

发育调控基因 *Pax5* mRNA 在膀胱癌中的表达及意义*

刘晓琼¹, 秦 杨², 杨 林¹, 赵体德², 王珣章¹

(1. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 云南省肿瘤医院昆明医学院第三附属医院, 云南 昆明 650106)

摘 要: 了解发育调控基因 *Pax5* 在膀胱肿瘤中的表达, 探讨其在膀胱肿瘤发生发展中的作用. 采用逆转录 PCR (RT-PCR) 和 Southern 杂交方法检测 13 例膀胱移行细胞癌 (TCC) 组织、4 例癌旁组织、3 例正常组织和 3 种癌细胞系 (膀胱移行细胞癌、结肠腺癌、肺癌) 中 *Pax5* mRNA 的表达. 结果显示, 3 种癌细胞系中均有 *Pax5* mRNA 表达; 13 例膀胱肿瘤组织和 4 例癌旁组织中 *Pax5* mRNA 阳性表达分别为 10 例和 3 例, 阳性率为 77% 和 75%. 3 例正常组织中仅有 1 例检出 *Pax5* mRNA 表达. *Pax5* 基因在膀胱肿瘤组织中的表达提示 *Pax5* 调控通路可能在膀胱肿瘤发生发展中具有重要作用.

关键词: 膀胱肿瘤; 癌; *Pax5* mRNA

中图分类号: Q344+.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 04-0017-03

个体发育是基因表达在时空上严格调控, 细胞有序增殖、分化的过程, 肿瘤发生则被认为是这一有序过程的逆转. 研究证实, 发育调控基因 *Pax* 基因家族的异常表达与多种肿瘤的发生发展有关, 如多形性恶性胶质瘤、成神经管细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤 (*Pax5*)、肾癌 (*Pax2*)、Wilms' 瘤 (*Pax2* 和 8)、横纹肌肉瘤 (*Pax3* 和 7) 等^[1]. 为探讨 *Pax* 基因家族与膀胱肿瘤发生发展的关系, 本实验采用 RT-PCR 和 Southern 杂交方法检测了 *Pax5* mRNA 在膀胱移行细胞癌 (TCC) 组织及细胞系中的表达.

1 材料和方法

1.1 细胞系和组织标本

膀胱移行细胞癌细胞系 T24、结肠腺癌细胞系 SW480 和肺癌细胞系 SPCA1 均购自武汉中国典型培养物保藏中心, 于补充 $\rho = 10\%$ FCS 的 DMEM 培养基中常规方法传代培养.

膀胱组织新鲜标本来自云南省肿瘤医院泌尿外科病理确诊手术标本. 膀胱移行细胞癌 13 例, UICC 分期: T1 4 例、T2-T3 9 例; WHO 分级: G1 5 例、G2 5 例、G3 3 例. 相应癌旁组织取自 T2-T3 期 TCC 个体. 正常膀胱组织 1 例来自前列腺炎手术标本, 2 例来自意外死亡个体. 标本离体后迅速置入液氮中保存.

1.2 RT-PCR 检测 *Pax5* mRNA 的表达

冻存组织于液氮中研磨成粉末, 用 TriPure 提取液 (BM 公司) 提取组织总 RNA. 细胞培养物弃尽培养基后直接加入提取液进行总 RNA 提取. 取 2~3 μg 总 RNA 于 10 μL 逆转录体系 (含 1 $\times$ buffer, 1 mmol/L dNTP, 25 pmol 随机 9 聚体, 12 unit RNasin, 100 unit MMLV) 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 60~90 min. 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 灭活逆转录酶, 取 2 μL cDNA 产物进行 PCR 扩增. *Pax5* 引物^[2]: 正义链 (5' - TGGAGGAGTGAATCAGCTTGG - 3'), 反义链 (5' - AGGATGCCGCTGATGGAGTAC - 3'). 内对照 GAPDH 基因引物: 正义链 (5' - CCAGCCGAGC-CACATCGCTC - 3'), 反义链 (5' - ATGAGCC-CCAGCCTTCTCCAT - 3'). PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30~40 个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. 设不加逆转录产物的 PCR 体系和不经逆转录反应的 RNA-PCR 体系为阴性对照, 同时扩增各样本的管家基因 GAPDH 作内对照以确定 RNA 模板的完整和逆转录过程的有效性. PCR 产物经 $w = 1.0\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.3 测序和 Southern 杂交

