中图分类号：R737.14编号：20110231

**承德医学院**

硕士研究生毕业论文

**BLCA-4在浸润性膀胱癌患者体液和组织中表达的研究BLCA - 4 expression in the body fluids and tissues of patients with**

**Invasive bladder cancer**

研究生：王晓鹏

导师：王志勇教授学科专业：肿瘤学

所在系部：承德医学院附属医院

研究起止日期：2012年7月～2013年9月论文提交日期：2014年3 月

**承德医学 院**

**学位论文使用授权及知识产权归属承诺**

本学位论文在导师（或指导小组）的指导下，由本人独立完成。本学位论文研究所获的研究成果，其知识产权归承德医学院所有。承德医学院有权对本学位论文进行交流、公开和使用。凡发表与学位论文主要内容相关的论文，第一署名单位为承德医学院，试验材料、原始数据、申报的专利等知识产权均归承德医学院所有。否则，承担相应的法律责任。

研究生签名：导师签章：

年月日

**承德医学院**

**研究生学位论文独创性声明**

本论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果，除了文中特别加以标注和致谢等内容外，文中不包含其他人已经发表或撰写的研究成果，指导教师对此进行了审定。本论文由本人独立撰写，文责自负。

研究生签名：导师签章：

年月日

**BLCA-4在浸润性膀胱癌患者体液和组织中表达的研究BLCA - 4 expression in the body fluids and tissues of patients with**

**Invasive bladder cancer**

研究生：王晓鹏学号：20110231

年级：2011 级

导师：王志勇教授学科专业：肿瘤学

所在系部：承德医学院附属医院研究方向：泌尿系统肿瘤

研究起止日期：2012年7月～2013年9月论文提交日期：2014年3 月

目 录

[摘要](#_Toc68640603) 3

[结论：](#_Toc68640604) 3

**[Abstract](#_Toc68640605)** 3

[前言](#_Toc68640606) 6

[1 材料](#_Toc68640607) 6

[2 分组方法](#_Toc68640608) 9

[3 实验方法](#_Toc68640609) 9

[5 A 5C61A61C89C17N35N](#_Toc68640610) 16

[结论](#_Toc68640611) 23

[参考文献](#_Toc68640612) 23

[附录](#_Toc68640613) 24

[参考文献](#_Toc68640614) 27

**BLCA-4在浸润性膀胱癌患者体液和组织中表达的研究**

摘**要**

**目的：**

膀胱癌是我国泌尿系统常见的恶性肿瘤之一，无痛性肉眼血尿为最常见的主诉。目前膀胱镜检查和尿脱落细胞检查是诊断和随访膀胱癌的最常用方法，但膀胱镜检查为有创检查，费用较高且给患者（尤其男性）带来极大的不适，还可能造成泌尿系感染。而尿脱落细胞学检查需要在恰当的时间收集尿液才能提高诊断率，虽然特异性较高，但敏感度较低，极易出现假阴性，会造成漏诊。近些年来，随着蛋白组学、基因组学和分子生物学等学科的迅猛发展，许多新的膀胱肿瘤瘤标得以发现，如miRNA、FDP(纤维蛋白原降解产物)、BTA (膀胱肿瘤抗原)、ImmunoCyt（免疫荧光细胞学）、UroVysion、核基质蛋白（NMP22）等。但是，这些瘤标对膀胱癌诊断的敏感性、特异性均不尽人意，有的实验要求的条件极为苛刻、价格昂贵、假阳性率高、容易受到主观因素的影响等，诸多问题使得这些瘤标不能广泛的应用于临床实践。

BLCA-4（bladder cancer specificity nuclear matrix protein 4）是膀胱癌特异性核基质蛋白，BLCAS家族中的一种，只存在于膀胱癌组织及癌旁组织中，与癌细胞的增殖、存活和血管的生成等密切相关。研究显示尿中BLCA-4对膀胱癌诊断有着极高的敏感性和特异性，且不会受其他泌尿系疾病（如结石、前列腺增生等良性疾病）影响。但该项研究尚不深入，目前只有以尿液为基础的关于敏感性及特异性的研究，而BLCA-4在血清中的表达水平和浸润性膀胱癌组织中表达的研究尚未见报道。本实验拟用免疫组化、ELISA、Western Blotting方法检测BLCA-4在浸润性膀胱肿瘤患者、泌尿系良性疾病和正常人的体液和组织中的表达及其水平，评估BLCA-4与浸润性膀胱肿瘤生物学活性之间的关系，探讨BLCA-4在膀胱肿瘤诊断中的价值，为BLCA-4作为新的膀胱癌标记物的临床应用提供实验依据。

**方法：**

用ELISA法、免疫组织化学法和Western Blotting法分别检测BLCA-4

在实验组（72例浸润性膀胱癌患者的血液、尿液和膀胱组织）、对照组（包括78例前列腺增生患者的血液、尿液和膀胱组织，44例体检正常者和34例泌尿系结石患者的血液和尿液）中的水平及表达情况。实验结果采用

SPSS17.0统计软件进行分析，采用秩转换非参数检验、单因素方差分析以及T检验，*P*值小于或等于0.05将被认为所检验的差别有统计学意义。

**结果：**

ELISA方法检测结果显示：实验组浸润性膀胱癌患者尿液中BLCA-4

含量中位数为1.593，增生组含量为0.319，结石组含量为0.238，正常组为

0.194，浸润性膀胱癌患者尿液BLCA-4蛋白含量显著高于其余三组

（*P*<0.05），增生组BLCA-4含量较正常对照组升高（*P*<0.05）；BLCA-4在T2a含量中位数为1.809，T2b中含量为1.675，T3+T4中含量为1.982，在中高分化膀胱癌尿液BLCA-4为1.416、低分化膀胱癌尿液BLCA-4为1.817，膀胱癌患者尿液BLCA-4含量在不同分级分期之间差别无统计学意义

（*P*> 0.05）；肿瘤直径大小＜2cm BLCA-4含量为0.966和肿瘤直径大小

≥2cm含量为1.809，膀胱癌患者尿液BLCA-4含量与肿瘤大小有关

（*P*<0.05）。确定临界值为0.620ng/ml时，尿BLCA-4检测浸润性膀胱癌的灵敏度、特异度最佳，分别为91.6%（22/24）和100%；实验组浸润性膀胱癌患者血清中BLCA-4含量中位数为5.808，增生组、结石组、正常组患者血清中BLCA-4的含量分别为5.718、5.076、4.995，结果分析无统计学意义（*P*> 0.05）。（见Fig1、2、3、4, Tab1、2、3）。

免疫组织化学检测结果显示：浸润性膀胱癌组织中BLCA-4的表达阳性率（77.8%）明显高于对照组前列腺增生患者膀胱组织中的表达阳性率

（2.56%），BLCA-4在中高分化和低分化癌组织中表达阳性率分别为65%和93.7%，BLCA-4在T2a、T2b和T3-T4中表达阳性率分别为64.3%、72.7%和100%，BLCA-4的表达与肿瘤分级（*P*＜0.05）分期（*P*＜0.05）有相关性；癌旁组织（距切缘2cm内）中BLCA-4表达阳性率为50%（36/72）；与患者年龄（*P*=0.801）、性别（*P*=0.289）、肿瘤数量（*P*=0.526）、肿瘤大小

（*P*=0.076）、手术方式（*P*=0.848）无明显相关性（*P*＞0.05）（见Fig7、8、

9，Tab5)。

Western-Blotting结果显示：浸润性膀胱癌组织中BLCA-4表达为0.828±0.267，癌旁组织表达为0.591±0.259，前列腺增生患者组织

中表达为0.242±0.116，BLCA-4在在浸润性膀胱癌组织中表达较高，在癌旁组织中也有表达，在前列腺增生患者膀胱组织中基本无表达，三者表达差异有统计学意义（*P*＜0.05）(Fig5、6, Tab4)。

结论：

1. BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中的表达有较高的敏感性

（91.6%）和特异性（100%），但其在浸润性膀胱癌患者血液中的表达在本实验中未发现差异有统计学意义。

2. BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中的表达与肿瘤直径大小存在一定相关性。

3. BLCA-4在浸润性膀胱癌组织中表达的水平与膀胱癌的分级、分期有相关性，与患者年龄、性别、肿瘤数量、肿瘤大小和手术方式无明显相关性。

4. BLCA-4在在浸润性膀胱癌组织中表达较高，在癌旁组织中也有表达，在前列腺增生患者膀胱组织中基本无表达，三者表达差异有统计学意义。

**关键词：**膀胱癌； BLCA-4； ELISA；免疫组化； Western Blotting； 体液；组织

**BLCA - 4 expression in the body fluids and tissues of patients with invasive bladder cancer**

**Abstract**

**Objective:**

Bladder cancer is the most common malignant tumor of urinary system in our country. Currently cystoscopy and urine cytology examination are the useful methods of diagnosis and follow-up for bladder cancer. But cystoscopy is a invasive detection and the high cost make patients feel discomfortable. It make patients difficult to accept so as to limits its application. The specificity of urine cytology examination is high, but the sensitivity is low. It is easy to appear false negatives and make missed diagnosis, causing a great impact on prognosis. In recent years, along with the development of molecular biology and the proteomics, we docover many new tumor markers for bladder cancer, such as BTA, NMP, ImmunoCyt, UroVysion and FDP etc. Although the most important tumor markers for bladder cancer have high sensitivity and specificity, it can not get satisfactory results. Some problems make the tumor cannot be widely used in clinical practice such as the harsh experimental conditions, expensive, the high rate of false positives and easily affected by subjective factors.

In recent years, BLCA-4 become a research focus for many scholars, which is a kind of BLCAS family. The study proves it have something todo wih cancer cell proliferation, survival and the formation of blood vessels and so on. The study on the basis of the urine in have higher sensitivity and specificity, which is not affected by other urinary benign diseases. But there is few research for it and at present it is only researched on urine. The study of BLCA-4 on the same patients, body fluids(serum, urine) and organization has not yet been reported. This experiment use the BLCA-4 as

The marker, detecting its expression in invasive bladder cancer, urinary benign

Diseases and normal persons, assessing its value in the diagnosis of bladder cancer. BLCA-4 as a new bladder cancer markers, it provides research for clinical use.

**Methods:**

Detecting the expression of BLCA-4 in experimental group(72 invasive bladder cancer patients, serum, urine and organization), control group(78 prostate hyperplasia patients, normal persons and urinary calculi patients, serum, urine and organization) by ELISA, Immunohistochemistry and Western Blotting. Through SPSS17.0 statistical software, Comparison between groups use Kruskal-Wallis H, ANOVA and T test method. *P*<0.05 was considered statistically significant.

**Results:**

ELISA result: The content of BLCA-4 in bladder cancer urine is 0.793ng/ml and hyperplasia of prostate group is 0.319, urinary calculi group is

0.238 and the normal group is 0.194(*P*<0.05). The content of BLCA-4 in

Bladder cancer is obviously higher than other groups. The content of BLCA-4 in T2a 1.409, T2b is 1.675 and T3+T4 is 1.582. The content of BLCA-4 in high differentiation of bladder cancer is 1.416 and poor differentiation of bladder cancer is 1.817. The expression of BLCA-4 has no difference between

The bladder cancer classification stage (*P*＞0.05). The data has statistically

Significant between tumor size＜2cm(0.966) and≥2cm(1.809)(P＜0.05). The data of the cut-off is 0.620ng/ml. In urine, the BLCA-4 positive rate of invasive bladder cancer is 91.3%(22/24) and the specificity is 100%. In

Serum, the content of invasive bladder cancer is 5.808 and hyperplasia of prostate group 5.718, urinary calculi group 5.076 and normal controls is

4.995. The expression of BLCA-4 has no difference in serum(P＞0.05)(Fig1、

2、3、4，Tab1、2、3).

Immunohistochemistry result: The positive rate of BLCA-4 expression in invasive bladder cancer organization(77.8%) is obviously higher than the group of hyperplasia of prostate(2.56%). The positive rate of BLCA-4 expression in high and poor differentiation cancer is 65% and93.7%. In

T2a, T2b and T3+T4 is 64.3%、72.7%和100%. The expression of BLCA-4 has difference between the bladder cancer classification stage (P＜0.05); The positive rate of BLCA-4 expression in tumor adjacent tissues is 50%(36/72) and has no difference with age(P=0.801), sex(P=0.289), the number of tumor(P=0.526), tumor size(P=0.076) and surgical way(P=0.848)(P

＞0.05）(Fig7、8、9，Tab5).

Western-Blotting result: The expression of BLCA-4 in invasive bladder cancer is 0.828±0.267, tumor adjacent tissues 0.591±0.259 and the hyperplasia of prostate is 0.242±0.116. It has difference in the organization of bladder

Cancer, tumor adjacent tissues and the hyperplasia of prostate(P＜0.05) (Fig5、

6, Tab4).

**Conclusions:**

1. BLCA-4 has high sensitivity and specificity in urine in invasive bladder cancer, but has low sensitivity and specificity in serum.

2. The expression of BLCA-4 has certain correlation in invasive bladder cancer and tumor size

3. The expression of BLCA-4 in invasive bladder cancer organization has difference between the bladder cancer classification stage and has no difference with age, sex, the number of tumor, tumor size and surgical way.

4. The expression of BLCA-4 has difference in the organization of invasive bladder cancer, tumor adjacent tissues and the hyperplasia of prostate tissues.

