

荧光定量 PCR 检测膀胱癌患者尿沉淀细胞 TWIST1 基因启动子甲基化状态的临床价值

陆明, 钱麟, 潘彬, 陈建刚, 赵枏

(南通市第一人民医院泌尿外科, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的:**评估尿沉淀细胞 TWIST1 基因启动子甲基化状态在膀胱癌诊断中的价值。**方法:**用实时荧光定量 PCR 的方法,对 50 例临床确诊的膀胱癌患者、13 例非肿瘤性尿路疾病患者、7 例健康志愿者检测了尿沉淀细胞 TWIST1 基因启动子的甲基化状态;同时行尿脱落细胞学检查。**结果:**50 例膀胱癌患者中尿脱落细胞 TWIST1 基因启动子甲基化阳性率为 64.0%(32/50),对照组均未发现甲基化改变,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。TWIST1 基因启动子甲基化率有随组织分期升高的趋势,但在不同分级、分期膀胱癌中的差异无显著性。实时荧光定量 PCR 法检测尿液中 TWIST1 基因启动子甲基化的敏感性和特异性分别为 64.0%、100.0%。而尿脱落细胞学检查阳性率为 48.0%(24/50),其敏感性和特异性分别为 48.0%和 100.0%。**结论:**尿脱落细胞 TWIST1 基因启动子的甲基化检测诊断膀胱癌敏感性和特异性均较高,且无创、无痛苦,可作为早期诊断膀胱癌的敏感指标。

[关键词] 膀胱癌;甲基化;实时荧光定量 PCR

[中图分类号] R737.14

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-395-04

Detection of the TWIST1 promoter methylation state through fluorescent quantitative PCR in urine sediments of bladder cancer

LU Ming, QIAN Lin, PAN Bin, CHEN Jian-gang, ZHAO Ping

(Department of Urology, Nantong First People's Hospital, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To assess the TWIST1 promoter methylation state in urine sediments and evaluate their value in diagnosis of bladder cancer. **Methods:** Fifty patients with bladder cancer, 13 patients with non tumorous urinary disease and 7 healthy volunteers were recruited in the study. The TWIST1 promoter methylation state in urine sediments was determined by real-time fluorescent quantitative PCR. The urine exfoliative cytologic examination was also performed. **Results:** The positive rate of TWIST1 promoter methylation was 64.0% (32/50) in exfoliated urothelial cells of 50 patients with bladder cancer, no one showed positive TWIST1 promoter methylation in the control group. The difference in the positive rate of TWIST1 promoter methylation between two groups was significant ($P < 0.01$). TWIST1 promoter methylation status did not correlate with stage and grade of bladder cancer, though there was a trend that more frequent methylation was detected in higher stage bladder cancer. The sensitivity of detecting TWIST1 promoter methylation by real-time fluorescent quantitative PCR in the diagnosis of bladder cancer was 64.0%, and specificity was 100%. The positive rate of urine exfoliative cytology was 48.0% (24/50), and sensitivity and specificity were 48.0% and 100.0% respectively. **Conclusion:** It has high sensitivity and specificity to detect the TWIST1 promoter methylation in exfoliated urothelial cells for the diagnosis of bladder cancer. The TWIST1 promoter methylation might be a potential biomarker for the noninvasive and painless detection method in early diagnosis of bladder cancer.

[Key words] bladder carcinoma; methylation; real-time fluorescent quantitative PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 395-398]

肿瘤抑癌基因启动子的甲基化状态,不仅具有肿瘤病理学意义,还有望成为肿瘤早期诊断新的分子标记物。TWIST1 基因是新近发现的一种高度保

守的碱性螺旋原环原螺旋转录因子,其表达产物具有抑制细胞凋亡和上皮-间质转变(EMT)等作用,有报道在乳腺癌、膀胱癌、胃肠道恶性肿瘤等病理

组织中 TWIST1 基因启动子存在高甲基化现象^[1-4]。膀胱癌患者尿液沉淀细胞中含有一定量与正常脱落细胞的甲基化谱式呈相反状态的肿瘤细胞。本研究通过实时荧光定量 PCR 的方法检测膀胱癌患者尿液沉淀细胞中 TWIST1 基因启动子甲基化状态,并与常用的尿脱落细胞学检测方法加以对比,以探讨其在膀胱癌早期诊断中的应用价值。

