

# 血清 CDH13 甲基化对非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗后进展的预测作用\*

林英立<sup>1</sup>,李艳丽<sup>2</sup>,戚景光<sup>1</sup>,梁杰<sup>1</sup>,赵炎<sup>1</sup>

(徐州市肿瘤医院:1.泌尿外科;2.科教科,江苏徐州 221005)

**[摘要]** **目的** 探索血清钙黏蛋白 13(CDH13)甲基化对非肌层浸润性膀胱癌行经尿道膀胱肿瘤切除术(TURBT)治疗后进展的预测作用。**方法** 选取2010年1月至2012年1月在该院行TURBT治疗的非肌层浸润性膀胱癌患者98例,应用甲基化特异性PCR检测患者血清CDH13甲基化状态,并分析其与患者临床病理资料及术后进展情况的相关性。**结果** 52例(53.1%)患者血清中检测到CDH13甲基化,并且血清CDH13甲基化与肿瘤大小、分级及数目密切相关( $P<0.05$ )。在随访过程中有20例(20.4%)患者出现肿瘤进展,Kaplan-Meier分析和log-rank检验发现存在血清CDH13甲基化的患者无进展生存率低于血清CDH13未甲基化的患者,差异有统计学意义( $P=0.007$ )。Cox回归分析显示,血清CDH13甲基化是非肌层浸润性膀胱癌行TURBT治疗后进展的独立危险因素。**结论** 血清CDH13甲基化可作为非肌层浸润性膀胱癌行TURBT治疗后进展的预测指标。

**[关键词]** 膀胱肿瘤;进展;CDH13;甲基化

**[中图分类号]** R737.14

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)35-4949-03

## Predictive effect of serum CDH13 methylation for progression after TURBT in patients with non-muscle invasive bladder cancer\*

Ling Yingli<sup>1</sup>, Li Yanli<sup>2</sup>, Qi Jingguang<sup>1</sup>, Liang Jie<sup>1</sup>, Zhao Yan<sup>1</sup>

(1. Department of Urologic Surgery; 2. Department of Science and Education, Xuzhou Municipal Tumor Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221005, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the predictive effect of serum CDH13 methylation for the progression after TURBT in the patients with non-muscle invasive bladder cancer. **Methods** Ninety-eight patients with non-muscle invasive bladder cancer treated by TURBT in this hospital from January 2010 to January 2012 were selected. The methylation specific PCR was used to detect the methylation status of serum CDH13. Then its correlation with the clinicopathological data as well as postoperative progression situation was analyzed. **Results** Serum CDH13 methylation was detected in 52 cases (53.1%), moreover serum CDH13 methylation was closely correlated with tumor size, grade and number ( $P<0.05$ ). During follow-up, 20 cases (20.4%) appeared the tumor progression. The Kaplan-Meier analysis and log-rank test found that the patients with serum CDH13 methylation had shorter progression-free survival rate than the patients without serum CDH13 methylation, and the difference was statistically significant ( $P=0.007$ ). The Cox regression analysis showed that serum CDH13 methylation was an independent risk factor for the progression after TURBT in non-muscle invasive bladder cancer. **Conclusion** Serum CDH13 methylation can serve as a predictive indicator of the progression after TURBT in non-muscle invasive bladder cancer.

**[Key words]** urinary bladder neoplasms; progression; CDH13; methylation

膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一,具有较高的发病率<sup>[1]</sup>。在新发病例中70%以上为非肌层浸润性膀胱癌。目前经尿道膀胱肿瘤切除术(TURBT)及术后的膀胱肿瘤灌注化疗是其主要治疗方法<sup>[2-3]</sup>。近年来,尽管手术技巧、灌注药物及灌注方案有了很大的提高,但仍有相当一部分肿瘤进展为肌层浸润性膀胱癌<sup>[4]</sup>。如何有效地预测非肌层浸润性膀胱癌行TURBT治疗后是否会进展,并给予个体化治疗以取得较好的预后,是目前亟须解决的问题<sup>[3,5-7]</sup>。钙黏蛋白13(CDH13)基因为抑癌基因,研究发现其在膀胱癌中因启动子甲基化而表达减少或缺失,并与肿瘤的恶性生物学行为密切相关,有望成为膀胱癌预后的分子标志物<sup>[8-9]</sup>。本研究将进一步探索血清CDH13甲基化对非肌层浸润性膀胱癌行TURBT治疗后进展

