

UHRF1 在膀胱癌中的表达及临床意义

于晓华¹, 李建辉¹, 郑俊彪¹, 杨国良², 薄隽杰²

(1.嘉善县第一人民医院, 浙江 嘉兴 314100;

2.上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127)

摘要: [目的] 研究 UHRF1 在膀胱癌中的表达及临床意义。[方法] 采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化法分别检测 58 例膀胱癌组织和 20 例相应正常组织中 UHRF1 的表达, 并分析表达的差异与临床病理特征的关系。[结果] UHRF1 mRNA 在膀胱癌中的表达量 (107.0 ± 24.3) 高于正常组织的表达量 (1.9 ± 0.4), 差异有显著统计学意义 ($P < 0.001$); 免疫组化显示 UHRF1 蛋白在膀胱癌组织中的阳性表达率为 53.4%, 正常组织中未见表达, 两种组织的表达有明显差异 ($P < 0.001$)。UHRF1 蛋白的表达与肿瘤分级 ($P = 0.026$) 和分期 ($P = 0.017$) 有关, 与性别、年龄、肿瘤大小、数目无明显相关性 ($P > 0.05$)。[结论] UHRF1 的表达在肿瘤组织中明显高于正常组织, 且与病理分级、临床分期有关, UHRF1 的过表达可能促进膀胱癌的进展。

关键词: 膀胱肿瘤; UHRF1; RT-PCR; 免疫组化

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)08-0565-04

Study of Expression of UHRF1 in Bladder Cancer and Its Clinical Significance

YU Xiao-hua, LI Jian-hui, ZHENG Jun-biao, et al.

(Jiashan No.1 People's Hospital, Jiashan 314100, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of UHRF1 and its clinical significance in bladder cancer. [Methods] Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry were used to detect the expression of UHRF1 in bladder cancer tissue (58 cases) and normal bladder tissue (20 cases). The relation between expression of UHRF1 in bladder cancer tissues and clinicopathologic features was analyzed. [Results] The expression of UHRF1 mRNA was higher in bladder cancer tissues (107.0 ± 24.3) than that in normal bladder tissues (1.9 ± 0.4) ($P < 0.001$). There was negative expression of UHRF1 protein in normal bladder tissues, while the positive expression of UHRF1 was 53.4% in bladder cancer tissues. The expression of UHRF1 related to tumor grading ($P = 0.026$) and staging ($P = 0.017$), but did not relate to gender, age, tumor number and size ($P > 0.05$). [Conclusion] The expression of UHRF1 is higher in bladder cancer than that in normal bladder tissues and relates to tumor grading and staging. It suggests that overexpression of UHRF1 might contribute to progress of bladder cancer.

Subject words: bladder neoplasms; UHRF1; real-time polymerase chain reaction (RT-PCR); immunohistochemistry

UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and ring-finger domains 1) 是首先被克隆作为一种与细胞生长有关的核蛋白基因^[1], 而后发现其可能与细胞周期调控有关^[2-3]。人 UHRF1 基因位于人类染色体 19p13.3, 含有 18 个外显子, 一个 2.4kb 大小的 cDNA。人 UHRF1 蛋白含有 793 个氨基酸并包括一个类泛素 (ubiquitin-like) 模式、一个亮氨酸拉链模式 (leucine

zipper motif)、锌指模式 (zinc finger motif)、一个 eyelinA/E-CDK2 磷酸位点、一个 RB 结合部位和一个指状构造^[1]。最近的研究表明 UHRF1 在调控细胞的增殖及细胞周期 G₁/S 的转换中起到重要的作用^[4,5]。UHRF1 mRNA 和蛋白在静止的细胞中表达较低, 而在增殖的细胞中表达明显增加^[6]。UHRF1 在胰腺癌、前列腺癌、宫颈癌及乳腺癌组织中都有过表达^[7-10]。本研究通过 RT-PCR 和免疫组化法检测膀胱癌组织和正常膀胱组织中 UHRF1 的表达, 并分析 UHRF1 的表达与临床病理特征的关系, 探讨

通讯作者: 薄隽杰, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 博士; 上海交通大学医学院附属仁济医院泌尿外科, 上海市黄浦区山东中路 145 号 (200001); E-mail: bojuanjie@sina.cn。

