

膀胱癌抑癌基因 Apaf-1 和 APC 的甲基化状况及其临床意义

潘俊¹, 陈凌武¹, 王文卫^{2*}, 瞿虎³, 王声正¹

(中山大学 1. 附属第一医院泌尿外科, 广东 广州 510080; 2. 附属第一医院黄埔院区泌尿外科, 广东 广州 510700;
3. 附属第六医院泌尿外科, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】研究抑癌基因细胞凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)和腺瘤性结肠息肉病相关基因(APC)的启动子甲基化状况与膀胱癌临床病理的关系及对患者复发的影响。【方法】采用甲基化特异性 PCR 方法检测 110 例膀胱癌组织中 Apaf-1 和 APC 的启动子甲基化状态,以 15 例正常膀胱黏膜组织为对照组。【结果】Apaf-1 和 APC 基因在膀胱癌组织中的甲基化率为 90.0%和 82.7%,在正常膀胱组织为 6.77%和 20.0%,差异分别有统计学意义(P 均 = 0.000)。Apaf-1 及 APC 的甲基化率与肿瘤分化程度及临床分期有明显的相关性,随肿瘤分级、分期的增加而升高。在复发组与未复发组的比较中,Apaf-1 的甲基化阳性率分别为 97.6%(41/42)和 85.3%(58/68),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.382, P = 0.036$),而 APC 的甲基化率分别为 85.7%(36/42)和 80.9%(55/68),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.424, P = 0.515$)。【结论】Apaf-1 及 APC 的甲基化改变在膀胱癌的发生、发展过程中具有重要作用,Apaf-1 启动子甲基化可能成为膀胱癌患者预后判断的分子标志物。

关键词: 膀胱癌; 甲基化; 肿瘤抑制基因; Apaf-1; APC

中图分类号: R737.14 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2010)03-0397-04

Clinical Implications of Methylation Status of Apaf-1 and APC Gene in Bladder Carcinoma

PAN Jun¹, CHEN Ling-wu¹, WANG Wen-wei^{2*}, QU Hu³, WANG Sheng-zheng¹

(1. Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Department of Urology, Huangpu District, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510700, China;
3. Department of Urology, The Sixth Affiliated Hospital, Guangzhou 510655, China)

Abstract:【Objective】To study the Apaf-1 and APC promoter methylation status and its relation with clinical pathology and prognosis of bladder carcinoma.【Methods】Methylation status of Apaf-1 and APC gene promoter in 110 specimens of bladder carcinoma and 15 normal bladder tissues were detected by methylation-specific PCR.【Results】The methylation rate of Apaf-1 and APC were significantly higher in bladder carcinoma (90.0%, 82.7%) than that of normal bladder tissues (6.77%, 20.0%) respectively with statistically significant differences ($P = 0.000$). The methylation rate of Apaf-1 and APC correlated well with the different grades and stages of bladder carcinoma respectively, increased with the development of tumor grades and stages. Between the recurrent group and the non-recurrent group, the methylation rates of Apaf-1 were 97.6% (41/42) and 85.3% (58/68), with statistically significant differences ($\chi^2 = 4.382, P = 0.036$); APC were 85.7% (36/42) and 80.9% (55/68), with no statistically significant differences ($\chi^2 = 0.424, P = 0.515$).【Conclusion】The methylation status of Apaf-1 and APC was related closely to the development of bladder carcinoma, the methylation status of Apaf-1 may become a new potential biomarker of prognosis in bladder carcinoma.

Key words: bladder carcinoma; methylation; tumor suppressor genes; Apaf-1; APC

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(3):397-400;405]

收稿日期: 2009-12-16

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B060700044); 广东省医学科研基金(A2009167)

作者简介: 潘俊, 博士生, 研究方向: 膀胱癌, E-mail: johnpcn@126.com; * 通信作者: 王文卫, 博士, 课题负责人, E-mail: wangww2000@yahoo.cn

