论著

文章编号:1000-5404(2011)16-1714-04

尿中修饰核苷水平在膀胱移行细胞癌诊断及预测预后中的意义

吴 辉[1],刘宏民[2],杨松鹏[1],王庆伟[1],张玉瑞[1],袁 璞[1],易 强[1],刘 刚[1],王少敏[2],宋东奎[1,3,4] (450052 郑州,郑州大学:第一附属医院泌尿外科[1],化学系质谱实验室[2],肿瘤分子外科研究所[3];河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室[4])

[摘要] **目的** 探讨尿中7种修饰核苷M1A、ac4C、A、06-MeG、MTA、1-MeI、1-MeG检测在膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma,BTCC)诊断及预测预后中的意义。**方法** 选取经病理证实为膀胱移行细胞癌患者45例为膀胱癌组,其中初发32例,复发13例;组织学分级:Ⅰ级22例,Ⅱ级16例,Ⅲ级7例;浸润性癌16例,非浸润癌29例。选取16例正常人为对照组。应用高效液相色谱/电喷雾-四极杆-飞行时间质谱技术(HPLC/ESI-Q-TOF-MS)检测膀胱癌组和对照组尿液中M1A、ac4C、A、06-MeG、MTA、1-MeI、1-MeG 7种修饰核苷水平(核苷含量/肌酐)。**结果** BTCC组尿液M1A、ac4C、06-MeG和1-MeI水平[分别为(4.61±1.82)、(0.63±0.29)、(0.46±0.35)和(12.28±9.74)],均显著高于对照组[(2.85±0.68)、(0.35±0.15)、(0.21±0.11)和(5.39±2.41),$P<0.01$];诊断准确度由大到小为1-MeI>M1A>ac4C>06-MeG,且1-MeI与M1A联合检测可达到对膀胱癌最高的灵敏度和特异性,分别为92.45%和87.50%。BTCC组织学分级之间以及浸润性与非浸润性之间尿液修饰核苷水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。复发患者尿液M1A和ac4C水平分别为(6.74±1.23)、(0.83±0.41),均显著性高于初发患者[(3.93±1.43)、(0.57±0.20),$P<0.05$],M1A与其复发时间呈负相关($r=-0.895$,$P<0.01$)。**结论** 尿液M1A联合1-MeI检测在膀胱移行细胞癌诊断中意义重大,M1A和ac4C有助于预测膀胱移行细胞癌患者预后。

[关键词] 膀胱移行细胞癌;修饰核苷;高效液相色谱/电喷雾-四极杆-飞行时间质谱技术
[中图法分类号] R730.43;R737.14 [文献标志码] A

Significance of urine modified nucleoside levels in diagnosis and prognosis of bladder transitional cell carcinoma

Wu Hui[1], Liu Hongmin[2], Yang Songpeng[1], Wang Qingwei[1], Zhang Yurui[1], Yuan Pu[1], Yi Qiang[1], Liu Gang[1], Wang Shaomin[2], Song Dongkui[1,3,4] ([1]Department of Urology, First Affiliated Hospital, [2]Laboratory of Mass Spectrometry Faculty of Chemistry, [3]Institute of Molecular Cancer Surgery, [4]Open Key Clinical Medical Experimental Laboratory Institute of Henan Province, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the significance of the levels of modified nucleosides M1A, ac4C, A, 06-MeG, MTA, 1-MeI, and 1-MeG in urine in the diagnosis and prognosis of bladder transitional cell carcinoma (BTCC). **Methods** We enrolled 45 patients with BTCC confirmed by pathological examination as a BTCC group and 16 healthy volunteers as a control group. The 45 patients (32 primary cases and 13 recurrent cases) included 22 cases of histological grade Ⅰ, 16 of histological grade Ⅱ, and 7 of histological grade Ⅲ, with 16 cases of invasive carcinoma and 29 of noninvasive carcinoma. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC/ESI-Q-TOF-MS) was used to measure the levels of M1A, ac4C, A, 06-MeG, MTA, 1-MeI, and 1-MeG in the urine of the BTCC group and control group, indicated by the concentration ratio of the nucleosides to creatinine. **Results** The levels of M1A, ac4C, 06-MeG, and 1-MeI in the urine of the BTCC group were 4.61±1.82, 0.63±0.29, 0.46±0.35, and 12.28±9.74, respectively, significantly higher than those of the control group (2.85±0.68, 0.35±0.15, 0.21±0.11, and 5.39±2.41, respectively) ($P<0.05$). The urine 1-MeI level was the most accurate indicator for diagnosing BTCC, followed by M1A, ac4C, and 06-MeG. A combination of urine M1A and 1-MeI levels had the highest sensitivity (92.45%) and the highest specificity (87.50%) for diagnosing BTCC. There was no significant differences in the urine modified nucleoside levels among the patients of histological grade Ⅰ,

