

· 临床研究 ·

前列腺癌相关基因PAX5启动子甲基化的临床意义

殷灵瑜¹, 陈文柏², 赵耀¹, 胡 阡¹, 刘志伟³, 李洪春¹, 马 萍², 蓝 婷¹, 李世宝^{2*}¹徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; ²徐州医科大学附属医院检验科, 江苏 徐州 221002; ³徐州医科大学形态学学科实验中心, 江苏 徐州 221004

[摘要] **目的:**探讨前列腺癌相关基因PAX5基因启动子甲基化作为前列腺癌生物标志物的临床价值。**方法:**采用实时定量RT-PCR(qRT-PCR)检测正常前列腺细胞系(RWPE-1)和前列腺癌细胞系(LNCaP、PC-3、DU145)中PAX5 mRNA的表达, 甲基化特异性PCR(MSP)法分析4株前列腺细胞的甲基化状态; 去甲基化药物处理后, qRT-PCR法检测肿瘤细胞PAX5基因mRNA表达; 实时定量MSP法检测64例前列腺癌患者、22例前列腺增生患者与47例健康体检者血清中PAX5基因启动子甲基化水平, 并统计分析血清PAX5基因启动子甲基化水平与临床病理参数的相关性; 运用受试者工作特征曲线(ROC曲线)分析PAX5基因启动子甲基化在前列腺癌诊断中的价值。**结果:**qRT-PCR结果显示, 与正常前列腺上皮细胞RWPE-1相比, PAX5 mRNA在3株前列腺癌细胞中均表达下调, 而且均可检测到PAX5基因启动子甲基化, 而正常前列腺上皮细胞RWPE-1不存在PAX5基因启动子甲基化; 去甲基化药物可恢复PAX5基因mRNA表达; 实时定量MSP结果显示, 前列腺癌患者的血清PAX5基因启动子甲基化水平显著高于前列腺增生患者和健康体检者; 前列腺癌患者的血清PAX5基因启动子甲基化率与Gleason评分和TNM分期有关; ROC结果显示PAX5基因的诊断价值优于前列腺特异抗原PSA。**结论:**本研究结果提示启动子甲基化是前列腺癌细胞中PAX5基因表达下调的主要原因, 血清PAX5启动子甲基化是一种潜在的前列腺癌诊断标志物。

[关键词] PAX5; 启动子甲基化; 前列腺癌**[中图分类号]** R737.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)01-072-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190113

Clinical significance of promoter methylation of prostate cancer related gene PAX5

Yin Lingyu¹, Chen Wenbai², Zhao Yao¹, Hu Kan¹, Liu Zhiwei³, Li Hongchun¹, Ma Ping², Lan Ting¹, Li Shibao^{2*}¹Medical Technology Institute of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ²Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002; ³Morphology Research Experimental Center, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical value of PAX5 promoter methylation as a biomarker of prostate cancer. **Methods:** The expression of PAX5 mRNA in prostate cell lines (RWPE-1, LNCaP, PC-3, and DU145) was detected by real time RT-PCR. Methylation-specific PCR (MSP) was used to analyze the methylation status of four prostate cells. Real-time RT-PCR was used to detect the expression of PAX5 mRNA in tumor cells. Real-time MSP was used to detect the expression of PAX5 gene in 64 cases of prostate cancer, 22 cases of benign prostatic hyperplasia and 47 healthy controls. The methylation level of PAX5 gene promoter in the serum of patients with prostate cancer was analyzed by ROC curve. The methylation level of PAX5 gene promoter in the serum of patients with prostate cancer was analyzed statistically. **Results:** Real-time RT-PCR showed that PAX5 mRNA was down-regulated in three prostate cancer cells compared with normal prostate epithelial cell RWPE-1; PAX5 gene promoter was detected in LNCaP, PC-3 and DU145 prostate cancer cells. Methylation of PAX5 gene promoter in normal prostate epithelial cell RWPE-1; the expression of PAX5 gene mRNA was restored by demethylation drug; Real-time MSP result showed that the methylation level of serum PAX5 gene promoter of prostate cancer patient was significantly higher than that of benign prostatic hyperplasia patients and healthy subjects. The methylation rate of PAX5 gene promoter was correlated with Gleason score and TNM staging; ROC results showed that the diagnostic value of PAX5 gene was superior to that of PSA. **Conclusion:** The methylation status of PAX5 gene in prostate cancer cells is the main reason for the down-regulation of PAX5 gene expression. Methylation of PAX5 promoter is a potential marker for prognosis of prostate cancer.

