DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.034
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004


文章编号:1000-5404(2004)21-1967-04

论著

# 膀胱癌患者尿液中CK-20 mRNA检测的临床意义

王德林[1],陈在贤[1],吴小候[1],苟 欣[1],刘 航[1],尹志康[1],张云美[2],赵 勇[3],张 徽[3],刘先俊[4] (重庆医科大学:[1]附属第一医院泌尿外科,[2]中医药学院护理学教研室,[3]基础医学院病理学教研室,[4]基础医学院生物化学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨检测尿液中CK-20 mRNA诊断膀胱癌的可行性。方法 采用RT-PCR技术检测41例膀胱移形细胞癌、4例膀胱非移形细胞癌、15例膀胱炎伴血尿患者及10例健康者的尿液脱落细胞中CK-20 mRNA的表达,还包括7种不同的肿瘤细胞系(膀胱癌T24、肾癌786-0和GRC-1、乳腺癌MCF-7和MDA-MB-435、卵巢癌SKOV$_3$和3AO)。结果 膀胱移形细胞癌中36例CK-20阳性(87.80%),GⅠ为18/21(85.71%),GⅡ为11/13(84.62%),GⅢ为7/7(100%),统计差别无显著性意义($P>0.05$),$T_{a\sim1}$为20/22(90.91%),$T_{2\sim4}$为16/19(84.21%),两组差别亦无显著性意义($P>0.05$);膀胱非移形细胞癌均无CK-20阳性;膀胱炎伴血尿患者中4例CK-20阳性(特异性为73.33%);19例膀胱癌组织及T24细胞系均有CK-20 mRNA的表达,其余6种细胞系及10例健康者均为阴性。结论 CK-20在诊断膀胱癌有较高的敏感性和特异性,与膀胱癌的大小、数目、分期及分级无关,可用于膀胱癌的早期诊断和手术后随访。

关键词:膀胱肿瘤;细胞角蛋白;聚合酶链反应;尿
中图法分类号:R446.12;R446.9;R737.14 文献标识码:A

# Clinical significance of detection of CK-20 mRNA in exfoliated urothelial cells of patients with bladder cancer

WANG De-lin[1], CHEN Zai-xian[1], WU Xiao-hou[1], GOU Xin[1], LIU Hang[1], YIN Zhi-kang[1], ZHANG Yun-mei[2], ZHAO Yong[3], ZHANG Hui[3], LIU Xian-jun[4] ([1]Department of Urology, First Affiliated Hospital, [2]Department of Nursing, College of Traditional Chinese Medicine, [3]Department of Pathology, College of Basic Medicine, [4]Department of Biochemistry, College of Basic Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

**Abstract**: **Objective** To explore the feasibility of detecting the cytokeratin 20 (CK-20) mRNA in exfoliated urothelial cells for the diagnosis of bladder carcinoma. **Methods** Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of CK-20 mRNA in cells collected from the urine of 45 cases of bladder cancer, 15 cases of cystitis accompanied by hematuria, 10 healthy volunteers, and 7 different cell lines, including bladder cancer cell line T24, kidney cancer 786-0 and GRC-1, breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435, and ovary cancer SKOV3 and 3AO. **Results** CK-20 mRNA expression was detected in 36 of 41 cases of bladder transitional cell carcinoma (87.80%), in 18 of the 21 GⅠ patients (85.71%), in 11 of the 13 GⅡ patients (84.62%), in 7 of the 7 GⅢ patients (100%), in 20 of the 22 $T_{a\text{-}1}$ patients (90.91%), and in 16 of the 19 $T_{2-4}$ patients (84.21%). Sensitivity of the method was found to be 87.80%, whereas specificity was 73.33%. In 15 patients with hematuria, there were 4 cases of false positive: 1 case of BPH, 1 case of atypical hyperplasia, 1 case of chronic inflammation, and 1 case undergoing TURP previously. CK-20 amplification band was also obtained in all of 19 cases of bladder transitional cell tumor tissues and bladder cancer cell line T24, but not in 4 patients with non-transitional cell carcinoma and 6 other tumor cell lines. No false positive cases were found in the healthy control group. **Conclusion** These results suggest that CK-20 might be a useful tumor marker for early noninvasive diagnosis and follow-up of bladder cancer by detecting CK-20 mRNA expression of uroepithelial cells from the voided urine specimen by RT-PCR.