从凝胶中回收 RT-PCR 产物, 连接 T 载体, 转化 XL1-BLUE 大肠杆菌, 提取质粒测序分析. 证实 RT-PCR 产物为 *Pax5* cDNA 片段后, 分别用

* 收稿日期: 2000-11-20; 作者简介: 刘晓琼 (1975-), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 王珣章.

*Styl*I 和 *Eco*52 I 双酶切去除两端引物序列, 回收 339 bp 片段, 参照 Boehringer 地高辛试剂盒说明进行探针标记. 其余各 RT-PCR 产物电泳后经虹吸印迹转移至尼龙膜, 常规方法进行 Southern 杂交, 68 ℃ 杂交过夜.

2 结果

2.1 RT-PCR 方法检测膀胱肿瘤、正常膀胱组织和癌细胞系中 *Pax5* mRNA 表达

RT-PCR 产物电泳结果见图 1b. T24、SW480、SPCA1 三种癌细胞系均可见 500 bp 的 *Pax5* mRNA 扩增产物; 13 例膀胱 TCC 癌组织,

检出 *Pax* mRNA 阳性表达 10 例, 总阳性率为 77%; 4 例癌旁组织, 检出 *Pax* mRNA 阳性表达 3 例, 阳性率 75%; 3 例正常膀胱组织中仅有 1 例检出 *Pax5* mRNA 表达, 阳性率 33%. GAPDH 作为内参照基因, 在所有检测样本均有表达, 扩增片段为 359 bp (图 1a). 阴性对照组则无任何扩增条带出现.

2.2 Southern 杂交对 RT-PCR 产物的检验

用 *Pax5* cDNA 扩增区域内部序列作探针, 对各 RT-PCR 产物进行 Southern 杂交, 结果均检出 500 bp 阳性条带, 证实扩增产物为 *Pax5* 基因 (图 1c).

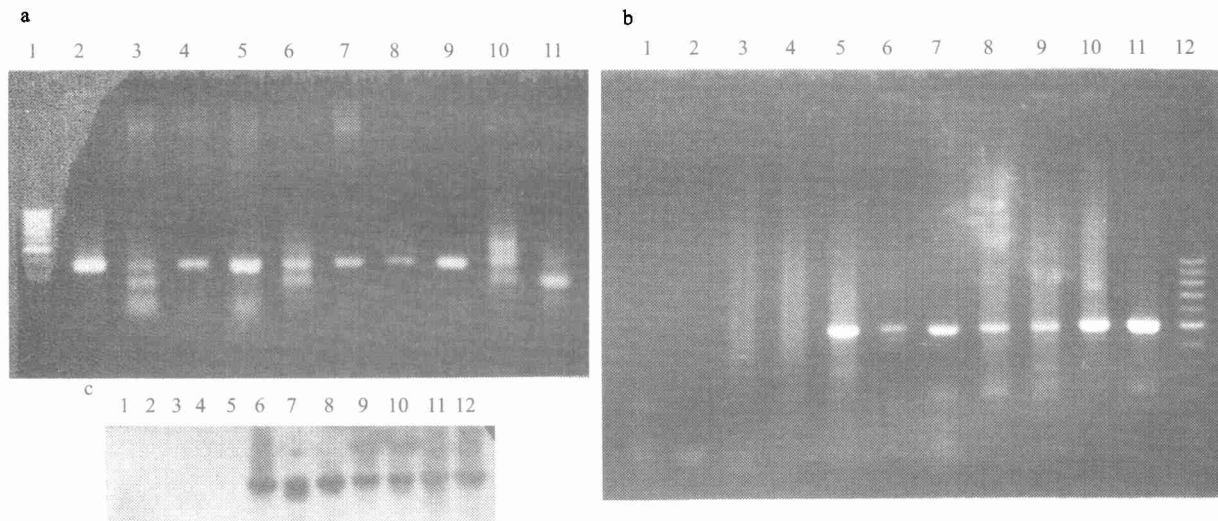


图 1 *Pax5* mRNA RT-PCR 结果及 Southern 杂交分析

Fig.1 Analysis of the results of *Pax5* mRNA RT-PCR by agarose gel electrophoresis and Southern blot

