

·技术研究·

尿液中ErbB3蛋白在肾透明细胞癌早期诊断中的意义

莫承强¹, 刘畅², 陈旭¹, 王华¹, 王思豪¹, 潘金成¹, 丘少鹏¹

(1. 中山大学附属第一医院泌尿外科, 广东广州 510080; 2. 北京大学第三医院麻醉科, 北京 100191)

摘要:【目的】探讨尿液中ErbB3蛋白表达水平对肾透明细胞癌早期诊断的意义。【方法】选取2016年4月26日至2016年8月31日于中山大学附属第一医院泌尿外科住院并接受外科手术治疗,术后病理结果证实为肾透明细胞癌的肾癌患者31例,以及50例经体检证明无泌尿系疾病及其他系统疾病的正常人尿液作为正常对照。使用ELISA法对实验组及对照组尿液中ErbB3蛋白进行检测,比较肾透明细胞癌组和正常对照组之间尿液ErbB3蛋白表达差异,建立使用尿液ErbB3蛋白诊断肾透明细胞癌的ROC曲线,同时分析尿液中ErbB3蛋白含量与患者BMI、肿瘤病理直径、术前肌酐、血压及血糖的相关性。【结果】①与正常组相比,肾透明细胞癌组患者尿液ErbB3蛋白浓度明显降低,差异具有统计学意义($P<0.001$)。②建立使用尿液ErbB3蛋白对肾透明细胞癌进行早期诊断的ROC曲线,曲线下面积为0.802($P<0.001$),当取诊断分界值为13.98时,约登指数最大为0.525,对应的诊断试验灵敏度为0.645,特异度0.880。诊断试验的Kappa值为0.542($P<0.001$)。③实验组患者尿液ErbB3蛋白含量与患者BMI、肿瘤病理直径、术前肌酐、血压及血糖无明显相关性。【结论】肾透明细胞癌患者尿液中ErbB3蛋白含量较正常人明显降低,使用尿液ErbB3蛋白对肾透明细胞癌进行早期诊断具有一定的可行性。

关键词: ErbB3蛋白; 肾透明细胞癌; 早期诊断

中图分类号: R737.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2018)02-0269-05

Role of Urine ErbB3 Protein in Early Diagnosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma

MO Cheng-qiang¹, LIU Chang², CHEN Xu¹, WANG Hua¹, WANG Si-hao¹, PAN Jin-cheng¹, QIU Shao-peng¹

(1. Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China;

2. Department of Anesthesiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

Corresponding to: QIU Shao-Peng, E-mail: urology@163.vip.com

Abstract: 【Objective】To explore the diagnostic value of urine ErbB3 protein in clear cell renal cell carcinoma. 【Methods】We collected 31 urine samples of clear cell renal cell carcinoma patients who received operations in the Urology Department of the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University from April 2, 2016 to August 31, 2016. Meanwhile we collected 50 urine samples of normal people as control. We tested the expression of urine ErbB3 protein in experimental group and control group, and analyzed the differences between the two groups. Then we established the ROC curve of which diagnosing clear cell renal carcinoma by urine ErbB3 protein. Also, we analyzed the relation between ErbB3 protein in urine and the patients' BMI, preoperative creatinine, tumor diameter and underlying diseases such as hypertension and hyperglycemia. 【Results】① The expression of urine ErbB3 protein in clear cell renal cell carcinoma group was significantly lower than normal group ($P<0.001$). ② When diagnosing clear cell renal carcinoma by ErbB3 protein, the AUC of ROC was 0.802 ($P<0.001$). When setting the cutoff as 13.98 pg/mL, the max Youden index was 0.525, the sensitivity was 0.645 and the specificity was 0.880. The Kappa value of diagnostic test was 0.542 ($P<0.001$). ③ There

收稿日期: 2017-09-19

基金项目: 国家自然科学基金(81272809)

作者简介: 莫承强, 博士, 主治医师, 研究方向: 泌尿系结石、泌尿系肿瘤及泌尿系微创治疗, E-mail: mochenggq@mail.sysu.edu.cn; 丘少鹏, 通信作者, 主任医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤、微创泌尿外科, E-mail: urology@163.vip.com

was no correlation between the ErbB3 content and patients' BMI, tumor diameter or preoperative creatinine by correlation analysis. Also, there was no correlation between the urine ErbB3 protein content and blood pressure or blood glucose.

