

GSTP1基因启动子甲基化与前列腺癌的相关性研究

邢红宇¹, 朱明月², 李伟², 林波²

1. 海南省中医院检验科, 海南海口 570203 ;
2. 海南医学院海南省肿瘤发生和干预重点实验室, 海南海口 570203

[摘要] 背景与目的: 谷胱甘S-转移酶P1 (glutathione S-transferase P1, GSTP1) 保护细胞避免DNA损伤和癌细胞形成, 抑制GSTP1活性可以导致DNA损伤的敏感性增强和癌变发生的概率增加。该研究旨在研究前列腺癌组织中GSTP1基因甲基化与前列腺癌临床病理特征的关系。**方法:** 收集2015年4月—2016年12月在海南省中医院和海口市人民医院住院的46例前列腺癌患者的前列腺癌组织及对应的包埋癌旁组织, 应用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测GSTP1 mRNA水平, 通过甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)检测GSTP1基因启动子区域CpG岛的甲基化表达水平, 然后与性别、年龄及肿瘤TNM分期等临床数据进行关联分析。**结果:** 与癌旁组织比较, 前列腺癌组织中GSTP1 mRNA表达水平降低($P < 0.01$), 并且GSTP1 mRNA降低与GSTP1基因甲基化呈负相关($P < 0.05$); 前列腺癌和癌旁组织中甲基化阳性率分别为66.0%和23.5%, 差异有统计学意义($P < 0.05$); GSTP1基因的启动子甲基化频率与肿瘤分期显著相关($r = 0.73$, $P < 0.05$), 而与其他临床特征无明显相关性($P > 0.05$)。**结论:** GSTP1基因启动子甲基化可能造成GSTP1基因低表达, 与前列腺癌发病明显相关, 有望成为检测及诊断前列腺癌的新方法。

[关键词] 前列腺癌; 谷胱甘S-转移酶P1; 甲基化; 相关性

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.11.007

中图分类号: R737.25 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)11-0879-05

Association between GSTP1 gene promoter methylation and prostate cancer XING Hongyu¹, ZHU Mingyue², LI Wei², LIN Bo² (1. Department of Clinical Laboratory, Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou 570203, Hainan Province, China; 2. Hainan Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention, Hainan Medical University, Haikou 570203, Hainan Province, China)

Correspondence to: XING Hongyu E-mail: ku2136548@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) protects cells from DNA damage and cancer cell formation. Inhibition of GSTP1 activity could increase susceptibility to DNA damage and increase the risk of cancer occurrence, which was associated with cancer. This study aimed investigate the relationship between GSTP1 gene methylation and clinical pathological features of prostate cancer. **Methods:** Forty-six patients with prostate cancer who were hospitalized in Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine and Haikou People's Hospital from Apr. 2015 to Dec. 2016 were enrolled in this study. The expression level of GSTP1 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). The methylation level of CpG island in GSTP1 gene promoter region was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), then its associations with the gender, age, tumor TNM staging and other clinical data were analyzed. **Results:** The expression of GSTP1 mRNA in prostate cancer tissues was lower than that in para-cancerous tissues ($P < 0.01$), and the decrease of GSTP1 mRNA was negatively correlated with GSTP1 methylation ($P < 0.05$). The positive rates of methylation in prostate cancer and para-cancerous tissues were 66.0% and 23.5%, respectively, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The promoter methylation frequency of GSTP1 gene was significantly correlated with different

tumor staging ($r=0.73$, $P<0.05$). However, compared with other clinical trials, there was no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion:** *GSTP1* gene promoter methylation may cause low expression of *GSTP1* gene, which is closely related to the pathogenesis of prostate cancer. Monitoring *GSTP1* gene promoter methylation is expected to be a new method for the detection and diagnosis of prostate cancer.

[**Key words**] Prostate cancer; Glutathione S-transferase P1; Methylation; Correlation

