

【编委点评】近年来前列腺癌在中国的发病率明显上升,而且增长速度较快,已经成为威胁老年男性的常见病之一。随着健康体检普及和诊断技术的提高,早期前列腺癌诊断日趋增加,且发现时肿瘤仅位于前列腺内部,属于局限性前列腺癌,根治性前列腺切除是其主要的治疗方法。对于接受根治性前列腺切除的早期前列腺癌患者,如果术后PSA下降至最低数值(谷底)以后再升高,且连续两次血清PSA超过0.2 ng/mL,这时患者进入一种新的“临床状态”,提示前列腺癌生化复发。出现生化复发到发现影像学能显示的扩散转移病灶,可能会相隔数月或数年。生化复发后,需要密切随访,判断临床是否局部复发或全身转移的可能性,选用补救性放疗或内分泌治疗。因此,临床亟需能够预测术后复发的生物标记物,将有助于对患者复发风险分层进行精准辅助治疗,从而改善预后。本研究作者及其团队探索CYP1B1基因多态性对前列腺癌根治术后生化复发的相关性并评估其预测价值具有重要的临床意义。研究结果显示,CYP1B1基因的单核苷酸多态性(SNP)位点中rs1056836与前列腺癌根治术后生化复发相关,是独立预后因素。

CC基因型与CG/GG基因型携带者两者相比,CC基因型携带者术后进展至生化复发时间较短,CC基因型的CYP1B1 mRNA表达量显著升高,两组间差异均具有统计学意义。本研究发现CYP1B1 rs1056836与前列腺癌根治术后生化复发之间有关联,而且CG基因型较CC基因型的生化复发风险显著降低。由此可见,CC基因型携带者复发风险显著升高,对前列腺癌患者进行该位点的基因分型有助于判断术后生化复发风险,临床上可以针对这部分高危患者积极采取辅助治疗以改善预后。本文选题较新颖,紧密结合临床难点、热点,课题设计思路较清晰,实验过程及结果分析可信,经过多次推敲和修改,本文有科学性、先进性和创新性,值得鼓励。但是,本研究还存在一定的局限性,需要增加更多病例数和多中心合作,并补充蛋白水平的验证以及生物学机制的深入研究。(王国民)

CYP1B1 基因多态性对前列腺癌根治术后生化复发(BCR)预测价值的初步研究

顾成元 秦晓健 戴波 朱耀 朱煜 许华 叶定伟[△]

(复旦大学附属肿瘤医院泌尿外科-复旦大学上海医学院肿瘤学系 上海 200032)

【摘要】目的 探讨CYP1B1基因多态性对前列腺癌根治术后生化复发(biochemical recurrence, BCR)的预测价值。方法 在426例行前列腺癌根治术的患者中采用Taqman探针法检测CYP1B1基因8个标签单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的分布情况。采用RT-PCR方法检测127例前列腺癌旁组织中CYP1B1 mRNA的表达。采用Cox比例风险模型和Kaplan-Meier法进行关联性和生存分析。结果 CYP1B1 rs1056836是前列腺癌根治术后BCR的独立预测因素(HR:0.65, 95%CI:0.33~0.93, P=0.025),并且与CYP1B1 mRNA的表达相关。结论 CYP1B1 rs1056836有助于预测前列腺癌根治术后BCR的风险,其机制可能与影响CYP1B1基因表达相关。

【关键词】前列腺癌; 生化复发(BCR); CYP1B1; 前列腺癌根治术; 单核苷酸多态性

【中图分类号】R737.25 【文献标志码】A doi:10.3969/j.issn.1672-8467.2020.01.004

Genetic variants of the CYP1B1 gene as predictors of biochemical recurrence (BCR) after radical prostatectomy in localized prostate cancer patients

GU Cheng-yuan, QIN Xiao-jian, DAI Bo, ZHU Yao, ZHU Yu, XU Hua, YE Ding-wei[△]

国家自然科学基金(81702537)

