

膀胱癌患者尿脱落细胞 CK20 的表达及临床诊断意义

韩惟青

(湖南省肿瘤医院腹部外科, 湖南 长沙 410013)

【摘要】 目的 观察尿脱落细胞 CK20 在膀胱癌患者中的表达情况, 探讨其临床价值及意义。方法 采用 RT-PCR 检测方法检测 35 例膀胱癌患者尿脱落细胞 CK20 的表达情况, 并与 30 例非肿瘤疾病患者 CK20 的表达情况进行对比分析。**结果** 35 例膀胱癌患者尿脱落细胞 CK20 mRNA 阳性率为 94.29% (33/35), 而非肿瘤疾病患者阳性率仅为 3.33% (1/30), 两组 CK20 mRNA 阳性率比较差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。RT-PCR 检测法检测尿脱落细胞 CK20 mRNA 的敏感性为 94.26%, 特异性为 96.67%。不同膀胱癌病理分期、分级的尿脱落细胞 CK20 mRNA 表达阳性率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 尿脱落细胞 CK20 在膀胱癌尿液中表达的敏感率及特异性较高, 是目前较为理想的一种膀胱肿瘤标记物, RT-PCR 检测法检测尿脱落细胞中 CK20 有助于膀胱癌的诊断。

【关键词】 膀胱癌; 尿脱落细胞; CK20; RT-PCR 检测法

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)13-1951-03

Expression of CK20 in exfoliated urothelial cells of patients with bladder cancer and its significance in clinical diagnosis. HAN Wei-qing. Department of Abdominal Surgery, Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha 410013, Hunan, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the expression of CK20 in exfoliated urothelial cells of patients with bladder cancer, and to investigate its clinical value and significance. **Methods** RT-PCR method was used to detect the expression of CK20 in exfoliated urothelial cells of 35 patients with bladder cancer (the study group), which were then compared with the expression level in 30 patients without neoplastic diseases (the control group). **Results** The positive rate of CK20 mRNA was 95.29% (33/35) in the study group and 3.33% (1/30) in the control group, with statistically significant difference between the two groups ($P < 0.01$). RT-PCR showed that the CK20 mRNA sensitivity in exfoliated urothelial cells was 94.26%, and the specificity was 96.67%. The positive rate of CK20 mRNA in urine exfoliated cells had no statistically significant difference among different pathological stages and grades of bladder cancer ($P > 0.05$). **Conclusion** CK20 expression in exfoliated urothelial cells of patients with bladder cancer has higher sensitivity and specificity, which is an ideal bladder tumor marker. The detection of CK20 in urine exfoliated cells by RT-PCR assay contributes to bladder cancer diagnosis.

【Key words】 Bladder cancer; Exfoliated urothelial cells; CK20; RT-PCR

膀胱癌是临床常见的一种泌尿系统恶性肿瘤疾病, 其中多数为浅表性移行细胞癌, 临床早期诊断和鉴别是改善患者预后的重要前提。目前, 临床膀胱癌主要以膀胱镜检查 and 活检组织检查为主, 虽有较高的临床诊断价值, 但属于有创性检查, 不宜作为普查项目开展。因此, 寻求一种特异性、敏感性较高且无创的检测方法已成为我们临床工作的重点, 国内外诸多学者已经为寻找膀胱肿瘤标记物进行了大量研究, 发

现细胞角蛋白 20 (CK20) 有较高的组织特异性, 尤其在膀胱癌组织中表现较为明显^[1-2]。这可能与移行细胞癌在生长过程其肿瘤细胞脱落至尿液中有关。为进一步证实尿脱落细胞 CK20 在膀胱癌中的表达情况及诊断价值, 我们采用了逆转录聚合酶链式反应 RT-PCR 方法检测了 CK20 在膀胱癌患者中的表达情况, 与健康正常人尿脱落细胞 CK20 的表达进行了对比分析, 报道如下:

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取 2010 年 6 月至 2011 年 6 月在我院接受治疗的膀胱移行细胞癌患者 35 例为膀胱癌组,其中男性 21 例,女性 14 例;年龄 38~71 岁,平均 59.5 岁。按照 WHO 病理分级:G₁: 11 例;G₂: 16 例;G₃: 8 例。按 TNM 分期:PTa~T1 者 16 例;PT2~T4 者 19 例。选取同期在我院接受治疗的非肿瘤疾病患者 30 例为对照组,其中男性 18 例,女性 12 例;年龄 37~72 岁,平均 58.5 岁;前列腺增生患者 14 例,下尿路结石或感染患者 16 例。两组患者在年龄、性别方面比较差异无统计学意义(P>0.05)。

