

방광암의 진단에서 요중 Survivin 검사와 Nuclear Matrix Protein (NMP)-22 검사 및 요세포검사의 비교

Urinary Survivin Test Compared to the Nuclear Matrix Protein (NMP)-22 Test and Urine Cytology for the Diagnosis of Bladder Cancer

Sang Hoon Chang, Young Ho Kim, Min Eui Kim

From the Department of Urology, Soonchunhyang University Hospital, Bucheon, Korea

Purpose: The aim of this study was to compare the sensitivity and specificity of the urinary survivin test for the diagnosis of bladder cancer with the nuclear matrix protein (NMP)-22 test and the urine cytology, and we wanted to correlate survivin with the tumor stage and grade.

Materials and Methods: Between October 2002 and March 2004, voided urine samples were obtained from 41 patients with bladder cancer and also from 36 controls who had no evidence of bladder cancer. The urinary survivin and NMP-22 levels were measured using a DuoSet IC ELISA kit and an automated chemiluminescent assay system. The results were compared with the cytologic results and the pathologic findings.

Results: The comparative results showed the higher sensitivity for the urinary survivin test (78.0%) and the NMP-22 test (75.6%) than for the urine cytology (65.8%) for the detection of bladder cancer. The specificity of urinary survivin (86.1%) and urine cytology (97.2%) were higher than that for the NMP-22 test (66.6%). Measuring the urinary survivin level was a more accurate test than the urinary NMP-22 test and the urine cytology for the detection of lower grade and superficial bladder cancer.

Conclusions: The urinary survivin test was superior to urine cytology for sensitivity and specificity, and these two parameters of the urinary survivin test were higher than those of the NMP-22 test. Especially, the urinary survivin test is an accurate diagnostic test for superficial and lower grade bladder tumor. Our results suggested that the urinary survivin test appears to be a reliable diagnostic test to identify patients with bladder cancer. (Korean J Urol 2006;47:1041-1045)

Key Words: Bladder cancer, Survivin, Nuclear matrix protein 22, Urine, Cytology

대한비뇨기과학회지
제 47 권 제 10 호 2006

순천향대학교 의과대학
비뇨기과학교실

장상훈 · 김영호 · 김민희

접수일자 : 2006년 5월 15일
채택일자 : 2006년 7월 21일

교신저자: 김민희
순천향대학교 부천병원
비뇨기과
경기도 부천시 원미구 중동
1174
☎ 420-767
TEL: 032-621-5462
FAX: 032-621-5665
E-mail: mekim@schbc.ac.kr

서론

2002년 한국중앙암등록 결과에 의하면 방광암의 발생빈도는 약 2.2%로 원발부위별 발생빈도상 10위이며 남성에서는 5위로, 비뇨생식기계 종양 중 발생빈도가 가장 높다. 방광암의 조기진단과 재발을 확인하기 위해 방광경검사와 요세포검사를 주로 시행하지만 방광경검사는 환자에게 통증과 불편감을 주고 크기가 작은 종양이나 상피내암의 경우

는 진단이 어려울 수 있다. 요세포검사는 특이도는 높지만 분화도가 좋거나 병기가 낮은 종양에서는 민감도가 낮고 검사자에 따라 차이가 있을 수 있는 단점이 있다.^{1,2} 최근 기존의 방광경 검사와 요세포검사를 보완하고 대체할 수 있으며 민감도와 특이도가 높은, 요로상피암과 관련된 단백질인 bladder tumor antigen (BTA), nuclear matrix protein (NMP)-22와 survivin에 대한 연구가 있다.¹⁻³ 저자들은 방광의 요로상피암 환자에서 요중 survivin 검사와 다른 종양표지자인 요중 NMP-22 검사와 요세포검사를 시행하여 각 검

사들의 유용성을 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2002년 10월부터 2004년 3월까지 본원에서 경요도종양절제술 시행 후 얻어진 조직검사에서 방광의 요로상피암으로 진단받은 41명을 환자군으로 하고 혈뇨를 주소로 내원하여 검사결과 방광암이 아니었던 36명을 대조군으로 하였다. 환자군의 평균나이는 63.6세 (38-84)였으며, 성별 분포는 남자가 30명, 여자가 11명이었다. 대조군의 평균 나이는 60.4세 (45-70)였으며, 남자가 20명, 여자가 16명이었다. 경요도종양절제술로 얻은 조직과 요세포검사를 위한 검체는 모두 1명의 병리의사가 판정하였다. 환자군의 병기는 International Union Against Cancer (UICC) TNM system을 사용하였고, 분화도는 1998년 WHO/ISUP를 이용하여 분류하였다. 대조군은 모두 배설성요로조영술, 방광조음과검사와 방광경검사를 시행하여 요로상피암이 발견되지 않은 환자들이었다.

