

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.005

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.005>

## 定量检测膀胱尿路上皮癌患者手术前后外周血中 survivin mRNA 的临床意义

陈平锋

(衡阳市南华大学附属第一医院泌尿外科, 湖南 衡阳 421001)

**[摘要]** 目的: 研究膀胱移行细胞癌患者手术前后全血中 survivin mRNA 表达变化及其临床意义。方法: 采用 qRT-PCR 检测 47 名非肌层浸润膀胱癌患者与 25 名正常人群手术前后外周血中 survivin mRNA 表达量并构建受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC) 曲线。结果: 术前膀胱癌患者 survivin mRNA 表达水平是正常人群的 4.06 倍 ( $P < 0.05$ ), 经 ROC 曲线分析, 区别膀胱癌患者与正常人群的 survivin 表达临界值为  $1.4 \times 10^{-2}$ , 患者术后各时间点 survivin 表达水平明显低于术前水平 ( $P < 0.05$ ), survivin mRNA 水平高于临界值的术后患者较低于临界值的患者复发率高 ( $P < 0.05$ )。结论: qRT-PCR 可简单敏感地检测全血中 survivin mRNA 水平, survivin 可作为用于膀胱癌诊断及复发判断的标志物。

**[关键词]** 膀胱癌; survivin; 外周血; mRNA; qRT-PCR

## Clinical significance of survivin mRNA detection in the peripheral whole blood of patients with bladder urothelial carcinoma before and after surgery

CHEN Pingfeng

(Department of Urology, First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the mRNA expression of survivin in whole blood of patients with bladder urothelial carcinoma. **Methods:** Levels of survivin mRNA expression in the whole blood of 47 patients with non-muscle-invasive bladder cancer before and after operations and 25 normal controls were detected by qRT-PCR and the receiver operating characteristic (ROC) curve for each factor was constructed. **Results:** The levels of survivin mRNA in bladder cancer patients were 4.06 folds compared to normal controls ( $P < 0.05$ ). The cutoff value for differentiating bladder cancer patients and normal people was  $1.4 \times 10^{-2}$  for survivin. Postoperative survivin expression in patients was significantly lower than preoperative expression at each time point ( $P < 0.05$ ). Post-

收稿日期 (Date of reception): 2017-10-20

通信作者 (Corresponding author): 陈平锋, Email: erdonlei@sina.com

基金项目 (Foundation item): 衡阳市科技计划项目 (2102KJ50)。This work was supported by the Science and Technology Project Foundation of Hengyang, China (2102KJ50).

operative recurrence rate of post-operative patients with mRNA level above cutoff value were higher than lower ones ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** qRT-PCR is a convenient and sensitive method to detect survivin mRNA in the whole blood using, and survivin could be useful tumor biomarkers for early detection and recurrence of bladder cancer.

**Keywords** bladder urothelial carcinoma; survivin; peripheral blood; mRNA; qRT-PCR

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤, 其发病率在世界范围内排在泌尿生殖系肿瘤的第2位<sup>[1]</sup>。当前膀胱癌诊断和复查策略多依靠影像学与病理学手段, 便利性较差, 现在仍缺乏灵敏度高、简单有效的筛查手段。随着肿瘤分子生物学机制研究的不断深入, 与癌症发生相关的基因逐步被发现, 且可能分布于人体体液系统, 可通过分子生物学技术检测出来。Survivin被称为杆状病毒凋亡抑制因子(inhibitor of apoptosis protein, IAP), 是IAP家族成员之一, 在促进细胞增殖和阻止细胞凋亡方面发挥重要的生物学作用。已有研究<sup>[2]</sup>证明: survivin表达增加与疾病进展、频繁复发、生存期缩短及治疗抵抗相关。本研究旨在探讨膀胱移行细胞癌患者全血中survivin mRNA的表达变化, 并探索其作为膀胱癌诊断或复发的生物学标志物的价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源与处理措施

共纳入47例经病理学初次确诊为非肌层浸润膀胱尿路上皮细胞癌肿瘤患者, 均来自南华大学附属第一医院, 无其他系统与器官的器质性疾病, 术前未经任何化学或放射治疗; 周围社区25例健康成人志

