

间的冷保存(供肝冷保存12 h)使 F_0F_1 -ATPase 蛋白合成明显下降,肝细胞氧化磷酸化受损,ATP 生产减少,细胞凋亡增多,这说明 F_0F_1 -ATPase 在能量代谢方面参与肝细胞凋亡。再灌注24 h后 F_0F_1 -ATPase 表达明显升高,ATP 合成也相应增多,肝细胞凋亡也随之减少,这也从一个方面反应 F_0F_1 -ATPase 蛋白表达对肝细胞能量合成及肝细胞凋亡起着至关重要的作用。C组在再灌注24 h内 F_0F_1 -ATPase 蛋白表达明显受抑,可能与长时间冷保存导致增殖的自由基攻击线粒体 F_0F_1 -ATPase 复合体,使蛋白表达降低,功能异常,致使线粒体内膜两侧电化学梯度异常,线粒体膜电位发生改变有关,这种改变可能激活线粒体介导的凋亡通路致细胞色素C 释放而致肝细胞凋亡。

综上所述, F_0F_1 -ATPase 的蛋白表达与ATP 合成及肝细胞凋亡变化密切相关,提示 F_0F_1 -ATPase 蛋白表达异常是导致移植肝早期细胞凋亡的主要原因。

参考文献:

- [1] Bhogal R H, Curbishley S M, Weston C J, *et al*. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation [J]. *Liver Transpl*, 2010, 16(11): 1303 - 1313.
- [2] Suen D F, Norris K L, Youle R J. Mitochondrial dynamics and apoptosis[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(12): 1577 - 1590.

- [3] 张莹, 别平, 石承先, 等. mtTFA、NRF-1 对冷保存-再灌注肝移植大鼠线粒体 DNA ATPase6 基因表达的调节[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(21): 2337 - 2342.
- [4] 张莹, 别平, 石承先, 等. “二袖套法”制备大鼠原位肝移植模型的方法改进[J]. *消化外科*, 2005, 4(6): 444 - 446.
- [5] Montalvo-Jave E E, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado J A, *et al*. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2008, 147(1): 153 - 159.
- [6] Zhang W X, Yin W, Zhang L, *et al*. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(6): 586 - 590.
- [7] Kamo N, Shen X D, Ke B, *et al*. Sotrastaurin, a protein kinase C inhibitor, ameliorates ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(11): 2499 - 2507.
- [8] Zeng Z, Huang H F, Chen M Q, *et al*. Contributions of heme oxygenase-1 in postconditioning-protected ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(7): 2517 - 2523.
- [9] Aksimentiev A, Balabin I A, Fillingame R H, *et al*. Insights into the molecular mechanism of rotation in the F_0 sector of ATP synthase[J]. *Biophys J*, 2004, 86(3): 1332 - 1344.
- [10] Lin F S, Shen S Q, Chen Z B, *et al*. 17 β -estradiol attenuates reduced-size hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibition apoptosis *via* mitochondrial pathway in rats[J]. *Shock*, 2012, 37(2): 183 - 190.

(收稿:2012-01-08;修回:2012-03-18)

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2012)12-1249-03

短篇论著

PTEN 甲基化及其异常表达与膀胱移行细胞癌的关系

延敏博, 孙华宾, 刘 燕, 徐白生 (519000 广东 珠海, 中山大学附属第五医院泌尿外科)

[摘要] 目的 探讨 PTEN 基因启动子甲基化及其 mRNA 异常表达与膀胱移行细胞癌临床及病理特征的关系。方法 应用甲基化特异性 PCR(MSP)法检测膀胱移行细胞癌组织(48 例)和正常膀胱组织(15 例)PTEN 基因启动子甲基化状态,应用 RT-PCR 技术检测其 mRNA 的表达水平。结果 膀胱癌组织中 PTEN 启动子甲基化率为 47.9% (23/48),而在 15 例正常膀胱组织中其启动子未发生甲基化,两组间差异具有统计学意义($P < 0.01$);PTEN 基因 mRNA 在膀胱癌组织和正常膀胱组织中的阳性表达率分别是 56.2% (27/48)和 100.0% (15/15),两组间差异有统计学意义($P < 0.01$);PTEN 基因启动子甲基化率与其 mRNA 表达水平在不同病理分级、临床分期间差异有统计学意义($P < 0.05$),且 PTEN 启动子甲基化与其 mRNA 表达存在明显关联性($\chi^2 = 21.372, r = 0.555, P < 0.01$)。结论 PTEN 基因启动子甲基化可导致其 mRNA 表达的缺失,对膀胱移行细胞癌的发生及转移有着极其重要的影响。

