

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.06.019

uPA 基因启动子区低甲基化在鼻咽癌侵袭转移中的作用

张松¹, 李烁², 高春生²

Promoter Hepomethylation of uPA Gene Play a Role in Invasion and Metastasis of Nasopharyngeal Cancer

Zhang Song¹, Li Shuo², Gao Chunsheng²

1. Department of Otolaryngology, Guangming New District People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518106, China; 2. Department of Otolaryngology Nanshan People's Hospital of Shenzhen

Abstract: Objective To explore the relationship between of the promoter hepomethylation of uPA gene and invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer. **Methods** Methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription PCR techniques were used to determine the promoter methylation status and mRNA expression of uPA gene in nasopharyngeal cancer and chronic inflammation tissue in pharynxnasalis. **Results** Hepomethylation of uPA gene promoter was found in 51 of 58 nasopharyngeal cancer samples. Hepermethylation of uPA gene promoter was found in the other seven nasopharyngeal cancer tissues. Hepermethylation of uPA gene promoter was found in all chronic inflammation tissue of pharynx nasalis. Over-expression of uPA mRNA was found in nasopharyngeal carcinoma tissues which promoter hepomethylation. Weak or no expression of uPA mRNA was found in nasopharyngeal carcinoma which promoter hepermethylation cance and chronic inflammation tissue in pharynx nasalis. **Conclusion** Over-expression of uPA gene is relate to promoter hepomethylation in nasopharyngeal cancer tissues. Promoter hepomethylation of uPA gene possibly concerned with invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer.

Key words: Urokinase plasminogen activator(uPA); Hypomethylation; Nasopharyngeal cancer

摘要:目的 探讨 uPA 基因启动子区低甲基化状态与鼻咽癌侵袭转移的关系。**方法** 用甲基化特异性 PCR 及 RT-PCR 法检测分析鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中 uPA 基因甲基化状态及其基因表达情况,分析 uPA 基因低甲基化与鼻咽癌侵袭转移的关系。**结果** 58 例鼻咽癌组织中有 51 例为 uPA 基因低甲基化,其余 7 例为高甲基化,而鼻咽部慢性炎症组织中 uPA 基因均为高甲基化;低甲基化的鼻咽癌组织中均见 uPA mRNA 强表达,而高甲基化的鼻咽癌和鼻咽部慢性炎症组织中仅见 uPA mRNA 弱表达或无表达。**结论** 鼻咽癌中 uPA 基因的高表达与其基因启动子区低甲基化有关,uPA 基因低甲基化可能与鼻咽癌的侵袭转移有关。

关键词: 尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA);低甲基化;鼻咽癌

中图分类号: R739.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)06-0691-03

0 引言

转移是恶性肿瘤的重要生物学特性,细胞外基质的降解是肿瘤浸润正常组织并开始转移的信号及重要途径。尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)介导的纤溶酶原激活系统,促进肿瘤细胞周围细胞外基质蛋白的降解,在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用。研究发现,在乳腺癌^[1]、直肠癌^[2]及前列腺癌^[3]等多种肿瘤组织中 uPA 基因高表达。最近黄涛等^[4]研究发现鼻咽癌组织中 uPA 基因表达较鼻咽部慢性炎症组织表达明显增高,且与鼻咽癌的转

移及预后有关。有研究指出,肿瘤组织中 uPA 基因高表达与其启动子区低甲基化有关,鼻咽癌组织中 uPA 基因启动子区甲基化情况与其表达的关系还未见报道。本研究拟在鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中检测 uPA 表达及其与基因启动子区甲基化的关系,探讨 uPA 基因表观遗传学调控在鼻咽癌侵袭转移中的作用,为鼻咽癌的基因治疗提供实验基础。

1 资料和方法

1.1 标本来源

标本来自 2008 年 1 月—2009 年 12 月期间于武汉协和医院就诊发现鼻咽新生物取活检的患者,其中低分化鳞癌 58 例,慢性炎症 17 例。上述确诊鼻咽癌患者中男 43 例、女 15 例,其中有淋巴结转移者 32 例,无淋巴结转移者 26 例;慢性炎症患者中,男 9 例,女 8 例。所有病例活检前均未经过放疗和化疗。

收稿日期:2011-09-08;修回日期:2012-02-10

基金项目:教育部博士学科点专项科研基金(新教师基金)(20070487172)

