

尿液 POU4F2 基因甲基化对膀胱尿路上皮癌早期诊断的意义

王永强^{1,2}, 于源³, 安丹³, 姜会玲¹, 林友成⁴, 吴松², 蔡志明^{1,2}

摘要 目的 寻找在中国人群中具有高敏感性、高特异性的膀胱癌甲基化标志物,以应用于膀胱癌的尿液诊断。方法 先用 T24 细胞系筛选 8 种文献报道的膀胱癌甲基化标志物,再利用甲基化特异性荧光定量 PCR (qMSP) 技术分别在 28 例膀胱癌患者、10 例尿路结石伴感染患者和 30 例健康志愿者尿液样品中检测筛选成功的 4 种甲基化标志物,计算出不同组合的敏感性和特异性。结果 PCDH17、POU4F2、TCF21、ZNF154 的敏感性分别为 46.43%、92.86%、39.29%、46.43% 特异性分别为 95.00%、97.50%、97.50%、100.00%,最优的诊断标志物为 POU4F2 (敏感性 92.86%、特异性 97.50%)。结论 应用 qMSP 技术,以 POU4F2 为甲基化标志物在尿液中检测膀胱癌可能会成为一种临床可用的诊断方式。

关键词 膀胱癌; qMSP; 甲基化; 诊断

中图分类号 R 737.14; R 394.3; R 446.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0144-06

膀胱癌发病率在全身肿瘤发病率中居第九位,严重危害人类的健康^[1]。由于早期膀胱癌常不显示症状,不易发现,因而早诊断、早治疗对膀胱癌患者的预后具有极大的帮助。开发高灵敏、高特异性的膀胱癌无创检查是膀胱癌检测和监控手段的发展方向。膀胱癌的发生与基因组水平的改变相关,同时亦发生表观遗传学上的改变如 DNA 甲基化和组蛋白修饰等^[2-4]。DNA 甲基化异常可通过影响染色质结构及癌基因和抑癌基因的表达而参与膀胱癌的形成。因此,特定基因的 DNA 甲基化可作为生物标志物诊断和监测膀胱癌。甲基化特异性 PCR (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 是目前检测 DNA 甲基化最敏感的技术,能发现 0.1% 的甲基化 DNA (>50 pg)。近些年产生的甲

基化特异性荧光定量 PCR (quantitative methylation-specific polymerase chain reaction, qMSP) 技术是实时定量基因扩增荧光检测系统与 MSP 技术的结合,利用 qMSP 技术检测膀胱癌的方法有诸多报道^[5-8],但研究主要局限于欧美人种,且不同种族间的基因甲基化情况差异较大。该研究利用 qMSP 技术在中国人尿液中检测多种肿瘤标志物,以期达到早期无创诊断膀胱癌的目的。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择 2013 年 2 月~2014 年 4 月在安徽医科大学第一附属医院泌尿外科、中山大学肿瘤医院泌尿外科、南方医科大学珠江医院泌尿外科膀胱癌患者尿液样品 28 份作为膀胱癌组,尿路结石伴感染患者尿液样品 10 份作为尿感染组,健康志愿者尿液样品 30 份作为正常组,临床资料见表 1。尿液样品均为中段晨尿,采集后立即用低温离心机 4℃ 2 000 r/min 离心 15 min 后,去上清液,留沉淀进行 DNA 提取。患者及其家属自愿签署知情同意书。

1.2 主要试剂 天根组织/血液 DNA 提取试剂盒、天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); dsDNA HS 分析试剂盒、实时荧光定量 PCR 系统、96 孔 PCR 仪、核酸蛋白定量仪 2.0(美国 Life Technologies 公司); DNA 甲基化试剂盒(美国 ZYMO Research 公司); TaKaRa RT-PCR 试剂盒、TaKaRa premix taq ver 2.0 plus dye(大连宝生物工程股份有限公司); 低温高速离心机 (BECKMAN 64R) (美国 Beckman Coulter 公司)。T24 膀胱癌细胞系由深圳北大医院中心实验室赠予。引物序列参考文献^[5-8],见表 2。

