

· 论 著 ·

膀胱移行细胞癌组织与尿沉渣细胞 WWOX 基因 启动子甲基化相关性研究*

王晓天, 宋永胜[△], 崔 军

(中国医科大学附属盛京医院第二泌尿外科, 辽宁沈阳 110004)

摘要:目的 探讨膀胱移行细胞癌组织与其对应尿沉渣细胞中氧化还原酶的 WW 结构域(WWOX)基因启动子区 CpG 岛的甲基化状态以及二者甲基化的相关性。方法 应用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测 54 例膀胱癌患者手术切除的癌组织及尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区甲基化状态。结果 54 例膀胱癌患者癌组织中 WWOX 基因启动子区的甲基化率达 35.2%, 对应的尿沉渣细胞中甲基化率为 29.6%, 分别与各自对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且膀胱癌组织 WWOX 基因启动子区的甲基化和对应的尿沉渣细胞的甲基化存在明显的相关性($r = 0.881, P < 0.05$)。不论是在癌组织还是尿沉渣细胞中, WWOX 基因启动子区甲基化率随着癌组织分级的增加逐渐升高($P < 0.05$)。结论 WWOX 基因启动子区的异常甲基化可能是膀胱癌的早期事件, 尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区的异常甲基化可能是膀胱癌早期诊断的分子标志物之一。

关键词:膀胱肿瘤; 尿沉渣; DNA 甲基化; WWOX 基因; 甲基化特异性聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.14.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)14-1564-04

Correlation study between bladder transitional carcinoma tissues with methylation of WWOX gene promoter in urinary sediment cells*

Wang Xiaotian, Song Yongsheng[△], Cui Jun

(Second Department of Urology, Affiliated Shengjing Hospital, China

Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

Abstract: Objective To investigate the methylation status in bladder transitional carcinoma tissues and corresponding urinary sediment WWOX gene promoter area CpG islet and their methylation correlation. **Methods** Methylation specific polymerase chain reaction(MSP) was used to detect the methylation status of WWOX gene promoters in resected carcinoma tissues and urinary sediment cells among 54 cases of bladder carcinoma. **Results** The DNA methylation rate of WWOX gene was 35.2% in 54 samples of bladder carcinoma tissues and 29.6% in corresponding urinary sediment cells, difference showing statistical significance compared with each corresponding control group($P < 0.05$). The obvious correlation existed between the WWOX methylation in bladder tissues and the WWOX methylation in urinary sediment cells($r = 0.881, P < 0.05$). The DNA methylation rate of WWOX gene was gradually increased with the rise of the pathology grade of cancer tissues($P < 0.05$). **Conclusion** Abnormal methylation of WWOX gene promoter area may be an early event of bladder carcinoma. Abnormal methylation of WWOX gene promoter area in urinary sediment cells may be one of potential molecular biomarkers for early diagnosing bladder cancer.

Key words: urinary bladder neoplasms; urinary sediment; DNA methylation; WWOX gene; methylation specific polymerase chain reaction

目前膀胱肿瘤临床诊断的“金标准”主要依靠膀胱镜检查结合病理组织活检, 但这一检查手段会使患者产生心理应激反应, 增加患者痛苦, 操作过程中有可能造成膀胱黏膜出血, 属于有创性检查^[1]; 另外, 在膀胱肿瘤发生早期及未形成肉眼可见瘤体之前难以做出明确诊断, 并且对肿瘤的诊断存在一定主观性^[2]。临床常用的另一种诊断方法, 尿脱落细胞学检查虽然特异性很高, 但其敏感性较差^[3]。因此, 临床中寻找一种敏感性高、特异性强, 能够早期诊断膀胱癌的非侵袭性检查方法显得极为重要。