**Key words**: bladder neoplasm; cytokeratin; polymerase chain reaction; urine

---

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(渝教科 1999-16)
Supported by the Foundation for Sci &Tech Research of Chongqing Municipal Education Commission (1999-16)
作者简介:王德林(1968—),男,四川省广安市人,副主任医师,副教授,主要从事泌尿系统肿瘤、尿动力学、男子性功能障碍方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)89011009
收稿日期:2003-09-13;修回日期:2004-01-20
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

膀胱癌是国人泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一,有逐年上升趋势。膀胱癌的诊断和随访主要依靠有创伤性的膀胱镜检查,尿液脱落细胞学检查是诊断膀胱肿瘤及监测手术后复发的最常用的无创性检查方法,但后者敏感性有限并受主观因素的影响。细胞角蛋白20(cytokeratin 20, CK-20)的发现和其特殊分布,有可能成为膀胱癌早期诊断和术后随访的新方法[1~4]。本研究采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测膀胱癌患者尿液脱落细胞CK-20 mRNA,探讨其作为膀胱癌的早期诊断和手术后随访方法的可行性。

## 1 材料及方法

### 1.1 临床资料

所有病例为我科2000年1月至2002年5月诊治的患者。

45例膀胱癌患者:①移行细胞癌患者41例,其中男性30例,年龄19~84岁,平均63岁,女性11例,年龄35~73岁,平均62岁。单发肿瘤24例,多发肿瘤17例;肿瘤直径≤2 cm 25例,肿瘤直径>2 cm 16例;有淋巴结和远处转移2例,无转移39例。按照WHO标准分级为Ⅰ级21例、Ⅱ级13例, Ⅲ级7例;按照UICC标准分期为$T_a$~$T_1$ 22例、$T_2$~$T_4$ 19例。②膀胱非移行细胞癌4例,其中平滑肌肉瘤1例,粘液腺癌1例,神经鞘膜瘤1例,直肠转移腺癌1例。输尿管移行细胞癌3例。

15例膀胱炎伴血尿患者中,单纯膀胱炎伴血尿5例,BPH伴感染5例,纤维平滑肌乳头组织增生1例,纤维血管增生1例,移行上皮中-重度不典型增生伴腺性膀胱炎1例,TURP术后感染出血2例。

对照组:健康者10例,男女各5例,年龄22~65岁,平均45岁。

还包括19例膀胱移行细胞癌组织、1例肾癌组织及7种不同的肿瘤细胞系(膀胱癌细胞系T24,肾癌细胞系786-0、GRC-1,卵巢癌细胞系$SKOV_3$、3AO,乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-435)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 尿液标本的收集 所有受检者,收集新鲜晨尿100 ml,4 ℃, 1 200 r/min,离心5 min,先取尿沉渣涂片作镜检,初步了解脱落细胞数量,再立即收集沉渣细胞以Trizol(上海Sangon)提取总RNA。本组有3例尿液标本在取尿沉渣涂片作镜检时未见上皮细胞,而没有作进一步检测,予以排除统计。

1.2.2 组织标本的收集 取新鲜癌组织100 mg加入Trizol,在匀浆器内匀浆后提取总RNA。

1.2.3 细胞系的收集 将贴壁生长后的细胞系经0.25%胰酶消化后,4 ℃,1 200 r/min,离心5 min,收集细胞,以PBS或生理盐水洗2~3次,加入Trizol提取总RNA。

1.2.4 引物 引物设计参照文献[5,6]。CK-20 Sense CAGACACACGGTGAACTATGG, Antisense, GATCAGCTTCCACTGTTAGACG bp 370; β-actin Sense GACTACCTCATGAAGATCCT, Antisense GCGGATGTCCACGTCACACT bp 313由上海Sangon公司合成。