[Key words] PAX5; promoter methylation; prostatic cancer**[基金项目]** 江苏省自然科学基金(BK20160233)

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(01):072-076]

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sdjnshlb@163.com

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是危害男性健康的最常见恶性肿瘤之一,其发病率高居美国男性恶性肿瘤之首,占男性癌症死亡人数的第2位^[1]。近年来随着生活方式改变和人口老龄化,我国PCa发病率呈逐年上升趋势^[2]。目前,PCa的诊断仍依赖于前列腺特异抗原(PSA)的筛查^[3],但血清PSA升高并无前列腺癌特异性,前列腺增生、前列腺炎、急性尿潴留、膀胱镜检查、导尿和直肠指诊等均可能造成血清PSA水平增高,从而导致PCa的过度诊疗^[4]。因此,临床上迫切需要寻找一种特异性的PCa标志物,以提高PCa的诊疗率。

PAX5基因定位于9p13染色体^[5],是参与生物体生长发育的核转录因子^[6]。最近研究表明PAX5基因在包括肝癌^[7]、乳腺癌^[8]和肺癌^[9]等多种肿瘤组织中存在启动子甲基化,提示PAX5基因可能是一个潜在的抑癌基因,而目前PAX5基因在PCa中的表达情况尚未有报道。本研究通过分析PCa中PAX5启动子甲基化介导表达沉默以及其甲基化作为PCa生物标志物的临床价值,以期寻找理想的PCa生物标志物。

1 对象和方法

1.1 对象

收集徐州医科大学附属医院2016年1—6月临床病理确诊的64例PCa患者血清,样本收集前所有患者均未接受任何治疗,患者中位年龄72(55~91)岁。同时选取22例前列腺增生患者和47例健康体检者作为对照组,中位年龄70(57~88)岁。各组年龄差异无统计学意义。所有标本分离血清后快速置于-80℃冻存。本研究经徐州医科大学附属医院伦理委员会批准,所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

RWPE-1细胞培养于含有0.2%生长因子的K-MSF培养基中,LNCaP、PC-3和DU145细胞用10%胎牛血清、青霉素和链霉素各100 U/mL的RPMI1640培养基培养,所有细胞均在37℃、5% CO₂培养箱中培养。RWPE-1、LNCaP、PC-3和DU145细胞系均购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。

1.2.2 去甲基化药物处理

将对数生长期的前列腺细胞以适宜密度接种,24 h后加入去甲基化试剂5-aza-dC(Sigma公司,美国)终浓度为5 μmol/L,每24 h更换含同浓度5-aza-dC的新鲜培养液,连续培养2 d,分别收集上述培养

细胞,TRIzol试剂提取总RNA,-80℃保存备用。

1.2.3 Real-time RT-PCR检测细胞mRNA表达水平

TRIzol试剂提取前列腺细胞系总RNA,按照PrimScript™ RT Reagent Kit(TaKaRa公司,大连)说明书进行逆转录。以逆转录后的cDNA为模板,于罗氏LightCycler 480 II中扩增。扩增条件:预变性95℃ 5 min;PCR反应95℃ 15 s,60℃ 34 s,45个循环;同样条件下实验重复3次。以GAPDH为内对照基因,采用2^{-ΔΔC_t}法计算PAX5 mRNA相对表达水平。所需引物序列如下:PAX5上游引物5'-CAAAC-CAAAGGTCGCCACAC-3',下游引物5'-GATGGAA-CTGACGCTAGGCA-3';GAPDH上游引物5'-GAGA-AGGCTGGGGCTCATTT-3',下游引物5'-AGTGATG-GCATGGACTGTGG-3'(上海Sangon Biotech公司)。

1.2.4 甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)

采用DNA提取试剂盒提取细胞系DNA,按照EZ DNA Methylation-Gold Kit(ZYMO公司,美国)说明书进行DNA亚硫酸盐修饰。运用MethPrimer软件设计MSP引物,包括甲基化引物(M)和非甲基化引物(U)。甲基化引物(M):上游引物5'-TTTAAG-TAGCGGGTTTGTATATGGAGAT-3',下游引物5'-AACCGCACCTTCTATTTAAAACATACG-3';非甲基化引物(U):上游引物5'-TAAAAATAAAAATTTGGTT-TGTGTTTG-3',下游引物5'-CCTCTATTTAAAACAT-ACACTTAAAAATCACA-3'(上海Sangon Biotech公司)。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,共38个循环;72℃再延伸10 min。3%的琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物。

