟杰[1],马志俊[1],陆士新[1,2],王瑞林[1],赵培荣[1],王留兴[1] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科[1];100021 北京,中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨前列腺癌组织中DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)的表达与谷胱甘肽S转移酶P1(glutathione S transferase P1, GSTP1)、结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)甲基化状态的关系及临床意义。**方法** 采用RT-PCR的方法检测56例前列腺癌(prostate cancer,PCa)组织和10例前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)组织中DNMT1和GSTP1、APC的mRNA表达,采用甲基化特异性PCR(MS-PCR)的方法检测GSTP1、APC的启动子区CpG岛甲基化状态。**结果** 大多数PCa组织中DNMT1 mRNA高表达(在低分化癌中阳性率为90.0%),而GSTP1和APC低表达(在低分化癌中阳性率分别为23.3%和33.3%),BPH组织中DNMT1 mRNA低表达(40.0%),而GSTP1和APC高表达(分别为90.0%和80.0%),低分化癌与BPH相比,差异有统计学意义($P<0.05$);大多数PCa组织中GSTP1、APC启动子区CpG岛呈高甲基化状态(在低分化癌中阳性率分别为83.3%和73.3%),而BPH组织中呈低甲基化(阳性率分别为10.0%和20.0%),低分化癌与BPH相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PCa组织中GSTP1、APC失活的机制可能与DNMT1的高表达导致其启动子区CpG岛异常高甲基化有关。

[关键词] 前列腺癌;DNA甲基转移酶1;谷胱甘肽S转移酶P1;结肠腺瘤性息肉病;甲基化
[中图法分类号] R737.25;R394.3;R730.23 [文献标志码] A

Correlation of DNMT1 expression with GSTP1 and APC methylation and its clinical significance

Zhang Weijie[1], Ma Zhijun[1], Lu Shixin[1,2], Wang Ruilin[1], Zhao Peirong[1], Wang Liuxing[1] ([1]Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052; [2]Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, 100021, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the correlation of expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and the methylation status of glutathione S transferase P1 (GSTP1) and adenomatous polyposis coli (APC) promoter CpG island in prostate cancer and its clinical significance. **Methods** RT-PCR method was used to detect the expression of DNMT1, GSTP1, and APC in 56 cases of prostate cancer and 10 cases of benign prostatic hyperplasia. Mutagenivcally separated-PCR (MS-PCR) was used to detect the methylation status of CpG island of promoter of GSTP1 and APC. **Results** DNMT1 mRNA was highly expressed in most of the prostate cancer tissue (the positive rate in the poorly-differentiated cancer tissues was 90.0%), but mildly expressed in benign prostatic hyperplasia (the positive rate was 40.0%). GSTP1 and APC mRNA was slightly expressed in most of the prostate cancer tissue (the positive rate of poor-differentiation was 23.3% and 33.3% respectively, $P<0.05$), but strongly expressed in most benign prostatic hyperplasia tissue (the positive rate was 90.0% and 80.0% respectively). GSTP1 and APC were in hypermethylated status in most prostate cancer tissues (the positive rate of poor-differentiation was 83.3% and 73.3% respectively), but in hypomethylated status (or demethylation) in benign prostatic hyperplasia (the positive rate was 10.0% and 20.0% respectively, $P<0.05$). **Conclusion** Silence of GSTP and APC in prostate cancer may be related with hypermethylation of DNMT1 promoter CpG island due to its high expression.

