

膀胱癌组织中白细胞介素-12B 基因启动子区甲基化的变化及其意义

翟宇强, 石硕文, 谭云鹤, 曹志平, 杨平
(西安市中心医院泌尿外科, 陕西 西安 710003)

[摘要] **目的** 研究膀胱癌组织中白细胞介素-12B 基因(IL-12B)启动子区甲基化的变化及其临床意义。**方法** 应用甲基化特异性聚合酶链反应、Western-blot 检测膀胱癌及癌旁组织 78 例, 比较 IL-12B 基因启动子区甲基化及其蛋白质与膀胱癌发生发展的关系。**结果** (1) 膀胱癌组织 IL-12B 启动子区甲基化产物明显多于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.8, P = 0.001$); (2) 膀胱癌组织和癌旁组织 IL-12B 启动子区甲基化产物的 PMR 水平差异有统计学意义 ($t = 3.42, P = 0.001$); (3) 膀胱癌组织 IL-12B 蛋白的表达水平显著低于癌旁组织 ($t = 2.832, P = 0.012$)。 **结论** IL-12B 基因启动子区甲基化及其编码蛋白质的失活与膀胱癌的发生相关。

[关键词] 膀胱癌; 白细胞介素-12B 基因; 聚合酶链反应

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)05-0058-03

Clinical Implications of Methylation of IL-12B Gene on Promoter Area in Bladder Cancer Tissues

ZHAI Yu-qiang, SHI Shuo-wen, TAN Yun-he, CAO Zhi-ping, YANG Ping
(Dept. of Urology, Xi'an Central Hospital, Xi'an Shanxi 710003, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the clinical implications of methylation of the interleukin-12B gene (IL-12B) on promoter area in bladder cancer tissues. **Methods** The tissues of 78 cases of bladder cancer and para-carcinoma tissues were studied. The expression of methylation of IL-12B gene on promoter area was detected by polymerase chain reaction (PCR). The protein expression of IL-12B was determined by western blot analysis. **Results** (1) The product of methylation of IL-12B gene on promoter area of the bladder cancer tissues was significantly higher than that of the para-carcinoma tissues (the chi-square = 14.8, $P = 0.001$). (2) The PMR level of IL-12B gene in bladder cancer and para-carcinoma tissues was statistically significant ($t = 3.42, P = 0.001$). (3) The IL-12B protein expression level of bladder cancer tissues was significantly less than that of para-carcinoma tissues ($t = 2.832, P = 0.012$). **Conclusion** The methylation of IL-12B gene on promoter area and the inactivation of IL-12B protein are significantly related to bladder cancer.

[Key words] Bladder cancer; IL-12B gene; Polymerase chain reaction

白细胞介素 12B (interleukin-12B, IL-12B) 又称自然杀伤细胞刺激因子 (natural killer cell stimulatory factor, NKSF)、细胞素毒性淋巴细胞成熟因子 (cytotoxic lymphocyte maturation factor, CLMF), 属于炎症因子的一种, 其启动子区 +1188A/C 是调控 IL-12B 分泌的部位^[1]。IL-12B 与许多人类恶性肿瘤如胃癌^[2]、肝癌^[3]等存在相关关系, 但是与膀胱癌的关系目前文献报道较少。采用甲基化

IL-12B 基因启动子区的方法验证该基因与膀胱癌发生发展的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

对 2009 年 6 月至 2012 年 6 月在西安市中心医院泌尿外科住院的膀胱癌病例进行研究, 研究组无

[基金项目] 西安市社会发展引导计划基金资助项目 (SF1201)

[作者简介] 翟宇强 (1968~), 男, 甘肃兰州市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事前列腺膀胱疾病临床及研究工作。

膀胱癌化疗和放射治疗, 经病理检查证实. 对照组癌旁组织切除. 所有患者签署知情同意书. 研究组和对照组各 78 例. 膀胱癌组织标本按 WHO 病理分级: I 级 31 例, II 级 20 例, III 级 27 例; UICC 临床分期: Ta ~ T1 43 例, T2 ~ T3 35 例. 年龄 31 ~ 72 岁, 平均 (49.7 ± 15.2) 岁.

