

• 论 著 •

钙网蛋白的 ELISA 检测方法的建立及其在膀胱癌诊断中的应用研究^{*}

许瑞环¹, 陈章权^{2#}, 罗 艺¹, 曾建蓉¹, 胡劲辉¹
(1. 深圳市龙岗中心医院中心实验室, 广东 518116; 2. 广东医学院临床免疫学教研室, 广东东莞 523808)

摘 要:目的 建立钙网蛋白的 ELISA 检测方法, 同时探讨其在膀胱癌诊断中的应用。方法 应用制备的钙网蛋白的多克隆抗体包被酶标板, 同时制备其与 HRP 交联物, 应用双抗体夹心法构建钙网蛋白的 ELISA 检测方法。应用构建的方法检测膀胱癌患者尿液钙网蛋白的浓度, 同时采用发光法检测尿液中 CA199 和 CYFRA21-1 的浓度。结果 ELISA 法检测膀胱癌尿液钙网蛋白阳性率为 100.00%, 良性病变组阳性率为 31.25%, 对照组其阳性率为 0.00%。尿液钙网蛋白, 其测定特异性为 83.87%, 敏感性为 100.00%; 尿液 CYFRA21-1, 当临界值为 4.15 ng/mL 时, 其诊断膀胱癌的特异度为 77.55%, 灵敏度为 43.48%。结论 应用建立的 ELISA 方法检测尿液钙网蛋白, 可用于膀胱癌的诊断、监测及预后评估。

关键词:膀胱肿瘤; 钙网蛋白; 酶联免疫吸附测定; 尿
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.012 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2011)20-2323-02

Establishment of ELISA method for calreticulin and its application in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma^{*}

Xu Ruihuan¹, Chen Zhangquan^{2#}, Luo Yi¹, Zhen Jianrong¹, Hu Jinghui¹
(1. Central Laboratory, Longgang Central hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China; 2. Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

Abstract: Objective To establish an ELISA method of calreticulin and explore its application in the diagnosis of bladder urothelial carcinoma. **Methods** Coat plate with prepared polyclonal antibody for calreticulin was used, meanwhile HRP labeled polyclonal antibody was prepared. Established a sandwich antibody ELISA method which was used to test the concentration of calreticulin. The concentration of CYFRA21-1 and CA19-9 were tested by chemiluminescence method. **Results** The positive rate of calreticulin for bladder urothelial carcinoma in urine was 100.00% with ELISA, 31.25% for urological patients without urothelial carcinoma and 0.00% for health people. The specificity of calreticulin for bladder urothelial carcinoma was 83.87%, and its sensitivity was 100.00%. But for CYFRA21-1, these were 77.55% and 43.48% respectively when the limit was 4.15 ng/mL. **Conclusion** Calreticulin in the urine can be tested by established method of ELISA, which can be useful for diagnosis, monitoring and prognosis for bladder urothelial carcinoma.

Key words: urinary bladder neoplasms; calreticulin; enzyme-linked immunosorbent assay; urine

膀胱癌是常见的恶性肿瘤之一, 其发病率居恶性肿瘤的第六位, 居男性泌尿生殖系统肿瘤首位^[1], 且膀胱癌发病率呈上升趋势^[1-3]。目前, 膀胱癌的诊断主要采用膀胱镜检查、肿瘤组织活检和尿脱落细胞学检查。但是, 这些方法因为损伤、敏感性、特异性等问题而受限。所以, 寻找理想的肿瘤标记物用于膀胱癌的早期诊断、监测及预后判断已成为一个必然的趋势。目前, 膀胱癌组织的蛋白质组学研究发现存在于尿液中的一种新的膀胱癌肿瘤特异性标志物——钙网蛋白^[4], 健康人尿液中无此成分。已有研究报道, 用免疫印记和免疫组化方法检测膀胱癌和前列腺癌尿液中的钙网蛋白^[5-6], 但这些方法不利于临床推广。本实验用一种简便实用的 ELISA 方法, 检测膀胱癌尿液中钙网蛋白, 同时结合膀胱癌的其他肿瘤标记物做综合分析, 以探索其作为一种新的膀胱癌无创诊断技术的临床诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 1~10 月在广东医学院附属医院和广州市人民医院泌尿外科住院 30 例膀胱癌患者为膀胱癌组。其中男 20 例, 女 10 例, 平均年龄 (56.8 ± 7.4) 岁, 均经病理活

