

# 膀胱肿瘤组织及尿液标本中*TWIST1*基因的甲基化水平研究

姜凤全<sup>1</sup> 杨春<sup>2</sup> 陈阵<sup>1</sup>

1. 大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁 大连 116011;
2. 大连医科大学附属第一医院核医学科, 辽宁 大连 116011

**[摘要]** **背景与目的:** 众多遗传学及表观遗传性的改变引发癌基因的激活剂抑癌基因的失活是膀胱肿瘤发生、发展的重要原因, 本研究旨在揭示膀胱肿瘤患者肿瘤组织及尿液标本*TWIST1*基因的甲基化模式。**方法:** 78例经病理确诊的膀胱肿瘤标本、癌旁正常组织及配对75例尿液标本组成实验组, 75例年龄及性别比例匹配的非肿瘤个体组成对照组。从肿瘤、癌旁及尿液标本提取DNA, 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)检测肿瘤组织、癌旁组织及尿液标本中*TWIST1*基因的甲基化水平, 检测结果与尿细胞学检测结果进行对比, 比较两种检测方法的灵敏度及特异度。**结果:** 甲基化检测结果显示, 88.5%的肿瘤标本及84.0%的尿液标本出现*TWIST1*基因的甲基化, 11.5%的癌旁正常组织及5.3%的对照尿液标本出现甲基化。尿细胞学检测结果显示, 49.3%的肿瘤患者尿液标本检测出瘤细胞, 17.3%的对照者被诊断为肿瘤或疑似肿瘤。尿液标本甲基化检测灵敏度及特异度显著高于尿细胞学检测方法。针对低级别肿瘤, *TWIST1*基因甲基化检测灵敏度为66.7%, 高于尿细胞学检测(33.3%)。**结论:** *TWIST1*基因甲基化水平检测可作为一种简单、非侵入、敏感及特异的方法应用于早期膀胱肿瘤诊断筛查。

**[关键词]** *TWIST1*基因; 膀胱肿瘤; 尿细胞学检测; 甲基化

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.03.001

中图分类号: R737.14 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)03-0161-05

## Hypermethylation of *TWIST1* gene in tumor tissues and voided urine in bladder cancer patients

JIANG Feng-quan<sup>1</sup>, YANG Chun<sup>2</sup>, CHEN Zhen<sup>1</sup> (1. Laboratory Department, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116011, China; 2. Nuclear Medicine Department, The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian Liaoning 116011, China)

Correspondence to: CHEN Zhen E-mail: zhenchen6@126.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Accumulation of genetic and epigenetic changes that lead to the activation of proto-oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes play important roles in development and progression of bladder cancer. We aimed to investigate the methylation patterns of *TWIST1* gene in bladder cancer. **Methods:** A total number of 78 histologically confirmed bladder tumor samples and paired 75 urine samples constituted the study group and was compared with 75 age-matched and gender-matched non-cancerous individuals. DNA was purified from both tumor, adjacent tissues and urine samples. The methylation status of the *TWIST1* gene was analyzed by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) in both urinary bladder cell carcinoma samples, adjacent tissues and urine samples. Sensitivity and specificity values of the method were assessed and compared with the results of the cytology test. **Results:** Methylation of *TWIST1* was detected in 88.5% of carcinoma samples and 84% of the paired urine samples, respectively; 11.5% carcinoma adjacent tissues and 5.3% control urine sample was methylated. The sensitivity by urine cytology detection method was 49.3% in bladder cancer patients, and was 17.3% in control group. The sensitivity of *TWIST1* genes was 66.7% for low-grade cases. The sensitivity of urine cytology was 33.3% for the same low-grade cases. **Conclusion:** The methylation analysis of *TWIST1* gene may be a simple, non-invasive, sensitive, and specific method for early detecting bladder cancer cells in urine.

