

7DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00479

RASSF1A 和 APC 基因启动子区甲基化与前列腺癌的关系

梁 永^{1,2}, 董柏萍³, 邱 镇¹, 崔心刚⁴, 张连升¹, 侯建国⁵, 曹广文², 崔飞伦^{1*}, 张宏伟^{2*}

1. 江苏大学附属第一人民医院泌尿外科, 镇江 212013
2. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433
3. 山东兖州九一医院神经内科, 兖州 272000
4. 第二军医大学长征医院泌尿外科, 上海 200003
5. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究 Ras 相关区域家族 1A (Ras association domain family 1 isoform A, RASSF1A) 及结肠腺瘤性息肉病 (adenomatosis polyposis coli, APC) 基因启动子区 CpG 甲基化及与前列腺癌 (PCa) 之间的关系, 探索 PCa 早期诊断的检测方法。**方法** 收集 60 例 PCa 和 40 例前列腺增生 (BPH) 病例的组织标本及其相关的临床指标。应用亚硫酸氢盐修饰后测序法检测 PCa 组织及 BPH 组织中 RASSF1A、APC 基因启动子区 CpG 甲基化情况。**结果** PCa 组 RASSF1A、APC 基因 CG 位点甲基化率高于 BPH 组 (60.8% vs 14%, 48.84% vs 1.19%, $P < 0.05$); 基因甲基化率与 PSA、Gleason 评分、病理分期和 PCa 危险分期关系密切 ($P < 0.01$); RASSF1A 及 APC 基因甲基化联合检测用于判断 PCa 及 BPH 的敏感度和特异度是 95.74% 和 82.9%。**结论** RASSF1A、APC 基因启动子区甲基化与 PCa 发生及发展有关, 其甲基化率的变化与 PCa 的危险分期关系密切。检测前列腺组织中相关基因甲基化状态, 有望成为诊断早期 PCa 的一种方法。

[关键词] 前列腺肿瘤; Ras 相关区域家族 1A 基因; 结肠腺瘤性息肉病基因; 甲基化

[中图分类号] R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0479-05

Association of methylation status of RASSF1A and APC promoters with prostate cancer

LIANG Yong^{1,2}, DONG Bai-ping³, QIU Zhen¹, CUI Xin-gang⁴, ZHANG Lian-sheng¹, HOU Jian-guo⁵, CAO Guang-wen², CUI Fei-lun^{1*}, ZHANG Hong-wei^{2*}

1. Department of Urology, First Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China
2. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Neurology, Yanzhou Jiuyi Hospital, Yanzhou 272000, Shandong, China
4. Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
5. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the promoter methylation status of Ras association domain family 1 isoform A (RASSF1A) and adenomatosis polyposis coli promoter (APC) and its association with prostate cancer (PCa), so as to pave a way for early diagnosis of Pca. **Methods** The prostatic tissues and clinical data were collected from 60 patients with prostate cancer and 40 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues. Bisulphite Sequencing PCR was used to detect the promoter CpG methylation of RASSF1A and APC genes. **Results** The methylation rates of promoter CG sites of RASSF1A and APC genes in Pca group were significantly higher than those in the BPH group (RASSF1A: 60.8% vs 14%; APC: 48.84% vs 1.19%, $P < 0.05$). The methylation rates in RASSF1A and APC genes were significantly associated with PSA, Gleason score, pathologic stage and risk classification of PCa ($P < 0.01$). Combined detection of methylation status of RASSF1A and APC genes yielded a sensitivity of 95.74% and a specificity of 82.90% in differential diagnosis of PCa and BPH. **Conclusion** The promoter methylation of RASSF1A and APC genes are associated with the development and progression of PCa, and the changes of methylation rate is closely associated with risk classification of PCa. Combined detection of methylation in RASSF1A and APC genes may be a promising method for early diagnosis of prostate carcinoma.

[Key words] prostatic neoplasms; Ras association domain family 1A gene; adenomatosis polyposis coli gene; methylation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 479-483]

[收稿日期] 2012-01-09 **[接受日期]** 2012-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金 (81072377, 30671793). Supported by National Natural Science Foundation of China (81072377, 30671793).