[**Key words**] prostate cancer; DNA methyltransferase 1; glutathione S transferase P1; adenomatous polyposis coli; methylation

Supported by the Natural Science Program of Department of Education of Henan Province(2007320075). Corresponding author: Wang Liuxing, Tel:86-371-66295955, E-mail:wlx2246@yahoo.com.cn

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究项目(2007320075)
[通信作者] 王留兴,电话:(0371)66295955,E-mail:wlx2246@yahoo.com.cn

前列腺癌(prostate cancer,PCa)是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一。在西方国家,其在40岁以上男性恶性肿瘤死亡原因中居第2位,仅次于肺癌[1]。在我国随着生活水平的提高和人口老龄化,其发病率也有逐年上升的趋势。当前前列腺癌的诊治中一个突出问题就是早期筛查和早期诊断存在困难,仅仅依赖前列腺特异抗原(prostate specific antigen,PSA)和直肠指诊已经不能适应前列腺癌临床早期诊断的需要[2],因此寻求新的标志物就显得十分重要。已有研究证实在前列腺癌中,有许多基因启动子CpG岛存在异常高甲基化,如谷胱甘肽S转移酶P1(glutathione S transferase P1, GSTP1)、GMGT、RASSF1A、RARβ2等[3-4]。本课题组研究了DNA甲基化过程中的关键酶DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1,DNMT1)mRNA在前列腺癌组织中的表达情况及与GSTP1、结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli,APC)启动子CpG岛甲基化状态的关系,希望能够找到新的前列腺癌的诊断分子标志。

1 资料与方法

1.1 临床病理资料

收集我院2008年1月至2010年1月收治前列腺癌确诊患者56例的临床和病理资料,手术标本取材后放入液氮冻存然后转入-80 ℃冰箱冷藏。病理标本中前列腺癌根治切除标本4例、经尿道电切标本19例、穿刺活检组织标本33例。患者年龄50~93岁,平均77岁。病理分级根据Gleason评分,56例PCa包括:高分化腺癌9例(Gleason评分2~4分),中分化腺癌17例(Gleason评分5~7分),低分化腺癌30例(Gleason评分8~10分)。临床分期:采用美国Jewett-Whitmore-Prout体系进行分期,A期4例,B期7例,C期11例,D期34例。以10例同期行开放手术切除的前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)患者标本作为对照,患者年龄55~80岁,平均68岁。所有患者术前未行放、化疗或其他针对肿瘤的治疗,临床病理资料完整。

1.2 主要试剂

总RNA提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),反转录试剂盒(Fermenta公司),DNA提取试剂盒(Axygen公司),甲基化修饰试剂盒(Epigentek公司),PCR扩增试剂盒(上海生工生物工程有限公司)。

1.3 RT-PCR

按照康为世纪公司总RNA提取试剂盒说明进行组织总RNA的提取,取5 μl RNA溶液,加DEPC水稀释至60 μl,混匀,以DEPC水作为空白对照,读取紫外分光光度计260、280 nm波长下的光密度值。计算RNA浓度(μg/μl)=$D(260)\times40\times60/5/1\,000$。计算其$D(260)/D(280)$值,纯RNA样本的$D(260)/D(280)$值应在1.8~2.0之间。取RNA溶液5 μl,1%甲醛变性的琼脂糖电泳100 V电压下电泳1 h。将胶移至紫外灯下,观察28S及18S处rRNA的亮度,通常以28S和18S EB的显色强度比2∶1为无RNA降解。按照Fermentas公司反转录试剂盒说明操作逆转录合成cDNA,-20 ℃保存。

取5 μl逆转录产物进行PCR扩增(引物由上海生工生物工程有限公司合成),50 μl反应体系,反应条件为:94 ℃预变性5 min,进入PCR循环:95 ℃变性30 s,62 ℃退火50 s,72 ℃延伸60 s,35个循环后72 ℃延伸7 min。PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳,于紫外灯下观察照相。出现目的基因条带为表达阳性。β-actin为内参。GSTP1引物正义链5′-GCCCTACACCGTGGTCTATT-3′,反义链5′-GACGCAGGATGGTATTGGA-3′,产物长度209 bp;APC引物正义链5′-CCAACAAGGCTACGCTAT-3′,反义链5′-TCTGCTCGCCAAGACAAA-3′,产物长度127 bp;DNMT1引物正义链5′-CTACCAGGGAGAAGGACAGG-3′,反义链5′-CTCACAGACGCCACATCG-3′,产物长度152 bp;β-actin引物正义链5′-AGGCATTGTGATGGACTCCG-3′,反义链5′-AGTGATGACCTGGCCGTCAG-3′,产物长度301 bp。