1 对象和方法

1.1 对象

2009 年 1 月~2010 年 12 月在本院行手术治疗的膀胱癌患者 50 例,其中男 41 例,女 9 例,年龄 51~82 岁,平均 61 岁。所有病例均通过膀胱镜活检组织或者切除膀胱组织进行病理学检查并确诊为膀胱癌。病理分级按 WHO 方法: I 级 29 例, II 级 13 例, III 级 8 例。临床分期按 UICC 标准: Ta~T1 期 34 例, T2~T3 期 16 例。对照组 20 例,男 15 例,女 5 例,年龄 48~80 岁,平均 58 岁,其中泌尿系非肿瘤患者 13 例(膀胱结石 4 例、膀胱炎 2 例、肾结石 2 例、前列腺增生 5 例), 7 例健康者。在年龄和性别上,膀胱癌和对照人群间无明显差异。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及亚硫酸盐修饰处理

膀胱镜检查前留清洁中段单次晨尿标本 150~200 ml。2 h 内离心、洗涤获取尿脱落细胞。通过细胞裂解、酚/氯仿抽提、酒精沉淀获取 DNA。按试剂盒(上海闪晶生物科技有限公司)说明书操作。紫外分光光度仪定量后置-70℃保存。DNA 亚硫酸氢盐修饰采用基因组 DNA 修饰试剂盒(Sereological 公司,美国),按说明书操作。

1.2.2 甲基化特异性定量 PCR(qMSP)及分析

按 SYBR Premix Taq Ex Taq kit (日本 TaKaRa 公司)说明书操作,非甲基化扩增引物(U) TWIST1 (F)5'-TTTGGATGGGGTTGTTATTGT-3', (R)5'-CC-TAACCCAAACAACCAACC-3', 产物长度 193 bp; 甲基化扩增引物(M) TWIST1 (F)5'-TTTCGGATGGGG-TTGTTATC-3', (R)5'-AAACGACCTAACCCGAACG-3', 产物长度 200 bp。实时荧光定量甲基化 PCR: DNA 10 μg 溶解于 10 μl 去离子水,取 1 μl 加入 24 μl 反应缓冲液 [1.25 mmol/L dNTPs、16.6 mmol/L (NH₄)₂SO₄、67 mmol/L Tris(pH 8.8)、67 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L β-巯基乙醇、0.1% 二甲亚砜、1.25 U Taq 酶和 10 pmol/L 引物] 中;PCR 循环条件:94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s(40 个循环),循环前 94℃ 预变

性 5 min,循环后 72℃ 延伸 5 min。反应结束后,确认扩增溶解曲线及琼脂糖凝胶电泳分析。并以甲基化酶(美国 NEB 公司)处理和未处理的正常膀胱组织细胞 DNA 分别作为阳性和阴性对照。

1.2.3 尿脱落细胞学检查

尿脱落细胞检查,以 HE 染色发现中度、重度核异质及肿瘤细胞定为阳性。

1.3 统计学方法

研究对象的特征 ROC 曲线统计分析,灵敏度、特异性、诊断准确性、Youden 指数、Kappa 值。所有数据用 SPSS13.0 软件处理。样本率的比较用 χ² 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TWIST1 基因启动子 qMSP 分析

所有研究对象标本 TWIST1 基因启动子的非甲基化 PCR 产物均为阳性。32 例膀胱癌尿沉淀细胞标本 TWIST1 基因启动子甲基化的 PCR 产物为阳性,占所检测膀胱癌标本的 64.0%,电泳确认其条带大小正确(图 1)。正常膀胱组织细胞经甲基化酶处理后,可扩增出甲基化 PCR 产物,Ct 值为 26.45,阴性对照扩增时的荧光强度均低于设定的域值。以 Ct 值对研究对象进行特征 ROC 曲线统计分析,计算得到 TWIST1 基因启动子甲基化的 ROC 曲线下面积 AUC=0.820,诊断价值较高(图 2)。对照组均未发现甲基化改变,两者比较差异有统计学意义(P < 0.01)。