随着我国人口老龄化速度加快及环境污染日益严重,我国癌症发病率居高不下,其中男性前列腺癌发病率逐年增加。目前,对前列腺癌的诊断和评价其预后指标,主要是根据临床特征、病理结果,以及检测血前列腺特异抗原(prostate-specific antigen, PSA)动态变化等,但临床研究表明,临床上只借助这类指标不能全面概括前列腺癌的发病状况。表观遗传的主要修饰方式之一是DNA甲基化,通过甲基化可调控基因表达水平、保持基因结构稳定性,在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用。有研究发现,DNA甲基化在多种癌症细胞中异常表达,并且在不同组织上DNA甲基化存在不同表达模式^[1]。谷胱甘S-转移酶P1(glutathione S-transferase P1, *GSTP1*)可代谢多种致癌化合物,起到解毒的作用,保护细胞避免DNA损伤和抑制癌基因激活。*GSTP1*最初是在人胎盘组织中被发现的,在肾、肺及前列腺等多数组织中表达。有研究表明,在前列腺癌组织中,*GSTP1*基因被抑制,这可能为及时诊断和治疗前列腺癌提供了新的方向^[2]。*GSTP1*基因可能成为诊断前列腺癌新的可靠标志物之一。目前,关于前列腺癌组织中*GSTP1*基因甲基化与前列腺癌患者临床病理特征的关系尚不明确。本研究通过回顾性分析前列腺癌患者临床病理特征与*GSTP1*基因甲基化的关系,为深入研究*GSTP1*基因甲基化在前列腺癌中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样本

收集2015年4月—2016年12月在海南省中医院和海口市人民医院肿瘤及泌尿外科进行住院治疗的患者的前列腺癌石蜡包埋组织及对应的前列腺癌旁石蜡包埋组织46例,所有组织均经显微切割所得,癌旁组织是指距病灶2 cm的组

织。患者年龄50~90岁,平均76岁,所有患者均经过病理穿刺活检确诊。根据美国临床肿瘤协会推荐的前列腺癌分期标准进行Jewett临床分期: B期12例, C期18例, D期16例。所有分期患者均行尿道前列腺电切术后病理诊断证实。

1.2 仪器与试剂

DNA、RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司,亚硫酸氢钠修饰试剂盒购自英国Intergen公司,酶标仪购自美国Biotek公司,ABI7300PCR扩增仪购自美国ABI公司,微型电泳仪购自天根生化科技(北京)有限公司,低温离心机购自德国Eppendorf公司。

1.3 DNA与RNA的提取

选取石蜡包埋组织8~10片,按照DNA、RNA提取试剂盒说明书中的步骤提取前列腺癌组织与癌旁组织DNA、RNA,提取后的DNA、RNA放于-20℃冰箱中保存备用。

1.4 基因组DNA修饰

经酶标仪检测DNA在260和280 nm处的吸光度(D)比值,若比值在1.7~2.0区间内则提示DNA合格;取600 ng DNA,按照甲基化修饰试剂盒说明书中的步骤对基因组DNA进行亚硫酸氢钠修饰,放于-20℃冰箱中备用。

1.5 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)

根据甲基化位点,参照文献设计引物^[3],*GSTP1*基因非甲基化引物序列: 顺义链引物为5'-GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT-3'; 反义链引物为5'-CCACCCCAATACTAAATCACAACA-3'; *GSTP1*基因甲基化引物序列: 顺义链引物为5'-TTCGGG GTGTAGCGGTCGTC-3', 反义链引物为5'-GCCCAATACTAAATCAGACG-3', 所有引物均由美国Life公司合成,甲基化、非甲基化上下游引物各50 pmol/L,

DNA模板100 ng, 超纯水加至50 μL , 混匀4 000 $\times g$ 离心5 min后进行PCR扩增。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min, 共40个循环。扩增结束后取PCR产物10 μL 加入凝胶槽中, 配制1%的琼脂糖凝胶, 1 \times 上样缓冲液与Gel red混匀后, 1 \times TAE电泳缓冲液, 在120 V电压下电泳30 min后, 在紫外灯照射下拍片记录。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测GSTP1 mRNA表达

每个样品做3个重复对照, 反应分2步进行: 第1步, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 第2步, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s和60 $^{\circ}\text{C}$ 35 s, 共40个循环, 在60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min时收集荧光信号, 内参基因(*GAPDH*)在相同条件下进行扩增, 最后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来分析基因GSTP1 mRNA的表达。GSTP1基因引物序列为5'-CTATGGGAAGGACCAGCAGG-3'和5'-TGGTCTCCCACAATG-3', *GAPDH*基因引物序列为5'-CCTAAGCCATTGTCAAAGCGA-3'和5'-CAAAGTTGTCATGGA-3'。RTFQ-PCR反应体系见表1。

表1 RTFQ-PCR反应体系

Tab. 1 RTFQ-PCR reaction system

Reagent	Volume $V/\mu\text{L}$
SYBRgreen mix (2 \times)	10
Primer forward (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
Primer reverse (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
ROX (50 \times)	0.4
RT reaction reagent	1.0
Double distilled water	7.0
Total	20

1.7 统计学处理

对所有数据用SPSS 19.0统计软件进行统计分析, 用 χ^2 检验两组差异, 用Spearman方法分析相关性。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GSTP1基因甲基化表达与一般临床特征的关系