1.4 MS-PCR

按照Axygen公司DNA提取试剂盒说明提取组织DNA;取5 μl DNA溶液,加焦碳酸二乙酯(DEPC)水稀释至60 μl,混匀,以DEPC水作为空白对照,读取紫外分光光度计260、280 nm波长下的光密度值。DNA浓度(μg/μl)=$D(280)\times40\times60/5/1\,000$。计算其$D(260)/D(280)$值,纯RNA样本的$D(260)/D(280)$值为1.8~2.0。根据Epigentek公司试剂盒步骤进行甲基化修饰。

取5 μl经修饰后的产物以50 μl反应体系于冰上操作,引物参照文献[5-7]由上海生工生物工程有限公司合成,充分混匀,经短暂离心,94 ℃预变性3 min,然后94 ℃变性30 s,去甲基化53 ℃(甲基化55 ℃)退火30 s,72 ℃延伸1.5 min,进行35个循环后,再94 ℃继续延伸5 min,置4 ℃保存。取扩增产物5 μl,加1.5 μl loading buffer 1.5 μl,混匀,加样于含有EB的2%琼脂糖凝胶中进行电泳(5 V/cm),电泳时间40 min。用凝胶成像系统分析照相,出现目的基因条带为表达阳性。GSTP1-U引物正义链5′-GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT-3′,反义链5′-CCACCCCAATACTAAATCACAACA-3′,产物长度97 bp;GSTP1-M引物正义链5′-TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC-3′,反义链5′-GCCCCAATACTAAATCACGACG-3′,产物长度93 bp;APC-U引物正义链5′-GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT-3′,反义链5′-AACCAATCAACAAACTCCCAACAA-3′,产物长度111 bp;APC-M引物正义链5′-TATTGCGGAGTGCGGGTC-3′,反义链5′-TCGACGAACTCCCGACGA-3′,产物长度98 bp。

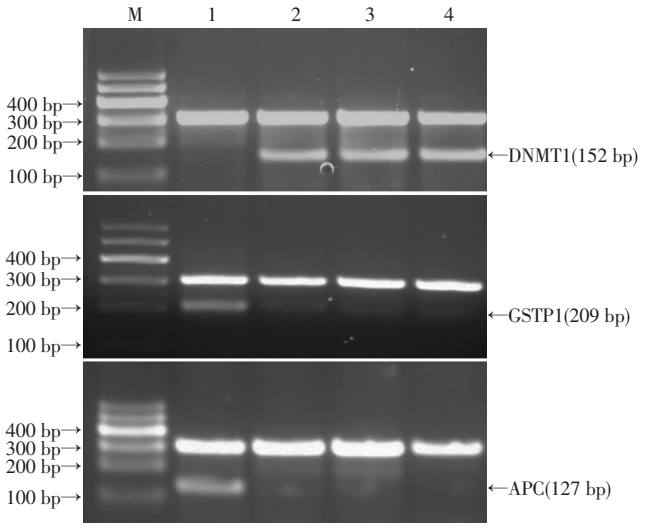
1.5 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,PCa与BPH组织中DNMT1与GSTP1、APC mRNA的表达差异及GSTP1、APC启动子CpG岛甲基化状态的差异采用Kruskal-Wallis Test秩和检验;DNMT1 mRNA的表达与GSTP1、APC启动子CpG岛甲基化状态之间的相关性采用Spearman等级相关性分析。

2 结果

2.1 BPH和PCa中DNMT1与GSTP1、APC mRNA的表达

DNMT1 mRNA阳性率在BPH中较低,随着癌分化程度的下降其阳性率明显升高,在低分化癌中非常高,与BPH相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。而GSTP1和APC mRNA的阳性率在BPH中很高,但随着癌分化程度的下降阳性率却呈明显下降趋势,与BPH相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1,表1。