[作者简介] 梁 永, 硕士生, 主治医师. E-mail: liangyong0537@163.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 0511-88915183, E-mail: pduifeilun@163.com; Tel: 021-81871061, E-mail: smmuhongwei@yahoo.com.cn

前列腺癌(PCa)是欧美国家男性最常见的恶性肿瘤之一^[1],在我国其发病率也已经跃居男性泌尿生殖系统恶性肿瘤的第3位^[2]。近来研究表明表观遗传调控异常伴随癌症的发生和发展^[3]。因此,针对PCa发生过程中基因甲基化进行研究不但可以认识其发生的机制,还可以为探索PCa早期诊断的检测方法和新的治疗方式提供理论依据。

Ras 相关区域家族 1A(Ras association domain family 1 isoform A, RASSF1A)基因是新型候选抑癌基因,CpG 岛甲基化使 RASSF1A 表达缺失,导致细胞的恶性转换^[4]。结肠腺瘤性息肉病(adenomatosis polyposis coli, APC)基因调节细胞生长及自身稳定,其相关区域的高甲基化,导致正常细胞黏附、生长、分化、增殖、凋亡调控和细胞内信号等方面的重要改变,使细胞发生癌变^[5]。目前,有关 RASSF1A、APC 基因启动子区在中国人 PCa 中甲基化状况的报道不多,尤其是两者联合甲基化发生方面的研究鲜有报道。本研究分析了两基因启动子区 CpG 甲基化率的变化以及两者联合甲基化与 PCa 危险分期的关系,探索 PCa 早期诊断的新思路和新方法。

1 资料和方法

1.1 临床资料 收集自 2007 年 10 月至 2011 年 9

月于江苏大学附属第一人民医院和第二军医大学长海医院泌尿外科就诊的住院患者的临床资料,经临床病理证实新发 PCa 60 例,良性前列腺增生(BPH) 40 例。以 PCa 患者为病例组,年龄 61~86 岁,平均(75.85±6.79)岁;BPH 患者为对照组,年龄 64~84 岁,平均(76.65±6.01)岁。两组年龄差异无统计学意义。

1.2 样本处理及 DNA 修饰 从患者的石蜡组织标本上切取石蜡切片,按照甲醛固定的石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒操作流程提取 DNA。DNA 提取量一般为 40~120 ng/μl,紫外分光光度计测定波长为 260 nm, DNA 无 RNA 和蛋白污染,保存于-20℃冰箱。采用亚硫酸氢盐修饰 DNA,严格按照 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit DNA (ZYMO Research)试剂盒步骤处理样本。

1.3 引物设计 应用 primer 5.0 软件进行 RASSF1A、APC 基因引物设计,引物序列详见表 1,选择 RASSF1A 基因转录起始位点上游 1 000 bp 至第一外显子区富含 CG 位点密集的基因区 961~1 159 为研究序列,基因长度 199 bp,包含 16 个 CG 位点;选择 APC 基因转录起始位点上游 1 000 bp 至第一外显子区富含 CG 位点密集的基因区 824~1 054 为研究序列,基因长度 231 bp,包含 13 个 CG 位点。

表 1 亚硫酸氢盐处理后 DNA 的 PCR 引物
Tab 1 PCR primer for bisulphate-treated DNA

Gene	Primer type	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
APC	Forward primer	GGG GTT AGG GTT AGG TAG GTT G	231
	Downstream primer	AAC ACC TCC ATT CTA TCT CCA ATA A	
RASSF1A	Forward primer	GGG TTT TAT AGT TTT GTA TTT AGG TTT TT	199
	Downstream prime	ACT CAA TAA ACT CAA ACT CCC CC	
RV-M		GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	
M ₁₃₋₄₇		CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	

RV-M, M₁₃₋₄₇: Identified by PCR primers

1.4 PCR 反应 反应体系 50 μl,其中 Hot Start Version Taq 0.5 μl,引物各 1 μl,dNTP 4 μl,修饰后的 DNA 8 μl,余下以 ddH₂O 补齐,所有反应皆以 ddH₂O 作为对照。PCR 反应条件:94℃ 2 min 40 s;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 40 s,37 个循环;72℃ 5 min。RASSF1A 基因产物片段大小为 199 bp,APC 基因产物片段大小为 231 bp。PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳(图 1),随机选取 10% 标本进行重复实验。PCR 产物经 Axy PrepPCR 清洁试剂盒纯化回收备用。

