

综 述

尿液膀胱癌相关肿瘤标记物研究进展

雷婷 张曼

作者单位:100083 北京市,北京世纪坛医院检验中心

通讯作者:张曼, E-mail: mzhang62@yahoo.cn

肿瘤标记物是肿瘤组织和细胞由于癌基因及其产物的表达而产生的抗原和其他生物活性物质,可以在肿瘤患者的组织、体液和排泄物中检出,但在正常组织和良性疾病不产生或产生甚微。膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,在尿路上皮系统发病率和复发率最高(治愈后5~15年内的复发率高达60%~85%),约20%可进展为浸润性肿瘤^[1,2],因此早期发现膀胱肿瘤对其治疗及愈后十分重要。目前膀胱癌的传统诊断和随诊方法是膀胱镜检、活检及尿细胞学检查,前两者为诊断膀胱癌的金标准,但其为有创性检查,技术要求高,使用不方便;后者虽特异性较高,但敏感性低,仅35%。因此,寻找一种非侵入性、高灵敏度、高特异性以及操作简便的尿液膀胱肿瘤标志物已成为国内外学者研究的热门。本实验室也加入了国际研究的行列,取得了一些研究成果^[3-6]。因此,本文就国内外在尿液肿瘤标记物检测膀胱癌方面的研究进展,即从尿液膀胱癌细胞相关性肿瘤标记物和尿液膀胱癌可溶性肿瘤标记物两方面做一综述。

1 尿液膀胱癌细胞相关性肿瘤标记物

尿液膀胱癌细胞相关性肿瘤标记物检测是指通过检查尿液脱落细胞中与膀胱癌相关的物质或抗原。临床用来筛选、检测、监测膀胱癌及其复发。

1.1 微小染色体维持蛋白5 (minichromosome maintenance proteins 5, MCM5) MCM家族是由6个亚单位组成的戒指状环形结构的六聚体复合物,是DNA复制起始和延伸的重要因子。MCM5是MCM中的6个亚单位之一,通过检测MCM5可以直接反应MCM的水平。张曼^[3]等通过反转录巢式聚合酶链反应、免疫组化技术检测MCM5 mRNA在膀胱癌患者尿脱落细胞中的表达水平,探讨其作为膀胱癌肿瘤标记物的可行性,发现MCM5基因表达量在G1、G2、G3期间差异有统计学意义($P<0.01$)。因此,MCM5基因作为早期诊断、监测术后复发膀胱癌的标志物具有一定的临床意义及发展前景。

1.2 细胞分裂周期蛋白基因6 (cell division cycle 6, CDC6) CDC6是DNA复制起始和延伸的首要因子,确保细胞在一个细胞周期中只复制一次。肿瘤细胞是恶性增殖细胞,在无序

增殖的同时伴随着DNA复制,因而在肿瘤细胞中存在高表达的CDC6蛋白。张曼^[4]等以膀胱癌细胞株为标本通过RT-PCR获得了目的基因CDC6 mRNA的相对表达量。安成^[5]等报道在尿液中检测CDC6蛋白基因可达到筛查膀胱癌的目的。

1.3 3、7、17号染色体数目异常和9号短臂缺失 Sandberg在1994年对泌尿系肿瘤染色体的研究认为,膀胱癌易发生非随机的染色体改变,包括3、9、7、10、11、Y、1、8、17、15号染色体。美国Vysis公司生产的UroVysionTM试剂盒使用荧光素标记的DNA探针,利用荧光原位杂交技术(FISH)检测尿脱落细胞的3、7、17号染色体的数目异常和(或)9号染色体短臂缺失(9p21),有上述异常的细胞被认为是恶变的膀胱癌细胞,能够区别与炎症反应相关的细胞变化,不仅具有较好的敏感性(80.4%)和特异性(85.3%),且更可预测远期复发。Skacel^[7]等指出膀胱镜阴性而FISH结果“假阳性”可能代表一个早期的基因改变,因为其中一些患者在随后的3~12个月内活检发现了恶性病变。通过检测3、7、9、17染色体畸变诊断膀胱癌的特异性与常规检测尿脱落细胞相当,而敏感性却显著提高,弥补了尿脱落细胞的不足,且能比膀胱镜检查更早发现膀胱癌,其应用前景比较乐观。