检确诊, 病理按 WHO 标准分级。泌尿系统常见良性肿瘤组 32 例, 诊断按照《大外科学》标准, 取至龙岗中心医院泌尿外科。另选 30 例年龄、性别与膀胱癌患者相匹配的体检健康者作为对照组, 标本取至龙岗中心医院体检科。各组取晨尿 10 mL, 尿样离心后, 其上清置于 -70 ℃ 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 试剂 钙网蛋白的多克隆抗体由实验室制备并保存。钙网蛋白单克隆抗体购自 SressGen 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为 Dako 公司产品。CA199、CYFRA21-1 为罗氏公司产品, 检测配套仪器为罗氏 ECL170, 酶标仪为芬兰雷勃 MK3 型。

1.2.2 钙网蛋白多克隆抗体的制备及鉴定 见参考文献[7]。

1.2.3 尿液标本中钙网蛋白水平的检测 应用棋盘滴定法确定 ELISA 方法中各成分的浓度。首先用 1.0 μg/mL、0.1 μg/mL 和 0.01 μg/mL 抗 CRT 单克隆抗体包板, 4 ℃ 冰箱过夜。用 1% 牛血清清蛋白室温封闭 2 h, 洗板后加入 100 μL 的尿液和不同梯度的重组 CRT, 37 ℃ 1 h。洗板后加入不同梯度的多克隆抗体, 37 ℃ 1 h, 洗板。随即加入不同浓度的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37 ℃ 1 h, 洗板。加入显色液及终止液, 405 nm

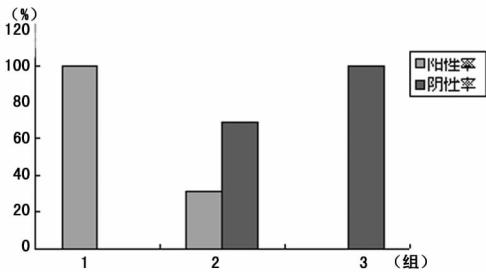
^{*} 基金项目: 广东省医学科研基金资助项目 (A2008653); 广东省湛江市科技招标项目。 [#] 共同第一作者。

和 630 nm 比色。以 A 值大于 1.0,同时阴性对照不显色的情况下定义为阳性孔。

1.2.4 尿液标本中 CA199、CYFRA21-1 水平的检测 尿液离心后,批量上机。仪器的配套试剂为同一批号,并且随标本同机操作。

2 结 果

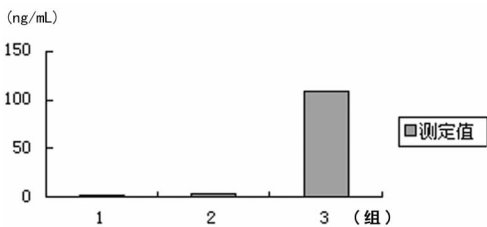
2.1 尿液标本中钙网蛋白的检测 见图 1。



1 组:膀胱癌组,其阳性率为 100.00%; 2 组:良性肿瘤组,其阳性率为 31.25%; 3 组:对照组,其阳性率为 0.00%。

图 1 不同组尿液钙网蛋白的阳性率直方图

2.2 尿液中 CA199、CYFRA21-1 的检测 图 2。



1 组:对照组,其测定均值为(2.71±0.82)ng/mL; 2 组:良性肿瘤组,其测定均值为(3.13±1.02)ng/mL; 3 组:膀胱癌组,其测定均值为(108.77±45.19)ng/mL; CA199 在 3 组间数据不存在可比性,故不适用于膀胱癌的诊断。

图 2 不同组尿液 CYFRA21-1 的测定结果均值直方图

2.3 尿液钙网蛋白和 CYFRA21-1 联合检测 尿液钙网蛋白检测用于膀胱癌的诊断,其特异性为 83.87%,敏感性为 100.00%。尿液 CYFRA21-1 用于膀胱癌的诊断,当临界值为 4.15 ng/mL 时,其诊断膀胱癌的特异度为 77.55%,灵敏度为 43.48%。当临界值为 2.11 ng/mL 时,其诊断膀胱癌的特异度为 38.77%,灵敏度为 43.47%。当取尿液 CYFRA21-1 临界值为 4.15 ng/mL 用于膀胱癌的诊断时,其特异性和敏感性均低于尿液钙网蛋白检测用于膀胱癌的诊断,所以尿液钙网蛋白用于膀胱癌的诊断可以取代尿液 CYFRA21-1。

3 讨 论

膀胱镜检查耗时、费用较高,且可能导致尿路感染、尿道损伤、膀胱损伤等并发症^[8]。尿脱落细胞学检查是一种用于诊断膀胱癌的常规方法,具有无创伤、特异性较高等特点,但其检出率因受多因素的影响,敏感性低(约 30%),特别是在肿瘤早期因细胞间黏附不脱落使其敏感性大为降低,而部分患者由于炎症、放疗或化疗使细胞形态改变,可导致 20%~40%的假阴性^[8]。此外,检测者主观意识、实验室倚倚等也影响其检出率。

