

后者缺血缺氧;另外,在动脉粥样硬化形成的过程中,一些细胞因子和炎性介质,包括血管内皮细胞等因子的产生将导致血管通透性增加,血-视网膜屏障受损,进而导致 DME^[15]。体重指数也与 DME 相关,体重指数越高,其与 DME 联系越大。WESDR 研究小组发现体重指数超标的患者发生糖尿病视网膜病变的概率是正常体重人群的 3 倍^[16]。这也可能反映体重指数是作用于其他危险因素起作用的,它本身可能仅是一个标志。

笔者研究发现了糖尿病病程、血压、血脂、血糖以及体重指数都可能与 DME 相关。但是,鉴于回顾性病例对照研究的设计上缺乏论证力度,其结果仍然有待于进一步开展前瞻性研究予以证实。

参考文献

1 Das A, McGuire PG, Ranganamy S. Diabetic macular edema: pathophysiology and novel therapeutic targets [J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(7):1375-1394

2 Arevalo JF. Diabetic macular edema: changing treatment paradigms [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2014, 25(6):502-507

3 Xie XW, Xu L, Wang YX, *et al.* Prevalence and associated factors of diabetic retinopathy. The Beijing Eye Study 2006 [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(11):1519-1526

4 王宁, 许迅, 邹海东, 等. 上海北新泾社区 2 型糖尿病患者黄斑水肿患病情况调查 [J]. *中华眼科杂志*, 2007, 43(7):626-630

5 Diep TM. Risk factors associated with diabetic macular edema [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013, 100(3):298-305

6 Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema [J]. *Curr Diab Rep*, 2012, 12(4):346-354

7 王家良. 临床流行病学-临床科研设计、衡量与评价 [M]. 2 版. 上海:上海科技出版社, 2001: 96

8 Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, *et al.* Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) study group. Global prevalence and risk factors of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(7):556-564

9 LeCaire TJ, Palta M, Klein R, *et al.* Assessing progress in retinopathy outcomes in type 1 diabetes: comparing findings from the wisconsin diabetes registry study and the wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(3):631-637

10 王小川, 王燕, 黄小东, 等. 糖尿病黄斑水肿相关因素分析 [J]. *国际眼科杂志*, 2013, 13(8):1631-1632

11 Virk SA, Donaghue KC, Wong TY, *et al.* Interventions for diabetic retinopathy in type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Ophthalmol*, 2015, 160(5):1055-1064

12 Hammes HP, Welp R, Kempe HP, *et al.* Risk factors for retinopathy and DME in type 2 diabetes - results from the German/Austrian DPV database [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0132492

13 Zapata MA, Badal J, Fonollosa A. *et al.* Insulin resistance and diabetic macular oedema in type 2 diabetes mellitus [J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(9):1230-1232

14 Stratton IM, Kohner EM, Aldington SJ, *et al.* UKPDS 50: risk factors for incidence and progression of retinopathy in Type II diabetes over 6 years from diagnosis [J]. *Diabetologia*, 2001, 44(2):156-163

15 Noma H, Mimura T, Yasuda K, *et al.* Role of inflammation in diabetic macular edema [J]. *Ophthalmologica*, 2014, 232(3):127-135

16 Bandello F, Casalino G, Loewenstein A, *et al.* Pharmacological approach to diabetic macular edema [J]. *Ophthalmic Res*, 2014, 51(2):88-95

(收稿日期:2015-09-21)
(修回日期:2015-10-09)

雄激素非依赖性前列腺癌耐药转化过程中异常甲基化基因的鉴定

吴先华 李丽民 吴启旺 齐雪芬 洪巧珍

摘要 目的 探讨 DNA 甲基化在雄激素非依赖性前列腺癌耐药转变过程中的作用。**方法** 以雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞为对照组,雄激素非依赖性前列腺癌细胞 LNCaP-AI 为实验组,采用 Illumina DNA 甲基化芯片检测两组细胞基因组 DNA 甲基化水平,并对甲基化芯片数据进行生物信息学分析;实时荧光定量 RT-PCR 检测前列腺特异抗原 PSA mRNA 的相对表达量。**结果** LNCaP 细胞相比,发现 LNCaP-AI 细胞共有 2619 个基因甲基化水平发生改变,其中 758 个基因发生高甲基化,占差异基因的 28.9%,1860 个基因表现为低甲基化,占差异基因的 71.1%,这些差异甲基化基因涉及 Notch 信号通路和胰岛素样生长因子 1 信号通路。LNCaP-AI 细胞 PSA 基因甲基化水平上升了 3.67 倍,其 PSA mRNA 表达水平下调了 6.5 倍。**结论** DNA 甲基化参与了前列腺癌雄激素非依赖性转变的过程,可能是导致前列腺癌耐药的诱因之一。

