

膀胱癌患者外周血 CTC 细胞中 survivin 的表达及意义

毛天赐¹, 张伟¹, 罗娟²

1. 空军军医大学唐都医院泌尿外科, 陕西 西安 710038;

2. 西安市儿童医院耳鼻喉科, 陕西 西安 710038

【摘要】目的 分析膀胱癌患者外周血循环肿瘤细胞(CTC)中生存蛋白(survivin)的表达及意义。**方法** 选择空军军医大学唐都医院于2019年1月至2020年11月期间收治的54例膀胱癌患者为研究对象, 采集其外周静脉血, 采用CanPatrol技术检测CTC, 免疫组化法检测survivin水平, 比较不同肿瘤直径、病理分级、肿瘤分期(T分期)、肿瘤数目患者的外周血CTC、survivin的表达差异, 以及不同类型CTC中survivin阳性率的差异。**结果** 54例膀胱癌患者中25例检出CTC, 阳性率为46.30%, 主要包括13例上皮型CTC、7例间质型CTC、5例为混合型。上皮型CTC中, 7例为survivin阳性表达, 占53.85%; 间质型CTC中, 均为survivin阳性表达, 占100.00%; 混合型CTC中, 4例survivin阳性表达, 占80.00%。间质型survivin阳性率显著高于上皮型和混合型CTC, 差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤直径<3 cm、分期<T₂、单发肿瘤的CTC检验阳性率更高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 不同病理分级之间的CTC检测阳性率比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。肿瘤病理分级中高级别、分期≥T₂的survivin检测阳性率分别为24.07%、25.93%, 明显高于低级别、分期<T₂的9.26%、7.41%, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 不同肿瘤直径、肿瘤数目的survivin检测阳性率之间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 膀胱癌患者中, 间质型CTC的survivin阳性表达率较其他型别明显更高, 且其表达与膀胱癌患者病理分期、分级之间具有一定相关性。

【关键词】 膀胱癌; 外周血; 循环肿瘤细胞; 生存蛋白; 病理分期; 病理分级; 相关性

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2021)22—2890—04

Expression of survivin in peripheral blood CTC cells of patients with bladder cancer and its significance. MAO Tian-ci¹, ZHANG Wei¹, LUO Juan². 1. Department of Urology, Tangdu Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA; 2. Department of Otolaryngology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA

[Abstract] **Objective** To analyze the expression and significance of survivin in peripheral blood circulating tumor (CTC) cells of patients with bladder cancer. **Methods** A total of 54 patients with bladder cancer, who admitted to

通讯作者: 张伟, E-mail: tdyyzhangwei@163.com

with acute ischemic stroke [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27 (10): 2877-2886.

[6] 么桂兰, 张然, 姚冬梅, 等. 老年急性缺血性脑卒中颈动脉狭窄患者血清hs-CRP, Hcy水平与IMT变化及其临床意义[J]. 临床误诊误治, 2019, 28(9): 82-86.

[7] BAIK SH, KWAK HS, HWANG SB, et al. Three-dimensional black blood contrast enhanced magnetic resonance imaging in patients with acute ischemic stroke and negative susceptibility vessel sign [J]. Eur J Radiol, 2018, 102: 188-194.

[8] 苏显都, 林明利, 符步远, 等. 血清miR-17-5p与Hcy水平联合预测急性缺血性脑卒中患者预后的价值[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 8(4): 298-302.

[9] 黎静, 李国辉, 陈绚, 等. 高同型半胱氨酸血症对急性缺血性脑卒中患者近期疗效和生活质量影响的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(22): 3181-3183.

[10] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018 [J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.

[11] CAI Z, HE W, ZHUANG FJ, et al. The role of high high-sensitivity C-reactive protein levels at admission on poor prognosis after acute ischemic stroke [J]. Int J Neurosci, 2019, 129(5): 423-429.

[12] 汪国宏, 朱幼玲, 吴建贤, 等. 急性缺血性脑卒中伴有H型高血压患

者血Hcy与颈动脉风险指标的相关研究[J]. 临床输血与检验, 2019, 21(2): 173-177.

[13] 庞国勋, 许进福, 马银玲. 血清Hcy水平与缺血性脑卒中发病及疾病程度的相关性研究[J]. 解放军医药杂志, 2019, 33(11): 79-81.

[14] YAN J, BO S, YUMING X, et al. Prognostic significance of homocysteine levels in acute ischemic stroke: a prospective cohort study [J]. Current neurovascular research, 2018, 12(4): 334-340.