M:标准;1:BPH;2:高分化癌;3:中分化癌;4:低分化癌

图1 RT-PCR检测BPH和PCa中DNMT1、GSTP1与APC mRNA的表达

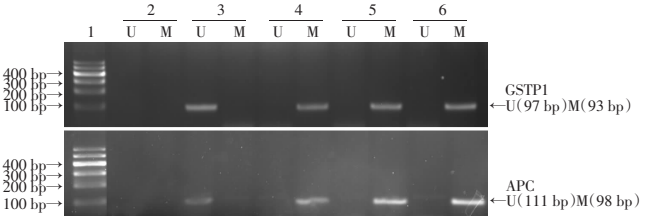
表1 BPH和PCa中DNMT1、GSTP1与APC mRNA的表达[例数(%)]

病理分级	n	DNMT1	GSTP1	APC
低分化癌	30	27(90.0)[a]	7(23.3)[a]	10(33.3)[a]
中分化癌	17	14(82.4)[a]	7(41.2)[a]	9(52.9)[a]
高分化癌	9	6(66.7)[a]	5(55.6)[a]	7(77.8)[a]
BPH	10	4(40.0)	9(90.0)	8(80.0)

a:$P<0.05$,与BPH比较

2.2 BPH和PCa中GSTP1、APC的甲基化状态

我们使用MS-PCR的方法检测了10例良性前列腺增生组织和56例前列腺癌组织GSTP1和APC的甲基化状态,发现其阳性率在BPH中非常低,随着癌分化程度的下降其阳性率明显升高,与BPH相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图2,表2。



1:标准;2:水对照;3:BPH;4:高分化癌;5:中分化癌;6:低分化癌;U:去甲基化;M:甲基化

图2 MS-PCR检测BPH和PCa中GSTP1、APC的甲基化状态

表2 BPH和PCa中GSTP1、APC的甲基化状态[例数(%)]

病理分级	n	GSTP1甲基化(+)	APC甲基化(+)
低分化癌	30	25(83.3)[a]	22(73.3)[a]
中分化癌	17	11(64.7)[a]	9(52.9)[a]
高分化癌	9	5(55.6)[a]	3(33.3)[a]
BPH	10	1(10.0)	2(20.0)

a:$P<0.05$,与BPH比较

2.3 PCa中DNMT1的表达与GSTP1和APC甲基化状态的相关性

经Spearman等级相关性分析,DNMT1的表达与GSTP1高甲基化呈显著正相关($r_s=0.817$,$P=0.000$),与APC高甲基化呈显著正相关($r_s=0.671$,$P=0.000$)。

3 讨论

近年来的研究证实,异常高甲基化是肿瘤抑制基因除突变、缺失失活的第3种机制,在某些情况下甚至是唯一机制[3-4]。DNMT1是复制后维持甲基化的关键酶[8],在许多肿瘤中存在DNMT1升高的现象[9]。已有研究证实在前列腺癌中,有许多基因启动子区CpG岛存在异常高甲基化[4]。我们在前期研究中通过免疫组化的方法检测了DNMT1在PCa和BPH中的表达[10],发现其在低、中、高分化癌及BPH的阳性率分别为86.7%、70.6%、55.6%和30.0%($P<0.05$)。本实验中DNMT1 mRNA的表达阳性率分别为90.0%、82.4%、66.7%和40.0%($P<0.05$),与免疫组化的结果相一致。说明在前列腺癌中存在DNMT1活性增高的现象,且随着其活性增高前列腺癌恶性程度亦增高。