2. 방법

1) 검체수집 및 보관: Survivin과 NMP-22 측정을 위하여 방광암환자에서는 수술 당일 아침 첫 소변을 채취하였고 대조군에서는 외래 내원 당일, 또는 입원 다음날 아침에 채취한 소변을 사용하였다. 요세포검사는 방광경검사 후 세척하여 얻은 검체로 시행하였다. Survivin 측정을 위한 검체는 채취 즉시 2,000rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질 안정제를 첨가한 후 측정 시까지 -70°C 냉장고에서 보관하였으며 NMP-22 측정을 위해 채취한 검체는 단백질 안정제와 단백질 분해효소 억제제, 그리고 완충용액과 혼합하여 측정시까지 -20°C 냉장고에 보관하였다.

2) 요중 survivin의 측정⁴: -70°C 냉동고에 보관되어 있던 소변은 실온에서 해동시켜 13,000G에서 원심침전하여 상층

액 100μl로 survivin의 농도를 측정하였다. Survivin에 대한 항체가 붙어있는 test kit를 만드는 과정으로 DuoSet IC ELISA kit (R & D System Inc, Minneapolis, USA)를 사용하였다. Phosphate buffer saline (PBS) buffer를 사용하여 희석하고 처리하여 이를 microplate luminometer인 DML2000™ (Digena, Gaithersburg, USA)을 이용하여 발색의 정도를 측정하여 표준곡선을 구한 후 chemiluminescence법을 이용하여 survivin의 농도를 측정하였다.

3) NMP-22의 측정: Automated chemiluminescent assay system (IMMULITE, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, USA)을 사용하여 NMP-22를 측정하였다.

4) 통계분석: Survivin은 16.5pg/ml 이상인 경우, NMP-22는 10U/ml 이상인 경우를 양성으로 판정하였고 세 가지 검사의 민감도와 특이도 값들을 비교 분석하였다. 통계분석은 chi-square test와 Fisher's exact test를 이용하여 p-value 0.05 미만을 의미 있는 것으로 하였다.

결 과

요중 survivin 검사는 환자군의 32례 (78.0%)에서 양성 있었고 NMP-22 검사와 요세포검사에서 각각 31례 (75.6%)와 27례 (65.8%)가 양성이었다. 대조군에서는 36례 중 5례에서 survivin 검사에서 양성을 보여 특이도는 86.1%였고 NMP-22 검사와 요세포검사는 각각 12례, 1례에서 양성으로 각각의 특이도는 66.6%, 97.2%였다. 요중 survivin 검사는 특이도는 NMP-22 검사보다 의미있게 높았으며 민감도는 요세포검사에 비해 높았다 (Table 1).

41례의 방광이행세포암 환자군의 병기는 각각 T1 17명 (41.5%), T2 5명 (12.2%), T3 14명 (34.1%), T4 5명 (12.2%)으로 표재성이 17명, 침윤성이 24명이었다. 표재성 방광암 17례 중 survivin 검사는 12례 (70.5%), NMP-22 검사는 8례 (47.0%), 요세포검사는 9례 (52.9%)에서 양성 있었고 survivin

Table 1. Overall results of the urinary survivin test, the NMP-22 test and the urine cytology

	Survivin test		NMP-22 test		Urine cytology		p-value
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	
Bladder cancer (n=41)	32	9	31	10	27	14	
Control (n=36)	5	31	12	24	1	35	
Sensitivity	78.0%*		75.6%		65.8%*		p* < 0.05
Specificity	86.1%†		66.6%†		97.2%		p† < 0.05

NMP-22: nuclear matrix protein-22, *: statistical significance between survivin test and urine cytology, †: statistical significance between survivin test and NMP-22 test

Table 2. The urinary survivin test, NMP-22 test and urine cytology for detecting urothelial carcinoma of the bladder according to the tumor stage

