

• 论 著 •

## 核基质蛋白 22、细胞角质素 20 和存活素 mRNA 对膀胱癌诊断价值的研究

吕天兵

(内江市第一人民医院泌尿外科,四川内江 641000)

**摘要:**目的 探讨核基质蛋白 22(NMP22)、细胞角质素 20(CK20)和存活素 mRNA 在膀胱癌诊断中临床应用价值。方法 选择因血尿和膀胱刺激症状到该院泌尿外科诊治的患者 107 例,分为对照组(44 例)和观察组(63 例)。观察组中按照肿瘤 TNM 分期和 WHO 分级,包括 T1s~T1 44 例,T2~T4 19 例;G1 14 例,G2 31 例,G3 18 例;另外选择 45 例健康志愿者作为健康组。通过 ELISA 方法检测所有志愿者尿液中 NMP22 水平,通过 RT-PCR 方法检测对照组和观察组受试者尿液中 CK20 和存活素 mRNA 表达量,比较这 3 种检测方法的灵敏度和特异度,以评估对膀胱癌诊断的价值。结果 观察组患者尿液中 NMP22 的水平(37.92 U/mL)显著高于健康组(4.31 U/mL)和对照组(7.04 U/mL),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。NMP22 检测指标的灵敏度和特异度分别为 82.54% 和 61.36%,与肿瘤分期和分级无明显相关性;CK20 和存活素 mRNA 检测指标的灵敏度和特异度分别为 83.70%、63.64% 和 85.71%、90.91%,与肿瘤分期有显著的相关性;T2~T4 亚组患者 CK20 和存活素 mRNA 检测灵敏度高于 T1s~T1 亚组患者,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 尿液 NMP22、CK20 和存活素 mRNA 检测对膀胱癌的诊断均有较高的灵敏度和特异度,是诊断膀胱癌较好的无创性手段。

**关键词:**核基质蛋白 22; 细胞角质素 20; 存活素 mRNA; 膀胱癌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2551-03

### The value of nuclear matrix protein 22, cytokeratin 20 and survivin mRNA as diagnostic markers for bladder tumor

LYV Tianbin

(Department of Urology Surgery, the First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the value of nuclear matrix protein 22(NMP22), cytokeratin 20(CK20) and survivin mRNA in the diagnosis of bladder cancer. **Methods** The research enrolled 107 cases with hematuria or irritation sign of bladder, who were divided into the control group(44 cases) and the observed group(63 cases). Besides, 45 health volunteers were chose as the health group. The urine level of NMP22 was detected by ELISA, and CK20 and survivin mRNA by RT-PCR to evaluate the value in the diagnosis of bladder tumor. The sensitivities and specificities of NMP22, CK20 and survivin mRNA were compared and analyzed. **Results** The urine level of NMP22 in the observed group(37.92 U/mL) was obviously higher than that of health volunteers (4.31 U/mL) and the control group(7.04 U/mL). The difference was significant( $P < 0.05$ ). The sensitivity and specificity of NMP22 were 82.54% and 61.36% respectively, which was unrelated with the tumor stage. The sensitivities and specificities of CK20 and survivin mRNA were 83.70%, 63.64% and 85.71%, 90.91% respectively, which was positively related with the tumor stage. The sensitivities of CK20 and survivin mRNA in the T2-T4 subgroup were higher than that T1s-T1 subgroup. And there was statistic difference( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There are significant evidences that the detections of NMP22, CK20 and survivin mRNA as non-invasive measures could be better methods and higher sensitivity and specificity in diagnosing bladder cancer.