[关键词] 膀胱移行细胞癌;PTEN;甲基化

[中图分类号] R394.2;R730.23;R737.14

[文献标志码] A

第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因 (PTEN) 是最早被发现的具有双特异性磷酸酶活

性的抑癌基因,它可以通过多种细胞因子途径抑制肿瘤的发生、发展。研究表明,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^[1],而在膀胱移行细胞癌中相关研究较少。本研究采用甲基特异性聚合酶链反应 (methyl-

[基金项目] 广东省医学科研基金 (B2011368);广东省科技计划项目 (2010B06090042)

[通信作者] 孙华宾, E-mail: sunhuabin66@163.com

ation specific PCR, MSP)及逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测膀胱癌中 PTEN 基因启动子甲基化状态及其 mRNA 表达水平,并分析二者与膀胱癌临床病理特征的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集本院2010年7月至2011年8月膀胱移行细胞癌患者手术标本48例,其中男性38例,女性10例,平均年龄62.5(39~88)岁。单发40例,多发8例;临床分期:非肌层浸润性(T_{is}、T_a、T₁)33例,肌层浸润性(T₂~T₄)15例;病理分级:低级别(G₁、G₂)36例,高级别(G₃)12例;有淋巴结转移11例,无淋巴结转移37例。另取同期正常膀胱组织标本15例作为对照组。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,放入-80℃深低温冰箱中保存。

1.2 MSP法

1.2.1 DNA的提取 使用DNeasy Tissue Kits试剂盒(Qiagen公司)从膀胱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[1.8 < D(260)/D(280) < 2.0],琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,之后置于-20℃保存备用。

1.2.2 DNA的甲基化修饰 以人甲基化/非甲基化DNA标准品经亚硫酸氢盐修饰作为甲基化和非甲基化对照,使用EZ DNA Methylation-Gold™ Kit试剂盒(ZYMO RESEARCH公司)对提取的基因组DNA进行亚硫酸氢盐修饰并纯化,置于-20℃保存备用。

1.2.3 MSP 以甲基化修饰后的DNA样本为模板,分别用甲基化和非甲基化2对引物进行PCR扩增,以水代替模板DNA作为阴性对照。引物设计根据PTEN基因序列(GenBank登录号AF067844),应用UCSC寻找其启动子,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。甲基化引物上游:5'-GTATTTCGAGTAAAGGAAGAAGACG-3',下游:5'-GATAAAAACTACAACCCAACGAA-3';非甲基化引物上游:5'-TATTTTTCGAGTAAAGGAAGAAGATGA-3',下游:5'-CAATAAAAACTACAACCCAACAAA-3';扩增产物长度均为200bp。PCR反应体系为50μl,含500ng/μl模板DNA1μl,10×LA PCR™ Buffer II (Mg²⁺ plus) 5μl, dNTP Mixture 8μl, 20μmol/L上下游特异性引物各0.5μl, ddH₂O 34.5μl, TaKaRa LA Taq 0.5μl(大连宝生,DRR013A)。循环参数:94℃预变性3min,然后94℃30s,58℃1min,72℃45s共35个循环,最后72℃延伸7min(4℃保存)。取PCR反应产物10μl经2%琼脂糖凝胶电泳,并设立空白对照,电压100V,30min后在紫外灯下观察结果并照相。

1.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法

1.3.1 总RNA提取 使用Trizol Reagent(Invitrogen, USA)RNA提取试剂分别从膀胱癌和正常组织提取总RNA,紫外分光光度计检测其含量和纯度[1.7 < D(260)/D(280) < 1.9]。