[△]Corresponding author E-mail: dwye@shea.org.cn

网络首发时间:2020-01-02 10:46:28 网络首发地址:https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1885.R.20191230.1811.004.html

(Department of Urology, Shanghai Cancer Center- Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To verify the hypothesis that genetic variants of *CYP1B1* gene may influence biochemical recurrence (BCR) in clinically localized prostate cancer patients who received radical prostatectomy. **Methods** We genotyped eight tagging single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CYP1B1* gene in 426 patients treated with radical prostatectomy (RP). The expression level of *CYP1B1* mRNA in the adjacent normal prostate tissues was quantified by reverse transcription and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in 127 cases. Kaplan-Meier analysis and Cox proportional hazard models were utilized to identify SNPs and its correlation with BCR. **Results** *CYP1B1* rs1056836 was significantly associated with BCR (HR: 0.65; 95%CI: 0.33 - 0.93, $P=0.025$) and *CYP1B1* mRNA expression. **Conclusions** *CYP1B1* rs1056836 may contribute to predicting the BCR of patients with RP, which may related to the genetic variation in *CYP1B1* gene.

【Key words】 prostate cancer; biochemical recurrence (BCR); *CYP1B1*; radical prostatectomy; single nucleotide polymorphism

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81702537).

目前前列腺癌根治术是临床局限性前列腺癌的标准治疗方法,但10年内术后复发率高达30%^[1]。前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)和病理指标对于术后复发的预测特异度和敏感度较低^[2],临床亟需能够预测术后复发的生物标志物,理想的生物标志物将有助于对患者复发风险分层进行精准辅助治疗从而改善预后。

研究显示雌激素通过氧化代谢在前列腺癌的进展过程中起重要作用^[3]。*CYP1B1*是一种在雌激素代谢羟基化过程中的关键酶。雌激素(如雌激素酮E1、雌二醇E2)可经氧化代谢生成儿茶酚雌激素和雌激素醌,而*CYP1B1*催化儿茶酚雌激素生成致癌性4-OHE。这些氧化代谢产物具有DNA损伤效应,导致前列腺癌发生及持续进展。*CYP1B1*蛋白表达量在前列腺癌组织中明显高于良性前列腺增生组织^[4]。

由于*CYP1B1*在雌激素代谢过程中的重要作用,*CYP1B1*基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)有可能通过改变基因表达水平影响前列腺癌进展。目前尚无*CYP1B1*基因多态性与前列腺癌根治术后复发的关联性研究。本研究旨在探索*CYP1B1*基因多态性对于前列腺癌根治术后生化复发的相关性,评估其预测价值。

资料和方法

研究对象 纳入2006年至2009年间在复旦大

学附属肿瘤医院接受前列腺癌根治术的426例局限性前列腺癌患者,中位随访时间37.7个月,术后每3个月随访PSA变化。将术后血清PSA水平连续两次超过0.2 ng/mL定义为生化复发(biochemical recurrence, BCR)。临床病理资料和随访信息通过电子病历系统检索获得。排除术后接受辅助内分泌或放疗的患者。

候选 SNP 选择及基因分型检测 利用人类基因组数据库NCBI,查找*CYP1B1*基因,确定研究区域。通过HapMap数据库查找本研究区域的SNP位点基因分型数据信息,获取汉族人群中*CYP1B1*基因及其延伸区域内所有SNP位点基因分型数据。将获取的基因分型数据导入Haploview 4.2软件,筛选出最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) > 0.05的SNPs,导出连锁不平衡图谱及数据。通过对连锁不平衡图谱的数据比对,挑选出每个单倍域内 $r^2 \geq 0.8$ 且 $LOD > 3$ 的SNPs,选取平均 r^2 值最大的一个SNP作为该单倍域标签SNP。共确定8个标签SNP位点(rs10916、rs162562、rs2551188、rs9341266、rs9341248、rs162549、rs1056827、rs1056836)。