[15] LI L, MA X, ZENG L, et al. Impact of homocysteine levels on clinical outcome in patients with acute ischemic stroke receiving intravenous thrombolysis therapy [J]. Peer J, 2020, 8: e9474.

[16] 葛冰磊, 俞善春, 金纪伟. 急性缺血性脑卒中患者血清Hcy、GAL3、MCP-1表达及其临床意义[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6): 893-897.

[17] 韩媛, 王爽, 黄超, 等. 急性缺血性脑卒中患者血清Lp-PLA2与Hcy、hsCRP及生化指标的相关性分析[J]. 中华急诊医学杂志, 2019, 28(8): 1026-1028.

[18] 张丽, 杨君素, 朱红雯, 等. 同型半胱氨酸水平与急性缺血性脑卒中老年患者溶栓预后相关性分析[J]. 河北医科大学学报, 2018, 39 (8): 872-876.

[19] LU ZH, LI J, LI XL, et al. Hypertension with hyperhomocysteinemia increases the risk of early cognitive impairment after first-ever ischemic stroke [J]. Eur Neurol, 2019, 82(4-6): 75-85.

(收稿日期: 2020-12-28)

Tangdu Hospital from January 2019 to November 2020, were selected as the research subjects, and peripheral venous blood was collected. CTC was detected by CanPatrol technique. The level of survivin was detected by immunohistochemistry. The difference in tumor diameter, pathological grade, tumor stage (T stage), tumor number, blood CTC and the expression of survivin were compared, as well as the difference of survivin positive rate in different types of CTC.

Results Among 54 cases of bladder cancer, 25 cases were positive for CTC with the positive rate of 46.30% (25/54), including 13 cases of epithelial CTC, 7 cases of interstitial CTC and 5 cases of mixed type. In epithelial CTC, 7 cases were survivin positive, accounting for 53.85%; in interstitial CTC, all were survivin positive, accounting for 100.00%; in mixed type of CTC, 4 cases were survivin positive, accounting for 80.00%. Survivin positive rate of interstitial type was significantly higher than that of epithelial type and mixed type of CTC ($P<0.05$). The positive rate of CTC test of tumor diameter <3 cm, tumor stage $< T_2$, and single tumor was significantly higher ($P<0.05$); there was no significant difference in the positive rate of CTC test among different pathological grades ($P>0.05$). The positive rate of survivin in patients with high-grade and tumor stage $\geq T_2$ were 24.07% and 25.93%, respectively, which were significantly higher than 9.26% and 7.41% in patients with low-grade and tumor stage $< T_2$ ($P<0.05$); there was no significant difference in the positive rate of survivin among patients with different tumor diameter and tumor number ($P>0.05$). **Conclusion** The positive expression rate of survivin in interstitial CTC is significantly higher than that in other types of bladder cancer, and there is a certain correlation between the expression of survivin and the pathological stage and grade of bladder cancer.

[Key words] Bladder cancer; Peripheral blood; Circulating tumor cell; Survivin; Tumor stage; Pathological grade; Correlation

膀胱癌主要是指发生在膀胱黏膜上的恶性肿瘤，在泌尿系统恶性肿瘤中十分常见。此病的发生与患者吸烟、职业接触等因素相关，临幊上患者多出现血尿、尿频、尿急、尿流梗阻等症状，对其正常生活带来极大困扰，症状严重者危及生命^[1-3]。膀胱癌患者较多数以浸润的方式生长，首次治疗后，具有较高的复发率，且患者远期生存率较低，血行转移主要以外周血中存在循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)为基础，是膀胱癌远处转移的主要途径^[4-5]。而生存蛋白(survivin)是一种凋亡抑制基因，与肿瘤的进展、转移之间具有一定相关性^[6]。本研究对膀胱癌患者外周血CTC进行检测，观察其survivin的表达情况，分析其与患者肿瘤直径、肿瘤分期等的相关性，进一步探究是否将其作为膀胱癌病情发展情况的监测指标，现报道如下：

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择空军军医大学唐都医院于2019年1月至2020年11月期间收治的54膀胱癌患者为研究对象。其中男性40例，女性14例；年龄35~80岁，平均(57.50 ± 3.22)岁。纳入标准：①经手术病理证实，确诊为膀胱癌；②未合并其他恶性肿瘤者；③同意纳入本研究。排除标准：①合并严重心脑血管疾病，肝肾功能不全者；②近期接受抗肿瘤治疗者；③具有精神类障碍，无法进行正常沟通交流者；④因其他原因中途放弃治疗者；⑤临床资料不全者。本研究经医院伦理委员会批准后实施。