目前普遍认为,在肿瘤转化过程中抑癌基因功能的失活比原癌基因的激活起更关键作用,而 DNA 异常甲基化可直接修饰和关闭抑癌基因的功能。细胞凋亡蛋白酶活化因子-1 基因(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)是 c-Myc 诱导肿瘤细胞凋亡中 p53 的下游成分,Apaf-1 基因可以控制肿瘤的发展。已证实在白血病等恶性肿瘤中都出现了 Apaf-1 基因转录和翻译水平的下调^[1],但在泌尿系肿瘤尤其是膀胱癌中有关 Apaf-1 的研究报道相对较少^[2]。Wnt 信号传导通路的异常激活在泌尿系肿瘤的发生中起着重要作用,虽然腺瘤性结肠息肉病相关基因(adenomatous polyposis coli, APC)是 Wnt 信号的下游抑制因子,但 APC 基因在膀胱癌的发生、发展中是否起着重要作用存在着争论^[3-4]。因此,本研究采用甲基化特异性 PCR 法(MSP 法)检测 Apaf-1 和 APC 基因在膀胱癌中的启动子甲基化状况,并分析其与膀胱癌临床特点的关系及在患者术后复发监测中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集 2001 年 1 月至 2005 年 12 月在我院确诊为膀胱移行细胞癌患者的临床资料,入选条件:①临床资料完整。②蜡块内组织较大,可供提取 DNA。筛选出 150 名患者,成功随访到 110 患者,随访成功率 73.3%,其中男 78 例,女 32 例。手术时年龄 36 ~ 72 岁,平均 62.5 岁。病理分级按 WHO 2004 分级标准,低级别 60 例,高级别 50 例;临床分期按国际抗癌协会 UICC-TNM 分期标准,浅表性(Tis ~ T1)48 例,浸润性肿瘤(T2 ~ T4)62 例。另取 15 例正常膀胱粘膜组织常规石蜡包埋切片作对照组。15 例正常膀胱粘膜组织标本均来自于行膀胱全切术时在离肿瘤边缘 5 cm 以外的无肿瘤组织,HE 染色病理学检查确认无肿瘤细胞。

1.2 石蜡切片中 DNA 组织的提取

每个标本切取 10 μm 厚度切片 3 ~ 4 张,无需脱蜡,直接用 TaKaRa DEXPAT™ 试剂盒(大连宝生),按步骤向石蜡包埋组织切片上加入 TaKaRa DEXPAT™ 后,只需 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热和 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,就可以得到 PCR 扩增用 DNA,紫外分光光度仪确定 DNA 的含量和纯度。

1.3 甲基化特异性 PCR 分析

采用 CPGenome™ DNA Modification Kit 试剂盒(Chemicon, USA),对样本 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰并纯化回收,引物设计采用 Primer premier 5.0 引物设计专门软件,由 Invitrogen 公司鉴定合成。Apaf-1 的甲基化引物 5' AGGAAATTTAAA TTTTCGGGC 3'(F),5' CGCGAACGAAACGTAAC TA 3'(R),非甲基化引物 5' GAGGAAATTTAAAT TTTTGGGT 3'(F),5' CCACAAACAAAACATAAC TA 3'(R)。APC 的甲基化的引物 5' TGTTTTATT GCGGAGTGC 3'(F),5' AACCCACATATCGATCAC GTAC 3'(R),非甲基化引物 5' TTGTGTTTTATTG TGGAGTGT 3'(F),5' AACCCACATATCAATCACATA TACACC 3'(R)。反应体系包括去离子水 18.15 μL , 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , dNTPs 1 μL , Taq 酶 0.35 μL , U 或 M-引物 F 1 μL , U 或 M-引物 R 1 μL 及修饰后的 DNA 1 μL 。Apaf-1 的 PCR 循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度(甲基化引物 55 $^{\circ}\text{C}$, 非甲基化引物 52 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增片段长度甲基化引物 170 bp, 非甲基化 161 bp。APC 的 PCR 循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度(甲基化引物 52 $^{\circ}\text{C}$, 非甲基化引物 50 $^{\circ}\text{C}$) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 扩增片段长度甲基化引物 150 bp, 非甲基化 141 bp。以双蒸水作为空白对照。取 PCR 产物 5 μL , 应用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 电泳 40 min, 电泳结果经激光密度扫描仪成像进行分析。甲基化引物扩增阳性者为甲基化阳性, 非甲基化引物扩增阳性且甲基化引物扩增阴性者为甲基化阴性。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件,甲基化阳性率的比较采用 χ^2 检验,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 膀胱癌组织 Apaf-1、APC 基因启动子甲基化状态与临床病理的关系

Apaf-1、APC 启动子甲基化特异性 PCR 产物电泳结果见图 1、2。正常膀胱组织和膀胱癌组织中的 Apaf-1 启动子甲基化率分别为 6.77% (1/15) 和 90.0% (99/110), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 57.29$, $P = 0.000$); APC 启动子甲基化率分别