基因分型检测方法如文献所述^[5]。外周血样本来自复旦大学附属肿瘤医院组织库,采用德国Qiagen公司试剂盒,按照操作步骤提取全基因组DNA。琼脂糖凝胶电泳法检测DNA质量,BioPhotometer核酸蛋白测定仪(德国Eppendorf公司)检测DNA的浓度和纯度,定量标准化至50 ng/ μ L,

于4℃下分装备用。采用TaqMan探针法进行基因分型,即利用Taq DNA聚合酶的5'-3'核酸外切酶活力对探针本身进行酶切,Taqman探针的两端分别标记有荧光基团和对应的淬灭基团。设计引物和探针定制于美国ABI公司。CYP1B1 rs1056836的引物序列F(5'-3'):TGTC AACAGTGGTCTGTGAATC,R:(5'-3')TGGATCAAAGTTCTCCGGGTTA。探针序列(5'-3'):ATGA-CCCAC/GTGAAGTG。反应体系5μL,包括1μL DNA模板、0.125μL引物探针、2.5μL TaqMan Universal Master Mix以及1.375μL去离子水。在每个384孔反应板中设置阴性空白对照。扩增条件为95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火30 s,60℃延伸30 s,共40个循环。扩增之后用ABI PRISM 7900HT荧光定量PCR仪检测荧光分布情况,并应用SDS 2.4软件进行基因分型。随机抽取10%的样本进行重复试验和验证,基因型符合率为100%。

CYP1B1 mRNA检测 上述426例病例中,127例保存了前列腺癌旁组织样本。按照Trizol试剂(美国Invitrogen公司)的说明提取总RNA。PCR反应体系总体积20μL,其中模板cDNA 1μg,10×PCR缓冲液(15 mmol/L MgCl₂) 2.4μL, Taq-DNA聚合酶1U, 10 mmol/L dNTPs 0.4μL, 5 mmol/L上游引物和下游引物各1μL,加ddH₂O至20μL。依次预变性、变性、退火、延伸。扩增产物为GAPDH,452 bp;CYP1B1,297 bp。引物CYP1B1上游(5'-3'):GCTGCAGTGGCTGCTCCT;下游(5'-3'):CC-CACGACCTGATCCAATTCT。

统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数值变量用非配对的 t 检验,分类变量用 χ^2 检验。组间基因型频率及等位基因频率比较采用 χ^2 检验。采用Cox比例风险回归模型,对可能的混杂因素(年龄、PSA、Gleason评分等)进行调整,计算风险比(hazard ratio, HR)和95%可信区间(95% confidence interval, 95%CI)来评估各种基因型与前列腺癌术后复发风险的相关性。采用Kaplan-Meier法在显性遗传模式下进行无复发生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有统计分析使用SAS 9.1软件完成。

结 果

患者基线特征见表1。共426例患者,中位随访

时间为37.7个月,其中100例术后出现生化复发(23.5%)。全组患者1年无生化复发率为94.1%,3年无生化复发率为78.6%,其中57例接受内分泌治疗,43例接受挽救性放疗联合内分泌治疗。术前血清PSA、病理分期、淋巴结侵犯、Gleason评分与生化复发相关($P < 0.01$)。

表1 研究对象的临床病理特征

Tab 1 Clinicopathologic characteristics of the study populations [n (%)]

Characteristics	BCR	Non-BCR	P
Age (y)	68 (58-79)	68 (46-82)	0.951
BMI (kg/m ²)			
< 24	46 (46.0)	176 (54.0)	0.162
≥ 24	54 (54.0)	150 (46.0)	
PSA (ng/mL)			< 0.001
≤ 20	39 (39.0)	210 (64.4)	
> 20	61 (61.0)	116 (35.6)	
Gleason Score			
≤ 7 (3+4)	27 (27.0)	173 (53.1)	< 0.001
≥ 7 (4+3)	73 (73.0)	153 (46.9)	
Stage of disease			
T1-2	49 (49.0)	233 (71.5)	< 0.001
≥ T3	51 (51.0)	93 (28.5)	
Lymph node involvement			< 0.001
Negative	75 (75.0)	304 (93.3)	
Positive	25 (25.0)	22 (6.7)	