作者单位:1. 518106 广东深圳,深圳市光明新区人民医院耳鼻喉科;2. 深圳市南山人民医院耳鼻喉科

作者简介:张松(1969-),男,博士,副主任医师,主要从事头颈部肿瘤发生发展机制的研究

1.2 主要试剂及仪器

基因组 DNA 亚硫酸氢钠修饰试剂盒 (Zymo Golden Methylation Kit) 购于美国 (Zymo, Orange, CA, USA); TRIzol 试剂购于 Gibco 公司; 逆转录酶 MLV 为 Promega 公司产品。PCR 仪为 9600 型, 成像系统为 Grab-it 4.0, 分析软件为 Gelworks 1D interdiat.

1.3 DNA 提取和亚硫酸氢钠修饰

各组织基因组 DNA 提取使用 DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), 亚硫酸氢钠修饰使用 Zymo Golden Methylation Kit, 具体步骤严格参照产品说明书。

1.4 甲基化特异性 PCR (MSP)

uPA 基因扩增采用甲基化特异性 PCR (MSP 法), 甲基化引物序列: 5'-AGC GTT GCG GAA GTA CGC GG-3' (正义链), 5'-CCG CCG CAG CCC CGC CCA AA -3' (反义链); 非甲基化引物序列: 5'-AGT GTT GTG GAAGTA TGT GG -3' (正义链), 5'-CCA CCA CAA CCC CAC CCA AA-3' (反义链)。扩增反应在下面的条件下进行: 95°C 3 min, 95°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 45 s 共 10 个循环, 95°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 45 s 共 20 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min。取 10 μl PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相。

1.5 RNA 提取及 RT-PCR 检测 mRNA

取 -70°C 存放的上述组织, 每份约 50 mg, 用 1 ml Trizol (按说明书操作) 逐步提取总 RNA。然后用逆转录酶及相关试剂按说明合成 cDNA。根据 GenBank 中 uPA mRNA 序列 (BC013575), 用 Primer Premier 5.0 设计引物: 5'-ACA TTC ACT GGT GCA ACT GC-3 (正义链) 和 5'-TTT CCC CAG GCC CAG CTG AA-3 (反义链)。β-actin 引物序列为: 5'-CGT CTG GAC CTG GCT GGC CGG GACC-3'D (正义链) 和 5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G-3'。PCR 反应条件为: 95°C 3 min, 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s 共 30 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min。取 10 μl PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相。然后用 Gelworks 1D interdiat 软件分析各条带的吸光度值, 以目的基因对 β-actin 的相对吸光度值记录结果。

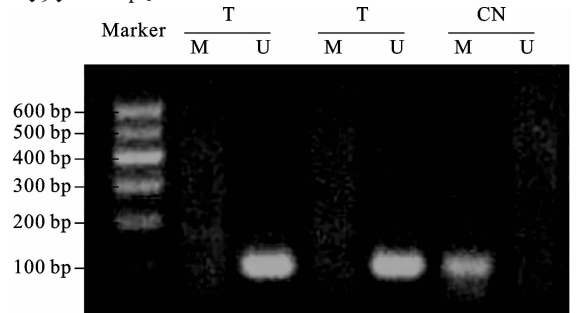
1.6 统计学方法

应用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, uPA 基因启动子区低甲基化及其 mRNA 表达与各临床资料之间的关系用独立样本的 *t* 检验进行分析, 取 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中 uPA 基因甲基化

甲基化特异性 PCR 检测结果显示: 58 例鼻咽癌组织中有 51 例 uPA 基因低甲基化, 7 例高甲基化, 在 32 例伴有淋巴结转移的鼻咽癌组织中有 31 例 uPA 基因为低甲基化, 仅 1 例为高甲基化; 而 26 例无淋巴结转移的鼻咽癌组织中有 20 例 uPA 基因低甲基化, 6 例发生高甲基化, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。17 例鼻咽部慢性炎症组织中无一例发生低甲基化, 图 1 示鼻咽癌组织中仅有非甲基化条带, 无甲基化条带, 而鼻咽部慢性炎症中仅有甲基化条带, 无非甲基化条带, 甲基化与非甲基化产物大小均为 96 bp。