**[Key words]** *TWIST1*; Bladder tumor; Cytology test; Methylation

膀胱肿瘤是世界范围内发病率居第5位的恶性肿瘤, 在泌尿生殖系肿瘤致死率居第2位。膀胱肿瘤诊断方法中, 作为金标准的膀胱镜检查具有最高的敏感性, 但其不足之处在于费用较高, 作为有创检查会给患者带来不同程度的不适感<sup>[1]</sup>。非侵入性检查中, 尿细胞学检测一直在临床上广泛使用, 但该检测方法存在灵敏度低, 尤其是针对低级别移行细胞癌。多数细胞基础的检测方法因灵敏度及特异度的欠缺无法在临床推广。

*TWIST1*是碱性的螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)蛋白家族中高度保守的转录因子, 其mRNA在胎盘组织表达量最高, 在胚胎发生、发展中发挥重要作用。*TWIST1*参与上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transitions, EMTs)过程的调控, 进而影响肿瘤的侵袭与转移<sup>[2]</sup>。转移性肿瘤中常见*TWIST1*过表达或启动子的甲基化。目前国内涉及膀胱肿瘤与*TWIST1*基因的相关性研究包括, *TWIST1*蛋白表达与肿瘤的相关性分析, 以及尿液标本甲基化水平检测, 研究发现*TWIST1*基因作为一种癌基因在膀胱肿瘤中其mRNA低表达, 而*TWIST1*蛋白则相对正常组织呈现高表达<sup>[3-4]</sup>, 肿瘤患者尿液样本*TWIST1*基因甲基化水平显著高于正常对照者<sup>[5]</sup>。本研究采用甲基化特异性PCR技术检测*TWIST1*基因在膀胱肿瘤组织、癌旁正常组织和尿液标本中的甲基化水平, 拟阐明此检测技术在膀胱肿瘤早期诊断中的应用价值。

## 1 资料和方法

### 1.1 临床资料

2009年12月—2012年8月我院诊治的膀胱尿路上皮癌患者78例, 男性55例, 女性23例, 年龄28~83岁, 中位年龄59岁。肿瘤组织取自手术切除膀胱组织, 参照WHO/ISUP (2010)标准行肿瘤分级, 参照TNM(2010)(Edge等<sup>[6]</sup>)行临床分期。 $T_a$ 期为非侵袭性乳头状瘤,  $T_1$ 期肿瘤侵犯皮下结缔组织,  $T_2$ 期侵犯肌层,  $T_3$ 期穿透膀胱壁,  $T_4$ 期肿瘤合并其他脏器如前列腺, 输尿管、阴道或腹壁。

将78例经病理确诊的膀胱肿瘤标本、癌旁正常组织及配对的75例尿液标本作为实验组, 另采集75例健康体检者尿液标本作为对照组, 其中男性53例, 女性22例; 年龄32~79岁, 中位年龄57岁(表1)。所有受试对象均知情同意, 研究经医院伦理委员会通过。

表1 实验组及对照组临床资料

Tab. 1 Clinical characteristics data of study group and control

	group		(n)
	Patients	Controls	
Gender			
Male	55		53
Female	23		22
Tumor stage			
$T_a$	9		
$T_1$	22		
$T_2$	30		
$T_3$	13		
$T_4$	4		
Tumor grade			
Low	36		
High	42		
Recurrence			
Primary	31		
Recurrence	47		
Smoking			
Yes	45		25
No	21		35
Quit	12		10

### 1.2 DNA提取

术中所取肿瘤标本于-80 °C冰箱保存, DNA提取试剂盒使用Invitrogen公司PureLink™基因组DNA提取试剂盒, 尿液标本DNA提取应用Zymo Research公司ZR尿液DNA提取试剂盒。提取的DNA标本于-20 °C冰箱保存。