有研究发现, 遗传学和表观遗传学的改变是膀胱癌发病的主要分子机制, 其中表观遗传学的改变尤其是 DNA 甲基化是近年来研究的热点。相关研究表明, 膀胱尿路上皮细胞癌组织及尿沉渣细胞中有多种相关基因的启动子区存在高甲基化改变^[4]。包含氧化还原酶的 WW 结构域(WW domain containing

oxidoreductase, WWOX)是一个新的抑癌基因, 其表达缺失与多种肿瘤的发生、发展密切相关^[5]。本研究采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测膀胱癌组织及其对应的尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区的甲基化状态, 并分析二者的相关性。旨在探讨 WWOX 基因甲基化在膀胱癌发生、发展过程中的作用及 WWOX 基因异常甲基化对膀胱癌早期诊断的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)组织标本: 收集 2009 年 1 月至 2011 年 1 月本院泌尿外科手术切除的 54 例膀胱癌患者(膀胱癌组)的癌组织(病理证实均为膀胱移行细胞癌)及相应的癌旁正常组织(距肿瘤切缘大于或等于 5 cm)。其中男 38 例, 女 16 例; 年龄 37~76 岁, 平均(58.75±10.12)岁。膀胱癌组织标本按 WHO 2004 病理分级标准: 低度恶性倾向尿路上皮乳头状瘤 18 例,

* 基金项目: 2009 年辽宁省博士科研启动基金资助项目(20091118)。 作者简介: 王晓天(1987~), 住院医师, 硕士研究生, 主要从事膀胱肿瘤的诊断与治疗研究。 [△] 通讯作者, Tel: 18940251063; E-mail: songys@sj-hospital.org。

表 2 膀胱癌组织及尿沉渣细胞 WWOX 基因启动子区甲基化与临床特征的关系

临床特征	n	膀胱癌组织			尿沉渣细胞		
		甲基化[n(%)]	χ^2	P	非甲基化[n(%)]	χ^2	P
总数	54	19(35.2)			16(29.6)		
性别			0.053	0.817		0.246	0.620
男	38	13(34.2)			10(26.3)		
女	16	6(37.5)			6(37.5)		
年龄(岁)			0.167	0.683		0.154	0.694
<50	19	6(31.6)			5(26.3)		
≥50	35	13(37.1)			11(31.4)		
肿瘤直径(cm)			1.717	0.190		0.807	0.369
<3	32	9(28.1)			8(25.0)		
≥3	22	10(45.5)			8(36.4)		
肿瘤数量(个)			2.100	0.147		1.674	0.196
单发	15	3(20.0)			2(13.3)		
多发	39	16(41.0)			14(35.9)		
病理分级							
低度恶性潜能	18	1(5.6)	3.863	0.049 ^a	0(0.0)	4.141	0.042 ^a
低级别	25	9(36.0)	4.713	0.030 ^b	7(28.0)	6.914	0.009 ^b
高级别	11	9(81.8)			9(81.8)		
临床分期			1.015	0.314		1.110	0.292
非浸润性(T _a ~T ₁)	36	11(30.6)			9(25.0)		
浸润性(T ₂ ~T ₃)	18	8(44.4)			7(38.9)		

^a: $P < 0.05$, 与低级别比较; ^b: $P < 0.05$, 与高级别比较。

征无明显相关性(均 $P > 0.05$)。见表 2。

2.4 膀胱癌组织与尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区甲基化的相关性 19 例出现甲基化的膀胱癌组织中, 对应的尿沉渣细胞有 16 例出现甲基化, 尿沉渣细胞和膀胱癌组织的总体符合率为 84.2%(16/19), 同时仅出现非甲基化为 35 例, 且尿沉渣细胞 WWOX 基因启动子区甲基化状况与膀胱癌组织中是否出现 WWOX 基因启动子区甲基化呈正相关($r = 0.881$, $P < 0.05$)。见表 3。