1.3 方法

1.3.1 实验组与对照组 实验组为膀胱癌患者,记为 BC; 对照组为尿路结石伴感染患者及健康志愿者,分别记为 U 和 N。

1.3.2 DNA 提取 采用天根微量样品基因组 DNA 提取试剂盒对尿沉渣进行 DNA 提取,提取流程参照试剂盒说明书。采用天根组织/血液 DNA 提取试剂盒对 T24 细胞进行 DNA 提取,提取流程参照试剂盒说明书。

2014-10-13 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划项目)(编号: 2014CB745200)

作者单位: ¹安徽医科大学,合肥 230032

²深圳市第二人民医院,深圳 518035

³深圳华大基因研究院,深圳 518083

⁴南方医科大学珠江医院,广州 510280

作者简介: 王永强,男,硕士研究生;

吴松,男,研究员,责任作者, E-mail: doctor_wusong@126.com;

蔡志明,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: caizhiming2000@163.com

表1 受检患者临床信息及检测结果

编号	性别	年龄(岁)	原发/复发	T	N	M	病理分级	PCDH17	POU4F2	TCF21	ZNF154
BC01	男	49	原发	a	x	x	低级别	+	+	+	+
BC02	男	68	复发	a	x	x	高级别	+	+	+	+
BC03	男	74	原发	a	x	x	高级别	+	+	+	+
BC04	男	71	原发	a	x	x	低级别	+	+	+	+
BC05	男	35	原发	a	x	x	低级别	+	+	+	+
BC06	女	41	原发	a	x	x	低级别	+	+	+	+
BC07	男	54	原发	a	x	x	低级别	+	+	+	+
BC08	男	56	原发	a	x	x	低级别	+	+	+	+
BC09	男	61	原发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC10	男	59	原发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC11	男	49	复发	1	x	x	低级别	+	+	+	+
BC12	男	66	复发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC13	男	70	复发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC14	男	66	原发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC15	男	54	原发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC16	男	87	原发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC17	女	80	原发	1	x	x	低级别	+	+	+	+
BC18	男	79	原发	1	x	x	高级别	+	+	+	+
BC19	男	73	复发	2	0	0	高级别	+	+	+	-
BC20	男	68	复发	2	0	0	高级别	+	+	+	-
BC21	男	74	原发	2a	0	0	高级别	+	+	+	-
BC22	男	67	原发	2a	0	0	高级别	+	+	+	-
BC23	男	74	原发	2b	0	0	高级别	+	+	+	-
BC24	男	60	原发	2b	0	0	高级别	+	+	+	-
BC25	男	84	原发	3	0	0	高级别	+	+	+	-
BC26	男	74	复发	3a	1	0	高级别	+	+	+	+
BC27	女	41	原发	3b	3	1	高级别	+	+	+	+
BC28	男	74	原发	4a	2	0	高级别	+	+	+	+
U01	男	37	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	-	-
U02	男	59	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U03	女	75	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	-
U04	男	75	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U05	女	73	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U06	女	73	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U07	男	77	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U08	男	30	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U09	女	48	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-
U10	男	31	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-

BC: 膀胱尿路上皮癌患者; U: 尿路结石伴感染患者; NA: 无相关信息 “+”和“-”分别代表检测阳性和阴性

1.3.3 样品检测

1.3.3.1 浓度检测 检测方法按照 Quant-it dsDNA HS Assay Kit 的说明书中步骤进行。注意每日首次使用 Qubit 时,均需要制作标准曲线,且要用 2 μl standard2#作为阳性对照,检验标准曲线的准确性,只有当 standard2#检测的浓度在下面范围内标准曲线才能使用。Qubit HS 阳性对照(standard2#)检测浓度范围 9.5 ~ 10.5 ng/μl。

1.3.3.2 样品完整性检测方法 根据 Qubit 定量

的浓度,取约 50 ng DNA,与 3 μl 溴酚蓝混合,补水至 10 μl 后,全部加入到 1% 琼脂糖检测胶的胶孔中,样品应同时包括 2 条分子量标准: λ-Hind III digest(上样量 2 μl)及 D2000(上样量 6 μl)。电泳条件:电压 150 V 电泳 40 min。将电泳完成的胶块置于凝胶成像仪中拍照保存。拍照时注意胶图背景较暗,胶孔要清晰。选择 DNA 总量 > 500 ng,片段大小 > 10 000 bp 的样本进行后续实验。