的预测作用。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2010年1月至2012年1月在本院行TURBT治疗的膀胱癌患者98例。纳入标准:(1)首次发现膀胱癌,术后组织病理学确诊为非肌层浸润性尿路上皮癌;(2)无其他合并肿瘤;(3)术前未接受抗肿瘤治疗。排除标准:未按照要求予术后膀胱灌注治疗及未完成随访者。患者的临床病理资料见表1。本研究符合赫尔辛基宣言的原则。

### 1.2 方法

**1.2.1 临床治疗方案** 98例患者均行TURBT治疗,术后给予表柔比星50mg即刻膀胱灌注化疗。对于中高危患者,术后8周每周1次膀胱灌注,之后每月1次,维持12个月。术后2

\* 基金项目:江苏省徐州市医学青年后备人才项目(2014007);江苏大学临床科技发展基金项目(JLY20160064);江苏省“六大人才高峰”资助项目(2014-WSW-066);江苏省卫生和计划生育委员会青年科研课题项目(Q201514);江苏省青年医学人才项目(QNRC2016395)。作者简介:林英立(1980—),副主任医师,博士/博士后,主要从事泌尿系肿瘤的临床、基础研究。

年每 3 个月进行 1 次膀胱镜检查,第 3 年开始每 6 个月 1 次。

**1.2.2 血清标本的采集及甲基化检测** 所有患者在术前经肘静脉抽取静脉血 10 mL,分离血清后保存于液氮中待测。采用 DNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)提取血清 DNA,应用 EZ DNA Methylation-Gold Kit(美国 Zymo Research 公司)对 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰并纯化。以甲基化修饰后的 DNA 为模板,分别用甲基化和非甲基化两对引物进行甲基化特异性 PCR 检测。CDH13 基因启动子区域 CpG 岛甲基化引物,CDH13 正义链:5'-TCG CGG GGT TCG TTT TTC GC-3',CDH13 反义链:5'-GAC GTT TTC ATT CAT ACA CGC G-3',产物长度为 243 bp(退火温度为 57 ℃)。非甲基化引物,CDH13 正义链:5'-TTG TGG GGT TGT TTT TTG T-3',CDH13 反义链:5'-AAC TTT TCA TTC ATA CAC ACA-3',产物长度为 242 bp(退火温度为 53 ℃)。取 PCR 产物 10 μL 行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,以双蒸水作为阴性对照,110 V 电泳 40 min,凝胶成像系统下照相。仅应用甲基化引物扩增出产物条带判断为存在完全 DNA 甲基化,仅应用非甲基化引物扩增出产物条带判断为不存在 DNA 甲基化(U),若同时出现扩增产物条带则表明存在部分 DNA 甲基化,完全 DNA 甲基化和部分 DNA 甲基化均判为 DNA 甲基化阳性(M)<sup>[10-11]</sup>。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。计数资料以例数或百分率表示,采用  $\chi^2$  检验分析血清 CDH13 甲基化与临床病理特征之间的关系;Kaplan-Meier 生存分析和 log-rank 检验用来评价血清 CDH13 甲基化对肿瘤进展的影响;Cox 回归分析检测血清 CDH13 甲基化对膀胱癌进展的预测作用;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 血清 CDH13 甲基化与膀胱癌临床病理特征的关系** 52 例(53.1%)患者血清中检测到 CDH13 甲基化,见图 1;并且血清 CDH13 甲基化与肿瘤的大小、分级及数目密切相关( $P < 0.05$ ),但与患者的年龄、性别和分期无关( $P > 0.05$ ),见表 1。



U:未甲基化;M:甲基化;Case31、32、34:CDH13 甲基化;Case33:CDH13 未甲基化

图 1 膀胱癌 CDH13 甲基化检测结果

表 1 膀胱癌患者的临床病理特征及其与血清 CDH13 甲基化的关系

项目	患者例数及构成比[n(%)]	CDH13 甲基化[n(%)]		P
		M	U	
年龄(岁)				0.377
≤65	36(36.7)	17(47.2)	19(52.8)	
>65	62(63.3)	35(56.5)	27(43.5)	
性别				0.827
男	65(66.3)	35(53.8)	30(46.2)	
女	33(33.7)	17(51.5)	16(48.5)	
大小(cm)				0.037
≤3	53(54.1)	23(43.4)	30(56.6)	
>3	45(45.9)	29(64.4)	16(35.6)	