GSTP1参与细胞的新陈代谢、解毒及清除可能损害基因的外源性化合物,因而保护细胞免受DNA损伤和癌变。王怀碧等[11]报道GSTP1在正常前列腺、前列腺增生、高级别的上皮内瘤变及前列腺癌组织中的表达呈逐渐降低的趋势。Nakayama等[12]亦报道,大于90%的前列腺癌组织中GSTP1的CpG岛存在高甲基化现象,而正常人和良性前列腺增生症患者的前列腺组织中未发现。我们在前期研究中通过免疫组化的方法检测了GSTP1在BPH和PCa中的表达[10],其在低、中、高分化癌及BPH的阳性率分别为13.3%、29.4%、44.4%和90.0%($P<0.05$)。本实验中GSTP1 mRNA的阳性表达率分别为23.3%、41.2%、55.6%和90.0%($P<0.05$)。GSTP1的甲基化在低、中、高分化癌及BPH的阳性率分别为83.3%、64.7%、55.6%和10.0%($P<0.05$)。说明随着肿瘤恶性程度的增高GSTP1的甲基化水平增高而表达降低。提示GSTP1启动子区CpG岛的高甲基化是导致其失活的原因之一。

APC蛋白是Wnt信号通路的重要组成部分,参与了β-catenin蛋白胞质内降解。APC失活后β-catenin积聚于胞质内并易位入细胞核,激活下游靶基因转录,如c-myc、cyclin D_1和c-Jun,最终导致细胞恶性转化,形成恶性肿瘤[13]。APC基因启动子甲基化在许多肿瘤中都很常见,如结肠癌、食管癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌及肝癌等。有文献报道PCa中APC基因甲基化发生率为27%~90%,而非肿瘤前列腺组织中仅为5%~6%。另外,约36%的前列腺上皮内瘤变(PIN)标本中出现APC基因甲基化[14]。我们在前期研究中通过免疫组化的方法检测了APC在BPH和PCa中的表达[10],其在低、中、高分化癌及BPH的阳性率分别为33.0%、55.6%、70.6%和86.7%($P<0.05$)。本

实验中 APC mRNA 的阳性表达率分别为 33.3%、52.9%、77.8% 和 80.0%（$P<0.05$）。APC 的甲基化在低、中、高分化癌及 BPH 的阳性率分别为 73.3%、52.9%、33.3% 和 20.0%（$P<0.05$）。与 BPH 相比，PCa 中 APC 的甲基化水平是增高的，而表达水平是降低的。说明 APC 的表达缺失可能与甲基化有关，且在前列腺癌的发生、发展过程中起促进作用。

综上所述，前列腺癌组织中 DNMT1 的高表达和 GSTP1、APC 的低表达意味着抑癌基因失活的机制与启动子区异常高甲基化有关。GSTP1 和 APC 的启动子区 CpG 岛的异常高甲基化（尤其是 GSTP1）可以作为前列腺癌的早期分子诊断指标[15]。另外，DNA 甲基化不改变核苷酸的序列，而是通过改变染色体结构和组蛋白乙酰化作用的水平，间接导致基因转录抑制[3]。由此我们可以猜想如果降低 DNMT 的活性，有可能使抑癌基因恢复表达，起到治疗肿瘤的作用，也许会为肿瘤的治疗开辟一条新的途径。