[基金项目] 河南省科技攻关项目(72102310106)
[通信作者] 宋东奎, E-mail: dksong@zzu.edu.cn

Ⅱ, and Ⅲ and between the patients with invasive and noninvasive carcinoma. The levels of M1A and ac4C in the urine from the recurrent patients were 6.74 ± 1.23 and 0.83 ± 0.41, significantly higher than those from the primary patients (3.92 ± 1.43 and 0.57 ± 0.20) ($P < 0.05$). The urine M1A level was negatively correlated with the recurrent time ($r = -0.895$, $P < 0.01$). **Conclusion** A combination of urine M1A and 1-MeI levels is of great importance for the diagnosis of BTCC. The urine M1A and ac4C levels are conducive to the prognosis of BTCC.

[**Key words**] transitional cell carcinoma of bladder; urinary modified nucleosides; HPLC/ESI-Q-TOF-MS

Supported by the Tackling Program of Sci & Tech Research of Henan(72102310106). Corresponding author: Song Dongkui, E-mail: dksong@zzu.edu.cn

膀胱癌是泌尿系统最常见的肿瘤,其中移行上皮细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)占94%,初次治疗后5年复发率高达50%~90%,约20%最终行膀胱全切术,致使患者生活质量显著下降;如何早期诊断与筛查以及有效预测其复发是目前迫切需要解决问题。研究表明尿液修饰核苷含量能够反映机体细胞RNA的代谢速率及细胞增殖状况,特别是肿瘤细胞中tRNA的修饰酶活性增高,可导致肿瘤特异性的tRNA高度修饰,使异常tRNA不能正常降解代谢和磷酸酯酯化再利用,导致尿液修饰核苷水平显著增高[1-2]。目前已有文献报道尿液修饰核苷可用于多种肿瘤的诊断,且与其诊断、病情监测、疗效和预后密切相关,并具有取材方便、无创和受外界因素影响小等优点,越来越受到重视[3-5]。本研究对膀胱癌患者尿液修饰核苷检测,以筛查其分子标记物,为临床诊断和评估预后提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取郑州大学第一附属医院2009年7月至2010年3月经检查证实为BTCC住院患者45例为BTCC组,其中,男性40例,女性5例,年龄45~83(63±8)岁,其中初发32例;复发13例;依据1999年提出的BUTT分级、分期方法:Ⅰ级22例,Ⅱ级16例,Ⅲ级7例;浸润性癌16例,非浸润癌29例[6];初发32例,复发患者13例,复发时间(7.85±4.67)个月。排除标本为内分泌异常、酗酒、泌尿系感染和肾功能不全的患者,因以上因素也可影响RNA的代谢[7]。选取我院体检科体检结果正常的16例志愿者为对照组,其中男性8例,女性8例,年龄50~70(58±4)岁。BTCC组患者进行术前采集尿样,而对照组采集尿样。所有尿液标本采集后立即进行预处理,然后进行核苷与肌酐值测定。

1.2 仪器与试剂

Alliance HPLC系统(美国Waters公司):①2695分离单元,②2996光电二极管阵列检测器;Micromass Q-TOF Micro™高分辨质谱仪(美国Waters公司);Waters Masslynx™4.0软件系统;Oasis® HLB萃取柱(美国Waters公司);TGL-16G台式离心机(上海,安亭仪器厂);检测尿液核苷标样购自Sigma公司(标样,美国),分别为1-甲基腺苷(M1A)、N^4-乙酰胞苷(ac4C)、腺嘌呤核苷(A)、06-甲基鸟苷(06-MeG)、5′-脱氧-5′-甲基硫代腺苷(MTA)、1-甲基次黄苷(1-MeI)和1-甲基鸟苷(1-MeG);甲醇(色谱纯,美国,Baker公司);乙醇、氨水、乙酸铵和磷酸二氢钾均为分析纯样品;Mili-Q超纯水。

1.3 方法

1.3.1 尿样预处理 样品收集后冻存于-20 ℃冰箱,测定前室温下解冻。调节pH为9.5左右,12 000 r/min的转速下离心15 min,取上清液1 ml,加入0.30 mmol的内标6Cl-G上样过固相萃取柱,收集流出液。