基金项目:浙江省卫生厅医药卫生一般研究计划项目(2013KYA222)
作者单位:324000 衢州市柯城区人民医院检验科(吴先华、吴启旺、齐雪芬、洪巧珍);324000 衢州市人民医院检验科(李丽民)

关键词 DNA 甲基化 前列腺癌 LNCaP 细胞 前列腺特异抗原

中图分类号 R73 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.018

Identification of Aberrant Methylation Genes in the Process of Drug Resistance Transformation of Androgen Independent Prostate Cancer.

Wu Xianhua, Li Limin, Wu Qiwang, et al. Department of Clinical Laboratory, Quzhou Kecheng District People's Hospital, Zhejiang 324000, China

Abstract Objective To investigate the role of DNA methylation in the process of drug resistance in the androgen independent prostate cancer. **Methods** The androgen dependent prostate cancer LNCaP cells were chosen as the control group. The androgen independent prostate cancer cell LNCaP - AI was chosen as the experimental group. Genomic DNA methylation levels in the two groups were detected by DNA Illumina methylation microarray, DNA methylation microarray data was analyzed by bioinformatics methods. The relative expression of prostate specific antigen mRNA was detected by real time fluorescent quantitative RT - PCR assay. **Results** LNCaP - AI cells were found to have a total of 2619 gene methylation levels change in contrast to LNCaP cells. Totally 758 of these genes were highly methylated, accounting for 28.9% of the difference. Totally 1860 genes showed low methylation, accounting for 71.1% of the difference. These genes involved in Notch signaling pathway and insulin like growth factor 1 signaling pathway. PSA gene methylation level of PSA cells increased by 3.67 times, and the expression level of mRNA LNCaP - AI was down regulated by 6.5 times. **Conclusion** DNA methylation is involved in the process of androgen independent transition of prostate cancer, which may be one of the causes of prostate cancer drug resistance.

Key words DNA methylation; Prostate cancer; LNCaP cell; PSA

前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的肿瘤之一,在西方国家其发生率在男性恶性肿瘤中占第2位,仅次于肺癌^[1]。雄激素剥夺疗法是目前临床上常用的治疗方法,然而经过12~16个月治疗后,雄激素敏感的前列腺癌会发展为雄激素非依赖性的前列腺癌,极易发生骨转移,治疗非常棘手,病死率极高,已成为临床治疗前列腺癌的一大难题,目前对于其耐药转变机制尚不清楚。

表观遗传是指DNA序列并不发生变化而基因表达却发生了可遗传的改变,基因组DNA甲基化是一种主要表观遗传修饰形式,是调节基因功能的重要手段,是肿瘤的发生与发展的重要影响因素。在肿瘤细胞中,人们发现存在着广泛的DNA低甲基化和局部的高甲基化,而与肿瘤抑制相关的基因则高甲基化失活,从而导致肿瘤最终发生^[2]。本研究将采用甲基化芯片技术对雄激素依赖性前列腺癌细胞株(LNCaP细胞)和雄激素非依赖性前列腺癌细胞株(LNCaP - AI细胞)进行DNA甲基化检测,探讨与前列腺癌细胞耐药发生相关的DNA甲基化基因,为雄激素非依赖性前列腺癌的发病机制研究奠定理论基础。

材料与方法

1. 前列腺癌细胞培养:雄激素依赖性前列腺癌细胞(LNCaP细胞)和雄激素非依赖性前列腺癌细胞(LNCaP - AI细胞)均购于中科院上海细胞库。细胞培养方法如下:采用0.25%胰酶消化细胞,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化并吹打成单

个细胞悬液,细胞计数板计数,以 3.0×10^5 密度传代接种于25cm²培养瓶中,加4ml的DMEM培养液,放置于37℃、5%CO₂培养箱中培养72h后换液,继续培养48h。倒置显微镜下观察细胞生长状态,当细胞生长贴壁率达到70%~80%时即可用于后续实验。

