

前列腺癌膜联蛋白 II 微卫星不稳定的荧光复合扩增研究

蔡晓健¹, 丁 涛³, 段友军¹, 黄振国¹, 刘志文¹, 王 豪¹, 刘未斌², 许韩峰¹

(1. 南华大学附属第一医院泌尿外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 广州九贤林生物公司, 广州 510000;
3. 上海市第十医院 泌尿外科, 上海 200072)

摘要: **目的** 探讨膜联蛋白 II 微卫星的不稳定对前列腺癌早期诊断的作用。 **方法** 使用荧光复合扩增的方法对 16 例前列腺癌组织、16 例良性前列腺增生组织及 16 例正常人血样中的膜联蛋白 II 的三个基因座进行扩增, 检测 PCR 产物, 分析其差异与疾病间的关系。 **结果** 膜联蛋白 II 的 D15S1185, D15S1292 两个正常基因座在前列腺癌组织、良性前列腺增生组织以及血液样本中扩增大小无差别; 在 AN2-di-repeat-NH 的二核苷酸重复序列微卫星基因座区域表现差异, 以扩增大小 134 bp 为分界线, 前列腺癌组织与正常血液样本存在显著性差异 ($\chi^2 = 9.087, df = 1, P = 0.003$), 前列腺癌组织与良性前列腺增生组织之间显著性不明显 ($\chi^2 = 1.997, df = 1, P = 0.158$), 良性前列腺增生组织与正常血液样本之间有显著性差异趋势 ($\chi^2 = 3.405, df = 1, P = 0.065$)。 **结论** 膜联蛋白 II 二核苷酸微卫星基因座 AN2-di-repeat-NH 的多态性有可能成为早期前列腺癌的预警指标。

关键词: 前列腺癌; 膜联蛋白 II; 荧光复合扩增; 微卫星

中图分类号: 446.6

文献标识码: A

The Study of Fluorescent Multiplex PCR Amplification to Detect Annexin II Microsatellite Instability in Prostate Cancer

CAI Xiaojian, DING Tao², DUAN Youjun, et al

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001)

Abstract: **Objective** To study the effect of annexin II microsatellite instability on diagnosing the early prostate cancer. **Method** Fluorescent multiplex PCR was used to amplify annexin II three loci in 16 prostate cancer tissues, 16 benign prostatic hyperplasia tissues and 16 normal blood samples. Then, the 48 PCR products were collected and the differences and relationship between them were analyzed. **Result** Annexin II D15S1185, D15S1292 loci have the same size PCR product in all the samples; AN2-di-repeat-NH dinucleotide repeats locus performs differences in size of 134 bp. Significant differences exist between prostate cancer tissues and normal blood samples ($\chi^2 = 9.087, DF = 1, P = 0.003$). Prostate cancer tissues and benign prostatic hyperplasia tissues didn't have obviously significant difference. ($\chi^2 = 1.997, DF = 1, P = 0.158$). Benign prostatic hyperplasia tissues and normal blood samples have significant trend ($\chi^2 = 3.405, df = 1, P = 0.065$). **Conclusion** The polymorphisms of a novel AN2-di-repeat-NH dinucleotide repeats locus may be a warning indicator of early prostate cancer.

Key words: Prostate cancer; Annexin II; Fluorescence multiplex amplification; Microsatellite

前列腺癌(prostate cancer, PC)为欧美男性发病率最高的恶性肿瘤,死亡率仅次于肺癌^[1]。北京市男性前列腺癌发病率由 2001 年的 5.53/10 万上升至 2010 年的 16.62/10 万,9 年增长 200.5%^[2]。目

前,前列腺癌的病因可能与高脂饮食、环境、性激素等因素有关^[3-4]。前列腺癌早期症状多不明显,与前列腺良性增生症的表现相似,容易被误诊延误治疗时机,约有 20% ~ 30% 的患者在初诊时已有转移。早期局限性前列腺癌治疗效果良好,转移性前列腺癌患者不仅效果差而且生存率低^[5-6],其发病和转移的分子机制还不清楚,寻找早期前列腺癌的生物标记物对于前列腺癌诊断和治疗具有重要

收稿日期:2013-10-10

基金项目:湖南省科技厅项目课题资助(编号 2011SK3189)。

作者简介:蔡晓健,本科,副主任医师,研究方向:泌尿外科肿瘤治疗, E-mail:397447863@qq.com.