**Key words:** nuclear matrix protein 22; cytokeratin 20; survivin mRNA; bladder cancer

目前,膀胱癌是全球范围内最常见的移行上皮细胞癌之一,发病率较高,并且呈逐年上升的趋势<sup>[1-2]</sup>。我国属于膀胱癌的高发地区<sup>[3-4]</sup>。80%以上的膀胱癌属于无浸润的浅表性肿瘤,3年内复发率较高<sup>[5]</sup>。因此早期诊断并对复发进行尽早预测极为重要。目前,临床上通常选择白光膀胱镜检查 and 活组织切片检查作为膀胱癌诊断标准<sup>[6]</sup>。但是组织切片检查灵敏度太低,而膀胱镜检查虽然对膀胱癌的特异度和灵敏度较高,但是属于有创检查,增加患者的痛苦程度,使患者依从性较差。因此,寻找新的肿瘤标志物,尽早确诊临床隐匿性膀胱癌,降低患者检查痛苦,提高膀胱癌诊断水平,对膀胱癌的诊断具有重要的临床价值。本实验采用前瞻性的研究方法,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)、聚合酶链式反应(PCR)、免疫组织化学等技术,对膀胱癌患者进行尿核基质蛋白 22(NMP22)、细胞角质素 20(CK20)和存活素 mRNA 检测,旨在探讨这 3 种肿瘤标志物对膀胱癌诊断的价值。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究随机选取 2012 年 1 月至 2016 年 6 月期间因血尿或膀胱刺激症状到本院泌尿外科住院诊疗的患者 107 例,其中男 72 例,女 35 例,年龄 35~75 岁,平均(55.81±14.22)岁。另选取 45 例健康志愿者的尿液样本为健康组,其中男 30 例,女 15 例,年龄 36~77 岁,平均(57.36±17.01)岁。经膀胱镜检查联合病理活检,将受试患者分为观察组和对照组。其中观察组患者 63 例,均确诊为膀胱移行细胞癌。按照肿瘤 TNM 分期:T1s~T1 44 例,T2~T4 19 例;按 WHO 分级:G1 14 例,G2 31 例,G3 18 例。对照组为 44 例泌尿系统良性疾病患者,其中包括尿路感染 11 例,膀胱癌术后复查患者 6 例,尿路结石 9 例,尿道狭窄 5 例,良性前列腺增生 7 例,前列腺癌 2 例,肾小球肾炎 3 例,肾癌 1 例。

### 1.2 样本采集

**1.2.1 尿液样本采集** 在膀胱镜检查前采集晨尿或自排尿约

300 mL, 分别用于尿细胞学、NMP22 检测、以及 CK20 和存活素 mRNA 检测。

**1.2.2 组织样本采集** 于开放式手术过程中选取膀胱癌组织样本, 正常膀胱组织样本取自因车祸死亡的死者膀胱黏膜, 置于一 70 °C 低温保存, 用于 CK20 和存活素 mRNA 检测。

**1.3 方法**

**1.3.1 NMP22 检测** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行 NMP22 检测, 试剂盒由美国 Matritech 生物技术有限公司提供; 按照试剂盒说明书进行操作, 10 U/mL 为阳性检测限。

**1.3.2 CK20 和存活素 mRNA 检测** 进行 RT-PCR 检测, 提取总 RNA 后, 进行 RT-PCR; 试剂盒由美国 Promega 生物技术有限公司提供。

**1.4 结果判断** (1)尿细胞学检查以发现肿瘤细胞为阳性; (2)尿液 NMP22 以浓度大于 10 U/mL 为阳性; (3)CK20 和存活素 mRNA 以 RT-PCR 产物电泳出现 370 和 279 bp 条带为阳性。

**1.5 统计学处理** 本资料采用 SPSS17.0 统计学软件进行处理; 符合正态分布的计量资料采用 *t* 检验进行两组间的数据比较, 非正态分布采用秩和检验; 计数资料以百分比表示, 采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 3 种诊断方法的病例分布** 所有受试者经 ELISA 和 RT-PCR 方法检测 NMP22、CK20 和存活素 mRNA 后, 病例分布见表 1。对照组检查出现假阳性结果分析见表 2。

**表 1 3 种诊断方法的病例分布(n)**

| 组别  | n  | NMP22(U/mL) |     | CK20 |    | 存活素 mRNA |    |
|-----|----|-------------|-----|------|----|----------|----|
|     |    | ≥10         | <10 | +    | -  | +        | -  |
| 对照组 | 44 | 17          | 27  | 16   | 28 | 4        | 40 |
| 观察组 | 63 | 52          | 11  | 55   | 8  | 54       | 9  |