### 1.3 甲基化特异性PCR(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 检测

EZ DNA甲基化修饰试剂盒(Zymo Research公司), 亚硫酸氢盐修饰的通用人类甲基化DNA标准(Bisulfite Converted Universal Methylated Human DNA Standard)(Zymo Research 美国)用作阳性对照, 以经亚硫酸氢盐修饰的人外周血淋巴细胞DNA作为甲基化阴性对照。

亚硫酸氢盐修饰DNA样本, 因为尿液DNA样本量的限制, 每次修饰使用约200 ng DNA样本, 而肿瘤标本, 每次使用约

500 ng DNA用于甲基化修饰。MSP特异引物序列*TWIST1*-M顺义链：5'-TTTCGGATGGG GTTGTATC-3'，反义链：5'-AAACGACC TAACCCGAACG-3'；*TWIST1*-U顺义链：5'-TTTGGATGGGGTTGTATTGT-3'；反义链：5'-CCTAACCCAAACAACCAACC-3'。甲基化反应体系50  $\mu$ L，2  $\mu$ L修饰的DNA模板，每种dNTP浓度均0.25 mmol/L，每种引物浓度均为0.5  $\mu$ mol/L，2单位*Taq*聚合酶。反应过程：95  $^{\circ}$ C预变性10 min，95  $^{\circ}$ C变性30 s，56  $^{\circ}$ C复性45 s，72  $^{\circ}$ C延伸60 s，共计40循环，最后72  $^{\circ}$ C延伸7 min。2.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，*TWIST1*基因甲基化和非甲基化产物分别200 bp和193 bp，电泳结果见图1。每例样品设3个对照：甲基化阳性、阴性对照以及水作为空白对照。

### 1.3 统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件，计数资料用百分比表示，组间比较采用 $\chi^2$ 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 肿瘤标本甲基化率

78例膀胱肿瘤标本，*TWIST1*甲基化率为88.5%(69/78)，癌旁组织为11.5%(9/78)，差异有统计学意义( $P<0.01$ )，甲基化状态与肿瘤的分期无统计学意义( $P=0.231$ )，图1，表2)。此外，甲基化状态与肿瘤复发以及吸烟与否也无统计学意义( $P=0.843$ ， $P=0.426$ )。



图1 肿瘤组织标本及尿液标本*TWIST1*基因甲基化检测结果

Fig. 1 *TWIST1* gene MS-PCR detection results for tumor and urine sample

M: Methylation, U: Unmethylation, 1: Patients tumor sample, 2: Patients urine sample, 3: Tumor adjacent tissue, 4: Control group urine sample, 5: Positive control, 6: Negative control, 7: Blank control.

表2 肿瘤及尿液标本甲基化率检测结果

Tab. 2 Methylation frequency results of tumor and urine samples

Samples	Methylated samples [n(%)]
Tumor samples (n=78)	69(88.5)
Tumor adjacent sample (n=78)	9(11.5)
Paired urine samples (n=75)	63(84.0)
Control urine samples (n=75)	4(5.3)

### 2.2 尿液标本甲基化水平检测

75例膀胱癌患者尿液标本*TWIST1*甲基化率灵敏度为84.0%(63/75)，特异度为94.7%(71/75)。对照组的尿液标本*TWIST1*甲基化率为5.3%，配对尿液标本检测结果显示，肿瘤标本出现甲基化的患者尿液标本中才可检测出甲基化，没有假阳性结果出现(图1)。

对比尿细胞学检测结果，75例患者尿液标本中，37例诊断为肿瘤或可疑，诊断灵敏度为49.3%(37/75)，特异度为82.7%(62/75)。对照组尿细胞学检测结果显示，有13(17.3%)诊断为肿瘤或可疑。尿液标本甲基化检测灵敏度及特异度显著高于尿细胞学检测，差异有统计学意义( $P<0.05$ )。针对低级别肿瘤，*TWIST1*基因甲基化检测灵敏度为66.7%(6/9)，高于尿细胞学检测的33.3%(3/9)。