愿者作为对照组, 两组基本人口特征见表1, 两组人口特征差异不具有统计学意义( $P > 0.05$ )。于术前1 d, 同时采正常对照组与患者血标本, 术后采1, 6, 12月的外周血标本, 标本量均为5 mL。手术方式为经尿道膀胱肿瘤激光汽化切除术。根据术前患者与健康对照者的survivin RNA表达水平, 构建受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线, 并计算survivin mRNA表达水平区分健康人群与患者的敏感度和特异度, 并计算其界限值。根据界限值, 在各个测试时间点根据mRNA水平将术后患者分类, 并统计随访1年膀胱癌复发与mRNA表达水平的关系, 检测survivin mRNA表达水平检验膀胱癌复发的有效性与能力。本研究经本单位伦理委员会审核批准, 符合医学伦理要求。

### 1.2 实验材料

膀胱癌T24受赠于武汉协和医院中心试验室, RPMI-1640培养基标准胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自美国Hyclone公司, LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司, 总RNA提取试剂、反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒购自武汉迈进生物试剂有限公司, 实时荧光定量PCR引物由武汉迈进生物试剂有限公司设计合成。

表1 膀胱癌患者与健康对照组人口特征对比

Table 1 Baseline characteristics of patients and healthy controls

组别	年龄/岁	性别(女/男)	BMI/(kg·m <sup>-2</sup> )
患者组	62.0 ± 6.9	28/19	27.5 ± 3.2
健康对照组	63.5 ± 6.3	18/7	26.5 ± 2.5
P	0.3537*	0.2960 <sup>#</sup>	0.1751*

\*, 两独立样本t检验; <sup>#</sup>, 卡方检验。

\*, independent sample t-test; <sup>#</sup>, Chi-squared test.

### 1.3 qRT-PCR

操作步骤如下：1)总RNA提取和cDNA合成。用EDTA-K2抗凝管收集所有患者与正常对照人群的外周血样本。按照TRIzol法从膀胱癌T24细胞和全血(包括血细胞与血浆)中提取总量RNA，每300 mL全血加入1 mL TRIzol。随后采用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取产物的完整性，紫外分光光度计检测RNA的纯度和浓度。2)按反转录试剂盒反转录得cDNA，反应条件如下：70 ℃ 10 min，冰浴2 min，42 ℃ 60 min，70 ℃ 10 min；3)qRT-PCR反应参数设置：95 ℃ 20 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 20 s，72 ℃ 5 s，40个循环，每个样品做3个平行管，每次实验至少重复3次；既知膀胱癌T24细胞高表达survivin<sup>[3]</sup>，取T24细胞10<sup>5</sup>种植6孔板培养，取对数期细胞后提取总RNA作为阳参组，以此定量各样本mRNA表达水平，2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行数据分析，目的基因与内参基因引物序列见表2。

表2 目的基因与内参基因引物序列

Table 2 Primers of  $\beta$ -actin and survivin used for real-time PCR

基因	基因引物序列(5'-3')
Survivin	F: AGGACCACCGCATCTCTACA
	R: TGITCCTCTATGGGGTCTCGTCA
$\beta$ -actin	F: AGCGAGCATCCCCAAAGTT
	R: GGGCACGAAGGCTCATCAT

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件进行分析。实验数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示，*t*检验分析比较各组间差

异。根据术前测得患者与正常对照者mRNA水平与病理结果，构建ROC曲线并计算曲线下面积(area under the curve, AUC)，评估全血中靶基因mRNA水平的诊断性能。约登指数用于确定两者最佳的诊断临界值(灵敏度+特异度-1)，率的比较采用卡方检验。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 qRT-PCR 检测正常人群与膀胱癌患者 survivin mRNA 表达水平

膀胱癌患者survivin mRNA表达水平是健康对照组的4.06倍(*P*<0.05)；经ROC曲线分析，区别膀胱癌患者与正常人群的survivin表达临界值为 $1.4\times 10^{-2}$ ，ROC AUC为0.895，其敏感度与特异度分别为85%与92%(图1)。

### 2.2 qRT-PCR 检测患者组术后各时间点 survivin 表达水平

术后各时间点survivin表达水平明显低于术前水平，经配对样本*t*检验，差异有统计学意义(*P*<0.05；图2)；在各时间点，经卡方检测survivin表达高于临界值的术后患者比例较术前时低，差异有统计学意义(*P*<0.05)。随访1年后发现：survivin mRNA水平高于临界值的术后患者累计人数为14人，低于临界值的术后患者为33人，高于临界值的术后患者有10人经过临床病理检查被确认为肿瘤复发，低于临界值的患者有3人被确认为肿瘤复发(图2)。经卡方检验，高于临界值的患者较低于临界值的患者肿瘤复发率高，差异有统计学意义( $\chi^2=19.09$ ，*P*<0.05；表3)。