1.2.5 总RNA提取 按照Trizol操作步骤进行,提取尿液脱落细胞、癌组织及细胞系中总RNA。在紫外分光仪测定RNA含量,根据RNA在260 nm和280 nm的吸光度的比值(≥1.8)和1%琼脂糖凝胶电泳28 s和18 s RNA条带比值≥1.5鉴定RNA纯度及完整性,取2 μg(调至1 μg/μl)总RNA为模板进行逆转录成cDNA。

1.2.6 RT 按照Sangon公司MMLV第一链cDNA合成试剂盒操作步骤进行。在冰浴中,于反应管内加入2 μl总RNA、1 μl随机6合引物(0.2 μg/μl)、9 μl去离子DEPC水,混匀,高速离心3~5 s,70 ℃孵育5 min,冷却后离心3~5 s,再加入4 μl反应缓冲液X5、1 μl核酸酶抑制剂(20 U/μl)、2 μl 10 mmol/L dNTPs,混匀,高速离心3~5 s后25 ℃孵育5 min,再加入1 μl M-MuLV逆转录酶(20 U/μl),25 ℃孵育10 min,再37 ℃孵育60 min,最后70 ℃孵育10 min终止反应。

1.2.7 PCR反应 反应体系为25 μl,取4 μl cDNA加入SangonPCR反应体系,含2.5 mmol/L $MgCl_2$, 8 mmol/L引物,2.5 U *Taq* DNA聚合酶。阳性对照为膀胱癌组织,阴性对照为未作RT的总RNA或去离子水。在GeneAMP PCR System 9600(美国PE公司)进行扩增。PCR反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,40个循环;72 ℃ 10 min。取PCR扩增产物5 μl在1.5%琼脂凝胶(含0.5 μg/μl溴化乙锭),90 V,电泳20~30 min,置于紫外光灯投射仪下观察结果,CK-20 mRNA阳性者可见370 bp条带。

### 1.3 统计学处理

采用SAS6.12软件包进行$\chi^2$检验和Fisher's精确概率法。

## 2 结果

### 2.1 尿液脱落细胞CK-20mRNA的检测结果

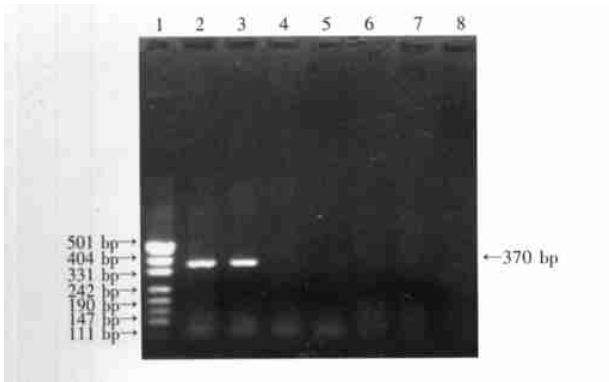
2.1.1 健康者 10例健康者的尿液脱落细胞中均无CK-20 mRNA的表达,特异性达100%。

2.1.2 膀胱炎伴血尿患者 以RT-PCR检测15例膀胱炎伴血尿的尿液标本,共4例有CK-20阳性,其中单纯炎症1例,BPH伴感染1例,移行上皮中-重度不典型增生伴腺性膀胱炎1例,TURP术后感染出血1例,CK-20的假阳性率为26.67%,特异性为73.33%。

2.1.3 肿瘤组织和7种肿瘤细胞系 19例膀胱肿瘤组织均有CK-20 mRNA的表达,而1例肾癌组织中无CK-20 mRNA的表达。在肿瘤细胞系中,除膀胱肿瘤T24外,肾癌细胞系786-0、GRC-1,卵巢癌细胞系$SKOV_3$、3AO及乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-435等6种细胞系均无CK-20 mRNA的表达(图1)。

2.1.4 膀胱癌患者 41例膀胱移行细胞癌患者,36例检测到CK-20 mRNA,阳性率为87.80%,假阴性率为12.20%。尿液中CK-20阳性率与肿瘤大小、数目、分级、分期无关($P>0.05$);4例膀胱非移行细胞癌尿液脱落细胞无CK-20 mRNA的表达;3例输尿管移行细胞癌,均为GⅡ,$T_2$期,2例尿液CK-20阳性(表1)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net