【Conclusion】The urine ErbB3 protein of clear cell renal cell carcinoma was significantly lower than normal people, and it is meaningful for applying urine ErbB3 protein to early diagnosis of clear cell renal cell carcinoma.

Key words: ErbB3 protein; clear cell renal cell carcinoma; early diagnosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2):269-273]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)又称为肾腺癌,简称肾癌,是起源于肾小管上皮细胞的恶性肿瘤,约占成人恶性肿瘤的2%~3%^[1]。肾癌的起病较为隐匿,在临床上,越来越多的肾癌是通过体检偶然发现,而以传统的“腰痛、血尿、腹部肿块”肾癌三联征来就诊并发现的肾癌的病例已经越来越少^[2-3],这类患者在临床上往往已经是晚期的肿瘤失去手术治疗机会,加上肾癌对放、化疗不敏感使得此阶段治疗变得十分棘手^[4-5],因此寻找简单、便捷早期诊断肾癌的方法显得尤为紧迫。近年来,关于肾癌标志物的研究越来越多,如HIF-1 α ^[6]、EGFR^[7]等都被证明与肾癌的发生、发展有关,在肾癌早期诊断及预后判定中具有一定的意义,然而这些标志物的灵敏度和特异度却不尽人意,所以找到一个可靠的早期诊断的肿瘤标志物便十分重要。ErbB3蛋白又称HER3,是人表皮生长因子受体(HER)家族的一员。最近很多研究都表明,ErbB3与多种肿瘤的发生、发展及预后都密切相关,但是关于ErbB3在肾癌中的表达情况,目前尚不明确,国内外也鲜有报道。我们前期研究发现,ErbB3蛋白在肾透明细胞癌组织中的表达显著低于癌旁组织以及正常组织,本研究拟通过对肾透明细胞癌患者尿液中ErbB3蛋白进行检测,建立使用尿液ErbB3蛋白来对肾透明细胞癌进行早期无创性诊断的诊断模型,探讨尿液ErbB3蛋白对肾透明细胞癌早期诊断中的意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

取2016年4月26日至2016年8月31日于中山大学附属第一医院泌尿外科住院并接受外科手术治疗,术后病理结果证实为肾透明细胞癌的肾癌患者31例以及50例经体检证明无泌尿系疾病及

其他系统疾病的正常人尿液作为正常对照组。标本的收集均经伦理委员会认可并征得患者同意。按照2010年AJCC肾癌分期标准,T1a期22例,T1b期7例,T2期2例。年龄为28至77岁,其中男性21例,女性10例。实验组患者尿液收集要求为入院后第二天清晨的晨尿,收集5 mL尿液标本即刻在4℃的条件下4 500 r/min(离心机半径为10 cm)离心5 min,去掉下层沉渣,取上清液5 mL立刻放入-80℃冰箱中保存。正常对照组也取晨尿一管,使用同样处理方法进行处理后留取5 mL上清液放入-80℃冰箱中保存。对尿液标本使用ELISA法进行检测。

1.2 实验试剂

人ErbB3 ELISA试剂盒购自广州瑞博奥生物科技有限公司。

1.3 实验方法

①将试剂盒以及检测尿液样品平衡至室温(18~25℃);在每孔加入200 μ L封闭液,放入37℃恒温箱孵育2 h;②包被抗体的ELISA板平衡至室温后,在每个对应的孔加入100 μ L配制好的标准品及样品,用封板膜封住整块板条,4℃孵育过夜;③将配制好的1 \times 洗液添加到洗板机上,每孔加入250 μ L洗液,用洗板机清洗板条5次;④洗板干净后,每孔加入100 μ L配制好的检测抗体(即生物素标记抗体),在室温下孵育1 h;⑤再次洗板,清洗步骤同③;⑥每孔加入100 μ L配制好的HRP-链霉亲和素,室温下孵育45 min;⑦再次洗板,清洗步骤同③;⑧每孔中加入100 μ L TMB显色液,室温下避光孵育10 min;⑨每孔中加入50 μ L终止液,立即在酶标仪450 nm读数。⑩对读数结果采用Sigmaplot 12.0软件计算浓度值。