参考文献：

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277 - 300.
[2] 杜稳斌, 侯建国, 武旗, 等. 前列腺癌组织中谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因启动子区域甲基化序列分析[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29 (7): 762 - 767.
[3] 周水根, 孙颖浩, 高建平. DNA 甲基化与前列腺癌[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13(12): 1108 - 1112.
[4] Li L C, Okino S T, Dahiya R, *et al*. DNA methylation in prostate cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1704(2): 87 - 102.
[5] 张艳, 陈彬, 陈敏, 等. DNA 甲基化 PCR 引物的设计[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3): 268 - 269.
[6] Cairns P, Esteller M, Herman J G, *et al*. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(9): 2727 - 2730.
[7] Ellinger J, Bastian P J, Jurgan T, *et al*. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer[J]. Urology, 2008, 71(1): 161 - 167.
[8] 王志刚, 吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展[J]. 遗传, 2009, 31(9): 903 - 912.
[9] 赵先兰, 饶燕玲, 孟志英, 等. 宫颈癌组织中 DNA 甲基转移酶 1 mRNA 的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(1): 120 - 122.
[10] 张伟杰, 别良玉, 陆士新, 等. 人前列腺癌组织中 DNMT1、GSTP1 和 APC 的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2011, 46(3): 370 - 372.
[11] 王怀碧, 叶明福, 王亚丽, 等. GSTP1 在病变前列腺组织中的表达及意义[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(2): 73 - 75.
[12] Nakayama M, Gonzalgo M L, Yegnasubramanian S, *et al*. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate cancer[J]. J Cell Biochem, 2004, 91(3): 540 - 552.
[13] 马宗源, 李祺福. APC 蛋白的结构特征及其与细胞骨架的关系[J]. 生命科学, 2004, 16(1): 16 - 18, 34.
[14] Richiardi L, Fiano V, Vizzini L, *et al*. Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(19): 3161 - 3168.
[15] Woodson K, O'Reilly K J, Hanson J C, *et al*. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer[J]. J Urol, 2008, 179(2): 508 - 512.

（**收稿**:2011-01-23；**修回**:2011-03-06）
（编辑 王小寒）

（上接 1601 页）

3 讨论

良性前列腺增生症起病隐匿而缓慢，多数患者无法回忆出确切起病时间，常因急性尿潴留、明显尿流变慢等原因就诊时明确诊断；或常规体格检查时发现前列腺增生。常见症状可分为两大类：阻塞性症状，如尿流细小、解不干净、排尿后段滴沥、尿柱断续、需用力方能解尿等；刺激性症状则包括频尿（排尿后不到 2 h 又想尿）、尿急（尿意强烈，甚至憋不住）、夜尿等[3]。由于排尿常排不干净，容易并发细菌性膀胱炎、膀胱结石、尿潴留等，严重者会导致肾积水乃至肾功能不全。此外因前列腺体增大，其血流量也相对增加，患者可能出现无痛性血尿。

钬激光是目前众多外科手术用激光中最新的一种。产生的能量可使光纤末端与结石之间的水汽化，形成微小的空泡，并将能量传至结石，使结石粉碎成粉末状。水吸收了大量的能量，减少了对周围组织的损伤。同时钬激光对人体组织的穿透深度很浅，仅为 0.4 mm。因此在碎石时可以做到对周围组织损伤最小，安全性极高[4]。对于排尿困难症状较重、身体状况较好的良性前列腺增生并膀胱结石患者，特别是结石较大或多发结石者，可采用第 1 组方式；对于膀胱结石较大或多发，特别是憩室内结石，钬激光碎石存在一定难度，可采用第 2 组方式；大多数良性前列腺增生并膀胱结石患者可采用第 3 组方式。

本研究显示，IPSS、QOL、残余尿全部有显著改善，与术前比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；第 3 组与第 1、2 组在术后的冲洗时间、住院天数、留置尿管时间之间的差异均有统计学意义（$P<0.05$）。表明良性前列腺增生伴膀胱结石进行经尿道钬激光碎石后行 TURP 是一种更安全、有效且并发症少的治疗方法，值得临床推广应用。

参考文献：

[1] 田野, 邵强, 宋健, 等. 北京多中心社区良性前列腺增生患病率调查: BPC-BPH 研究结果[J]. 中华泌尿外科杂志, 2010, 31(3): 194 - 198.
[2] 文建国, 娄安锋, 王庆伟, 等. 尿流率联和超声残余尿评估良性前列腺增生症逼尿肌收缩功能[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(3): 202 - 204.
[3] 张元芳. 现代泌尿外科和男科学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2008: 478.
[4] Borborglu P G, Kane C J, Ward J F, *et al*. Immediate and postoperative complications of transurethral prostatectomy in the 1990s[J]. J Urol, 1999, 162(4): 1307 - 1310.

（**收稿**:2011-04-01；**修回**:2011-05-11）
（编辑 龙 亮）