1.3.4 Bisulfite 处理 Bisulfite 处理的样本起始量为 200 ng,具体实验方法和注意事项根据 ZYMO RESEARCH 的 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 的说明书进行操作,纯化时用 20 μl 的 M-Elution Buffer 洗脱 DNA。Bisulfite 反应体系: CT Conversion Reagent 130 μl, DNA 模板 200 ng, 灭菌双蒸水补足 150 μl。所用仪器: 96-Well GeneAmp PCR System 9700。反应条件: 98 °C, 10 min; 65 °C, 2.5 h; 4 °C 维持。

1.3.5 甲基化引物筛选 以经 Bisulfite 处理的 T24 细胞系 DNA 为模版,选取各个引物分别进行 PCR。反应体系: 模版 30 ng, TaKaRa® premix taq 25 μl, 上下游引物各 1 μl, 灭菌双蒸水补足至 50 μl。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s 扩增 40 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳分析。没有条带的视为引物筛选失败,选取 ALU-C4 作为内参, PCDH17、POU4F2、TCF21、ZNF154 作为甲基化标志物进行后续实验。见图 1。

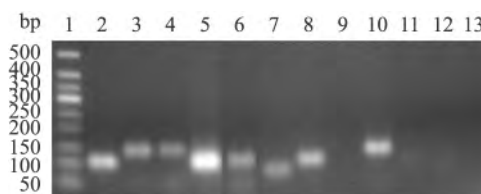


图1 引物鉴定 PCR 产物电泳图

1: Ladder; 2: ACTB-1 内参; 3: ACTB-2 内参; 4: ACTB-3 内参; 5: ALU-C4 内参; 6: ZNF154 标志物; 7: PCDH17 标志物; 8: POU4F2 标志物; 9: NID2 标志物; 10: TCF21 标志物; 11: TMEFF2 标志物; 12: TWIST1 标志物; 13: VIM 标志物

1.3.6 qMSP 检测 对经 Bisulfite 处理的 DNA 样本进行 qMSP,每个样本检测 ALU-C4、PCDH17、POU4F2、TCF21、ZNF154 5 对引物。反应体系: SYBR® Premix Ex Taq™ II(2 ×) 10 μl、引物(10 μM) 2 μl、ROX Reference Dye(50 ×) 0.4 μl、DNA 模板 2 μl、Nuclease-Free Water 5.6 μl,共 20 μl 体系。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s 扩增 45 个循环。每个反应重复 3

次 取 3 次 结 果 的 平 均 CT 值 作 为 最 终 结 果。

1.4 统计 学 处 理 采 用 SPSS 13.0 软 件 进 行 分 析，数 据 以 $\bar{x} \pm s$ 表 示。两 组 间 比 较 采 用 独 立 样 本 *t* 检 验，多 组 间 比 较 采 用 单 因 素 方 差 分 析。

2 结 果

2.1 甲 基 化 拷 贝 数 计 算 用 5 个 基 因 ALU-C4、PC-DH17、POU4F2、TCF21、ZNF154 的 每 对 引 物 纯 化 后 的 RT-PCR 产 物 制 作 标 准 曲 线，做 出 每 对 引 物 的 标 准 曲 线^[9]，通 过 标 准 曲 线 定 出 每 个 基 因 的 实 际 甲 基 化 的 拷 贝 数。见 图 2。

