

• 临床检验研究论著 •

# 尿中脱落细胞的环氧化酶-2、ImmunoCyt 和透明质酸酶联合检测在膀胱癌早期诊断中的应用

崔国兴

(河北省涿州市医院泌尿外科,河北涿州 072750)

**摘要:**目的 评价尿中脱落细胞的环氧化酶-2(Cox-2)、ImmunoCyt 和透明质酸酶(HAase)测定在膀胱癌早期诊断中的应用价值,寻找早期诊断膀胱癌的有效方法。方法 选择 60 例早期膀胱移行细胞癌和 60 例非膀胱肿瘤患者,对尿中脱落细胞的 Cox-2、ImmunoCyt 和透明质酸酶(HAase)进行检测,并行尿脱落细胞学检查。结果 尿中脱落细胞的 Cox-2、ImmunoCyt、HAase 和尿脱落细胞学的敏感度分别为 60%、61.6%、66%、26.6%;准确度分别为 76%、74%、80%和 87%;特异度分别为 92%、90%、94%和 100%。Cox-2+ImmunoCyt+HAase 联合检测与 Cox-2、ImmunoCyt 和 HAase 单独检测相比,敏感度和准确度都有所提高( $P<0.05$ );尿中脱落细胞的 Cox-2、ImmunoCyt 和 HAase 联合检测的敏感性和准确性均高于尿脱落细胞学,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 尿中脱落细胞的 Cox-2、ImmunoCyt 和 HAase 是早期诊断膀胱移行细胞癌的一种高特异性指标,三者联合检测能提高膀胱癌的早期诊断率。

**关键词:**膀胱肿瘤; 环氧化酶-2; 透明质酸酶; 脱落细胞学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)06-0656-02

## Clinical Study on the value of Cox-2, ImmunoCyt and HAase in urine exfoliated cells in early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma

Cui Guoxing

(Department of Urology, Zhuozhou City Hospital, Zhuozhou, Hebei 072750, China)

**Abstract: Objective** To evaluate clinical significance of Cox-2, ImmunoCyt and Hyaluronidase(HAase) in urine exfoliated cells in early diagnosis of bladder transitional cell carcinoma, and find a favorable method for bladder transitional cell carcinoma(BTCC). **Methods** Cox-2, ImmunoCyt and HAase in urine exfoliated cells were detected from 60 cases with early BTCC and other 60 controls, and exfoliative cytology were detected too. **Results** The results showed that the sensitivities of Cox-2, ImmunoCyt, HAase in urine exfoliated cells and exfoliative cytology was 60%, 58%, 66%, 76%, the accuracy was 74%, 80%, 87% and 22.0% respectively, the specificity was 92%, 90%, 94% and 100% respectively. The diagnosis sensitivity and accuracy of tumor marker combined detection were significantly higher than that alone ( $P<0.05$ ). but the sensitivity and accuracy of Cox-2, ImmunoCyt and HAase in urine exfoliated cells were significantly higher than those of urinary cytology ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Cox-2, ImmunoCyt and HAase in urine exfoliated cells are specific markers in the early diagnosis of BTCC. The combined detection can improve the early diagnosis rate of carcinoma of urinary bladder.

**Key words:** urinary bladder neoplasms; cyclooxygenase-2; hyaluronidase; exfoliative cytology

膀胱癌是中国最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,早期诊断对膀胱癌的诊断和治疗有着重要的意义<sup>[1-3]</sup>。目前尿脱落细胞学和膀胱镜检查仍然是膀胱癌诊断和监测的"金标准",但尿脱落细胞学检查的敏感度较低,而膀胱镜检查是有创检查,且不能进行早期诊断。因此,寻找特异度、敏感度均较高的无创性检查方法具有着重要的临床意义<sup>[4-5]</sup>。本文旨在研究尿环氧化酶-2(Cox-2)、ImmunoCyt 和透明质酸酶(HAase)联合检测对膀胱癌的早期诊断价值,探讨三者联合检测的意义,并与脱落细胞学检测进行比较,试图找到一种膀胱癌早期诊断的理想方法,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院 2009 年 1 月至 2011 年 12 月明确病理诊断为早期膀胱移行细胞癌患者 60 例(膀胱癌的诊断除了病史、症状和体格检查外,主要依靠膀胱镜活组织检查来确诊,同时通过 B 超检查和静脉肾盂造影来排除肾盂、输尿管肿瘤),其中男 33 例,女 26 例,平均年龄 3~78 岁;另外收集同期治疗的非膀胱肿瘤患者 60 例设为对照,其中前列腺增生 19 例,尿路感染 18 例,尿石症 19 例,肾积水 4 例,经病理检查排除膀胱肿瘤。所有患者于晨起时留取新鲜中段尿 150 mL,血