1: pUC 19 DNA/MspI(HpaII) marker; 2: Bladder cancer tissue; 3: T24; 4: 786-0; 5: GRC-1; 6: $SKOV_3$; 7: MCF-7; 8: Negative control specimen

图 1　RT-PCR 检测肿瘤组织和细胞系中 CK-20 mRNA 的表达

**Fig 1　Expression of CK-20 in bladder cancer tissue and cell lines detected by RT-PCR**

表 1　膀胱癌患者尿液 CK-20mRNA 的表达

**Tab 1　Expression of CK-20 mRNA in exfoliated urothelial cells of patients with bladder cancer**

| Item | *n* | CK-20 | *P*(Fisher) |
|---|---|---|---|
| Single tumor | 24 | 21 | 1.000 |
| Multiple tumor | 17 | 15 | |
| Diameter of tumor≤2 cm | 25 | 22 | 1.000 |
| Diameter of tumor>2 cm | 16 | 14 | |
| Lymph node metastasis (positive) | 2 | 2 | 1.000 |
| Lymph node metastasis (negative) | 39 | 34 | |
| Distant Metastasis (positive) | 2 | 2 | 1.000 |
| Distant Metastasis (negative) | 39 | 34 | |
| Grading G Ⅰ | 21 | 18 * | |
| Grading G Ⅱ | 13 | 11 * | |
| Grading G Ⅲ | 7 | 7 * | |
| Grading $T_{a\sim1}$ | 22 | 20 | 0.649 |
| Grading $T_{2\sim4}$ | 19 | 16 | |

*: $\chi^2=0.073$, $P>0.05$

### 2.2　尿液脱落细胞细胞学检查结果

对 13 例膀胱癌患者同时行尿液脱落细胞学检查, 只能确诊 1 例, 阳性率仅为 7.69%。

## 3　讨论

细胞角蛋白是分布于上皮细胞间的中间纤维丝, 它包括至少 20 个成员, 分为酸性细胞角蛋白(Ⅰ型细胞角蛋白, CK-10 ~CK-20)和碱性细胞角蛋白(Ⅱ型细胞角蛋白, CK-1 ~CK-9)[4]。人类正常尿路上皮细胞可以持续表达 CK-7、CK-8、CK-17、CK-18 和 CK-19, 并偶尔有 CK-13 的表达, 而通常不表达 CK-20[3]。但是在尿路移行上皮癌细胞中, CK-20 常呈强阳性表达[1]。这可能由于正常尿路上皮细胞中 CK-20 基因处于休眠状态, 当尿路上皮细胞发生恶性变化时, CK-20 基因被激活而发生强阳性表达。CK-20 是 Moll 等于 1990 年分离鉴定的, 除在尿路移行上皮癌有表达外, 还在结肠癌、胃腺癌、胆囊癌、胆管癌、胰管细胞腺癌、卵巢粘液腺癌呈阳性表达, 而在肾细胞癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜腺癌、卵巢非粘液腺癌、肺腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺、子宫颈、咽部、食管、皮肤处的鳞状细胞癌、非上皮癌、各种肉瘤和恶性淋巴瘤不表达, 由于其独特的分布特点和表达方式, CK-20 很快应用于某些肿瘤的病理分型、鉴别和转移的监测等[1~4]。

本研究以 RT-PCR 检测 41 例膀胱移行细胞癌患者, 36 例尿液脱落细胞检测到 CK-20 mRNA, 敏感性为 87.7%, 在检测 15 例膀胱炎伴血尿的尿液标本发现 4 例有 CK-20 阳性(其中单纯炎症 1 例、BPH 伴感染 1 例、移行上皮中-重度不典型增生伴腺性膀胱炎 1 例、TURP 术后感染出血 1 例), 特异性为 73.3%, 同时检测 10 例健康者的尿液脱落细胞中均无 CK-20 mRNA 的表达, 这些与文献[5, 6]报道较一致。较尿液脱落细胞学方法敏感, 本组尿液脱落细胞学检查阳性率仅为 7.69%, 提示 CK-20 在诊断膀胱癌有较高的敏感性和特异性。