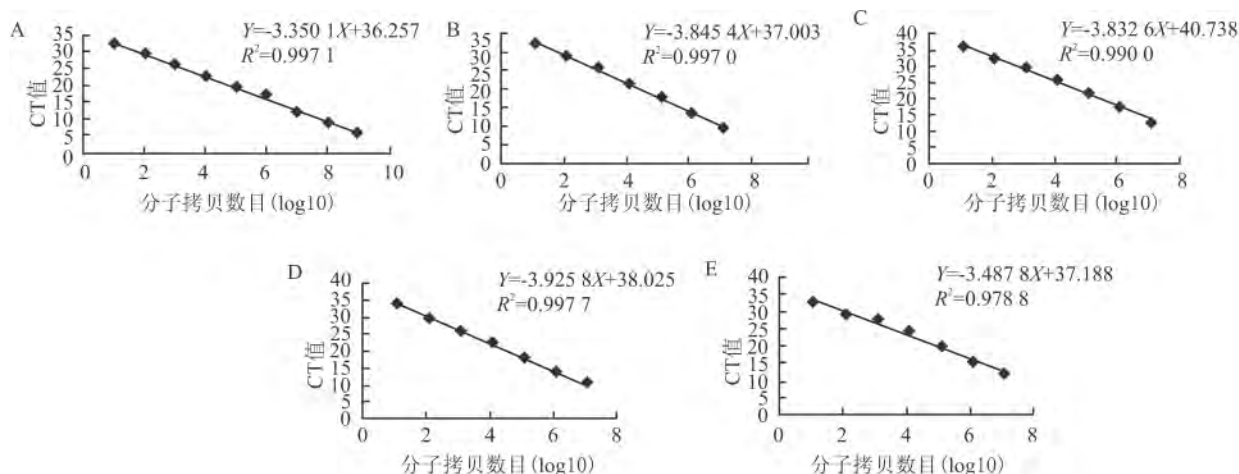


图 2 甲 基 化 分 子 拷 贝 数 标 准 曲 线

A: ALU-C4 标 志 物; B: PCDH17 标 志 物; C: POU4F2 标 志 物; D: TCF21 标 志 物; E: ZNF154 标 志 物

表 2 qMSP 内 参 及 甲 基 化 标 志 物

基 因	引 物 序 列 (5'→3')	敏 感 性 (%)	特 异 性 (%)	样 本 数 量 (n)	样 本 来 源	人 种
ACTB-1 (内参)	F: TAGGGAGTATATAGTTGGGGAAGTT R: AACACACAATAACAAACACAAATTCAC	NA	NA	NA	NA	NA
ACTB-2 (内参)	F: TGGTGATGGAGGAGTTTACTAAGT R: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA	NA	NA	NA	NA	NA
ACTB-3 (内参)	F: TGGTGATGGAGGAGTTTACTAGGT R: ACCCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA	NA	NA	NA	NA	NA
ALU-C4 (内参)	F: GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTTGTAATTTAGTA R: ATTAACATAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA	NA	NA	NA	NA	NA
PCDH17	F: CCGCGGAGGGCGTAGTA R: GTCCACGTCCAACAAATACGATAC	100	83	318	癌组织、尿液	葡萄牙
TCF21	F: GTTAAGAGGGAAGGCGTTTATT R: CCTTACTCAACACTCGCATACGA	96	100	50	癌组织	葡萄牙
VIM	F: TTCGGGAGTTACTTCGCGTT R: ACCGCGGAACATCCTACGA	85	94	182	癌组织、尿液	丹麦
POU4F2	F: GTTGTGCGAAGTTGAGTTTATTC R: CCGTTCAAACTAACAAACAAAACGA	87	100	184		
ZNF154	F: TTTATCGGATTAGAGATAGTAGAGCGT R: TAACGTAAATCCCCCAAACGACG	64	100	50	癌组织	葡萄牙
TMEFF2	F: GTTCGGGGTTACGCGC R: TTCGCCTCACTCTCCGCT	90	93	278	癌组织、尿液	NA
TWIST1	F: GTTAGGTTTCGGGGCGTTGTT R: CCGTCCCTTCCTCCGACGAA					
NID2	F: CCGGTTTTTAAGGAGTTTTATTTTC R: CTACGAAATTCCTTTACGCT					

NA: 无 相 关 信 息

2.2 相对甲基化水平计算 将实际甲基化的拷贝数代入以下公式,计算出相对甲基化水平值。相对甲基化水平值 = $[(\text{gene}/\text{ALU})_{\text{sample}}/(\text{gene}/\text{ALU})_{\text{Standard}}] \times 1000$ 。

2.3 3组间相对甲基化水平差异比较 PCDH17 基因: 正常组 (46.88 ± 72.17)、膀胱癌组 (382.67 ± 440.00)、尿路感染组 (286.93 ± 489.52) 3组间差异有统计学意义 ($F = 7.267, P < 0.01$)。POU4F2 基因: 正常组 (0.35 ± 0.50)、膀胱癌组 (104.55 ± 94.74)、尿路感染组 (9.63 ± 28.87) 3组间差异有统计学意义 ($F = 22.321, P < 0.01$)。TCF21 基因: 正常组 (24.82 ± 36.95)、膀胱癌组 (169.85 ± 169.52)、尿路感染组 (78.71 ± 41.79) 3组间差异有统计学意义 ($F = 11.997, P < 0.01$)。ZNF154 基因: 正常组 (43.68 ± 89.86)、膀胱癌组 (480.96 ± 425.70)、尿路感染组 (110.52 ± 89.65) 3组间差异有统计学意义 ($F = 18.420, P < 0.01$)。