2. 基因组DNA提取与重亚硫酸盐修饰:收集对数生长期细胞,采用细胞基因组DNA提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit,北京天根生化公司)提取DNA,具体步骤严格按说明书进行。提取好的DNA溶解于ddH₂O中,采用Nano Drop仪器测定DNA浓度,A260/A280比值为1.7~2.0,表示DNA样品合格,保存于-20℃冰箱中备用。采用DNA重亚硫酸盐甲基化转化试剂盒处理细胞DNA(北京天根生化公司),其原理是使未甲基化的胞嘧啶(C)转化成胸腺嘧啶(T),而甲基化的C不变,可将99%以上未甲基化胞嘧啶转化为尿嘧啶,严格按照试剂盒说明书操作。

3. 细胞总RNA提取与cDNA第1链合成:取对数生长期的细胞,采用Trizol法提取细胞总RNA(TRNzol总RNA提取试剂盒,北京天根生化公司),溶解于ddH₂O中,用NanoDrop核酸检测仪测量RNA浓度与纯度,确保A260/A280在2.0左右。采用反转录cDNA第1链合成试剂盒(TaKaRa PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit,大连宝生物工程有限公)将RNA反转录成cDNA,冻存于-20℃冰箱中备用。以上操作均严格按照说明书步骤进行。

4. 全基因组甲基化芯片检测:采用 Illumina DNA 甲基化芯片检测雄激素依赖性雄激素非依赖性前列腺癌细胞内全基因组 DNA 甲基化,以筛选出差异的甲基化位点,具体检测方法如下:①样本基因组 DNA 的提取及纯化;②样品 DNA 质量检测;③DNA 重亚硫酸盐修饰;④全基因组扩增;⑤产物酶切;⑥芯片杂交;⑦芯片处理;⑧图像扫描;⑨生物信息学数据处理:对基因芯片的表达谱数据库的数据用 Bead Studio 甲基模块软件进行预处理。

5. 实时荧光定量 RT-PCR 检测 PSAmRNA 表达:以 GAPDH 作为内参基因,PSA mRNA 表达量采用相对定量的方式表示。采用 Primer 5.0 软件设计基因引物,引物序列见表 1。PCR 扩增条件为:95℃ 10min;95℃ 10s,60℃ 30s,共 40 个循环。待 PSA mRNA 与 GAPDH 扩增反应结束后,将调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为循环阈值(cycle threshold, Ct),并调节域值范围,判断结果。GAPDH 作为内参对核酸模板进行均一化处理,并以对照组中待检测的 PSA mRNA 作为参照因子,通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 对实验组细胞内待测的 miRNAs 进行相对定量分析,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{待测 PSA}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{待测 PSA}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{对照组}}$ 。

表 1 PSA 和 GAPDH 荧光定量 PCR 引物

基因	序列(5'→3')	产物(bp)
PSA 上游引物	GCCCACTGCATCAGGAACAA	96
PSA 下游引物	GCTGTGGCTGACCTGAAATACC	
GAPDH 上游引物	AACAGCCTCAAGATCATCAGCA	102
GAPDH 下游引物	CATGAGTCCTCCACGATACCA	

结 果

1. 全基因组甲基化芯片筛选雄激素非依赖性前列腺癌 LNCaP-AI 细胞甲基化谱:在本研究中,笔者采用 Illumina 公司的 Infinium HumanMethylation27 芯片检测雄激素非依赖性前列腺癌 LNCaP-AI 细胞与雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞的全基因组甲基化水平,通过生物信息学方法比较分析,与 LNCaP 细胞相比,发现 LNCaP-AI 细胞共有 2619 个基因甲基化水平发生改变(图 1),其中 758 个基因发生高甲基化,占差异基因的 28.9%,比如 DSC2、NCSTN、C9orf121、NGFR、PPP2R2B 等,上调倍数从 4~30 倍不等(图 2);1860 个基因表现为低甲基化,占差异基因的 71.1%,比如 ACBD6、MATN3、HECTD2、SNX22、IL1RAP 等,下调倍数从 5~40 倍不等(图 3)。这些