## 3 讨 论

恶性肿瘤的发生、发展涉及一系列遗传学改变，包括染色体畸形、癌基因突变或扩增激活以及抑癌基因的失活等。内环境大量微效基因的协同调节以及外环境的影响组成了恶性肿瘤的发生机制<sup>[7]</sup>。

*TWIST1*基因定位于染色体7p21.2，编码蛋白起到转录因子的作用，可调节胚胎发育工程中的细胞重建，因同时具备EMT调节功能，研究发现*TWIST1*能促进肿瘤细胞侵袭转移。多种肿瘤组织中发现*TWIST1*基因表达情况的异常以及启动子区超甲基化的出现<sup>[8-10]</sup>。

膀胱肿瘤是泌尿外科最常见的恶性肿瘤之

一, 发病率居泌尿生殖系肿瘤第2位。膀胱肿瘤具有易复发的特性, 早期筛查, 早期诊断对有效预防肿瘤进展、复发及获得更好的预后具有重要帮助。临床上采用的传统的细胞学检测技术有着敏感性及特异性不高的缺陷, 而金标准的膀胱镜检查又存在费用高, 侵入性给患者带来不适等缺点。寻找新的分子诊断靶点以及安全非侵入性的诊断技术成为膀胱肿瘤诊断中的突破点, 目前国内*TWIST1*基因甲基化水平与膀胱肿瘤诊断技术相关性方面文献少见报道, 研究对象限于尿液标本。

本研究中我们分析了膀胱肿瘤患者肿瘤组织及尿液标本中*TWIST1*基因甲基化模式。尿液标本中尿路上皮脱落细胞可用于DNA的检测, 为泌尿系统肿瘤的诊断提供了便利。研究发现膀胱肿瘤组织及配对尿液标本中*TWIST1*基因的甲基化率非常高, 分别达到了88.5%和84.0%, 对照组尿液标本中甲基化率仅为5.3%, 差异有统计学意义, 但统计结果提示甲基化与肿瘤的分期等临床参数无显著相关性。本研究尿液标本甲基化检测结果与国内外研究结果基本相一致, 肿瘤的分期分级结构不同以及检验方法的不同可能在一定程度上影响检测结果, 与之前研究结果稍有不同<sup>[5]</sup>。

恶性肿瘤的侵袭转移与EMT密切相关, *TWIST1*调节肿瘤细胞转移的机制在于细胞上皮标志如E-钙粘连蛋白的失去, 而获得间质细胞的标志, 即EMT过程。此过程使得肿瘤组织能脱离原发灶向周围组织波及, 为肿瘤的转移提供了基础。乳腺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌及食管癌等多种恶性肿瘤中均存在E-钙粘连蛋白介导的细胞黏附功能的减弱<sup>[9]</sup>, 从而导致恶性肿瘤的侵袭转移。

甲基化这一重要的表观遗传学改变, 能在不改变遗传物质一级结构的情况下达到调节基因表达的目的。研究发现, 膀胱肿瘤形成过程中涉及多种基因甲基化水平的改变, *TWIST1*甲基化状态的改变能影响EMT的进程, 从而影响肿瘤的侵袭力及复发特性。

本研究结果提示, 尿液标本甲基化水平检测对比尿细胞学检测技术有着更高的灵敏度和特异度。进一步的研究需要证实甲基化与基因表达的可能关系, 通过文献报道, 超甲基化应导致基因表达的下调。存在的问题就是, *TWIST1*作为癌基因, 应该在肿瘤组织中高表达, 而这与其超甲基化水平相矛盾。Christoph等<sup>[11]</sup>及Navarro等<sup>[12]</sup>的研究结果提示, DNA的甲基化水平并非完全与基因的表达呈现正相关。在乳腺癌、结直肠癌的研究结果也提示, *TWIST1*基因的甲基化水平与基因表达未表现出负相关, 转录后调控可能影响着基因的表达<sup>[13-14]</sup>。Tang等<sup>[3]</sup>报道*TWIST1*在膀胱癌中表达上调, 而mRNA水平较正常组织显著降低, 说明转录后调控的存在, 接下来的研究重点将围绕表达调控, 揭示甲基化、转录后调控等多方面机制在*TWIST1*基因表达中的作用。