	Survivin test	NMP-22 test	Urine cytology	p-value
Superficial (n=17)	70.5% (12/17)	47.0% (8/17)	52.9% (9/17)	p>0.05
Invasive (n=24)	87.5% (21/24)	95.8% (23/24)	75.0% (18/24)	p>0.05
p-value	0.331	p<0.01	0.041	

NMP-22: nuclear matrix protein-22

Table 3. The urinary survivin test, NMP-22 test and urine cytology for detecting of urothelial carcinoma of the bladder according to the tumor grade

	Survivin test	NMP-22 test	Urine cytology	p-value
Low grade (n=19)	73.6% (14/19)	68.4% (13/19)	57.9% (11/19)	p>0.05
High grade (n=22)	81.8% (18/22)	81.8% (18/22)	72.7% (16/22)	p>0.05
p-value	0.530	0.319	0.428	

NMP-22: nuclear matrix protein-22

Table 4. The overall sensitivity of the urinary survivin test, the survivin test+the NMP-22 test and the survivin test+the urine cytology

	Sensitivity	p-value
Survivin test (n=41)	78.0% (32/41)	
Survivin test+NMP-22 test	92.7% (38/41)	p<0.05
Survivin test+urine cytology	90.0% (37/41)	p<0.05

NMP-22: nuclear matrix protein-22

검사의 민감도가 가장 높았다. 침윤성암 24례 중 survivin 검사는 21례 (87.5%), NMP-22검사는 23례 (95.8%), 요세포 검사는 18례 (75.0%)에서 양성을 보였다 (Table 2).

방광이행세포암을 분화도별로 분류하였을 때 저분화도 19례 중 survivin 검사는 14례 (73.6%), NMP-22 검사에서는 13례 (68.4%), 요세포검사는 11례 (57.9%)에서 양성이고 고분화도 22례 중 survivin 검사, NMP-22 검사와 요세포검사에서 각각 18례 (81.8%), 18례 (81.8%), 16례 (72.7%)에서 양성으로 판정되어 분화도에 따른 민감도의 차이는 없었다 (Table 3).

요중 survivin 검사를 기존의 NMP-22 검사와 요세포검사와 병행한 경우 민감도가 92.7%, 90.0%로 survivin 단독 검사에 비해 의미있게 높았다 (Table 4).

Survivin 검사와 다른 두 가지 검사의 병기 및 분화도에 따른 상호 비교분석에서는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다.

고 찰

Survivin은 세포고사 억제유전자 가족 (Inhibitors of Apoptosis Proteins Family; IAPs)의 일종인 단백질로 태생기 발달 시와 생리주기 중 분비기의 자궁내막에서 발현되고 완전히 분화가 된 성인의 조직에서는 발현되지 않는다.^{3,5} 성인에서는 폐, 대장, 췌장, 유방, 전립선 그리고 방광암과 같은 악성종양에서 다시 나타난다.⁶⁻¹¹ Bcl-2 유전자가 세포고사를 억제하는 대표적인 것으로 알려진 이후 많은 연구를 통해 최근 IAPs가 보고되었다.^{12,13} IAPs는 Baculovirus에서 처음 발견되었는데 이들은 세포고사 기전에서 형태학적 변화를 유발하는 단백질 분해 기능을 가지고 있는 effector molecule의 집단인 caspase와 결합하여 세포고사를 억제한다. 이들은 Bcl-2보다 세포고사를 억제하는 능력이 더 크고, survivin은 다른 IAPs군과 달리 carboxyl-terminal RING finger domain이 없는 독특한 구조로 되어 있다.^{11,13} 염색체 위치는 17q25에 위치하여 세 개의 intron과 4개의 exon으로 구성되어 총 142개의 아미노산으로 이루어진 분자량 16.5kDa의 단백질이다. Survivin은 세포주기 중 G2/M에서 발현이 되는데 감수분열의 시작 시기에 방추체의 미세소관의 기능을 억제하는 것과 연관되어 있으며 다단계의 cascade로 구성된 세포고사 기전에서 caspase 3와 7의 활동을 직접적으로 억제한다.¹⁴