1.2.5 实时定量MSP

使用DNA提取试剂盒提取血清游离DNA,按照EZ DNA Methylation-Gold Kit说明书进行DNA亚硫酸盐修饰。以亚硫酸盐修饰的血清游离DNA为模板,进行实时荧光定量PCR分析血清中PAX5基因甲基化水平(引物同1.2.4)。反应条件:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸34 s,共45个循环;按照下列公式计算PAX5基因甲基化水平:甲基化率(%)=甲基化的DNA拷贝数/(甲基化的DNA拷贝数+未甲基化的DNA拷贝数)×100%。

1.3 统计学方法

所有统计学分析均通过SPSS 13.0统计软件进行,前列腺细胞株中PAX5基因表达差异使用方差分析,实验组与对照组之间的差异采用Student-t检

验进行分析;比较PAX5基因表达与启动子甲基化和前列腺癌主要临床病理参数之间关系时采用卡方检验。受试者工作特征曲线(ROC曲线)分析其诊断价值。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺细胞系中mRNA的表达情况

Real-time PCR结果显示:与正常前列腺上皮细胞(RWPE-1)相比,LNcaP、PC-3和DU145细胞PAX5 mRNA表达均显著下调(图1),去甲基化药物处理后,LNcaP、PC-3和DU145细胞中PAX5基因mRNA表达均明显升高(图2),提示PAX5基因表达沉默在PCa进展中可能发挥重要作用。

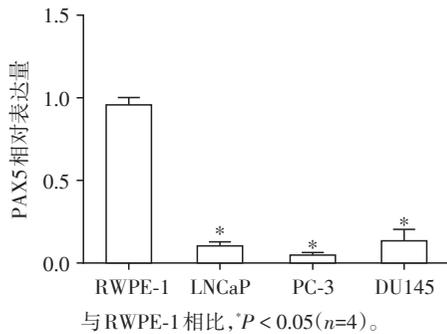


图1 PAX5基因在前列腺上皮细胞和PCa细胞系中mRNA的相对表达量

Figure 1 Relative expression of mRNA of PAX5 gene in prostate epithelial cells and prostate cancer cell lines

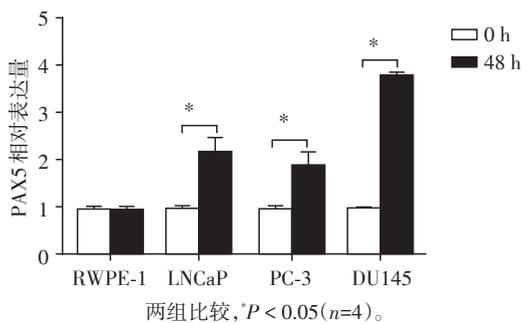


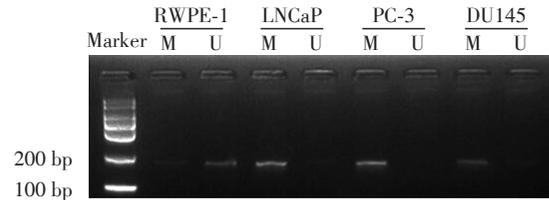
图2 去甲基化药物处理后各细胞系相对表达量

Figure 2 Relative expression of prostate cell lines after demethylation

2.2 PCa细胞系中PAX5的甲基化状态

为了解PAX5在PCa细胞株中沉默的可能机制,分析PAX5基因结构发现,在PAX5基因的转录起始位点有CpG岛存在。MSP检测4株细胞系PAX5基因启动子甲基化状态发现,3株PCa细胞系

中均存在甲基化的DNA,而正常前列腺上皮细胞系RWPE-1中未检测到甲基化的DNA(图3),提示PCa细胞株中的PAX5基因沉默可能与其启动子区CpG岛甲基化密切相关。



M:甲基化产物;U:非甲基化产物。

图3 MSP法检测前列腺上皮细胞和PCa细胞系甲基化情况
Figure 3 Detection of methylation status of prostate epithelial cells and prostate cancer cell lines by MSP

2.3 PCa、前列腺增生患者及健康体检者血清中PAX5的甲基化状态

为检测PAX5在PCa患者血清中的甲基化情况,使用实时定量MSP检测64例PCa患者,22例前列腺增生患者及47例健康体检者血清。结果显示,PCa患者血清中PAX5基因的甲基化率,远高于前列腺增生患者和健康体检者(图4),同时将PCa患者的血清PSA水平与血清PAX5水平比较,ROC曲线结果显示PAX5 cut-off值为0.745时,灵敏度为0.758,特异度为0.857;PSA cut-off值为7.51 ng/mL时,灵敏度为0.530,特异度为0.952(图5),表明PAX5基因启动子甲基化是一个潜在区分PCa患者与非癌患者的生物标志物。