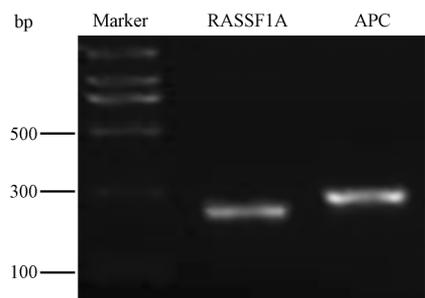


图 1 目的基因 RASSF1A、APC 电泳图
Fig 1 Electrophoresis of RASSF1A and APC genes

1.5 目的基因克隆 分别从 PCa 组和 BPH 组随机选取 3 个 DNA 样本进行同组混合。混合后 DNA 用于基因克隆测序, 实验步骤为: pMD18-T 载体 1 μ l, PCR 产物 1 μ l, Solution I 5 μ l, ddH₂O 补至 10 μ l, 混匀后 16 $^{\circ}$ C 反应 90 min, 全量(10 μ l) 加入 100 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 加热 60 s 后, 迅速再次冰浴 2 min, 加入 890 μ l 的 super optimal broth with catabolite repression (SOC) 培养液(无氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 震荡 220 r/min 培养 120 min, 全速离心后弃去上清液, 涂布于 LB 琼脂平板上培养, 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜。

1.6 PCR 鉴定克隆及测序 从克隆后菌落中各挑选 10 个白色孤立克隆, 置入 200 μ l LB 培养液中摇菌 3 h 后行 PCR 鉴定。PCR 反应体系: 鉴定引物(表 1)RV-M 1 μ l, M₁₃₋₄₇ 1 μ l, Taq PCR Master Mix 12.5 μ l, 模板(菌液) 1 μ l, ddH₂O 补至 25 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 RASSF1A 基因大小 351 bp(目的基因 199 bp+载体区 152 bp), 鉴定 APC 基因大小 382 bp(目的基因 231 bp+载体区 152 bp)(图 2)。鉴定合格后将克隆送上海迈浦生物科技有限公司测序。

检测的灵敏度和特异度。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 PCa 与 BPH 甲基化程度 RASSF1A、APC 基因在 60 例 PCa 中分别测序 960、780 个 CG 位点, 在 40 例 BPH 中分别测序 640、520 个 CG 位点。PCa 组 RASSF1A、APC 基因 CG 位点甲基化的发生率高于 BPH 组(60.8% vs 14%, $P < 0.05$; 48.84% vs 1.19%, $P < 0.05$, 图 3)。

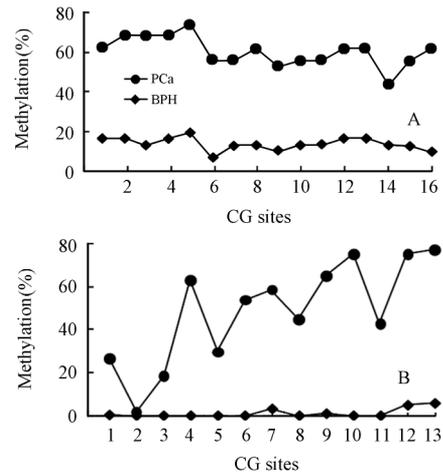


图 3 RASSF1A 与 APC 基因在 PCa 和 BPH 的 CG 位点及甲基化率

Fig 3 CG sites and methylation of RASSF1A and APC genes in Pca and benign hyperplasia tissues

PCA: Prostate cancer; BPH: Benign prostate hyperplasia. A: RASSF1A gene; B: APC gene