收稿日期: 2011-11-02; **修回日期:** 2011-12-30

UHRF1 在膀胱癌发生发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 实验材料

标本取自上海仁济医院泌尿外科 2009 年 2 月至 2009 年 11 月手术切除的新鲜标本 58 例及 20 例相应的癌旁组织作为对照, 所有的标本均经病理证实。58 例膀胱癌患者中, 男性 39 例, 女性 19 例, 年龄 44~81 岁, 平均 67.3 岁。其中低级别膀胱癌 34 例, 高级别 24 例; 非肌层浸润性 38 例, 肌层浸润性 20 例。所有的患者术前均未接受放疗或化疗。手术切除的标本立即放入液氮中, 然后于 -80℃ 冰箱中冻存用于实时荧光定量 PCR 检测, 石蜡切片取自上海仁济医院病理科。

1.2 RT-PCR 检测 UHRF1 mRNA 的表达

采用 Trizol 提取试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取组织样本总 RNA。所得 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 符合纯度要求。运用逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 按其操作要求合成 cDNA。特异性的引物由上海生工生物工程有限公司合成, UHRF1 引物正义链: 5'-GAAACTCACCAACACCAACAG-3', 反义链: 5'-TGCTATTCTTGCCACCCTTG-3'; 内参 β -actin 引物的正义链: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCC-TAGAAGCA-3', 反义链: 5'-TGGCACCAGCACAAT-GAA-3'。反应体系: cDNA 0.5 μ g, PCR Primer-F 0.2 μ l, PCR Primer-R 0.2 μ l, SYBR Premix Ex Taq™ (2 $\times$) 5 μ l, 加 dH₂O 补足到 10 μ l。RT-PCR 的反应条件: 95℃ 10 s, 95℃ 5 s, 60℃ 31 s, 40 个循环。

1.3 免疫组化法检测 UHRF1 蛋白的表达

组织经福尔马林固定, 石蜡包埋, 厚 5 μ m。石蜡切片经常规脱蜡至水, EDTA 高温修复抗原, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 切片于二甲苯中脱蜡, 每次 15 min, 以 0.3% 的 H₂O₂ 孵育 10 min, 清除内源性的过氧化物酶活性, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 滴加正常山羊血清封闭, 室温孵育 30 min, 倾去, 滴加 1:100 鼠抗单克隆抗体 (Ab57083, Abcom 公司), 4℃ 冰箱孵育过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 再加生物素标记二抗 (DAKO 公司), 室温孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 再滴加辣根过氧化物标记的三抗, 室温孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, DAB 显

色, 苏木精复染, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 实验数据处理

在本研究中, 我们基于目的基因和管家基因实时荧光定量扩增曲线得到 Ct 值 (C 为 Cycle, t 为 threshold), 以管家基因为内参, 校正每个样品的 Ct 值。 ΔCt = 样品 Ct 均值 - β -actin Ct 均值, $\Delta\Delta Ct$ = 样品 ΔCt - 对照组 ΔCt 的均值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示样品目的基因 mRNA 相对表达量。免疫组化检测结果以显微镜下细胞核内呈棕黄色颗粒为阳性, 每份标本选取 5 个以上视野, 高倍镜下计数 1 000 个细胞, 计算细胞中阳性细胞的百分比, 以 <25% 为阴性 (-), 25%~50% 为中等阳性 (+), $\geq 50\%$ 为强阳性 (++)。

1.5 统计学处理

数据以均值 $\pm$ 标准差表示, 由 SPSS 11.0 统计软件包进行分析。荧光定量 PCR 数据比较采用独立样本 t 检验, 免疫组化数据采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

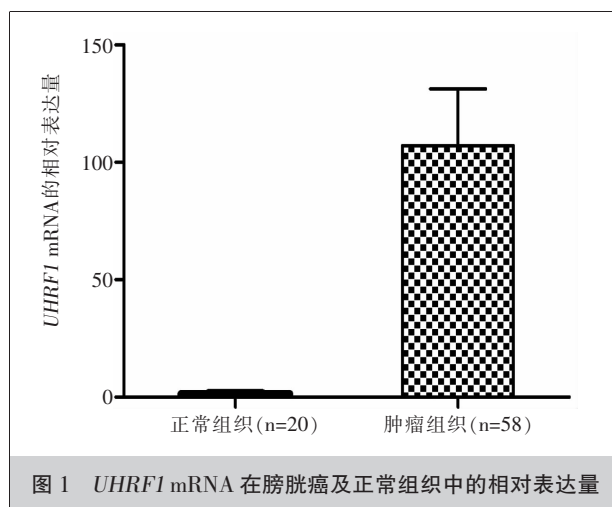
2 结果

2.1 UHRF1 mRNA 在膀胱癌组织中的表达

UHRF1 mRNA 在膀胱癌中的相对表达量 (107.0 ± 24.3) 明显高于正常组织的相对表达量 (1.9 ± 0.4), 有显著统计学差异 ($P < 0.001$) (图 1)。