1.4 统计学方法

实验数据使用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析,本实验结果中计数资料采用卡方检验,计量资料采用 t 检验,取检验水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 肾透明细胞癌组与正常对照组年龄性别对比

肾透明细胞癌组中男性患者21人,女性患者10人,正常对照组中男性患者31人,女性患者19人,经过卡方检验, $P=0.502$,肾透明细胞癌组与正常对照组性别比例没有统计学差异。肾透明细胞癌组患者年龄与正常对照组患者年龄经过独立样本 t 检验, $t=3.197$, $P=0.002$,两者有统计学差异($P<0.05$),肾透明细胞癌组患者年龄大于正常对照组患者年龄(表1)。

表1 肾透明细胞癌组与正常对照组患者基本情况比较
Table 1 Patients' characteristics ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Male	Female	Age/years
Cancer	21	10	46.5±13.9
Control	31	19	39.2±12.4

2.2 肾透明细胞癌与正常对照组尿液中ErbB3蛋白含量对比

ELISA法结果显示,肾透明细胞癌组尿液ErbB3蛋白浓度为(17.8±26.6) pg/mL,正常对照组尿液ErbB3蛋白浓度为(59.0±54.7) pg/mL,与正常组相比,肾透明细胞癌组患者尿液ErbB3蛋白浓度明显降低,经过独立样本 t 检验($t=5.174$, $P=0.000<0.001$),差异具有统计学意义。

2.3 尿液ErbB3蛋白含量诊断肾透明细胞癌的ROC曲线

使用尿液ErbB3蛋白对肾透明细胞癌进行早期诊断,建立ROC曲线(图1),ROC曲线下面积为0.802($P=0.000<0.001$)。当取诊断分界值为13.98时,约登指数最大,为0.525,对应的诊断试验灵敏度为0.645,特异度0.880。诊断试验的Kappa值为0.542($P=0.000<0.001$)。

2.4 尿液ErbB3蛋白含量与患者BMI、病理直径、术前肌酐的关系

按照ROC曲线确定的最佳诊断分界值为13.98,可以将肾透明细胞癌组分为高于诊断分界值的ErbB3高表达组和低于诊断分界值的低表达组,通过独立样本 t 检验,比较高表达组及低表达组的患者BMI、病理直径和术前肌酐。结果显示,

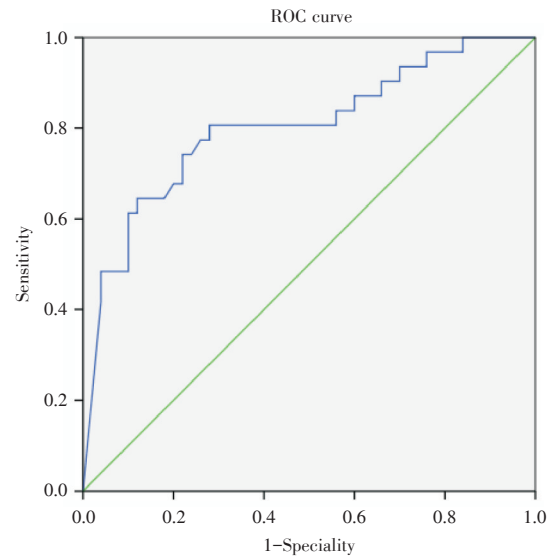


图1 ErbB3蛋白诊断肾透明细胞癌的ROC曲线
Fig.1 The ROC curve for diagnosing clear cell renal carcinoma by urine ErbB3 protein

两组患者BMI之间无统计学差异($P=0.526$)两组病理直径也无统计学差异($P=0.260$);高表达组和低表达组之间术前肌酐值同样没有统计学差异($P=0.624$,表2)。

表2 尿液ErbB3蛋白高表达组和低表达组患者BMI、病理直径、术前肌酐结果

Table 2 Information of BMI, tumor diameter and preoperative creatinine ($\bar{x} \pm s$)

