

膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因启动子 CpG 岛异常甲基化研究

马建波 廖于峰 魏任雄 戴金华 贾广成

摘要 **目的** 探讨膀胱癌患者尿沉渣细胞中 PTEN 基因启动子 CpG 岛的甲基化状况及其临床意义。**方法** 收集临床病理确诊 39 例膀胱癌,采用甲基化特异 PCR(MSP)的方法,检测膀胱癌肿瘤组织和配对的尿沉渣 PTEN 基因启动子 CpG 岛的甲基化异常频率,同时以 45 例非肿瘤性泌尿系疾病患者及 14 例健康志愿者作为对照。**结果** 膀胱癌肿瘤组织和配对的尿沉渣 PTEN 基因启动子甲基化阳性率分别为 53.8% (21/39) 和 48.7% (19/39),两者密切相关($r=0.381, P=0.017$)。膀胱癌组尿沉渣 PTEN 基因启动子甲基化阳性率(48.7%, 19/39)显著高于非肿瘤组(11.1%, 5/45) ($\chi^2=15.37, P=0.000$),非肿瘤组与志愿组间(阳性率为 0)并无明显差异($P>0.05$);尿沉渣 PTEN 基因甲基化对膀胱癌诊断的敏感性为 48.7% (19/39),特异性为 91.5% (54/59)。性别、年龄、病理分级及临床分期与 PTEN 基因甲基化均无明显相关性(P 均 >0.05)。**结论** PTEN 基因启动子因异常甲基化可能是膀胱癌的早期事件,尿沉渣 PTEN 基因启动子异常甲基化可能是膀胱癌早期诊断分子标志物之一。

关键词 膀胱移行细胞癌 PTEN DNA 甲基化 尿沉渣

Detection of Promoter Methylated PTEN Gene in Urine Sediments in Patients with Bladder Cancer. Ma Jianbo, Liao Yufeng, Wei Renxiong, Jia Guangcheng. Department of Laboratory, Ningbo No. 2 Hospital, Zhejiang 315010, China

Abstract **Objective** To evaluate promoter methylation of PTEN (Phosphatase and Tension homolog deleted on chromosome Ten) gene and its clinical significance. **Methods** 39 Patients which clinically final diagnosis by pathology for bladder transitional cell cancer were included in this study. The methylation status of PTEN in cancer tissues and paired urine sediments was examined by MSP method. **Results** The frequency of methylation of PTEN gene in cancer tissues and paired urine sediments was 53.8% (21/39), 48.7% (19/39), respectively. There was a statistically significant relationship between them ($r=0.381, P=0.017$). The frequency of methylation of PTEN gene in urine sediments with bladder cancers was significantly higher than that in noncancerous urinary lesion patients ($\chi^2=15.37, P=0.000$). No hypermethylation of PTEN was observed in normal health individuals. No association between methylation status and grading or staging was demonstrated ($P>0.05$). The sensitivity and specificity of aberrant methylation of PTEN gene in urine sediments for detecting bladder cancer was 48.7% (19/39) and 91.5% (54/59). **Conclusion** Hypermethylation of PTEN in urine sediment DNA is a potential biomarker for detecting bladder cancer.

Key words Bladder transitional cell carcinoma; PTEN; Methylation; Urine sediment

膀胱肿瘤是我国最常见的泌尿生殖系肿瘤,膀胱移行细胞癌(TCCB)是其最常见的病理类型,其主要特征是多中心发生与高复发性。目前临床上用于膀胱癌诊断的“金标准”是膀胱镜检查结合病理组织活检,但它为有创性检查,不仅增加了患者痛苦,而且在肿瘤早期未形成肉眼可见瘤体之前难以做出诊断。尿脱落细胞学检查虽然特异性很高,但是其灵敏性较差($<50\%$)。抑癌基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化是肿瘤的发生过程中的早期

事件,被认为是理想的肿瘤早期诊断和判断肿瘤生物学行为的标志^[1]。作为第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因 PTEN,在多种肿瘤中存在失活现象。除突变、缺失等原因外,启动子区域 CpG 岛异常甲基化可能是其失活的第三条途径。本研究采用甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 方法检测 39 例膀胱癌患者尿沉渣细胞 PTEN 启动子甲基化状况,旨在探讨 PTEN 异常甲基化对膀胱癌早期诊断的意义。