1.2 方法

1.2.1 IL-12B 启动子区甲基化特异性 PCR

血样 DNA 的提取采用快速萃取法. 采用亚硫酸氢盐修饰 DNA, 用 IL-12B 启动子区 + 1188A / C 甲基化热启动 PCR 扩增, 上游和下游引物分别为: 5' GGGTTTTGCGAGAGCGCG 3' 和 5' GCTAACAAAC-GCGAACCG 3'; 未甲基化 PCR 扩增上游和下游引物分别为 5'GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG3'; 5' GGTTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG3'. 25 μ L 总反应系统, 包括 2 \times Tap PCR MasterMix 12 μ L, 2 μ L 引物, 4 μ L DNA 模板, 双蒸馏水补足. 共 35 个循环. 每个循环包括预处理温度 95 $^{\circ}$ C, 时间 5 min; 循环反应的热变性温度为 95 $^{\circ}$ C, 30 s 的时间; 扩展温度 72 $^{\circ}$ C, 30 s 的时间; 退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 61 $^{\circ}$ C, 59 $^{\circ}$ C, 30 s 的时间. 最后扩展 10 min. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物. 使用自动凝胶成像系统的照片和图像分析. 采用 β 肌动蛋白 (β -actin) 作为内部控制, 采用甲基化率参数 (PMR) 来描述基因在组织中的甲基化水平, 目标带与 β -actin 的密度比值采用半定量分析.

1.2.2 对 IL-12B 的表达采用 Western blot 测定

膀胱癌组织及癌旁组织总蛋白的提取采用常规提取蛋白法, 电泳分离用聚丙烯酰胺凝胶, 转膜用硝酸纤维素膜, 磷酸盐缓冲液和一半的 5% 的脱脂奶粉封闭, 1:1 000 稀释的抗兔抗人 IL-12B 为一抗, 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶偶联羊抗兔抗体为二抗, 反应时间均为室温下 1 h, DAB 显影. 使用自动凝胶成像系统分析检测目标条带并进行定量分析.

1.3 统计学处理

采用 SPSS 进行数据录入和统计. 计数资料比较采用 χ^2 检验, 多组间计量资料比较采用方差分析, 2 组间计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 电泳检测 IL-12B 基因启动子甲基化结果

电泳结果显示 β 肌动蛋白、IL-12B 未甲基化产物、甲基化产物条带均较清晰, 大小为 250 bp、

158 bp、115 bp (图 1). 膀胱癌组织和癌旁组织的 DNA 甲基化产物的 IL-12B 检测结果, 癌旁组织 12 例 (15.4%), 膀胱癌 53 例 (67.9%). 2 组之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.8, P = 0.001$).

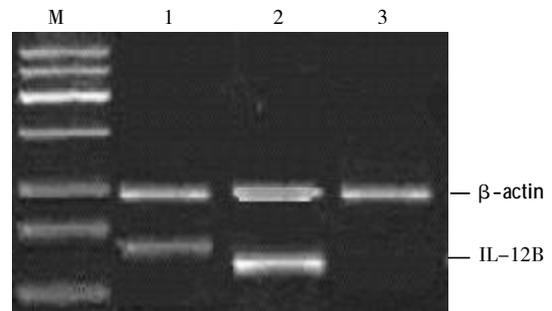


图 1 IL-12B 甲基化产物、未甲基化产物和 β -actin 电泳结果

Fig. 1 The PCR result of methylation of IL-12B gene on promoter area

M:marker; 1:IL-12B 未甲基化产物; 2:IL-12B 甲基化产物; 3:空白对照.

