

瘦素在非肌层浸润性膀胱癌中的表达及其意义

林世龙, 杨国良, 张连华, 薄隽杰

(上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200001)

摘要: [目的] 探讨瘦素在非肌层浸润性膀胱癌中的表达情况, 组织并分析其与膀胱癌患者临床病理特征及预后的关系。[方法] 收集 112 例膀胱移行细胞癌组织和 20 例正常膀胱组织的病理切片, 采用免疫组化方法检测膀胱癌和正常膀胱组织中瘦素的表达。[结果] 正常膀胱组织中瘦素的表达水平明显低于肿瘤组织 ($P=0.032$)。在低级别、高级别膀胱癌中, 瘦素的阳性表达率分别为 43.8%、75.8%, 差别有统计学意义 ($P=0.001$)。本组随访 6~102 个月, 其中 67 例出现复发。复发组与未复发组中瘦素的阳性表达率分别为 70.1% 和 46.7%, 差别有统计学意义 ($P=0.013$)。但瘦素表达与患者年龄、性别、肿瘤数目、大小及分期无明显相关性 ($P>0.05$)。[结论] 瘦素表达在膀胱癌组织中明显高于正常膀胱组织, 瘦素的检测有助于膀胱癌诊断及预后评估。

关键词: 膀胱肿瘤; 瘦素; 预后

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)02-0131-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.02.B011

Expression of Leptin in Non-muscle-invasive Bladder Cancer and Its Significance

LIN Shi-long, YANG Guo-liang, ZHANG Lian-hua, et al.

(Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200001, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of leptin in non-muscle-invasive bladder cancer and its relationship with clinical features and prognosis. [Methods] The expression of leptin in 112 specimens of non-muscle-invasive bladder cancer and 20 specimens of normal bladder tissues was detected by immunohistochemistry. [Results] The positive rate of leptin was significantly higher in bladder cancer tissues than that in normal bladder tissues ($P=0.032$). The positive rate of leptin was 43.8% in low grade bladder cancer, 75.8% in high grade, with significant difference ($P=0.001$). The patients were followed up for 6~102 months, and 67 patients were recurrent. The expression of leptin was significantly higher in recurrence group than that in non-recurrence group (70.1% vs 46.7%, $P=0.013$). The positive rate of leptin related to tumor grade and recurrence ($P<0.05$), but not with sex, age, tumor number, size and stage ($P>0.05$). [Conclusion] The expression of leptin is higher in superficial bladder cancer. The detection of the expression of leptin is helpful to diagnosis and prognostic evaluation in non-muscle-invasive bladder cancer.

Subject words: bladder neoplasms; leptin; prognosis

膀胱癌是泌尿系最常见的恶性肿瘤, 其中 90% 是移行细胞癌。膀胱癌进展快、复发率高, 寻找一种无创性检查方法, 用于膀胱肿瘤的初诊和术后高危人群的筛查监测, 尤其是寻找对膀胱癌诊断灵敏度高、特异性强、方便快捷的肿瘤标志物成为研究的重要方向之一。瘦素是一种大小为 16kD 的激素蛋白, 主要调节人体的能量代谢。除脂肪细胞外, 肝脏、胃、

乳腺、骨髓以及脑垂体等处也可合成瘦素。近年研究发现瘦素在食管癌、前列腺癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤中表达异常^[1-4], 提示高水平的瘦素被证实可促进肿瘤细胞的增殖及侵袭^[5]。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取上海交通大学附属仁济医院泌尿外科住院手术治疗患者中的 112 例膀胱移行细胞癌组织和

基金项目: 上海市科学技术委员会面上项目 (12ZR1417700)

通讯作者: 薄隽杰, 主任医师, 博士生导师, 博士; 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市黄浦区山东中路 145 号 (200001);
E-mail: bojuanjie@sina.com

收稿日期: 2013-08-19; **修回日期:** 2013-11-06

20 例同期手术病例的正常膀胱组织的病理切片,均经病例证实。其中男性 75 例,女性 37 例,年龄 41~85 岁,中位年龄 69 岁。112 例非肌层浸润性膀胱癌患者中,67 例出现复发。

1.2 免疫组化测定

组织经福尔马林固定,石蜡包埋,厚 5 μ m,石蜡切片经常规脱蜡至水,柠檬酸(pH6.0)高温修复抗原,PBS 冲洗 3 次,每次 5min,以 3%的 H₂O₂ 孵育 10min,清除内源性的过氧化物酶活性,PBS 冲洗 3 次,每次 5min,滴加正常山羊血清封闭,室温孵育 30min,倾去,滴加 1:200 鼠抗人单克隆抗体(Abcam 公司),4℃冰箱孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 5min,再加生物素标记二抗(DAKO 公司),室温孵育 30min,PBS 冲洗 3 次,每次 5min,再滴加辣根过氧化物酶标记的三抗,室温孵育 30min,PBS 冲洗 3 次,每次 5min,DAB 显色,苏木精复染,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

