

膀胱癌组织中 PCDH8 基因启动子甲基化状态及其临床意义

吴明亮¹, 管同郁^{2△}, 林英立², 吴刚², 戚景光²

(1. 江苏大学临床医学院, 江苏镇江 212000; 2. 徐州市肿瘤医院泌尿外科, 江苏徐州 221000)

摘要:目的 研究膀胱癌组织中抑癌基因 PCDH8(原钙黏蛋白 8, protocadherin 8) 启动子区 CPG 岛甲基化状态及临床意义。方法 收集 79 例原发性膀胱移行细胞癌组织和 20 例正常膀胱黏膜组织, 应用甲基化特异性 PCR(MSP) 检测 PCDH8 基因启动子区 CPG 岛的甲基化状态, 并结合临床病理资料进行分析。结果 20 例正常膀胱黏膜组织中均未检测到 PCDH8 基因甲基化, 79 例膀胱癌组织中 44 例检测到 PCDH8 基因启动子区甲基化, 甲基化率为 55.7%, 两组相比差异有统计学意义($P < 0.01$); 膀胱癌组织中 PCDH8 基因 CPG 岛启动子区甲基化与患者的年龄、性别、肿瘤数目无关($P > 0.05$); 直径小于或等于 3 cm 的肿瘤组织中 PCDH8 基因甲基化率为 43.5%, >3 cm 的肿瘤组织中 PCDH8 基因甲基化率为 72.7%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 乳头状肿瘤中 PCDH8 基因的甲基化率为 48.2%, 非乳头状肿瘤中 PCDH8 基因的甲基化率为 73.9%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 复发性肿瘤中 PCDH8 基因甲基化率为 71.1%, 原发性肿瘤中 PCDH8 基因的甲基化率为 35.3%, 差异有统计学意义; $G_1 \sim G_2$ 膀胱癌 PCDH8 基因的甲基化率为 43.4%, G_3 膀胱癌的甲基化率为 80.8%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); PCDH8 基因在 Ta~T1 期肿瘤的 PCDH8 基因甲基化率为 43.7%, T2~T4 期肿瘤中的甲基化率为 74.2%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 抑癌基因 PCDH8 启动子区 CPG 岛甲基化与膀胱移行细胞癌的发生、发展相关, PCDH8 基因启动子区 CPG 岛的甲基化有可能成为膀胱癌早期诊断、监测复发和判断预后的分子标志物。

关键词:膀胱癌; PCDH8; 甲基化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.028

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)01-0080-03

The methylation status and clinical significance of the promoter of PCDH8 gene in the tissue sample of bladder cancerWu Mingliang¹, Guan Tongyu^{2△}, Lin Yingli², Wu Gang², Qi Jingguang²

(1. Clinical Medical College, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China;

2. Department of Urology, Xuzhou Cancer Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the methylation status of the CpG island of tumor suppressor gene PCDH8 and its clinical significance in bladder cancer tissues. **Methods** 79 cases of primary bladder transitional cell carcinoma and 20 cases of normal bladder mucosa tissue were collected, and then the promoter methylation status of PCDH8 gene was examined by methylation specific PCR (MSP), and correlated with clinical pathological data for statistical analysis. **Results** We found that no PCDH8 gene methylation was detected in 20 normal bladder mucous tissues, while PCDH8 promoter methylation was found in 44 cases of total 79 primary bladder transitional cell carcinoma tissues, the methylation rate was 55.7%, and the difference was statistical significant between normal bladder mucous group and bladder cancer group ($P < 0.01$). The promoter methylation of PCDH8 gene in bladder transitional cell carcinoma tissues did not correlate with patient's age, gender, tumor number ($P > 0.05$), the methylation rate of PCDH8 gene in tumors whose diameter more than 3 cm was 72.7%, while the methylation rate of PCDH8 gene in tumors whose diameter less than 3 cm was 43.5%, and the difference was significant ($P < 0.05$). The methylation rate of PCDH8 gene in the papillary tumor was 48.2%, while the methylation rate of PCDH8 gene in the unapillary tumor was 73.9%, and the difference was significant ($P < 0.05$). The methylation rate of PCDH8 gene in recurrent tumors was 71.1%, while the methylation rate of PCDH8 gene in primary tumors was 35.3%, and the difference was significant ($P < 0.05$). The methylation rate of PCDH8 gene in tumors with G_1, G_2 phase was 43.4%, while the methylation rate of PCDH8 gene in tumors with G_3 was 80.8%, and the difference was significant ($P < 0.05$). The methylation rate of PCDH8 gene in the tumors with Ta T1 phase was 43.7%, while the methylation rate of PCDH8 gene in tumors with T2 T4 was 74.2%, and the difference was significant ($P < 0.05$). Our result suggested that PCDH8 gene methylation was associated with tumor growth, morphology, recurrence, poor differentiation and tumor invasion ($P < 0.05$). **Conclusion** The promoter methylation of tumor suppressor gene PCDH8 is closely correlated with the occurrence and development of primary bladder transitional cell carcinoma. The promoter methylation of PCDH8 gene could be used as molecular markers of early diagnosis, monitoring and prognosis biomarker in bladder cancer.