尿标本离心取上清液。分别进行 Cox-2 蛋白、ImmunoCyt、HAase 和尿液脱落细胞学的检测。

### 1.2 方法

**1.2.1 Cox-2 蛋白检测** 取 1 份新鲜尿液离心,舍弃上清液,将红细胞裂解液加入后作用 5 min,离心并弃上清液,取干燥后的沉渣细胞涂片,4%的多聚甲醛固定 5min 后,微波进行抗原修复,加入 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 5 min 后加入 COX-2 抗人单克隆抗体工作液(购自北京中山生物技术有限公司),按 SP 免疫组化法标准进行操作。通过光镜观察细胞涂片中央部分,以正常膀胱组织标本为阴性对照,阳性结果以超过 20 个棕黄色细胞颗粒出现在肿瘤细胞、间质细胞胞质中,而胞核处为空泡状或染色较淡,即可判定尿 Cox-2 蛋白表达阳性。

**1.2.2 ImmunoCyt 检测** ImmunoCyt 试剂盒(Diagnocure 公司),阳性和阴性对照的准备、滤过尿液、细胞固定、免疫反应、封片等严格按试剂盒说明书标准进行操作,分别在 20 和 40 倍荧光显微镜下进行观察。细胞膜或囊泡内有绿色荧光点(M344 抗原)或红色荧光点(19A211 抗原)的为阳性,计算阳性细胞数,通过普通光镜确定阳性细胞的性质。

**1.2.3 HAase 检测** HAase 标准品与 HAase 活性测定试剂

盒(由上海生物化学试剂公司提供),采用 ELISA-like Assay 方法检测。用北京普朗新技术有限公司 DNM-9602G 酶标分析仪测定,实验步骤按照试剂盒说明书进行。

**1.2.4 尿脱落细胞学检查** 取患者新鲜尿液,常规 HE 染色方法寻找肿瘤细胞,根据巴氏分级 I ~ II 级为阴性,III ~ V 级为阳性,以找到肿瘤细胞为尿脱落细胞学检查阳性。

**1.3 统计学处理** 所有数据均采用 SPSS11.0 软件分析处理,组间比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 Cox-2 蛋白检测结果** 早期膀胱癌组 60 例患者中尿液 Cox-2 蛋白检测发现 36 例,阳性率 60.0%(36/60);而对照组 60 例患者中有 5 例表达阳性,可见 Cox-2 诊断膀胱移行细胞癌的敏感度为 60.0%(36/60),特异度为 91.7%(55/60),准确度为 75.8%(91/120),见表 1。

**2.2 ImmunoCyt 检测结果** 早期膀胱癌组 60 例患者中 ImmunoCyt 检测发现 38 例,阳性率 63.3%(38/60);而对照组 60 例患者中有 4 例表达阳性,可见 ImmunoCyt 诊断膀胱移行细胞癌的敏感性为 63.3%(38/60),特异性为 93.3%(56/60),准确性为 78.3%(94/120),见表 1。

**2.3 HAase 检测结果** 早期膀胱癌组 60 例患者中尿液 HAase 检测发现 39 例,阳性率 65.0%(39/60);而对照组 60 例患者中有 2 例表达阳性,可见 HAase 诊断膀胱移行细胞癌的敏感性为 65.0%(39/60);特异性为 96.7%(58/60),准确性为 80.8%(97/120),见表 1。

**2.4 Cox-2、ImmunoCyt 和 HAase 单独检测与联合检测的敏感性、特异性、准确性比较** 三者联合检测发现膀胱癌的敏感性比单独检测有显著提高,特异性稍有降低,准确性也有提高( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 4 种检测方式分别及联合检测敏感度、特异度及准确度的比较[%(n/n)]

检测方式	敏感性	特异性	准确性
Cox-2	60.0(36/60)	91.7(55/60)	75.8(91/120)
ImmunoCyt	63.3(38/60)	93.3(56/60)	78.3(94/120)
HAase	65.0(39/60)	96.7(58/60)	80.8(97/120)
三者联合	86.7(52/60)	86.0(58/60)	87.0(97/120)