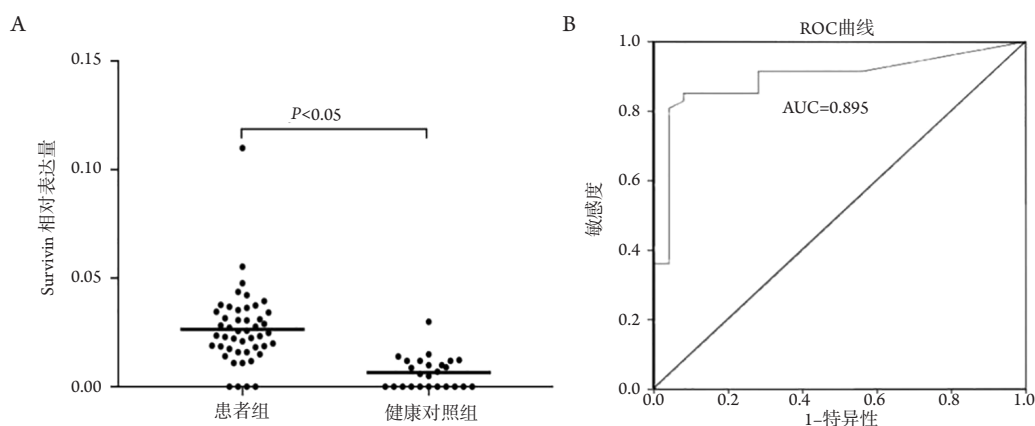


图1 术前膀胱癌患者与健康对照组survivin mRNA表达对比(A)与ROC曲线(B)

Figure 1 Comparison of preoperative blood level of survivin between patients and healthy controls (A) and outcomes of ROC analysis (B)

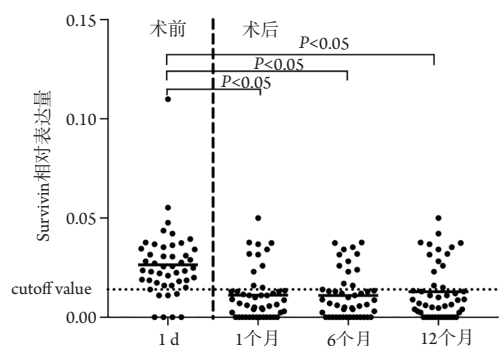


图2 47名膀胱癌患者术前术后各时间点survivin表达水平比较

Figure 2 Multiple comparisons between preoperative blood level of survivin and postoperative ones at each time point

表3 患者术后survivin表达水平高于与低于临界值者肿瘤复发率比较( $\chi^2$ )

Table 3 Comparison of post-operative recurrence rates between post-operative patients with mRNA level above cutoff value and lower ones (Chi-squared test)

组别	复发	未复发	合计
高于临界值	10	4	14
低于临界值	3	30	33
合计	13	34	47

### 3 讨论

本研究发现：与正常人群相比，膀胱尿路上皮癌患者外周血中survivin表达上调。本研究通过分析区分膀胱癌患者与健康人群的survivin表达的临界值，检验了survivin判断膀胱癌发生的灵敏度与特异性，并通过术后观察随访验证了外周血survivin水平提示膀胱癌复发的有效性。

近些年来，许多与膀胱癌发生发展有关的基因逐渐被发现，并且作为肿瘤的生物标志物广泛应用于靶向治疗、肿瘤诊断和预后判断中。Survivin也称为杆状病毒IAP，是IAP家族成员之一。Survivin定位于人染色体17q25，含4个外显子和3个内含子，分子蛋白约有142个氨基酸<sup>[4]</sup>。Survivin只含有1个由3个螺旋和3个反平行 $\beta$ 片层组成的BIR结构，其羧基末端缺乏与锌结构结合的结构域，代之以一个独特的 $\alpha$ 螺旋结构，富含疏水基团，能与纺锤体微管上的微管蛋白结合，抑制细胞凋亡<sup>[5]</sup>。另外，survivin的BIR中还含有Pio33，Trp67和Cys84等氨基酸残基，通过这些残基与

Caspase-3和Caspase-7结合抑制Caspase活性，阻止多种凋亡信号诱导的细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

