



膀胱移行细胞癌患者尿液粘蛋白MUC1定量检测的临床意义

膀胱移行细胞癌的流行细胞学特点决定了早期诊断及术后监测在治疗中的重要性。近年多种膀胱肿瘤标记物应用与患者尿液检测[1][2][3][4]，经美国FDA批准用作膀胱移行细胞癌(BTCC)监测的肿瘤标记物有核基质蛋白(NMP22)、膀胱肿瘤抗原(BTA)、纤维蛋白分解产物(FDP)三种，而作BTCC筛选的肿瘤标记物仅有核基质蛋白(NMP22)。另外端粒酶活性检测研究也有一定进展[5]，但目前都不能完全取代膀胱镜检及尿脱落细胞学检查[6]。基于此，我们设计采用放射免疫法检测尿液上皮特异性肿瘤蛋白MUC1水平，研究其作为膀胱肿瘤标记物在膀胱癌诊断及预后监测中的应用价值。同时探讨影响尿液瘤标的相关因素。

1 资料和方法

1.1 病例资料

2001年3月至2001年9月同济医院就诊的膀胱癌患者31例，癌前病变(腺性膀胱炎)10例，非肿瘤患者10例，正常对照10例。各组间年龄、性别相比均差异无显著性。31例膀胱肿瘤均系BTCC，其中男23例，女8例，初发肿瘤22例，复发肿瘤9例，单发肿瘤19例，多发肿瘤12例。按WHO分级，G₁ 16例，G₂ 5例，G₃ 10例。按TNM分期，Ta~T1期22例，T2~T4期9例。其中29例行手术治疗，经尿道膀胱肿瘤电切术23例，全膀胱切除直肠代膀胱术4例，膀胱部分切除术2例，保守动脉介入化疗2例。10例癌前病变中腺性膀胱炎9例，鳞状上皮化生1例。10例非肿瘤患者中泌尿系结石5例，良性前列腺增生2例，尿道狭窄1例，肾囊肿2例。正常对照均为10例男性健康志愿者。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂 人MUC1(CA15-3)双抗体夹心免疫放射法(IRMA)检测试剂盒为北京中国原子能科学研究院产品，内含标准品5瓶(A、B、C、D、E，浓度分别为9.5、31、75、135、237 U/ml)，I¹²⁵标记的抗MUC1单抗溶液1瓶，温育/稀释液 2瓶，以及抗MUC1单抗固定的包被管 100支。

1.2.2 标本收集与保存 取清晨至正午间一次膀胱储存6至8小时的尿液注入采样杯，30 min内送实验室。3~5 ml尿液样本室温500~1 000 g离心10~15 min，上清1~2 ml存放于-80 ℃深低温冰箱长期保存。样品于室温(15~25 ℃)下解冻，不可用升温方式解冻以避免抗原失活，若有沉淀要再一次离心后使用。尿样收集瓶远离热源和阳光，尿样收集在治疗和手术后至少5 d采集，并加入尿液稳定剂抗微生物。

1.2.3 MUC1定量检测 用双抗体夹心免疫放射法(IRMA)定量检测各组尿液MUC1水平。

1.3 结果计算

数据的计算机处理使用IRMA程序，横坐标(X)为标准品的浓度对数，纵坐标(Y)为计数率(CPM)，Y=获取计数值B/总放值T。半对数纸画图，以标准品的浓度对数为横坐标，以各点的CPM为纵坐标，在半对数纸上画出标准曲线，以待测样品的CPM在标准曲线上查出其浓度。

1.4 统计处理

所有数据用SPSS10.0进行t检验和方差分析。

2 结果

膀胱肿瘤组患者尿液MUC1同各组尿液MUC1含量相比较, 差异无显著性($P>0.05$)。各组之间MUC1的含量见表1。

膀胱肿瘤组中, 不同分级、分期肿瘤患者尿液MUC1差异无显著性($P>0.05$), 初发和复发肿瘤患者尿液MUC1差异无显著性($P>0.05$), 而术前与术后肿瘤患者尿液MUC1差异有显著性($P<0.05$)。膀胱肿瘤组不同分级、分期、单发多发、初发复发间MUC1含量之间的关系见表2。