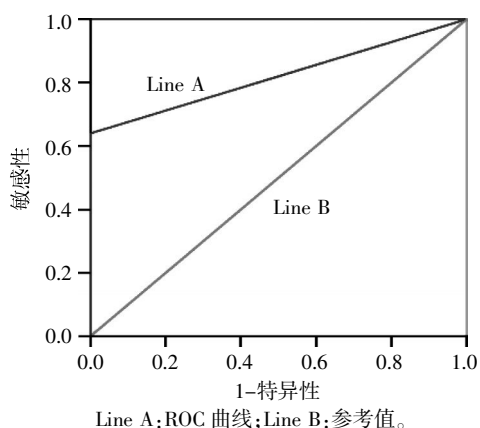
M: DNA marker; 1~2: 非甲基化引物扩增阳性标本; 3: 双蒸水; 4~5: 甲基化引物扩增阳性标本。

图 1 qMSP 分析 TWIST1 基因启动子甲基化的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 qMSP analysis TWIST1 gene promoter methylation agarose gel electrophoresis figure

2.2 TWIST1 基因启动子甲基化检测与尿脱落细胞检查的比较

50 例膀胱癌患者尿液沉淀细胞中 TWIST1 基因启动子甲基化率为 64.0%(32/50),尿脱落细胞学检查结果阳性率为 48.0%(24/50),两者比较差异无统计学意义(P > 0.05),两种检查方法比较, Kappa 值为 0.504,一致性尚好;但尿液沉淀细胞中



Line A: ROC 曲线; Line B: 参考值。

图 2 以 Ct 值对研究对象进行的特征 ROC 曲线统计分析

Figure 2 With Ct value on the research objects by features ROC curves statistical analysis

表 1 尿液沉淀细胞中 TWIST1 基因启动子甲基化率与尿脱落细胞检查比较

Table 1 Urine precipitation cells TWIST1 gene promoter methylation rate and urine exfoliated cells check comparison

| 检查方法 | 敏感性 (%) | 特异性 (%) | 诊断准确性 (%) | Youden | Kappa |
|-------------|---------|---------|-----------|--------|-------|
| TWIST1 甲基化率 | 64.0 | 100.0 | 74.3 | 0.640 | 0.540 |
| 尿脱落细胞学 | 48.0 | 100.0 | 62.9 | 0.480 | 0.345 |

期诊断对治疗和预防复发有着非常重要的意义,可以增加保留膀胱的机会并提高患者总体生存率^[5]。目前,膀胱镜检查及对可疑病变组织进行活检和对尿脱落细胞病理学检查仍然是膀胱肿瘤临床最常用的诊断和随访方法。膀胱镜检查是一种侵入性且昂贵的检查方法,给患者带来痛苦;尿脱落细胞检查的阳性率较低,给临床应用带来不便。因此,迫切需要寻找一种对膀胱肿瘤诊断敏感性高、特异性强,方便快捷、又经济的非侵入性的方法。近年来对 DNA 甲基化与肿瘤发生发展的研究为研发非损伤性且高效的膀胱癌早期诊断手段提供了新的途径。

TWIST1 基因位于染色体 7p21 处,由 606 个碱基序列组成,是新近发现的一种高度保守的碱性螺旋-环-螺旋转录因子,其基因蛋白的过度表达,在抑制细胞凋亡、EMT 和肿瘤的侵袭转移方面起着非常重要的作用,TWIST1 基因甲基化已被国外研究机构认为是最有发展前途的尿路上皮癌生化诊断标志物之一^[6-9]。本研究分别采用尿脱落细胞病理学的检测方法和实时荧光定量 PCR 检测尿沉淀细胞中 TWIST1 基因启动子的甲基化状态。结果显示:50 例膀胱癌患者尿脱落细胞 TWIST1 基因启动子的甲基化率为 64.0% (32/50),提示膀胱癌患者尿脱落细胞 TWIST1 基因启动子区域存在高甲基化;这一结果与 Renard 等^[10]报道的 68.0% 相比略低,可能与种族不同和本组样本量较少有关。而对照组无 1 例甲