综上所述, *TWIST1*基因可作为膀胱肿瘤的一个候选检测靶点, 甲基化水平的检测的高灵敏度及特异度提示其可作为安全无创的膀胱肿瘤筛查方法, 尤其是针对低分期肿瘤。

#### [参 考 文 献]

- [1] KIM Y K, KIM W J. Epigenetic markers as promising prognosticators for bladder cancer [J]. *Int J Urol*, 2009, 16(1): 17-22.
- [2] WALLERAND H, ROBERT G, PASTICIER G, et al. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor *TWIST* is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers [J]. *Urol Oncol*, 2010, 28(5): 473-479.
- [3] TANG X, XING J, LI W, et al. Expression of transcription factor *Twist1* in bladder urothelial carcinoma and its clinical significance [J]. *J BUON*, 2013, 18(1): 211-219.
- [4] 谢锦来, 黄宏双, 陈智伟, 等. 膀胱尿路上皮癌组织中*TWIST*蛋白表达及其临床意义 [J]. *海南医学院学报*, 2012, 4: 466-468.
- [5] 陆明, 钱麟, 潘彬, 等. 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 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 03: 395-398.
- [6] EDGE S B, BYRD D R, Compton C C, et al. The AJCC Cancer Staging Manual [M]. Seventh edition, Springer, London 2010: 497-501.
- [7] POLLARD P J, RATCLIFFE P J. Cancer puzzling patterns of predisposition [J]. *Science*, 2009, 324(5924): 192-194.

- [ 8 ] SMIT M A, GEIGER T R, SONG J Y, et al. A TWIST-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis [ J ] . Mol Cell Biol, 2009, 29(13): 3722-3737.
- [ 9 ] SASAKI K, NATSUGOE S, ISHIGAMI S, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma [ J ] . J Exp Clin Cancer Res, 2009, 28: 158-166.
- [ 10 ] MATSUO N, SHIRAHA H, FUJIKAWA T, et al. TWIST expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma [ J ] . BMC cancer, 2009, 9: 240.
- [ 11 ] CHRISTOPH F, HINZ S, KEMPENSTEFFEN C, et al. A gene expression profile of tumor suppressor genes commonly methylated in bladder cancer [ J ] . J Cancer Res Clin Oncol, 2007, 133(6): 343-349.
- [ 12 ] NAVARRO A, YIN P, MONSIVAIS D, et al. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma [ J ] . PLoS One, 2012, 7(3): e33284.
- [ 13 ] GORT E H, SUIJKERBUIJK K P, ROOTHAAN S M, et al. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immuno-histochemical expression of TWIST1 in breast cancer [ J ] . Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(12): 3325-3330.
- [ 14 ] OKADA T, SUEHIRO Y, UENO K, et al. TWIST1 hypermethylation is observed frequently in colorectal tumors and its overexpression is associated with unfavorable outcomes in patients with colorectal cancer [ J ] . Genes Chromosomes Cancer, 2010, 49(5): 452-462.
- (收稿日期: 2014-01-02 修回日期: 2014-02-18)

### 《中国癌症杂志》2014年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊,读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容:国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊,并为中国科技论文统计源期刊,先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊,大16开,80页铜版纸(随文彩图),每月30日出版,单价10元,全年120元。国际标准刊号1007-3639,国内统一标准刊号CN31-1727/R,邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅,漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

也欢迎广大作者来稿。

主 编:沈镇宙

联系地址:上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编:200032

电 话:021-64188274; 021-64175590 × 3574

网 址:www.china-oncology.com

电子邮件:zgaz@163.com