1.2 观察指标与评价(检测)方法 比较不同肿瘤直径(<3 cm、≥3 cm)、病理分级(低级别、高级别)、肿瘤分期(T分期即< T_2 、≥ T_2)、肿瘤数目(单发、多发)之间外周血CTC、survivin表达的阳性率，以及不同类型CTC中survivin阳性率的差异。患者入组次日抽取空腹静

脉血，采用CanPatrol技术检测其不同型别的CTC，采用免疫组化法检测survivin表达情况。

1.2.1 CTC检测 首先应用红细胞裂解液对采集的外周血样本进行处理，去除红细胞，之后以免疫磁珠分离法去除CD45⁺的白细胞。采取膜滤过法自白细胞中分离出CTC。最后，使用EDTA抗凝真空采血管再次采集膀胱癌患者10 mL的外周静脉血，将最初收集的2 mL去除掉，以轻柔的力度将其进行上下颠倒，使其处于混匀状态。将新鲜的血样样本放置于温度为0℃~4℃的环境中进行保存，在运输过程中，注意避免造成震荡、碰撞。将红细胞裂解液加入血样中，同样以轻柔的力度将其进行上下颠倒，使其处于混匀的状态；将其放置于室温环境中，持续5~8 min，至出现透明红的情况。之后进行4℃的离心，300×g，持续10 min，离心处理后，可见管底处有淡红色的细胞，呈团块状，将上清弃掉，之后加入4 mL的磷酸盐缓冲液(PBS)，将细胞重悬，并保持轻柔的动作，对其细胞团块进行上下捶打，使其呈分散状。重悬细胞后，将200 μL抗CD45的免疫磁珠加入，并放置于温度为2℃~8℃的环境中进行孵化，持续30 min，在此期间，以轻柔的动作将其倾斜、旋转。选取上清液，使用PBS进行重悬，将抗CD45、抗CK8、染核试剂依次加入，并将其混匀，放置于室温内，持续30 min的孵化，CK8⁺CD45⁻DAPI⁺细胞便可被定义为CTC，使用24孔的5 μm滤膜进行过滤，应用显微镜对不同型别的CTC进行观察。

1.2.2 survivin蛋白表达检测 于含有10%的胎牛血清RPMI-1640培养基、温度为37℃、5%CO₂条件下，对CTC细胞进行培养。培养之后，应用丙酮进行相应固定，持续10 min，之后放置于温度为37℃、

0.75% H₂O₂-PBS 的环境中,持续浸泡 30 min,再应用 PBS 进行振洗,之后将封闭血清加入,37℃持续 30 min,将血清弃之,将比例为 1:100 的 survivin 一抗加入,37℃持续 30~60 min,再次使用 PBS 振洗,之后加入二抗,37℃ 30 min, PBS 进行振洗,Tris-HCl 缓冲液进行振洗,将新鲜的底物溶液浸入,之后进行水洗,将苏木素染液浸入,再用水进行清洗,快速过盐酸酒精,随后用水洗,再过氨水,之后水洗,脱水过二甲苯,进行封片,使用显微镜进行相应观察。

1.3 统计学方法 应用 SPSS20.0 统计学软件进行数据分析,计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计数资料比较采用 χ^2 检验,均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CTC 及 survivin 检测结果 54 例膀胱癌患者中 25 例检出 CTC, 阳性率为 46.30% (25/54), 主要包括 13 例上皮型 CTC、7 例间质型 CTC、5 例为混合型。上皮型 CTC 中 7 例为 survivin 阳性表达, 占比 53.85%; 间质型 CTC 中均为 survivin 阳性表达, 占比 100.00%; 混合型 CTC 中 4 例 survivin 阳性表达, 占比 80.00%。间质型 CTC 中 survivin 阳性率明显高于上皮型和混合型 CTC, 差异有统计学意义($\chi^2=5.765, 4.605, P<0.05$)。

2.2 膀胱癌病理特征与 CTC 阳性率的关系 肿瘤直径<3 cm、T 分期<T₂、单发肿瘤的 CTC 检测阳性率明显更高, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 不同病理分级之间的 CTC 检测阳性率比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1 膀胱癌病理特征与 CTC 阳性率的关系[例(%)]