为了进一步检测 CK-20 诊断膀胱癌的敏感性和特异性, 我们又检测膀胱癌组织、肾癌组织和细胞系中 CK-20 mRNA 的表达情况, 19 例膀胱移行细胞癌组织均有 CK-20mRNA 的表达, 膀胱癌细胞系 T24 亦有 CK-20 mRNA 的表达, 而在 1 例肾癌组织, 肾癌细胞系 786-0、GRC-1, 卵巢癌细胞系 $SKOV_3$、3AO 和乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-435 中未见 CK-20 mRNA 的表达。表明 CK-20 对膀胱癌细胞及组织有较高特异性。

本研究进一步分析 CK-20 mRNA 的检出率与膀胱癌的分期、分级、肿瘤大小、数目、有无淋巴结和远处的转移的关系, 在膀胱移形细胞癌中, G Ⅰ为 18/21 (85.71%), G Ⅱ为 11/13 (84.62%), G Ⅲ为 7/7 (100%), 两组差别无显著性意义($P>0.05$), $T_{a\sim1}$ 为 20/22 (90.91%), $T_{2\sim4}$ 为 16/19 (84.21%), 两组差别亦无显著性意义($P>0.05$), 在肿瘤大小、单发与多发、有无远处和淋巴结转移组, 亦未发现有显著性差别, 与文献[7]报道一致。

但是, 在以 RT-PCR 检测 4 例膀胱非移行细胞癌患者, 尿液脱落细胞无 CK-20 mRNA 的表达, 而在 3 例输尿管移行细胞癌患者中 2 例 CK-20 阳性, 表明 CK-20 可能仅对尿路移行细胞癌有较高的敏感性。临床上, 肾盂及输尿管癌的发生率较低, 膀胱癌绝大多数为移行细胞癌(>95%), 在西方国家可高达 97%[8]。故 CK-20 对尿路上皮细胞癌有较大的诊断价值。

综上所述, 通过检测膀胱癌患者的尿液脱落细胞中 CK-20 mRNA 的表达情况, 对诊断膀胱癌有较高的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

灵敏度和特异性，CK-20 有可能作为膀胱癌的早期诊断和手术后随访的肿瘤标记物，成为一种无创伤的诊断及随访方法。但是对于膀胱非移行细胞癌患者可能出现假阴性，同时，在膀胱炎症时可能出现假阳性，从而可能降低 CK-20 的诊断敏感性和特异性。

参考文献：

[1] Moll R, Schiller D L, Franke W W, *et al*. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type Ⅰ cytokeratin with unusual properities and expression patterns[J]. J Cell Biol, 1990, 111(2): 567—580.

[2] Moll R, Lowe A, Laufer J, *et al*. Cytokeratine 20 in human carcinoma. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodes[J]. Am J Pathol, 1992, 140(2): 427—447.

[3] Southgate J, Hutton K A R, Thomas D F M, *et al*. Methods in laboratory investigation normal human urothelial cells *in vitro*: proliferation and induction of stratification[J]. Lab Invest, 1994, 71(4): 583—594.

[4] Chandler I S, Calnnek D, Quaroni A, *et al*. Identification and characterization of rat instetinal keratins[J]. J Biol Chem, 1991, 266(18): 11932—11938.

[5] Klein A, Zemer R, Buchumensky V, *et al*. Expression of cytokeratine 20 in urinary cytology of patients with bladder carcinoma[J]. Cancer, 1998, 82(2): 349—354.

[6] Ohnamis S, Matsumoto N, Nakano M, *et al*. Identification of genes showing differential expression in antisense k-ras-transduced pancreatic cancer cells with suppressed tumorigenicity[J]. Cancer Res, 1999, 59(21): 5565—5571.

[7] Burchumensky V, Klein A, Zemer R, *et al*. Cytokeratin 20: A new marker for early detectation of bladder cell carcinoma[J]. J Urol, 1998, 160(6): 1971—1975.