1.3.2 逆转录合成cDNA 使用RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0(大连宝生生物工程有限公司,DRR019A)试剂盒,以Oligo-dT为引物,AMV为逆转录酶,逆转录mRNA得到cDNA。

1.3.3 PCR扩增 在逆转录反应的PCR管中加入TaKaRa Ex Taq HS 0.25μl,5×PCR Buffer 10μl,上下游特异性引物各0.5μl及灭菌蒸馏水28.75μl,以cDNA为模板进行扩增。PTEN引物及GAPDH内参引物均由广州复能基因有限公司合成。PTEN:上游引物5'-CATACCAGGACCAGAGGAAACC-3',下游引物5'-TGGATCAGAGTCAGTGGTGTCTAG-3';GAPDH:上游引物5'-GTGGGGCGCCAGGCACCA-3',下游引物5'-CTCCTATGTCACGCACATTC-3'。其扩增产物长度分别为286、146bp。扩增条件:94℃预变性3min,94℃30s,54℃30s,72℃45s,共33个循环,72℃延伸7min。以在上述成分中不加模板作为阴性对照。扩增产物均经2%琼脂糖凝胶电泳并照相。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行χ²检验,Fisher精确概率法以及配对资料的关联性分析。

2 结果

2.1 PTEN基因启动子甲基化状态

膀胱癌和正常组织甲基化率分别为47.9%(23/48)和0.0%(0/15),两组间差异有统计学意义(P=0.001);膀胱癌中PTEN甲基化率还与其临床分期、病理分级及淋巴结转移有关(P<0.05),而在其他因素间差异无统计学意义(P>0.05,表1,图1)。

表1 膀胱癌不同临床病理特征间PTEN甲基化及其mRNA表达情况

特征	例数	甲基化	χ ²	P	mRNA表达阳性	χ ²	P
性别			0.254	0.614		0.393	0.531
男	38	17			20		
女	10	6			7		
性状			0.067	0.796		0.610	0.435
单发	40	20			21		
多发	8	3			6		
临床分期			5.648	0.017		4.656	0.031
非肌层浸润	33	12			22		
肌层浸润	15	11			5		
病理分级			4.703	0.03		6.349	0.012
低级别	36	14			24		
高级别	12	9			3		
淋巴结转移			6.572	0.01		6.516	0.011
有	11	9			2		
无	37	14			25		



1:空白对照;2:阴性对照;3-5:不同的膀胱移行细胞癌组织;6:正常膀胱组织;7:甲基化对照;8:非甲基化对照;9:100bp DNA标准;U:非甲基化;M:甲基化

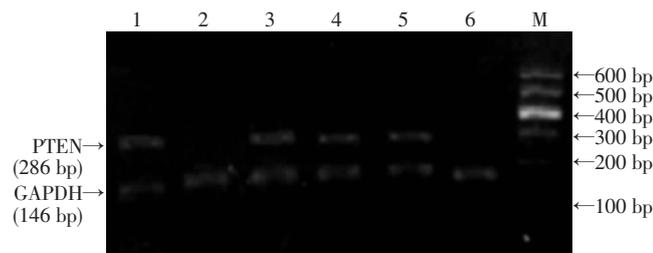
图1 膀胱移行细胞癌和正常膀胱组织PTEN基因启动子甲基化状态

2.2 PTEN 基因 mRNA 表达情况

膀胱癌组织中 PTEN mRNA 阳性表达率 56.2% (27/48) 明显低于正常膀胱组织 (100%, $\chi^2 = 9.844, P = 0.021$); 且其表达缺失与临床分期、病理分级及淋巴结转移有关 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 PTEN 启动子甲基化与 mRNA 表达之间的关系

在膀胱移行细胞癌中, 发生甲基化与未发生甲基化的 PTEN 基因其 mRNA 阳性表达率分别为 21.7% (5/23), 88.0% (22/25), 经统计学分析, PTEN 启动子甲基化与其 mRNA 表达存在明显关联性 ($\chi^2 = 21.372, r = 0.555, P < 0.01$)。