表 1 各组 MUC1 的含量

Tab.1 Comparison of urine MUC1 contents in the groups

Group	<i>n</i>	MUC1 (U/ml, <i>Mean±SD</i>)	<i>P</i>
BTCC	31	67.56±49.17	
Precancerosis	10	53.61±28.13	0.395
Nontumorous	10	58.73±33.61	0.590
Normal	10	87.12±48.02	0.239

表 2 肿瘤组不同分级、分期、单发或多发、初发与复发间 MUC1 含量

Tab.2 Urine MUC1 contents in patients with BTCC in relation to the cancer grade, staging, and recurrence

BTCC	<i>n</i>	MUC1 (U/ml, <i>Mean±SD</i>)	<i>P</i>
Grade			0.749
G ₁	16	76.39±47.07	
G ₂ ~G ₃	15	70.03±55.17	
TNM			0.798
Tis-T1	22	73.05±54.01	
T2~T4	9	74.51±49.17	
Recurrence			0.776
Primary	22	72.05±52.63	
Recurrent	9	75.70±48.15	
Operation			0.025
Before	19	66.52±50.17	
After	19	25.11±27.73	

术前肿瘤患者尿液MUC1含量为(66.52±50.17)U/ml, 术后1周肿瘤患者尿液MUC1含量为(54.77±28.56)U/ml, 2周含量为(26.31±27.14)U/ml, 4周为(25.11±27.73)U/ml。术后1周同术前相比, 肿瘤患者尿液MUC1差异无显著性(P=0.379)。术后2周和术后1周相比, 肿瘤患者尿液MUC1差异显著(P=0.027)。术后4周和术前相比, 肿瘤患者尿液MUC1差异显著(P<0.05)。术后2周同4周相比尿液MUC1差异无显著性(P>0.05)。

3 讨论

MUC1是位于上皮性细胞表面的高分子量糖蛋白, 在不同的上皮性肿瘤中出现不同的蛋白表型和基因表达, 具有多种生物学功能, 在肿瘤的侵袭、转移中发挥一定作用[7][8][9][10]。因非上皮组织(淋巴组织)中不表达该蛋白, 且癌变时MUC1的分子结构及基因、蛋白表达水平均发生变化。Simms首次应用ELISA法研究了血清MUC1水平在不同分期分级膀胱癌患者中的表达, 当正常上限设为4.8 U/ml时, 总的特异性为97%, 但灵敏度仅为24%, 故不能作为一项有效的筛选指标, 但可作为有效的肿瘤监测指标[11]。目前国内尚无尿液MUC1在膀胱癌诊断中的应用报告, 本文初步探讨了血清MUC1在膀胱癌诊断及预后监测中的应用价值。

本研究显示膀胱肿瘤组患者尿液MUC1同各组尿液MUC1含量差异无显著性(P>0.05), 而且膀胱肿瘤组中, 不同分级、分期肿瘤患者尿液MUC1差异无显著性(P>0.05), 初发和复发肿瘤患者尿液MUC1也无显著性差异(P>0.05), 说明尿液MUC1水平同肿瘤分级、分期无相关, 尿液含量并不平行于组织含量, 故不能作为BTCC的瘤标应用于临床筛选和诊断。正常尿液中MUC1主要由膀胱粘膜表层腺腔侧移行细胞分泌或脱落形成, 其含量受尿液浓缩和稀释影响较大, 另外感染、结石、有创检查和治疗理论上应该也有影响。膀胱肿瘤组患者尿液MUC1主要来源于肿瘤细胞高分泌的MUC1, 理论上含量应该明显高于正常组与非肿瘤组。我们分析这种实际检测与理论的差异原因可能涉及以下因素:(1) 我们先前的组织化学研究显示BTCC患者组织中MUC1蛋白表达量同肿瘤分级、分期呈正相关, 表达增多主要表现在腺腔侧细胞膜表达量增多, 间质基层细胞出现表达, 腺腔侧及间质基层细胞浆出现表达。由此可见肿瘤组织MUC1表达增多主要是间质基层细胞细胞浆出现高表达, 腺腔侧及间质基层细胞胞浆出现过表达却并不一定向腺腔侧分泌脱落, 而主要向基层和间质分泌脱落。(2) 同所有肿瘤基因表型肿瘤标记物一样, MUC1的含量受尿液浓缩和稀释影响最大。尿液肿瘤标记物处于一个相对变化的开放系统, 其含量变化较大, 不同于处于一个相对恒定和稳定封闭系统的血浆肿瘤标记物, 其含量同肿瘤组织分泌量呈正相关。尿液肿瘤标记物含量随尿液的浓缩与稀释而变化很大, 严重的影响了尿液肿瘤标记物标记物的临床应用价值。(3) 目前尚没公认的尿液肿瘤标记物收集储存的标准, 具体操作中患者的临床医嘱依从性和可控性差。尿液容量要求采样一次性膀胱储存6~8 h尿液, 在所有质控标准中对尿液肿瘤标记物影响最大, 实际操作难以达到。从本研究各组标准差均较大可见个体变异度很难控制。(4) 本组膀胱肿瘤患者年龄在60至70岁间, 肾脏功能(决定尿液浓缩与稀释量)个体差异性大, 自身年龄相关疾病如良性前列腺增生和糖尿病等并发率较高, 亦影响尿液容量要求, 个体变异度很难控制。(5) 尿液样本收集时间跨度较大, 季节温度对患者饮水量、尿量影响较大。(6) 各种尿液肿瘤标记物均为尿中脱落和分泌的蛋白, 在尿中降解分化的半衰期不同, 用同一标准显然很难得到客观、科学的结果。