**Key words:** Bladder cancer; BLCA-4; ELISA; Western Blotting; Immunohistochemistry; Body fluids; Organization

|  |  |
| --- | --- |
| 英文缩写 |  |
| 英文及缩写 | 中文 |
| Bladder cancer specificity of nuclear matrix  proteins(BLCA) | 膀胱癌特异性核基质  蛋白 |
| Nuclear matrix protein(NMP) | 核基质蛋白 |
| Bladder cancer(BC) | 膀胱癌 |
| Immunohistochemical | 免疫组化 |
| Immunofluorescence cytology | 免疫荧光细胞学 |
| Bladder tumor antigen(BTA) | 膀胱肿瘤抗原 |
| Fibrinogen degradation products(FDP) | 纤维蛋白原降解产物 |
| Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) | 酶联免疫吸附试验 |
| Western blotting(WB) | 蛋白质印迹法 |
| Invasive bladder cancer | 浸润性膀胱癌 |
| Sensitivity | 敏感性 |
| Specificity | 特异性 |
| Antibody | 抗体 |
| Phosphate buffered saline(PBS) | .磷酸缓冲液 |
| Phenyl methane sulfonyl fluoride (PMSF) | 苯甲基磺酰氟 |
| N,N,N',N'-Tetra methyl ethylene diamine(TEMED) | 四甲基乙二胺 |
| Sodium dodecyl sulfate (SDS) | 十二烷基磺酸钠 |
| American Joint Commission for Cancer  Staging(AJCC) | 美国癌期划分联合委  员会 |

|  |  |
| --- | --- |
| Polyvinylidene fluoride (PVDF) | 聚乙烯二氟 |
| Prostate specific antigen（PSA） | 前列腺特异性抗原 |

**BLCA-4在浸润性膀胱癌患者体液和组织中表达的研究**

前**言**

膀胱癌是我国泌尿系统常见的恶性肿瘤之一，在欧美发达国家其发病率仅次于前列腺癌。统计数据表明，膀胱癌发病率在男性常见恶性肿瘤中占第4位，女性占第10位。在膀胱癌中，90%以上是移行细胞癌( TCC)，超过70%的TCC在治疗后很快复发，复发肿瘤中约30%出现恶性度增加

[1]. 因此，需要对患膀胱肿瘤的患者进行终生的随访监测。由于早期膀胱

癌缺乏明显的临床特异性表现，膀胱癌诊断和随访监测比较困难。无痛性肉眼血尿是膀胱癌最常见的症状，但超过90%血尿患者并未患有膀胱癌，而某些膀胱癌也不表现出明显的肉眼血尿[2]。

目前为止，尿脱落细胞学癌细胞检查和膀胱镜直视检查仍是膀胱癌诊断、随访和监测的最常用方法。但是，侵入性膀胱镜检查的有创性、对早期肿瘤诊断效果欠佳和检查价格昂贵；尿脱落细胞学检查的低敏感性等，使其对膀胱肿瘤诊断和治疗后监测的作用受到明显的限制。比较理想的肿瘤标记物，应具有操作简单、快速、敏感性较高、特异性较强、费用低廉、易标准化、大批量进行、可重复、能在检验科室进行、可对复发进行预测监测及对各种治疗（手术或药物）变化敏感等特点。因此，寻求一种特异性强、敏感性高、简单、方便、无创的检查方法，已成为目前国际上学者们的研究热点。近年来，随着蛋白组学、基因组学和分子生物学等学科的发展， 许多新的膀胱肿瘤瘤标得以发现，如miRNA、核基质蛋白（NMP）、

ImmunoCyt（免疫荧光细胞学）、UroVysion等，有的学者进行了联合几种瘤标（如联合CYFRA21-1、UBC、TPA或NMP22等）进行检测膀胱癌实验，但是结果都不十分令人满意。

最近，国际共识小组对现有的各种肿瘤标记物进行了初步的评估，发现有些用来诊断膀胱癌的肿瘤标记物比用PSA诊断前列腺癌的准确率还要高， 具有极为广阔的临床应用前景[3]。膀胱癌特异性核基质蛋白家族( BLCAs)被作为一组较为理想的、可靠的膀胱癌新型瘤标，越来越受到研究学者的重视。其中BLCA-4是BLCAS家族中一种，已有的研究证实与癌细胞的增殖、存活和血管的生成等有关，以膀胱癌患者尿液为样品的基

础研究，其表现出了极高的敏感性和特异性，且不受泌尿系其他（结石、前列腺增生）疾病的影响。

国内对于BLCA-4的研究还很少，目前只有以尿液为基础的研究，关于BLCA-4在体液（血清、尿液）和组织中表达的系统研究尚未见报道。

本实验从蛋白水平，以膀胱肿瘤特异性核基质蛋白4（BLCA-4）作为标志物，检测BLCA-4在浸润性膀胱癌患者、前列腺增生、正常体检者和泌尿系结石患者体液和组织中的表达量，观察不同患者及正常人群中的表达差异。旨在以BLCA-4作为一种新的膀胱肿瘤标志物进行相关研究，评估其应用于临床的前景。

**材料与方法**

# 1 材料

## 1.1 标本收集

选择承德医学院附属医院泌尿外科2012年7月至2013年5月收治的浸润性膀胱癌患者72例（T2~T4），前列腺增生患者78例，正常体检者44例和泌尿系结石患者34例。

72例经术后病理证实的浸润性膀胱肿瘤组织中，男56例、女16例，年龄33-80岁，平均年龄（64.4±12.1）岁；中高分化患者40例、低分化患者

32例，T2a期者28例，T2b期22例，T3、T4期22例。肿瘤直径大于2cm的

42例，直径≤2cm的30例。留取术前晨起（早6点）患者血液、尿液各5ml，在4度下，3000r/min离心15min收集上清液于2支EP管内，每支约1.5ml，在-80度低温冰箱中保存待用，在解冻过程中需要注意使温度逐渐升高，先放到-20度保持一段时间，然后再放到-4度，待溶化后，再水浴，使用前需再次离心处理；术中留取肿瘤组织和瘤旁组织，取材厚度是0.2cm～

0.3cm，10%福尔马林固定液，组织离体后立刻固定，离体一般不要超过

30分钟，在常温条件下固定时间为8-24小时，固定液至少要10倍于组织，

8-24h后将组织放入70%酒精中收集保存，待收集到一定数量后行脱水、包埋处理，包埋成蜡块后保存于4°冰箱中待用；另留取2份组织块置于2支EP管中30min内冷冻于-80°冰箱内，供western检测用。所收集标本详细

记录信息包括：患者姓名、性别、年龄、职业、家族史、手术方式、肿瘤大小，部位、大体分型、侵及范围、转移、病理诊断、病理号、分化程度、病理分级、分期等。所有标本患者都给与编号（如: 1、2、3....），所取血、尿标注为数字+B（blood, 血）和数字+N（尿），前列腺增生患者标记为数字+B/N。所有组织标号：癌组织标为C，癌旁组织标为A，前列腺增生组织标为N，采用数字+C/A/N标记。

78例手术后经病理证实的前列腺增生患者平均年龄（60.4±6.3）岁。

150例膀胱组织标本中经尿道电切手术取材的88例，大小约0.3×0.2cm，经耻骨上手术方式取材的62例1.0×1.5cm 。

泌尿系结石组34例，男20例，女14例，年龄大小25-72岁，平均

年龄（40.1±8.5）岁，上尿路结石23例，下尿路结石11例，所留血尿采用数字+J标记。

正常对照组留取体检者8点血、尿，并经体检证实无泌尿系相关疾病，标记采用数字+Z表示。

### 1.1.1 入组标准

1）实验组为经病理证实的浸润性膀胱癌患者，无其他泌尿系相关疾病；

2）前列腺增生组为经病理证实的单纯前列腺增生患者，无其他泌尿系相关疾病；

3）经检验、检查证实的泌尿系结石患者，无其他泌尿系相关疾病；

4）体检者为经检查无泌尿系相关疾病患者；

5）组织块大小合适，电灼不严重。

6）愿意加入本试验，签署知情同意书。

### 1.1.2 排除标准

1）凡不符合上述纳入标准的患者；

2）所留取血液发生溶血的标本；

3）所留取的尿液，血尿太严重的，经离心无法清除者；

4）有其他泌尿系疾病者；

5）从留取到冰冻时间超过2h者；

6）组织离体时间超过30min者；

7）经尿道电切术所取组织块太小者；

8）组织离体超过30min未放入冰箱冷冻者；

9）所取标本病理证实为其他疾病者，如腺性膀胱炎等。

## 1.2 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| CHK 普通光学显微镜 | 日本 Olympus |
| BIO-RAD 680 型全自动酶标仪 | 美国伯乐公司 |
| BP211D 精密电子天平 | 德国 Startorius |
| MCO-15AC CO2 恒温培养箱 | 日本 SANYO |
| Wd750ASL23 微波炉 | 中国格兰仕 |
| DYY-III2 型稳压稳流电泳仪  DYCP-31B 型电泳槽摇床 | 北京六一仪器厂北京六一仪器厂  上海福玛实验设备有限公司 |
| QL-901 振荡器 | 中国其林贝尔公司 |
| LD5-IA 低速离心机 | 北京雷勃尔离心机有限公司 |
| 全自动脱水机 | 英国 Shandon Thermo 公司 |
| YXQG0 手提式电热压力蒸汽消毒  器 | ft东安得医疗科技有限公司 |
| S325 石蜡切片机 | 英国 Shandon 公司 |
| GN-RO-100 型纯水机 | 北京市双峰纯水设备厂 |
| ULT1386-32-V14-80℃冷冻冰箱 | 美国 |
| 3K15 高速低温离心机 | 美国 Sigma 公司 |
| G2X-DH-40X45 电热恒温箱 | ft东立鹤公司 |
| BX40F4 显微镜 | 日本 Olympus 公司产品 |
| 显微照相系统 | 日本 Olympus 公司产品 |
| 塑料薄膜封口机 | 温州市兴业机械设备有限公司 |

## 1.3 主要试剂

抗BLCA-4 ELISA试剂盒武汉华美生物技术有限公司

BLCA-4一抗武汉华美生物技术有限公司

BLCA-4二抗福州迈新生物技术开发有限公司

DAB显色试剂盒北京四正柏生物技术开发有限公司

3 % H 2 O 2北京中杉金桥生物技术有限公 司

|  |  |
| --- | --- |
| β-actin 一抗 | 美国 Santa Cruz 公司 |

|  |  |
| --- | --- |
| Western-blot 二抗甲醇 | 北京中杉金桥生物技术有限公司北京化工厂 |
| Tris 碱 | 美国 Promega 公司 |
| 丙烯酰胺 | 加拿大 BBI 公司 |
| 甲叉双丙烯酰胺 | 北京化工厂 |
| 过硫酸铵 | 北京化工厂 |
| TEMED | 北京化工厂 |
| SDS | 加拿大 BBI 公司 |
| 甘氨酸  Marker  无水乙醇 | 北京拜尔迪生物技术有限公司  普利莱基因技术有限公司北京化工厂 |

## 1.4 主要溶剂配制

### 1.4.1 0.01M PBS缓冲液

取NaCl 80.0g，Na2HPO4·12H 2O 36.28g, KCl 2g, KH2PO4 2.4g，用高压灭菌双蒸水定容至10000ml，调pH值为7.2~7.6, 0.22μm滤膜过滤除菌后，分装，4℃保存备用。

### 1.4.2 1.5M Tris-HCl(PH8.8)

Tris碱18.17g，双蒸水80ml，浓HCl调PH8.8，定容至100ml。

### 1.4.3 转膜缓冲液

Tris碱3.03g，甘氨酸14.4g，甲醇200ml，加双蒸水至1000ml，现用现配。

### 1.4.4 5×Tris甘氨酸电泳缓冲液

Tris碱15.1g，甘氨酸94g, SDS 5.0g，双蒸水使其溶解，定容至1000ml，使用前做5倍稀释。

### 1.4.5 1.0M Tris-HCl(PH6.8)

Tris碱12.11g，双蒸水80ml，浓HCl调PH6.8，定容至100ml。

### 1.4.6 10%SDS

SDS 10g，双蒸水定容至100ml，常温保存。1.4.7 30%丙烯酰胺（29: 1）

丙烯酰胺29g，N，N'-亚甲基双丙烯酰胺1g，温热双蒸水分别溶解后，双蒸水定容至100ml，滤纸过滤，避光4℃保存。

### 1.4.8 1×TBST缓冲液

NaCl 8.8g, 1.0MTris-HCl PH6.8 20ml, Tween20 0.5ml，双蒸水定容至1000ml，4℃，现用现配。

### 1.4.9 封闭液（5%脱脂奶粉）

脱脂奶粉2.5 g，加入1×TBST使其充分溶解后，定容至50ml。

### 1.4.10 10%过硫酸胺APS

APS 1g，双蒸水定容10ml，分装，-20℃保存备用。

# 2 分组方法

分为实验组（浸润性膀胱癌组），对照组包括前列腺增生、泌尿系结石和正常体检者。因为正常膀胱组织留取的难度较大，所以将前列腺增生患者膀胱组织作为对照。

# 3 实验方法

## 3.1 ELISA法（酶免吸附法）

原理：ELISA的实验基础，是抗原或抗体的固相化与抗原或抗体的反应。利用结合在载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，而酶标记的抗原或抗体也保留其免疫学活性，又可以保留酶的活性；在ELISA测定时，受检标本在适合的条件下与固相载体表面的抗原或抗体反应。用PBS等洗涤掉未形成抗原抗体复合物。然后加入酶标记的抗原或抗体，通过反应而结合到抗原抗体复合物上。这时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，再用紫外线分析出吸光度，可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。酶的催化效率高，所以放大了免疫反应的结果，使测定方法达到很高的敏感度。

检测实验组和对照组体液中BLCA-4的表达量，步骤如下：

#### （1）从-80℃冰箱中取出需待测样品，溶解冰冻的体液标本，反复摇晃使物质混合均匀。

#### （2）检测前各试剂盒均要置于2-8℃避光处保存，使用前在室温静置

30min，未用的板条再放回装有干燥剂的铝箔袋内，密封口袋，放回4℃冰箱。

（3）50µl样品（稀释倍数预实验中确定）加至样品孔，设置空白孔，标准液做阳性对照。50µl/孔加入稀释后的标准品至标准品孔。

（4）加入50µl酶标抗原，用封板膜封住反应孔，37℃温箱孵育60min。

（5）去除混合液（防止流入旁孔），加入冲洗液后静置10-30s，洗板 5

次。

（6）加入底物A和B各50µl，37℃孵箱孵育15min，应避免气流气温波动，使用前确保A、B有效。

（7）迅速加入50µl终止液终止反应，正常由蓝变黄，若显色不均匀可轻敲。

（8）打开酶标仪电源，预热仪器，设置好检测程序。

（9）混匀后即刻测量OD450值（10min内）。在仪器记录并保存读取的结果。

（10）实验完毕后将剩余的试剂放入4℃冰箱保存，在有效期内使用。

## 3.2 免疫组织化学法

原理：抗体和抗原之间的结合具有高度的特异性。先将组织或细胞中的某种化学物质提取出来，以此作为抗原或半抗原，通过免疫动物后获得特异性的抗体，再以此抗体去探测组织或细胞中的同类的抗原物质。由于抗原与抗体的复合物是无色的，因此还必须借助于组织化学的方法将抗原抗体结合的部位显示出来，以其达到对组织或细胞中的未知抗原进行定性，定位或定量的研究。

### 3.2.1 用免疫组织化学法检测浸润性膀胱癌患者的癌组织、癌旁组织和前列腺增生患者的膀胱组织。步骤如下：

（1）取材和固定，取材厚度是0.2cm～0.3cm，10%福尔马林固定液，组织离体后立刻固定，离体一般不要超过30分钟，在常温条件下固定时间为8-24小时，固定液至少要10倍于组织，8-24h后将组织放入70%酒精中收集保存。