Survivin在促进细胞增殖和阻止细胞凋亡方面发挥重要的生物学作用。已有研究<sup>[7]</sup>证明存活素表达增加与肿瘤进展、频繁复发、生存期缩短和治疗抵抗相关。Salz等<sup>[8]</sup>发现survivin的过表达可引起膀胱尿路上皮组织基因转录微环境的改变，从而促进膀胱肿瘤形成。同时有研究<sup>[9]</sup>表明：survivin或将成为一种理想的肿瘤标志物，可用于多系统或器官肿瘤的诊断及预后判断，并在血液标本中呈现出差异性表达。Nigam等<sup>[10]</sup>发现survivin的高表达可以减少胆囊癌术后生存时间。Dellal等<sup>[11]</sup>发现泌乳素肿瘤患者血清中survivin的高表达。Dong等<sup>[12]</sup>报道胰腺癌患者血清的survivin也出现表达水平增高。而Wang等<sup>[13]</sup>首次发现乳腺癌患者survivin在全血中的表达水平与健康人群有明显差异，并且对区分正常人群与乳腺癌患者有较为理想的敏感度和特异性；同时研究<sup>[14]</sup>发现：survivin高表达提示膀胱癌患者的不良预后。现在尚无明确的机制解释肿瘤患者外周血survivin表达水平上调的原因，survivin mRNA在胎儿组织与大部分人类肿瘤组织中选择性大量表达，但在正常的分化组织中却十分罕见<sup>[15]</sup>。本研究也证实了这一点，有研究<sup>[7]</sup>推论，这可能是由肿瘤组织血运丰富，肿瘤组织向循环系统释放survivin mRNA所致。

本研究尚有不足之处，样本的膀胱癌病理类型与临床分期较单一，样本量较小，进一步的研究需针对不同临床分期、病理类型并扩大样本量以验证survivin作为膀胱癌标志物的有效性与可行性。综上，本研究证实了全血中survivin mRNA表达水平作为诊断或预测膀胱癌发生和复发的有效性和可行性，采用qRT-PCR方法检测手术前后外周血survivin mRNA水平的变化，可作为观察膀胱癌术后微转移的一种低创伤性、可测量的客观指标。

### 参考文献

- Soria F, Marra G, Čapoun O, et al. Prevention of bladder cancer incidence and recurrence: tobacco use[J]. *Curr Opin Urol*, 2018, 28(1): 80-87.
- Chen X, Duan N, Zhang C, et al. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies[J]. *J Cancer*, 2016, 7(3): 314-323.

3. Hou JQ, He J, Wang XL, et al. Effect of small interfering RNA targeting survivin gene on biological behaviour of bladder cancer[J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(20): 1734-1739.
4. Dohi T, Okada K, Xia F, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(33): 34087-34090.
5. Ma H, Nguyen C, Lee KS, et al. Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression[J]. Oncogene, 2005, 24(22): 3619-3631.
6. Shamsabadi FT, Eidgahi MR, Mehrbod P, et al. Survivin, a promising gene for targeted cancer treatment[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(8): 3711-3719.
7. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: a molecular biomarker in cancer[J]. Indian J Med Res, 2015, 141(4): 389-397.
8. Salz W, Eisenberg D, Plescia J, et al. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3531-3534.
9. Garg H, Suri P, Gupta JC, et al. Survivin: a unique target for tumor therapy[J]. Cancer Cell Int, 2016, 16: 49.
10. Nigam J, Chandra A, Kazmi HR, et al. Prognostic significance of survivin in resected gallbladder cancer[J]. J Surg Res, 2015, 194(1): 57-62.
11. Dellal FD, Niyazoglu M, Gorar S, et al. Serum survivin increases in prolactinoma[J]. J Clin Med Res, 2015, 7(4): 248-252.
12. Dong H, Qian D, Wang Y, et al. Survivin expression and serum levels in pancreatic cancer[J]. World J Surg Oncol, 2015, 13: 189.
13. Wang S, Xu J, Zhang Q. Clinical significance of survivin and vascular endothelial growth factor mRNA detection in the peripheral whole blood of breast cancer patients[J]. Neoplasma, 2016, 63(1): 133-140.
14. Jeon C, Kim M, Kwak C, et al. Prognostic role of survivin in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e76719.
15. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.

本文引用: 陈平锋. 定量检测膀胱尿路上皮癌患者手术前后外周血中survivin mRNA的水平及其临床意义[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(1): 23-27. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.005

**Cite this article as:** CHEN Pingfeng. Clinical significance of survivin mRNA detection in the peripheral whole blood of patients with bladder urothelial carcinoma before and after operation[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(1): 23-27. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.01.005