

· 基础研究 ·

ASPP 家族基因在膀胱尿路上皮癌组织中的表达及其临床意义

唐以众, 王 健[△], 陈国俊

(青海大学附属医院泌尿外科, 青海西宁 810001)

摘要:目的 探讨 ASPP1、ASPP2 及 iASPP 基因在膀胱尿路上皮癌组织中的表达及其临床意义。方法 应用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(fqRT-PCR)对 30 例膀胱尿路上皮癌组织及其癌旁组织中 ASPP1、ASPP2 及 iASPP mRNA 的表达进行检测。结果 膀胱尿路上皮癌组织中 ASPP1、ASPP2 mRNA 的表达水平(0.651±0.214、0.703±0.184)显著低于正常膀胱组织(0.923±0.182、0.963±0.208)($P<0.05$),而膀胱尿路上皮癌组织中 iASPP mRNA 的表达水平(0.508±0.227)明显高于正常膀胱组织(0.305±0.136)($P<0.05$)。ASPP1、ASPP2 及 iASPP mRNA 的表达与膀胱尿路上皮癌的分化程度有关($P<0.05$)。结论 ASPP1、ASPP2 及 iASPP mRNA 在膀胱尿路上皮癌组织中有不同程度的表达,可能参与了膀胱尿路上皮癌的发病。

关键词: 荧光免疫测定; 逆转录聚合酶链反应; 膀胱尿路上皮癌; 基因, ASPP

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.02.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)02-0174-02

Expression of ASPP family genes in bladder urothelial carcinoma tissues and its clinical significance

Tang Yizhong, Wang Jian[△], Chen Guojun

(Department of Urology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of ASPP1, ASPP2 and iASPP genes in bladder urothelial carcinoma tissues and its clinical significance. **Methods** Fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(fqRT-PCR) was adopted to detect mRNA expression of ASPP1, ASPP2 and iASPP in 30 cases of bladder urothelial carcinoma tissues and their pericarcinomatous tissues. **Results** Expression levels of ASPP1 and ASPP2 mRNA in bladder urothelial carcinoma tissues (0.651±0.214, 0.703±0.184) were significantly lower than those in normal bladder tissues (0.923±0.182, 0.963±0.208) ($P<0.05$) while expression level of iASPP mRNA in bladder urothelial carcinoma tissues (0.508±0.227) was obviously higher than that in normal bladder tissues (0.305±0.136) ($P<0.05$). The expressions of ASPP1, ASPP2 and iASPP mRNA were related to differentiation degree of bladder urothelial carcinoma ($P<0.05$). **Conclusion** ASPP1, ASPP2 and iASPP mRNA can be found in bladder urothelial carcinoma tissues with different degrees, and may be involved in pathogenesis of bladder urothelial carcinoma.

Key words: fluoroimmunoassay; reverse transcriptase polymerase chain reaction; bladder urothelial carcinoma; Genes, ASPP

P53 凋亡刺激蛋白(apoptosis stimulating protein of P53, AS-PP)家族是科学家们近年来发现的新的蛋白质家族^[1-2],该家族含有 3 个成员: ASPP1、ASPP2 及 iASPP。ASPP1、ASPP2 能特异性与 P53 结合,诱导 P53 的凋亡功能;而 iASPP 能竞争性地与 P53 结合,抑制 P53 的细胞凋亡作用^[2]。因此,它们成肿瘤治疗的新靶点。本文应用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, fqRT-PCR)对 30 例膀胱尿路上皮癌组织及正常癌旁组织中 ASPP1、ASPP2 及 iASPP 基因进行检测。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 主要试剂包括 TRizol 试剂(大连 TaKaRa 公司)、RT-PCR 试剂盒(美国 BD 公司)、莫洛尼氏鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, M-MLV)逆转录酶试剂盒(美国 Promega 公司)等。主要仪器包括紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)、7500 型快速实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)等。

1.2 组织标本 收集 30 例新鲜膀胱尿路上皮癌组织以及距癌组织边缘 3 cm 以上的正常膀胱上皮组织,标本取自 2009 年 7 月至 2011 年 7 月在本院接受泌尿外科手术的患者,标本均经病理检查确诊。