差异的基因主要与细胞氧化还原状态水平、骨架系统、染色体组装相关、脂质和类固醇激素代谢、细胞黏附和迁移等方面相关。

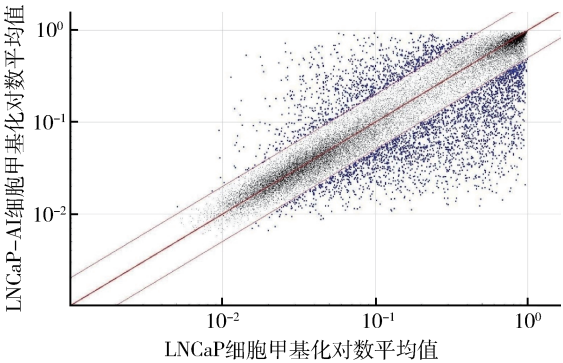


图 1 雄激素非依赖性前列腺癌 LNCaP-AI 细胞差异甲基化基因散点图

全基因组甲基化芯片筛选出的差异甲基化基因位点,红色线为分割线,上面的蓝点代表上调倍数>2 的甲基化基因,下面的蓝点代表下调倍数>2 的甲基化基因

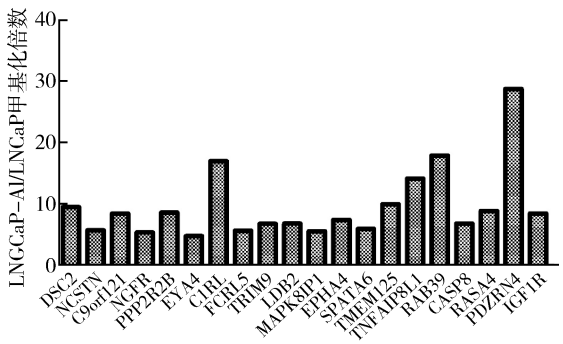


图 2 雄激素非依赖性前列腺癌 LNCaP-AI 细胞株高甲基化基因

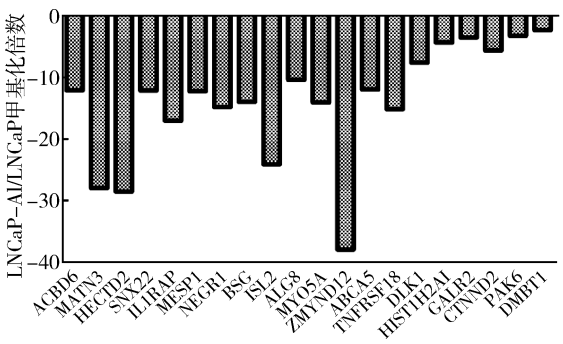


图 3 雄激素非依赖性前列腺癌 LNCaP-AI 细胞株低甲基化基因

2. Notch 信号通路相关基因甲基化变化:Notch 信号通路是前列腺癌发生、耐药和转移的 1 个重要调节因素。在本研究中,笔者特别研究了 Notch 信号通

路相关基因的甲基化变化,在这个通路中共发现 7 个基因发生甲基化水平改变,包括 Notch 的靶分子 (CFD、HES7)、Notch 的配体和受体分子 (JAG1)、Notch 的调节因子 (DTX3、LFNG、MIB2) 和 Notch 的转录 (辅) 因子 (MESP2),其中发生高甲基化的差异基因包括 MIB2、CFD 和 JAG1 基因,而低甲基化的分子包括 DTX3、LFNG、MESP2 和 HES7 基因 (图 4)。

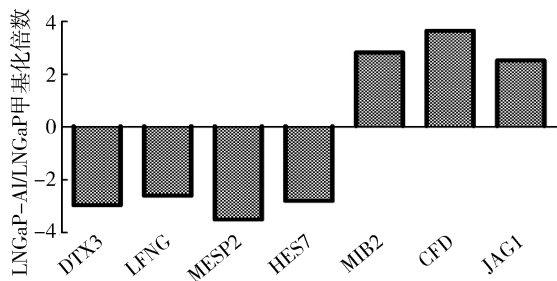


图 4 Notch 信号通路相关基因甲基化水平

3. 胰岛素样生长因子 1 信号 (IGF1) 通路相关基因甲基化变化: 对于胰岛素样生长因子 1 信号 (IGF1) 通路的变化,笔者确定了 5 个差异表达的基因涉及这一信号通路,包括高甲基化的 IGF1R、IGFBP3 和低甲基化的 IGFBP5、GRB10、PRKAR2B 基因 (图 5)。