用于膀胱癌检测的标记物为 CYFRA21-1 和 CA19-9^[9]。在已知的 20 多种 CK 中,CK-19 表达于正常泌尿系上皮,而 CK-20 则只表达于肿瘤上皮。Eissa 等^[10]报道用 RT-PCR 检

测尿脱落细胞中 CK-20,敏感性为 91%,特异性为 67%,但操作复杂、费时、费用也高,而通过免疫组化检测,则敏感性和特异性均会下降^[10]。另外,CK 亦存在于其他类型上皮恶性肿瘤中,尚不是一个理想的检测指标。本实验发现应用电化学发光方法检测膀胱癌尿液 CYFRA21-1,当临界值为 4.15 ng/mL 时,其诊断膀胱癌的特异性为 77.55%,敏感性为 43.48%。其结果低于董丽和许青霞^[11]报道敏感性为 86%,特异性为 72%。其原因可能为所用的检测方法不同,本实验为电化学发光法,文献报道的方法为 ELISA 方法,其敏感性和特异性均低于电化学发光法。CA19-9 是新报道的膀胱癌肿瘤标记物,Chuang 和 Liao^[12]的研究结果表明其敏感性和特异性分别为 69.6%和 70.8%,但在尿路感染和高分化的肿瘤组织中假阳性率较高,对低分化的膀胱癌的检测和监测具有较大的价值。本实验发现 3 组 A199 数据分布不规律,无统计学意义。但是有实验证实 CA199 在膀胱癌尿液中升高^[13]。

已有报道钙网蛋白的上调见于乳腺、肝和前列腺癌组织中^[14-15]。尽管在肿瘤细胞和增生细胞中钙网蛋白升高众所周知,但是这种升高的机制还没有确定。在肿瘤细胞中钙网蛋白表达的升高似乎由细胞的压力引起,而不是由细胞的增生引起^[16]。

Kageyama 等^[4]收集了 71 例膀胱癌患者尿液标本,用免疫印记研究表明膀胱癌患者尿液中 CRT 的检测敏感性为 73.5%,特异性为 86%。此外也有报道检测组织钙网蛋白的表达用于前列腺癌的诊断,但用的方法为免疫组化法^[6]。钙网蛋白作为肿瘤标记物用于肿瘤的诊断研究才起步,目前报道的有关钙网蛋白检测主要是免疫印记法和免疫组化法,不利于临床推广使用。

参考文献

[1] Antor AF, Hartge P, Hoover RN, et al. Epidemiological characteristic of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder[J]. Cancer Res, 1998, 48(13): 3853-3855.
[2] Gray M, Sims TW. NMP-22 for bladder cancer screening and surveillance[J]. Urol Nurs, 2004, 24(3): 171-172.
[3] 孟荟. 老年膀胱癌的诊治进展[J]. 实用老年医学, 2000, 14(5): 231-233.
[4] Kageyama S, Isono T, Iwaki H, et al. Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine[J]. Clin Chem, 2004, 50(5): 857-866.
[5] Gelebart P, Opas M, Michalak ML. Calreticulin, a Ca⁺⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 260-266.
[6] Iwaki H, Kageyama S, Isono T, et al. Diagnostic potential in bladder cancer of a panel of tumor markers(calreticulin, gamma-synuclein, and catechol-o-methyltransferase) identified by proteomic analysis[J]. Cancer Sci, 2004, 95(12): 955-961.
[7] 兔抗重组人钙网蛋白抗体的制备及其特性鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 7(6): 641-643.
[8] Dey P. Urinary markers of bladder carcinoma[J]. Clin Chem Acta, 2004, 340(12): 803-810.
[9] Ecke TH. Focus on urinary bladder cancer markers; a review[J]. Minerva Urol Nefrol, 2008, 60(4): 237-246. (下转第 2327 页)

度下降是预后良好的指标。这与 BNP 在判断心力衰竭预后中的报道一致^[7]。

患者术后心功能的恢复是衡量临床治疗效果的重要指标,因此,围绕 NT-proBNP 对手术转归的预测价值开展了许多研究。Nozohoor 等^[8]研究发现,主动脉瓣置换术后进入 ICU 时的 BNP 浓度是术后心力衰竭的独立预报因子,BNP 浓度增高预示预后不良,并确定了预测心力衰竭的 BNP 阈值以及预测 1 年死亡的临界值。Hutfless 等^[9]报道了心脏手术后 BNP 升高的峰值与术后住院日和 1 年后死亡率相关。Filsoufi 等^[10]观察了 42 例二尖瓣手术患者,发现术前 NT-proBNP 浓度不是手术转归的预报因子。Detaint 等^[11]对 124 例二尖瓣反流的患者进行了长达 4.4 年的随访,发现 BNP 不仅是严重二尖瓣反流的标志,而且反映了不良预后尤其是心力衰竭所致的死亡。本组研究发现手术后 ICU 治疗时间、总住院时间和强心药应用时间与术前和术后第 1 天 NT-proBNP 浓度无明显相关,与术后第 3 天 NT-proBNP 浓度呈正相关,表明术后第 3 天 NT-proBNP 浓度与预后有一定的相关性。