意义。

膜联蛋白Ⅱ属于膜联蛋白家族中的一员,又名膜联蛋白 A2 (annexinA2, ANXA2)、P36 等,人的该基因定位于 15q21-q22,含 13 个外显子^[7],膜联蛋白Ⅱ表达水平及分布的变化和很多疾病的发生相关,现研究发现在急性早幼粒细胞白血病、食管鳞癌、肝癌、肺癌等细胞组织中膜联蛋白Ⅱ的 mRNA 和蛋白均呈异常表达,且与肿瘤细胞的分化程度密切相关^[8-9]。

荧光复合扩增多重 PCR 是基于测序仪毛细管电泳,使用多色荧光染料标记不同的引物,在一个 PCR 管内进行多个基因的扩增,激光器激发染料发光,在通过毛细管视窗检测,CCD 收集信号,软件分析读取,检测的大小非常精确精准,在人类 STR 检测,癌症的微卫星不稳定有着广泛的应用^[10-12]。

本研究使用荧光复合扩增的方法对前列腺癌组织、良性前列腺增生组织及正常人血样中的膜联蛋白Ⅱ的基因座 D15S1185, D15S1292 以及本研究寻找到二核苷酸重复序列微卫星基因座 AN2-di-repeat-NH 进行扩增,探讨此复合扩增方法的可行性,并对比样本组织之间 PCR 产物的差异。

1 材料与方法

1.1 样本

前列腺癌组织切片、良性前列腺增生组织切片和正常人血样各 16 份。所有样本均来自南华大学附属第一医院泌尿科住院病人,该项研究得到本院伦理学委员会批准。

1.2 主要仪器和试剂

PE9700 型 DNA 扩增 (PEKIN-ELMER 公司);

ABI3130XL 遗传分析仪 (ABI 公司);2k-15 型冷冻离心机 (Sigma 公司);微量移液器 (芬兰 Thermo 公司);Mulli-Q 超纯水系统 (Millipore 公司)。热启动酶、复合扩增 Master mix、纳米磁珠 DNA 提取试剂盒均购买自广州九贤林生物科技有限公司;荧光引物合成自 Takara 公司;Chelex-100 树脂购买自 Bioroad 公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 使用棉签将前列腺癌组织切片及一般前列腺疾病石蜡组织切片上的组织转移到棉签上,使用试剂盒自带的裂解液,补加蛋白酶 K 使终浓度为 1 mg/mL,56 ℃ 孵育过夜。去除棉签,加入 3 倍体积的结合液,95 ℃ 孵育 15 min,加入 20 μL 的纳米磁珠,室温孵育 5 min。置于磁力架上,吸附磁珠。弃去液体,再加入 200 μL 的结合液,漂洗一遍磁珠。加入洗涤液洗涤磁珠两遍,56 ℃ 孵育 5 min。加入 50 μL 洗脱液,56 ℃ 孵育 10 min,置于磁力架上,吸取上清转移至新的薄壁管中,得到提取好的 DNA。血样样本 DNA 提取使用 Chelex-100 的方法提取 DNA^[9]。

1.3.2 引物设计 在 Genebank 上调取 Annexin A2 的序列定位于人类 15 号染色体上,同时在 NCBI 上在 UniSTS 下搜索 annexin A2,选取其中定位于人类 15 号染色体上,选取其中命名 ANXA2 的基因座 D15S1185 (GeneBank 登录号: G07155. 1), 以及 D15S1292 (GeneBank 登录号: G15634. 1),使用软件在两个基因座附近寻找二核苷酸重复的微卫星序列,在侧翼设计引物,命名为 AN2-di-repeat-NH。引物序列见表 1。

表 1 基因座复合扩增引物序列

	Primer-up	Primer-down
D15S1185	FAM-CTGTGAGGGTGACGTTAGCA	TGGAATGTTTCATTCTTTGGC
D15S1292	FAM-AAAATTCTGCCTCCAGAGCA	GCCTGTGGGGAACCTAAAAT
AN2-di-repeat	FAM-CTTTGAACCCGGAGTTTCGT	CACACCCCAGCAGTCATGAA

1.3.3 引物的荧光标记及 PCR 反应体系 根据引物的特性在上游或下游 5'末端标记 FAM 荧光素。反应总体积 25 μL,Just Taq Hotstart DNA Polymerase (热启动酶)2 μL,Just PCR buffer for Multiple (多重 PCR buffer) 12. 5 μL,引物 2 μL (最后终浓度