**表 2 对照组患者假阳性病例分布(n)**

| 诊断      | n  | NMP22 | CK20 | 存活素 mRNA |
|---------|----|-------|------|----------|
| 尿路感染    | 11 | 6     | 6    | 1        |
| 膀胱癌术后复查 | 6  | 4     | 3    | 2        |
| 尿路结石    | 9  | 3     | 2    | 0        |
| 尿道狭窄    | 5  | 0     | 1    | 0        |
| 良性前列腺增生 | 7  | 0     | 1    | 0        |
| 前列腺癌    | 2  | 2     | 1    | 1        |
| 肾小球肾炎   | 3  | 1     | 1    | 0        |
| 肾癌      | 1  | 1     | 1    | 0        |

**2.2 NMP22 检测结果分析** 健康组、对照组和观察组 NMP22 水平中位值分别为 4.31(1.47~9.01) U/mL、7.04(1.39~117.66) U/mL 和 37.92(1.83~411.53) U/mL。观察组患者尿液中 NMP22 的水平明显高于健康组和对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3。NMP22 检测指标的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 82.54%、61.36%、75.36%、71.05%。

**表 3 所有受试者尿液 NMP22 水平检测结果**

| 组别  | n  | NMP22 范围(U/mL) | NMP22 中位值(U/mL) |
|-----|----|----------------|-----------------|
| 健康组 | 45 | 1.47~9.01      | 4.31*           |
| 对照组 | 44 | 1.39~117.66    | 7.04*           |
| 观察组 | 63 | 1.83~411.53    | 37.92           |

注:与观察组比较, \*  $P < 0.05$ 。

**2.3 CK20 和存活素 mRNA 检测结果分析** CK20 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和阳性可能性比分别为 83.70%、63.64%、77.46%、77.78%、2.28。存活素 mRNA 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和阳性似然比分别为 85.71%、90.91%、93.10%、81.63%、9.43%。

**2.4 NMP22、CK20 和存活素 mRNA 检测结果与肿瘤分期、分级的关系** 研究结果显示, NMP22 检测阳性率与肿瘤分期、分级无明显关系, 但是 CK20 和存活素 mRNA 检测阳性率与肿瘤分期有显著的相关性, T2~T4 亚组患者 CK20 和存活素 mRNA 检测阳性率高于 T1s~T1 亚组患者, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 4。

**表 4 NMP22、CK20 和存活素 mRNA 检测阳性与肿瘤分期、分级的关系[n(%)]**

| 项目        | n  | NMP22     | CK20       | 存活素 mRNA   |
|-----------|----|-----------|------------|------------|
| <b>分期</b> |    |           |            |            |
| T1s~T1    | 44 | 35(79.55) | 36(86.36)* | 35(79.55)* |
| T2~T4     | 19 | 17(89.47) | 19(100.00) | 19(100.00) |
| <b>分级</b> |    |           |            |            |
| G1        | 14 | 10(71.43) | 11(78.57)  | 10(71.43)  |
| G2        | 31 | 27(87.10) | 28(90.32)  | 28(90.32)  |
| G3        | 18 | 15(83.33) | 16(88.89)  | 16(88.89)  |

注:与 T2~T4 亚组比较, \*  $P < 0.05$ 。

**3 讨论**

目前, 临床上诊断膀胱癌的主要手段仍然是膀胱镜检查 and 尿脱落细胞学检查, 膀胱镜+活检是一直膀胱癌早期诊断和随访检测的“金标准”<sup>[5-7]</sup>。但是, 由于膀胱镜检查对患者造成的创伤以及活检的灵敏度低, 使得膀胱癌患者漏检的可能性增加。因此, 寻找高灵敏度、高特异度的检测手段和肿瘤标志物一直是膀胱癌诊断研究的热点。