1.3 ASPP 家族基因相对表达量的检测

1.3.1 引物和探针的设计与合成 所有引物用 Primer Premier 5.0 软件设计,由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。对不同引物序列进行预实验,以保证目的基因与内参基因扩增效率一致且均接近 1。

表 1 RT-PCR 引物序列及其扩增的目的片段大小

目的基因	引物序列	片段长度
ASPP1	5'-TTG CCA GTG AAG ACA GAA GC-3'	152 bp
	5'-GGG AAG TGT GAG AAA GGA TGA G-3'	
ASPP2	5'-CAC GGC TCT TCA CAA TGC-3'	168 bp
	5'-GCT CCT GAC TCC ACC AAA-3'	
iASPP	5'-CGC CAA CTA CTC TAT CGT GGA TT-3'	123 bp
	5'-CGC CAT GCA GAT GAC GTG T-3'	
GAPDH	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'	225 bp
	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'	

1.3.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 取冻存组织约 100 mg,采用 TRizol 提取总 RNA,紫外分光光度计测定吸光度 A_{260}/A_{280} 比值,明确 RNA 纯度及浓度,并经琼脂糖凝胶电泳证实 RNA 完整。取总 RNA 2 μ g 经 M-MLV 逆转录酶试剂盒合成 cDNA 第一链。

1.3.3 实时荧光定量 RT-PCR 每一样品均设 2 个重复孔,反

应体系均为 10 μ L,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 20 s 后,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s。实时荧光定量 PCR 仪监测记录数据。每次 PCR 反应后均进行熔解曲线分析以确认扩增产物的特异性。

1.3.4 ASPP mRNA 表达水平的相对定量分析 采用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算 ASPP 基因表达量^[3],即以 GAPDH 为内参照基因,计算各样品 $\Delta C_t, \Delta\Delta C_t = (C_t ASPP - C_t GAPDH)$,设定 ΔC_t 值最大的正常对照为校正样品, $\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t \text{ 样品} - \Delta C_t \text{ 校正品})$,某样品的 ASPP mRNA 相对表达量 (relative quantification, RQ) 可用如下公式计算: $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,ASPP 基因表达水平的差异分析采用配对 t 检验。ASPP 基因与临床病理特征的关系分析采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ASPP1、ASPP2 和 iASPP mRNA 在膀胱尿路上皮癌组

织中的表达 膀胱尿路上皮癌组织中 ASPP1、ASPP2 mRNA 的表达水平均低于癌旁组织 ($P < 0.05$),而其 iASPP mRNA 的表达水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$),见表 2。

表 2 尿路上皮癌及癌旁组织 ASPP1、ASPP2 和 iASPP mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ASPP1	ASPP2	iASPP
尿路上皮癌组织	0.651 \pm 0.214	0.703 \pm 0.184	0.508 \pm 0.227
癌旁组织	0.923 \pm 0.182	0.963 \pm 0.208	0.305 \pm 0.136
P	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 ASPP1、ASPP2 和 iASPP mRNA 与临床病理特征的关系 尿路上皮癌组织中 ASPP1、ASPP2 和 iASPP mRNA 的表达与肿瘤细胞分化程度有关 ($P < 0.05$),而与性别、年龄、淋巴结转移、临床肿瘤-淋巴结-转移 (tumor-node-metastasis, TNM) 分期无关 ($P > 0.05$),见表 3。

表 3 尿路上皮癌组织 ASPP1、ASPP2 和 iASPP mRNA 与临床病理特征的关系 ($\bar{x} \pm s$)