2.2 RASSF1A 和 APC 基因启动子区甲基化率与 PCa 临床特征的关系 PCa 组中, 前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA) 和 TNM 分期及 Gleason 评分越高, 甲基化率越高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。为分析与甲基化率的关系, 将 PCa 病例组根据血清 PSA、Gleason 评分和临床分期分为低危组($\leq T2a$, Gleason 评分 ≤ 6 和 PSA < 10 ng/ml)、中危组(T2b 或 Gleason 评分 = 7 或 PSA 10~20 ng/ml)、高危组(T2c 或 Gleason 评分 > 7 分或 PSA > 20 ng/ml) [6]。结果表明 RASSF1A 基因和 APC 基因甲基化率与 PCa 的危险分期密切相关, 差异有统计学意义($P < 0.001$), 两基因甲基化率越高 PCa 患者的危险分期越高(表 2)。提示基因的甲基化率的高低与 PCa 的治疗及预后密切相关。

2.3 RASSF1A 和 APC 基因启动子区甲基化率检测的诊断价值 以 PCa 患者和 BPH 患者为对象, 运用接受者操作特性曲线(receiver operating characteristic curve, ROC 曲线), 评价以 RASSF1A 和

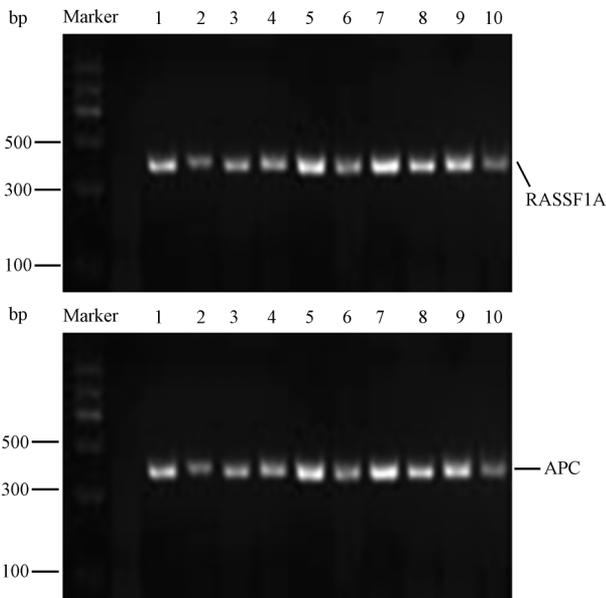


图 2 RASSF1A 与 APC 基因单克隆鉴定电泳图

Fig 2 Electrophoresis results of mono-clones of RASSF1A and APC genes

1-10: Different mono-clones

1.7 统计学处理 应用 SPSS 16.0 软件分析数据, 组间比较采用 χ^2 检验及精确概率检验。采用 ROC 曲线判定诊断的价值, 并计算单个基因和两者联合

APC 基因的启动子区甲基化率为检测指标的灵敏度和特异度。RASSF1A 和 APC 基因的 ROC 曲线下面积分别为 0.837 和 0.874,95% 置信区间分别为(0.732,0.942)和(0.775,0.972)。两者联合检测(RASSF1A 和 APC 基因同时发生甲基化)的 ROC 曲线下面积为 0.917,95% 置信区间为(0.844,0.990)。见图 4。

率 $\geq 14\%$ 定义为阳性, $<14\%$ 为阴性;APC 基因在 PCa 组和 BPH 组的甲基化率 $\geq 1.19\%$ 定义为阳性, $<1.19\%$ 为阴性;RASSF1A 和 APC 基因在 PCa 组和 BPH 组联合甲基化率 $\geq 6.9\%$ 定义为阳性, $<6.9\%$ 为阴性。结果表明两基因联合检测灵敏度为 95.74%,特异度为 82.9%,优于单基因检测($P=0.00$)。见表 3。

表 2 RASSF1A、APC 基因在不同 PCa 分组中的甲基化率
Tab 2 RASSF1A and APC gene methylation rates in different groups of prostate cancer (PCa)

Variable	n	RASSF1A		APC	
		Methylation (%)	P	Methylation (%)	P
PSA $\rho_B/(ng \cdot ml^{-1})$			<0.01		<0.001
<10	48	50.16		30.60	
10-20	7	44.28		41.25	
>20	5	62.48		72.32	
Gleason score			<0.001		<0.001
≤ 6	51	60.2		50.60	
7	5	65.00		72.40	
>7	4	97.40		78.20	
TNM			<0.001		<0.001
$\leq T_{2a}$	52	78.06		60.20	
T_{2b}	5	80.33		72.83	
T_{2c}	3	100.00		100.00	
Risk staging			<0.001		<0.001
Low-risk	31	48.35		30.36	
Middle-risk	17	64.80		59.70	
High-risk	12	87.30		81.20	