结合患者的临床病理资料, GSTP1基因启动子区甲基化与患者的年龄、PSA水平无关, 与临床分期有关(表2)。

2.2 前列腺癌组织、癌旁组织GSTP1基因启动子甲基化比较

结果显示, 前列腺癌组织GSTP1基因启动子甲基化率显著高于其对应的癌旁组织, 差异有统计学意义(P<0.05, 表3)。

表2 GSTP1基因甲基化与临床病理参数的关系

Tab. 2 The relationship between gene methylation and clinicopathological parameters of GSTP1

Group	Number	Methylation	χ^2 value	P value
Age/year			2.786	>0.05
≥ 50	30	24		
<50	16	13		
Clinical stage			1.871	<0.05
B	12	5		
C	18	10		
D	16	14		
PSA $\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$			3.781	>0.05
<20	44	25		
≥ 20	54	32		

表3 前列腺癌组织、癌旁组织GSTP1基因启动子甲基化水平

Tab. 3 The promoter methylation level of GSTP1 gene in prostate cancer tissues and para-cancerous tissues

Item	N	Methylation [n(%)]	Unmethylation [n(%)]
Prostate cancer tissues	46	34(73.9)	13(28.2)
Para-cancerous tissues	46	12(26.1)	34(73.9)

2.3 GSTP1基因甲基化水平

用MSP法对目的基因进行扩增, 1.0%琼脂糖凝胶电泳结果显示出现清晰条带(图1), 电泳结果显示, 4号标本癌旁组织只出现非甲基化条

带, 表明没有发生甲基化。2号前列腺癌组织标本只出现甲基化条带, 为完全甲基化。其余则为部分甲基化。

2.4 *GSTP1*基因mRNA表达及与*GSTP1*基因启动子甲基化相关性

通过RTFQ-PCR检测发现, 癌组织*GSTP1* mRNA表达水平显著低于癌旁组织($P < 0.01$, 图2)。将*GSTP1* mRNA表达水平与*GSTP1*基因启动子甲基化用Spearman相关性分析, 结果发现, 甲基化与mRNA表达水平呈负相关($r = 0.724$, $P = 0.026$)。



图1 *GSTP1*基因MSP电泳结果

Fig. 1 *GSTP1* gene MSP electrophoresis results

m: Marker; P: Methylation positive control; 1-3: Prostate cancer specimen; 4: Specimen of para-cancerous tissues; Double distilled water: Blank control; M: Methylation strips; U: Non-methylated stripe, MSP electrophoresis results and product recovery after DNA sequencing

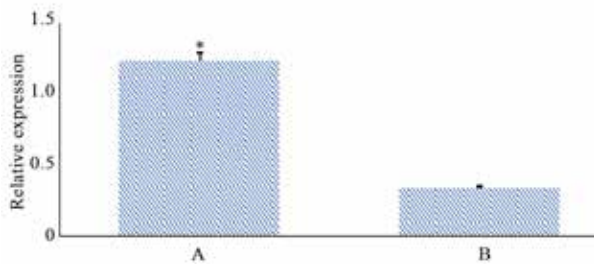


图2 *GSTP1* mRNA表达水平

Fig. 2 *GSTP1* mRNA expression levels

A: Para-cancerous tissue; B: Prostate cancer tissue. *: $P < 0.01$, compared with each other

3 讨 论

我国前列腺癌的患病率逐年上升, 但目前临床上面临的问题是对前列腺癌的诊断准确率相对较低, 因而导致诸多患者失去最佳治疗时机, 生存率得不到提高。目前, 临床上常综合运用PSA动态监测、监测白细胞黏附抑制、直肠指诊及影像学诊断再结合病理活检等多种方法进行综合诊断, 但这些手段都存在一定程度的

误检和漏检率, 因而不能完全适应临床诊断和及时治疗等迫切需求。发现新的前列腺癌特异性生物标志物, 预防和提高前列腺癌愈后的难点是建立前列腺癌有效预警、早期诊断及转移复发预测的方法。