1.3.2 尿中核苷与肌酐值测定 HPLC在线系统测定尿中核苷浓度;HPLC法测定核苷含量,使用C18柱分离尿核苷;均使用内标法定量。

1.3.3 肌酐值的测定 紫外分光光度法测尿样中肌酐含量。以随机尿样为研究对象,以核苷与肌酐浓度比值[nmol/(μmol creatinine)]为研究指标,反映尿中核苷的水平[8]。

1.3.4 核苷定性与定量 采用峰识别方法测定。将待检尿样未知峰的出峰时间与核苷标准样品的出峰时间对照,可识别尿中多种核苷,不同浓度核苷标准样品浓度与内标的比值建立工作曲线,通过建立核苷标准品的工作曲线推算出尿中核苷浓度。7种修饰核苷的标准曲线的线性关系和最低检测限见表1。其线性回归方程:y = ax + b,a为斜率;b为截距。

表1 7种修饰核苷的标准曲线数据和最低检测限

修饰核苷	线性方程		线性度	定量范围	最低检测度
	斜率	截距	(R^2)	(nmol/ml)	(nmol/ml)
1-甲基腺苷	0.127 2	0.182 7	0.999 8	0.44~222.33	0.23
N^4-乙酰胞苷	0.046 5	-0.021 0	0.999 7	0.12~60.45	0.06
腺嘌呤核苷	0.197 6	-0.024 0	0.999 8	0.18~42.08	0.03
06-甲基鸟苷	0.161 0	0.112 1	0.999 3	0.10~54.42	0.03
5′-脱氧-5′-甲基硫代腺苷	0.363 1	0.095 0	0.999 2	0.08~42.08	0.70
1-甲基次黄苷	0.019 1	0.004 3	0.999 5	0.24~123.99	0.26
1-甲基鸟苷	0.103 5	0.077 9	0.999 8	0.13~65.29	

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行两随机样本t检验和Pearson相关分析;核苷对膀胱癌检测的准确性(敏感度和特异度的综合分析)通过绘制受试者工作特性曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)进行比较。

2 结果

2.1 BTCC尿液修饰核苷分子标记物筛查

BTCC和对照组尿液修饰核苷水平见表2。BTCC组M1A、ac4C、06-MeG、1-MeI水平都显著高于对照组($P<0.01$)。M1A、ac4C、06-MeG和1-MeI对BTCC诊断的准确性见图1,其ROC曲线下面积分别为0.854、0.849、0.757和0.869,诊断价值从大到小依次为1-MeI、M1A、ac4C和06-MeG。这4种核苷联合检测在BUTT诊断中的敏感性和特异性比较见表3。以超过正常组$\bar{x}\pm s$为阳性界值,按照准确性由高到低的顺序每次增加1种核苷,1种核苷浓度大于正常范围即定为阳性病例,进行并联统计分析。1-MeI与M1A联用检验可达到最高的敏感性(92.45%)和特异度(87.50%)。

2.2 BTCC尿液修饰核苷水平与其生物学行为相关性分析

BTCC组尿液修饰核苷水平与其生物学行为相关性见表4。复发者M1A和ac4C水平显著高于初发者,且M1A的含量与复发时间呈负相关($r=-0.895$,$P<0.01$);但组织学Ⅰ、Ⅱ级和Ⅲ级以及浸润性与非浸润性之间尿液修饰核苷水平差异无统计学意义($P>0.05$)。

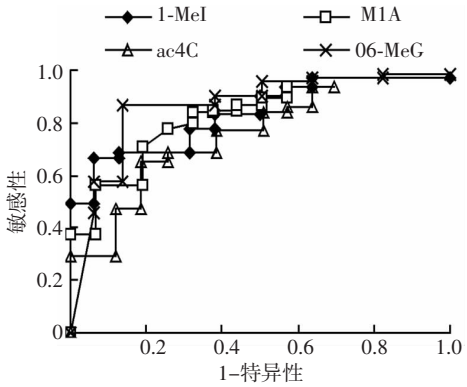


图1 4种修饰核苷检测膀胱癌的准确性

表3 4种检测方案在BUTT诊断中的敏感性及特异性

	1-MeI	2种联合	3种联合	4种联合
敏感性	84.91%	92.45%	96.23%	98.22%
χ^2	2.96	5.43	0.27	2.96
P	0.085	0.020	0.606	0.085
特异性	87.50%	87.50%	56.20%	43.75%
χ^2			1.78	1.41
P			0.182	0.236