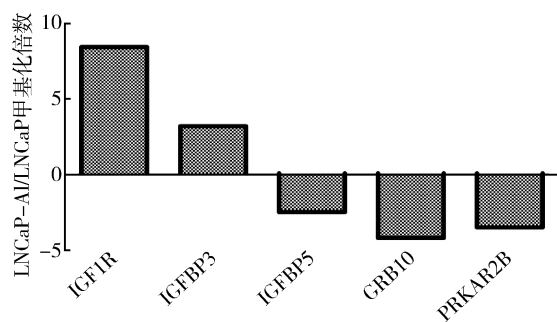


图 5 胰岛素样生长因子 1 信号 (IGF1) 通路相关基因甲基化水平

4. 雄激素受体信号通路的关键分子前列腺特异抗原 PSA 基因高甲基化: 雄激素受体 (androgen receptor, AR) 在雄激素非依赖进展中发挥着关键作用,前列腺特异抗原基因 PSA 是 AR 的直接靶分子,是前列腺上皮细胞分化的 1 个重要标志。与 LNCaP 细胞相比,LNCaP - AI 细胞 PSA 基因甲基化水平上升了 3.67 倍,而 AR 基因的甲基化状态未发生改变。通过荧光定量 PCR 检测 PSA mRNA 表达水平发现 LNCaP - AI 细胞的 PSA 表达下调了 6.5 倍。

讨 论

前列腺癌已成为危害我国老年男性人群健康的重大疾病,对雄激素非依赖性前列腺癌的转变发生机制研究,是目前国内外前列腺癌研究的 1 个热点。DNA 甲基化是前列腺癌中最为常见且研究最多的表观遗传异常机制。在脊椎动物中,CpG 二核苷酸是 DNA 甲基化发生的主要位点。CpG 常成簇存在,人们将基因组中富含 CpG 的一段 DNA 称为 CpG 岛 (CpG island),通常长度约 1 ~ 2kb。一般说来,DNA 甲基化能关闭某些基因的活性,去甲基化则可诱导基因的重新活化和表达。

本研究中笔者发现了一些差异甲基化基因并参与了细胞信号通路,包括 Notch 信号通路和 IGF 1 信号转导通路。Notch 信号通路在前列腺癌发生、发展和耐药形成过程中发挥了重要的作用,目前发现多个基因涉及到 Notch 信号通路^[3]。研究表明 Notch 信号通路在 LNCaP 细胞中发挥着肿瘤抑制功能,当 LNCaP 细胞处于去雄激素环境中时,Notch 信号通路的相关基因如 MIB2、JAG1 会发生明显的下调,过表达 JAG1 可促进 LNCaP 细胞以雄激素非依赖的方式生长增殖,可见 Notch 信号通路与雄激素不依赖表型的出现具有一定的联系^[4]。

本研究中筛选出 MIB2、CFD 和 JAG1 基因发生高甲基化,高甲基化的基因导致转录水平降低,进而使得基因表达水平下降,因此这两种基因的高甲基化可能是促进前列腺癌 LNCaP 细胞发生耐药的诱因之一。低甲基化的基因包括 DTX3、LFNG、MESP2 和 HES7 基因或许也参与了耐药形成过程,需要进一步实验证实。与前列腺癌相关的另一个通路是 IGF 1 信号转导通路,IGF1 增强抗凋亡和促有丝分裂的效应,先前报道文献表明雄激素非依赖的前列腺癌进展与 IGF1R 的丢失有关,这与本研究 IGF1R 基因高甲基化研究结果相符^[5]。另外,过表达 IGF1R 也有利于 LNCaP 细胞形成雄激素非依赖表型^[6]。另一个变化明显的基因是 IGFBP5,在 LNCaP - AI 中发生低甲基化,蛋白水平上升,使得细胞更具侵袭性和转移性,抗凋亡能力增强。PSA 是雄激素受体 AR 信号通路的一个重要分子,也是前列腺上皮细胞发生病变的重要分子标志物,在临床上应用广泛。研究表明,前列腺癌在发生初期可发生 PSA 表达水平快速升高,当发生转移时,PSA 可发生部分降低^[7]。与本研究 PSA mRNA 下调了 6.5 倍的结果相符。低 PSA 或缺乏 PSA 表达的 LNCaP 细胞是未分化或低分化肿瘤干细