Kim 등⁴의 연구에서는 정상인, 방광암을 제외한 다른 비뇨기질환이 있는 환자군, 방광암 환자로 나누어 요중 sur-

vivin의 정량 검사를 시행한 결과 방광암 환자군이 평균치가 63.3pg/ml로 정상인과 다른 비뇨기질환이 있는 환자군보다 평균 survivin 치가 높다고 보고하였다. 다른 비뇨기질환이 있는 환자군에는 신세포암과 전립선암이 포함되어 있었는데 이들의 평균 survivin 치가 10pg/ml 미만으로 방광암 환자에 비해 낮은 값을 보임을 보고하였다. 또한 방광암의 조직학적 형태에 따른 survivin 평균치는 분류한 결과 이행 세포암에서 편평상피세포암으로 분화가 동반된 경우와 소 세포암에서 이행세포암보다 높았다.

Smith 등¹⁵은 46례의 새로 진단되거나 재발한 방광암환자의 소변에서 survivin이 검출된 반면 건강한 성인과 신세포암, 전립선암, 자궁경부암환자에서는 검출되지 않았다고 보고하였는데 Kim 등⁴의 이전 연구와 저자들의 연구에서는 정상인에서도 낮은 수치이지만 요중 survivin을 검출할 수 있었다. 이는 측정단위가 다른 연구에 비해 정밀한 pg/ml를 사용한 것 때문으로 생각된다. 정상대조군 5례에서 요중 survivin이 양성으로 나타난 것도 이 때문으로 생각된다. 요중에서 survivin의 양적 검출이 침윤성인 경우와 고분화도인 경우에 더 높게 나타났다는 보고가 있으나¹⁶ 본 연구에서도 침윤성암에서 survivin이 높게 검출되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 표재성 방광암에서 요중 survivin 검사와 요중 NMP-22 검사, 요세포검사를 비교하였을 때 각각 민감도가 70.5%, 47.0%, 52.9%로 요중 survivin 검사의 민감도가 우수하고 저분화도 방광이행세포암 진단에 있어 민감도가 73.6%, 68.4%, 57.9%로 요중 NMP-22 검사, 요세포검사에 비해 민감도가 높아 표재성 방광암과 저분화도 방광암을 진단하는데 있어 다른 두 가지 검사법에 비해 더욱 가치가 있다고 생각된다. Survivin이 폐, 대장, 췌장, 유방, 방광의 종양에서 발현되는 것은 좋지 못한 예후, 생존율의 감소 그리고 재발까지 시간의 단축들과 관련이 있다는 보고들이 있다.^{10,11} 표재성 방광암에서 얻은 조직을 대상으로 survivin을 측정된 연구에서 분화도와 병기와는 관련이 없다는 보고와 분화도와 관련이 있다는 연구가 있어 조직을 대상으로 한 연구에서 분화도와 survivin의 발현과의 관계는 확실하지 않다.^{10,12} 조직 내에서 survivin이 높은 정도로 발현되는 것이 낮게 발현된 경우보다 예후가 좋지 않으며, 저분화도의 방광이행세포암 조직을 survivin 양성과 음성으로 나누어 추적 관찰한 결과에서 survivin이 첫 번째 재발까지의 기간이 각각 12±6개월, 36±16개월로 survivin 양성인 경우 첫 번째 재발까지의 기간이 짧았다.^{10,12} Hausladen 등¹¹은 bacillus Calmette-Guerin (BCG)나 mitomycin-C 같은 방광 내 약물주입 치료를 받은 25명의 환자를 대상으로 12개월간 추적관찰하였다. Survivin 검사, 요세포검사와 방광내시경을 시행한 후 survivin 치와 치료 결과를 비교한 결과 1개월

뒤 요중 survivin 치가 0.1ng/ml 이하이거나 검출되지 않았던 경우 재발률이 낮았다. 이는 survivin이 방광암 세포 내에서만 국소화 되기 때문에 BCG 등의 방광 내 약물 주입 치료에 영향을 받지 않는다고 주장하였다.