**2.5 尿脱落细胞学检查结果** 早期膀胱癌组的 60 例患者中尿脱落细胞学检测发现 12 例,阳性率为 20.0%(12/60);对照组的尿脱落细胞学检查均阴性,可见尿脱落细胞学检测诊断膀胱移行细胞癌的敏感度为 20.0%,而特异度为 100%。

**3 讨 论**

目前临床上膀胱癌诊断的金标准是膀胱镜检查 and 活检,创伤性大,又受检查者操作经验及技巧的影响,作为一种膀胱癌筛查方法在临床工作中受到制约;尿脱落细胞学检测是临床诊断膀胱癌的方法之一,特异度高,敏感性较低,但由于炎症或放疗影响会有一定的假阳性率<sup>[6]</sup>。因此,多年来泌尿外科专家一直追求对膀胱癌早期诊断敏感度和特异度均较高,且无创、简便经济的新肿瘤标记物,但是单一的肿瘤标记物均无较高的特异度,因此采用多个肿瘤标记物联合检测,提高其对膀胱癌早期诊断敏感度和特异度,具有重要的临床意义<sup>[7]</sup>。

环氧化酶(Cox)是机体内催化花生四烯酸转变为前列腺素的限速酶,存在 Cox-1 和 Cox-2 两种同工酶,其中 Cox-2 是一种可诱导型酶,主要位于内质网与核膜,在正常生理状态下检测不到,但在接受刺激后 Cox-2 能在 24 h 内数十倍的表达,

催化花生四烯酸转化为前列腺素,促进细胞增殖、促进肿瘤相关血管形成、抑制凋亡、以及使局部免疫抑制等,并且能通过不同的途径促进肿瘤的浸润及转移参与肿瘤的病理进程<sup>[8]</sup>。其表达水平的增加是肿瘤发生的一个早期事件,目前已应用于膀胱癌的早期诊断<sup>[9]</sup>。

ImmunoCyt 是一种结合了荧光免疫细胞化学和尿细胞学的独创技术,即通过单克隆抗体检测癌胚抗原的高分子量形式,来检测尿液中特异性标记的移行细胞癌细胞<sup>[10]</sup>。ImmunoCyt 可查出尿路脱落上皮细胞中 3 种抗移行细胞癌的单克隆抗体:M344、LDQ10 和 19A211。本研究单独应用 ImmunoCyt 的敏感度为 63.3%,单独应用尿细胞学的敏感度为 20.0%,明显高于尿细胞学的敏感性,此结果与文献报道一致<sup>[11]</sup>。研究表明,ImmunoCyt 是一种无创的、高度敏感性的检测移行细胞癌的方法<sup>[12]</sup>。由于 ImmunoCyt 检查商品化的设备已经应用于临床,检测方法简单,有希望大规模的应用于临床的尿液检测指标。

透明质酸酶(HAase)是细胞外基质的降解酶,是一种具有高度底物特异性的内生性糖苷酶,可特异性的作用于透明质酸葡萄糖胺及葡萄糖醛酸的分子键,从而导致透明质酸的解聚和降解,并从胶原纤维间隙中释放出来、重新分布,因而在胚胎发育、免疫监视、血管形成以及肿瘤发生发展的过程中都具有重要作用<sup>[13]</sup>。有研究表明,HAase 随着膀胱癌的分级分期而升高<sup>[14]</sup>。因此,可通过 HAase 与膀胱癌组织学分级和临床分期密切相关,在一定程度上反映出了膀胱癌的生物行为,可作为无创性措施用于膀胱癌的早期诊断。膀胱癌组织与尿液接触时,HAase 被分泌到尿液中,因此,可通过检测尿 HAase 来早期诊断膀胱癌。

本研究结果显示,Cox-2 蛋白、ImmunoCyt、HAase 联合检测的敏感度、准确度和特异度均明显高于尿脱落细胞学,并且与 Cox-2 蛋白、ImmunoCyt 和 HAase 单独检测相比,Cox-2 蛋白、ImmunoCyt、HAase 联合检测的敏感度和准确度都有所提高,差异均有统计学意义。膀胱癌的发生、发展是受多基因、多因素影响的极复杂的过程,单一的肿瘤标记物不能完全准确的反映膀胱癌的恶性潜能,不能早期诊断膀胱癌。本研究结果表明,尿 Cox-2 蛋白、ImmunoCyt 和 HAase 三者联合检测能提高膀胱癌的早期诊断率,具有敏感度及特异度均较高,无创、简便经济的特点,值得在临床工作中推广。

**参考文献**

[1] Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, et al. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers[J]. Clin Chem, 2000, 46(5):595-605.