材料与方法

1. 一般资料:收集 2007 年 2 月~2010 年 2 月期间在笔者医院泌尿外科经临床病理确诊的膀胱癌 39 例(膀胱癌组),其中男性 27 例,女性 12 例;年龄为 42~78 岁,平均 61.4 岁;病

基金项目:宁波市医学科技计划项目(2007010)

作者单位:315010 宁波市第二医院检验中心(马建波、廖于峰、魏任雄、戴金华);泌尿外科(贾广成)

理学分级:高分化膀胱癌 8 例,中分化膀胱癌 18 例,低分化膀胱癌 13 例;临床分期:表浅膀胱癌 (T_a/T_1) 23 例,浸润膀胱癌 ($\geq T_2$) 16 例。同期非肿瘤性泌尿系疾病患者 45 例(非肿瘤组,包括前列腺增生 17 例,腺性膀胱炎 8 例,泌尿系结石 11 例,尿路感染 9 例),其中男性 36 例,女性 9 例,年龄为 32~72 岁,平均 58.5 岁。同期另择健康志愿者 14 例(健康组),男性 9 例,女性 5 例,年龄为 22~31 岁,平均 26.4 岁。膀胱癌患者的临床分期、病理分型按照国际 TMN 标准进行。入选标准:①膀胱癌组:有肉眼血尿症状,且膀胱镜病理活检或术后病理检查证实为膀胱癌;②非肿瘤组:有肉眼血尿症状但膀胱镜检查或术后病理等排除膀胱癌的泌尿系疾病;③健康组:无肉眼血尿症状且身体健康。排除标准:高度怀疑或检查确诊患有其他泌尿系统肿瘤或身体其他部位肿瘤的患者;病理诊断不明确的患者。获得的活检标本部分用甲醛溶液固定,部分于 -80°C 冻存备用。所有受试者的尿液均为晨尿。三组患者性别及年龄的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2. 实验方法: (1) DNA 提取及甲基化修饰:收集晨尿 50ml, 2h 内 2500r/min 离心 5min, 获取尿脱落细胞。按照 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 (日本 TakaRa 公司产品) 试剂盒操作指南提取膀胱肿瘤组织及尿脱落细胞基因组 DNA。提取的 DNA 纯度用紫外分光光度计检测, 吸光度 A_{260}/A_{280} 值为 1.7~1.9, 本实验健康对照组、非肿瘤组和膀胱癌组 DNA 的平均浓度约分别为 $90\mu\text{g}/50\text{ml}$, $120\mu\text{g}/50\text{ml}$ 和 $160\mu\text{g}/50\text{ml}$ 。DNA 样本 -20°C 保存待用。按照 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (美国 Zymo Research 公司产品) 试剂盒操作指南对提取的 DNA 样本进行亚硫酸处理并纯化。(2) 甲基化特异性 PCR (MSP) 检测:引物设计根据 PTEN 基因序列 (Genbank accession number AF143312), 并参照 Salvesen 等和 Kang 等, 由 TakaRa 公司合成^[2,3]。PTEN 甲基化引物 (M) 序列为: 5' - TTCGTTGTCGTCGTCGTATTT - 3' (sense), 5' - GCCGCTTAACCTCTAAACCGCAACCG - 3' (antisense), 扩增产物长度为 206bp。PTEN 非甲基化特异引物 (U) 5' - GTGTTGCTGGAGGTAGTTGTTT - 3' (sense), 5' - ACCACTTAACCTCTAA ACCACAACCA - 3' (antisense), 扩增产物长度为 162bp。内参照基因为 GAPDH, 5' - ACCACAGTC-CATGCCATCAC - 3' (sense), 5' - TCCACCACCCTGTTGCTG-TA - 3' (antisense), 扩增产物长度为 452bp。PCR 扩增体系如下: $10\times$ PCR Buffer 2.5 μl ; 2.5 mmol/L dNT 2.5 μl ; U 或 M primers 1.0 μl ; HS Taq DNA 聚合酶 (5U/ μl) 0.2 μl ; dH₂O 16.8 μl ; DNA (50mg/L) 2.0 μl ; 总体积为 25.0 μl 。反应条件如下: 95°C 预变性 5min; 95°C 变性 (45s)、 58°C 退火 (45s)、 72°C 延伸 (60s) 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5min。甲基化 DNA 作为阳性对照; 用甲基转移酶 M. Sss I (New England 公司) 将正常肝组织 DNA 甲基化。无模板对照作为阴性对照。PCR 扩增产物 10 μl 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳。