Clinical data	High	Low	t	P
BMI	23.9±3.9	23.1±2.9	-0.642	0.526
Tumor diameter	2.9±1.5	3.8±2.3	1.150	0.260
Preoperative reatinine	78.9±20.4	82.3±17.0	0.495	0.624

2.5 高血压组与血压正常组患者尿液ErbB3蛋白含量比较

将肾透明细胞癌患者按照术前临床资料分为高血压组和血压正常组,术前患有高血压的患者共7人,血压正常组24人,高血压组患者尿液ErbB3蛋白浓度为(16.8±22.2) pg/mL,血压正常组患者尿液ErbB3蛋白浓度为(18.1±28.2) pg/mL,经过独立样本 t 检验,高血压组和血压正常组之间患者尿液ErbB3蛋白浓度无统计学差异($P=0.912$)。

2.6 高血糖组与血糖正常组患者尿液ErbB3蛋白含量比较

将肾透明细胞癌患者按照术前临床资料分为

高血糖组和血糖正常组,术前合并高血糖并且服用药物或使用其他方式控制血糖的患者共4人,血糖正常的患者共27人,高血糖组患者尿液中ErbB3蛋白浓度为(11.7±10.1) pg/mL,血糖正常组患者尿液中ErbB3蛋白浓度为(18.7±28.3) pg/mL,经过独立样本 t 检验,高血糖组和血糖正常组患者尿液ErbB3蛋白浓度之间无统计学差异($P=0.632$)。

3 讨论

3.1 ErbB3蛋白与肿瘤

ErbB3的酪氨酸激酶活性是HER2的千分之一左右,所以一般认为其没有酪氨酸激酶活性,但是它不仅可以与人表皮生长因子受体家族的其他成员形成二聚体发挥作用,而且在ErbB3的胞内C端有6个结合PI3KSH2的磷酸化位点,这个结构的特殊性就提示了ErbB3在PI3K/AKT通路中发挥一定的作用^[8-10]。PI3K/AKT通路通过抑制细胞凋亡,增强细胞对缺氧和营养缺乏环境的耐受能力,从而辅助肿瘤生长^[11],因此ErbB3可能通过该通路参与到肿瘤的发展过程之中。虽然多项研究已经表明,ErbB3与很多肿瘤密切相关,但ErbB3与肾癌中的作用我们知之甚少。

3.2 肾癌的诊断

肾癌起病隐匿,临床中约80%的肾癌患者是由于其他症状在进行腹部影像学检查(超声、CT、MRI)时偶然发现肾肿瘤^[12-13]。当出现“血尿、腰痛、腹部肿块”的肾癌三联征及其他相关症状时,30%~40%的患者已合并淋巴结转移或其他器官转移,组织学上为进展期病变^[14]。目前临床上常用的影像学检查方法为腹部超声、腹部CT平扫和增强扫描。因为泌尿系肿瘤的特殊性,现在一些研究尝试寻找可以使用尿液中的一些特异性生物标志来对肾癌进行早期筛查诊断,Jeremiah等^[15]研究发现,尿液中水通道蛋白-A(AQP1)和脂滴包被蛋白-2(PLIN2)在诊断肾透明细胞癌及乳头状细胞癌的灵敏度和特异度都极高。