0.2 μm), DNA 模板 4 μL,补超纯水至 25 μL。95 ℃ 11 min,94 ℃ 40 s 60 ℃ 1 min 72 ℃ 1 min,30 循环,72 ℃ 10 min,4 ℃ ∞。

1.3.5 PCR 产物检测 单一扩增预实验使用 3% 琼脂糖电泳检测,复合扩增荧光 PCR 产物,使用

ABI PRISM3130XL 测序仪/分型仪 (Applied Biosystems) 进行基因分型,用 Genemapper 软件对有荧光

标记的 PCR 产物的大小进行测量。荧光复合扩增的图谱见图 1。

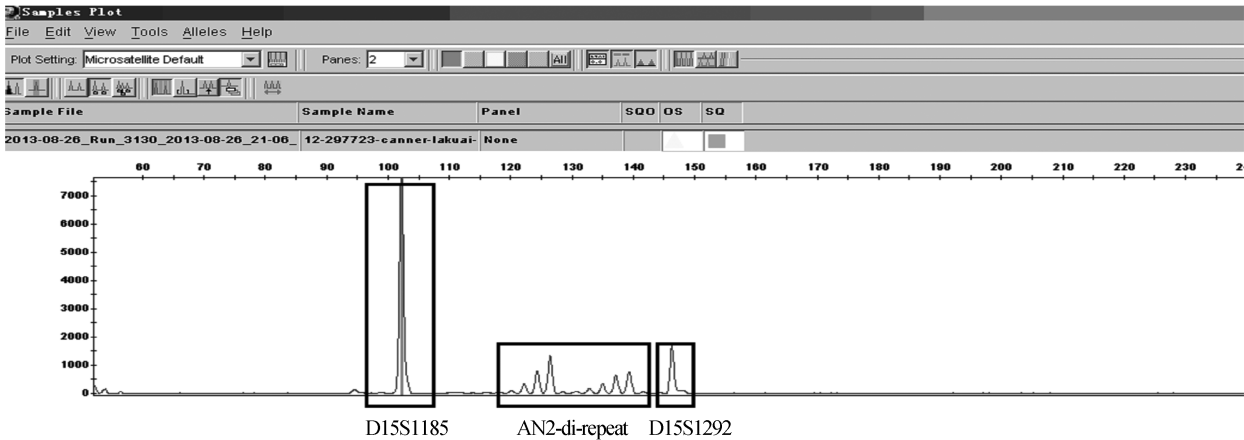


图 1 基因座 D15S1185,AN2-di-repeat,D15S1292 荧光复合扩增 PCR 分型图谱

1.3.6 统计学分析 原始数据的处理与分析用 Excel2000 (Microsoft) 及 SPSS 13.0 (SPSS Inc.)。卡方 (χ^2) 检验使用 SPSS 13.0, 比较前列腺癌组织和对照良性前列腺增生组织, 以及正常血液样本的差别。

2 结 果

2.1 样本提取及扩增

前列腺癌组织石蜡样本、前列腺增生组织石蜡样本通过磁珠法快速提取, 得到 DNA 样本在扩增中不受抑制; 正常血液样本通过 Chelex-100 法提取。所有样本经荧光复合 PCR 扩增后, 样品在 ABI PRISM3130XL 遗传分析仪上样检测, 得到分型图谱。

2.2 微卫星 AN2-di-repeat 扩增 PCR 产物在不同组织中大小有差异

GeneMapper 分析软件得到的基因座大小, 基因座 D15S1185, D15S1292 大小分别为分析图谱中得到的结果为固定大小的 102 bp 和 146 bp, 而通过软件在这两个基因座附近寻找二核苷酸重复的微卫星 AN2-di-repeat 扩增 PCR 产物大小在不同组织样本中大小不一致, 如表 2 所示。

2.3 D15S1185, D15S1292, AN2-di-repeat 扩增 PCR 产物统计分析

由于膜联蛋白 II 的很多区域趋于保守, 本研究中 D15S1185, D15S1292 两个基因座在前列腺癌组织, 良性前列腺增生组织, 以及血液样本中扩增大小

小无差别, 但我们通过软件发现的 AN2-di-repeat 的二核苷酸重复序列区域表现出在癌症和不同组织的差别, 使用统计软件 SPSS 13, 以扩增大小 134 bp 为分界线, 统计分析。