Key words: bladder cancer; PCDH8; methylation

膀胱癌是泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一, 占人体恶性肿瘤的第 4 位, 严重地威胁人类健康^[1-3]。膀胱癌的发生、发展是一个复杂的过程, 涉及到遗传学及表观遗传学方面的改变; DNA 甲基化是目前研究较多的一种表观遗传学机制, 抑癌基因启动子区域 CPG 岛的异常甲基化参与多种肿瘤的发生发

展, 有望成为肿瘤早期诊断、监测及预后判断的分子标志物^[4-5]。PCDH8(protocadherin-8, 原钙粘蛋白-8) 是原钙粘蛋白家族中的一个新成员, 研究表明 PCDH8 是一种新的抑癌基因, 它在多种肿瘤中因启动子甲基化而表达减少或缺失, 并与肿瘤的发生发展密切相关^[6-7]。然而, PCDH8 基因在膀胱癌中

的甲基化状态及其临床意义尚未见报道。作者采用甲基化特异性 PCR(MSP)来研究 PCDH8 基因在膀胱移行细胞癌组织和正常膀胱黏膜组织中甲基化状态并探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 9 月至 2012 年 9 月在徐州市肿瘤医院行手术治疗的 79 例膀胱移行细胞癌患者的癌组织及其同时期住院的 20 例膀胱结石患者的正常膀胱黏膜组织。病理证实全部为移行细胞癌,取自膀胱结石患者的膀胱黏膜均为正常膀胱黏膜。肿瘤的病理分级参照 WHO1973 分级标准,肿瘤的分期参照国际抗癌联盟 2002TNM 分期系统分为非肌层浸润性膀胱癌(Ta, T1, Tis)和肌层浸润性膀胱癌(T2, T3, T4)。膀胱癌患者中,男 56 例,女 23 例;年龄小于或等于 65 岁 29 例,>65 岁 50 例;单发肿瘤 30 例,多发肿瘤 49 例;肿瘤直径小于或等于 3 cm 46 例,>3 cm 33 例;乳头状肿瘤 56 例,非乳头状肿瘤 23 例;复发性肿瘤 45 例,原发性肿瘤 34 例;病理分级 G₁~G₂ 53 例,G₃ 26 例;肿瘤分期 Ta、T1、Tis 48 例,T2~T4 31 例。所有手术标本于术后即刻置于液氮中,置-80℃保存备用。

1.2 组织 DNA 提取 取组织标本 25 mg 加入液氮进行物理研磨,采用 DNeasy Tissue Kit(Qiagen, Genomic, CA)按照试剂盒说明书提取 DNA,紫外分光光度计(NanoDropND-100,美国)检测 DNA 浓度和纯度,所有 DNA 标本 A260/A280 均在 1.80~2.00 之间。