426例患者基因型分布见表2,对上述临床病理特征进行调整后分析显示,8个标签SNP位点中发现CYP1B1 rs1056836与前列腺癌根治术后生化复发相关(CG基因型,HR:0.65,95%CI:0.33~0.93, $P=0.025$),而其余7个SNP位点与前列腺癌根治术后生化复发之间无关联性,所以CYP1B1 rs1056836是独立预后因素。

在显性模型中,受突变基因影响并表现出性状的定义为暴露组,即暴露于遗传因素——rs1056836多态性中突变型G。因为是显性模型,所以CG和GG都表现出突变性状,CC为野生性状。根据定义,CG/GG为暴露组,CC为非暴露组。本研究将CYP1B1 rs1056836中CC型与CG/GG型携带者两者相比,CC基因型携带者术后进展至生化复发时间较短,两组间差异具有统计学意义(图1, $P=0.036$)。

进一步分析CYP1B1各SNP位点与mRNA表达的关系(图2),与CG/GG基因型相比,rs1056836 CC基因型的CYP1B1 mRNA表达量显著升高,两

表2 CYP1B1 标签 SNPs 与前列腺癌根治术后生化复发的关系

Tab 2 Associations between CYP1B1 tag SNPs and biochemical recurrence [n (%)]

SNP	BCR (%)	Non-BCR (%)	HR (95% CI) ^a	P
rs10916				
TT	83 (83.0)	280 (85.9)	1.00	
GT	15 (15.0)	43 (12.9)	1.06 (0.61-1.84)	0.827
GG	2 (2.0)	3 (1.2)	1.42 (0.35-5.79)	0.625
rs162562				
AA	73 (73.0)	245 (75.2)	1.00	
AC	23 (23.0)	68 (20.9)	1.20 (0.75-1.92)	0.441
CC	4 (4.0)	13 (3.9)	2.00 (0.73-5.51)	0.180
rs2551188				
CC	55 (55.0)	191 (58.6)	1.00	
CT	41 (41.0)	121 (37.1)	1.09 (0.73-1.63)	0.680
TT	4 (4.0)	14 (4.3)	0.93 (0.34-2.56)	0.885
rs9341266				
GG	80 (81.0)	247 (75.8)	1.00	
AG	19 (17.0)	72 (22.1)	0.76 (0.46-1.26)	0.284
AA	1 (2.0)	7 (2.1)	0.58 (0.08-4.20)	0.593
rs9341248				
CC	87 (87.0)	278 (85.3)	1.00	
CT	12 (12.0)	42 (12.9)	1.40 (0.76-2.56)	0.278
TT	1 (1.0)	6 (1.8)	0.73 (0.10-5.21)	0.749
rs162549				
TT	75 (75.0)	251 (77.0)	1.00	
AT	22 (22.0)	70 (21.5)	1.27 (0.78-2.07)	0.330
AA	3 (3.0)	5 (1.5)	1.48 (0.54-4.04)	0.450
rs1056827				
CC	72 (72.0)	226 (69.3)	1.00	
AC	25 (25.0)	87 (26.7)	0.88 (0.56-1.39)	0.595
AA	3 (3.0)	13 (4.0)	0.95 (0.30-3.02)	0.927
rs1056836				
CC	81 (81.0)	238 (73.0)	1.00	
CG	17 (17.0)	83 (25.5)	0.65 (0.33 - 0.93)	0.025
GG	2 (2.0)	5 (1.5)	1.19 (0.29-4.85)	0.807

^a: Adjusted age and clinicopathological factors.