瘦素以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性表达,以细胞染色强度和细胞阳性百分率得分之积进行判定,随机选择 5 个高倍镜视野进行判断:着色强度无染色记 0 分,浅黄色计 1 分,棕黄色计 2 分,黄褐色计 3 分,同时对阳性细胞百分比进行评分(0~100%)。上述 2 项相乘,<50%阴性, $\geq$ 50%阳性。结果观察在未知患者临床资料的情况下进行。

1.4 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件进行数据统计分析。不同分组间采用 χ^2 检验进行统计学分析。Kaplan-Meier 法计算生存率,生存率的比较采用 Log-Rank 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 瘦素在膀胱癌组织和正常膀胱组织中的表达

瘦素蛋白主要在细胞浆内表达(Figure 1)。20 例正常组织中有 7 例表达,阳性表达率为 35.0%;112 例膀胱癌患者中 68 例表达,阳性表达率为 60.7%,肿瘤组织中的阳性表达率明显高于正常膀胱组织($P=0.032$)。

2.2 瘦素的表达与膀胱癌患者临床病理的关系

瘦素的表达与膀胱癌患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤数目等无明显相关性($P>0.05$);但与膀胱癌的分级、复发有关($P<0.05$)。在低级别、高级别膀胱癌中,瘦素的阳性表达率分别为 43.8%、75.8%,差别有统计学意义($P=0.001$)。复发组与未复发组中瘦素的阳性表达率分别为 70.1%和 46.7%,差别有统计学意义($P=0.013$)(Table 1)。

2.3 瘦素的表达与膀胱癌患者无复发及无进展生存率的关系

通过对非肌层浸润性膀胱癌患者随访,随访截止日期为 2011 年 12 月 31 日,随访终点为复发或进

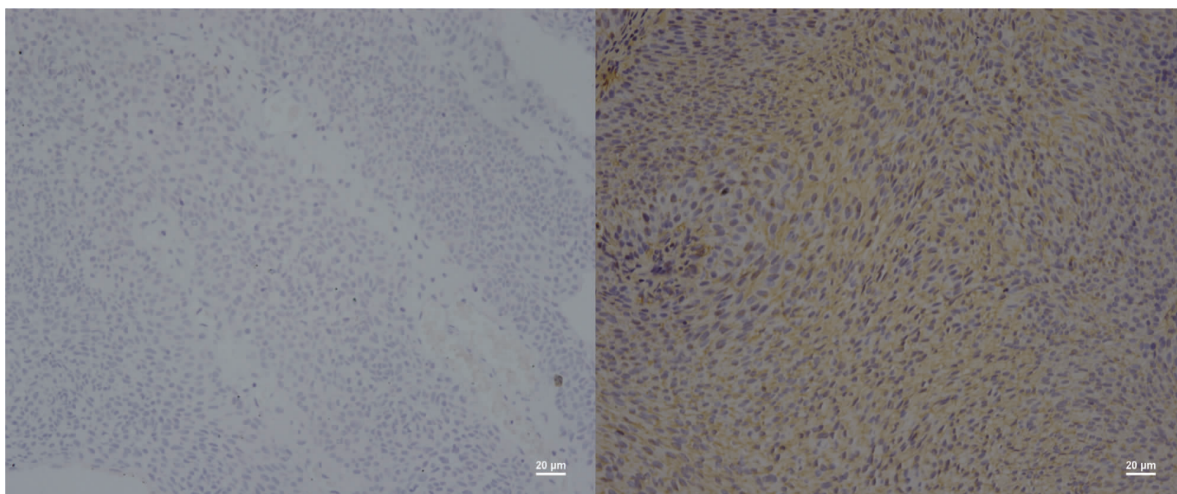


Figure 1 Expression of leptin in bladder cancer tissues and normal bladder tissues

展,随访 6~102 个月,中位随访 43.4 个月。112 例非肌层浸润性膀胱癌中,复发 67 例,Log-Rank 检验比较性别、年龄、肿瘤大小、数目、分级及瘦素的表达等因素研究发现,瘦素的阳性表达是患者术后预测复发的预后因素。Kaplan-Meier 曲线显示,瘦素阳性表达组患者和阴性表达组患者术后无复发生存率有显著性差异(Figure 2)。

Table 1 Correlation of leptin expression to clinicopathologic features of bladder cancer