2.4 检出限判定 根据 30 个正常样本中各基因的最大相对甲基化水平值确定各基因的检出限,PCDH17、POU4F2、TCF21、ZNF154 的检出限分别为 300.17、1.95、154.56、427.99。见图 3。

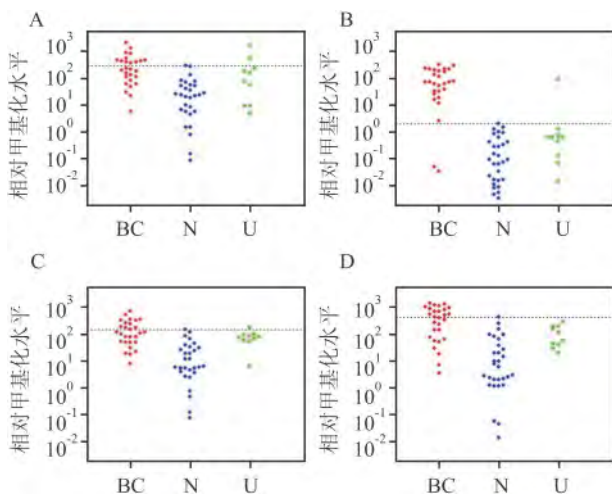


图 3 标志物的相对甲基化水平

A: PCDH17 标志物; B: POU4F2 标志物; C: TCF21 标志物; D: ZNF154 标志物

2.5 结果判定 相对甲基化水平值高于检出限判定为阳性,等于或低于检出限判定为阴性。见表 1。多种标志物联用时,其中任一标志物阳性即判定为阳性结果。敏感性 = 检测结果为阳性的膀胱癌样本数 / 总的膀胱癌样本数 特异性 = 检测结果为阳性的非膀胱癌样本数 / 总的非膀胱癌样本数。见表 3。

表 3 甲基化标志物的敏感性和特异性

标志物	敏感性(%)	特异性(%)
PCDH17	46.43	95.00
POU4F2	92.86	97.50
TCF21	39.29	97.50
ZNF154	46.43	100.00
POU4F2、PCDH17	92.86	95.00
POU4F2、ZNF154	92.86	97.50
POU4F2、TCF21	92.86	97.50

3 讨论

膀胱癌分为尿路上皮癌、鳞状细胞癌、腺细胞癌、小细胞癌、混合型癌、癌肉瘤以及转移性癌等,其中以尿路上皮癌最常见,占 90% 以上。膀胱独特的生理环境使得膀胱癌无创诊断成为可能,膀胱上皮细胞脱落至尿液中,可随尿液排出体外,便于诊断。目前经美国食品和药物管理局批准用于临床的膀胱癌相关的无创诊断方法有尿细胞学、膀胱肿瘤抗原、核基质蛋白 22、ImmunoCyt、荧光原位杂交,但其均存在一定的缺点,并不适合大规模高危人群筛查。

DNA 甲基化状态易于 DNA 序列发生改变,其对环境变化的敏感性更高,在细胞发生癌变的早期即可发现甲基化状态的变化。因此,利用甲基化标志物诊断膀胱癌更适合高危人群筛查,且有利于发现癌前病变^[5]。国外已有文献^[5-8,10]报道了膀胱癌特异的甲基化标志物,并利用 MSP 及 qMSP 技术在尿液中鉴别膀胱癌患者与正常个体,取得了较好的效果。但是这些研究主要集中在欧美国家,不同人种间的 DNA 甲基化状态差异较大,这些甲基化标志物是否适用于中国人尚不清楚。

本研究选取了 PCDH17、TCF21、VIM、POU4F2、ZNF154、TMEFF2、TWIST1、NID2 共 8 个基因进行筛选,经过 PCR 产物电泳鉴定后选取 PCDH17、POU4F2、TCF21、ZNF154 作为甲基化标志物进行后续实验。PCDH17 是原钙黏蛋白家族的成员之一。PCDH17 基因位于 13q21.1,主要编码钙黏蛋白相关的神经受体,在特异的细胞与细胞之间的连接与功能中起作用^[11]。有研究^[12]报道 PCDH17 主要通过增加细胞间的黏附、信号转导及生长控制而起到一定的抑癌作用。POU4F2 是 POU 家族蛋白的一员,POU 家族蛋白是包含有 POU 结构域的一类转录调控因子。POU4F2 维持视神经元功能,研究^[13]显示 POU4F2 在乳腺癌中表达升高,起到促进肿瘤生长的功能。TCF21 基因位于人类 6 号染色体 6q23-24 区域,研究^[14]报道 TCF21 基因能够促使间质细胞转