2.2 UHRF1 蛋白在膀胱癌组织中的表达

UHRF1 蛋白主要在细胞核内, 仅少量在胞浆中表达 (图 2)。20 例正常组织中未见 UHRF1 蛋白的



表达,58例膀胱癌患者中31例表达,阳性率53.4%,UHRF1蛋白在肿瘤组织中的表达明显高于正常膀胱黏膜($P<0.001$)。

2.3 UHRF1蛋白的表达与膀胱癌患者临床病理的关系

UHRF1蛋白的表达与膀胱癌患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤数目等无明显相关性($P>0.05$);但与膀胱癌的分级、分期有关。在低级别和高级别膀胱癌UHRF1蛋白表达的阳性率分别为41.2%、70.8%,差

别有统计学意义($P=0.026$)。非肌层浸润性肿瘤和肌层浸润性肿瘤中UHRF1蛋白表达的阳性率42.1%和75.%,差别有统计学意义($P=0.017$)。见表1。

3 讨论

膀胱肿瘤是最常见的泌尿生殖系的恶性肿瘤。美国男性恶性肿瘤发病中居第4位,女性则居第7位,2010年新发膀胱癌病例70 530例,其中14 680例死亡^[11]。而目前关于膀胱癌发生、发展机制尚不清楚,因此明确导致肿瘤形成和进展的分子生物学改变,能为肿瘤患者的治疗提供合理的依据。

UHRF1在多种肿瘤中都有过表达,可能是UHRF1可以调整细胞周期中G/S期的转化,进而促进肿瘤的进展^[12]。抑癌基因p53表达或功能的缺失大约存在于50%的肿瘤组织中^[13]。p53通过失活转录因子E2F1来抑制UHRF1的表达,因为E2F1是UHRF1上游的直接调节因子^[3]。因此,肿瘤组织p53基因的失活也是导致UHRF1过表达的原因。在p53基因未失活的肿瘤中,抑制UHRF1的表达可明显抑制细胞的增殖和促进凋亡^[14]。因此,UHRF1在肿瘤细胞DNA损伤修复中起到重要的作用。

本研究利用敏感性高、特异性高的荧光定量RT-PCR分析发现,UHRF1 mRNA在膀胱癌中的相对表达量明显高于相应的癌旁组织,差异有统计学意义($P<0.001$)。UHRF1 mRNA的过表达在前列腺癌、乳腺癌和肺癌中都有报道^[15]。最近研究报道,在乳腺癌中,UHRF1的高表达可以促进细胞的增殖^[16]。免疫组化显示,UHRF1蛋白在肿瘤组织中的表达水平明显高于正常组织,UHRF1蛋白的过