3 讨论

目前早期诊断和有效预测BTCC复发风险仍存在困难。研究表明BTCC术后复发率高,且约35%浅表性膀胱癌在复发时分期分级将会提高,其中10%~20%复发患者转变成浸润性癌[9]。膀胱镜检查及活检仍是目前膀胱癌诊断和随访的金标准,但患者感到很痛苦且不易早期发现肿瘤[10]。尿细胞学检查能直接识别尿中脱落的肿瘤细胞,对诊断膀胱癌的特异性很高,但敏感性较低。荧光原位杂交技术对膀胱癌诊断有较高的敏感性,但对尿液标本收集要求较高,且价格昂贵,临床不宜推广[11]。修饰核苷作为非常有潜力的肿瘤标记物已发现对多种肿瘤的诊断、病情监测以及了解疗效和预后起到积极作用[4,7-8],因其取材方便,对受检者无损伤,易多次取样,且修饰核苷为小分子有机化合物,不容易变形、破坏,样本容易保存等优点[12],而目前对膀胱癌肿瘤标志物多为基因产物,以蛋白质为主,易受到酶类的破坏,不易保存,且准确性低于修饰核苷[13-14]。除了婴儿和孕妇外,正常成年人修饰核苷排放稳定,几乎不受性别、年龄、饮食的影响。但尿液修饰核苷检查能否作为BTCC早期诊断和有效预测BTCC复发风险的分子标记物还不清楚。

表2 BTCC组和对照组尿液修饰核苷水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	M1A/cre	ac4C/cre	A/cre	06-MeG/cre	MTA/cre	1-MeI/cre	1-MeG/cre
对照组	16	2.85±0.68	0.35±0.15	0.93±0.48	0.21±0.11	0.16±0.06	5.39±2.41	1.37±0.81
BTCC组	45	4.61±1.82	0.63±0.29	0.86±0.47	0.46±0.35	0.24±0.20	12.28±9.74	2.38±2.93
t		5.799	3.679	0.234	3.565	1.053	4.692	1.307
P		0.000	0.000	0.861	0.001	0.296	0.000	0.175

表4 BTCC组尿液修饰核苷水平与其生物学行为相关性

项目	M1A/cre	ac4C/cre	A/cre	06-MeG/cre	MTA/cre	1-MeI/cre	1-MeG/cre
病理分级							
Ⅰ级	5.12±2.00	0.67±0.39	1.12±2.50	0.66±0.71	0.31±0.43	18.20±15.11	3.01±5.30
Ⅱ级	4.70±1.73	0.62±0.22	1.12±0.85	0.42±0.16	0.20±0.08	14.22±7.69	2.31±1.02
Ⅲ级	5.27±2.15	0.59±0.13	0.66±0.53	0.56±0.42	0.16±0.10	10.82±5.78	1.80±0.82
浸润与否							
浸润性	4.80±1.53	0.61±0.24	0.35±0.50	0.37±0.11	0.14±0.12	9.30±6.28	1.73±1.10
非浸润性	4.74±1.98	0.62±0.26	1.10±1.66	0.55±0.52	0.25±0.32	14.12±11.98	2.78±4.02
初发与复发							
初发	3.92±1.43[a]	0.57±0.20[a]	1.52±2.28	0.41±0.21	0.16±0.10	18.03±15.60	1.90±1.12
复发	6.74±1.23	0.83±0.41	0.62±0.71	0.76±0.76	0.31±0.46	11.14±6.55	4.40±5.55

a: $P<0.01$,与复发比较

作者研究发现BTCC患者尿液M1A、ac4C、06-MeG、1-MeI的水平显著高于正常人,有文献报道多种肿瘤患者尿液修饰核苷水平显著高于正常人,其中就包括M1A、ac4C、06-MeG、1-MeI。这可能是因为肿瘤具有基因表达的不稳定性,发生了某些酶的缺失或活性改变,导致其代谢产物出现大量修饰核苷[15],M1A、1-MeI、06-MeG分别是由A、I、G经tRNA甲基化酶催化转变而成,研究[4]表明BTCC中tRNA甲基化酶的活性增高,从而引起了尿中M1A、1-MeI、06-MeG水平的增高;BTCC患者中NAT缺失[16],导致ac4C在膀胱癌患者尿液中水平增高。因此,本研究提示尿液修饰核苷水平检测可作为膀胱移行细胞癌的诊断肿瘤标志物。

通过绘制受试者ROC分析发现1-MeI对BTCC诊断的准确性最高,提示1-MeI可作为BTCC首选的肿瘤标志物,选择M1A与1-MeI联合检测效果时可取得极高的灵敏度(92.45%)同时又不降低特异度(87.50%),而FISH检查膀胱癌的敏感性为81%,特异性为85%,而尿脱落细胞学的敏感性为65%,特异性为76%[11]。可见尿液修饰核苷水平检测是一种很好的诊断膀胱癌的非侵犯性技术。