胞,代表一种雄激素不依赖的、更具侵袭性的神经内分泌样前列腺癌细胞。

综上所述,本研究发现了一些基因甲基化与前列腺癌耐药发生相关,并参与多个信号通路,为雄激素非依赖性前列腺癌的发病机制研究提供依据,在今后的工作中将进一步研究其分子生物学功能,深入探讨 DNA 甲基化在前列腺癌雄激素非依赖性转变过程中的作用。

参考文献

- 1 Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics 2014[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2014, 64(1):9-29
- 2 Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3):204-220
- 3 Villarronga MA, Bevan CL, Beldandia B. Notch signaling: a potential therapeutic target in prostate cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(7):566-580

- 4 Wang Z, Li Y S, Kong D, *et al.* Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 109(4):726-736
- 5 Heidegger I, Kern J, Ofer P, *et al.* Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis. [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(9):2723-2735
- 6 Yujun G, Yue Z, Ashiya B, *et al.* IGF-1R modulation of acute GH-induced STAT5 signaling: role of protein tyrosine phosphatase activity. [J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(11):1969-1979
- 7 Wang Y, Liu G, Tong D, *et al.* Metformin represses androgen-dependent and androgen-independent prostate cancers by targeting androgen receptor. [J]. *Prostate*, 2015, 75:1187-1196

(收稿日期:2015-08-19)

(修回日期:2015-08-19)

二次经皮穿刺球囊压迫治疗初次球囊术后复发性三叉神经痛

沈永锋 王 鼎 杨定博 杜垣锋 俞文华

摘 要 **目的** 探讨二次经皮穿刺球囊压迫(percutaneous balloon compression,PBC)治疗初次 PBC 术后复发性三叉神经痛的临床疗效。**方法** 回顾性分析了 64 例采用二次 PBC 治疗初次 PBC 术后复发性三叉神经痛患者的临床资料及疗效。**结果** 术后疼痛即刻缓解 58 例(90.6%),偶有疼痛但不需服药者 3 例(4.7%),疼痛未消失但服药可控制者 2 例(3.1%),较术前有所缓解但服药不能控制者 1 例(1.6%),整体有效率为 95.3%。随访至今(2~63 个月,平均随访时间 2 年以上),6 例轻度复发,2 例重度复发,2 年复发率 12.5%。术后患侧面部麻木 60 例(93.8%),咀嚼肌乏力 36 例(56.3%),口角疱疹 29 例(45.3%),无角膜溃疡、蛛网膜出血及其他严重并发症。**结论** 二次 PBC 治疗初次 PBC 术后复发的三叉神经痛具有风险小、疗效好、复发率低的优点,是其较理想手术方案选择。

关键词 球囊压迫 三叉神经痛 复发

中图分类号 R74

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.019

Percutaneous Balloon Compression of Trigeminal Ganglion for Recurrent Trigeminal Neuralgia after Percutaneous Balloon Compression.

Shen Yongfeng, Wang Ding, Yang Dingbo, *et al.* Hangzhou Cancer Hospital, Zhejiang 310000, China

Abstract Objective To evaluate the clinical effects of the patients with recurrent trigeminal neuralgia after percutaneous balloon compression treated with percutaneous balloon compression of trigeminal ganglion. **Methods** A total of 64 patients underwent a second PBC, and a retrospective study of the clinical data of these patients was performed. **Results** After PBC, pain relief was immediate in 58 (90.6%) patients, and 3 (4.7%) patient had some pain and need no medication, 2 (3.1%) patients had some pain that could be controlled with medication. The total efficiency was 95.3%. With a mean length of follow-up of approximately 2 years after surgery, 6 cases

基金项目:浙江省科技计划项目(2013C33092);杭州市卫生科技计划项目(2013B13)

作者单位:310000 杭州市肿瘤医院(杭州市第一人民医院吴山院区)(沈永锋);310000 南京医科大学附属杭州医院、杭州市第一人民医院(王鼎、杨定博、杜垣锋、俞文华)

通讯作者:俞文华,电子信箱:d542762345@126.com