为20.0%(3/15)和82.7%(91/110),差异有统计学意义($\chi^2 = 27.85, P = 0.000$)。Apaf-1、APC启动子甲基化阳性率随肿瘤分级、分期的增加而显著升高,差异分别有统计学意义($P < 0.05$);而不同性

别、不同年龄以及肿瘤单发与多发之间的比较分别无显著性差异($P > 0.05$;表1)。有淋巴结转移的患者 Apaf-1 启动子甲基化阳性率明显高于无淋巴结转移的患者($P < 0.05$)。

表1 膀胱癌组织中 Apaf-1、APC 甲基化状态与临床病理的关系

Table 1 Relationship between Apaf-1 and APC promoter methylation status and clinicopathologic features of bladder cancer

Clinic parameters	Total	Apaf-1 methylation n(%)	P	APC methylation n(%)	P
Normal bladder epithelium	15	1(6.77)	0.000	3(20.0)	0.000
Bladder cancer	110	99(90.0)		91(82.7)	
Gender			0.899		0.413
Male	78	70(89.7)		66(84.6)	
Female	32	29(90.6)		25(78.1)	
Age			0.509		0.105
> 60	70	64(91.4)		61(87.1)	
< 60	40	35(87.5)		30(75.0)	
Tumor grade			0.001		0.000
Lower	60	49(80.7)		42(70.0)	
Higher	50	50(100.0)		49(98.0)	
Tumor stage			0.000		0.000
Superficial	48	37(77.1)		31(64.6)	
Invasive	62	62(100.0)		60(96.8)	
Tumor number			0.332		0.155
Single	65	57(87.7)		51(78.5)	
Multiple	45	42(93.3)		40(88.9)	
Recurrence			0.036		0.515
No	68	58(85.3)		55(80.9)	
Yes	42	41(97.6)		36(85.7)	
Lymph node metastasis			0.046		0.697
Yes	27	27(100.0)		23(85.2)	
No	83	72(86.7)		68(81.9)	

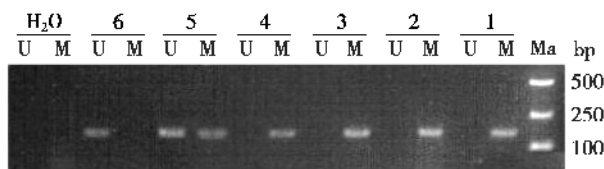


图1 膀胱癌 Apaf-1 基因启动子甲基化检测结果

Fig.1 The Apaf-1 promoter methylation status of bladder cancer

1-5: bladder cancer; 6: normal bladder epithelium; H₂O: blank control

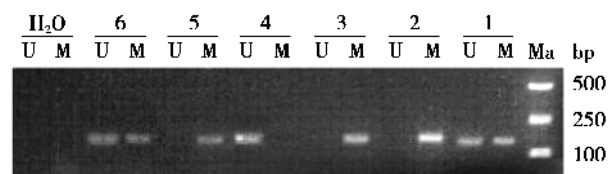


图2 膀胱癌 APC 基因启动子甲基化检测结果

Fig.2 The APC promoter methylation status of bladder cancer

1-5: bladder cancer; 6: normal bladder epithelium; H₂O: blank control

2.2 Apaf-1、APC 的甲基化表达状况与患者复发的关系

Apaf-1 的甲基化阳性率在复发组与未复发组

中分别为97.6%(41/42)和85.3%(58/68),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.382, P = 0.036$)。APC 的甲基化阳性率在复发组与未复发组中分别为85.7%

(36/42) 和 80.9% (55/68), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.424$, $P = 0.515$)。