统计结果显示, 前列腺癌组织与血液样本在 AN2-di-repeat 二核苷酸重复序列以扩增大小 134 bp 为分界线, 卡方检验达到非常显著的水平。 ($\chi^2 = 9.087, df = 1, P = 0.003$)。前列腺癌组织与良性前列腺增生组织在 AN2-di-repeat 二核苷酸重复序列以扩增大小 134 bp 为分界线, 卡方检验不显著 ($\chi^2 = 1.997, df = 1, P = 0.158$); 前列腺增生组织与无关正常人血样在 AN2-di-repeat 二核苷酸重复序列以扩增大小 134 bp 为分界线, 卡方检验表现出显著差异的趋势 ($\chi^2 = 3.405, df = 1, P = 0.065$)。

3 讨 论

本研究使用荧光复合扩增的方法对前列腺癌组织、良性前列腺增生组织及正常人血样中的膜联蛋白 II 的基因座 D15S1185, D15S1292 以及本研究寻找到二核苷酸重复序列微卫星基因座 AN2-di-repeat-NH 进行扩增, 探讨此复合扩增方法的可行性, 并对样本组织之间 PCR 产物的差异, 统计分析本研究寻找到二核苷酸重复序列微卫星基因座 AN2-di-repeat-NH 在前列腺癌组织、前列腺增生组织及正常人血样之间的关系。

Annexin A2 的序列定位于人类 15 号染色体上,

表 2 微卫星 AN2-di-repeat 在不同组织中的扩增大小

Cancer sample No	AN2-di-repeat	Cancer sample No	AN2-di-repeat
306762	129,135	328777	133
300142	133,137	332952	135,142
276629	137	332367	131
116667	135	331958	131,135
290758	133,139	332550	133
276307	129	329893	101,139
306299	133	328756	133,140
317222	129,137	317222	129
346217	129,137	332163	133,140
3434649	135,140	329687	129
297723	126,139	332374	122,127
348222	137,144	329703	129,133
326831	125,137	331176	133
310963	135	328875	129,140
118786	129,131	332473	126,139
113180	129,135	329969	131
Blood-1	134	Blood-2	124
Blood-3	129	Blood-4	131
Blood-5	133	Blood-6	131,134
Blood-7	131	Blood-8	131
Blood-9	122	Blood-10	131
Blood-11	131	Blood-12	130
Blood-13	124	Blood-14	129
Blood-15	127	Blood-16	129

表左列中样本 306762-113180 为前列腺癌组织样本点大小;表右列中样本 328777-329969 为前列腺增生组织位点大小;样本 Blood-1 至 Blood-16 为正常血液样本位点大小

基因全序列大小大约 190 kb 左右。在 NCBI 上的 UniSTS 下,搜索 annexin A2,选取其中的 2 个基因座 D15S1185 (GeneBank 登 录 号: G07155. 1) 和 D15S1292(GeneBank 登录号:G15634.1),这两个基因座没有相关报道,其中基因座 D15S1185 报道的扩增大小为 105 bp ~ 106 bp,基因座 D15S1192 有关报道的大小在 150 bp。通过序列分析软件发现这两个基因座附近存在一些二核苷酸以及五核苷酸的微卫星序列。找出的二核苷酸微卫星 AN2-di-repeat-NH 通过荧光扩增,发现了 AN2-di-repeat-NH 这个新膜联蛋白Ⅱ二核苷酸序列在前列腺癌、前列腺增生组织,以及正常血样的统计学差别。

石蜡组织切片中含有组织量较少,并且切片中含有的甲醛以及石蜡等是 PCR 反应的强抑制剂,普通的抽提取方法很难达到满意的效果,本研究使用纳米磁珠,使石蜡组织切片的 DNA 得到最大量的提取,得到的 DNA 纯化产物在下游 PCR 反应中没有抑制,可以得到目的产物。