Variables	N	Expression of leptin		χ^2	P
		Negative(%)	Positive(%)		
Gender					
Female	37	17(45.9%)	20(54.1%)	1.028	0.311
Male	75	27(36.0%)	48(64.0%)		
Age(years)					
≤ 65	45	16(35.6%)	29(66.4%)	0.439	0.508
> 65	67	28(41.8%)	39(51.2%)		
Tumor size(cm)					
≤ 3	74	28(37.8%)	46(62.2%)	0.221	0.639
> 3	38	16(42.1%)	22(57.9%)		
Tumor number					
Unifocal	65	27(41.5%)	38(58.5%)	0.330	0.566
Multifocal	47	17(36.2%)	30(63.8%)		
Grade					
Low grade	48	27(56.3%)	21(43.8%)	11.779	0.001
High grade	64	15(24.2%)	47(75.8%)		
T stage					
T _a	67	29(43.3%)	38(56.7%)	1.117	0.290
T ₁	45	15(33.3%)	30(66.7%)		
Rucurrence					
Yes	67	20(29.9%)	47(70.1%)	6.224	0.013
No	45	24(53.3%)	21(46.7%)		

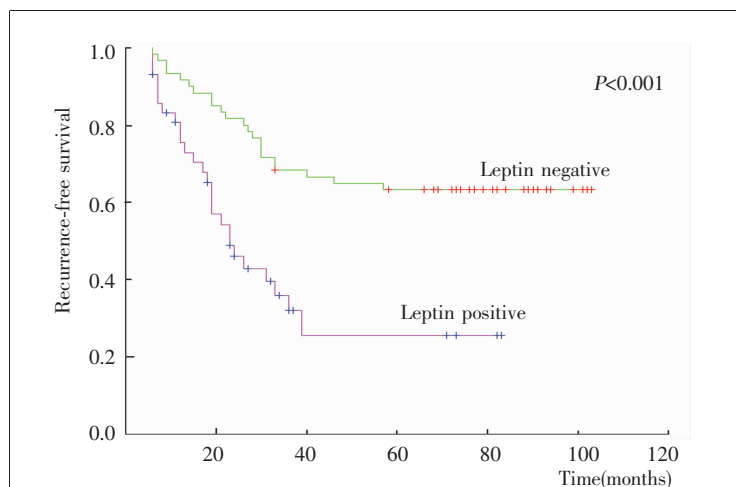


Figure 2 Recurrence-free survival curves of bladder cancer patients with or without leptin expression

3 讨论

膀胱癌是最常见的泌尿系统恶性肿瘤,在美国男性恶性肿瘤发病中占第 4 位,女性中占第 7 位。2011 年美国新发膀胱癌病例 70 530 例,其中 14 680 例死亡^[6]。中国临床统计资料显示,膀胱癌发病率在泌尿系统肿瘤中仍处于首位,其中男性发病率为

14.72/10 万,女性发病率为 5.34/10 万^[7]。在

所有初次诊断的患者中,大约 75%的患者是非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer,NMIBC),25%的患者是肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer,MIBC)^[8]。非肌层浸润性膀胱癌 5 年生存率大于 90%,但复发率高达 60%~85%,其中 20%可进展为肌层浸润性肿瘤^[9]。近年来,在美国有研究显示,肥胖与乳腺癌、宫颈癌、肾癌、肝癌等有密切关系^[10,11]。而在众多有关肥胖的基因当中,瘦素在 1994 年首次被体外克隆^[12]后,人们发现其与多种肿瘤发生发展有密切关系,Ishikawa 等^[13]发现乳腺癌组织较正常组织瘦素表达更强,且瘦素表达高的患者发生转移的概率更大,尤其是在不表达雌激素和黄体酮受体以及 Her-2 的三阴性乳腺癌中表达较高^[14];Yuan 等^[15]发现膀胱癌组织中瘦素受体的表达水平下降,同时利用 T24 膀胱癌细胞株过表达瘦素受体后,细胞周期被阻滞在 S 期之前;Hoon Kim 等^[16]发现前列腺癌标本瘦素表达高于前列腺增生标本而且瘦素表达水平与前列腺癌是否转移及 Gleason 评分成正比。国内外学者不仅发现瘦素表达水平在各种肿瘤中表达异常这一现象,而且就其机制近年来也作出较为深入的探讨。Ptak 等^[17]发现瘦素在卵巢癌细胞中可通过 STAT3 途径抑制 caspase-3 表达;Yan 等^[18]在乳腺癌中,瘦素调节 GSK3 β 磷酸化通过 Akt/GSK3 β 和 MTA/Wnt 通路激活 β -catenin 来促使肿瘤细胞发生 EMT;Yehuda-Shnaidman 等^[19]将大肠癌细胞株 HCT116 置于瘦素环境下培养,发现瘦素在不影响细胞糖分解酶的情况下抑制了线粒体的呼吸