1.4 粘蛋白7(mucin 7) mucin是位于上皮细胞表面的一类糖蛋白,具有润滑保护尿路的作用,作为可选择性的上皮屏障结构,在不同的上皮性肿瘤中出现不同的蛋白表型和基因表达,mucin的表达增高与肿瘤的侵袭力、转移力相关,mucin 7是mucin家族中的一种,Okegawa等^[8]利用巢式RT-PCR方法检测65例膀胱癌、15例活检阴性和30例正常对照的尿标本,结果显示敏感性68%、特异性87%,和肿瘤的级、期、大小无显著关联。Retz等^[9]发现特异的mucin 7基因的表达预示着浅表性膀胱癌向侵袭性膀胱癌恶性转化的开始。mucin 7可作为膀胱癌恶性转化的早期诊断和监测指标。

1.5 Lewis X抗原 Lewis X抗原属于Lewis系统,表达于90%膀胱肿瘤细胞和极少量正常上皮细胞的蛋白质脂类细胞表面,属于表面分化抗原,在恶变的细胞表面起抗原调节作

用。Friedrich^[10]等研究显示 Lewis X 的敏感性高达 94.4%, 特异性为 36.9%。联用尿脱落细胞学, 可保持较高的敏感性, 明显增加特异性。

1.6 微卫星 (microsatellite) 微卫星是广泛存在于原核及真核细胞基因组中多形性矩阵串联的 DNA 重复序列 (每对大概 2~4 个碱基)。目前在许多肿瘤中都发现了微卫星异常, 包括杂合性缺失 (LOH) 和微卫星不稳定性 (体细胞微卫星位点的扩增、丢失和缺失)。在膀胱癌中最常见的遗传性改变是 9 号染色体的杂合性缺失, 也见于 4p、8p、9p、11p 和 17p。Frigerio^[11]等发现结合细胞学和杂合性分析对检测原发及复发肿瘤均有高度敏感性。同时, 还发现对 G1、G2 期的敏感性为 72%, G3 期高达 96%, 与传统细胞学检查相比, 微卫星检测不受肿瘤病理分级和分期的影响。但该项检查技术要求高、操作复杂、价格昂贵、易受膀胱炎等因素影响。

1.7 端粒酶 (telomerase) 端粒是染色体末端的重复序列, 用来保护 DNA 复制过程中基因的稳定性, 细胞的每一次分裂都会有端粒的缺失从而引起染色体的不稳定和细胞凋亡。在膀胱癌的细胞里表达有端粒酶, 能够使 DNA 复制过程中的末端端粒再生, 从而阻止细胞凋亡。常用于检测端粒酶的方法是基于 PCR 技术的端粒重复序列扩增 (TRAP) 法。Lokeshwar^[12]等检测端粒酶的敏感性为 70%~100%, 特异性为 60%~70%。Melissourgos^[13]等通过检测 146 例膀胱癌患者中的端粒酶的催化亚单位-人端粒酶逆转录酶 (hTERT), 检出 134 例阳性 (敏感性 92%), 而细胞学仅检出 64 例 (敏感性 44%); 对低度恶性肿瘤的检出率高达 93% (对比 28%)。Glas^[14]等在一篇系统综述里提出, 与其他肿瘤标记物相比, 端粒酶有最高的敏感性 (75%), 但特异性低, 易受炎症、年龄和尿液环境的影响。

1.8 癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) CEA 是主要存在于直肠、结肠癌组织和胚胎肠粘膜上的一种糖蛋白抗原, 目前经 FDA 批准用于临床检测的主要是免疫细胞荧光实验, 利用单克隆抗体 19A211、M344 和 LQD10 识别尿脱落肿瘤细胞表面的抗原物质。Toma^[15]等对 126 例患者研究显示免疫细胞荧光实验总敏感性为 78.3%, 特异性为 73.8%, 其中 G1~G3 级病变的敏感性分别为 85.7%、73.9% 和 83.3%, 对各级膀胱癌均有较高的敏感性。但需要长期严格的质量控制和经过培训、经验丰富的操作者。

2 尿液膀胱癌可溶性肿瘤标记物

尿液膀胱癌可溶性肿瘤标记物检测方法是指通过检测肿瘤细胞分泌、脱落或宿主对体内新生物反应而产生并进入尿液的物质。临床用来筛选、检测、监测膀胱癌及其复发。

2.1 膀胱特异性核基质蛋白 (BLCA-4 和 BLCA-1) Konety^[16]等报道从膀胱癌细胞中可分离出 9 种 NMP, 其中 6 种是膀胱癌特异核基质蛋白, 研究最多的是 BLCA-4。过度表