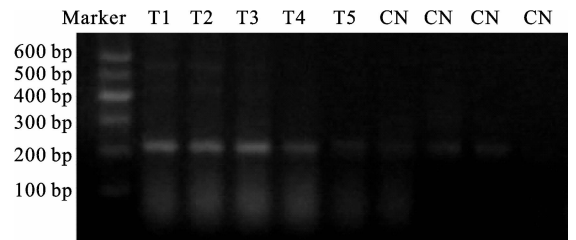


T: Nasopharyngeal cancer; CN: chronic inflammation tissue in pharynx nasalis; M: Methylation strap; U: Unmethylation strap

图 1 鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中 uPA 基因甲基化电泳图
Figure 1 Methylation status of uPA gene in human nasopharyngeal cancer and chronic inflammation tissue in pharynx nasalis

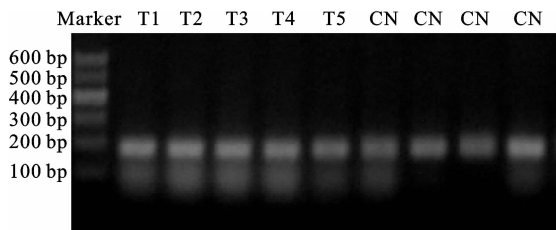
2.2 uPA mRNA 在鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中的表达

RT-PCR 结果显示: 51 例 uPA 基因低甲基化的鼻咽癌组织中 uPA mRNA 均为高表达 (0.5126 ± 0.1362); 7 例 uPA 基因高甲基化的鼻咽癌组织及 17 例鼻咽部慢性炎症组织中仅见 uPA mRNA 的低表达或无表达 (0.2128 ± 0.0129), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2、3。



T1, T2, T3: Nasopharyngeal cancer with lymph node metastasis; T4, T5: Nasopharyngeal cancer without lymph node metastasis; CN: chronic inflammation tissue in pharynx nasalis. Over-expression of uPA mRNA was found in nasopharyngeal carcinoma tissues which promoter hepomethylation. Weak or no expression of uPA mRNA was found in nasopharyngeal carcinoma which promoter hepermethylation cance and chronic inflammation tissue in pharynx nasalis. Amplified product of uPA mRNA was 215 bp

图 2 鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中 uPA mRNA 表达电泳图
Figure 2 Expression of uPA mRNA in human nasopharyngeal cancer and chronic inflammation tissue in pharynx nasalis



T1, T2, T3: Nasopharyngeal cancer with lymph node metastasis; T4, T5: Nasopharyngeal cancer without lymph node metastasis. CN: chronic inflammation tissue in pharynx nasalis. Amplified product of β -actin mRNA was 190 bp

图 3 鼻咽癌及鼻咽部慢性炎症组织中 β -actin mRNA 表达电泳图
Figure 3 Expression of β -actin mRNA in human nasopharyngeal cancer and chronic inflammation tissue in pharynx nasalis

3 讨论

尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)是一种多功能丝氨酸蛋白酶,分子量 55 kD。其主要功能是与受体 uPAR 结合,激活纤溶酶系统,使细胞外基质和基底膜的多种成分降解,从而使肿瘤细胞穿透正常组织屏障,引起肿瘤浸润和转移。另外,uPA 也参与了一些与纤溶酶无关的活动,因此它与肿瘤的发生密切相关。一些研究已经发现多种肿瘤组织中 uPA 基因高表达,且与肿瘤的侵袭转移及预后有关^[1-3]。很明显,在正常组织和肿瘤组织中 uPA 基因的表达调控机制是相同的。Pakneshan 等^[5]研究发现在乳腺癌组织中 uPA 基因高表达与其基因启动子区去甲基化有关。尽管有作者报道鼻咽癌组织中 uPA 基因高表达,但是,uPA 基因启动子区甲基化状况还未见报道。