a 内对照 GAPDH 基因 RT-PCR 结果 1. 100 bp ladder DNA marker; 2~11. 部分组织 359 bp GAPDH 扩增产物

b *Pax5* mRNA RT-PCR 结果 1. 阴性对照: 未经反转录的 RNA 为 PCR 模板; 2. 阴性对照: 以 H₂O 代替反转录产物为 PCR 模板; 3, 4. 正常膀胱组织; 5. T24 细胞系; 6. SW480 细胞系; 7. SPCA1 细胞系; 8~11. 膀胱肿瘤组织; 12. 100bp ladder DNA marker;

c Southern 杂交分析 (各样号同 b)

3 讨论

肿瘤的发生发展是基因表达调控紊乱, 细胞去分化, 无序恶性增殖的结果, 它与个体发育过程中基因表达及细胞分化的时空秩序形成鲜明对比. 由于共同涉及细胞生长、增殖、分化、通讯和凋亡等关键细胞代谢途径, 肿瘤发生和正常个体发育被认为是两条关系密切的负性相关途径. 在正常胚胎发育中调控细胞快速生长的转录因子有可能在成体细胞中表达异常而被重新激活, 使细胞获得生长优势, 脱离分化状态并产生转化能力, 导致肿瘤发生.

人类 *Pax* 基因家族编码 9 种在胚胎发育中起

重要调控作用的转录因子 (*Pax1* - 9), 参与中枢神经系统发育、B 淋巴细胞分化以及肾、眼等器官形成. PAX 蛋白的共同特征是具有一个保守的 128 氨基酸的配对结构域 (paired domain) 和一个完整或部分序列的同源结构域 (homeodomain), PAX 蛋白通过配对结构域和同源结构域与下游靶基因特定顺式元件结合而发挥转录调控活性^[3]. 在小鼠同源物的研究中, Catharina 等发现 *Pax* 基因可体外转化成纤维细胞, 并具有裸鼠致瘤能力^[4]. 其他研究也发现, 多种 *Pax* 基因在人类肿瘤中异常表达, 包括多形性恶性胶质瘤、成神经管细胞瘤、非何杰金氏淋巴瘤 (*Pax5*)、肾癌 (*Pax2*)、Wilms' 瘤 (*Pax2* 和 8)

和横纹肌肉瘤 (Pax3 和 7) 等^[1]。

Pax 基因家族的第Ⅲ类 (class Ⅲ) 成员——Pax2, Pax5 和 Pax8, 由于在有丝分裂高度活跃的未分化细胞中表达, 尤被认为是候选原癌基因^[3]。最令人感兴趣的是, 在人类星形细胞瘤的研究中, PAX5、PAX2 和 PAX8 等被发现是 p53 基因的上游调控者, 对 p53 基因的转录具有直接调控作用。PAX5 等蛋白的配对结构域可以与 p53 基因启动子特异结合, 抑制 p53 基因转录和依赖于 P53 蛋白的下游反式调控途径^[6]。鉴于 p53 基因在细胞周期调控、细胞凋亡等诸多代谢途径中发挥关键作用, Pax5 等基因的表达及其相关调控通路与肿瘤发生发展的关系也变得十分令人关注。