化为上皮细胞 这个过程的逆转就是上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), TCF21 基因的低表达会导致 EMT, 与多种肿瘤的侵犯和转移有关。ZNF154 与细胞的生长分化功能有关。ZNF154 基因的高甲基化与非浸润性膀胱癌的复发有关^[10]。

通过在 28 例膀胱尿路上皮癌患者、10 例尿路结石伴感染患者、30 例健康志愿者尿液样品中进行 qMSP 检测 确定了 4 个标志物的检出限分别为 PC-DH17 300.17、POU4F2 1.95、TCF21 154.56、ZNF154 427.99。最终发现以 POU4F2 单一甲基化标志物可达到最好的效果 敏感性 92.86% 特异性 97.50%。

利用 qMSP 技术诊断膀胱癌具有极高的敏感性 对早期膀胱癌检出率高。本研究在实验过程中共收集膀胱癌患者尿液 75 例, 但提取出 DNA 符合 qMSP 实验要求的只有 28 例, 与 Reinert et al^[10] 尿液 DNA 的提取成功率(约 30%) 相当。这可能是膀胱癌尿液甲基化诊断方式已诞生多年, 但仍未推广应用于临床的技术难题之一。尿液采集前受检者的饮水、活动状态、尿液离体后的处理方式及时间、保存方式及提取方式等都有可能对提取成功率产生影响。要将尿液甲基化诊断膀胱癌推广于临床应用, 必须要改变现有的尿液 DNA 保存及提取方式 达到提取成功率 90% 以上, 而后进行大样本、多中心研究及实验证实。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16 (R1): R50-9.
- [3] Laird P W. The power and the promise of DNA methylation markers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(4): 253-66.
- [4] Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone - modification maps [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(4): 286-98.
- [5] 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): 1483-91.
- [6] Costa V L, Henrique R, Danielsen S A, et al. Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(23): 5842-51.
- [7] Costa V L, Henrique R, Danielsen S A, et al. TCF21 and PC-DH17 methylation: An innovative panel of biomarkers for a simultaneous detection of urological cancers [J]. *Epigenetics*, 2011, 6(9): 1120-30.
- [8] 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.
- [9] Lee C, Kim J, Shin S G, et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli* [J]. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 273-80.
- [10] Reinert T, Borre M, Christiansen A, et al. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46297.
- [11] Yagi T. Clustered protocadherin family [J]. *Dev Growth Differ*, 2008, 50 Suppl 1: S131-40.
- [12] Haruki S, Imoto I, Kozaki K, et al. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(6): 1027-36.
- [13] Fujita R, Ounzain S, Wang A C, et al. Hsp-27 induction requires POU4F2/Brn-3b TF in doxorubicin-treated breast cancer cells, whereas phosphorylation alters its cellular localisation following drug treatment [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2011, 16(4): 427-39.
- [14] Baum B, Settleman J, Quinlan M P. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(3): 294-308.

Diagnosis of bladder cancer based on urinary levels of POU4F2 hypermethylation

Wang Yongqiang^{1,2}, Yu Yuan³, An Dan³, et al

(¹Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035;

³Beijing Genomics Institute at Shenzhen, Shenzhen 518083)

Abstract Objective To identify a panel of novel epigenetic biomarkers with high sensitivity and specificity that can be utilized in detection and diagnosis of bladder cancer using urine sediments. **Methods** T24 cell lines that had been treated with bisulfite were used to examine the 8 methylated candidates that were previously reported in