PSA: Prostate specific antigen

表 3 RASSF1A 和 APC 基因甲基化率检测 PCa 的敏感度和特异度
Tab 3 Sensitivity and specificity of methylation rates of RASSF1A and APC in prostate cancer screening

Screening test	Result	PCa	BPH	Sensitivity (%)	Specificity (%)
RASSF1A	+	43	8	71.67	80
	-	17	32		
APC	+	52	4	86.67	90
	-	8	36		
RASSF1A and APC	+	45	6	95.74	82.9
	-	2	29		

PCa: Prostate cancer; BPH: Benign prostate hyperplasia

3 讨论

2010 年 3 月,美国癌症学会(ACS)更新的《前列腺癌早期筛查指南》中提出,在临床病理诊断中经常遇到 PCa 与 BPH(特别是重度不典型增生)的鉴别诊断问题,早期发现和诊断 PCa 非常重要。因此联合多项检测指标诊断 PCa 在临床上迫切和必要的。DNA 甲基化异常现象在病理确诊前就能被检测出^[7]。PSA 作为目前 PCa 早期筛查的唯一指标,敏感度达到 94.7%,而特异性只有 18.4%^[8]。研究显示 RASSF1A、APC 等基因的甲基化率对早期 PCa 的诊断特异度达 93%,显著高于 PSA 的特异度;敏感度达 78%^[8]。因而通过检测前列腺组织中的 RASSF1A、APC 基因的甲基化状态有望成为 PCa 早期筛查的理想指标。

本研究中 RASSF1A 和 APC 基因的 ROC 曲线下面积分别为 0.837 和 0.874,两基因联合检测 ROC 曲线下面积为 0.917,95% 置信区间为(0.844,0.990),RASSF1A 基因和 APC 基因联合甲基化检测 PCa 的灵敏度和特异度可达到 95.74% 和 82.9%,明显优于单一基因检测。早在 1896 年,Ashworth 首次提出循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)的概念^[9]。Okegawa 等^[10]在激素抵抗性 PCa 患者 CTC 中检测出 RASSF1A、APC 等基因甲基化异常,其研究对象是骨转移患者,易检测出 CTC。有报道检测肝癌、进展期乳腺癌患者 CTC 对早期发现肿瘤的远处转移、个性

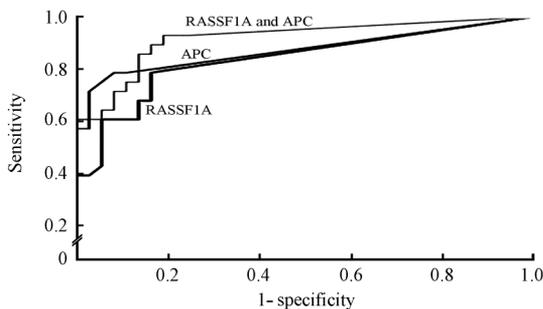


图 4 RASSF1A 和 APC 基因及两者联合检测的 ROC 曲线图

Fig 4 ROC curves of detection with RASSF1A and APC alone or their combination

在 PCa 组检测到 RASSF1A 和 APC 基因同时发生甲基化的有 47 例,BPH 组有 35 例,由其 CG 位点可计算得到两者联合甲基化率在癌组织和增生组织中分别是 40.26% 和 6.9%。以增生组织中的单个基因和基因联合甲基化率大小为判断依据进行分类,RASSF1A 基因在 PCa 组和 BPH 组的甲基化