3 讨 论

肿瘤的形成受遗传学和表观遗传学修饰的影响, 而甲基化是目前研究最为深入的表观遗传学机制。肿瘤细胞 DNA 甲基化模式表现为局部特异位点如 CpG 岛高甲基化和整体广泛低甲基化状态^[5]。近年来的研究证实在膀胱癌的发生、发展过程中相关基因 CpG 岛的甲基化紊乱发生率很高^[6-7]。Apaf-1 基因作为一个抑癌基因较少发生突变, 引起该基因功能缺失的机制有杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH) 和启动子甲基化, 其中甲基化引起的基因功能“静默”是该基因表达下调的主要原因^[8]。我们研究发现, 在正常膀胱粘膜组织中 Apaf-1 的甲基化率非常低, 为 6.77% (1/15), 仅有 1 例可检测到少量的甲基化, 而膀胱癌组织中其甲基化率则高达 90.0% (99/110), 仅有 11 例甲基化表现不明显, 因此, 我们认为 Apaf-1 的甲基化检测可用于临床上鉴别膀胱良恶性肿瘤。另外, Apaf-1 甲基化率在高级别、浸润型的膀胱癌中均高达 100%, 明显高于低级别、表浅型的膀胱癌, 提示 Apaf-1 基因启动子高甲基化的膀胱癌具有较高的恶性生物学行为, 与预后不良密切相关。而不同性别、不同年龄以及肿瘤单发与多发之间的比较并无统计学差异, 但其甲基化状况与是否出现淋巴结转移有着明显的联系, 考虑 Apaf-1 甲基化阳性的肿瘤转移及侵袭能力较强。随访表明, 在复发组与未复发组中 Apaf-1 启动子甲基化率 (97.6%: 85.3%) 有统计学差异, 提示 Apaf-1 甲基化阳性的患者术后可能有较高的复发率。研究证实, 基因 CpG 岛的甲基化改变往往发生在明显的恶性表现出现之前^[9], 故对 Apaf-1 基因 DNA 甲基化检测可以评估膀胱癌远期复发的风险并对复发作出提前预测。

Wnt 信号传导通路的异常激活与人类肿瘤的发生发展密切相关, APC 是 Wnt 信号的下游抑制因子, APC 失活后则会导致 β -catenin 降解减少, 胞质 β -catenin 转移到细胞核与 Tcf-4 结合, 活化靶基因刺激肿瘤生长^[10-11]。研究证明在结肠癌等消化道肿瘤中 APC 启动子的甲基化率很高^[12], 而在膀胱癌中它的甲基化如何国内外相关报道较

少, 观点也不尽相同。Stoehr R 等^[3]研究认为, 尽管 Wnt 的信号传导途径在包括泌尿系肿瘤的许多肿瘤发生中起着重要作用, 但 APC 基因的突变和表达缺失却是少见事件。而 Kastritis E 等^[4]却认为 APC 的突变及异常表达在浸润性的尿路上皮癌中却并不少见, 而且可能有判断预后的重要价值。本研究发现正常膀胱组织和膀胱癌的 APC 启动子总甲基化率分别为 20.0% 和 82.7%, 差异有统计学意义, 提示 APC 基因与膀胱癌的发生密切相关, 用于膀胱癌的早期诊断和鉴别良恶性膀胱肿瘤方面具有重要价值。同时, 发现 APC 的甲基化率在不同级别、不同分期的癌组织中有明显差别, 其表达随肿瘤的分级、分期的增加而明显升高, 表明 APC 的甲基化是膀胱癌形成的早期事件并在癌细胞的恶性转化过程中逐步积累, 与膀胱癌的发生存在密切关系。但是在复发组与未复发组中 APC 的甲基化率无明显的统计学差异, 表明其预测膀胱癌复发作用的局限性。

综上所述, Apaf-1、APC 基因的高甲基化状态在膀胱癌的发生、发展过程中起着重要作用, 如能进一步与其它抑癌基因组成膀胱癌的甲基化检测谱, 将对患者的早期诊断与预后的监测提供一种新的、非创伤性的手段。

参考文献:

- [1] Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, et al. Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia [J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3(6):325-334.
- [2] Hinz S, Kempkensteffen C, Weikert S, et al. EZH2 polycomb transcriptional repressor expression correlates with methylation of the APAF-1 gene in superficial transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Tumour Biol*, 2007, 28(3):151-157.
- [3] Stoehr R, Krieg RC, Knuechel R, et al. No evidence for involvement of beta-catenin and APC in urothelial carcinomas [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20(5):905-911.
- [4] Kastritis E, Murray S, Kyriakou F, et al. Somatic mutations of adenomatous polyposis coli gene and nuclear b-catenin accumulation have prognostic significance in invasive urothelial carcinomas: evidence for Wnt pathway implication [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(1):103-108.
- [5] 汪清铭, 吴祥元, 王东宁, 等. B 细胞淋巴瘤 SHP-1 基因甲基化状态及其意义 [J]. *中山大学学报: 医学科学*

(下转第 405 页 to page 405)