临床病理特征	n	ASPP1		ASPP2		iASPP	
		mRNA	P	mRNA	P	mRNA	P
性别							
男	17	0.615 \pm 0.232	>0.05	0.718 \pm 0.161	>0.05	0.319 \pm 0.157	>0.05
女	13	0.698 \pm 0.187		0.684 \pm 0.215		0.286 \pm 0.106	
年龄							
≤ 60 岁	18	0.671 \pm 0.178	>0.05	0.696 \pm 0.185	>0.05	0.311 \pm 0.116	>0.05
>60 岁	12	0.621 \pm 0.265		0.714 \pm 0.189		0.297 \pm 0.168	
分化程度							
高、中分化	25	0.608 \pm 0.179	<0.05	0.682 \pm 0.170	<0.05	0.328 \pm 0.131	<0.05
低分化	5	0.864 \pm 0.266		0.870 \pm 0.167		0.190 \pm 0.109	
淋巴结转移							
有	8	0.714 \pm 0.236	>0.05	0.713 \pm 0.219	>0.05	0.321 \pm 0.095	>0.05
无	22	0.628 \pm 0.207		0.700 \pm 0.175		0.299 \pm 0.150	
TNM 分期							
I + II	20	0.642 \pm 0.192	>0.05	0.677 \pm 0.185	>0.05	0.307 \pm 0.126	>0.05
III + IV	10	0.668 \pm 0.264		0.755 \pm 0.178		0.301 \pm 0.162	

3 讨 论

ASPP 家族基因的发现为研究 P53 功能开辟了新的领域,ASPP 的正性调控和 iASPP 负性调控最终影响 P53 的促凋亡功能,进而决定肿瘤细胞的命运^[4-5]。研究表明,ASPP 家族基因表达异常可见于乳腺癌、肝癌、血液肿瘤等多系统肿瘤^[6-11]。李强等^[12]构建过表达 iASPP 的乳腺癌细胞株,过表达 iASPP 可明显降低顺铂对乳腺癌细胞的抑制作用。而 Hang 等^[13]采用 RNA 干扰技术,下调 iASPP 在人乳腺癌 MCF-7 细胞和淋巴白血病 Nalm-6 细胞中的表达,发现细胞凋亡率上升,细胞对促凋亡药物的敏感性增加,提示 iASPP 具有抗凋亡的作用。因此,ASPP 家族有望成为阐明肿瘤病理机制、早期诊断、治疗和预后判断的一个新靶点。

膀胱癌是泌尿系统最为常见的肿瘤^[14],可发生于膀胱的各层组织。按组织发生学分为上皮性肿瘤和非上皮性肿瘤,其中 95% 以上为上皮性肿瘤,包括尿路上皮癌、鳞状细胞癌及腺癌,其中,尿路上皮癌占 90% 以上,好发年龄为 40~60 岁^[15]。膀胱癌的发生和演变是一个多基因调控的过程,其中,P53 失去对细胞生长的正常抑制作用,细胞过度生长是导致膀胱癌形成的一个重要因素。

本研究发现,ASPP1 和 ASPP2 mRNA 在膀胱尿路上皮

癌组织中的表达水平低于正常膀胱组织,而 iASPP mRNA 在膀胱尿路上皮癌组织中的表达明显高于癌旁组织,提示 ASPP1 和 ASPP2 的表达下调及 iASPP 的过表达可能在膀胱癌的发生、发展过程中发挥重要作用,其作用机制可能为:iASPP、ASPP1 和 ASPP2 结合 P53 的 DNA 结合位点,抑制 P53 的促细胞凋亡功能,肿瘤细胞获得凋亡抗性,不断增殖,最终导致恶性细胞不断增生^[2]。但 ASPP 家族基因在序列结构上存在极大的相似性,它们在肿瘤细胞中怎样获得与 P53 竞争性结合的优先权还不得而知,ASPP 对 P53 凋亡通路的作用中有许多蛋白质的参与,ASPP 与它们之间的作用还需要进一步研究。本研究还显示,ASPP 基因与膀胱尿路上皮癌细胞的分化程度有关,而与性别、年龄、淋巴结转移、临床分期无关。今后,还需进一步开展大样本调查,化疗药物对 ASPP 基因表达的影响也需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Samuels-Lev Y, O'connor DJ, Bergamaschi D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53[J]. Mol Cell, 2001, 8(4): 781-794.
 [2] Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, et al. (下转第 179 页)