本研究显示术前与术后肿瘤患者尿液MUC1差异有显著性(P>0.05), 说明对某一个体而言尿液MUC1可以作为疗效评价指标和预后复发监测指标。研究中为了了解尿液肿瘤标记物用于术后疗效评判和复发监测的最佳采样时间, 我们分别于术后1周、2周、1月分组采样, 对比各组间差异的显著性, 发现术后1周同术后2周、1月采样差异有显著性, 而术后2周、1月采样数值较稳定, 差异无显著性, 说明尿液肿瘤标记物用于术后疗效评判和复发监测的最佳采样时间为2周至1月。这同Lwase提出的血清肿瘤标记物应以4周为界限, 术后4周内与4周后血清水平有20%差别看法不同<HZ[13]>, 分析可能同肿瘤蛋白分泌或脱落入血与入尿的组织跨度有关。

本研究采用IRMA标记单抗, 标记单抗量充分, 直接与固相抗原结合无竞争性抑制反应, 而不是单抗限量, 竞争性结合, 且无需第二抗体, 因此明显优于放射免疫法。IRMA的灵敏度明显高于RIA, 同ELISA方法一样是检测尿液瘤标的最佳方法。

参考文献:

- [1]Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer[J]. J Urol, 1999, 161(2):388-94.
- [2]Pode D, Shapiro A, Wald M, et al. Noninvasive detection of bladder cancer with the BTA stat test[J]. J Urol, 1999, 161(2): 443-6.
- [3]Zippe C, Pandrangi L, Agarwal A. NMP22 is a sensitive cost effective test in patients at risk for bladder cancer[J]. J Urol, 1999, 161(1): 62-5.
- [4]Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, et al. A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer [J]. J Urol, 1997, 158(3Pt 1): 801-5.
- [5]Kavalier E, Landman J, Chang Y, et al. Detecting human bladder carcinoma cells in voided urine samples by assaying for the presence of telomerase activity[J]. Cancer, 1998, 82(4): 709-14.
- [6]Brown FM. Urine cytology: it is still the gold standard for screening[J]? Urol Clin North Am, 2000, 27(1): 25-37.
- [7]Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Graff A, et al. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast and ovary[J]. J Pathol, 1997, 182(4): 385-91.
- [8]Hilkins J, Ligtenberg MJ, Vos HL, et al. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property[J]. TIBS, 1992, 17(9): 259-363.
- [9]Wesseling J, Vandervalk SW, Vos HL, et al. Epithialin (MUC1) overexpressoin inhibits integrin-mediated adhesion to extracellular matrix components[J]. Cell Biol, 1995, 129(1): 255-65.
- [10]Hanski C, Drechsler K, Hanisch FG, et al. Altered glycosylation of the MUC 1 protein core contributes to colon carcinoma-associated increase of mucin bound sialyl-Lewis (x) expression[J]. Cancer Res, 1993, 53(17): 4082-8.
- [11]Simms MS, Hughes OD, Limb M, et al. MUC1 mucin as a tumor marker in bladder cancer [J]. BJU Int, 1999, 84(3): 350-2.
- [12]Lwase H, Kobayash S, Itoh Y, et al. Evaluation of serum tumor markers in patients with advance or recurrent breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 1994, 33(3): 83-8.