组间差异具有统计学意义($P=0.025$),其余7个SNP位点与CYP1B1 mRNA表达量之间未见相关性。

讨 论

CYP1B1 rs1056836 是位于外显子3的非同义替换SNP,导致亮氨酸突变为缬氨酸。之前关于CYP1B1基因多态性与前列腺癌关系的相关报道,其研究终点为前列腺癌发病,但结果并不一致^[6-8]。荟萃分析对这些研究进行了总结,结果显示在亚洲

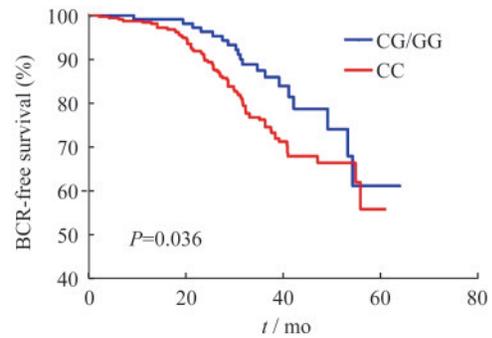


图1 CYP1B1 rs1056836 各基因型的无复发生存曲线

Fig 1 Kaplan-Meier survival curves for biochemical recurrence (BCR)-free survival by CYP1B1 rs1056836 dominant model

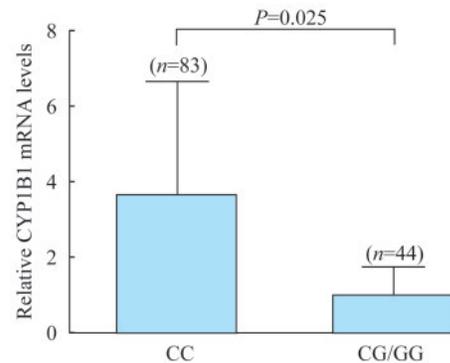


图2 CYP1B1 rs1056836 各基因型的 mRNA 表达量的比较

Fig 2 The relative CYP1B1 messenger ribonucleic acid (mRNA) expression levels in prostate tissue by rs1056836 dominant model

男性中rs1056836与前列腺癌发病风险相关,与C等位基因携带者相比,G等位基因携带者的前列腺癌发病风险为1.52倍(95%CI:1.20~1.92),但在高加索人群中并无关联^[9]。造成这一差异的原因可能有各种族基因型分布频率不同、环境因素影响和前列腺癌发病率差异等。CYP1B1 rs1056836的等位基因频率在不同的种族间具有显著的差异,其中G等位基因在亚洲人群中的频率约为16.76%,显著低于高加索人群的38.66%,两者间差异具有统计学意义($P<0.01$)^[10]。本研究首次以前列腺癌根治术后生化复发为研究终点,在汉族人群中观察CYP1B1基因多态性与前列腺癌的关联性。结果显示,本组汉族人群中rs1056836基因频率约为22.3%,低于既往文献报道的G等位基因在高加索人群中的频率。同时,本研究还发现CYP1B1 rs1056836与前列腺癌根治术后生化复发之间有关联,CG基因型较CC基因型的生化复发风险显著降低(HR:0.65,95%CI:

0.33~0.93, $P=0.025$)。

既往有研究观察CYP1B1 rs1056836与前列腺癌侵袭性之间的关系,如Beuten等^[11]纳入393例高加索人,将Gleason评分 ≥ 7 定义为高侵袭性前列腺癌,结果发现与CYP1B1 rs1056836 CC基因型携带者相比,GG基因型携带者患高侵袭性前列腺癌的几率降低约55%,差异具有统计学意义(OR:0.45,95%CI:0.24~0.84, $P=0.01$)。结合本研究的结果,我们认为CYP1B1可能在前列腺癌的进展阶段起关键作用,其表达升高后,CYP1B1可通过上调Sp1引起上皮细胞-间充质转化和激活Wnt/ β -Catenin信号通路来增强肿瘤细胞增殖和转移^[12]。