uPA 基因在鼻咽癌中高表达的机制还不十分清楚,有研究指出 uPA 基因高表达可能与其基因启动子区低甲基化有关。基因的甲基化状态与其表达情况有关,研究较多的是在多种肿瘤中一些抑癌基因启动子区高甲基化使其表达沉默,我们先前的研究也发现鼻咽癌^[6]和喉癌^[7]中抑癌基因 DAPK 启动子区高甲基化与其发生发展有关。近年发现,一些癌基因及转移相关基因的低甲基化可使其高表达,与肿瘤的发生和转移有关,如 p-cadherin^[8]、r-ras^[9]和 c-myc^[10]。本研究我们发现在鼻咽部慢性炎症组织及 uPA 基因高甲基化的鼻咽癌组织中 uPA mRNA 弱表达或无表达,而在 uPA 基因低甲基化的鼻咽癌组织中 uPA mRNA 均为高表达。这些结果表明 uPA 基因的高表达可能与其启动子区低甲基化有关。

uPA 基因高表达,可促进肿瘤细胞周围细胞外基质蛋白的降解,从而使肿瘤细胞浸润和转移。有些学者发现 uPA 基因高表达与肿瘤的侵袭及转移有关,如 Gaylis 等^[11]发现在 PC3 前列腺癌模型中 uPA 基因高表达与癌细胞的侵袭能力密切相关;Minoos 等^[12]研究发现 uPA 基因高表达与结肠癌的

预后有关。我们在分析 uPA 基因甲基化与鼻咽癌侵袭转移的关系时发现,在 32 例伴有淋巴结转移的鼻咽癌组织中有 31 例 uPA 基因为低甲基化,仅 1 例为高甲基化;而 26 例无淋巴结转移的鼻咽癌组织中有 20 例 uPA 基因低甲基化,6 例发生高甲基化,两者差异具有统计学意义。在所有 uPA 基因低甲基化的鼻咽癌组织中 uPA mRNA 均为高表达,而高甲基化的鼻咽癌组织及鼻咽部慢性炎症组织中 uPA mRNA 弱表达或无表达,这些结果表明 uPA 基因低甲基化使其高表达可能与鼻咽癌的侵袭和转移有关。

总之,鼻咽癌组织中 uPA 基因的高表达可能与其基因的低甲基化有关,我们进一步的研究将在体外培养的鼻咽癌细胞中通过改变 uPA 基因的甲基化状态观察其表达的变化及鼻咽癌细胞生长及侵袭转移能力的变化,进一步探讨 uPA 基因的甲基化状态与鼻咽癌细胞的生长及侵袭转移能力的关系,为鼻咽癌的基因治疗提供新的研究方向。

参考文献:

- [1] De Cremoux P, Grandin L, Diéras V, et al. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen-activator-inhibitor type 1 predict metastases in good prognosis breast cancer patients[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(5): 1475-82.
- [2] Kim TD, Song KS, Li G, et al. Activity and expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinases in human colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 211.
- [3] Usher PA, Thomsen OF, Iversen P, et al. Expression of urokinase plasminogen activator, its receptor and type-1 inhibitor in malignant and benign prostate tissue[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(6): 870-80.
- [4] Huang T, Fu SM, Liang Z, et al. Expression of uPA and uPAR in nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance[J]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2009, 23(11): 517-9. [黄涛, 符生苗, 梁荣, 等. 鼻咽癌组织中 uPA 及 uPAR 蛋白的表达及其临床意义[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2009, 23(11): 517-9.]
- [5] Pakneshan P, Têtu B, Rabbani SA. Demethylation of urokinase promoter as a prognostic marker in patients with breast carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(9): 3035-41.
- [6] Kong WJ, Zhang S, Guo CK, et al. Effect of methylation-associated silencing of the death-associated protein kinase gene on nasopharyngeal carcinoma[J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(3): 251-9.
- [7] Kong WJ, Zhang S, Guo CK. Methylation-associated silencing of death-associated protein kinase gene in laryngeal squamous cell cancer[J]. *Laryngoscope*, 2005, 115(8): 1395-401.
- [8] Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, et al. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(16): 5869-77.
- [9] Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, et al. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(6): 2115-24.
- [10] Szyf M. DNA methylation and demethylation as targets for anti-cancer therapy[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(5): 533-49.
- [11] Gaylis FD, Keer HN, Wilson MJ, et al. Plasminogen activators in human prostate cancer cell lines and tumors: correlation with the aggressive phenotype[J]. *J Urol*, 1989, 142(1): 193-8.
- [12] Minoos P, Baker K, Baumhoer D, et al. Urokinase-type plasminogen activator is a marker of aggressive phenotype and an independent prognostic factor in mismatch repair-proficient colorectal cancer[J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(1): 70-8.