表 3 膀胱癌组织与尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区甲基化的相关性

尿沉渣细胞	膀胱癌组织		总数
	甲基化	非甲基化	
甲基化	16	0	16
非甲基化	3	35	38
总数	19	35	54

3 讨 论

WWOX 基因是 2000 年由 Bednarek 等^[6]应用鸟枪基因测序技术结合对感兴趣区域对应的转录子行分离并分析的方法鉴定出的一个新基因, 位于常染色体 16q23.3-q24.1 区域, 由 9 个外显子和 8 个内含子组成, 编码一个长为 414 个氨基酸、相对分子质量为 46 000 的单链蛋白。WWOX 被认为是一个新的抑癌基因, 在多种肿瘤中的启动和进展阶段起重要作用^[7]。

膀胱癌的发生、发展是一个多阶段、多因素参与的一个复杂过程, 其中涉及许多癌基因的激活及抑癌基因的失活^[8]。研究表明, DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而调控基因的表达, 是表观遗传学重要的修饰方式^[9]。有研究指出, 抑癌基因启动子区 CpG 岛的异常甲基化是肿瘤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^[10]。健康人晨尿每毫升约含脱落细胞 4 000 个左右, 其中大部分为尿路上皮脱落细胞。发生泌尿系统疾病时, 尿中脱落细胞数量可明显增加, 并有一定数量的病变尿路上皮细胞存在^[11]。因此, 通过 MSP 方法可检出占尿沉渣细胞总量比例低、与正常细胞的甲基化谱式相反的肿瘤细胞。

本研究采用 MSP 法检测了 54 例膀胱癌组织和对应的癌旁正常组织及尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区甲基化状态。结果显示膀胱癌组织中甲基化率显著高于对应的癌旁正常组织($P < 0.05$), 膀胱癌患者尿沉渣细胞甲基化率显著高于非肿瘤组($P < 0.05$), 说明 WWOX 基因启动子区甲基化可能参与了膀胱癌的发生、发展。进一步研究发现, 无论是在肿瘤组织还是尿沉渣细胞中, WWOX 基因启动子区甲基化与患者性别、年龄、肿瘤直径、临床分期等无明显相关性($P > 0.05$), 而与膀胱肿瘤的病理学分级有明显关联($P < 0.05$)。高级别尿路上皮癌组织中甲基化发生率高于低级别尿路上皮癌组织, 后者又高于低度恶性倾向尿路上皮乳头状瘤组织, 结果提示: WWOX 基因启动子区的甲基化改变可以提示膀胱癌细胞的潜

在侵袭性,在膀胱移行细胞癌的早期发生及发展中有重要作用。本研究中,在尿沉渣细胞与膀胱癌组织中的甲基化总体符合率为 84.2%(16/19),二者在检测 WWOX 基因启动子区甲基化方面有显著的相关性($P < 0.05$),提示尿沉渣细胞遗传信息丢失不多,检测尿沉渣细胞可以基本准确地反映膀胱癌组织的甲基化情况。因此,尿沉渣细胞中 WWOX 基因启动子区甲基化的检测,可以作为膀胱癌早期诊断的无创指标。

早期膀胱癌患者术后必须定期随访,并行膀胱镜及尿液查瘤细胞检查,此两项检查均有其局限性^[12];通过检测尿液中细胞或蛋白质水平指标如膀胱肿瘤抗原(BTA)、核基质蛋白 22(NMP22)、尿纤维蛋白降解产物(FDP)等诊断或监测膀胱癌的复发,但这些方法的敏感性和特异性均不十分理想^[13]。近年来,膀胱癌患者尿沉渣细胞 DNA 的 MSP 检测方法以其高敏感性、高特异性成为一个重要临床检验方法,为初发及复发性膀胱癌提供了一个简单无创的检测方法,用于膀胱癌的诊断与随访^[14]。另外,膀胱癌的发病是一个多基因决定的综合事件。因此,可以将 WWOX 与其他多种在膀胱癌中高频甲基化的基因组为膀胱癌的 DNA 甲基化谱,进行尿液样本的 DNA 甲基化谱检测,将为膀胱癌的早期诊断及预后判断提供一种新的、无创性的手段^[15]。

参考文献:

- [1] 林向阳. 医源性男性尿道损伤原因及防治[J]. 现代泌尿外科杂志, 2009, 14(3): 232.
- [2] 马建波, 廖于峰, 魏任雄, 等. 膀胱癌尿沉渣 PTEN 基因启动子 CpG 岛异常甲基化研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(7): 85-87.
- [3] 杨青, 李俊. 膀胱癌尿脱落细胞学检查与尿液肿瘤标志物研究进展[J]. 安徽医药, 2012, 16(4): 528-529.
- [4] 郭战军, 林英立, 张春霆. DNA 甲基化在膀胱癌中的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2011, 31(5): 653-655.
- [5] Salah Z, Aqeilan R, Huebner K. WWOX gene and gene product; tumor suppression through specific protein inter-

actions[J]. Future Oncol, 2010, 6(2): 249-259.

- [6] Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, et al. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23. 3-24. 1, a region frequently affected in breast Cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(8): 2140-2145.
- [7] Bouteille N, Driouch K, Hage PE, et al. Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein[J]. Oncogene, 2009, 28(28): 2569-2580.
- [8] 郭雪涛, 崔明玉. 多基因改变与膀胱肿瘤生物学行为的关系及相关性研究[J]. 包头医学院学报, 2006, 22(4): 460-462, 465.
- [9] Estécio MR, Issa JP. Dissecting DNA hypermethylation in Cancer[J]. FEBS Lett, 2011, 585(13): 2078-2086.
- [10] 温机灵, 周祥福. 抑癌基因启动子区域 CpG 岛甲基化与膀胱癌的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2008, 28(4): 444-448.
- [11] 穆大为, 周利群, 丁义, 等. 应用荧光原位杂交技术检测上尿路的尿路上皮癌可显著提高诊断敏感性[J]. 北京大学学报: 医学版, 2010, 42(4): 381-385.
- [12] 毕长富, 张克荣, 董浩, 等. 膀胱癌诊断治疗的新进展[J]. 河北中医, 2011, 33(12): 1899-1901.
- [13] 郭宏骞, 孙西钊, 孙则禹. 几种检测膀胱癌的新方法[J]. 临床泌尿外科杂志, 2000, 15(12): 570-572.
- [14] Chung W, Bondaruk J, Jelinek J, et al. Detection of bladder Cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011, 20(7): 1483-1491.
- [15] Pu RT, Laitala LE, Clark DP. Methylation profiling of urothelial carcinoma in bladder biopsy and urine[J]. Acta Cytol, 2006, 50(5): 499-506.

(收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2013-01-22)

(上接第 1563 页)

- [6] Wu S, Wang Y, Sun L, et al. Decreased expression of dual-specificity phosphatase 9 is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11(413): 413.
- [7] Li Z, Fei T, Zhang J, et al. BMP4 signaling Acts via dual-specificity phosphatase 9 to control ERK activity in mouse embryonic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(2): 171-182.
- [8] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA[J]. Gene Ther, 1999, 6(7): 1258-1266.
- [9] Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(10): 1735-1737.
- [10] Liu D, Knapp JE. Hydrodynamics-based gene delivery [J]. Curr Opin Mol Ther, 2001, 3(2): 192-197.

- [11] Schlaepfer IR, Eckel RH. Plasma triglyceride reduction in mice after direct injections of muscle-specific lipoprotein lipase DNA[J]. Diabetes, 1999, 48(1): 223-227.
- [12] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(21): 3081-3087.
- [13] Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis [J]. Science, 1986, 232(4746): 34-47.
- [14] Goto M, Yoshioka T, Battelino T, et al. TNFalpha decreases gluconeogenesis in hepatocytes isolated from 10-day-old rats[J]. Pediatr Res, 2001, 49(4): 552-557.
- [15] Gómez-Valadés AG, Vidal-Alabró A, Molas M, et al. Overcoming diabetes-induced hyperglycemia through inhibition of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) with RNAi[J]. Mol Ther, 2006, 13(2): 401-410.

(收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2013-02-22)