作者进一步研究发现病理不同分级之间、浸润性和非浸润性之间尿液修饰核苷水平并无明显差别,这与文献[17]报道的结果相一致,目前并未找到对这种情况的合理解释。但作者发现复发患者的M1A和ac4C的含量明显高于初发患者,其中M1A与复发时间呈负相关。原因可能为BTCC复发时,肿瘤细胞增殖,核酸代谢及蛋白合成速度更快,具有高度修饰作用的tRNA修饰酶含量更多,而且复发时间越短,另一方面,ac4C水平的升高可能与T淋巴细胞的功能异常在内的细胞免疫机制的异常有关[18]。这为我们提供了一种对膀胱癌复发进行监测、诊断的新方法,并对复发患者的临床治疗有重要的指导意义。

综上所述,BTCC患者尿液中M1A、ac4C、06-MeG和1-MeI水平可作为BTCC的诊断标志物,M1A与1-MeI联合检测时可获得较高的灵敏度和特异度;同时,通过检测尿液M1A和ac4C有助于预测其复发风险。但本研究样本例数较少和未检测全部的修饰核苷;术后至复发期间的尿液修饰核苷水平的跟踪检测也是以后研究的重点,以便更系统的了解尿液修饰核苷水平与BTCC预后及复发的关系,并通过检测膀胱良性疾病和其他恶性肿瘤患者的尿液修饰核苷,对膀胱癌进行鉴别诊断。

参考文献:

[1] Liebich H M, Muller-Hagedorn S, Bacher M, *et al*. Age-dependence of urinary normal and modified nucleosides in childhood as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 814(2): 275-283.

[2] Yang J, Xu G, Zheng Y, *et al*. Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 813(1/2): 59-65.

[3] Hsu W Y, Chen W T, Lin W D, *et al*. Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Clin Chim Acta, 2009, 402(1/2): 31-37.

[4] Bullinger D, Frohlich H, Klaus F, *et al*. Bioinformatical evaluation of modified nucleosides as biomedical markers in diagnosis of breast cancer[J]. Anal Chim Acta, 2008, 618(1): 29-34.

[5] La S, Cho J H, Kim J H, *et al*. Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from thyroid cancer patients[J]. Anal Chim Acta, 2003, 486(2): 171-182.

[6] 夏同礼. 尿路上皮肿瘤病理[M]//吴阶平. 吴阶平泌尿外科学. 济南:山东科学技术出版社, 2004: 945-953.

[7] Seidel A, Brunner S, Seidel P, *et al*. Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control[J]. Br J Cancer, 2006, 94(11): 1726-1733.

[8] Li H Y, Wang S M, Liu H M, *et al*. Separation and identification of purine nucleosides in the urine of patients with malignant cancer by reverse phase liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2009, 44(5): 641-651.

[9] Lee R, Droller M J. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy[J]. Urol Clin North Am, 2000, 27(1): 1-13, vii.

[10] 杨庆, 毛全宗, 纪志刚. 膀胱癌尿液肿瘤标记物研究现状及进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(4): 285-287.

[11] 汪广杰, 张晓莉, 陈志文, 等. 荧光原位杂交技术在膀胱癌诊断中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(14): 1911-1914.

[12] 冯波, 郑民华, 朱正纲, 等. RNA修饰核苷作为肿瘤标志物的应用[J]. 诊断学理论与实践, 2005, 4(3): 240-243.

[13] 蓝建华, 王德林, 杨宗珂, 等. 膀胱移行细胞癌中整合素连接激酶的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(13): 1243-1245.

[14] 梁平, 靳风烁, 吴刚, 等. COX-2和EGFR在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 857-859.

[15] Barraud P, Golinelli-Pimpaneau B, Atmanene C, *et al*. Crystal structure of Thermus thermophilus tRNA m1A 58 methyltransferase and biophysical characterization of its interaction with tRNA[J]. J Mol Biol, 2008, 377(2): 535-550.

[16] 阴正坤, 宋东奎, 张莉蓉. N-乙酰基转移酶2基因多态性与膀胱癌遗传易感性关系的研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2006, 27(4): 231-234.

[17] 冯璐, 李梅, 裴笑月, 等. 尿中5种修饰核苷用于肺癌高危人群筛查分子标志物的可行性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(1): 35-38.

[18] 王文昭, 赵欣捷, 李响, 等. 尿中修饰核苷代谢轮廓分析在肺癌诊断中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 738-741.

(**收稿**:2010-03-04;**修回**:2010-04-24)

(编辑 汪勤俭)