癌症是一种基因病,并且越来越多的研究发现癌症与微卫星的不稳定性(MSI)和杂合性缺失

(LOH)相关。微卫星(MS)是广泛存在于真核生物基因组中具有高度多态性的、非编码的、简单串联式核苷酸重复序列,具有介导基因重组、保持基因组稳定性的作用。MSI 是指与正常组织相比,在肿瘤组织基因组中微卫星简单重复序列的增加或丢失,多是由于 DNA 错配修复功能的缺失所致。LOH 是指一对染色体中的一条染色体发生了几千个核苷酸乃至一整条染色体遗传物质的缺失,多发生于抑癌基因的附近,是识别抑癌基因的标志。前列腺癌以前有报道与雄激素受体(AR)基因微卫星多态性有关^[13],但国内外未见有与膜联蛋白Ⅱ基因内部微卫星有关的报道,本研究第一次发现了膜联蛋白Ⅱ基因内部的一个新二核苷酸微卫星 AN2-di-repeat-NH 在前列腺癌组织与正常血样中有统计学的显著差异。

从 AN2-di-repeat-NH 基因座的统计分析来看,前列腺癌组织和正常血样的基因频率在 134 bp 这个分界线上有非常显著的差异, $\chi^2 = 9.087$, $df = 1$, $P = 0.003$,提示膜联蛋白Ⅱ基因的内部微卫星的改变与前列腺癌组织的癌细胞增殖有关;良性前列腺

增生组织和正常血样的基因频率在 134 bp 这个分界线上有显著差异的趋势,提示前列腺增生疾病的产生也会导致膜联蛋白 II 基因内部微卫星序列的微变异,这可能与 PSA 值的高低变化有关系。本次实验结果前列腺癌组织和良性前列腺增生组织的基因频率在 134 bp 这个分界线上,没有显著差异,有两种可能性:第一,良性前列腺增生与前列腺癌是前列腺组织疾病的主要构成,它们的组织细胞来源具有高度一致性,同时两种疾病的初期病理表现均为组织细胞的增殖所致,它们在疾病发展初期可能存在趋同的关系。第二,由于本研究的样本有限,无法达到统计学显著差异的程度。这些都有待于进一步的研究。

综上所述,一个新膜联蛋白 II 二核苷酸微卫星基因座 AN2-di-repeat-NH 的多态性有可能成为早期前列腺癌的预警指标。

参考文献:

- [1] Jemal A, Tiwari R, Murray T, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2004, 54: 8-29.
- [2] 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26: 77-78.
- [3] Engstrom CA. Hot flashes in prostate cancer: state of the science[J]. Am J Mens Health, 2008, 2(2): 122-132.
- [4] Fitzpatrick JM, Schulman C, Zlotta AR, et al. Prostate cancer: a serious disease suitable for prevention[J]. BJU Int, 2009, 103(7): 864-870.
- [5] Rentsch CA, Cecchini MG, Thalmann GN. Loss of inhibition over master pathways of bone mass regulation results in osteosclerotic bone metastases in prostate cancer[J].

Swiss Med Wkly, 2009, 139(15-16): 220-225.

- [6] Albiges-Sauvin L, Levy A, Massard C, et al. Prognosis and predictive factors in prostate cancer[J]. Bull Cancer, 2009, 96(4): 439-449.
- [7] Cockrell E, Espinola RG, McCrae KR. Annexin A2: biology and relevance to the antiphospholipid syndrome[J]. Lupus, 2008, 17(10): 943-951.
- [8] Mohammad HS, Kurokohchi K, Yoneyama H, et al. Annexin A2 expression and phosphorylation are up-regulated in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol, 2008, 33(6): 1157-1163.
- [9] Sharma MR, Rothman V, Tuszynski GP, et al. Antibody-directed targeting of angiotensin's receptor annexin II inhibits Lewis Lung Carcinoma tumor growth via blocking of plasminogen activation: possible biochemical mechanism of angiotensin's action[J]. Exp Mol Pathol, 2006, 81(2): 136-145.
- [10] 郑秀芬. 法医 DNA 分析[M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2002. 37-39.
- [11] Nazmi AR, Ozorowski G, Pejic M, et al. N-terminal acetylation of annexin A2 is required for S100A10 binding[J]. Biol Chem, 2012, 393(10): 1141-1150.
- [12] Drucker A, Arnason T, Yan SR, et al. Ephrin b2 receptor and microsatellite status in lymph node-positive colon cancer survival[J]. Transl Oncol, 2013, 6(5): 520-527.
- [13] Li C, Gronberg H, Matsuyama H, et al. Difference between Swedish and Japanese men in the association between AR CAG repeats and prostate cancer suggesting a susceptibility-modifying locus overlapping the androgen receptor gene[J]. Int J Mol Med, 2003, 11: 529-533.

(此文编辑: 秦旭平)