NMP22 属于核基质蛋白家族的成员, 是细胞核的骨架结构, 维持细胞核的正常形态, 同时参与调控一些重要的细胞活动, 如 DNA 的复制、转录、翻译等<sup>[8-9]</sup>。当细胞发生癌变时, NMP22 合成增加, 在肿瘤细胞凋亡时被释放至尿液中, 采用 ELISA 方法可检测其水平<sup>[10]</sup>。本项研究结果显示, 观察组尿中 NMP22 水平(1.83~411.53 U/mL)明显高于健康组(1.47~9.01 U/mL)和对照组(1.39~117.66 U/mL), 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。据推测, 这可能与膀胱癌患者肿瘤细胞增殖异常活跃, 导致 NMP22 合成增加有关。另外, 研究结果显示, NMP22 检测具有较高的灵敏度和特异度, 分别为 82.54% 和 61.36%。虽然, 对于对照组患者, 会出现 NMP22 检测假阳性的结果, 这可能与尿路损伤、组织坏死、炎性反应等有关, 但是 NMP22 阳性预测值可达到 75.26%, 说明 NMP22 检测可作为膀胱镜检查的辅助手段用于临床。

CK20 是一类中间纤维丝, 分布于上皮细胞, 属于水溶性聚合多肽, 参与上皮细胞的发生、分化和成熟等生理过程<sup>[11]</sup>。CK20 有严格的上皮细胞分布特征, 在非上皮细胞或组织中, CK20 几乎不表达<sup>[12]</sup>。本项研究结果也证实, CK20 检测的灵敏度和特异度分别为 83.70% 和 63.64%, 阳性预测值为 77.46%, 且与肿瘤分级无关, 但是与临床分期密切相关, 对 T1s~T1 亚组患者检测的灵敏度仅为 86.36%, 明显低于 T2~T4 亚组患者检测的灵敏度(100.00%), 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

存活素 mRNA 是最新发现的一类凋亡抑制蛋白家族 (IAP) 成员, 可以促进肿瘤细胞凋亡, 抑制癌细胞过度生长。但与其他家族成员不同的是, 存活素 mRNA 只包含一部分保守的轮状病毒 IAP 重复结构, 而无羧基末端锌指结构<sup>[13]</sup>。存活素 mRNA 主要分布于胚胎及未分化成熟的组织, 多见于肿瘤组织内。多项研究也证实, 存活素 mRNA 的过量表达与膀胱癌密切相关。本研究结果显示, 存活素 mRNA 检测对于膀胱癌诊断的灵敏度和特异度分别高达 85.71% 和 90.91%。同时, 存活素 mRNA 的表达与肿瘤临床分期密切相关, 对 T1s~T1 亚组患者检测的灵敏度仅为 79.55%, 明显低于 T2~T4 亚组患者检测的灵敏度 (100.00%), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明存活素 mRNA 的表达水平随着膀胱癌分化程度的降低而逐渐增高, 明显影响着肿瘤的恶性程度和发展趋势。而且, 本研究结果显示, 存活素 mRNA 的阳性预测值高达 93.10%, 假阳性的概率明显低于 NMP22 和 CK20。存活素 mRNA 检测的阳性似然比为 9.43, 说明存活素 mRNA 可作为膀胱癌诊断的辅助检测指标之一用于临床。

总而言之, NMP22、CK20 和存活素 mRNA 检测都具有较高的灵敏度和特异度, 均可作为膀胱镜检查的辅助手段用于临床, 有助于疾病的早期诊断。

参考文献

[1] Oh JK, Weiderpass E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases [J]. *Ann Glob Health*, 2014, 80(5):384-392.  
 [2] Krabbe LM, Woldu SL, Shariat SF, et al. Improving diagnostic molecular tests to monitor urothelial carcinoma recurrence [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(11):1189-1199.  
 [3] Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Kapila K, et al. Urinary survivin mRNA expression and urinary nuclear matrix protein 22 Bladder Chek R and urine cytology in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Med Princ Pract*, 2012, 21(3):295-297.  
 [4] Lee MH, Thomas JL, Chang YC, et al. Electrochemical

sensing of nuclear matrix protein 22 in urine with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated Zinc oxide nanorod arrays for clinical studies of bladder cancer diagnosis [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 79(21):789-795.