2.4 PAX5启动子甲基化率与PCa临床病理特征的关系

PCa患者的血清PAX5基因启动子甲基化率与Gleason评分和TNM分期有关,高Gleason评分(8~10分)PCa患者血清PAX5基因启动子甲基化率明显高于低Gleason评分(6~7分)(图6),Ⅲ~Ⅳ期PCa患者血清PAX5基因启动子甲基化率明显高于I~II期(图7)。

3 讨论

目前,PCa仍是医学界难以攻克的难题,全球范围内病死率估计于2016年达到8%,仅次于皮肤癌^[10-11]。目前,PCa的诊断主要依赖于血清中的PSA水平,并且其一般治疗方法包括前列腺切除术、放疗及化疗^[12]。然而随着肿瘤的扩散和转移,手术及放疗已不能很好地应对PCa的发生。因此,为

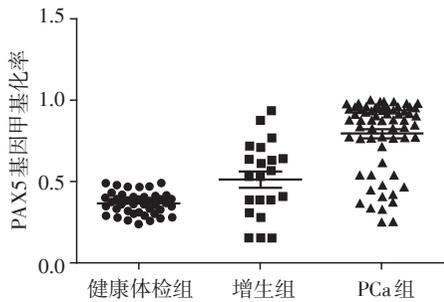


图4 PAX5基因甲基化率在健康体检组、增生组、PCa组的分布

Figure 4 Distribution of PAX5 gene methylation rate in the healthy physical examination group, proliferative group and prostate cancer group

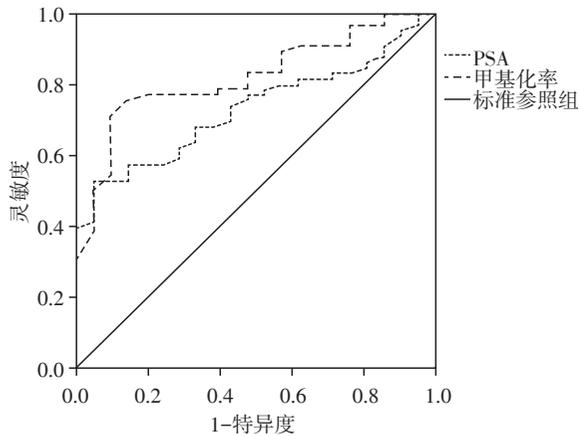


图5 PAX5基因甲基化率(cut-off值为0.745)和PSA水平(cut-off值为7.51 ng/mL)的ROC曲线

Figure 5 ROC curve of PAX5 gene methylation rate (cut-off value 0.745) and PSA level (cut-off value 7.51 ng/mL)

了采取更有效的治疗方法及改善预后,必须找到即时诊断指标。

PAX(the pair box)由9个基因组成,对哺乳动物细胞分化及肿瘤形成具有重要调控作用。在某些特定组织细胞修复和再生过程中,PAX基因表现出了关键作用。因此,PAX基因可以在多种肿瘤细胞中表达。经研究发现PAX5是B细胞特异性激活蛋白,在B细胞分化、神经发育和精子发生的早期阶段具有重要作用^[13]。PAX5广泛表达于人的胚胎组织^[14]以及一些肿瘤组织包括膀胱癌^[15]等。Liu等^[7]研究发现PAX5在正常人肝组织中表达,但肝癌细胞系中表达沉默或下调,并且与其相邻的正常组织相比,原发性肝癌中PAX5的平均表达水平显著降低($P < 0.001$)。经过实验证明在肝癌中PAX5启动子甲基化是导致其下调的原因。同时,赵丽娟^[16]在