（2）透明：70%乙醇3h，80%乙醇3h，，90%乙醇过夜，95%乙醇I缸2h，

II缸2h，100%乙醇I缸2h，II缸2h。透明：二甲苯I缸25min, II缸25min。埋蜡：然后手工埋蜡包埋。

（3）标本蜡块连续切片4μm，切片后放入60℃恒温箱烤片2h。

（4）脱蜡和水化，切片用二甲苯脱蜡15min，二甲苯15min，无水乙醇5min×2, 95%乙醇5min×2, 90%乙醇5min×2，，80%乙醇5min。

（5）PBS冲洗5min×3，蒸馏水冲洗一次。

（6）以3﹪H2O2孵育30min(37℃)；PBS冲洗3×5min后在微波炉中进

行抗原修复，煮沸后放入切片，4min中低火，4min低火，室温冷却25min。

（7）PBS洗5min×3，加BLCA-4抗体，在湿盒中4℃过夜。

（8）第二天取出放37℃温箱中复温30min, PBS洗3×5min，滴加Ⅱ抗，

37℃孵育30分钟，PBS洗3×5min，加C液，37℃孵育30分钟。

（9）PBS洗3×5min, DAB显色10分钟（DAB现用现配，避光处理），蒸馏水冲洗终止显色。

（10）苏木素复染核8min，自来水冲洗5min。

（11）系列酒精二甲苯脱水透明；树胶封片观察。另外，设置部分组织切片用PBS替代BLCA-4抗体（其余染色步骤相同）作为阴性对照。

### 3.2.2 免疫组化结果判定方法：正常膀胱组织中BLCA-4不表达，阳性信号主要表达于膀胱肿瘤细胞中，在膀胱肿瘤组织中表达于细胞核中。在染色均匀清晰的区域，选取5个高倍镜视野(×200)：①按阳性细胞百分率(A值)评分：＜25%为1分，25%-50%为2分，＞50%为3分；②按染色强度

（B值）评分：不着色为0分，浅棕黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为

3分。综合染色阳性细胞数（A值）与染色强度（B值）判断结果，阴性(-)：0分，弱阳性(+): 1-2分，中度阳性(++): 3-4分，强阳性(+++): 5-6分。

## 3.3 Western-blotting方法

原理：Western-blotting采用的是聚丙烯酰胺凝胶电泳，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用标记的二抗。经过PAGE分离的蛋白质样品，转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶或同位素标记的第二抗体起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白水平的表达。既可以定性，又可以半定量的Western是初步鉴定蛋白质最方便也是最通用的方法。

用Western-blotting检测浸润性膀胱癌患者癌组织、癌旁组织、前列腺增生膀胱组织中BLCA-4的表达，步骤如下：

### 3.3.1 组织蛋白提取：

#### （1）.取出组织放入冰盒内，提前预冷裂解液。

#### （2）.匀浆器配套、标记，內加1ml纯水，用于洗涤组织上的血液。

#### （3）.取组织0.08g放入匀浆器口，用眼科剪剪碎后研磨，此步骤要在冰上操作。

#### （4）.研磨后放入高速离心机离心12000r，5min离心。

#### （5). 离心后弃上清，保留沉淀物质。

#### （6). 再洗涤一次，为了更好的去除血液成分。

#### （7). 离心后，弃上清。加入裂解液1ml和PMSF10微升，裂解20分钟，每5min

涡旋震荡20秒。

#### （8). 然后12000r，离心5min。

#### （9). 取上清约800微升，放于EP管中，-80度冻存备用。

### 3.3.2 细胞总蛋白定量

#### （1）蛋白定量采用BCA 法

原理：在碱性环境下蛋白质与Cu2+络合并将Cu2+还原成Cu+. BCA与Cu+结合形成稳定的紫蓝色复合物，在570nm处有高的吸收值并与蛋白质浓度成正比，据此可测定蛋白质浓度。

#### （2）工作溶液及标准蛋白溶液配制

将50体积BCA reagent与1体积Cu reagent 混合即为工作溶液。用

PBS 与待测蛋白样品匹配之缓冲液进行倍比稀释：25µl 4000µg/ml

BSA+25µl稀释溶液(PBS) = 50µl(BSA=2000µg/ml)，取25µl连续倍比稀释

7次，得到BSA标准溶液2000µg/ml、1000µg/ml、500µg/ml、250µg/ml 、

125µg/ml、62.5µg/ml、31.25µg/ml、15.625µg/ml，各25µl 。

#### （3）微板测定

将25µl标准品和待测样本与200µl工作溶液混合；37℃，30min孵育；将反应微板温度冷却至室温；测定570nmOD值；拟合标准品曲线并计算蛋白浓度。

#### （4）根据所测蛋白质浓度，计算上样量。

### 3.3.3 蛋白电泳

#### （1) 用双蒸水将玻璃板冲洗干净、晾干，将两块玻璃板对齐后垂直固定于电泳装置上，准备灌胶。

#### (2)配胶：按下表分别配制12%分离胶和浓缩胶，最后加入TEMED，加入TEMED后立即混匀灌胶。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 试剂 | 12%分离胶(10ml) | 浓缩胶(4ml) |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | 双蒸水(ml) | 3.3 | 2.7 |  |
|  | 30%丙烯酰胺(ml) | 4.0 | 0.67 |  |
|  | 1.5M Tris-HCl (ml) | 2.5 | － |  |
|  | 1.0M Tris-HCl(ml) | － | 0.5 |  |
|  | 10%SDS(ml) | 0.1 | 0.04 |  |
|  | 10%APS(ml) | 0.1 | 0.04 |  |
|  | 1%TEMED(ml) | 0.004 | 0.004 |  |

#### （3)将分离胶溶液加至电泳板中，在分离胶溶液上面铺上水层，以隔绝空气。

#### （4) 待分离胶凝固后，倾去分离胶上面的水层，迅速加入浓缩胶，小心插入梳子，避免混入气泡。

#### （5) 待浓缩胶凝固后，在电泳槽中加入电泳缓冲液，然后轻轻将梳子拔出。

#### （6) 将蛋白样品和5×Loading Buffer按体积比4: 1比例混合，于沸水中煮

5min使蛋白变性，然后将蛋白样品及蛋白分子标记加入浓缩胶制成的加样孔中。

(7)进行稳压电泳：浓缩胶，80V；分离胶，120V。电泳至溴酚兰到达胶的底部时即可终止电泳，进行转膜。

### 3.3.4 转膜

#### （1）根据凝胶大小剪取6张滤纸和1张PVDF膜，PVDF膜于甲醇中浸泡

5min，然后将滤纸、PVDF膜于转移缓冲液中处理15min，同时将海绵浸于转移缓冲液中。

#### （2）按照阴极、1层海绵垫、3层滤纸、胶、PVDF膜、3层滤纸、1层海绵垫、阳极的顺序安装转膜装置，边安装边驱赶气泡。

（3）扣紧转移槽，接通电源，以2mA/cm2恒流转膜，β-actin 4℃转膜2h, BLCA-4转膜约3h。

（4）转膜后，在PVDF膜左上角剪口做标记。

### 3.3.5 免疫反应

#### （1）将PVDF膜浸泡于含有5%脱脂奶粉的平皿中，室温摇动封闭2h。

#### （2）用等量的TBST和封闭液配制抗体稀释液，将一抗用抗体稀释液稀释至适当浓度，兔抗人BLCA-4一抗以1: 100稀释，鼠抗人β-actin一抗以

1: 1000稀释。将PVDF膜置于杂交袋中，于PVDF膜蛋白面加入适量的抗体溶液，压紧四角，4℃孵育过夜。

（3）洗膜，用TBST液洗PVDF膜，共3次，每次10min。

（4）用等量的TBST和封闭液配制抗体稀释液，用于检测BLCA-4蛋白的鼠抗兔二抗，以1: 1000进行稀释；用于检测β-actin蛋白的ft羊抗鼠二抗以1: 2000进行稀释。将PVDF膜置于杂交袋中，于PVDF膜蛋白面加入适量的抗体溶液，压紧四角，于摇床上室温摇动孵育2h。

（5）用TBST洗膜3次，每次5min。

### 3.3.6 化学发光、显影、定影

（1）采用ECL试剂盒进行化学发光。取等量的A液和B液两种试剂，混合后置于保鲜膜上，将PVDF膜蛋白面朝下与此混合液充分接触，反应1min。

（2）将PVDF膜移至另一保鲜膜上，去尽残液，包好，放入X光片夹中，固定。

（3）在暗室中，将显影液和定影液分别倒入盘中，将事先剪成适当大小并于左上角剪口做标记的X光片放在PVDF膜上进行曝光，根据信号强弱适当调整曝光时间，一般为10s~3min。

（4）曝光完毕，将X光片在显影液中浸泡1~2min，待出现明显条带时，于自来水下冲洗，然后在定影液中浸泡2~4min，自来水冲洗，晾干，扫描图像。每次实验重复3次。

（5）扫描的图像用灰度扫描软件Image J进行灰度分析，以目的条带灰度值与内参β-actin灰度值的比值作为各目的蛋白条带的相对灰度，用相对灰度进行统计分析，并作图。

**结果**

ELISA方法检测结果显示：实验组浸润性膀胱癌患者尿液中BLCA-4

含量中位数为1.593，增生组含量为0.319，结石组含量为0.238，正常组为

0.194，浸润性膀胱癌患者尿液BLCA-4蛋白含量显著高于其余三组

（*P*<0.05），增生组BLCA-4含量较正常对照组升高（*P*<0.05）；BLCA-4在T2a含量中位数为1.409，T2b中含量为1.675，T3+T4中含量为1.582，在中高分化膀胱癌尿液BLCA-4为1.416、低分化膀胱癌尿液BLCA-4为1.817，膀胱癌患者尿液BLCA-4含量在不同分级分期之间差别无统计学意义

（*P*> 0.05）；肿瘤直径大小＜2cm BLCA-4含量为0.966和肿瘤直径大小

≥2cm含量为1.809，膀胱癌患者尿液BLCA-4含量与肿瘤大小有关

（*P*<0.05）。确定临界值为0.620ng/ml时，尿BLCA-4检测浸润性膀胱癌的灵敏度、特异度最佳，分别为91.6%（22/24）和100%；实验组浸润性膀胱癌患者血清中BLCA-4含量中位数为5.808，增生组、结石组、正常组患者血清中BLCA-4的含量分别为5.718、5.076、4.995，结果分析无统计学意义（*P*> 0.05）。（见Fig1、2、3、4, Tab1、2、3）。

免疫组织化学检测结果显示：浸润性膀胱癌组织中BLCA-4的表达阳性率（77.8%）明显高于对照组前列腺增生患者膀胱组织中的表达阳性率

（2.56%），BLCA-4在中高分化和低分化癌组织中表达阳性率分别为65%和93.7%，BLCA-4在T2a、T2b和T3-T4中表达阳性率分别为64.3%、72.7%和100%，BLCA-4的表达与肿瘤分级（*P*＜0.05）分期（*P*＜0.05）有相关性；癌旁组织（距切缘2cm内）中BLCA-4表达阳性率为50%（36/72）；与患者年龄（*P*=0.801）、性别（*P*=0.289）、肿瘤数量（*P*=0.526）、肿瘤大小

（*P*=0.076）、手术方式（*P*=0.848）无明显相关性（*P*＞0.05）（见Fig7、8、

9，Tab5)。

Western-Blotting结果显示：浸润性膀胱癌组织中BLCA-4表达为0.828±0.267，癌旁组织表达为0.591±0.259，前列腺增生患者组织中表达为0.242±0.116，BLCA-4在在浸润性膀胱癌组织中表达较高，在癌旁组织中也有表达，在前列腺增生患者膀胱组织中基本无表达，三者表达差异有统计学意义（P＜0.05）(Fig5、6, Tab4)。

**附图**

1.4

1.2

1

0.8

ng/ml

0.6

0.4

0.2

0

Normal group Prostate hyperplasia group

Urinary calculi group

Bladder cancer group

Fig. 1 The content of BLCA-4 in normal groups, prostatic hyperplasia groups, urinary calculi groups and bladder cancer groups in urine by ELISA

3.5

3

2.5

2

ng/ml

1.5

1

0.5

0

T2a T2b T3+T4 high and middle

low

Fig. 2 The relationship between the content of BLCA-4 and the bladder cancer classification stage in urine by ELISA

3

2.5

2

1.5

ng/ml

1

0.5

0

＜2cm≥2cm

Fig. 3 The relationship between the content of BLCA-4 and the tumor size in urine by ELISA

10

9

8

7

6

ng/ml

5

4

3

2

1

0

Normal group Prostate hyperplasia

group

Urinary calculi group

Bladder cancer group

Fig. 4 The content of BLCA-4 in normal groups, prostatic hyperplasia groups, urinary calculi groups and bladder cancer groups in serum by ELISA

# 5 A 5C 61A 61C 89C 17N 35N



目的条带β-actin



Fig. 5 The expression of BLCA-4 in the organization detected by Western-blotting A: tumor adjacent tissues, C: cancer tissues, N: normal bladder tissues