2.2 IL-12B 启动子区甲基化的半定量分析

膀胱癌组织和癌旁组织 IL-12B 启动子区甲基化产物的 PMR 水平分别为 (0.371 ± 0.146) 和 (0.034 ± 0.012) . 2 组之间有显著性差异 ($t = 3.42, P = 0.001$). 与临床病理因素的关系: IL-12B 在膀胱癌组织不同病理分级的 PMR 水平 2 组之间差异无统计学意义 ($F = 0.198, P > 0.05$), 不同临床分期的 PMR 水平差异无统计学意义 ($t = 0.257, P > 0.05$), 见表 1.

表 1 膀胱癌组织 IL-12B 表达水平与临床病理因素关系
Tab. 1 The relation of the expression level of IL-12B in bladder cancer tissues and clinicopathologic factors

因素	n	PMR 水平	F/t	P
病理分级				
I	31	0.365 \pm 0.162		
II	20	0.382 \pm 0.171		
III	27	0.371 \pm 0.169	0.198	> 0.05
临床分期				
Ta ~ T1	43	0.385 \pm 0.181		
T2 ~ T3	35	0.377 \pm 0.178	0.257	> 0.05

2.3 2 组间 IL-12B 蛋白表达的比较

IL-12B 和内参照 β -珠蛋白两条棕色电泳条带分别为 72 ku 和 38 ku 的, 见图 2. IL-12B 蛋白在膀胱癌组织的密度显著低于癌旁组织, 量化分析结果为膀胱癌组织 (0.391 ± 0.121) , 癌旁组织

(1.215 ± 0.437), 2 组之间差异有统计学意义 ($t = 2.832, P = 0.011$) .

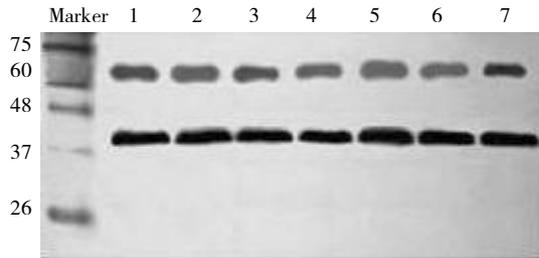


图 2 IL-12B 蛋白的 Western blot 结果

Fig. 2 The Western blot result of IL-12B protein

Marker:蛋白质 marker; 2、4、6:为膀胱癌组织; 1、3、5、7 为癌旁组织.

3 讨论

膀胱癌属于最常见的恶性肿瘤之一, 其发生受周围环境因素和个体遗传因素有关. 个体因素中, 慢性炎症刺激诱导细胞凋亡诱发肿瘤细胞的发生, 炎症因子基因变异引起的免疫功能下降会减弱机体清除肿瘤细胞的能力^[4], 与肿瘤的发展相关. IL-12B 基因位于染色体 5q31-33, 调控活化的巨噬细胞和 B 细胞分泌 IL-12 的一条重肽链 p40 的产生. IL-12 属于炎症因子之一, 可以协助机体对肿瘤细胞的清除, 在体内外都能抑制多种恶性肿瘤的增殖与转移^[5]. Han S S 等^[6]对宫颈癌患者的检测中发现, IL-12B 基因突变与宫颈癌密切相关. Ben Chaaben A 等^[7]研究发现 IL-12B 基因与肿瘤的发生密切相关.

IL-12B 基因启动子区甲基化失活会抑制机体巨噬细胞分泌 IL-12, 参与介导抗血管生成, 促进肿瘤的发生发展, 逆转巨噬细胞 IL-12B 表达可以提高抗肿瘤免疫和抗血管生成治疗疗效^[8]. IL-12B 基因失活的机制为: 启动子甲基化、纯合缺失和点突变^[9], IL-12B 抗肿瘤作用的机理主要包括: (1) 通过 NKT 细胞、CD4⁺T 细胞和 NK 细胞等效应细胞起细胞毒作用^[10]; (2) 通过肿瘤坏死因子介导的间接抗肿瘤作用; (3) IL-12 作用于 NK 细胞, 产生内源性 IFN- γ , 在抗肿瘤效应中起关键作用; (4) IL-12 还可以通过抑制肿瘤细胞增殖, 抗肿瘤血管生成^[11].