病理特征	CTC 检测结果		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
肿瘤直径			12.027	<0.05
<3 cm	17 (31.48)	27 (50.00)		
≥3 cm	3 (5.56)	7 (12.96)		
病理分级			2.309	>0.05
低级别	18 (33.33)	11 (20.37)		
高级别	12 (22.22)	13 (24.07)		
T 分期			18.774	<0.05
<T ₂	27 (50.00)	3 (5.56)		
≥T ₂	8 (14.81)	16 (29.63)		
肿瘤数目			6.136	<0.05
单发	15 (27.78)	26 (48.15)		
多发	5 (9.26)	8 (14.81)		

2.3 膀胱癌病理特征与 survivin 阳性率的关系 肿瘤病理分级中的高级别、T 分期≥T₂ 的 survivin 检测阳性率明显高于低级别及 T 分期<T₂, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 而不同肿瘤直径、肿瘤数目的 survivin 检测阳性率之间比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 见表 2。

表 2 膀胱癌病理特征与 survivin 阳性率的关系[例(%)]

病理特征	survivin 检测结果		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
肿瘤直径			0.990	>0.05
<3 cm	9 (16.67)	31 (57.41)		
≥3 cm	9 (16.67)	5 (9.26)		
病理分级			4.266	<0.05
低级别	5 (9.26)	23 (42.59)		
高级别	13 (24.07)	13 (24.07)		
T 分期			6.666	<0.05
<T ₂	4 (7.41)	26 (48.15)		
≥T ₂	14 (25.93)	10 (18.52)		
肿瘤数目			0.990	>0.05
单发	9 (16.67)	28 (51.85)		
多发	9 (16.67)	8 (14.81)		

3 讨论

膀胱癌是临幊上常见的泌尿系统肿瘤,具有较高的复发率,而肿瘤的复发、转移与其预后之间具有密切的关系^[7~9]。因此,及时对此病进行正确诊断及治疗具有重要的临幊意义。研究指出通过分析膀胱癌患者外周血 CTC 细胞中 survivin 的表达情况,有助于了解其表达阳性率与患者病理分级、分期、病灶大小之间的关系,从而判定患者病情发展情况^[10~11]。另有研宍显示,大约有半数的肌层浸润性膀胱癌患者在初期治疗时,可能会出现微转移的情况^[12~13]。

CTC 主要是由肿瘤原发灶肿瘤细胞脱落、诊疗操作时,释放入血液,随之会形成相应的肿瘤微转移灶,CTC 主要是肿瘤发生相关血行转移的基础,在肿瘤转移中,是其必需的前提之一^[14]。对患者外周血进行检测,若发现 CTC,则可能会发生远处转移的风险,预后情况不佳。CTC 主要可分为上皮型 CTC、间质型 CTC、混合型 CTC,其中间质型 CTC 迁移、传播能力较强,具有更强的侵袭能力,通过观察其数量、表型的转变,可在一定程度上提示患者疾病进展、治疗的应答情况^[15]。survivin 属于一种细胞凋亡抑制蛋白,主要位于第 17 号的染色体长臂上,包括 4 个外显子、3 个内含子,此物质对于细胞的凋亡具有一定抑制作用。survivin 对细胞分裂具有调节作用,还可有效的参与至肿瘤血管生成过程,在膀胱癌组织中呈现为高表达^[16]。有研究指出,若患者存在 CTC,其数量越多则患者疾病的浸润性会越强,复发时间也就相应越短,从而会显著提高转移的概率,增加患者疾病风险^[17]。本研究发现,54 例膀胱癌患者中有 25 例检出 CTC, 阳性率为 46.30% (25/54); 肿瘤直径<3 cm、T 分期<T₂、单发肿瘤的 CTC 检验阳性率显著更高; 不同病理分级之间的 CTC 检测阳性率差异不具明显性; 肿瘤分级高级别、T 分期≥T₂ 的 survivin 检测阳性率更高; 不同肿瘤直径、肿瘤数目的 survivin 检测阳性率之间差异不具明显

性。可进一步提示,患者CTC细胞阳性率、CTC细胞中survivin阳性表达与其病理分级、分期、直径等之间具有一定相关性。

本研究主要根据CanPatrol技术、免疫磁珠法、膜滤过法等技术对膀胱癌患者外周血中的CTC进行检测,与传统检测方法比较更加多样化,且优势更加明显,可以将白细胞进行更有效的去除,且去除率较高;此外,本研究所应用的检测方法可以对各种表型的CTC进行有效的收集,所收集的CTC细胞可在细胞培养、免疫荧光剂基因检测等检测中进行良好的运用,回收率更高^[18]。54例膀胱癌患者检测结果显示,上皮型CTC中7例为阳性表达,占比53.85%;间质型CTC中均为阳性表达,占比100.00%;混合型CTC中4例阳性表达,占比80.00%。间质型阳性率显著高于上皮型和混合型CTC。这可能是由于,间质型CTC的侵袭性较高,可能与survivin的高表达具有相关性,survivin通过对细胞的凋亡进行有效的抑制,对于细胞的分裂、肿瘤血管生成具有促进作用,从而侵袭性显著增强。