达的 BLCA-4 能提高细胞的生长速度, 从而引起细胞表达过多的致肿瘤基因型。利用 ELISA 法分析 BLCA-4 敏感性在 89%~96%, 特异性在 95%~100%。BLCA-1 是另外一种核基质蛋白, 在一项 25 个病例和 46 个对照的实验中其敏感性为 80%, 特异性为 87%^[17], 仍需要大规模的实验数据来进一步验证其敏感性和特异性。

2.2 膀胱肿瘤抗原 (bladder tumor antigen, BTA) 基底膜是阻止癌细胞侵犯邻近组织的屏障, 当膀胱粘膜上皮癌变时, 癌细胞分泌蛋白水解酶将基底膜降解, 进入尿液后形成独特的基底膜复合物, 即 BTA。BTA 试验是利用乳胶凝集反应来检测 BTA。目前常用的 BTA-stat 和 BTA-TRAK 是 BTA 检测的改进方法, 用来检测单克隆抗体检测尿液中人补体因子 H 相关蛋白。von Rhijn^[18]等人报道 BTA-stat 和 BTA-TRAK 的中位敏感性分别为 70% 和 69%, 比细胞学稍高, 特异性低。Mahnert B^[19]和 Khaled HM^[20]等人报道 BTA-stat 对低度恶性的膀胱肿瘤敏感性低, 约 13%~55%, 对 G2、G3 期的敏感性较高, 分别为 36%~67% 和 63%~90%。BTA-TRAK 的敏感性也随着肿瘤恶性程度及分期不同而变化。BTA 检测会因尿路感染、结石、肾炎、前列腺增生等良性泌尿系疾病呈现假阳性。

2.3 细胞角蛋白 (cytokeratins, CK) CK 是上皮细胞中间丝的组成成分, 表达水平依赖于上皮类型、分化及恶性程度。上皮组织存在 20 种不同的 CK, 几乎所有上皮细胞在恶性转化过程中均维持其表达量, 因而是上皮来源肿瘤细胞的一种特征性变化。与膀胱癌相关的有 CK8、CK18、CK19 和 CK20。UBC 实验 (urinary bladder cancer test) 用于检测尿液中 CK8 和 CK18 的片段, 敏感性因分期和分级的不同从 35% 到 79% 不等。CYFRA21-1 是 CK19 的可溶性片段, 通过识别 2 株单克隆抗体 BM19-21 和 KS19-1 的双抗体夹心法进行测定, 对 G1 期膀胱癌的敏感性是尿细胞学检查的 3 倍, 并有 71% 和 65% 被尿细胞学检查漏检的初发和复发患者可采用 CK19 检出^[21,22], 对膀胱癌的早期诊断及复发监测有意义。CK20 并不是一个真的可溶性标记物, 它需要对脱落细胞进行处理, 一般采用 RT-PCR, 检测复杂、昂贵, 在许多非恶性疾病甚至健康人群中也会增高。

2.4 生存素 (survivin) survivin 基因定位于 17q25, 是近年来发现的 8 个调节凋亡的蛋白家族成员之一, 在胎儿的发育过程中有表达, 成人健康组织中检测不到, 但许多肿瘤中丰富表达。survivin 能在膀胱癌尿液中检测到, 并与其复发、分期、预后和死亡率相关^[23]。利用 RT-PCR 技术检测尿液中 survivin 的 mRNA, 敏感性和特异性分别为 63%~94% 和 93%~100%, 操作简单、敏感、非侵入性, 但诊断的稳定性需更大的样本来验证。

2.5 核基质蛋白 22 (nuclear matrix protein 22, NMP22) NMP22 是核有丝分裂装置蛋白的一个亚单位, 分布于细胞有

丝分裂较为活跃的组织,肿瘤细胞有丝分裂旺盛,有报道^[24]指出在某些膀胱癌细胞株其含量为正常尿道上皮的 25 倍以上。Lotan^[25]等人收集了近年来关于肿瘤标记物的文献并对其敏感性和特异性进行比较,指出 NMP22 的平均敏感性为 73%,特异性为 80%。膀胱癌患者尿中 NMP22 水平增高与肿瘤的分级、分期无关,良性泌尿系疾病或其他泌尿系肿瘤患者 NMP22 也有所增高,但明显低于膀胱癌患者。与细胞学相比有更高的敏感性和相似的特异性,操作方法简单,发展前景乐观。