[2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2007, 62(1):10-29.

[3] 郭金英, 陈彦, 文阳安, 等. RNA 干扰沉默 STAT3 基因表达对膀胱癌细胞生长影响的实验研究[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(3):196-199.

[4] 林云侨, 李惠长. 膀胱癌分子标志物诊断研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(2):216-218.

[5] 李扬, 郑衍平, 许旭昀, 等. 尿 NMP22、UBC 及 BTA 联合检测在膀胱癌早期诊断中的意义研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11):1187-1188.

[6] 原小斌, 王东文, 马志方, 等. 荧光原位杂交(FISH)技术在尿路上皮肿瘤诊断中的应用研究[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2010, 2(4):219-223.

[7] 来永庆, 孟作为, 陶令之. 膀胱癌新标志物 UPK3A 的临床应用研究[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2010, 2(4):232-236. (下转第 659 页)

表 2 EDTA 血浆标本的放置时间对 BNP 的测定结果的影响( $\bar{x} \pm 2s$ , pg/mL)

时间	温度	
	室温	4 °C
<1 h	375 ± 252	372 ± 210
2 h	372 ± 219	370 ± 212
3 h	368 ± 210	371 ± 214
4 h	325 ± 162	368 ± 209

3 讨 论

BNP 是一个含 32 个氨基酸的多肽,从分子结构来说, BNP 基因首先编码出含 134 个氨基酸的 Prepro-BNP, 储存于心房或心室的心肌颗粒中, Prepro-BNP 在切去 N 端 26 个氨基酸的信号肽后成为含 108 个氨基酸的 pro-BNP, 之后可进一步被弗林蛋白酶切割为含 N 端 76 个氨基酸的 NT-pro-BNP1276 和含 C-端 32 个氨基酸的 BNP。这一过程发生在分泌中还是血浆中并不清楚,但可以肯定的是这三者共存于血浆中<sup>[5]</sup>。因此,测定血浆 BNP 水平,对慢性心力衰竭患者有较好的临床诊断价值,是慢性心力衰竭患者死亡风险较准确的评价指标之一,也是心血管事件发生的独立危险因素<sup>[6-7]</sup>。BNP 水平与心力衰竭的严重程度呈正相关,是心力衰竭患者疗效观察的指标,对心源性及单纯性肺源性呼吸困难, BNP 有着明显的鉴别诊断依据<sup>[8-9]</sup>。因此其检测备受临床医生的青睐和重视, BNP 在体内的半衰期较短,约 20 min,从临床的角度考虑, BNP 更能及时反映患者的病情变化,利于临床监测治疗效果<sup>[5]</sup>。它的降解清除主要通路一是利尿纳肽家族的 C 型受体介导,内吞入细胞后由溶解酶降解;二是经中性内肽酶(NEP)降解<sup>[10-11]</sup>。BNP 检测的临床运用及自身的特性决定它所面临患者的特殊性,临床上影响 BNP 检测水平的因素较多,如利尿剂、血管紧张素转换酶抑制剂、肾上腺素拮抗剂等药物的使用都能改变血液中心肽类激素水平,因此实验前误差的有效控制,决定检测的准确性。有文献报道用 EDTA 抗凝时 BNP 丢失最少, BNP 在塑料试管比玻璃试管要更稳定<sup>[5]</sup>。为此,本实验选择肝素和 EDTA 抗凝血进行比较。有文献报道分离胶管与干燥管血清检测结果随放置时间的延长而明显下降, EDTA 或肝素抗凝血浆在放置 2 h 内对 BNP 检测稳定, EDTA 抗凝血浆 BNP 测定值明显高于肝素抗凝血浆<sup>[12]</sup>。该报道与本实验肝素抗凝血浆测定值略高于 EDTA 抗凝血浆的结果有所不同,原因有待于在今后的工作中进一步摸索。标本存放的温度和保存的时间,均可对测定结果产生影响,尤其部分地区夏季温度有时可高达 37 °C 会严重影响测定结果。心血管科和老年病科的 BNP 检测已常态化,护士抽血大多凌晨 4 时就开始了,检验科大多在 8:30 以后开始测试,部分标本检测时间延后,为此,建议 BNP