*GSTP1*属于代谢酶家族, 参与代谢、解毒等多种重要功能, 可清除入侵机体的有毒物质, 发挥防止损伤细胞DNA和抑制癌变的作用^[4]。*GSTP1*基因定位于染色体11q13, *GSTP1*基因发生甲基化, 导致它的正常代谢、解毒功能受损甚至消失, 无法起到消除致癌物质的作用, 从而使肿瘤发生可能性增加。有研究证实, 在其他实体肿瘤中*GSTP1*表达升高; 但在前列腺癌组织中表达则不同, *GSTP1*特异性的表达被抑制甚至缺失^[5-6]。关于*GSTP1*在不同肿瘤组织中的表达差异, 其原因暂不清楚, 有待继续深入研究。Møller等^[7]研究显示, *GSTP1*基因甲基化有助于增加诊断前列腺癌的特异度和灵敏度。本研究也显示, *GSTP1* mRNA水平在前列腺癌组织中显著降低, 提示*GSTP1*发生甲基化后, 其mRNA水平被抑制, 呈负相关关系。Ellinger等^[8]推断, 导致前列腺癌组织中*GSTP1*基因表达抑制或沉默可能是由于*GSTP1*基因启动子区CpG岛超甲基化, 且被认为是检测前列腺癌癌变的生物标志物, 在前列腺癌发生、发展中起重要作用。有研究显示, 在前列腺癌组织中过表达*GSTP1*, 可显著抑制癌细胞的活力及增加死亡率, 可能是通过抑制MEK/ERK1/2通路实现的。综合现有研究表明, *GSTP1*基因发生甲基化常预示着前列腺癌患者的预后较差^[9-11]。在前列腺癌发生、发展过程中, *GSTP1*基因启动子区CpG岛甲基化水平逐渐升高, 通过MSP检测*GSTP1*基因甲基化水平具有很高的灵敏度和准确度, 因此, 前列腺癌中*GSTP1*基因的异常甲基化沉默将来可能成为该病治疗的重要靶标之一^[12-13]。本研究发现, *GSTP1*基因甲基化与临床分期有关, 而与其他临床特征无关, 提示在前列腺癌的不断发展中*GSTP1*基因甲基化的水平是呈现不断增加的趋势, 有助于判断前列腺癌的发展状况。

本研究发现, 73.9%的前列腺癌组织中有*GSTP1*基因甲基化, 甲基化率显著高于癌旁组织。张彦等^[2]研究50例前列腺癌石蜡组织中*GSTP1*基因甲基化表达, 结果发现, 所有样本*GSTP1*基因均未发生甲基化。出现这种结果可能与不同研究所选择的样本、实验方法差异及不同地域等诸多因素有关。因而, 在后续研究中还要进行临床多中心的样本筛选, 规范统一实验方法, 将有助于确认*GSTP1*基因在前列腺癌中的诊断价值。

[参 考 文 献]

- [1] ESTELLER M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectation [J]. *Curr Opin Oncol*, 2005, 17(1): 55-60.
- [2] 张彦, 赵坡, 钟梅, 等. *GSTP1*基因在前列腺癌组织中的表达及甲基化状态研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(4): 280-283.
- [3] ZCHBAUER-MÜLLER S, FONG K M, VIRMANI A K, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 249-255.
- [4] MARTIGNANO F, GURIOLI G, SALVI S, et al. *GSTP1* methylation and protein expression in prostate cancer: diagnostic implications [J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 435829.
- [5] 宋旭, 王蓉, 肖锋, 等. 谷胱甘肽S转移酶P1和4-HNE在前列腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *中华男科学杂志*, 2017, 23(5): 412-416.
- [6] LEE W H, MORTON R A, EPSTEIN J I, et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(24): 11733-11737.
- [7] MØLLER M, STRAND S H, MUNDBJERG K, et al. Heterogeneous patterns of DNA methylation-based field effects in histologically normal prostate tissue from cancer patients [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40636.
- [8] ELLINGER J, BASTIAN P J, JURGAN T, et al. Cp G island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer [J]. *Urology*, 2008, 71(1): 161-167.
- [9] WANG X X, JIA H T, YANG H, et al. Overexpression of glutathione S-transferase P1 inhibits the viability and motility of prostate cancer via targeting MYC and inactivating the MEK/ERK1/2 pathways [J]. *Oncol Res*, 2017. [Epub ahead of print]
- [10] PHE V, CUSSENOT O, ROUPRET M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer [J]. *BJU Int*, 2010, 105(10): 1364-1370.
- [11] ZHAO F, OLKHOV-MITSEL E, VAN DER KWAST T, et al. Urinary DNA methylation biomarkers for noninvasive prediction of aggressive disease in patients with prostate cancer on active surveillance [J]. *J Urol*, 2017, 197(2): 335-341.
- [12] SERENAITE I, DANIUNAITE K, JANKEVICIUS F, et al. Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer [J]. *Virchows Arch*, 2015, 466(1): 53-59.
- [13] GONZALGO M L, NAKAYAMA M, LEE S M, et al. Detection of *GSTP1* methylation in prostatic secretions using combinatorial MSP analysis [J]. *Urology*, 2004, 63(2): 414-418.

(收稿日期: 2017-05-12 修回日期: 2017-10-15)