1.2 研究试剂 RNA 提取试剂盒由北京百泰克生物技术有限公司提供;CK20 上游及下游引物由北京赛百盛公司合成,其碱基序列为:上游引物:5'-CAGACACACGGTGAAGTATGG-3',下游引物:5'-GATCAGCTTCCACTGTTAGACG-3',扩增产物长度 370 bp。RT-PCR RNA 一步样品处理试剂盒由 TaKaRa 大连有限公司合成提供。RT-PCR 试剂盒购于上海 CDEFAE 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 提取 RNA 收集两组患者新鲜晨尿 100 ml,经离心后沉渣,用冷 PBS 对尿沉渣进行两次洗涤,收集脱落细胞,取待检标本 50 μl,按照总 RNA 提取试剂盒按说明书提取尿脱落细胞的总 RNA。

1.3.2 逆转录反应 逆转录反应严格按照 RT-PCR RNA 一步样品处理试剂盒说明书进行,经离心后 37℃ 反转录 60 min,得到 cDNA 后,于 -20℃ 储存。

1.3.3 PCR 扩增 取 cDNA 2 μl 加入 dNTP 1 μl, 10×PCR buffer 6.5 μl,上游引物 5'-CAGACACACGGTGAAGTATGG-3' 1 μl,下游引物 5'-GATCAGCTTCCACTGTTAGACG-3' 1 μl, Taq DNA 聚合酶 0.5 μl 加入甘油至 50 μl,按照 RT-PCR RNA 一步样品处理试剂盒说明书进行如下循环:95℃ 30 s→55℃ 30 s→72℃ 30 s,共 30 个循环,最终以 72℃ 5 min 结束。

1.3.4 琼脂糖凝胶电泳 将 RT-PCR 产物 20 μl 经 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外灯投射仪下观察有无特异性扩增带。若同时出现 370 bp 和 205 bp 内参电泳带则视为 CK20 阳性,若仅出现一条 205 bp 内参电泳带则视为 CK20 阴性。

1.4 观察指标 观察两组患者尿脱落细胞 CK20 RT-PCR 的检测结果,并观察不同膀胱癌病理

分期、分级的表达情况。尿脱落细胞 CK20 敏感性=(膀胱癌 CK20 mRNA 阳性/总例数)×100%;特异性=(非膀胱癌 CK20 mRNA 阴性/总例数)×100%。

1.5 统计学方法 本次研究所得数据均采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计数资料以百分率表示,采用χ²检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者尿脱落细胞 CK20 RT-PCR 检测结果比较 膀胱癌组 35 例膀胱癌患者尿脱落细胞 CK20 mRNA 阳性率为 94.29% (33/35),而非膀胱癌患者的对照组阳性率仅为 3.33% (1/30),两组 CK20 mRNA 阳性率比较差异有显著统计学意义(P<0.01),见表 1。由此可见,RT-PCR 检测法检测尿脱落细胞 CK20 mRNA 的敏感性为 94.26%,特异性为 96.67%。

表 1 两组患者尿脱落细胞 CK20 RT-PCR 检测情况[例(%)]

组别	例数	阳性	阴性	敏感性(%)	特异性(%)
膀胱癌组	35	33 (94.29) ^a	2 (5.71)	94.26	-
对照组	30	1 (3.33)	29 (96.67)	-	96.67

注:^a与对照组比较差异有显著统计学意义(χ²=36.425, P<0.01)。

2.2 不同膀胱癌病理分期、分级的尿脱落细胞 CK20 mRNA 表达情况 35 例患者 G₁、G₂、G₃ 级尿脱落细胞 CK20 mRNA 阳性率分别为 90.91%、93.75%、100%,组间比较差异无统计学意义(P>0.05);PTa~T1 期和 PT2~T4 尿脱落细胞 CK20 mRNA 阳性率分别为 93.75%、94.74%,组间比较差异无统计学意义,表明尿脱落细胞 CK20 mRNA 的表达与分级、分期无关。见表 2。

表 2 不同膀胱癌病理分期、分级的尿脱落细胞 CK20 mRNA 表达情况[例(%)]

分期/分级	类别	例数	阳性(%)	阴性(%)
WHO 分级	G ₁	11	10 (90.91)	1 (9.09)
	G ₂	16	15 (93.75)	1 (6.25)
	G ₃	8	8 (100)	0 (0)
TNM 分期	PTa~T1	16	15 (93.75)	1 (6.25)
	PT2~T4	19	18 (94.74)	1 (5.26)