2.6 透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 和透明质酸酶 (hyaluronidase, HAase) HA 为一种葡萄糖氨基聚糖,是真核细胞胞外基质和体液的基本成分。在肿瘤组织,升高的 HA 大部分集中在肿瘤基质中。HAase 是一种降解 HA 的内源性糖苷酶,能促进肿瘤侵袭。目前发现有三种 HAase 基因,诱导膀胱癌的类型是 HYAL1 型。Lokeshwar^[26]等发现抑制膀胱癌细胞表达 HYAL1,会导致细胞生长速率下降 4 倍,意味着肿瘤细胞分裂需要 HYAL1,还指出 HYAL1 在促进肿瘤细胞侵入性中起重要作用,在低度恶性肿瘤中没有发现 HYAL1 的升高。在一些比较研究中,HA 和 HAase 联合检测 (HA-HAase) 敏感性在 83%~94%,特异性在 77%~93%,优于其他肿瘤标记物(包括细胞学)^[27,28]。由此可见,HA-HAase 是一个很有前景且值得深入研究的肿瘤标记物,对低度或高度、低分期或高分期的肿瘤都有较高的敏感性。

3 其他

3.1 生长因子 许多生长因子在文献里都有报道,如表皮生长因子受体、血管上皮生长因子、肿瘤坏死因子、纤维母细胞生长因子受体 3(FGFR3)等。van Oers JM^[29]等人在一项 280 人的病例研究中发现 FGFR3 的变异率在膀胱癌和上尿道肿瘤的发生率相当,并且与低度恶性肿瘤相关。

3.2 蛋白质组学 蛋白质组学是研究蛋白的结构和功能,在研究肿瘤标记物中有重要作用。在人的尿液中能找到许多蛋白质,通过分析特异蛋白或肽的分泌速率的改变,早期预测膀胱癌。有报道^[30]显示其敏感性为 80%,特异性达 90%~97%,但缺乏大的样本量研究。

3.3 DNA 甲基化 肿瘤相关基因启动子 Cp G 岛甲基化状态异常广泛见于肿瘤,有望作为临床肿瘤诊断的分子标记。Eun^[31]等在 118 例膀胱癌样本中发现了 84 例 RUNX3 启动子甲基化,敏感性为 71.2%,并与肿瘤浸润发展、患者预后及总的生存率相关。

4 小结

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和复发率较高,因此早期诊断膀胱肿瘤对其治疗及愈后十分重要。目前临床使用膀胱癌的传统诊断方法具有一定的局限性。因此,寻找一种非侵入性、高灵敏度、高特异性以及操作

简便的尿液膀胱肿瘤标志物已成为国内外学者研究的热点。然而,目前国内研究报道还较少,且有些标志物缺少大样本量的研究。膀胱肿瘤标志物的临床意义及发展前景还需进一步的研究及探讨。

5 参考文献

- 1 Van Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*, 2005, 47: 736-748.
- 2 Kitamura H, Tsukamoto T. Early bladder cancer: concept, diagnosis, and management. *Int J Clin Oncol*, 2006, 11: 28-37.
- 3 张曼, 安成, 白焱, 等. 检测尿脱落细胞中微小染色体维持蛋白 5 基因表达对膀胱癌的意义. *中华检验医学杂志*, 2003, 26: 101-103.
- 4 张曼, 安成, 郝林, 等. 细胞分裂周期蛋白基因 6 半定量检测方法的条件的建立. *中华检验医学杂志*, 2003, 26: 197-199.
- 5 安成, 白焱, 张秀敏, 等. 尿脱落细胞中细胞分裂周期蛋白基因 6 的检测. *中华检验医学杂志*, 2002, 25: 35-37.
- 6 靳胜, 张曼, 张秀敏, 等. 双向电泳技术在筛选膀胱癌特异标志蛋白中的应用. *中华检验医学杂志*, 2006, 29: 445-448.
- 7 Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. *J Urol*, 2003, 169: 2101-2105.
- 8 Okegawa T, Kinjo M, Horie S, et al. Detection of mucin 7 gene expression in exfoliated cells in urine from patients with bladder tumor. *Urology*, 2003, 62: 182-186.
- 9 Retz M, Lehmann J, Roder C, et al. Differential mucin MUC7 gene expression in invasive bladder carcinoma in contrast to uniform MUC1 and MUC2 gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. *Cancer Res*, 1998, 58: 5662-5666.
- 10 Friedrich MG, Hellstern A, Hautmann SH, et al. Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma: a comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against Lewis X and 486p3/12 with the BTA STAT and NMP22 tests. *J Urol*, 2002, 168: 470-474.
- 11 Frigerio S, Padberg BC, Strebel RT, et al. Improved detection of bladder carcinoma cells in voided urine by standardized microsatellite analysis. *Int J Cancer*, 2007, 121: 329-338.
- 12 Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus on bladder tumor markers. *Urology*, 2005, 66: 35-63.
- 13 Melissourgous N, Kastrinakis G, Davilas I. Detection of human telomerase reverse transcriptase mRNA in urine of patients with bladder cancer: evaluation of an emerging tumor marker. *Urology*, 2003, 62:

- 362-367.
- 14 Glas AS, Roos D, Deutekom M, et al. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. *J Urol*, 2003, 169: 1975-1982.
- 15 Toma MI, Friedrich MG, Hautmann SH, et al. Comparison of the ImmunoCyt test and urinary cytology with other urine tests in the detection and surveillance of bladder cancer. *Word J Urol*, 2004, 22: 145-149.
- 16 Konety BR, Nguyen TS, Brenes G, et al. Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J Urol*, 2000, 164: 690-691.
- 17 Meyers-Irvin JM, Landsittel D, Gertzenberg RH. Use of the novel marker BLCA-1 for the detection of bladder cancer. *J Urol*, 2005, 174: 64-68.
- 18 von Rhijn BW, van der Poel HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*, 2005, 47: 736-748.
- 19 Mahnert B, Tauber S, Kriegmair M, et al. BTA-TRAK—a useful diagnostic tool in urinary bladder cancer. *Anticancer Res*, 1999, 19: 2615-2619.
- 20 Khaled HM, Abdel-Salam I, Abdel-Gawad M, et al. Evaluation of the BTA tests for the detection of bilharzial related bladder cancer: the Cairo experience. *Eur Urol*, 2001, 39: 91-94.
- 21 Nisman B, Barak V, Shapiro A, et al. Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma. *Cancer*, 2002, 94: 2914-2922.
- 22 Eissa S, Kassim S, El-Ahmady O. Detection of bladder tumours: role of cytology, morphology-based assays, biochemical and molecular markers. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2003, 15: 395-403.
- 23 Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, et al. Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer*, 2007, 109: 1106-1113.
- 24 Sjakste N, Sjakste T, Vikmanis U. Role of the nuclear matrix proteins in malignant transformation and cancer diagnosis. *Exp Oncol*, 2004, 26: 170-178.
- 25 Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*, 2003, 61: 109-118.
- 26 Lokeshwar V, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res*, 2005, 65: 2243-2250.
- 27 Eissa S, Kassim SK, Labib RA, et al. Detection of bladder carcinoma by combined testing of urine for hyaluronidase and cytokeratin 20 RNAs. *Cancer*, 2005, 103: 1356-1362.
- 28 Hautmann S, Toma M, Lorenzo Gomez MF, et al. Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer: a side-by-side comparison. *Eur Urol*, 2004, 46: 466-471.
- 29 van Oers JM, Zwarthoff EC, Rehman I, et al. FGFR3 Mutations indicate better survival in invasive upper urinary tract and bladder tumours. *Eur Urol*, 2009, 55: 650-657.
- 30 Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, et al. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol*, 2005, 47: 885-894.
- 31 Eun J, Yong J, Pildu J, et al. Methylation of the RUNX3 promoter as a potential prognostic marker for bladder tumor. *J urol*, 2008, 180: 1141-1145.

(收稿日期: 2010-03-21)

(本文编辑: 李霖)

消 息

2011 全国检验医学学术大会会议通知

2011 全国检验医学学术大会暨第九次全国检验医学学术会议和第六届全国临床实验室管理学术会议将于 2011 年 5 月 24 日至 27 日在北京举行。大会由中华医学会检验分会和中国医院协会临床检验管理专业委员会联合举办。该会议是医学检验界两学会第一次合作举办的大型全国学术会议, 将成为建国以来规模最大的检验医学学术交流和医学检验设备展示活动。本次大会学术活动为期两天半, 将举行大会报告、专题报告、技术交流卫星会议及壁报展示交流, 对医学检验各专业学科的发展、研究成果进行交流, 对检验医学和实验室管理所面临新形势和问题进行充分的交流探讨。会议期间还将举办临床实验室设备新技术交流和展览会, 展示国内外最新的检验仪器和设备。希望全国各级临床检验中心、各级医院、妇幼保健院、血站、疾控中心、独立实验室等从事临床检验工作和管理人员积极参与, 前来参会。请有关公司和单位积极报名参加医学检验和设备展览会。

大会组织委员会主席为尚红、陈文祥; 学术委员会负责人为潘柏申、陈文祥, 会务委员会负责人是王治国、孙芾。大会组委会将于近日发布会议具体信息, 敬请关注。

中华医学会检验分会、中国医院协会临床检验专业管理委员会