3. 统计学处理: 采用 SPSS 16.0 统计软件, 率的比较采用 χ^2 检验, 相关关系采用 Spearman 相关分析。

结 果

1. 甲基化检测结果: 尿沉渣 PTEN 启动子甲基化检测电泳结果见图 1。膀胱癌组检出 PTEN 基因启动子甲基化阳性 19 例 (48.7%, 19/39), 非肿瘤性泌尿系统疾病组检出 5 例 (11.1%, 5/45), 志愿组均未见 PTEN 基因甲基化阳性; 膀胱癌组 PTEN 基因启动子甲基化阳性率显著高于非肿瘤性泌尿系统疾病组 ($\chi^2=15.37, P=0.000$), 非肿瘤性泌尿系统疾病组与志愿组间并无明显差异 ($P>0.05$)。尿沉渣 PTEN 基因甲基化对膀胱癌诊断的敏感性为 48.7% (19/39), 特异性为 88.9% (40/45)。

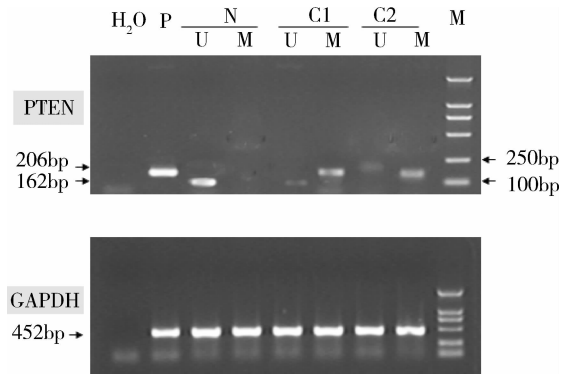


图 1 尿沉渣 PTEN 启动子甲基化检测电泳

M. DNA Marker DL2000; M. 甲基化反应; U. 非甲基化反应; H₂O. 无 DNA 模板的阴性对照; P. 甲基化阳性对照; N. 非肿瘤性泌尿系统疾病尿沉渣; C1. 膀胱癌肿瘤组织; C2. 膀胱癌尿沉渣 GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 为内参照基因

2. 膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因甲基化状况与患者各临床病理参数的相关性: 见表 1。由表 1 可见, 性别、年龄、病理分级及临床分期与 PTEN 基因甲基化均无明显相关性 (P 均 >0.05)。

表 1 膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因甲基化状况与患者各临床病理参数的相关性 [$n(\%)$]

项目		PTEN		P
		甲基化 ($n=19$)	非甲基化 ($n=20$)	
性别	男性	12 (44.4)	15 (55.6)	0.432
	女性	7 (58.3)	5 (41.7)	
年龄	≥ 50 岁	13 (52.0)	12 (48.0)	0.584
	< 50 岁	6 (42.9)	8 (57.1)	
病理分级	G ₁	3 (37.5)	5 (62.5)	0.193
	G ₂	7 (38.9)	11 (61.1)	
	G ₃	9 (69.2)	4 (30.8)	
临床分期	T _a	4 (57.10)	3 (42.9)	0.505
	T ₁	6 (37.5)	10 (62.5)	
	$\geq T_2$	9 (56.3)	7 (43.7)	

3. 膀胱癌肿瘤组织和配对的尿沉渣 PTEN 基因甲基化的相关性:膀胱癌肿瘤组织 PTEN 基因甲基化阳性率为 53.8% (21/39)。膀胱癌肿瘤组织和配对的尿沉渣同时出现 PTEN 基因甲基化为 15 例,同时仅出现非甲基化为 14 例,两者明显相关($r = 0.381$, $P = 0.017$)。

讨 论

PTEN 基因位于第 10 号染色体 q23.3 区,有 9 个外显子和 8 个内含子,编码一个含有 403 个氨基酸的多肽。PTEN 作为第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,其适度的表达可通过使 3,4,5 - 三磷酸磷脂酰肌醇(PIP_3)去磷酸化,达到抑制细胞生长及促进细胞凋亡的目的;并通过使黏着斑激酶(FAK)去磷酸化抑制细胞转移及侵袭;另外,还通过抑制 MARK 信号传导通路抑制细胞生长分化^[4~6]。PTEN 基因自 1997 年发现起就受到众多研究者的关注,其结构、功能异常广泛存在于人类多种恶性肿瘤中。而通过 DNA 甲基化导致 PTEN 基因失活最初见于前列腺癌细胞系,接着在胃癌、肺癌、甲状腺癌等恶性肿瘤中也有发现,但膀胱移行细胞癌中 PTEN 基因甲基化状态研究较少^[7~9]。