化治疗有指导意义^[11-12]。但通过检测血中肿瘤细胞基因甲基化异常进行早期PCa的诊断仍需进一步开展研究并验证。

RASSF1A基因和APC基因是2个抑癌基因,其表观遗传学特征的改变将会影响肿瘤的发生和发展。本研究采用目前公认的研究基因甲基化的金标准——亚硫酸氢盐修饰后测序法(bisulphite sequencing PCR, BSP)^[13],对PCa组织及BPH组织中RASSF1A、APC基因启动子区CpG甲基化情况进行了检测。结果显示,RASSF1A基因在PCa与BPH CG位点的甲基化发生率为60.8%、14.0%;APC基因在PCa与BPH CG位点的甲基化发生率为48.84%、1.19%,PCa组RASSF1A、APC基因甲基化率均高于BPH组($P < 0.05$)。本研究还发现,RASSF1A基因和APC基因的甲基化率与PCa危险分期相关。PSA和TNM分期及Gleason评分越高,甲基化率越高。Gleason评分是评价PCa细胞分化程度的一个评价体系。癌细胞的分化程度与肿瘤的恶性程度和患者的预后密切相关,一般来说,癌细胞分化越差,肿瘤的恶性程度就越高,PCa的Gleason评分越高。PCa的危险分期亦与其治疗和预后有关。据报道与PCa临床发病有关的甲基化异常基因还包括:GSTP1、RARβ、ECAD、CD44、EDNRB、MGMT、P14、P16等^[8,14]。有研究表明,DNA甲基转移酶(DNMT1)减少能阻断细胞分化或抑制肿瘤形成^[15]。反义DNA甲基转移酶基因在体外实验中具有抗肿瘤活性,并且能在一定程度上逆转恶性表型^[16]。因而,设计、开发高效稳定的表观药物成为癌症治疗中的一个重要靶点,研发小剂量的特异抑制剂可能提供更多的治疗恶性肿瘤的手段^[17]。恶性肿瘤相关基因启动子区高甲基化分析的表观遗传学研究,将揭示更多的尚未所知的表观调控变化,为表观治疗在癌症中的应用开辟新的天地。本研究仍需扩大样本以进一步验证,同时可结合蛋白组学进一步探讨目的基因在PCa发生、发展中的作用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60:277-300.
- [2] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25:77-80.
- [3] Sebova K, Fridrichova I. Epigenetic tools in potential anticancer therapy[J]. Anticancer Drugs, 2010, 21:565-577.
- [4] Van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin[J]. J Biol Chem, 2002, 277:17901-17905.
- [5] Chealde J P, Krawczak M, Thomas M W, Hodges A K, Al-Tassan N, Fleming N, et al. Different combinations of biallelic APC mutation confer different growth advantages in colorectal tumours[J]. Cancer Res, 2002, 62:363-366.
- [6] Mohler J, Bahnson R R, Boston B, Busby J E, D'Amico A, Eastham J A, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: prostate cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8:162-200.
- [7] Palmisano W A, Divine K K, Saccomanno G, Gilliland F D, Bayliss S B, Herman J G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum [J]. Cancer Res, 2000, 60:5954-5958.
- [8] Rouprêt M, Hupertan V, Yates D R, Catto J W, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13:1720-1725.
- [9] Ghossein R A, Carusone L, Bhattacharya S. Review: polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells; application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas[J]. Diagn Mol Pathol, 1999, 8:165-175.
- [10] Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E. Association of circulating tumor cells with tumor-related methylated DNA in patients with hormone-refractory prostate cancer [J]. Int J Urol, 2010, 17:466-475.
- [11] Louha M, Poussin K, Ganne N, Zylberberg H, Nalpas B, Nicolet J, et al. Spontaneous and iatrogenic spreading of liver-derived cells into peripheral blood of patients with primary liver cancer [J]. Hepatology, 1997, 26:998-1005.
- [12] Cristofanilli M, Budd G T, Ellis M J, Stopeck A, Matera J, Miller M C, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351:781-791.
- [13] Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA methylation: bisulphite modification and analysis[J]. J Vis Exp, 2011(56):3170.
- [14] Singal R, Ferdinand L, Reis I M, Schlesselman J J. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease[J]. Oncol Rep, 2004, 12:631-637.
- [15] Laird P W, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson S L, Jung W E, Li E, et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation [J]. Cell, 1995, 81:197-205.
- [16] MacLeod A R, Szyf M. Expression of antisense to DNA methyltransferase mRNA induces DNA demethylation and inhibits tumorigenesis[J]. J Biol Chem, 1995, 270:8037-8043.
- [17] Sebova K, Fridrichova I. Epigenetic tools in potential anticancer therapy[J]. Anticancer Drugs, 2010, 21:565-577.