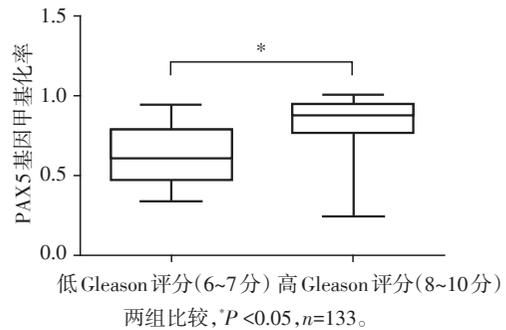


图6 血清PAX5基因启动子甲基化率与Gleason评分

Figure 6 Serum PAX5 gene promoter methylation rate and Gleason score

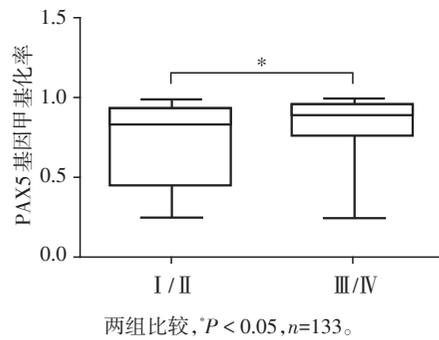


图7 血清PAX5基因启动子甲基化率与TNM分期

Figure 7 Serum PAX5 gene promoter methylation rate and TNM staging

肺癌中发现PAX5启动子存在甲基化,并经过去甲基化药物处理后PAX5恢复了表达。Palmisano等^[9]研究表明在多种恶性肿瘤中PAX5启动子甲基化能够使PAX5基因沉默,且甲基化程度与临床患者预后呈负相关。同样,本实验结果显示在PCa细胞系中PAX5基因的mRNA水平是下调的,MSP检测结果显示,3株PCa细胞中PAX5基因均存在启动子甲基化,并经过去甲基化药物处理后,PAX5基因恢复了表达,从而可以说明PAX5基因启动子甲基化是PCa细胞中PAX5基因表达下调的主要原因。为了更直接更客观地反映PAX5基因启动子甲基化的情况,本研究通过实时定量MSP检测64例PCa患者,22例前列腺增生患者及47例健康体检者血清,实验结果表明PCa患者的血清PAX5基因启动子甲基化率显著高于前列腺增生患者和健康体检者。此外,还分析PCa患者的血清PAX5基因启动子甲基化率与Gleason评分和TNM分期的相关性,高Gleason评分(8~10分)PCa患者血清PAX5基因启动子甲基化率明显高于低Gleason评分(6~17分),Ⅲ~Ⅳ期PCa患者血清PAX5基因启动子甲基化率明显高于I~II

期。因此,认为PAX5可能是PCa中的抑癌基因之一,并且血清PAX5启动子甲基化是一种潜在的PCa诊断标志物。

综上所述,本文研究了PAX5在PCa中的甲基化及其与临床病理特征的相关性。PAX5可能抑制PCa的发生发展过程,因此,PAX5有可能成为治疗PCa潜在的药物靶点。而PAX5甲基化与病理特征之间的作用机制尚未明确,需要进行深入的分子生物学研究。

[参考文献]

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917
- [2] Bray F, Ren JS, Masuyer E, et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(5):1133-1145
- [3] Dimakakos A, Armakolas A, Koutsilieris M. Novel tools for prostate cancer prognosis, diagnosis, and follow-up [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:890697
- [4] Shankar E, Bhaskaran N, MacLennan GT, et al. Inflammatory signaling involved in high-fat diet induced prostate diseases [J]. *J Urol Res*, 2015, 2(1):212-218
- [5] Stapleton P, Weith A, Urbánek P, et al. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9 [J]. *Nat Genet*, 1993, 3(4):292-298
- [6] Carotta S, Holmes ML, Pridans C, et al. Pax5 maintains cellular identity by repressing gene expression throughout B cell differentiation [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5(21):2452-2456
- [7] Liu W, Li X, Chu ES, et al. Paired box gene 5 is a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through interaction with p53 signaling pathway [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3):843-853
- [8] Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer [J]. *J Pathol*, 2011, 225(2):222-231
- [9] Palmisano WA, Crume KP, Grimes MJ, et al. Aberrant promoter methylation of the transcription factor genes PAX5 alpha and beta in human cancers [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15):4620-4625
- [10] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1):7-30
- [11] Smith RA, Andrews K, Brooks D, et al. Cancer screening in the United States, 2016: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):96-114
- [12] Boccellino M, Alaia C, Misso G, et al. Gene interference strategies as a new tool for the treatment of prostate cancer [J]. *Endocrine*, 2015, 49(3):588-605
- [13] Nutt SL, Urbánek P, Rolink A, et al. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(4):476-491
- [14] Li X, Cheung KF, Ma X, et al. Epigenetic inactivation of paired box gene 5, a novel tumor suppressor gene, through direct upregulation of p53 is associated with prognosis in gastric cancer patients [J]. *Oncogene*, 2012, 31(29):3419-3430
- [15] Babjuk M, Soukup V, Mares J, et al. The expression of PAX5, p53 immunohistochemistry and p53 mutation analysis in superficial bladder carcinoma tissue. Correlation with pathological findings and clinical outcome [J]. *Int Urol Nephrol*, 2002, 34(4):495-501
- [16] 赵丽娟. 抑癌基因PAX5在非小细胞肺癌中的甲基化及功能研究 [C]. 重庆:重庆医科大学, 2015

[收稿日期] 2017-07-05