续表 1 膀胱癌患者的临床病理特征及其与血清 CDH13 甲基化的关系

项目	患者例数及构成比[n(%)]	CDH13 甲基化[n(%)]		P
		M	U	
数目				0.034
单发	55(56.1)	24(43.6)	31(56.4)	
多发	43(43.9)	28(65.1)	15(34.9)	
分级				0.030
G1/2	66(67.3)	30(45.5)	36(54.5)	
G3	32(32.7)	22(68.8)	10(31.3)	
分期				0.507
Ta	35(35.7)	17(48.6)	18(51.4)	
T1	63(64.3)	35(55.6)	28(44.4)	

M:甲基化;U:未甲基化

**2.2 血清 CDH13 甲基化与膀胱癌进展的关系** 所有患者术后均随访至术后 3 年。研究发现有 20 例(20.4%)患者出现肿瘤进展,其中 16 例为 CDH13 甲基化组患者,4 例为 CDH13 未甲基化患者。Kaplan-Meier 分析和 log-rank 检验发现存在血清 CDH13 甲基化的患者其无进展生存率比血清 CDH13 未甲基化的患者低,差异有统计学意义( $P = 0.007$ ),见图 2。进一步 Cox 回归分析表明血清 CDH13 甲基化是非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗后进展的独立危险因素,见表 2。

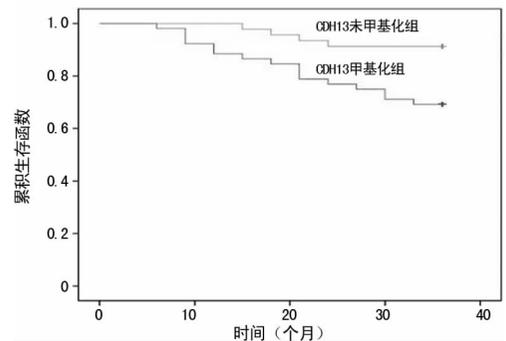


图 2 血清 CDH13 甲基化与未甲基化患者生存曲线

表 2 血清 CDH13 甲基化对膀胱癌进展的预测作用

项目	多因素 Cox 回归分析		
	Exp(B)	95%CI	P
年龄	0.973	0.694~4.621	0.736
性别	0.852	0.764~5.031	0.817
肿瘤大小	1.628	0.885~6.571	0.117
肿瘤数目	1.194	0.946~9.317	0.217
分级	2.514	1.134~7.264	0.033
分期	2.182	1.035~9.372	0.047
CDH13 甲基化	3.256	1.485~10.361	0.013

## 3 讨 论

膀胱癌是我国泌尿系统常见肿瘤,近年来随着暴露危险因素的增加,其发病率有逐年增加的趋势<sup>[12]</sup>。同时,膀胱癌是一种异质性疾病,组织病理学相同的肿瘤其临床表现和预后并不

完全一致<sup>[3-4,6]</sup>。复发和进展是膀胱癌的重要特性,尤其是非肌层浸润性肿瘤;如何鉴别非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗后是否会进展为肌层浸润性病变是临床工作中面临的一大难题<sup>[3-4,6]</sup>。目前,主要应用临床病理特征如肿瘤的分期、分级、数目、大小、形态等进行预后的预测,但这些指标并不能准确地预测肿瘤的进展<sup>[13-14]</sup>。因此,需要新的、准确的指标来预测肿瘤的进展,并指导临床治疗。

CDH13 是钙黏蛋白家族的一员,在细胞黏附、运动、增殖及细胞表型等方面起着重要的调节作用<sup>[8]</sup>。其基因定位于人类染色体 16q24,在肿瘤中常因启动子甲基化而表达减少或缺失,是一种抑癌基因。笔者在基础研究中发现应用 RNA 干扰技术抑制 CDH13 在膀胱癌 5637 细胞中的表达后细胞增殖加快,迁移和侵袭能力增强;进一步的研究发现,在膀胱癌 ScaBer 细胞中因 CDH13 基因启动子甲基化、CDH13 呈低表达状态,5-Aza-dc 与 ScaBer 细胞共同孵育后 CDH13 基因甲基化状态得到逆转,并且 CDH13 蛋白表达明显增加同时对细胞的增殖、迁移和侵袭产生抑制作用;这些研究结果表明 CDH13 基因启动子甲基化在膀胱癌的发生、发展中起着重要作用<sup>[15-16]</sup>。临床研究发现膀胱癌组织中 CDH13 甲基化与肿瘤生长、分化不良及浸润等恶性生物学行为密切相关;进一步研究发现膀胱癌患者血清中也存在 CDH13 甲基化,并与肿瘤的恶性生物学行为及患者不良预后有关<sup>[10-11,17]</sup>。这些研究结果表明,血清 CDH13 甲基化有可能成为预测非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗进展的分子标志物。