[5] Huber S, Schwentner C, Taeger D, et al. Nuclear matrix protein-22: a prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer, results from the UroScreen study [J]. *BJU Int*, 2012, 110(5):699-708.  
 [6] Keese SK, Briggman JV, Thill G, et al. Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1996, 6(2/3):189-214.  
 [7] Ramos D, Navarro S, Villamón R, et al. Cytokeratin expression patterns in low-grade papillary urothelial neoplasms of the urinary bladder [J]. *Cancer*, 2003, 97(8):1876-1883.  
 [8] Chou R, Gore JL, Buckley D, et al. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Intern Med*, 2015, 163(12):922-931.  
 [9] Dal Moro F, Valotto C, Guttilla A, et al. Urinary markers in the everyday diagnosis of bladder cancer [J]. *Urologia*, 2013, 80(4):265-275.  
 [10] Proctor I, Stoeber K, Williams GH. Biomarkers in bladder cancer [J]. *Histopathology*, 2010, 57(1):1-13.  
 [11] Nawroth R, Weckermann D, Retz M, et al. Prostate and bladder cancer: detection of disseminated tumor cells in bone marrow [J]. *Urologe A*, 2014, 53(4):514-518.  
 [12] Lopez-Beltran A, Marques RC, Montironi R, et al. Dysplasia and carcinoma in situ of the urinary bladder [J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2015, 37(1):29-38.  
 [13] Ku JH, Godoy G, Amiel GE, et al. Urine survivin as a diagnostic biomarker for bladder cancer: a systematic review [J]. *BJU Int*, 2012, 110(5):630-636.

(收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-05-11)

(上接第 2550 页)

[4] 马晓慧. 丙肝患者 HCV-RNA 阳性与自免肝抗体相关性研究 [J]. *中国卫生标准管理*, 2016, 7(11):159-160.  
 [5] 陆绍花, 李娅. 酶联免疫法测抗-HCV-IgG 的 S/CO 比值与 HCV-RNA 及肝功能的相关性研究 [J]. *中国民族民间医药*, 2016, 25(9):82-83.  
 [6] 赵亚娟, 孙孟甜, 杨振丽. HCVAb-IgG 阳性与 HCV-RNA 载量的关系探讨 [J]. *中国实用医药*, 2014, 18(36):93-94.  
 [7] 苏艳玉, 黄秀云. HCV-RNA-PCR 与抗-HCV-IgG 的相关性探讨 [J]. *中国冶金工业医学杂志*, 2014, 31(5):554.  
 [8] 任宪辉, 姚冬杰, 张洋. 丙型肝炎患者 HCV-RNA 感染与血清自身抗体的相关性分析 [J]. *国外医学(医学地理分册)*, 2016, 37(2):131-133.  
 [9] 王江南, 陈秀荣, 李健. ELISA 法检测抗-HCV-IgG 抗体以及 FQ-PCR 检测血清 HCV-RNA 在丙型肝炎诊断中的应用价值 [J]. *广东医学*, 2015, 36(24):3797-3801.  
 [10] Tejada-Strop A, Drobeniuc J, Mixson-Hayden T, et al. Disparate detection outcomes for anti-HCV IgG and

HCV RNA in dried blood spots [J]. *J Virol Methods*, 2015, 212(8):66-70.

[11] Maasoumy B, Cobb B, Bremer B, et al. Detection of low HCV viraemia by repeated HCV RNA testing predicts treatment failure to triple therapy with telaprevir [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 39(1):85-92.  
 [12] Keys R, Leone A, Eron J, et al. Large scale screening of human sera for HCV RNA and GBV-C RNA [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(3):473-477.  
 [13] Galmozzi E, Aghemo A. Nonsynonymous variant Pro70Ser (rs117648444) in IFNL4 gene identifies carriers of the rs368234815 ΔG allele with higher HCV RNA decline during the first 4 weeks of pegylated interferon and ribavirin therapy in HCV-1 patients [J]. *J Clin Virol*, 2014, 59(4):274-275.

(收稿日期: 2017-03-03 修回日期: 2017-05-02)