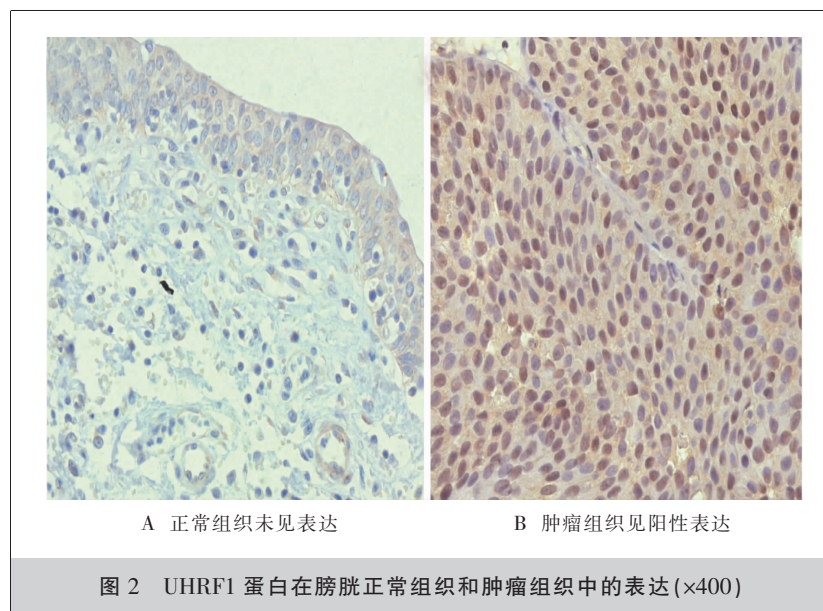


表1 UHRF1蛋白的表达与膀胱癌患者临床病理特征的关系

组别	例数	UHRF1 表达		χ^2 值	P 值
		阴性 (%)	阳性 (%)		
性别					
男性	39	19(48.7)	20(51.3)	0.225	0.636
女性	19	8(42.1)	11(57.9)		
年龄(岁)					
≤65	23	10(43.5)	13(56.5)	0.145	0.704
>65	35	17(48.6)	18(51.4)		
肿块大小(cm)					
≤3	37	17(45.9)	20(54.1)	0.015	0.902
>3	21	10(47.6)	11(52.4)		
数目					
单发	36	15(41.7)	21(58.3)	0.910	0.340
多发	22	12(54.5)	10(45.5)		
分级					
低级别	34	20(58.8)	14(41.2)	4.073	0.026
高级别	24	7(29.2)	17(70.8)		
分期					
T _a ~T ₁	38	22(57.9)	16(42.1)	5.699	0.017
T ₂ ~T ₄	20	5(25.0)	15(75.0)		

表达还与肿瘤的分级和分期有关。可见 UHRF1 的过表达可能参与膀胱癌浸润进展的过程。非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌的临床生物学行为有很大的差别,在临床治疗及术后的预后都有明显的差别。本结果研究显示,肌层浸润性膀胱癌中 UHRF1 的表达明显高于非肌层浸润性膀胱癌,提示 UHRF1 在膀胱癌的进展中起到一定的作用。

综上所述,本研究利用 RT-PCR 和免疫组化检测不同膀胱组织中 UHRF1 的表达情况,结果显示, UHRF1 在转录和翻译水平都有过表达。UHRF1 在肿瘤组织中的表达量明显高于相应的癌旁组织, UHRF1 的过表达还与膀胱癌患者的分级及分期有关。因此 UHRF1 的过表达可能参与膀胱癌的发生发展。因此深入研究 UHRF1 导致膀胱癌发生发展的具体机制,将会为膀胱癌的治疗和预后提供新的思路。

参考文献:

- [1] Fujimori A, Matsuda Y, Takemoto Y, et al. Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(12):1032-1035.
- [2] Uemura T, Kubo E, Kanari Y, et al. Temporal and spatial localization of novel nuclear protein NP95 in mitotic and meiotic cells[J]. *Cell Struct Funct*, 2000, 25(3):149-159.
- [3] Arima Y, Hirota T, Bronner C, et al. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G₁/S transition[J]. *Genes Cells*, 2004, 9(2):131-142.
- [4] Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, et al. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1[J]. *Nature*, 2008, 455(7214):822-825.
- [5] Achour M, Jacq X, Rondé P, et al. The interaction of the SRA domain of ICBP90 with a novel domain of DNMT1 is involved in the regulation of VEGF gene expression [J]. *Oncogene*, 2008, 27(15):2187-2197.
- [6] Hopfner R, Mousli M, Jeltsch JM, et al. ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase II α expression [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(1):121-128.
- [7] Mousli M, Hopfner R, Abbady AQ, et al. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(1):120-127.
- [8] Unoki M, Nishidate T, Nakamura Y. ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain[J]. *Oncogene*, 2004, 23(46):7601-7610.
- [9] Crnogorac-Jurcevic T, Gangeswaran R, Bhakta V, et al. Proteomic analysis of chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(5):1454-1463.
- [10] Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, et al. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions [J]? *Hum Pathol*, 2005, 36(10):1101-1107.
- [11] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5):277-300.
- [12] Bronner C, Achour M, Arima Y, et al. The UHRF family: oncogenes that are drugable targets for cancer therapy in the near future?[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 115(3):419-434.
- [13] Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens [J]. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3):311-322.
- [14] Abbady AQ, Bronner C, Trotzier MA, et al. ICBP90 expression is downregulated in apoptosis-induced Jurkat cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010:300-303.
- [15] Jenkins Y, Markovtsov V, Lang W, et al. Critical role of the ubiquitin ligase activity of UHRF1, a nuclear RING finger protein, in tumor cell growth [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(12):5621-5629.
- [16] Yan F, Tan XY, Geng Y, et al. Inhibition effect of siRNA-downregulated UHRF1 on breast cancer growth[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2011, 26(2):183-189.