1.2

1

0.8

0.6

0.4

0.2

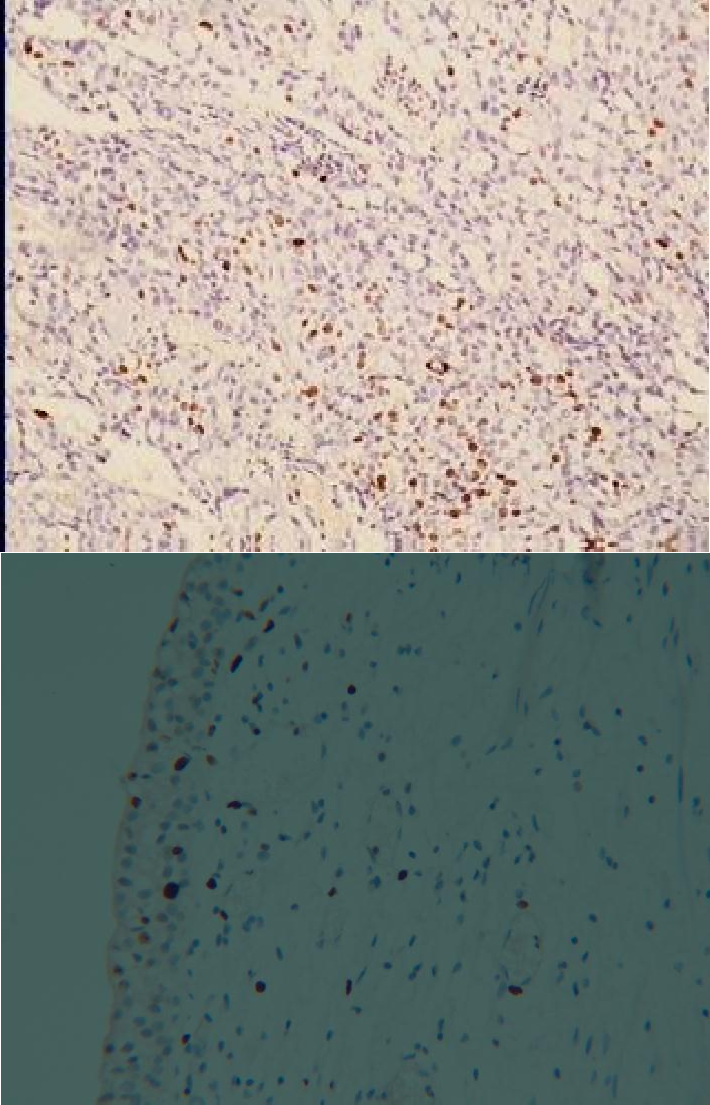
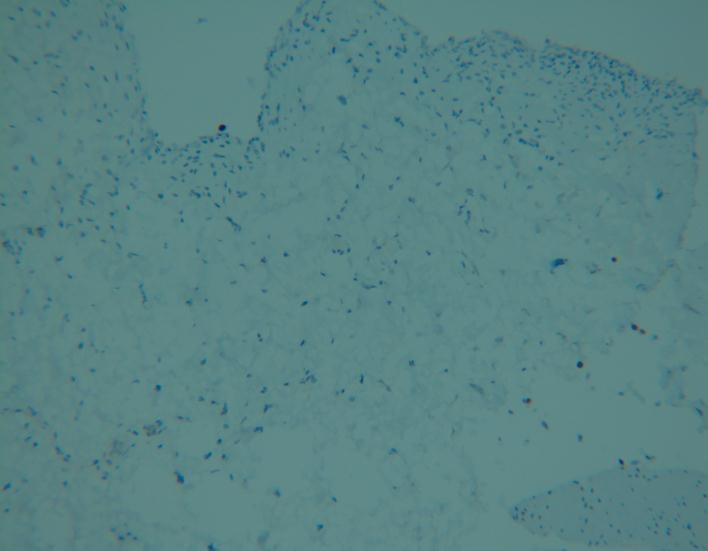
0

Bladder cancer Tumor adjacent tissue Hyperplasia of prostate

tissue

Groups

Fig. 6 The expression of BLCA-4 in the organization detected by Western-blotting



A

B

C

Fig. 7 The expression of BLCA-4 in the organization detected by immunohistochemistry（200×）A. normal bladder tissues B. bladder cancer tissue

C. bladder cancer adjacent tissues

28



A



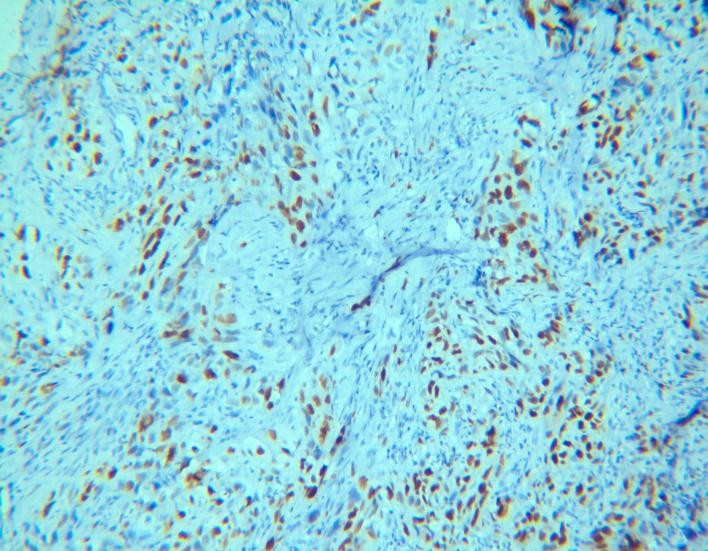
B

Fig. 8 The expression of BLCA-4 in the organization detected by immunohistochemistry A. poorly differentiated carcinoma tissue（400×）

B. high differentiation carcinoma tissue(200×)

29

30



A

B

C

Fig.9 The expression of BLCA-4 in the organization detected by

immunohistochemistry A. carcinoma tissue of T2a（200×）B. carcinoma tissue of T2b（200×） C. carcinoma tissue of T3 and T4（400×）

**附表**

Table 1 The content of BLCA-4 in normal groups, prostatic hyperplasia groups, urinary calculi groups and bladder cancer groups in urine by ELISA(M±Qd , ng/ml)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Group | N | BLCA-4 |
| Normal group | 14 | 0.194±0. 133△ |
| Prostate hyperplasia group | 26 | 0.319±0.2 05△ |
| Urinary calculi group | 20 | 0.238±0. 173△ |
| Bladder cancer group | 24 | 1.593±0.479 |

△ *P*<0.05,compared with bladder cancer group.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Group | N | BLCA-4 |
| Normal group | 14 | 4.995±2.966 △ |
| Prostate hyperplasia group | 26 | 5.718±3.676 △ |
| Urinary calculi group | 20 | 5.076±3.114 △ |
| Bladder cancer group | 24 | 5. 808±3.534 |

Table 2 The content of BLCA-4 in normal groups, prostatic hyperplasia groups, urinary calculi groups and bladder cancer groups in blood by ELISA ((M±Qd, ng/ml)

△*P*＞0.05 compared with bladder cancer group.

Table 3 The content of BLCA-4 between the bladder cancer classification stage and tumor size by ELISA（M±Qd, ng/ml）

| Group |  | N | BLCA-4 | P |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | T2a | 7 | 1.409±1.211 |  |
| Classification stage | T2b | 9 | 1.675±1.418 | ＞0.05 |
|  | T3+T4 | 8 | 1.582±1.317 |  |
|  | High and middle | 13 | 1.416±0.308 |  |
| Differentiated degree |  |  |  | ＞0.05 |
|  | poor | 11 | 1.817±0.812 |  |
|  | ＜2 | 12 | 0.966±0.208 |  |
| Tumor size(cm) |  |  |  | ＜0.05 |
|  | ≥2 | 12 | 1.809±0 .708 |  |

Table.4 The expression of BLCA-4 in the organization detected by Western-blotting

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Group | N | BLCA-4 | *P* |
| Bladder cancer | 72 | 0.828±0.267 |  |
| Tumor adjacent tissue | 72 | 0.591±0.259 | ＜0.05 |
| Hyperplasia of prostate tissue | 78 | 0.242 ±0.116 |  |

Table.5 The expression of BLCA-4 in the organization detected by immunohistochemistry

BLCA-4 Positive

*P*χ*2*

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | N | - |  | | | | | |
| organization |  |  |
| Hyperplasia of prostate tissue | 78 | 76 | 2 | 0 | 0 | 2.56% ＜0.05 89.309 | | |
| Bladder cancer tissue | 72 | 16 | 12 | 26 | 18 | 77.8% | | |
| Differentiated degree |  |  |  |  |  |  | | |
| High and middle | 40 | 14 | 2 | 12 | 10 | 65% ＜0.05 8.502 | | |
| Poor | 32 | 2 | 4 | 14 | 8 | 93.7% | | |
| Classification stage |  |  |  |  |  |  | | |
| T2a | 28 | 10 | 4 | 10 | 4 | 64.3% |  |  |
| T2b | 22 | 6 | 2 | 8 | 6 | 72.7% | ＜0.05 | 9.559 |
| T3-T4 | 22 | 0 | 6 | 8 | 8 | 100% |  |  |

Group

+ ++ +++

Rate %

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Gender  Man | 56 | 14 | 8 | 18 | 16 | 75% |
| Woman | 16 | 2 | 4 | 8 | 2 | 87.5% |
| Age  ＜60 | 34 | 8 | 8 | 10 | 8 | 76.5% |
| ≥60 | 38 | 8 | 4 | 16 | 10 | 78.9% |
| Number of tumors |  |  |  |  |  |  |
| 1 | 40 | 10 | 10 | 16 | 4 | 75% |
| ≥2 | 32 | 6 | 2 | 10 | 14 | 81.3% |
| Tumor size  ＜2.0cm | 32 | 4 | 6 | 14 | 8 | 87.5% |
| ≥2.0cm | 40 | 12 | 6 | 12 | 10 | 70% |
| Operation methods |  |  |  |  |  |  |
| Open surgery though pubis | 30 | 7 | 1 | 10 | 12 | 76.7% |
| Transurthral resection | 42 | 9 | 11 | 16 | 6 | 78.6% |
| Tumor adjacent tissue | 72 | 36 | 20 | 16 | 0 | 50% |

|  |  |
| --- | --- |
| 0.289 | 1.125 |
| 0.801 | 0.064 |
| 0.526 | 0.402 |
| 0.076 | 3.150 |
| 0.848 | 0.037 |

**讨论**

（一）膀胱癌及检查方法概述

膀胱癌是我国泌尿系统常见的恶性肿瘤之一，在欧美等发达国家，膀胱癌在男性恶性肿瘤中占第四位，其发病率仅次于前列腺癌，在女性恶性肿瘤中占第十位，在中国人中男性占第八位，女性占第十二位，且具有逐年增高的趋势。统计数据表明，美国2010年有新发病例70530 例，同时有

14680例死亡与其有关[4]。在膀胱癌中，90%以上是移行细胞癌( TCC)，超过70%的移行细胞癌在治疗（如膀胱肿瘤电切术）后5年内再次复发，复发肿瘤中约30%恶性度增加[5]。因此，迫切需要对膀胱癌的患者进行终生

的随访和监测。膀胱癌的发生和接触致癌物质、吸烟、异物长期刺激有关，临床表现缺乏特异性的临床表现，所以膀胱癌诊断和随访监测比较困难。连续或间断性无痛性肉眼血尿是膀胱癌最常见的症状，但只有10%血尿患者最终诊断是膀胱癌，而且很大一部分膀胱癌也不表现出血尿症状[2]。所以单从临床症状来诊断和检测膀胱癌是不充分的的。

到目前为止，尿脱落细胞学检查和侵入性膀胱镜检查仍是膀胱癌诊断和后续监测的最常用方法。但是由于膀胱镜检的有创性、对早期肿瘤诊断的困难、价格昂贵，使其对膀胱肿瘤诊断和随访监测的作用受到限制。尿脱落细胞学检查已被确立为标准的非侵入性检测膀胱癌的方法，尿细胞学检查的特异性是目前无创诊断指标中最高的，也是目前NCCN指南中唯一推荐的无创诊断指标。尿脱落细胞学检查依赖于肿瘤细胞的脱落进入尿液和病理学家的正确识别。标本处理的方式方法不同，如温度、保存时间、观察者水平等可以影响检测结果。尿脱落细胞学检查的低敏感性，影响了它的临床应用。因此，需要研究出新的、更为准确的、检查价格较低的膀胱肿瘤标记物。

近些年来，伴随着分子生物学、蛋白组学和基因学等学科的发展， 出

现了许多膀胱肿瘤新的瘤标，如ImmunoCy（t 免疫荧光细胞学）、UroVysion、

核基质蛋白（NMP）、Survivin等。目前为止，美国食品和药品管理局(FDA)批准5种针对膀胱癌的尿液检测方法：尿核基质蛋白22(NMP22)、膀胱肿瘤抗原(BTA)、免疫一细胞检查法、纤维素和纤维蛋白降解产物(FDP)及荧

光原位杂交(FISH)，但这些新的瘤标还需要大规模、多中心、广泛的的研究。有的学者联合几种瘤标（如联合CYFRA21-1、UBC、TPA或NMP22等）进行检测膀胱癌实验，但是结果都不十分令人满意。而膀胱癌特异性核基质蛋白家族( BLCAs)被作为一组较为理想的、可靠的膀胱癌新型瘤标，越来越受到研究学者的关注。

（二）核基质蛋白性质及与肿瘤发生发展关系

核基质蛋白是细胞核的非染色质网状框架，由外周核纤层蛋白核孔复合体、核糖核酸蛋白网状结构和部分核仁组成[7]，它是细胞核的基本结构单位，细胞核的形态由它决定，同时还在细胞的许多过程中（包括RNA加工、转录、染色体的复制、基因调控等） 起重要的作用[8]。人体正常细胞发生癌变后，细胞、细胞核、核仁形态以及基因的表达均发生不同程度的改变，这些改变（部分的）是由作为细胞核结构单位的核基质蛋白所决定的[9]，核基质蛋白是一种非溶解性微量蛋白，细胞在凋亡过程中，核基质蛋白发生破裂分解，随组织液、血液或尿液释放到周围的环境中[10]，它约占全部细胞核蛋白的10%，本质是缺乏脂质的DNA组蛋白[11]。Fey等[12]证实，核基质蛋白具有组织类型来源的特异性。核基质蛋白多分布于细胞有丝分裂较为活跃的组织，在乳腺，结肠，骨骼和尿路上皮均发现肿瘤特异性。核基本质蛋白随着细胞的癌变而转变，所以核基质蛋白可作为恶性肿瘤出现的标志[13]。核基质蛋白释放到周围环境中，可刺激机体产生自身免疫血清，根据此发现，已经确定了多种核基质蛋白，其中某些蛋白具有组织特异性和肿瘤特异性[14.15]。许多发生癌变的细胞都有核基质蛋白成分或核结构的改变，而且，核基质蛋白能够在细胞死亡后被释放到血清和尿液中，这使核基质蛋白能作为肿瘤细胞的标志物在血液和尿液中得到检测。

（三）膀胱癌特异性核基质蛋白的发现及意义

膀胱癌特异性核基质蛋白发现于1996年，Getzenberg等[16]对17例膀胱癌组织和正常膀胱组织研究，第一次分离并确定了9种膀胱核基质蛋白，其中有6种只表达于膀胱癌组织而不表达于正常膀胱人膀胱组织中。存在于膀胱癌组织中的6种核基质蛋白，被命名BLCA-1、2、3、4、5、6, 只存在于正常人的膀胱组织中3种命名为BLNL- 1、2、3。对膀胱癌细胞系