作用, Zheng 等^[20]获得 MMTV-Wnt-1 转基因小鼠自发肿瘤细胞后, 发现瘦素可影响 CD29/CD24 这一包含肿瘤干细胞的细胞群的成球数量; 综上所述可以发现瘦素在细胞凋亡、肿瘤细胞上皮间质转化、细胞代谢以及肿瘤干细胞等方面均发挥作用, 这为我们进一步研究瘦素在膀胱癌中的作用提供了新思路。

本实验用免疫组化的方法检测膀胱癌组织和正常膀胱组织标本中瘦素的表达。结果显示, 在膀胱移行细胞癌标本中, 瘦素的阳性表达率明显高于正常组织 ($P=0.032$); 随着膀胱移行细胞癌分级的增高, 瘦素的阳性表达率也明显增高 ($P<0.05$), 提示瘦素的表达与膀胱癌恶性程度及自然病程有关。

112 例非肌层浸润性膀胱癌患者复发 67 例, 复发患者瘦素的表达明显高于无复发, 其差别有明显统计学意义 ($P<0.05$)。通过比较性别、年龄、肿瘤数目、大小、分级及瘦素的表达等因素研究发现, 瘦素的表达是预测患者术后无复发生存的独立观察指标。因此术后检测瘦素表达对预测患者术后的复发及进展有重要的意义。

综上所述, 瘦素表达与膀胱癌的病理分级有关, 而且也是预测患者术后复发的一个有效指标。因此, 我们认为进一步探讨瘦素导致膀胱癌复发的分子机制, 有望为判断膀胱癌预后提供一种新的分子生物学指标。

参考文献:

- [1] Wang XJ, Yuan SL, Lu Q, et al. Potential involvement of leptin in carcinogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(17): 2478-2481.
- [2] Wang Y, Luo HS, Zhao L, et al. Expression of leptin and leptin receptor in gastric carcinoma [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2005, 22(5): 609. [王颖, 罗和生, 赵亮, 等. 瘦素及其受体在胃癌中的表达 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(5): 609.]
- [3] Ribeiro AM, Andrade S, Pinho F. Prostate cancer cell proliferation and angiogenesis in different obese mice models [J]. Int J Exp Pathol, 2010, 91(4): 374-386.
- [4] Wu MH, Chou YC, Chou WY, et al. Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk [J]. Br J Cancer, 2009, 100 (4): 578-582.
- [5] García-Robles MJ, Segura-Ortega JE, Fafutis-Morris M. The biology of leptin and its implications in breast cancer: a general view [J]. J Interferon Cytokine Res, 2013, 33(12): 717-727.
- [6] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [7] Zhang W, Xiang YB, Liu ZW, et al. Trends analysis of common urologic neoplasm incidence of elderly people in Shanghai, 1973-1999 [J]. Ai Zheng, 2004, 23(5): 555-558.
- [8] Zlotta AR, Roumeguere T, Kuk C, et al. Select screening in a specific high-risk population of patients suggests a stage migration toward detection of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Eur Urol, 2011, 59(6): 1026-1031.
- [9] Youssef RF, Lotan Y. Predictors of outcome of non-muscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer [J]. Scientific World Journal, 2011, 11: 369-381.
- [10] Basen-Engquist K, Chang M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence [J]. Curr Oncol Rep, 2011, 13(1): 71-76.
- [11] Paz-Filho G, Lim EL, Wong ML, et al. Associations between adipokines and obesity-related cancer [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011, 16: 1634-1650.
- [12] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [J]. Nature, 1994, 372(6505): 425-432.
- [13] Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(13): 4325-4331.
- [14] Otvos L Jr, Kovalszky I, Riolfi M, et al. Efficacy of a leptin receptor antagonist peptide in a mouse model of triple-negative breast cancer [J]. Eur J Cancer, 2011, 47(10): 1578-1584.
- [15] Yuan SS, Chung YF, Chen HW, et al. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in bladder cancer [J]. Urology, 2004, 63(2): 408-413.
- [16] Hoon Kim J, Lee SY, Myung SC, et al. Clinical significance of the leptin and leptin receptor expressions in prostate tissues [J]. Asian J Androl, 2008, 10(6): 923-928.
- [17] Ptak A, Rak-Mardyla A, Gregoraszczuk EL. Cooperation of bisphenol A and leptin in inhibition of caspase-3 expression and activity in OVCAR-3 ovarian cancer cells [J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(6): 1937-1943.
- [18] Yan D, Avtanski D, Saxena NK, et al. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways [J]. J Biol Chem, 2012, 287(11): 8598-8612.
- [19] Yehuda-Shnaidman E, Nimri L, Tarnovscki T, et al. Secreted human adipose leptin decreases mitochondrial respiration in HCT116 colon cancer cells [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74843.
- [20] Zheng Q, Dunlap SM, Zhu J, et al. Leptin deficiency suppresses MMTV-Wnt-1 mammary tumor growth in obese mice and abrogates tumor initiating cell survival [J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18(4): 491-503.