1.3 PCDH8 基因启动子甲基化检测

1.3.1 DNA 的亚硫酸氢盐修饰 采用修饰试剂盒 EpiTect Bisulfite Kit(Qiagen, Valencia, CA),取 1 μg DNA 按说明书操作进行修饰。

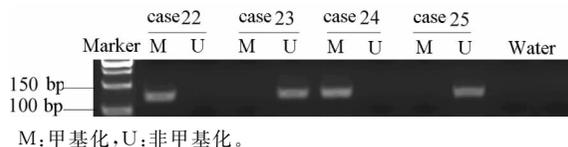
1.3.2 MSP 引物由上海生物有限公司合成。MSP 基本原理:DNA 经亚硫酸氢盐处理后,未发生甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,甲基化的胞嘧啶则不发生转化,然后使用对甲基化和未甲基化的 DNA 特异的引物进行 PCR 扩增,根据扩增结果加以区分。甲基化引物(M):上游 5'-CGG TTA TTG GTT ATT CGG TTC C-3',下游 5'-ACG AAC TCT AAA AAC GCG CG-3';未甲基化引物(U):上游 5'-GGT GGT TAT TGG TTA TTT GGT TT-3',下游 5'-CCA ACA AAC TCT AAA AAC ACA CA-3'^[8]。采用甲基化特异性 PCR 检测 PCDH8 基因甲基化状态。PCR 反应条件:95℃ 3 min;95℃ 30 s,61.3℃(M 引物)或 57.3℃(U 引物)30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环;72℃ 10 min。取 PCR 产物 10 μL 行 2%琼脂糖凝胶电泳,以双蒸水作为阴性对照,110 V 电泳 40 min,凝胶成像系统下照相。应用甲基化引物扩增出产物条带判断为存在完全 DNA 甲基化,应用非甲基化引物扩增出产物条带判断为不存在 DNA 甲基化(U),若同时出现扩增产物条带则表明存在部分 DNA 甲基化,完全 DNA 甲基化和部分 DNA 甲基化均被认为 DNA 甲基化阳性(M)。

1.4 统计学处理 采用 SAS 8.0 统计软件进行分析。采用 Fisher's 确切概率法分析膀胱癌患者及其对照组中 PCDH8 基因启动子甲基化状态的差异。采用四格表 χ² 检验分析膀胱癌患者中 PCDH8 基因启动子甲基化与临床病理特征之间的关系,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌组织和正常膀胱黏膜组织中 PCDH8 基因启动子甲基化情况 本研究发现 44 例膀胱癌组织 PCDH8 基因启动子甲基化(图 1),甲基化率为 55.7%(44/79);20 例正常膀胱黏膜组织中未检测到 PCDH8 基因启动子甲基化,甲基化率为

0%(0/20);表明膀胱移行细胞癌组织中 PCDH8 基因启动子甲基化率高于正常膀胱黏膜组织,PCDH8 基因启动子甲基化与膀胱癌的发生有关。



M:甲基化,U:非甲基化。

图 1 膀胱移行细胞癌组织中 PCDH8 基因启动子甲基化状态

2.2 PCDH8 基因启动子甲基化与膀胱癌临床病理特征的关系 见表 1。结果显示,膀胱移行细胞癌组织中 PCDH8 基因启动子甲基化与患者年龄、性别、肿瘤数目无关(P>0.05),但是与肿瘤的生长方式、大小形态、是否复发、分化程度以及浸润深度密切相关(P<0.05)。

表 1 PCDH8 基因启动子甲基化与膀胱癌临床病理特征的关系[n(%)]

项目	n	未甲基化	甲基化	P
性别				
男	56	23(41.1)	33(58.9)	0.3668
女	23	12(52.2)	11(47.8)	
年龄				0.9431
≤65	29	13(44.8)	16(55.2)	
>65	50	22(44.0)	28(56.0)	
肿瘤				0.2062
单发	30	16(53.3)	14(46.7)	
多发	49	19(38.8)	30(61.2)	
肿瘤直径				0.0098
≤3 cm	46	26(56.5)	20(43.5)	
>3 cm	33	9(27.3)	24(72.7)	
肿瘤形状				0.0367
乳头状	56	29(51.8)	27(48.2)	
非乳头状	23	6(26.1)	17(73.9)	
肿瘤复发				0.0015
复发	45	13(28.9)	32(71.1)	
原发	34	22(64.7)	12(35.3)	
病理分级				0.0017
G ₁ ~G ₂	53	30(56.6)	23(43.4)	
G ₃	26	5(19.2)	21(80.8)	
肿瘤分期				0.0078
T _a ~T ₁	48	27(56.3)	21(43.7)	
T ₂ ~T ₄	31	8(25.8)	23(74.2)	