T24、253 j和UMUC-2研究发现，6种BLCA中的5种( BLCA-1、2、3、4、

6）存在于这3种癌细胞系中，而BLNL- 1、2、3未发现存在于膀胱癌细胞系中。这些特异性核基质蛋白可以参与DNA的复制、转录、RNA的合成和细胞核形态的保持，与膀胱癌的发生发展有密切的关系。在众多研究中已发现人体各种细胞包括前列腺、肾、输尿管、乳腺、结肠、直肠、宫颈等癌变都会引起核基质蛋白的改变[17-21]。将BLCAs分子量大小、等电点以及测得的序列与先前任何一个鉴定出的人类蛋白质进行比较均无同源性

[22]. 这项研究为新的瘤标的研究奠定了理论基础。BLCA-4作为膀胱癌特

异性核基质蛋白的一种，通过检测其在膀胱肿瘤患者体液中的含量并研究其作用机制对肿瘤患者的诊断、治疗有重要的意义。

（四）BLCA-4与膀胱癌发生发展可能机制

BLCA-4与膀胱癌发生发展机制是：核支持结构的改变可能会影响到基因的表达，这在肿瘤发生发展的过程中起到重要的作用[23]。BLCA-4基因出现在膀胱癌患者组织中，通过对其提取，序列测定和分析发现它与

ETS转录因子家族的ELK-3最相似，并且与一些某些已知的转录因子相互作用，调控基因的表达[24]。T. Oikawa等研究发现ETS转录因子参与细胞的凋亡、促肿瘤形成、血管内皮生长因子VEGF的表达、血管再生、远处转移等过程[25]。2005年，Myers-Irvin等[26]通过将制备的BLCA-4 cDNA转染到不同的膀胱肿瘤细胞系，发现BLCA-4的表达导致细胞同未转染细胞相比增殖速率明显增加并且引发细胞的恶性转变，同时应用微阵列分析显示出一系列基因表达的改变，其中上调表达明显的有白细胞介素1a

（interleukin-1a, IL-1a）、血栓调节蛋白（thrombo modulin, TM）和白细胞介素8(IL-8)。BLCA-4与IL-1a、TM、IL-8存在一定的关系。

白细胞介素1是（IL-1）是机体产生主要的细胞炎性因子，参与机体炎症反应的细胞因子，有a和β两种亚型，其与肿瘤形成的关系还不明确。研究显示，在表达BLCA-4的转染癌细胞中，IL-la表达显著增加。IL-la可显著的提高基质降解酶的表达，可提高肿瘤细胞和内皮细胞的粘附的能力，这可能与癌细胞的浸润性和转移有关。但是M. Seddighzadeh等[27]发现其对肿瘤有双重作用，一方面促进肿瘤细胞的粘附，增加基质降解酶的表达，促进肿瘤浸润；另一方面研究证明IL-1能增加机体自身的免疫反应，降低肿瘤恶性表型，具有抗肿瘤作用。

血栓调节蛋白是一种位于血管内皮表面的跨膜糖蛋白，由血管内皮细

胞合成的，血浆血栓调节蛋白(PTM)是存在于血管内皮表面的跨膜糖蛋白，可与凝血酶按1: 1形成可逆性复合物，使凝血酶失去促凝作用[28]，与凝血酶相互作用通过影响蛋白C通路发挥机体抗凝血作用同时参与炎症、细胞粘附、细胞增殖等过程[29、30、31]。有文献报道TM量在许多恶性肿瘤疾病中升高[32]，BLCA-4的过表达引起TM量的升高，为肿瘤组织疏通微循环血管，为它提供了良好的供养环境。有文献报道，PTM是尿道上皮癌的一项敏感的标记。

白介素8（IL-8）在许多种肿瘤中都有表达，是趋化因子家族的一员。参与细胞的增殖，是细胞存活和生长的必需因子[33]。IL-8在膀胱肿瘤组织中过量表达，通过上调MMP-2和MMP-4的表达促进肿瘤的转移，另外，应用抗IL-8的抗体可以抑制肿瘤的生长[34]。在Sheryka E等[35]人的研究中已经发现膀胱肿瘤患者尿IL-8升高，2008年M. Chikazawa等[36]的研究中也证明了这一点，BLCA-4调控IL-8基因的上调，在尿路上皮细胞恶性转化和远处转移中起重要作用[37、38]。IL-8的表达与肿瘤转移能力相关[39]。已经发现膀胱移形细胞癌患者尿液中IL-8表达上调[40]。上述这些研究阐示了BLCA-4在膀胱肿瘤发生发展中的可能机制，但是还需要继续深入研究。

（五）BLCA-4在体液中表达的研究

已发现BLCA-4对膀胱癌的发病机制是通过IL-1a（增强增殖和侵袭），血栓调节蛋白（保持细胞存活的血流量）和IL-8（有助于血管内皮生长）控制癌细胞的发生发展[41]。这种蛋白能够在细胞死亡后被释放到体液中，这使得核基质蛋白能作为肿瘤细胞的标志物在血液和尿液中得到检测。Van Le等前瞻性研究评估BLCA-4在使用预定的临界值的前提下检测膀胱癌敏感性89%、特异性95%[42]。2011年，上海FENG CC等[43]利用间接ELISA法检测79名膀胱肿瘤患者、31名泌尿系感染者和29名正常对照人群，结果肿瘤组尿BLCA-4水平显著高于其他两组，在临界值定为1.7×10 -4OD

units/ug时，灵敏度为97.37%，特异度为100%。在本实验中，ELISA结果显示BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中表达的灵敏度为91.6%，特异性为

100%，与以往的研究结果类似。而且本实验结果显示浸润性膀胱癌患者尿液BLCA-4的含量与膀胱癌的分级、分期无相关性（P＞0.05），但是实验发现BLCA-4与肿瘤的大小（以直径2cm为界）有一定的相关性（P＜

0.5），表现为肿瘤越大，BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中的含量越高，

这可能与肿瘤暴露于尿液中的表面积的大小有关。

本实验还对浸润性膀胱癌患者血液中BLCA-4的表达进行了研究，结果发现BLCA-4在浸润性膀胱癌血液中的表达量与前列腺增生患者、泌尿系结石患者和健康体检者血液中BLCA-4的表达量无明显差异（P＞0.05），这可能是BLCA-4在血液含量较少且被血液中的高丰度蛋白所遮盖，但是BLCA-4在血液中表达无差异的明确原因还需要进行大量的深入的研究，且国际上未见相关报道。

本实验以浸润性膀胱癌作为实验组，以体检正常者、前列腺增生患者和泌尿系结石患者作为对照组，结果显示BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中的表达明显高于对照组，而且对照组BLCA-4的含量均低于预先设定的临界值，这说明BLCA-4在浸润性膀胱癌中的表达不受泌尿系其他良性疾病的影响，使得BLCA-4作为泌尿肿瘤标志物的潜力得到了进一步加强。

（六）BLCA-4在组织中表达的研究

2011年，FENG CC等[43]用免疫组织化学方法检测分析膀胱癌患者癌组织，显示BLCA-4与肿瘤分级、分期无相关性。但是2012年第三军医大学附属西南医院Qian Zhao等的研究[44]，通过免疫组化方法检测325例不同肿瘤分级、不同分期及大小的膀胱肿瘤患者组织BLCA-4的染色表达情况，结果显示G1级91例，阳性表达25例，阴性表达66例，G2-G3级234例，阳性表达153例，阴性表达81例；Ta-T1期201例，阳性表达85例，阴性表达

116例，T2-T4期124例，阳性表达93例，阴性表达31例，显示BLCA-4的表达与肿瘤的分期、分级密切相关（*P*＜0.05）。本实验以浸润性膀胱癌患者作为实验组，对照组为癌旁组织、前列腺增生患者膀胱组织，用免疫组织化学方法检测BLCA-4的表达，发现浸润性膀胱癌组织中BLCA-4的表达阳性率77.8%，明显高于对照组癌旁组织和前列腺增生患者膀胱组织中的表达阳性率50%和2.56%，说明BLCA-4在膀胱肿瘤组织、癌旁组织中有表达，而在前列腺增生患者膀胱组织中也有2.56%的表达，分析这和所用抗体为多克隆抗体有一定的关系。实验发现BLCA-4表达与肿瘤分级分期有相关性（P＜0.05），和Qian Zhao等的研究结果类似。从实验结果可以看出，BLCA-4在浸润性膀胱癌中表达阳性率很高且与肿瘤分级分期有关，可以用它作为膀胱癌筛查指标，也可以用它对肿瘤进行分级分期指导治疗和预测预后。研究结果发现BLCA-4与在组织中的表达与肿瘤大小、患者年龄、

性别、肿瘤数量、手术方式无明显相关性（P＞0.05），但是从实验也可以看出，同一分期肿瘤经尿道电切术取材标本弱阳性例数11例（26.1%）明显高于耻骨上开放手术弱阳性例数1例（3.3%），这可能与电切使组织变性有关，减弱了BLCA-4的表达。

Western-Blotting结果示，浸润性膀胱癌组织中BLCA-4表达灰度为0.828±0.267，癌旁组织表达为0.591±0.259，前列腺增生患者组织中表达为0.242±0.116，BLCA-4在浸润性膀胱癌组织、癌旁组织和在前列腺增生患者组织中表达有差异。而前列腺增生患者组织也有条带，应该与抗体是多克隆抗体有关。

（七）展望

目前对于BLCA-4研究还不完善，本实验研究对象为浸润性膀胱癌，缺乏大样本、多中心的广泛研究；所使用的抗体为多抗，对实验结果可能增加了不确定因素，现在还不能完全替代膀胱镜检查。但是BLCA一4所表现出的的敏感性高、特异性强、不易受其他疾病的影响、非侵入性、无创性等优点，为膀胱癌的诊断和监测复发提供了新的方向。由于细胞癌变与核基质蛋白的结构和成分密切相关，BLCA-4以及它所引发的一系列基因、蛋白质水平上的变化都有可能成为抗癌剂的标靶，通过联合抗BLCA-4抗体的特异性分子药物截断与肿瘤形成相关的效应过程或者制作肿瘤疫苗有望成为治疗膀胱肿瘤的新途径和方向。总之，BLCA-4作为一种新的膀胱肿瘤标记物具有广阔应用前景。

结**论**

1. BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中的表达有较高的敏感性和特异性，但其在浸润性膀胱癌患者血液中的表达无特异性和敏感性。

2. BLCA-4在浸润性膀胱癌患者尿液中的表达与肿瘤大小存在一定相关性。

3. BLCA-4在浸润性膀胱癌组织中表达的水平与膀胱癌的分级分期有相关性，与患者年龄、性别、肿瘤数量、肿瘤大小和手术方式无明显相关性。

4. BLCA-4在在浸润性膀胱癌组织、癌旁组织和在前列腺增生患者膀胱组织中表达有差异。

参考文献

[1] American Cancer Society. What Are the Key Statistics for Bladder Cancer. Washington, DC: AmericanCancerSociety, 2006.

[2] T. S. Van Le, J. Myers, B. R. Konety, T. Barder, and R. H. Get-zenberg," Functional characterization of the bladder cancer marker, BLCA-4," Clinical Cancer Research, vol. 10, no. 4, pp. 1384–1391, 2004.

[3] Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. Urology J Urology, 2005, 66: 35-63.

[4] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 133-134.

[5] Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. Urology, 1995; 45: 387-96.

[6] Lokeshwar VB, Habuchi T, Grossman HB, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. Urology J Urology, 2005, 66: 35-63.

[7] Berezney, R., and Coffey, D. S. Identification of a nuclear protein matrix. Biochem. Biophys. Res. Commun., 60: 1410–1417, 1974

[8] Getzenberg, R. H. The nuclear matrix and the regulation of gene expression: tissue specificity. J. Cell Biochem., 55: 22–31, 1994

[9] Pienta, K. J., Partin, A. W., and Coffey, D. S. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. Cancer Res., 49: 2525-2532, 1989

[10] Keesee, S. K., Briggman, J. V., Thill, G., Wu, Y. J. Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. CRC Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression, 6: 189–214, 1996

[11] Fey EG, penmanS. Nuelear martix Proteins reflect cell tyPe of origin in cultured human cells〔J). Proc Acad Sci USA, 1988, 85: 121-5.

[12] Keesee SK, Briggrman JV, Thill G, etal. UtiliZation of nuclear matrix Proteins for cancer diagnosis[J]. Crit Rev Eularyot Gene Expr,] 996, 6: 189-214

[13] Fey EG, Penman S. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 81: 859-866 [14] Keesee S, Briggman J B, Thill G, etal. Utilitation of nuclear matrix proteinfor cancer diagnosis. In: SteinG, ed. Critical review in eukaryotic gene expression, 1996: 6: 183-214.

[15] MillerTE, BeausangLA, MeacghiniM, etal. Biotecniques, 1993: 15: 1042-1047. [16] Getzenberg RH, Konety BR, Oeler TA, et al. Cancer Res, 1996; 56: 1690-1694.

[17] Boccardo F, Rubagotti A, Carmignani G, Romagnoli A, NicolòG, Barboro P, Parodi S, Patrone E, Balbi C Nuclear matrix proteins changes incancerous prostate tissues and their prognostic value in clinically localized prostate cancer. Prostate. 2003 Jun 1; 55(4): 259-64.

[18] Konety, B. R., Nangia, A. K., Nguyen, T-S. T., Veitmeier, B. N., Dhir, R., Aciemo, J. S., Becich, M. J., Hrebinko, R. L., and Getzenberg, R. H. Identification of nuclear matrix protein alterations associated with renal cell carcinoma. J. Urol., 159: 1359–1363, 1998

[19] Wright T, McGechan A. Breast cancer: new technologies for risk assessment and diagnosis. Mol Diagn. 2003; 7(1): 49-55. Review. [20] Toumpanaki A, Baltatzis GE, Gaitanarou E, Seretis E, Toumpanakis C, Aroni K, Kittas C, Voloudakis-Baltatzis IE. "Two-dimensional electrophoretic analysis of nuclear matrix proteins in human colon adenocarcinoma." Ultrastruct Pathol. 2009 Mar-Apr; 33(2): 83-91.

[21] Keesee, S. K., Meyer, J., Marchese, J., et al, A nuclear matrix protein marker for cervical dysplasia. Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res., 39: 202, 1998.

[22] T. S. Van Le, J. Myers, B. R. Konety, T. Barder, et al" Functional characterization of the bladder cancer marker, BLCA-4," Clinical Cancer Research, vol. 10, no. 4, pp. 1384–1391, 2004.