- [2] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data[J]. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189.
- [3] Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(2): 153-161.
- [4] Gonçalves JP, Oliveira A, Severo M, et al. Cross-sectional and longitudinal associations between serum uric acid and metabolic syndrome[J]. *Endocrine*, 2012, 41(3): 450-457.
- [5] Chang HY, Tung CW, Lee PH, et al. Hyperuricemia as an independent risk factor of chronic kidney disease in middle-aged and elderly population[J]. *Am J Med Sci*, 2010, 339(6): 509-515.
- [6] Wang T, Bi Y, Xu M, et al. Serum uric acid associates with the incidence of type 2 diabetes in a prospective cohort of middle-aged and elderly Chinese[J]. *Endocrine*, 2011, 40(1): 109-116.
- [7] 中华医学会风湿病学分会. 原发性痛风诊治指南(草案)[J]. *中华风湿病学杂志*, 2004, 8(3): 178-181.
- [8] Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks[J]. *Comp Funct Genomics*, 2001, 2(3): 155-168.
- [9] Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1168(1/2): 237-246.
- [10] 钟麒, 高玉霞, 常红, 等. 男性高尿酸血症患者血浆代谢组学的研究[J]. *天津医药*, 2011, 39(8): 695-697.
- [11] Yang T, Chu CH, Bai CH, et al. Uric acid level as a risk marker for metabolic syndrome: A Chinese cohort study[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(2): 525-531.
- [12] 简维雄, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病心血瘀阻证血浆代谢组学的检测分析[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(6): 579-584.
- [13] See LC, Kuo CF, Chuang FH, et al. Hyperuricemia and metabolic syndrome: associations with chronic kidney disease[J]. *Clin Rheumatol*, 2011, 30(3): 323-330.
- [14] Mankovsky B, Kurashvili R, Sadikot S. Is serum uric acid a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease? A review of the clinical evidence. Part 1, diabetes and metabolic syndrome[J]. *Clin Res Rev*, 2010, 4(3): 176-184.
- [15] van den Brink DM, Wanders RJ. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease[J]. *Cell. Mol. Life Sci*, 2006, 63(15): 1752-1765.
- [16] Liu Y, Sun X, Di D, et al. A metabolic profiling analysis of symptomatic gout in human serum and urine using high performance liquid chromatography-diode array detector technique[J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(23/24): 2132-2140.

(收稿日期: 2012-09-18 修回日期: 2012-12-22)

(上接第 175 页)

- iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from wolln to human[J]. *Nat Genet*, 2003, 33(2): 162-167.
- [3] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [4] Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(10): 749-758.
- [5] Lu X. p53: a heavily dictated dictator of life and death[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(1): 27-33.
- [6] Liu ZJ, Xin L, Yun Z, et al. Downregulated mRNA expression of ASPP and the hypermethylation of the 5'-untranslated region in Cancer cell lines retaining wild-type p53[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(7): 1587-1590.
- [7] 方赞熙, 张忠英, 黄如欣, 等. 实时荧光定量 PCR 技术检测 iASPP 基因在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(1): 102-103.
- [8] Zhang XW, Min W, Zhou CL, et al. The expression of iASPP in acute leukemias[J]. *Leuk Res*, 2005, 29(2): 179-183.
- [9] Jiang L, Siu MK, Wong OG, et al. iASPP and chemoresistance in ovarian cancers: effects on paclitaxel-mediated mitotic catastrophe[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(21): 6924-6933.
- [10] Liu ZJ, Cai Y, Hou L, et al. Effect of RNA interference of iASPP on the apoptosis in MCF-7 breast cancer cells[J]. *Cancer Invest*, 2008, 26(9): 878-882.
- [11] Chen J, Xie F, Zhang L, et al. iASPP is over-expressed in human non-small cell lung cancer and regulates the proliferation of lung cancer cells through a p53 associated pathway[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 694.
- [12] 李强, 程湘, 孙守勋, 等. 乳腺癌细胞过表达 iASPP 对顺铂作用的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(15): 1438-1440.
- [13] Hang L, Min W, Diao SY, et al. siRNA-mediated down-regulation of iASPP promotes apoptosis induced by etoposide and daunorubicin in leukemia cells expressing wild-type p53[J]. *Leuk Res*, 2009, 33(9): 1243-1248.
- [14] 全国肿瘤防治研究办公室, 卫生部统计信息中心. 2008 年中国卫生统计提要[J]. 2004~2005 年前十位恶性肿瘤死亡率, 52-53.
- [15] Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression[J]. *Cancer Control*, 2000, 7(4): 325-334.

(收稿日期: 2012-09-09 修回日期: 2012-12-01)