3 讨论

膀胱癌在我国是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤,近年来虽然在膀胱癌的诊治方面取得了一些进展,但仍未能十分有效地阻止疾病的进展和改善患者预后,因此有必要对其发生、发展的相关因素进行深入研究^[9-10]。膀胱癌的发生发展是一个多因素相互作用的复杂过程,涉及到遗传学以及表观遗传学的改变。表观遗传是指在保持基因序列不变的情况下改变基因或蛋白的表达情况,并且能够通过有丝分裂或减数分裂稳定传递的现象,是基因组表达调控方式之一,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、染色质重塑以及非编码 RNA 的调控等几个方面。DNA 甲基化是目前研究的比较深入的表观遗传修饰形式,是肿瘤中最常见的分子水平改变之一。基因启动子区域的异常过度甲基化所致的基因失活在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用^[10-12];近年来,DNA 的甲基化研究成为肿瘤学研究的一个热点。

PCDH8 是原钙黏蛋白家族中的一新成员,其蛋白结构包括 6 个重复的细胞外区域、1 个跨膜区和 1 个胞内区。PCDH8 在细胞的生长、分化、细胞骨架形成以及细胞间的信号传导等方面发挥着重要作用^[6,8]。Yu 等^[6]研究发现在人类乳腺癌中存在 PCDH8 基因甲基化现象,并且与乳腺癌细胞的生长和迁移密切相关,启动子甲基化是 PCDH8 基因表达下调的主要原因。吕顺莉等^[13]研究发现 PCDH8 基因在正常胰腺组织中没有发生甲基化,但在胰腺癌细胞株中却出现甲基化现象,从而认为 PCDH8 基因甲基化是导致该基因表达减少的主要原因,与胰腺癌的发展密切相关。PCDH8 基因是一种抑癌基因,位于人染色体 13q14.3。在多种肿瘤中该基因常因启动子异常甲基化而表达减少或缺失,并与肿瘤的发生发展密切相关,PCDH8 基因启动子甲基化可以作为一种肿瘤诊断、检测和预后判断的分子标志物。在本研究中作者应用 MSP 同时检测了 20 例正常膀胱黏膜组织和 79 例膀胱移行细胞癌组织中 PCDH8 基因启动子的甲基化状态,发现 55.7%(44/79)的膀胱移行细胞癌组织中存在 PCDH8 基因甲基化,而在 20 例正常膀胱黏膜组织中均未检测到 PCDH8 基因甲基化,提示 PCDH8 基因启动子甲基化具有肿瘤特异性,是一个有价值的膀胱移行细胞癌的诊断标志物。

本研究中作者将 PCDH8 基因启动子甲基化状态与患者的临床病理资料以及患者的预后资料进行了分析时发现,直径小于或等于 3 cm 的膀胱癌中 PCDH8 基因甲基化率 43.5%,>3 cm 膀胱癌中 PCDH8 基因甲基化率为 72.7%;乳头状肿瘤中的甲基化率为 48.2%,非乳头状肿瘤中的甲基化率为 73.9%;原发性肿瘤中的甲基化率为 71.1%,复发性肿瘤中的甲基化率为 35.3%;高分化肿瘤中 PCDH8 基因甲基化率为 43.4%,在中低分化肿瘤中为 80.8%;在肌层浸润性膀胱癌中为 74.2%,非肌层浸润性膀胱癌中为 43.7%;差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这些结果提示 PCDH8 基因启动子甲基化与膀胱癌的生长方式、形状大小、是否复发、分化程度及浸润深度等肿瘤的生物行为有关^[14]。

综上所述,作者的研究结果表明在膀胱癌组织中 PCDH8 基因具有较高的甲基化率,并且与膀胱癌的发生、发展密切相关,原发性膀胱癌及浅表性膀胱癌均存在 PCDH8 基因甲基化现象,其可能成为膀胱癌早期诊断和监测的分子标志物。

参考文献:

[1] Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world[J]. World J Urol, 2009, 27(3): 289-293.