[23] B. R. Konety and R. H. Getzenberg," Nuclear structural proteins as biomarkers of cancer," Journal of Cellular Biochemistry, vol. 76, no. 33, pp. 183–191, 1999

[24] T. S. Van Le, J. Myers, B. R. Konety, T. Barder, et al" Functional

Characterization of the bladder cancer marker, BLCA-4," Clinical Cancer Research, vol. 10, no. 4, pp. 1384–1391, 2004

[25] T. Oikawa," ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy," Cancer Science, vol. 95, no. 8, pp. 626–633, 2004.

[26] J. M. Myers-Irvin, T. S. Van Le, and R. H. Getzenberg," Mechanistic analysis of the role of BLCA-4 in bladder cancer pathobiology," Cancer Research, vol. 65, no. 16, pp. 7145–7150, 2005.

[27] M. Seddighzadeh, P. Larsson, A. C. Ulfgren et al.," Low IL-1αexpression in bladder cancer tissue and survival," European Urology, vol. 43, no. 4, pp. 362–368, 2003.

[28] Parker DC, Folpe AL, Bell J. etal. Potential utility of uroplakinIII. thrombomodrlin, high molecular weight cytokeratin, and cytokeratin 20 in noninvasive, invasive, and metastatic urothelial(transitional cell) carcinormas [J]. Am J Surg pathol, 2003, 27(l): 1-10.

[29] E. M. Conway, M. Van de Wouwer, S. Pollefeyt et al.," The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factorκB and mitogen-activated protein kinase pathways," Journal of Experimental Medicine, vol. 196, No. 5, pp. 565–577, 2002

[30] C. T. Esmon and W. G. Owen," The discovery of thrombomodulin," Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 2, no.2, pp. 209–213, 2004

[31] H. C. Huang, G. Y. Shi, S. J. Jiang et al.," Thrombomodulin-mediated cell adhesion: involvement of its lectin-like domain," Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 47, pp. 46750–46759, 2003.

[32] Iqbal S. Role of thrombomodulin in cancer biology. Breast 2000; 9: 264–6 [33] S. Tseng-Rogenski and M. Liebert," Interleukin-8 is essential for normalurothelial cell survival," American Journal of Physiology, vol. 297, no. 3, pp. F816–F821, 2009.

[34] B. M. Mian, C. P. N. Dinney, C. E. Bermejo et al.," Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder

Cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-κB," Clinical Cancer Research, vol. 9, no. 8, pp. 3167–3175, 2003.

[35] Sheryka E, Wheeler MA, Hausladen DA, Weiss RM. Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell carcinoma. Urology 2003; 62: 162–6

[36] M. Chikazawa, K. Inoue, S. Fukata, T. Karashima, and T. Shuin," Expression of angiogenesis-related genes regulates different steps in the process of tumor growth and metastasis in human urothelial cell carcinoma of the urinary bladder," Pathobiology, vol. 75, no. 6, pp. 335–345, 2008.

[37] C. Escudero-Lourdes, T. Wu, J. M. Camarillo et al.," Interleukin-8 (IL-8) over-production and autocrine cell activation are key factors in monomethylarsonous acid [MMA(III)] -induced malignant transformation of urothelial cells," Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 258, pp. 10–18, 2012.

[38] Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, et al. Interleukin8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. Cancer Res 2000; 60: 2290–9.

[39] Li A, Varney M. L, Singh R. K Expression of interleukin 8 and its receptorsin human colon carcinoma cells with different metastatec potentials. Clin Cancer Res, 2001, 7: 3298一3304.

[40] Sheryka E, Wheeler MA, Hausladen DA. etal. Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell careinoma [J]. Urology, 2003, 62(1): 162-66.

[41] Myers-Irvin, J. M, Van Le, T. S., and Getzenberg, R. H. (2005) Mechanistic analysis of the role of BLCA-4 in bladder cancer pathobiology. Cancer Res. 65, 7145–7150.

[42] Van Le, T. S, Miller R, Barder, T, et al. (2005) Highly specific urine-based marker of bladder cancer. Urology 66, 1256–1260.

[43] Feng CC, Wang PH, Guan M, et al. Urinary BLCA-4 is Highly Specific

For Detection of Bladder Cancer in Chinese Han Population and Is Related to Tumor Invasiveness[J]. Folia Biologica. 2011,57(6):242-247.

[44] Qian Zhao, Wen-Hao Shen, Zhi-Wen Chen, et al. High expression level of BLCA-4 correlates with poor prognosis in human bladder cancer[J]. International Journal of Clinical and experimental pathology

(2012),5(5):422-427.

附**录**

2002年AJCC{（American Joint Commission for Cancer Staging）美国癌期划分联合委员会}膀胱癌的TNM分期和临床分期：

TNM分期：

T（原发肿瘤）

Tx原发肿瘤无法评估

T0无原发肿瘤证据

Ta非浸润性乳头状癌

Tis原位癌（扁平癌）

T1肿瘤侵入上皮下结缔组织

T2肿瘤侵犯肌层

T2a肿瘤侵犯浅肌层（内侧半）

T2b肿瘤侵犯深肌层（外侧半）

T3肿瘤侵犯膀胱周围组织

T3a显微镜下发现肿瘤侵犯膀胱周围组织

T3b肉眼可见肿瘤侵犯膀胱周围组织（膀胱外肿块）

T4肿瘤侵犯以下任一器官或组织，如前列腺、子宫、阴道、盆壁和腹壁

T4a肿瘤侵犯前列腺、子宫或阴道

T4b肿瘤侵犯盆壁或腹壁浸润性膀胱癌指T2-T4

N（淋巴结）

Nx区域淋巴结无法评估

N0无区域淋巴结转移

N1单个淋巴结转移，最大径≤2 cm

N2单个淋巴结转移，最大径＞2 cm但＜5 cm，或多个淋巴结转移，最大径＜5 cm

N3淋巴结转移，最大径≥5 cm M（远处转移）

Mx远处转移无法评估

M0无远处转移

M1远处转移

1973年世界卫生组织（WHO）膀胱癌的病理（组织学）分级：

尿路上皮癌I级：癌细胞排列很有规律，细胞核的大小基本上均一，细胞排列也有层次，肿瘤分化程度良好。

尿路上皮癌II级：癌细胞核大小不是很均匀，分层次的排列基本消失，肿瘤中度分化。

尿路上皮癌III级：癌细胞核大小不均匀，分层次的排列消失，分化不良。

**综述**

**膀胱肿瘤标记物研究进展**

**摘要：**目前膀胱癌诊断及随访主要依靠尿细胞学检查与膀胱镜检相结合的手段，现有方法不仅费用较昂贵，同时为患者带来较大的痛苦，尿液作为无创标本可提供蛋白质等是膀胱癌理想的肿瘤标记物。近年来有较多研究关注于尿液中膀胱癌肿瘤标记物的应用，本文主要对现有的尿液中膀胱癌肿瘤标记物、联合瘤标和膀胱特异性核基质蛋白进行概述，讨论其不足和研究前景。

膀胱癌仍然是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。早期做出正确的诊断对疾病的治疗与预后有重要的临床意义。在膀胱癌中90%以上是移行细胞癌( TCC)，超过70%的TCC在治疗后复发，复发肿瘤中约30%出现恶性度增加[1]，因此需要对膀胱肿瘤的患者进行终生的随访和监测。目前为止，膀胱镜检仍是膀胱癌早期诊断和随访监测的金标准。但是由于膀胱镜检的有创性、对早期肿瘤诊断困难和价格昂贵使其对膀胱肿瘤早期诊断和治疗后监测的作用受到限制。因此，需要研究新的更准确的膀胱肿瘤标记物。理想的肿瘤标记物应具有高敏感性、高特异性、操作简便、快速、费用低、易标准化、可重复、能在医师办公室进行、可预测复发及对治疗变化敏感等特点。近年来随着分子生物学和蛋白组学等学科的发展，发现了许多膀胱肿瘤新的瘤标，如BTA (膀胱肿瘤抗原)、FDP（纤维蛋白原降解产物）、

ImmunoCyt（免疫荧光细胞学）、UroVysion、核基质蛋白（NMP）等，其中膀胱癌特异性核基质蛋白- 4( bladder cancer specific nuclear matrix protein 4, BLCA- 4)被证实与癌细胞的增殖、存活和血管的生成有关，BLCA-4在尿液检测膀胱癌中以其敏感性、特异性高被广泛的关注，而BLCA-1虽然研究尚少但也表现出了极高的特异性和敏感性而逐渐引起人们的关注。下面将对现有的膀胱肿瘤标记物进行阐述。

1目前获得美国食品和药物管理局（FDA）批准用于临床的膀胱癌相关的无创诊断方法

1.1尿细胞学

尿细胞学检查已被确立为标准的非侵入性检测膀胱癌的方法，尿细胞学检查的特异性是目前无创诊断指标中最高的，也是目前NCCN指南中唯一推荐的无创诊断指标。尿细胞学检查尤其在原位癌的诊断中有较高价值。细胞学依赖于肿瘤细胞的脱落进入尿液和病理学家的正确识别。

Arora等[2]报道细胞学检查的敏感度为65.8%、特异度为100%。由于肿瘤细胞间较弱的联系使高级别的癌症更可能比低级别肿瘤细胞更容易进入尿液，这个原因使得细胞学对低级别的膀胱癌敏感度更低。多项研究已证明，尿细胞学在低级别膀胱癌的敏感性差，而在高级别的癌中敏感性和特异性都会提高。Niedworok等[3]研究发现传统尿细胞学对高级别尿路上皮癌G3的敏感度3次检测分别为85.87%、83.59% 89.15%。而已被证实低级别癌症的敏感性范围从13%至75％，高级别的癌症是80%，整体细胞学敏感性范围从25%到70％[4.5]，这说明它对诊断高级别癌有更大的优势。汇集来自36个研究，涉及14260名患者表现出了敏感性44％（95％CI, 38-51％），特异性为96％（95％CI，94-98％，也能说明它的高特异性。而标本处理的不同，如温度、保存时间、观察者水平等可以影响结果。但是尽管有这些限制，细胞学高特异性相对较低的费用使它还是成为诊断膀胱癌的骨干标记物。

定量细胞学(Quanticyt)是一个自动化的图像分析，可以定量分级的尿液细胞学。这项技术要进行膀胱冲洗，提供足够数量细胞进行分析，然后根据细胞核DNA含量及核形态，将样品分为低，中，高复发膀胱癌风险。五个研究涉及129例患者表现出58％的灵敏度（范围：45-65％）和227例患者表现出特异性为76％（范围：68-87％）[6]。Van der Poel等评估了

129例患者，并得出了69％的灵敏度和72.5％的特异性，而3级肿瘤的灵敏度将会提高到85％。这说明Quanticyt的灵敏度和肿瘤的分级是有很大关系的。大体相同的结果也被另一项研究报道105例患者敏感性为42.1％和67.9％的特异性[7] 。

1.2膀胱肿瘤抗原(BTA)

最初的BTA实验是一种乳胶凝集实验，定性测定尿中基底膜蛋白抗原。Johnston [ 8]等研究证明, BTA实验的敏感性与特异性均低于尿细胞学检查， 尤其是患有其它泌尿生殖器疾病，如膀胱炎的病人。因为BTA 实验

依赖于尿中的基底膜蛋白， 而浸润性肿瘤伴有更多的基底膜破坏， 所以

BTA实验的敏感性也会随之提高。

BTA stat和BTA-TRAK是检测膀胱肿瘤相关抗原。BTA Stat实验是定性实验，能够立即出结果。膀胱癌细胞能够释放一种人补体因子H相关蛋白，这种蛋白不能由其它上皮细胞系统产生，它能够阻止肿瘤细胞被机体的免疫细胞破坏、可能选择性给予癌细胞生长优势，在细胞培养中正常细胞不表达相关的H-蛋白，这就为BTA Stat实验提供了基础。BTA stat是一个定性的，类似于NMP22 lshtm的测试，它是FDA批准用于监视，但不是为了筛选/诊断。BTA stat的敏感性和特异性介于67%至70％和75％至

78％。而BTA-TRAK灵敏度和特异性分别为66%和65％。BTA stat表明随着组织学分级的提高灵敏度会提高；53%，76%，90％从等级1到3。BTA、BTA- stat和TBA-TRAK总敏感性及特异性分别54%~83%、80%~90%、

54%~78%和72%~95%、72%~95%、95%~97%[9]。虽然灵敏度和特异性都很高，但是泌尿生殖系创伤、结石、泌尿系急性炎症和泌尿生殖系肿瘤的病人，可产生假阳性结果，而且假阳性也会出现在接受过卡介苗治疗或肠道尿路改道或利用肠道病史的患者。目前它们仅应用于随访，如果BTA检测异常患者还需要作进一步的其它检查。

膀胱肿瘤抗原试验( BTA test)是第一个用于商业的试验。最初的报道该试验的特异度高达96%,而敏感度仅为40%~65%。后来的研究表明，由于结石病以及下尿路感染和其它一些尿路疾病等原因，该实验的假阳性可达34%。所以它的研究前景不被人们看好。

1.3 ImmunoCyt

Immunocyt利用单克隆抗体检测尿液中脱落的癌细胞。它是一种联合使用3 种单克隆抗体来检测TCC细胞表面抗原（M344、LDQ10 和

19A211）的测定方法。因为使用的单克隆抗体，所以它的灵敏度和特异性会比较高。一个前瞻性研究表明1级肿瘤敏感性为79.3％，2级肿瘤

84.1％，3级肿瘤92.1％[10]。另一系统性回顾8个研究2896例患者的研究表明，84％的总体灵敏度（95％CI, 77-91％），特异性为75％（95％CI, 78-92％）[11]。当与细胞学结合时Immunocyt的的灵敏度从78提高到至88％，特异性改变不大。Immunocyt尽管有高敏感性，但特异性低、假阳性率高， 因此还必须有赖于UC的高特异性。所以联合细胞学和

Immunocyt可能会得到敏感性和特异性都较高的结果，但由于其高成本、对器械的要求及对检验医生水平要求较高也限制了其推广。目前它仅用于尿细胞学检测之外的辅助检测。

1.4 UroVysion

UroVysion 是一种通过原位杂交的方法检查染色体拷贝数的变化及

9p21的缺失突变的方法。一些研究表明UroVysion检测有着较高的敏感性（69～96％）及特异性（65～96％）。然而，该检测需要荧光显微镜才能完成检测，对检验医生水平要求较高，使得它的应用受到很大的限制，而且目前仍缺少大样本实验验证它的高敏感性和特异性。