正常人的晨尿每毫升约含脱落细胞 4000 个左右,其中 50% 左右为尿道上皮细胞。泌尿系统疾病时,病变的尿道上皮脱落细胞数量明显增加。MSP 可以在非甲基化等位基因超出 1000 倍的情况下精确地检测到甲基化的等位基因^[10]。因此,MSP 方法有望在正常细胞占绝大多数的背景下,检出数量极少的肿瘤细胞的甲基化谱式^[11]。本研究对 39 例膀胱癌患者肿瘤组织和配对的尿沉渣 PTEN 基因异常甲基化检测,两者同时出现 PTEN 基因甲基化为 15 例,同时仅出现非甲基化为 14 例,二者甲基化状态密切相关($r = 0.381$, $P = 0.017$),提示尿液脱落细胞遗传信息丢失不多,检测尿液脱落细胞可以基本准确地反映肿瘤组织的甲基化情况。

本研究中膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因甲基化阳性率为 48.7% (19/39),非肿瘤性泌尿系统疾病组甲基化阳性率仅为 11.1% (5/45),14 名健康对照无一例出现 PTEN 基因甲基化,并且尿沉渣 PTEN 基因甲基化状况与患者的病理分级、临床分期、性别和年龄等病理参数无明显相关,提示尿沉渣 PTEN 基因异常甲基化可以成为膀胱癌早期诊断的分子标志物之一,PTEN 基因甲基化状态的检测有早期预示肿瘤的作

用。张志华等^[12]报道膀胱癌 PTEN 基因甲基化阳性率为 62.5%,而刘双林等^[13]报道甲基化阳性率仅为 14%。尿沉渣 PTEN 基因甲基化检出率一方面与肿瘤的类型、样本数量有关,另一方面也与尿中脱落的肿瘤细胞数量相关。因此,荧光定量 MSP 等更为敏感的方法结合多个肿瘤相关基因甲基化谱的检测有望提高膀胱癌的早期检出率。

参考文献

- 1 Esteller M, Corn PG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research*, 2001, 61 (8): 3225 - 3229
- 2 Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, *et al.* Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population - based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *Int J Oncol*, 2004, 25 (6): 1615 - 1623
- 3 Kang GH, Lee S, Kim WH, *et al.* Epstein - barr virus - positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype - positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2002, 160 (3): 787 - 794
- 4 Gu J, Tamura M, Pankov R, *et al.* Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol*, 1999, 146 (2): 389 - 403
- 5 Leslie NR, Downes CP. PTEN: The down side of PI 3 - kinase signaling. *Cell Signal*, 2002 (4), 14: 285 - 295
- 6 Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 - kinase/ AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (8): 4240 - 4245
- 7 Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest*, 2002, 82 (3): 285 - 291
- 8 Soria JC, Lee HY, Lee JI, *et al.* Lack of PTEN expression in non - small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (5): 1178 - 1184
- 9 Alvarez - Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, *et al.* PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas[J]. *Thyroid*, 2006, 16 (1): 17 - 23
- 10 Herman JG, Graff JR, Myöhönen S, *et al.* Methylation - specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93 (18): 9821 - 9826
- 11 Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, *et al.* Quantitation of Promoter Methylation of Multiple Genes in Urine DNA and Bladder Cancer Detection. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98 (14): 996 - 1004
- 12 张志华, 郭柏鸿, 车团结, 等. 磷酸酶基因 CpG 岛甲基化状态及其在膀胱移行细胞癌中的表达. *兰州大学学报 (医学版)*, 2009, 35 (4): 5 - 8
- 13 刘双林, 张旭, 吴淮, 等. 膀胱移行细胞癌中 PTEN 基因启动子甲基化及其表达的研究. *中国现代医学杂志*, 2008, 18 (20): 2939 - 2942

(收稿: 2010 - 07 - 22)

(收稿: 2011 - 07 - 01)