[8] Messing E M, Catalona W. Urothelial tumors of the urinary tract[A]. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, *et al*. ed. Campbell's Urology[M]. 7th ed. Vol 3. Peking: Science Press, 2001. 2327—2391.

（编辑 陈聪连）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)21-1970-01

## 胆囊切除致肝总管横断伴小网膜囊大量积液 1 例

## A case report of common hepatic duct transection with a huge omental bursa cyst caused by cholecystectomy

郑 璐，李 靖 （第三军医大学新桥医院肝胆外科，重庆 400037）

### 1 临床资料

患者：女，26 岁，半月前因胆囊多发性结石在当地医院行胆囊切除术。术后第 3 天起逐渐出现腹胀伴恶心、呕吐胃内容物多次，呈进行性加重，B 超示：上腹部巨大囊性占位。入我院查体：皮肤、巩膜轻度黄染，腹部膨隆，上腹部压痛，轻度肌紧张，无反跳痛。可触及一约 30 cm× 30 cm 的包块，质中，轻度压痛，囊性感，欠活动。血常规：WBC 10.64× $10^9$/L，N：0.74，L：0.25，肝功 ALT 167 IU/L，AST 74 IU/L，T-Bil 43.88 μmol/L，D-Bil 34.41 μmol/L。CT 平扫示：左上腹见一 29 cm× 19 cm× 29 cm 巨大囊性病变，CT 值为 7 Hu。向右达胆囊窝内，胰腺受压，胆囊缺如。B 超示：腹部巨大囊性占位，肝门部胆管扩张，上段内径 1.9 cm，中下段结构不清。入院后经禁食、抗炎、抑制胰腺分泌等保守治疗效果不佳。第 3 天急诊行剖腹探查术，术中发现：腹腔脏器黄染，小网膜囊积液，形成巨大囊性包块，网膜孔已封闭。肝总管于左右肝管汇合下方约 1 cm 处横断，断端上方肝管扩张，直径约 1 cm，其内未发现胆囊管开口。断端下方胆总管封闭。术中诊断为肝总管横断、网膜囊大量积液（胆汁）。

因肝总管断端及周围炎症水肿较重，断端间缺损过长，决定行肝总管 Y 型管外引流术。切开囊壁，吸尽胆汁（约 10 000 ml）。探查左右肝管内无结石及狭窄，将一 F20 号 T 型管短臂缝合塑型为 Y 型管，将其短臂分别插入左右肝管，长臂经肝总管断端引出。大量生理盐水冲洗腹腔及小网膜囊。经小网膜囊放置橡皮引流管一根，与 Y 型管分别戳孔经右腹壁引出固定。术后予抗炎、支持等处理，病情恢复良好，切口Ⅱ/甲愈合后出院。4 个月后再次入院，行胆管整形、胆管空肠 Roux-en-Y 吻合术，吻合口约 2.5 cm 大小，手术顺利，术后恢复良好，于术后 12 d 痊愈出院。

### 2 讨论

#### 2.1 医源性胆管损伤的诊断与处理

医源性胆管损伤最常见于胆囊切除手术，随着技术的不断发展，发生率已明显降低（0.2%～0.6%）[1,2]。但是一旦发生，约 25%～30%可能产生极严重的后果[1]。通过术中仔细检查、胆管造影等方法及时发现和早期处理胆管损伤，通常可取得较好的效果。如术中漏诊，术后患者出现黄疸、腹痛等症状，应选用 B 超、MRCP、ERCP 或 PTC 等检查确诊。处理方式应根据胆管损伤的类型不同、程度轻重、发现早晚以及术者的技术水平的差异来选择，一般有胆道整形修复术和胆肠吻合术两大类重建方式。本例患者由于外院行胆囊切除术中未及时发现胆管

作者简介：郑 璐（1980— ），男，重庆市人，硕士研究生，医师，主要从事肝胆疾病方面的研究。电话：（023）68774906

收稿日期：2004-06-28；修回日期：2004-09-16

（下转 1973 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net