1.5 FDP( fibrin/ fibrinogen degradation product;尿纤维蛋白降解产物)

FDP与膀胱癌的生物学行为有关， 膀胱肿瘤细胞产生血管内皮生长因子使周围微血管壁的通透性增加，血浆蛋白外渗，并激活内源性凝血途径，形成血管外纤维蛋白凝块，纤溶酶原被尿激酶和肿瘤细胞分泌的纤溶酶原活化剂所激活，转化成纤溶酶，然后可溶解纤维蛋白沉积和邻近的纤维蛋白成为FDP进入尿液，可以通过检测尿液发现它，所以它可作为膀胱癌诊断的指标。文献[12]报道, FDP比色法试验对浅表性和浸润性膀胱癌诊断的总敏感度为82.1%，其中G1为63.2%, G2为82%, G3为95%；特异度：正常人为96%，除膀胱癌外的泌尿系统疾病患者为86%, 膀胱镜阴性患者可80%。最初的Aura Tek FDP实验已经被Accu-Dx实验取代，德国

Topsakal等报道, Accu- DX用于膀胱癌病人的监测， 敏感性和特异性分别为69. 6%和67. 9%, 同期尿细胞学检查分别为44.9%、96.4%, 并且随着肿瘤病理学分期/分级的升高, Accu- DX的阳性率也相应升高( Ta 50%, T2 100%; G1 42. 9%, G3 94. 1%), FDP 和疾病活动度有关，但对

血尿、膀胱炎等有较高的假阳性率[ 13]。由于产品质量的稳定性原因，该试剂盒目前在美国已停止生产。这使得FDP的检测要回到实验室中进行而且要排除其他的干扰因素，虽然它的敏感度和特异度都很高而且与肿瘤分期关系密切，但要使它作为稳定的标记物还要做大量的研究。

上面这些用于检测膀胱癌的实验方法在一定程度上使得检测膀胱癌的敏感性和特异性有很大提高，有些还和肿瘤的分期分级有相关性，这些研究对于今后研究理想的标记物有很大的帮助，但同时也有很多问题如对膀胱癌诊断最重要的指标敏感性和特异性始终不能得到令人满意的结果、

有的实验要求的条件极为苛刻、价格昂贵、容易受到主观因素的影响等这些问题使得单一的瘤标要广泛的用于临床实践是十分困难的。

2联合瘤标检测

因为单一瘤标的种种不足，这就使得多瘤标联合应用被人们广泛的关注，这种方法的依据是肿瘤在发生、生长、浸润、转移等方面都有自己的特点，单一瘤标因子做为肿瘤的特征性产物，只反映了肿瘤生物学行为的某一阶段或某一方面的特点， 因此联合瘤标的选择必须从肿瘤生物学行为整体和发展变化的角度去把握， 能兼顾反映肿瘤的各个阶段和不同方面特征。而且针对肿瘤生物学行为不同阶段、不同性质的尿瘤标联合，能有效提高诊断的灵敏度和特异度，防止漏诊误诊， 是一种更有希望的

BTCC检测手段，接近理想瘤标的标准。

2003年陈权等[14]应用酶联疫吸附试验(ELISA)检测泌尿道疾病患者和膀胱癌患者尿中BTA、NMP22的浓度，并与正常组进行对比，利ROC曲线，评价BTA、NMP22在诊断时的价值，当BTA的临床判断值为12。

4ng/ml时，诊断灵敏度为75. 0%，特异性为83. 2%；当NMP22的临床判断值为11. 2U/ L时，诊断灵敏度为92. 9%，特异性为93. 3%。两指标的联合应用BTA、NMP22分别以12. 4 ng/ ml和11.2U/ L为判断限联合检测，特异性为82.6%, 灵敏度为96.4%。实验显示瘤标联合检测比单一的检测效果好，接着2004年ft东大学第二医院泌尿外科周春文等对45例BTCC患者，同时分别以抗体夹心ELISA方法检测尿细胞角蛋白（CYFRA21-1）、血管内皮生长因子（VEGF），TRAP方法检测尿端粒酶。三种瘤标联合检测的灵敏度与单一瘤标检测结果比较，尿CYFRA21-1、端粒酶、VEGF诊断BTCC的灵敏度分别为82.2%、77.8%、84.4%，联合瘤标诊断BTCC的灵敏度为95. 6%。联合检测的灵敏度要远高于单一一种瘤标。Sanchez-Carbayo等[15]也有类似的认为，他们检测CYFRA21-1、UBC、TPA或NMP22等这些作为瘤标的蛋白成分，这些蛋白成分具有高度结构和功能差异，能反映肿瘤细胞的不同特点，联合检测应比单一瘤标有更高的灵敏度。结果显示，四种瘤标联合检测的灵敏度(91.9%)高于任三种的组合

（89.2%~91%）,更高于任两种的组合(85.6%~88.3%). Giannopoulos等的研究也证实BTA、UBC、NMP22三者联合检测的灵敏度为94.9%,高于任何两种联合检测结果。这些研究使得瘤标的研究有了新的方向。

2009年李扬等应用酶联免疫吸附试验( ELISA) 检测膀胱癌疑似尿中

NMP22、尿膀胱癌抗原（UBC）、BTA的浓度，并与正常组进行对比，得到结果当NMP22的临床判断值为10.0U/ml时，NMP22检测敏感性

76.5%，特异性72%，阳性预测值为78.8％，阴性预测值为69.2%; UBC临床判断值为12μg/ml时，检测敏感性67.5%，特异性76%，阳性预测值为79.3％，阴性预测值为63.3％；BTA临床判断值为11.2U/ml时，检查敏感性73. 5%，特异性64%，阳性预测值为73.5%，阴性预测值为64%。

3种肿瘤标记物联合检测敏感性97.1%，特异性为80%，阳性预测值为

86.8％，阴性预测值为95.2％。联合检测的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值显著高于任何单一肿瘤标记物检测。在2010年金美花等[16]用酶联免疫标记技术队60例患者进行HAase和NMP-22检测，HAase、NMP-22联合检测对膀胱癌诊断有较高的灵敏度( 95.1%)、特异度( 80.9%)和精确度(90.3%)相比Haase的灵敏度89.1%特异度86.4%准确度86.1%和NMP22的灵敏度74.3%特异度85.2%准确度78.6%有显著的提高。这些实验证实了联合流标检测的优势，因为它测试的联合瘤标要比单一的瘤标能更全面的反映肿瘤的各个阶段和不同方面特征，不会遗漏，因检测片面发生漏诊误诊几率减小。

联合瘤标检测实验取得了明显的成果，它使得检测膀胱癌的敏感性和特异性有了很大的提高，为瘤标的研究提供了一个新的方向。但是这些研究都只停留在灵敏度和/或特异性方面，研究的瘤标也不尽相同，不能得到一个被认可的组合，没有更加深入全面广泛的研究，加之检测成本高，瘤标经典的组合方式还无定论等问题使得这项研究需要大量的工作要做。但这种联合研究方式可能对肿瘤诊断产生重大的影响。

3核基质蛋白

近年来，随着科学技术的发展，人们的目光又被另外一种膀胱癌标记物所吸引，它就是膀胱癌特异性核基质蛋白，它不光在诊断监测发面有其他标志物所不具备的高敏感性和特异性，而且对治疗、判断预后都有独特的作用。

核基质蛋白是核基质的重要组成部分，约占全部核蛋白的10%，是缺乏脂质的DNA组蛋白， 它构成细胞核网状骨架结构的一个组成部分， 在

DNA的复制、转录、以及mRNA 的加工处理和调整等方面起重要作用

[ 17]，所以核基质蛋白对细胞核的形态结构功能影响很大。许多癌变细胞都有核基质蛋白成分和结构的转变， 而且核基质蛋能够在细胞死亡后被释放到血清和尿液中，这使得核基质蛋白可作为肿瘤细胞的标志在血液和尿液中得到检测。

1996年Getzenberg等[18]对17例膀胱癌组织和正常组织研究首次分离

确定了9种膀胱核基质蛋白，其中6种只在膀胱癌组织中表达而在正常膀胱人膀胱组织中缺乏，这6种核基质蛋白命名BLCA-1、2、3、4、5、6，另外3种只存在于正常人的膀胱组织中，命名为BLNL- 1、2、3。对膀胱癌细胞系253 j、T24和UMUC-2 研究中发现6种BLCA的5种（BLCA-1、

2、3、4、6）存在于3种癌细胞系中, BLNL1- BLNL3未发现存在于癌细胞系中。这些特异性核基质蛋白参与DNA的复制、RNA的合成和细胞核形态的保持，与膀胱癌的发生发展密切相关。这项研究为早期诊断膀胱癌和检测膀胱癌复发提供新的瘤标奠定了理论基础。

3.1 NMP22

1974年，细胞核的结构成分核基质，被首次揭示，这种非染色体结构参与核的形成，组成DNA并对DNA的复制、转录和RNA的合成起重要作用[19]。NMP22其实不是特异性核基质蛋白，而是一种核有丝分裂体蛋白，存在于所有种类细胞的核基质， 核有丝分裂体蛋白虽然具有高度的免疫性，但它在核基质中处于一个相对低的水平。NMP22在凋亡过程中从肿瘤细胞的核中释放，正常人体内NMP22水平很低， 患有膀胱癌的病人

NMP22水平增高25倍[20]，这也是它能成为膀胱癌标志物的基础。一项

FDA推荐的NMP22试剂盒， 通过酶联免疫实验， 可发现和测定尿中

NMP22. Soloway [ 21]等研究认为，以NMP22超过10Units/ml为阳性，它对膀胱癌诊断的敏感性为61.2%, 特异性为89.9%,对浸润性膀胱癌诊断的敏感性为100%。在另一项前瞻性研究中Grossman等人通过对668例膀胱癌患者的研究发现NMP22检测与膀胱镜检相结合应用比单纯膀胱镜检对膀胱癌的诊断敏感性要高，然而NMP22检测的特异性并不令人满意

（40~90%），同样有着较高的假阳性率。研究表明膀胱癌患者尿中NMP22水平增高，与肿瘤的分级、分期无明显相关，而且良性泌尿系统疾病的病人NMP22也有所增高，但明显低于膀胱癌病人。这就要求要有一个合适的临界值，当降低临界值以NMP22大于7Units/ml 为标准时，敏感性提

高为81%, 特异性为77%,但至今还没有一个合适的临界值来作为检测

NMP22的标准。由于NMP22检测结果稳定、可靠、简单、快速，使之成为一种很有价值的膀胱癌诊断性尿标记物。已经被美国FDA批准用于膀胱肿瘤的筛查和监测肿瘤的复发， 这使NMP22成为泌尿生殖系统肿瘤继

PSA之后的第二个分子标记物.

3.2 BLCA-4

BLCA-4是一种膀胱癌组织中的特异性核基质蛋白。它拥有一个强有力的基于尿液的膀胱肿瘤标记物的巨大潜力。BLCA- 4 表达在所有膀胱癌患者的膀胱肿瘤组织和癌旁正常组织中，在正常人膀胱组织中不表达。已发现这种蛋白对膀胱癌的发病机制，通过IL-1α（增强增殖和侵袭），血栓调节蛋白（保持细胞存活的血流量）和IL-8（有助于血管内皮生长）控制癌细胞的发生发展[22]。Van Le等前瞻性评估BLCA-4在使用预定的临界值的前提下它有89％的敏感性和95％的膀胱癌检测的特异性[23]。因为BLCA-4不受肿瘤级别的影响，和尿路感染史，吸烟，导尿，或膀胱炎无明显的相关性，这使得BLCA-4作为泌尿肿瘤标志物的潜力得到了进一步加强。而且BLCA- 4还可用于普通人群和膀胱癌高危人群的筛选和监测。[Nguyen TS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Nguyen%20TS%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=10953114)等用免疫方法检测了51例正常对照组受试者、55例膀胱肿瘤患者以及202例脊髓损伤病人尿中BLCA-4的水平，正常受检者尿中BLCA-4 水平均低于所设临界值( 13 optical density units perug protein), 膀胱癌患者中有53例，脊髓损伤患者中有38例尿BLCA- 4水平高于临界值。学者们认为尿样中BLCA-4水平升高可能有助于从正常人中准确识别膀胱癌的发生。而且它在癌旁组织中也有表现，因此BLCA-4也可以用来筛查肉眼未能见的早期肿瘤。这些证明BLCA-4可能是膀胱癌早期的标志物。2004年Van Le等[24]在利用F334大鼠制作的膀胱肿瘤模型中，通过免疫印迹法检测到肿瘤形成前期鼠尿液和膀胱组织BLCA-4阳性，正常对照组大鼠则阴性更进一步证明了尿BLCA-4的早期预防应用价值。因此作者认为尿BLCA-4有可能成为高潜能膀胱肿瘤标记物， 用于普通人群和高危人群（ 脊髓损伤者） 膀胱癌的筛选、诊断和监测。

肿瘤的分期、分级与肿瘤患者的预后、生存期有重大的关系，一个价值高的标记物应该能对医生的治疗预期有很好的指导作用。BLCA-4是否与这些相关，2011年，上海FENG CC等[25] 利用间接ELISA法检测79

名膀胱肿瘤患者、31名泌尿系感染者和29名正常对照人群，结果肿瘤组尿BLCA-4水平显著高于其他两组，在临界值定为1.7×10 -4OD units/ug时，灵敏度为97.37%，特异度为100%，并且发现尿BLCA水平与肿瘤是否浸润相关，肌肉浸润患者BLCA-4水平更高，但同时发现尿BLCA-4的水平在连续的分期和分级上表达却没有差异，免疫组织化学方法检测分析也未显示BLCA-4与肿瘤分级、分期的相关性。但是2012年，第三军医大学附属西南医院Qian Zhao等的研究[26]，通过免疫组化方法检测325例不同肿瘤分级、不同分期及大小的膀胱肿瘤患者组织BLCA-4的染色表达情况，结果显示254例（78.2%）肿瘤患者组织表达阳性，有178 例

（54.8%）组织强阳性表达，显示BLCA-4的过度表达与肿瘤的分期、分级密切相关，但未发现其与患者年龄、性别、肿瘤的大小和数目相关，多元线性回归分析表明BLCA-4在预测膀胱肿瘤患者整体生存率上是一个独立影响因子。两个实验显示结果不相同。根据上述研究结果，作者认为BLCA-4对医生判断肿瘤患者预后等问题上有一定帮助，但是BLCA-4与肿瘤分期、分级关系尚不能定论还需要进一步的更加广泛的研究。

文献表明特异性核基质蛋白的结构和成分对细胞癌变有重大作用，BLCA-4以及它所引发的一系列基因、蛋白质水平上的变化都有可能成为抗癌药物的标靶，通过结合抗BLCA-4抗体的特异性分子药物对肿瘤形成相关的效应过程进行干扰或者制作肿瘤疫苗对早期肿瘤细胞进行杀伤有望成为治疗膀胱肿瘤的新途径和方向。