已有研究表明, Pax5 基因在恶性胶质瘤^[7]、淋巴瘤^[8]和成神经管细胞瘤^[9]中表达失调, 并且与分化程度相关。本研究发现, Pax5 基因在膀胱移行细胞癌组织中呈高频率表达, 阳性表达率达 77%, 与 Adshead 等的结果相符^[2]。由于检测样本数量有限, 本研究结果未显示 Pax5 基因表达与病理分期、分级有关。在癌前细胞或癌细胞中, Pax5 基因的活化可能使 p53 等抑癌基因的转录受到抑制, 细胞获得生长优势, 保持分裂活跃, 最终促成肿瘤发生或恶性进展。除膀胱癌组织和细胞系外, 本研究还在结肠腺癌和肺癌细胞系中检测到 Pax5 mRNA 的表达, 暗示转录因子 PAX5 的表达及其调控通路可能是多种肿瘤发生发展的公共途径。本研究在 3 例高分期 TCC 癌旁组织中检测到 Pax5 mRNA 的表达, 验证了膀胱癌是区域性癌变 (field cancerization) 的假说。此外, 用 RT-PCR 方法在一例正常膀胱组织中检测到 Pax5 mRNA 的表达, 表明正常膀胱组织中也可

能存在 Pax5 基因较低水平的本底表达。免疫组化和原位杂交研究将为 Pax5 基因在膀胱肿瘤和正常组织中的表达提供进一步的实验证据。

探索 Pax5 基因在肿瘤发生发展中的表达特性和调控通路具有十分重要的意义, 不仅可以促进对肿瘤发生发展分子机制的深入了解, 而且在利用 Pax5 基因表达产物作为潜在肿瘤标志和基因治疗靶位的应用方面也具有潜在价值。

致谢:衷心感谢中山医科大学第一附属医院泌尿外科郑克立教授、珠江医院肾移植中心林民专副教授对本文的指导与支持。

参考文献:

- [1] STUART E T, YOKOTA Y, GRUSS P. PAX and HOX in neoplasia[J]. Adv Genet, 1995, 33: 255 - 274.
- [2] ADSHEAD J M, OGDEN C W, PENNY M A, et al. The expression of PAX5 in human transitional cell carcinoma of the bladder: relationship with de-differentiation[J]. BJU Int, 1999, 83: 1039 - 1044.
- [3] STRACHAN T, READ A P. PAX genes[J]. Curr Opin Genet Dev, 1994, 4: 427 - 438.
- [4] CATHARINA C, MAULBECKER G P. The oncogenic potential of Pax genes[J]. EMBO J, 1993, 12: 2361 - 2367.
- [5] STUART E T, KIOUSSI C, GRUSS P. Mammalian Pax genes[J]. Annu Rev Genet, 1994, 28: 219 - 236.
- [6] STUART E T, HAFFNER R, OREN M, et al. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression[J]. EMBO J, 1995, 14: 5638 - 5645.
- [7] STUART E T, KIOUSSI C, AGRIZZI A, et al. PAX5 expression correlates with increasing malignancy in human astrocytomas[J]. Clin Cancer Res, 1995, 1: 207 - 214.
- [8] IIDA S, RAO P H, NALLASIVAM P, et al. The t(9;14) (p13; q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene[J]. Blood, 1996, 88: 4110 - 4117.
- [9] KOZMIK Z, SURE U, RUEDI D, et al. Deregulated expression of PAX-5 in medulloblastoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 5709 - 5713.

The Expression of Pax5 in Human Transitional Cell Carcinoma of the Bladder

LIU Xiao-qiong¹, QIN Yang², YANG Lin¹, ZHAO Ti-de¹, WANG Xun-zhang²

(1. Biopharmaceutical Center, Zhoushan University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Urology, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650106, China)

Abstract: To investigate the association of Pax5 expression with oncogenesis and progression of human transitional cell carcinoma of bladder. Using RT-PCR and Southern analysis, Pax5 gene expression was assessed in 13 primary tumors, 4 specimens neighboring the tumor, 3 cases of normal urothelium and 3 established cell lines of TCC, colon adenocarcinoma and lung carcinoma. All three established cell lines and 77% of primary TCCs expressed Pax5 mRNA. The result suggested that Pax5 may play a role in oncogenesis and progression of human TCC of the bladder.

Keywords: bladder neoplasms; carcinoma; Pax5 mRNA