注:^a与对照组比较差异有显著统计学意义(χ²=36.425, P<0.01)。

3 讨论

膀胱癌是临床常见的一种恶性肿瘤。在我国其发病率占泌尿系统恶性肿瘤的第一位,因膀胱癌早期症状不典型,多数患者在就诊时已属中晚期,治疗预后较差。因此,胰腺癌的早期诊断和治疗是改善预后、提高患者生活质量的关键。膀胱镜检查及病理活

检是筛选和诊断膀胱癌的常用方法,虽临床诊断率较高,但因为是有创性检查,很多无症状患者很难接受。因此,寻求一种无创性、敏感性较高的诊断方法已成为临床工作的重点。

诸多国内外学者为寻求一种特异性细胞已做了大量研究,Moll等^[3]研究首次发现尿脱落细胞CK20具有I型细胞角蛋白的各种特征,不与其他I型细胞角蛋白发生交叉反应,是一种独立的I型细胞角蛋白,它可在膀胱癌尿路上皮表达,且不在正常尿路上皮组织表达。这种发现表明:排尿标本尿脱落细胞CK20的检测有望成为膀胱癌检测的肿瘤标志物。为此,国内外众多学者对尿脱落细胞CK20在各类肿瘤中进行了大量研究,RT-PCR检测法是近年来临床研究所广泛采用的防范,它是以RNA为模板,通过逆转录反应和聚合酶链反应检测RNA的一种新技术,其原理是通过扩增出肿瘤细胞标志性靶RNA,从而来证实肿瘤细胞的存在,RT-PCR检测法检测肿瘤细胞有较高敏感性,有关研究表明:RT-PCR检测法可检测出尿中存在于1 000 000个正常细胞中的1个肿瘤细胞^[4]。Buchumensky等^[5]通过RT-PCR技术检测了膀胱肿瘤CK20的表达情况,结果显示:144例膀胱移行型癌中,CK20阳性患者131例,其敏感度为91%,而21例健康人对照组中CK20均为阴性,其特异性为100%。Rotem等^[6]也运用了RT-PCR法检测了95例膀胱移行细胞癌患者和27例正常人的CK20表达情况,结果显示:其敏感度和特异性分别为86.7%和96.7%。本次研究同样采取了RT-PCR检测法对35例移行膀胱癌患者和30例非膀胱癌患者进行了检测分析,结果发现:膀胱癌组35例膀胱癌患者尿脱落细胞CK20 mRNA阳性率为94.29% (33/35),而非膀胱癌患者的对照组阳性率仅为3.33% (1/30),两组CK20

mRNA阳性率比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。由此可见,尿脱落细胞CK20 mRNA诊断膀胱癌的敏感性为94.26%,特异性为96.67%。不同膀胱癌病理分期、分级的尿脱落细胞CK20 mRNA表达阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),这与上述文献研究结果基本一致,表明尿脱落细胞CK20对膀胱癌的检测和诊断具有较高的敏感性和特异性,但不同分期、分级膀胱癌CK20表达无特异性。笔者认为:当受检患者尿脱落细胞CK20表达阳性时应首先考虑膀胱癌,但也不排除其他尿路感染(本次研究对照组出现1例CK20阳性,为下尿路感染患者)。

综上所述,尿脱落细胞CK20在膀胱癌尿液中表达的敏感率及特异性较高,是目前较为理想的一种膀胱肿瘤标记物,RT-PCR检测法检测尿脱落细胞中CK20有助于膀胱癌的诊断。

参考文献

- [1] Wu XH, Luo CL. Expression of cytokeratin 20 in exfoliated urothelial cells of bladder cancer [J]. Zhonghua Minyao Waikexue (Chin J Urol), 2002, 23(4): 215-216.
- [2] 吴小候, 蒲军, 刘彦慧, 等. 快速检测尿液CK20方法的建立[J]. 重庆医学, 2007, 36(14): 1355-1356.
- [3] Moll R, Lowe A, Laufer J, et al. Cytokeratin-20 in human carcinomas: a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies [J]. Am J Pathol, 1992, 140: 427-447.
- [4] 吴小候, 罗春丽, 梁鲁南, 等. 膀胱移行细胞癌CK20表达及临床意义[J]. 重庆医学, 2002, 31(12): 1169-1170.
- [5] Buchumensky V, Klein A, Zemer R, et al. Cytokeratin 20: A New marker for early detection of bladder cell carcinoma [J]. J Urol, 1998, 160: 1971-1974.
- [6] Rotem D, Cassel A, Lindenfeld N, et al. Urinary cytokeratin 20 as a marker for transitional cell carcinoma [J]. Eur Urol, 2000, 37: 601-604.

(收稿日期:2011-12-14)