本组患者由于二尖瓣狭窄,长期心功能低下,几乎全部患者术前 NT-proBNP 均升高,而术后多数心功能得到明显改善,因此,术前 NT-proBNP 不适用于判断手术预后;术后第 1 天 NT-proBNP 受手术等多种因素影响,升高的幅度不能真实地反映心功能变化,因此术后即刻至术后第 1 天 NT-proBNP 的浓度对评估心功能意义不大。为排除麻醉、手术、体外循环等因素的影响,术后随访应选择合适的时间点监测 NT-proBNP 的动态变化。

参考文献

[1] Wazni OM, Martin DO, Marrouche NF, et al. Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery[J]. Circulation, 2004, 110(2): 124-127.

[2] Nozohoor S, Nilsson J, Lührs C, et al. B-type natriuretic peptide as

a predictor of postoperative heart failure after aortic valve replacement[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 23(2): 161-165.

[3] Rodeheffer RJ. Measuring plasma B-type natriuretic peptide in heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(4): 740-749.

[4] Davutoglu V, Celikb A, Aksoy M, et al. Plasma NT-proBNP is a potential marker of disease severity and correlates with symptoms in patients with chronic rheumatic valve disease[J]. Eur J Heart Fail, 2005, 7(4): 532-536.

[5] Eryol NK, Dogan A, Ozdogru I, et al. The relationship between the level of plasma B-type natriuretic peptide and mitral stenosis[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2007, 23(5): 569-574.

[6] Georges A, Forestier F, Valli N, et al. Changes in type B natriuretic peptide (BNP) concentrations during cardiac valve replacement[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2004, 25(6): 941-945.

[7] Miller W, Hartman KA, Grill DE, et al. Only large reductions in concentrations of natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP) are associated with improved outcome in ambulatory patients with chronic heart failure[J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(1): 78-84.

[8] Nozohoor S, Nilsson J, Lührs C, et al. B-type natriuretic peptide as a predictor of postoperative heart failure after aortic valve replacement[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 23(2): 161-165.

[9] Hutfless R, Kazanegra R, Madani M, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in predicting postoperative complications and outcomes in patients undergoing heart surgery[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(10): 1873-1879.

[10] Filsoufi F, Rahmanian PB, Salzberg S, et al. B-type natriuretic peptide (BNP) in patients undergoing mitral valve surgery[J]. J Card Surg, 2008, 23(6): 600-605.

[11] Detaint D, Messika-Zeitoun D, Avierinos JF, et al. B-type natriuretic peptide in organic mitral regurgitation [J]. Circulation, 2005, 111(18): 2391-2397.

(收稿日期:2011-08-09)

(上接第 2324 页)

[10] Eissa S, Kenawy G, Swellam M, et al. Compararison of cytokera-tin 20 RNA and angiogenin in voided urine samples as diagnostic tools for bladder carcinoma[J]. Clin Biochem, 2004, 37(9): 803-810.

[11] 董丽, 许青霞. 尿中 Cy21-1 在膀胱癌诊断中应用[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(1): 54.

[12] Chuang CK, Liao SK. Evaluation of CA19-9 as a tumor marker in urothelial malignancy[J]. Scand J Urol Nephrol, 2004, 38(5): 359-365.

[13] Noto K, Fujime M, Isobe H, et al. Determination of urinary CA19-9 levels in urothelial cancer--assessment of its role in diagnosis [J]. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi, 1997, 88(3): 406-413.

[14] Franzen B, Linder S, Alaiya AA, et al. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant breast lesions: down-regulation of cytokeratins[J]. Br J Cancer 1996, 74(10): 1632-1638.

[15] Alaiya A, Roblick U, Egevad D, et al. Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma[J]. Anal Cell Pathol, 2000, 21(1): 1-9.

[16] Ramsamooj P, Nolario V, Dritschilo A. Enhanced expression of calreticulin in the nucleus of radioresistant squamous carcinoma cells in response to ionizing radiation[J]. Cancer Res, 1995, 55(14): 3016-3021.

(收稿日期:2011-08-29)