M: 100 bp DNA 标准; 1、3、5: 不同的正常膀胱组织; 2、4、6: 不同的膀胱移行细胞癌组织

图 2 膀胱移行细胞癌和正常膀胱组织 PTEN 基因 mRNA 的表达

3 讨论

膀胱移行细胞癌 (transitional cell carcinoma of the bladder, TCCB) 是我国最常见的泌尿生殖系恶性肿瘤^[2], 其发生、发展是机体内因与环境外因相互作用的结果。DNA 甲基化是在 DNA 甲基化转移酶的作用下, 将 S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到基因组 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位上, 形成 5-甲基胞嘧啶, 这种基因修饰可在细胞分裂中进行遗传并影响 DNA 和其他分子的相互作用。近年来, 随着表观遗传学的发展, DNA 甲基化已成为各种肿瘤研究的热点^[3]。

PTEN 是一种抑癌基因, 定位于染色体 10q23.3, 全长 200 kb, 具有蛋白和脂质磷酸酶活性, 通过去磷酸化作用调控细胞的增殖和凋亡, 进而抑制肿瘤的发生。研究发现, 肿瘤的发生可能与 PTEN 蛋白的表达缺失有关, 而其表达缺失又与该基因异常甲基化关系密切。目前, PTEN 基因由于高甲基化而表达失活在多种恶性肿瘤组织中研究较多, 但在膀胱癌中报道尚少。

本研究检测 48 例膀胱癌和 15 例正常膀胱组织中 PTEN 基因甲基化状态与其 mRNA 表达水平, 发现膀胱癌中 PTEN 启动子甲基化率显著高于正常膀胱组织 ($P < 0.01$), 而其 mRNA 阳性表达率又低于正常膀胱组织 ($P < 0.01$), 二者在不同病理分级、临床分期及淋

巴结转移间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 随着膀胱癌病理分级、临床分期的增加及淋巴结的转移, PTEN 甲基化率明显增加, 而其 mRNA 阳性表达率明显降低; 这提示 PTEN 基因启动子甲基化及其 mRNA 表达缺失可能对膀胱移行细胞癌的发生有一定作用。这与马建波等^[4-6]研究相似。

刘双林等^[7]发现 PTEN 启动子甲基化可能导致其转录后失活, 进而使其蛋白表达减少或缺失。本研究采用 RT-PCR 技术从基因转录水平检测 PTEN mRNA 表达情况, 发现膀胱移行细胞癌中发生甲基化组 PTEN 基因 mRNA 阳性表达率明显低于未发生甲基化组, 经统计学分析得出二者存在明显关联性 ($P < 0.01$); 这与刘双林等^[7]研究结果相似, 但本研究从 mRNA 水平更直观地反映出 PTEN 启动子甲基化与其基因表达的关系, 敏感度更高, 有助于揭示 PTEN 甲基化对膀胱移行细胞癌发生、发展影响的机制。

综上所述, PTEN 基因启动子甲基化可能导致其 mRNA 表达缺失, 这在膀胱移行细胞癌的发生、发展中起重要作用, 并影响其生物学行为。随着检验技术的进步, 我们可以通过检测 PTEN 甲基化及其表达来评估膀胱癌患者的疾病发展程度及预后, 并有望使用抑制 DNA 甲基化的药物来治疗膀胱癌及其他肿瘤。

参考文献:

- [1] Goel 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.
- [2] 廖于峰, 马建波, 魏任雄, 等. 膀胱移行细胞癌尿沉渣细胞 INK4a 和 ARF 基因启动子异常甲基化及临床意义[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(8): 1946-1948.
- [3] 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.
- [4] 马建波, 廖于峰, 魏任雄, 等. 膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因启动子 CpG 岛异常甲基化研究[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(7): 85-87.
- [5] 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.
- [6] 郑清友, 靳风烁, 李增鹏, 等. 凋亡抑制因子 survivin 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(10): 1030-1032.
- [7] 刘双林, 张旭, 吴淮, 等. 膀胱移行细胞癌中 PTEN 基因启动子甲基化及其表达的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18(20): 2939-2942.

(收稿: 2011-11-15; 修回: 2011-12-25)

(编辑 龙 亮)