TWIST1 基因启动子甲基化实时荧光定量 PCR 的灵敏度和诊断准确性优于尿脱落细胞学方法(表 1)。

2.3 TWIST1 基因启动子甲基化与临床病理关系

I、II、III 级膀胱癌中基因甲基化率分别为 58.6% (17/29)、69.2% (9/13)、75.0% (6/8),三者差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Ta~T1、T2~T3 癌基因甲基化率分别为 55.9% (19/34)、81.3% (13/16), T2~T3 基因甲基化率较 Ta~T1 有升高趋势,但两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,术后复发率高,并出现恶性程度提高和分期进展,早

期诊断对治疗和预防复发有着非常重要的意义,可以增加保留膀胱的机会并提高患者总体生存率^[5]。目前,膀胱镜检查及对可疑病变组织进行活检和对尿脱落细胞病理学检查仍然是膀胱肿瘤临床最常用的诊断和随访方法。膀胱镜检查是一种侵入性且昂贵的检查方法,给患者带来痛苦;尿脱落细胞检查的阳性率较低,给临床应用带来不便。因此,迫切需要寻找一种对膀胱肿瘤诊断敏感性高、特异性强,方便快捷、又经济的非侵入性的方法。近年来对 DNA 甲基化与肿瘤发生发展的研究为研发非损伤性且高效的膀胱癌早期诊断手段提供了新的途径。

甲基化阳性,表明 TWIST1 基因启动子 CpG 岛的高甲基化状态有着很高的膀胱癌特异性。TWIST1 基因启动子甲基化率与病理分级分期无相关性,可能是病例数相对较少的缘故;或提示其可能参与了膀胱癌的发生,而与其发展、演进关系不甚密切,属膀胱癌的早期事件。此外,实时荧光定量 PCR 的检测方法的灵敏度、诊断准确性、Youden 指数、Kappa 值均高于尿脱落细胞学的方法,两者的特异性相当。故认为尿脱落细胞中 TWIST1 基因启动子的甲基化检测可作为诊断膀胱癌的一项敏感指标。且实时荧光定量 PCR 的检测方法敏感性和特异性均较高,是更为经济、实用、非侵入性的一种方法。适合于复发率很高的膀胱癌的早期诊断与随访。使需定期进行膀胱镜检查的患者数量明显减少,具有较好的临床应用价值。

[参考文献]

[1] Bialek P, Kern B, Yang X, et al. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation [J]. Dev Cell, 2004, 6(3):423-435

[2] Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, et al. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(12):3325-3330

[3] Kang GH, Lee S, Cho NY, et al. DNA methylation profiles

- of gastric carcinoma characterized by quantitative DNA methylation analysis[J]. *Lab Invest*,2008,88(2):161-170
- [4] Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, et al. Twist1 and Y-box-binding protein-1 promote malignant potential in bladder cancer cells[J]. *BJU Int*,2011,108(2):142-149
- [5] Mariappan P, Smith G. A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on 25-year prospective database[J]. *J Urol*,2005,173(4):1108-1111
- [6] Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, et al. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection[J]. *J Natl Cancer Inst*,2006,98(14):996-1004
- [7] Negaes PD, Favaro FP, Camargo JL, et al. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments;a perspective for tumor recurrence detection [J]. *BMC Cancer*,2008,8:238
- [8] Gomez I, Pela C, Herrera M, et al. TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival[J]. *PLoS One*,2011,6:e18023
- [9] Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis [J]. *Cancer Cell*,2011,19(6):372-386
- [10] Renard I, Joniau S, van Cleynenbreugel B, et al. Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples [J]. *Eur Urol*,2010,58(1):96-104
- [收稿日期] 2011-11-25

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆
<http://jnmu.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。