酒精性脂肪肝中库普弗细胞表型变化的探讨

程 希^{1,2,3} 胡超杰^{1,2,3} 李晚霞^{1,2,3} 黄 成^{1,2,3} 李 俊^{1,2,3}

摘要 目的 通过建立小鼠酒精性脂肪肝(AFL)的模型,并采用肝脏原位灌流,分离出形态良好、具有生物学活性的库普弗细胞(KCs),研究其在AFL中的作用。方法 采用Lieber-DeCarli液体饮食加一次急性酒精灌胃,建立小鼠AFL模型。造模周期为16d,于第16天灌胃9h后处死小鼠,取小鼠肝脏、血清及KCs。检测各组血清谷丙转氨酶/谷草转氨酶(ALT/AST)、肝匀浆、血清中总胆固醇/三酰甘油(TG/TC)水平变化和肝脏病理切片HE、油红染色。选取原位灌流的方法分离KCs,采用流式细胞术分析KCs表型及组成的改变。荧光实时定量PCR(qRT-PCR)检测组织及提取细胞中各细胞因子水平。结果 ALT/AST、TG/TC等反应肝损伤的指标模型组显著高于对照组,HE及油红染色结果与之一致,表明小鼠AFL模型建立成功。肝脏原位灌流每只小鼠细胞得率约 $1.5 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个。以小鼠巨噬细胞表面标记分子F4/80及白细胞共同抗原CD45双标设门,流式细胞术分析F4/80和CD45双阳性细胞,在模型中肝脏固有CD68⁺细胞显著降低,并出现大量的浸润单核细胞。qRT-PCR结果显示,在肝组织及原代KCs中细胞因子,肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1)水平显著升高。结论 小鼠AFL模型建立成功,肝脏原位灌流法细胞得率较高,AFL的发病可能与KCs构

成、表型改变,与细胞因子升高介导外周单核细胞浸润有关。
关键词 酒精性脂肪肝;原位灌流;库普弗细胞;细胞因子
中图分类号 R 967; R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0149-05

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是全球发病率和死亡率较高的慢性肝病。文献^[1-2]报道,大部分的酗酒者都会形成脂肪肝,其中有20%~40%会发展为更严重的ALD。饮酒所造成酒精性肝损伤比较显著^[3]。然而,饮酒如何影响ALD进展的机制尚不明确。库普弗细胞(kupffer cells, KCs)作为肝脏内定居的巨噬细胞主要功能是清除病原体,产生各种促炎因子^[4],其在酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AFL)发病过程中起到了非常重要的作用。一方面,血液中的酒精能够刺激KCs;另一方面,内毒素也能够刺激KCs活化,释放细胞因子及氧自由基。文献^[5-7]报道,KCs可以分为炎症浸润(CD11b⁺)与组织固有(CD68⁺)两群,共同参与机体炎症和疾病的调控。CD11b⁺主要功能是分泌各种细胞因子,CD68⁺主要功能则是修复和吞噬^[8]。KCs在疾病发展中的作用不同,且在AFL中这两群细胞是如何变化还鲜少有报道。该研究建立AFL模型,提取原代KCs,旨探讨CD11b⁺与CD68⁺两群细胞和AFL发病的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康的40只C57BL/6雄性小鼠,清洁级9~10周龄(体重 ≥ 20 g),由安徽医科大学实验动物中心提供。饲养于安徽医科大学药学院动

2014-10-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81273526);安徽省教育厅基金项目(编号:KJ2012A156);安徽省自然科学基金(编号:1308085MH145);安徽医科大学博士科研启动基金(编号:XJ201118)

作者单位:安徽医科大学¹药学院、²肝病研究所,合肥 230032

³安徽省创新药物产业共性研究院,合肥 230032

作者简介:程 希,女,硕士研究生;

李 俊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lj@ahmu.edu.cn

bladder cancer patients. Methylation levels of the candidate genes were quantified using the urine sediments from 28 bladder cancer patients, 30 healthy volunteers and 10 infected urinary calculi patients by quantitative methylation-specific polymerase chain reaction(qMSP). The four most efficacious and reliable biomarkers were selected after the sensitivity and specificity of each biomarker were further calculated and inspected. **Results** The sensitivities of PCDH17, POU4F2, TCF21 and ZNF154 in the detection of bladder cancer were 46.43%, 92.86%, 39.29% and 46.43% respectively; the specificities of these biomarkers were 95.00%, 97.50%, 97.50% and 100.00% respectively. POU4F2 appeared as the best biomarkers among the four, showing a sensitivity of 92.86% and a specificity of 97.50%. **Conclusion** Bladder cancer can be detected by a biomarker panel by using qMSP depending on the urine samples from patients.

Key words bladder cancer; qMSP; hypermethylation; diagnosis