3.3 ErbB3与肾癌

ErbB3作为人表皮生长因子受体家族的一

员,现有的研究已经证实其与多种肿瘤密切相关,但ErbB3与肾癌的关系目前尚不明确,国内外相关的研究也非常少。我们前期研究发现,ErbB3蛋白在肾透明细胞癌组织中的表达显著低于癌旁组织以及正常组织,并在本研究中首次揭示了肾透明细胞癌患者尿液中ErbB3蛋白含量明显低于正常对照组,具有显著统计学差异,这就预示着ErbB3可能是肾癌的一个保护性蛋白。以此我们使用尿液中ErbB3蛋白含量对肾透明细胞癌患者进行早期诊断,绘制ROC曲线,结果显示曲线下面积(AUC)为0.802,诊断试验的灵敏度和特异度为0.645和0.880,诊断试验的Kappa值为0.542。结果说明,使用尿液ErbB3蛋白对肾透明细胞癌进行早期诊断时,诊断准确性中等,特异度较高,但灵敏度一般。约登指数是扣除了误诊率和漏诊率之后的比率,所以约登指数越大,说明误诊率和漏诊率的总和越小,也就是说明准确性越高。而Kappa值是由Cohen在1960提出的作为评价诊断试验一致性的指标,Kappa值实际为两个差值之比,分子为观察到的一致率与期望率之差,差值大说明观察到的一致率比期望率高,分母为(1-期望率),是为了减少期望率对一致性判断的影响,Kappa值越大,说明一致性越好。根据实验样本的临床资料,我们研究了ErbB3蛋白与肾透明细胞癌患者术前BMI、肌酐值以及肿瘤病理直径的关系,发现尿液中ErbB3浓度与BMI、肌酐值以及肿瘤病理直径并没有明显关系,并且与患者术前是否患有高血压、糖尿病也没有明显相关性,说明肾癌患者尿液中ErbB3浓度下降可能只是由于肿瘤细胞生长引起的改变,而与患者其他临床基本情况没有明显相关性。

3.4 不足与展望

本实验由于时间与人力限制,选取的样本量仍较少,随机误差较大,实验结果的准确性有待加大样本量后进一步提高。此外,本实验发现在肾透明细胞癌患者尿液中ErbB3蛋白表达降低,但尚未进行细胞学或分子生物学机制层面的研究。在未来希望可以进一步增加实验样本量,提高诊断试验的灵敏度和特异度,同时完成机制层面的探究,更好更及时地将这一早期诊断方法推广于临床。

参考文献

- [1] Ciccicarese C, Brunelli M, Montironi R, et al. The prospect of precision therapy for renal cell carcinoma [J]. *Cancer Treatment Rev*, 2016, 49(9): 37-45.
- [2] Lee CT, Katz J, Fearn PA, et al. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information [J]. *Urol Oncol*, 2002, 7(7): 135-140.
- [3] Patard JJ, Leray E, Rodriguez A, et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma [J]. *Eur Urol*, 2003, 44(44): 226-232.
- [4] Wu JP. *Wu Jieping Urology* [M]. Jinan: Shangdong Province Science and Technology Press, 2004: 898-918.
- [5] Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, et al. *Campbell-Walsh Urology* [M]. 9. Guo YL, Zhou LQ. Beijing: Peking University Medical Press, 2009: 1651-1733.
- [6] Lessi F, Mazzanti C M, Tomei S, et al. VHL and HIF-1 α : gene variations and prognosis in early-stage clear cell renal cell carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 840-870.
- [7] Dias F, Teixeira AL, Santos JI, et al. Renal cell carcinoma development and miRNAs: a possible link to the EGFR pathway [J]. *Pharmacogenomics*, 2013, 14(14): 1793-803.
- [8] Fedi P, Pierce JH, Fiore PPD, et al. Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(1): 492-500.
- [9] Soltoff SP, Carraway KL, Prigent SA, et al. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 3550-3558.
- [10] Prigent SA, Gullick WJ. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera [J]. *EMBO J*, 1994, 13(12): 2831-2841.
- [11] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2(4): 339-345.
- [12] Feldstein MS, Rhodes DJ, Parker AS, et al. The haphazard approach to the early detection of asymptomatic renal cancer: results from a contemporary executive health programme [J]. *BJU Int*, 2009, 104(1): 53-59.
- [13] Nogueira M, Kim HL. Molecular markers for predicting prognosis of renal cell carcinoma [J]. *Urol Oncol*, 2008, 26(2): 113-152.
- [14] Jemal A, Siegel R, Xu JQ, et al. Cancer Statistics [J]. *Cancer*, 2009, 59(5): 1-24.
- [15] Morrissey JJ, Mobley J, Figenschau RS, et al. Urine aquaporin 1 and perilipin 2 differentiate renal carcinomas from other imaged renal masses and bladder and prostate cancer [J]. *Mayo Clin Proc*, 2015, 90(1): 35-42.

(编辑 余 菁)