Stanilova S 等^[12]对 63 例膀胱癌患者和 160 例正常人群的比较发现, IL-12 基因 pro2 等位基因是膀胱癌的危险因素 (42% vs 62.5%, $P = 0.0042$) . Wei Y S 等^[13]对 302 例膀胱癌患者和 310 例正常对照的 IL-12 基因的三个位点进行了研究, 结果表明 IL-12 基因 16974 A 等位基因是膀胱癌的危险因素 (OR=1.334, 95% CI 1.065 1.670, $P = 0.012$) . 本

研究分析了 IL-12B 基因启动子甲基化, 在膀胱癌中 IL-12B 蛋白明显低于癌旁组织, IL-12B 启动子甲基化结果明显高于癌旁组织, 推断膀胱癌的发生发展与 IL-12B 基因启动子甲基化及其编码蛋白的失活有关, 与国外研究结果相互验证.

总之, 本研究通过对 IL-12B 甲基化和蛋白表达在膀胱癌组织和癌旁组织的差异, 确认在膀胱癌组织出现 IL-12B 甲基化失活. 但由于基因与基因之间相互作用的复杂性, IL-12B 和膀胱癌的关系还需要更多的研究来确认.

[参考文献]

- [1] XIAOJUN CHEN, SUPING HAN, SUMIN WANG, et al. Interactions of IL-12A and IL-12B Polymorphisms on the Risk of Cervical Cancer in Chinese Women [J]. Clin Cancer Res, 2009, 1(3):400-405.
- [2] 吴娟, 路滢, 徐耀初. 白细胞介素-12B 基因多态性与胃癌遗传易感性的关系 [J]. 中国肿瘤, 2009, 18(4): 322-324.
- [3] 杨艳, 仇小强, 余红平, 等. 广西肝细胞癌与 TGF- β 1 及 IL-12B 基因多态性关系 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(11):1383-1385.
- [4] CHEW V, TOW C, TEO M, et al. Inflammatory tumour microenvironment associated with superior survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. J Hepatol, 2010, 52(3): 370-379.
- [5] JU M J, QIU S J, GAO Q, et al. Combination of peritumoral mast cells and T-regulatory cells predicts prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2009, 100(7): 1267-1274.
- [6] HAN S S, CHO E Y, LEE T S, et al. Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women [J]. Obstet Gynecol Reprod Biol, 2008, 6(5):71-75.
- [7] BEN CHAABEN A, BUSSON M, DOUIK H, et al. Association of IL-12p40 +1188 A/C polymorphism with nasopharyngeal cancer risk and tumor extension [J]. Tissue Antigens, 2011, 78(2):148-151.
- [8] 韩建英, 徐致祥, 邢海平, 等. 癌缺氧病因及预防和治疗 [J]. 国外医学医学地理分册, 2011, 32(2): 102-105.
- [9] ZHANG J P, YAN J, XU J, et al. Increased intratumoral IL-17-Producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. J Hepatol, 2009, 50(5): 980-989.
- [10] EIKORD E, ALCANTA-OROZEO E M, DOVEDI S J, et al. T regulatory cells in cancer: recent advances and the therapeutic potential [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(11):1573-1586.
- [11] 胡月子, 张冉. IL12B 基因多态性与卵巢癌的相关性研究 [J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2012, 9(1):25-26.
- [12] STANILOVA S, MITEVA L, PRAKOVA G. IL-12B pro and GSTP1 polymorphisms in association with silicosis [J]. Tissue Antigens, 2008, 71(2):169-174.
- [13] WEI Y S, LAN Y, LUO B, et al. Association of variants in the interleukin-27 and interleukin-12 gene with nasopharyngeal carcinoma [J]. Molecular carcinogenesis, 2009, 48(8):751-757.

(2013-01-15 收稿)