(上接第 79 页)

[8] 汤大明,张红金,景炳文,等.血小板在危重病患者全身炎症反应监测中的意义[J].中国危重病急救医学,2003,15(1):35-37.

[9] 张燕,吴建新.C 反应蛋白对重症急性胰腺炎的诊断价值[J].胃肠病学,2006,11(4):251-253.

[10] Salomone T, Tosi P, Palareti G, et al. Coagulative disorders in human acute pancreatitis role for the D-dimer[J]. Pancreas, 2003, 26(2): 111-116.

[11] 陈国胜,欧希龙,孙为豪,等.前列地尔对重症急性胰腺炎患者血小板参数的影响[J].四川医学,2006,26(9):913-914.

[2] Scosyrev E, Golijanin D, Wu G, et al. The burden of bladder cancer in men and women; analysis of the years of life lost[J]. BJU Int, 2012, 109(1): 57-62.

[3] Parkin DM. The global burden of urinary bladder cancer [J]. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2008, 218(Suppl 1): 12-20.

[4] Marzese DM, Gago FE, Orozco JO, et al. Aberrant DNA methylation of cancer-related genes in giant breast fibroadenoma: a case report [J]. J Med Case Reports, 2011, 5(1): 516.

[5] Caffarelli E, Filetici P. Epigenetic regulation in cancer development[J]. Front Biosci, 2011, 16: 2682-2694.

[6] Yu JS, Koujak S, Nagase S, et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(34): 4657-4665.

[7] Morris MR, Ricketts CJ, Gentle D, et al. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma [J]. Ncogene, 2011, 30(12): 1390-1401.

[8] He D, Zeng Q, Ren G, et al. Protocadherin8 is a functional tumor suppressor frequently inactivated by promoter methylation in nasopharyngeal carcinoma[J]. Eur J Cancer Prev, 2012, 21(6): 569-575.

[9] Jacobs BL, Lee CT, Montie JE. Bladder cancer in 2010: how far have we come? [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4): 244-272.

[10] Morgan TM, Clark PE. Bladder cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2010, 22: 242-249.

[11] Kim WJ, Kim YJ. Epigenetics of bladder cancer [J]. Methods Mol Biol, 2012, 863: 111-118.

[12] Hoffman AM, Cairns P. Epigenetics of kidney cancer and bladder cancer[J]. Epigenomics, 2011, 3(1): 19-34.

[13] 吕顺莉,高军,杜奕奇,等.胰腺癌细胞株原钙黏附蛋白 8 基因的甲基化状[J].中华胰腺病杂志,2010,10(3):190-192.

[14] Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics [J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(10): 1707-1721.

(收稿日期:2013-08-15 修回日期:2013-09-20)

[12] 赵艳玲,徐玉兰.前列地尔注射液对糖尿病肾病患者血浆纤维蛋白原的影响[J].安徽医药,2008,12(4):351-352.

[13] 王兴鹏,吴恺,张汝玲,等.前列腺素 E1 脂微球载体制剂对重症急性胰腺炎的治疗作用[J].中华急诊医学杂志,2006,15(5):433-436.

[14] 周峰,王春友,万赤丹,等.前列腺素 E1 在重症急性胰腺炎脏器功能保护中临床疗效观察[J].临床外科杂志,2004,12(9):540-541.

[15] 赵光丽.奥曲肽与前列地尔联合治疗急性胰腺炎疗效观察[J].牡丹江医学院学报,2008,29(3):46-47.

(收稿日期:2013-08-23 修回日期:2013-09-22)