本研究发现,在 98 例非肌层浸润性膀胱癌患者中,有 52 例存在血清 CDH13 甲基化,并且与肿瘤的大小、分级及数目密切相关。所有患者在行 TURBT 治疗后均进行了随访,发现存在血清 CDH13 甲基化的患者其无进展生存率明显低于血清 CDH13 未甲基化的患者,结果表明血清 CDH13 甲基化与膀胱癌的进展密切相关,并有可能成为预测膀胱癌进展的分子标志物。为进一步探索血清 CDH13 甲基化对非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗进展的预测作用,笔者进行了单因素和多因素 Cox 回归分析,发现血清 CDH13 甲基化是非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗进展的独立危险因素。

综上所述,血清 CDH13 甲基化与非肌层浸润性膀胱癌大小、分级、数目及肿瘤进展密切相关,血清 CDH13 甲基化是非肌层浸润性膀胱癌行 TURBT 治疗进展的预测指标。本研究将为建立膀胱癌的预后预测体系和探索个体化治疗方案提供科学依据。

## 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] Packiam VT, Johnson SC, Steinberg GD. Non-muscle-invasive bladder cancer; Intravesical treatments beyond Bacille Calmette-Guérin[J]. *Cancer*, 2017, 123(3): 390-400.
- [3] Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer

[J]. *Lancet*, 2009, 374(9685): 239-249.

- [4] Anghel RM, Gales LN, Trifanescu OG. Outcome of urinary bladder cancer after combined therapies [J]. *J Med Life*, 2016, 9(1): 95-100.
- [5] Iliev R, Kleinova R, Juracek J, et al. Overexpression of long non-coding RNA TUG1 predicts poor prognosis and promotes cancer cell proliferation and migration in high-grade muscle-invasive bladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(10): 13385-13390.
- [6] Isharwal S, Konety B. Non-muscle invasive bladder cancer risk stratification [J]. *Indian J Urol*, 2015, 31(4): 289-296.
- [7] Leopardo D, Cecere SC, Di Napoli M, et al. Intravesical chemo-immunotherapy in non muscle invasive bladder cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(16): 2145-2158.
- [8] Andreeva AV, Kutuzov MA. Cadherin 13 in cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010, 49(9): 775-790.
- [9] Chen F, Huang T, Ren Y, et al. Clinical significance of CDH13 promoter methylation as a biomarker for bladder cancer; a meta-analysis [J]. *BMC Urol*, 2016, 16(1): 52.
- [10] 林英立, 管同郁, 向代香, 等. 膀胱癌中 CDH13 基因启动子甲基化的临床意义 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2013, 33(2): 174-177.
- [11] Lin YL, Sun G, Liu XQ, et al. Clinical significance of CDH13 promoter methylation in serum samples from patients with bladder transitional cell carcinoma [J]. 2011, 39(1): 179-186.
- [12] Pang C, Guan Y, Li H, et al. Urologic cancer in China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2016, 46(6): 497-501.
- [13] Wu P, Cao Z, Wu S. New progress of epigenetic biomarkers in urological cancer [J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 9864047.
- [14] Nagata M, Muto S, Horie S. Molecular biomarkers in bladder cancer; novel potential indicators of prognosis and treatment outcomes [J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 8205836.
- [15] 林英立, 管同郁, 戚景光, 等. siRNA 抑制 CDH13 表达对膀胱癌 5637 细胞增殖和侵袭的影响 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2014, 34(2): 147-150.
- [16] 林英立, 戚景光, 梁杰, 等. 5-Aza-dc 对膀胱癌 ScaBer 细胞 CDH13 基因甲基化状态和蛋白表达以及细胞增殖迁移侵袭的影响 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2015, 35(1): 4-8.
- [17] 林英立, 管同郁, 向代香, 等. 膀胱癌组织中 CDH13 的表达及临床意义 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2013, 33(5): 594-596.

(收稿日期: 2017-06-15 修回日期: 2017-09-19)