检测标本应立即送检,短时间内进行测定,夏季检测最好不要超过 2 h,不能及时送检的标本可暂时放置科室冰箱冷藏。另外, BNP 检测结果受抗凝剂的影响,不同的抗凝剂抗凝标本的结果差异较大。实验证明,肝素与 EDTA 抗凝标本的结果存在恒定的差异,其影响机制具体的原因有待进一步讨论。综上所述,实验室在进行 BNP 检测过程中选用单一、固定的抗凝剂为佳,以避免抗凝剂对 BNP 检测影响,标本应立即送检,3 h 内进行测定,不能及时送检的标本可暂时放置冰箱冷藏。

参考文献

- [1] 杨春华. 老年慢性心力衰竭患者血浆脑钠肽水平观察[J]. 实用老年医学, 2012, 26(1): 38-40.
- [2] 宋艳秋, 张辉. 心衰患者血浆 B-型钠尿肽水平的研究[J]. 心血管康复医学杂志, 2011, 20(4): 321-323.
- [3] Warnes CA, Williams RG, Bashore TM, et al. ACC/AHA 2008 guidelines for the management of adults with congenital heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. Circulation, 2008, 118(23): e714-e833.
- [4] Dickstein K, Vardas PE, Auricchio A, et al. 2010 Focused Update of ESC Guidelines on device therapy in heart failure: an update of the 2008 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure and the 2007 ESC Guidelines for cardiac and resynchronization therapy. Developed with the special contribution of the Heart Failure Association and the European Heart Rhythm Association[J]. Europace, 2010, 12(11): 1526-1536.
- [5] 胡大一, 杨振华. B 型钠尿肽的临床应用和最新进展[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2006: 19-26.
- [6] 唐世凡, 王朝晖, 朱秀华, 等. B 型钠尿肽与慢性心力衰竭患者临床预后的关系研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(4): 343-346.
- [7] 邓新桃, 石柱良, 王如兴, 等. B 型利钠肽水平对慢性心力衰竭患者预后的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(6): 462-466.
- [8] 黄梁镔, 梅丽芳, 龙欣. 血浆 B 型钠尿肽水平在临床诊疗中的运用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1071-1072.
- [9] 周海燕. B 型利钠肽检测在急性呼吸困难鉴别诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(14): 1633-1635.
- [10] 王善钻. 脑利钠肽(BNP)在脑血管疾病中的研究进展[J]. 中华保健医学杂志, 2010, 12(4): 326-328.
- [11] 邵春来, 洪小苏. 脑利钠肽与心血管疾病的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(1): 36-40.
- [12] 王伟佳, 张秀明, 温冬梅, 等. 不同抗凝剂、样本放置时间及保存温度对 B 型利钠肽和氨基末端 B 型利钠肽原检测的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(2): 83-87.

(收稿日期: 2012-10-09)

(上接第 657 页)

- [8] Yildirim U, Erdem H, Kayikci A, et al. Cyclooxygenase-2 and survivin in superficial urothelial carcinoma of the bladder and correlation with intratumoural microvessel density[J]. J Int Med Res, 2010, 38(5): 1689-1699.
- [9] 梁平, 靳风烁, 吴刚, 等. COX-2 和 EGFR 在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 857-859.
- [10] 刘炜, 叶敏, 沈海波. ImmunoCyt 在移行膀胱细胞癌早期诊断中的应用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(9): 623-624.
- [11] Liang P, Jin FS, Wu G, et al. Expressions of cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of bladder and their correlation[J]. Acta Acad Med Milit Tertiae,

- 2009, 31(9): 857-859.
- [12] Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis[J]. Biochem, 2007, 46(23): 6911-6920.
- [13] Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, et al. HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder Cancer[J]. Eur Urol, 2010, 57(1): 86-93.
- [14] Eissa S, Zohny SF, Shehata HH, et al. Urinary retinoic acid receptor-β2 gene promoter methylation and hyaluronidase activity as noninvasive tests for diagnosis of bladder Cancer[J]. Clin Biochem, 2012, 45(6): 402-407.

(收稿日期: 2012-11-23)