综上所述,膀胱癌患者CTC细胞阳性率、CTC细胞中survivin阳性表达与其病理分级、分期、直径等之间具有一定相关性,可作为临床评估病情的有效依据。

参考文献

- [1] CUMBERBATCH MGK, JUBBER I, BLACK PC, et al. Epidemiology of bladder cancer: a systematic review and contemporary update of risk factors in 2018 [J]. Eur Urol, 2018, 74(6): 784-795.
- [2] 金一,李江松,李博.外周血循环肿瘤细胞与膀胱癌患者临床特征、复发转移的关系[J].癌症进展,2019,17(7): 847-850.
- [3] OHEYEN E, HOEKX L, WACHTER SD, et al. Bladder cancer diagnosis and follow-up: the current status and possible role of extracellular vesicles [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): 821.
- [4] 秦松林,刘婷,胡威,等. survivin在肾细胞癌中的表达及临床意义[J]. 国际泌尿系统杂志, 2019, 39(3): 483-486.
- [5] 唐春华,孙双权,董明渊,等. 膀胱肿瘤患者免疫细胞及其细胞因子检测的研究[J]. 甘肃科学学报, 2019, 31(1): 61-66.
- [6] NING Y, ZHANG W, HANNA DL, et al. Clinical relevance of EMT and stem-like gene expression in circulating tumor cells of metastatic

colorectal cancer patients [J]. Pharmacogenomics J, 2018, 18(1): 29-34.

- [7] 同传武,赵江.术前外周血淋巴细胞/单核细胞比值与高级别T1期膀胱癌电切术后生存时间的相关性分析[J].河北医药,2019,41(1): 42-45, 50.
- [8] 杨川,王凯. FOXO1在膀胱癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系[J].海南医学,2019,30(4): 437-440.
- [9] FENSTERMAKER RA, FIGEL SA, QIU JX, et al. survivin monoclonal antibodies detect survivin cell surface expression and inhibit tumor growth *in vivo* [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(11): 2642-2652.
- [10] 王力伟,周晓洲,陈志文,等.膀胱癌循环肿瘤细胞NANOG基因的表达与临床特征相关性的初步研究[J].第三军医大学学报,2018,40(8): 711-716.
- [11] 陈平锋.定量检测膀胱尿路上皮癌患者手术前后外周血中survivin mRNA的临床意义[J].临床与病理杂志,2018,38(1): 23-27.
- [12] DIMITROV-MARKOV S, PERALES-PATÓN J, BOCKORNY B, et al. Discovery of new targets to control metastasis in pancreatic cancer by single-cell transcriptomics analysis of circulating tumor cells [J]. Mol Cancer Ther, 2020, 19(8): 1751-1760.
- [13] AWADALLA A, ABOL-ENEIN H, GABR MM, et al. Prediction of recurrence and progression in patients with T1G3 bladder cancer by gene expression of circulating tumor cells [J]. Urol Oncol, 2020, 38(4): 278-285.
- [14] 徐兰峰,朱丹,袁潮.生存蛋白在膀胱癌患者尿液脱落细胞中的表达及临床相关性研究[J].中国实验诊断学,2020,24(2): 361-319.
- [15] JIANG XH, YAO ZY, HE X, et al. Clinical significance of plasma anti-TOPO48 autoantibody and blood survivin-expressing circulating cancer cells in patients with early stage endometrial carcinoma [J]. Arch Gynecol Obstet, 2019, 299(1): 229-237.
- [16] 吴岑,郑志雄,黄志扬,等.膀胱癌患者外周血中循环肿瘤细胞的监测及临床意义研究[J].癌症进展,2019,17(9): 1068-1071.
- [17] CHEN DM, XU JJ, ZHANG QY. Detection of survivin expression in bladder cancer and renal cell carcinoma using specific monoclonal antibodies [J]. Oncol Rep, 2018, 39(6): 2817-2828.
- [18] FU L, ZHANG JW, LI L, et al. Diagnostic accuracy of urinary survivin mRNA expression detected by RT-PCR compared with urine cytology in the detection of bladder cancer: A meta-analysis of diagnostic test accuracy in head-to-head studies [J]. Oncol Lett, 2020, 19(2): 1165-1174.

(收稿日期:2021-03-01)