NMP는 핵내의 3차원 구조형성과 관련된 단백질의 일종으로 DNA 복제와 RNA 합성 등과 같은 유전자 발현이나 조절에 관계하는 것으로 알려져 있고 종양의 종류에 따라 다양하다.¹⁷ 또한 세포가 죽게 될 때 혈액이나 소변으로 유출될 수 있으며 방광암이 있는 경우 정상적인 방광세포에 비해 세포내 농도가 25배 이상 높게 존재한다.^{17,18} Kwon 등¹은 방광암 환자에서 요세포검사보다 NMP-22 검사의 민감도가 높았다고 보고하였으며, 본 연구에서도 NMP-22 검사의 민감도가 요세포검사보다 우수하였다. 방광암의 병기, 분화도별로 분류하였을 때 요중 NMP-22 검사는 분화도에서는 저분화도와 고분화도 간의 유의한 차이는 없었지만 침윤성암에서 표재성암보다 민감도가 높았다. NMP-22 검사의 기준치는 대부분의 연구에서 10U/ml로 하고 있지만, Park 등²은 15U/ml로 한 경우 민감도 90.0%, 특이도 90.6%였다고 보고하였다. NMP-22 검사는 또한 요로감염, 신장질환, 전립선비대증, 요로결석 환자군에서도 양성으로 나타날 수 있으며 특히 요로감염 환자군에서는 대부분이 양성을 보여 결과해석에 주의해야 한다. 본 연구에서는 요중 survivin 검사가 요세포검사보다 민감도가 높았고 NMP22보다 특이도가 높았으나, 병기 및 분화도에 따른 비교에서는 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 그러나 표재성암 그리고 저분화도의 암을 진단하는 데 있어서는 요중 survivin 측정이 다른 두 검사법에 비해 민감도가 높았다. 또한 요중 survivin 검사는 다른 검사에 비해 요로감염이나 방광 내 약물주입 치료 등에 영향을 받지 않아 우수한 검사법으로 생각된다. 요중 survivin 검사를 기존의 NMP-22 검사와 요세포검사를 병행할 경우 방광암의 진단과 추적관찰에 더 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로의 연구는 방광암 환자에서 장기간에 걸친 방광에 대한 추적 검사의 필요성과 이에 따르는 비용문제를 고려한 연구가 필요하다.

결 론

본 연구결과 요중 survivin 검사는 방광이행세포암의 진단에 있어 기존의 NMP-22 검사보다 특이도가 높고 요세포 검사보다 민감도가 높은 종양표지자이며, 특히 방광암의 대부분을 차지하고 있는 표재성암과 저분화도 방광암의 조기발견과 치료 후 추적관찰에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Kwon DH, Hong SJ. The clinical utility of BTA TRAK, BTA stat, NMP22 and urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a comparative study. *Korean J Urol* 2003;44:721-6
2. Park JO, Moon DG, Cheon J, Kim JJ, Yoon DK. Urinary NMP (nuclear matrix protein) 22 in screening and post-treatment follow-up bladder cancer. *Korean J Urol* 1999;40:551-6
3. Shariat SF, Casella R, Khoddami SM, Hernandez G, Sulser T, Gasser TC, et al. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 2004;171:626-30
4. Kim JM, Lee KW, Kim YH, Park SK, Lee YK, Kim ME. Expression of urinary survivin as a new tumor marker for the detection of bladder cancer. *Korean J Urol* 2004;45:1219-23
5. Fuessel S, Kueppers B, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, et al. Systematic in vitro evaluation of survivin directed antisense oligodeoxynucleotides in bladder cancer cells. *J Urol* 2004;171:2471-6
6. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-4
7. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nature Genet* 1999;23:387-8
8. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000;6:529-34
9. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-21
10. Swana HA, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999;341:452-3
11. Hausladen DA, Wheeler MA, Altieri DC, Colberg JW, Weiss RM. Effect of intravesical treatment of transitional cell carcinoma with bacillus Calmette-Guerin and mitomycin C on urinary survivin levels and outcome. *J Urol* 2003;170:230-4
12. Ku JH, Kwak C, Lee HS, Park HK, Lee ES, Lee SE. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2004;171:631-5
13. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992;258:302-4
14. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltsersdorf T, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998;58:5315-20
15. Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, Colberg JW, Weiss RM, Altieri DC. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA* 2001;285:324-8
16. Schultz JJ, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA, Willems JL, Swinkels DW, et al. Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res* 2003;23:3327-31
17. Miller TE, Beausang LA, Winchell LF, Lidgard GP. Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients. *Cancer Res* 1992;52:422-7
18. Keesee SK, Briggman JV, Thill G, Wu YJ. Utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996;6:189-214