3.3 BLCA-1

研究显示BLCA-1只存在于膀胱癌患者的组织中，而不存在于正常的临近组织中或正常供者的组织中，使用临界值为0.025光密度单位，25个膀胱癌样品中有20检测到BLCA-1, 46个正常人中只有6个可以检测到，2005年Myers-Irvin等分别用ELISA和Weserten Blot检测膀胱癌组织和尿液中的BLCA-1，结果显示BLCA-1在膀胱癌组比正常样品组表达水平高很多，得到80％的敏感性和87％的特异性.而BLCA-1的表达与肿瘤分级无相关性[27]。

BLCA-1的基因类似于TI-227H（癌症转移相关基因），这种基因从B16-F10老鼠的黑色素瘤中分离出来，在1996被Ishiguro等发现。BLCA-1的基因与TI-227H同源性说明BLCA-1可能能够区分原位癌和转移性癌，

但是现在为止的研究仍然没有发现BLCA-1与癌症分期有关，现如今对它的研究还很少许多问题还未解决。

4其他肿瘤标记物

膀胱肿瘤标记物还有癌胚抗原、白介素、酸性成纤维细胞生长因子、端粒酶、自分泌因子、肿瘤胶原酶刺激因子、尿激酶型纤溶酶原激活剂、层黏蛋白、纤维连接蛋白，Survivin、E-钙黏素(E-cad)、HAase、、FN、L-selectin、MCM5、P27、MSI、BGA、integrin、centrosome等，有的报道取得了较好效果，它们对有膀胱刺激征和血尿的患者筛查及监测肿瘤复发有积极作用，但由于观察时间短，缺乏循证医学支持，作为临床诊断的手段还有待进一步研究，尚未在临床上广泛推广应用。

5总结与展望

传统的瘤标研究的很多，取得了很不错的成果，检测的灵敏度和特异性提高，与肿瘤分期分级相关性研究对判断预后有很大的帮助，但同时也有很多问题，如对膀胱癌诊断最重要的指标敏感性和特异性始终不能得到令人满意的结果、有的实验要求的条件极为苛刻、价格昂贵、假阳性率高、容易受到主观因素的影响等这些问题使得单一的瘤标要广泛的用于临床实践是十分困难的。通过表-1可以看出联合瘤标检测取得了明显的成果，它使得检测膀胱癌的敏感性和特异性有了很大的提高，为瘤标的研究提供了一个新的方向。但是这些研究都只停留在灵敏度和/或特异性方面，没有更加深入全面广泛的研究，加之检测成本高，瘤标经典的组合方式还无定论等问题使得这项研究需要大量的工作要做。在进行更加广泛、深入、全面的研究后，可能会的到令人满意的结果。

核基质蛋白22 (NMP-22)是最早用于诊断膀胱癌的核基质蛋白，已经被美国FDA批准用于膀胱肿瘤的筛查和监测肿瘤的复发，这使NMP22成为泌尿生殖系统肿瘤继PSA之后的第二个分子标记物，但NMP22不属于特异性核基质蛋白，这也就决定了它的检测条件要非常的苛刻，任何刺激尿路上皮细胞导致其快速更新的因素如泌尿生殖系感染、尿道结石、其他泌尿系肿瘤、肠代膀胱术、腔内器械操作等均能引起NMP22水平的升高，产生假阳性，从而削弱了NMP22的临床应用价值。根据它的高敏感性可以和其它特异性高的瘤标联合应用，可能会有比较不错的效果。

膀胱癌特异性核基质蛋白4（BLCA-4）被初步认定是一项无创性、高敏感度、高特异度的膀胱癌特异性肿瘤标记物。它最大的优势是基于尿液分析BLCA-4检测除了可以用于诊断膀胱癌还可用于膀胱癌的诊断和在普通人群及和高危群体如脊髓损伤病人中进行膀胱癌的筛选和监测，这一点是以往研究的众多的标志物所不具备的特点。而且BLCA-4不会受到泌尿系统结石，插管，炎症等因素的影响。BLCA-4在诊断膀胱肿瘤的高特异性、高敏感性是其它膀胱肿瘤记志物如NMP22、BTA 、细胞学、

ImmunoCyt、UroVysion、FDP等无法比拟的，而且可以和单克隆抗体药物结合对膀胱肿瘤进行治疗。这些都是BLCA-4有别于其它标志物的价值优势。

但其研究尚处初步阶段还有许多需要解决的问题如（1）、检测BLCA-4的抗体为抗人BLCA-4多克隆抗体，更加特异的单克隆抗体正在研究将使检测结果可能会更加准确，但现今的研究应用的都是多克隆抗体，单克隆抗体的效果未知。（2）、现今对其做的研究范围较小如只对汉民族和欧美地区的小范围进行了研究，其他民族和地区的研究没有、而且病例较少只是收集了少部分的病例，缺少大样本的研究来证实它的敏感性高和特异性强。（3）、它不存在于正常的人体中只存在于肿瘤组织和肿瘤旁组织中，但是研究表明尿中BLCA-4的的敏感性和特异性并未达到100%，而且在正常人体样品中也有检测到，原因是还有我们不知道的因素影响还是实验方法的问题我们还不清楚，作者认为建立更高的正常临界值可能会解决这个问题，但是有待具体的研究进行解决。（4）、血液中BLCA-4表达与尿液中是否一致未曾被研究。（5）、BLCA-4是否与肿瘤的分期、分级有相关性和如何通过它的数值对肿瘤进行分期、分级，这些问题尚无定论还有待研究。

BLCA-1的研究只是初步研究，只知道它存在于肿瘤组织中，在邻近组织和正常人的组织中缺失，这使得BLCA-1不光在膀胱癌的诊断和检测上有和BLCA-4一样的优势，同时使得它在用单克隆抗体的治疗肿瘤时有更大的优势，因为这样就可以更加精确的定位肿瘤细胞予以杀伤。但是BLCA-1的研究太少，许多问题还未解决，如它在膀胱癌癌变转化和形成中的联系与作用、致癌机制、在尿液和在血液中是否表现的和BLCA-4一样、是否和肿瘤分期分级有关、是否受泌尿道其他疾病的影响等问题都

不清楚，所以对BLCA-1的研究应该更加深入更加引起人们的重视。它很可能为膀胱肿瘤的诊断、检测和治疗提供更加好的希望。

目前BLCAS的其余成员BLCA- 2，3，5，6在膀胱癌诊断上的价值如何尚无报道，许多问题需要研究如各成员在膀胱癌癌变转化和形成中的相互联系与作用、致癌机制亦不清楚，抗BLCAS抗体在膀胱癌治疗上的价值和意义更未知晓。因此，有必要对膀胱癌特异性核基质蛋白（BLCAS）进行更广泛而深入的研究。BLCAS很可能成为诊断膀胱肿瘤的价值最高的标记物。

参考文献

[1] Messing EM, Young TB, Hunt VB, et al. [Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations[J].](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7879333) Urology, 1995, 45(3): 387-96.

[2] Arora VK, Sarungbam J, Bhatia A, et al. Usefulness of NMP22 as an adjunctto a typical urine cytology and low-grade urothelial carcinoma [J]. Diagn Cytopathol 2010, 38(14): 56-58.

[3] Niedworok C, Rembrink V, Hakenberg OW, et al. The value of urinary cytology in the diagnosis of high grade urothelial tumors[J]. Urologe A, 2009, 48(9): 1018, 1020-2, 1024.

[4] Villicana P, Whiting B, Goodison S, et al. Urine-based assays for the detection of bladder cancer. Biomark Med[J]. 2009, 1; 3(3): 265.

[5] Tritschler S, Sommer ML, Straub J, et al. Urinary cytology in era of fluorescence endoscopy: redefining the role of an established method with a newreference standard[J]. Urology, 2010, 76(3): 677-80.

[6] van Rhijn BW, van der Poel, HG, van der Kwast TH. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review[J]. Eur Urol, 2005, 47(6): 736-48.

[7] Moonen PM, Merkx GF, Peelen P, et al. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer[J]. Eur Urol, 2007, 51(5), 1275-1280.

[8] Johnston B, Morales A, Emerson L, et al. Rapid detection of bladder cancer: a comparative study of point of care tests[J]. Urol, 1997, 158(6): 2098-101.

[[9] Mutlu N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mutlu%20N%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12964816), [Turkeri L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Turkeri%20L%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12964816), [Emerk K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Emerk%20K%5bAuthor%5d&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12964816). Analytical and clinical evaluation of a new urinary tumor marker[J]. Clin Chem Lab Med, 2003, 41(8): 1069-1074.

[10] Mian C, Maier K, Comploj E, et al. uCyt+/Immunocyt in the detection of recurrent urothelial carcinoma: an update on 1991 analyses[J]. Cancer, 2006, 108(1), 60–5.

[11] Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost effectiveness of photodynamic diagnosis and

Urinebiomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer[J]. Health Technol Assess,2010, 14(4) 1–331.

[12] Johnston B, Morales A, Emerson L, et al. Rapid detection of bladder cancer: a comparative study of point of care tests[J]. JUrol, 1997, 158(6): 2098-101.

[13] Topsakal M, Karadeniz T, Anac M, et al. Assessment of fibrin-fibrinogen degradation products (Accu-Dx) test in bladder cancer patients[J]. Eur Urol, 2001, 39(3): 287-91.

[14] 陈权, 赵雪梅. 膀胱癌抗原、核基质蛋白对膀胱癌的诊断价值[J]. 检验医学, 2004, 19(3): 191-193.

[15] Sanchez-Carbayo M, Herrero E, Meglas J, et al. Comparative sensitivity of urinary CYFRA21-1, urinary bladder cancer antigen, tissue polypeptide antigen and NMP22 to detect bladder cancer[J]. J Urol, 1999, 162(6): 1951-6.

[16] 金美花, 德伟林等. 联合检测尿HAase和NMP-22活性水平在膀胱癌诊断和手术后复发的研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14（8）: 1198-1199.

[17] Pardoll DM, Vogelstein B, Coffey DS. A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells[J]. Cell, 1980, 19(2): 527-36.

[18] Getzenberg RH, Konety BR, Oeler TA, et al. Bladder cancer-associated nuclear matrix proteins[J]. Cancer Res, 1996, 56(7): 1690-1694.

[19] Shelfo SW, Soloway MS. The role of nuclear matrix protein 22 in the detection of persistent or recurrent transitional-cell cancer of the bladder[J]. World J Urol, 1997, 15(2): 107-11.

[20] Keesee SK, Briggman JV, Thill G, et al. Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1996, 6(2-3): 189-214.

[21] Soloway MS, Briggman JV, Carpinito GA, et al. Urinary nuclear matrix protein as a marker for transitional cell carcinoma of the urinary tract[J]. J Urol, 1996, 156(4): 1280-5.

[22] Myers-Irvin JM, Van Le TS, Getzenberg RH. Mechanistic analysis of the role of BLCA-4 in bladder cancer pathobiology[J]. Cancer Res, 2005, 65(16), 7145–50.

[23] Van Le TS, Miller R, Barder T, et al. Highly specific urine-based marker of bladder cancer[J]. Urology, 2005, 66(6): 1256–60.

[24] Van Le TS, Myers J, Konety BR, et al. Functional characterization of the bladder cancer marker, BLCA-4[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(4): 1384-1391.

[25] Feng CC, Wang PH, Guan M, et al. Urinary BLCA-4 is Highly Specific for Detection of Bladder Cancer in Chinese Han Population and Is Related to Tumor Invasiveness[J]. Folia Biologica, 2011, 57(6): 242-247.

[26] Qian Zhao, Wen-Hao Shen, Zhi-Wen Chen, et al. High expression level of BLCA-4 correlates with poor prognosis in human bladder cancer[J]. International Journal of Clinical and experimental pathology, 2012, 5(5): 422-427.

[27] Myers-Irvin JM, Landsittel D, Getzenberg RH. Use of the novel marker BLCA-1 for the detection of bladder cancer[J]. J Urology, 2005, 174(1): 64–8.

致**谢**

光阴似箭，充实的三年研究生生活即将结束。回首三年来的求学历程，是难忘的三年，也是宝贵的三年。值此毕业论文完成之际，我怀着深深地感激之情向那些引导我、帮助我、激励我的人致以最诚挚的谢意。

首先，衷心的感谢我的导师王志勇教授，从课题的选题、设计与研究、资料的收集与论文的撰写都倾注了导师大量的心血，给了我细心的指导与帮助。衷心的感谢导师三年来对我在学习上的严格要求，临床工作中的精心指导和谆谆教诲，以及生活中的关怀和呵护。导师崇高的医德、精湛的医术、娴熟的手术技巧、严谨的治学作风、渊博的知识以及正直向上的人格魅力深深感染激励着我，必使我终生受益。

衷心感谢承德医学院附属医院泌尿外科于满、常辉、辛立升等老师在我课题研究过程中给予我的极大帮助，以及在临床实习工作过程中给予我的耐心指导。

衷心的感谢承德医学院基础所李欣、许倩、陈龙等老师在我课题的研究及收集资料过程中给予的大力帮助和细心指导。

衷心的感谢承德医学院附属医院病理科李春辉、金小平、蔡芫、王嘉旭等老师在我课题的研究过程中给予的大力帮助和细心指导。

衷心的感谢研究生部乔跃兵主任、李德臣、张晓英和周颖等老师在我学习、科研和生活中给予的关心和帮助。

衷心的感谢王浩、张建伟、张阳、郭明、张艳等同学在我学习、科研中给予的关心和帮助。

感谢在百忙之中评阅我论文的各位专家老师。

感谢我的家人对我的支持和鼓励，感谢你们对我无微不至的关怀与爱护。

**个人简历**

**一、个人基本情况**

姓名王晓鹏性别男民族满族

出生日期1985年9月21日籍贯河北省隆化县

**二、个人经历**

2006-9至2011-7承德医学院大学本科

2011-9至2014-7承德医学院硕士研究生

三、**发表论文情况**

《膀胱肿瘤标记物研究进展》（综述）第一作者，《国际泌尿系统杂志》已发表。

《膀胱癌特异性核基质蛋白在膀胱癌诊断中的价值（论著）第一作者，《承德医学院学报》已发表。

非第一作者发表文章若干篇。

**四、承担或主研课题情况**

主研课题：特异性核基质蛋白4（BLCA-4）在浸润性膀胱癌患者体液和组织中表达的研究。