已有研究报道CYP1B1 SNP位点通过改变雌激素正常生理代谢或表达水平可影响个体的肿瘤发病风险^[3-4]。据此,本研究假设位于CYP1B1编码区的rs1056836可能改变基因表达水平,进而导致前列腺癌的术后复发。随后的实验证实rs1056836确实与CYP1B1 mRNA表达相关。与正常前列腺细胞相比,前列腺癌细胞中CYP1B1的转录水平显著升高^[13]。CYP1B1活性受到芳烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)、内源性雌激素和雌激素受体等多种机制调节。在侵袭性前列腺癌中AhR异常激活,CYP1B1催化雌激素氧化代谢生成儿茶酚雌激素和雌激素醌增多,最终导致前列腺癌细胞增殖和迁移增加^[14]。

本研究存在一定的局限性,如病例数和随访时间相对有限,缺乏蛋白水平的验证,具体的生物学机制也有待进一步阐明。本研究发现CYP1B1编码区SNP rs1056836与前列腺癌根治术后生化复发风险有关,CC基因型携带者复发风险显著升高。对于行前列腺癌根治术的患者进行该位点的基因分型有助于判断复发风险,临床上可针对高危患者积极采取辅助治疗以改善预后。

参 考 文 献

[1] 戴波,常坤,孔蕴毅,等.根治性前列腺切除术患者生化复发的危险因素分析[J].中华外科杂志,2015,53(4):261-265.
[2] 瞿元元,戴波.前列腺癌根治术后生化复发的危险因素[J].现代泌尿外科杂志,2013,18(2):204-206.
[3] GAJJAR K, MARTIN-HIRSCH PL, MARTIN FL.

CYP1B1 and hormone-induced cancer [J]. *Cancer Lett*, 2012,324(1):13-30.
[4] GO RE, HWANG KA, CHOI KC. Cytochrome P450 1 family and cancers[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2015, 147:24-30.
[5] 顾成元,李巧新,朱耀,等.脂联素基因多态性与前列腺癌发病风险的相关性研究[J].中华泌尿外科杂志,2014,35(5):395-396.
[6] HOLT SK, KWON EM, FU R, et al. Association of variants in estrogen related pathway genes with prostate cancer risk[J]. *Prostate*, 2013,73(1):1-10.
[7] CATSBURG C, JOSHI AD, CORRAL R, et al. Polymorphisms in carcinogenmetabolism enzymes, fish intake, and risk of prostate cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(7):1352-1359.
[8] FUKATSU T, HIROKAWA Y, ARAKI T, et al. Genetic polymorphisms of hormone-related genes and prostate cancer risk in the Japanese population[J]. *Anticancer Res*, 2004,24(4):2431-2437.
[9] YANG J, XU DL, LU Q, et al. Prostate cancer risk and aggressiveness associated with the CYP1B14326C/G (Leu432Val) polymorphism: a meta-analysis of 2788 cases and 2968 controls [J]. *Asian J Androl*, 2012, 14 (4) : 560-565.
[10] GU CY, LI GX, ZHU Y, et al. A single nucleotide polymorphism in CYP1B1 leads to differential prostate cancer risk and telomere length[J]. *J Cancer*, 2018, 9(2) : 269-274.
[11] BEUTEN J, GELFOND JA, BYRNE JJ, et al. CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(9) : 1751-1757.
[12] CHANG I, MITSUI Y, KIM SK, et al. Cytochrome P450 1B1 inhibition suppresses tumorigenicity of prostate cancer via caspase-1 activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (24) : 39087-39100.
[13] KWON YJ, BAEK HS, YE DJ, et al. CYP1B1 Enhances cell proliferation and metastasis through induction of EMT and activation of Wnt/ β -catenin signaling via Sp1 upregulation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3) : e0151598.
[14] RICHMOND O, GHOTBADDNI M, ALLEN C, et al. The aryl hydrocarbon receptor is constitutively active in advanced prostate cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4) : e95058.

(收稿日期:2019-06-17;编辑:王蔚)