

小窝蛋白-1 和血管内皮生长因子在膀胱尿路上皮癌中的表达及其临床意义

董建国¹, 江海波², 任选义², 陈静¹, 代翠莲¹

(1. 兰考第一医院, 河南 兰考 475300; 2. 开封市中心医院, 河南 开封 475000)

摘要: [目的] 探讨小窝蛋白-1(caveolin-1)和血管内皮生长因子(VEGF)在膀胱尿路上皮癌(BUC)组织中的表达及其临床意义。[方法] 应用免疫组织化学 PV-6000 法检测 caveolin-1 和 VEGF 在 86 例 BUC 和 13 例正常膀胱黏膜组织中的表达情况并分析其相关性。[结果] Caveolin-1 和 VEGF 蛋白在正常膀胱黏膜呈低表达 (8.7%和 15.4%), 在 BUC 组织呈高表达 (59.6%和 75.6%), 差异均有统计学意义($P=0.003$, $P=0.017$)。Caveolin-1 在 BUC 组织的阳性表达率随着膀胱癌分级和分期的提高, 其表达水平呈增高趋势, 差异有统计学意义($P=0.005$, $P=0.002$)。VEGF 在 BUC 组织的阳性表达率随着 BUC 分级和分期的提高其表达水平亦增高, 差异有统计学意义($P=0.006$, $P=0.002$)。Caveolin-1 和 VEGF 蛋白在 BUC 组织中的阳性表达呈正相关($r=0.245$, $P=0.023$)。[结论] Caveolin-1 和 VEGF 在 BUC 组织中高表达, 可作为促进 BUC 发生和进展的标志物。

关键词: 小窝蛋白-1; 血管内皮生长因子; 膀胱上皮癌; 组织学分级; 临床分期

中图分类号: R737.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)08-0698-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.08.B010

Expression of Caveolin-1 and VEGF in Bladder Urothelial Carcinoma and its Clinical Significance

DONG Jian-guo¹, JIANG Hai-bo², REN Xuan-yi², et al.

(1. The First Hospital of Lankao, Lankao 475300, China; 2. The Central Hospital of Kaifeng, Kaifeng 475000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression and clinical significance of caveolin-1 and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in bladder urothelial carcinoma (BUC). [Methods] The expression level of caveolin-1 and VEGF protein in 86 cases of BUC and 13 cases of normal bladder mucosa was detected by immunohistochemical PV-6000 method, and the correlation of caveolin-1 and VEGF expression with clinicopathological features of BUC was analyzed. [Results] The positive rate of caveolin-1 and VEGF protein in BUC (59.6% and 75.6%) was higher than that in normal bladder mucosa (8.7% and 15.4%; $P=0.003$ and $P=0.017$). The positive expression of caveolin-1 in BUC was positively correlated with the histological grades and T stages ($P=0.005$, $P=0.002$). The positive expression of VEGF in BUC was positively correlated with the histological grade and T stages ($P=0.006$, $P=0.002$). The expression of caveolin-1 and VEGF protein was positively correlated with each other in BUC ($r=0.245$, $P=0.023$). [Conclusion] Caveolin-1 and VEGF are highly expressed in BUC, indicating that both caveolin-1 and VEGF may promote the carcinogenesis and progression of BUC.

Subject words: caveolin-1; vascular endothelial cell growth factor; bladder urothelial carcinoma; histological grade; clinical stage

膀胱癌是我国发病率最高的泌尿系统恶性肿瘤,具有多灶性生长和恶性进展特征。尿路的被覆上皮称为尿路上皮(urothelium)或移行上皮(transitional cell),本研究采用尿路上皮的概念。90%以上的膀胱

癌是尿路上皮细胞癌,又称膀胱上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BUC)。目前尚无可靠的指标用以预测 BUC 的发病风险、恶性程度及其预后^[1]。小窝蛋白-1(caveolin-1)参与了细胞的生长和增殖过程,被认为与肾癌、前列腺癌等肿瘤的发生和浸润性生长有关^[2],但 caveolin-1 在膀胱癌组织中的研究较少。血管内皮生长因子(vascular endothelial cell

通讯作者: 任选义,主任医师,硕士生导师,医学博士;开封市中心医院泌尿外科,河南省开封市龙亭区河道街 85 号(475000);E-mail: D2009049@126.com

收稿日期: 2017-01-05; **修回日期:** 2017-02-02

growth factor, VEGF) 属于血小板源生长因子超基因家族成员, 通过和血管内皮生长因子受体 1 和 2 (vascular endothelial cell growth factor receptor, VEGFR-1, VEGFR-2) 相结合, 调节内皮细胞增殖、迁移和血管渗透功能, 与肿瘤的新生血管形成有关^[3]。本研究采用免疫组化方法检测 caveolin-1 和 VEGF 蛋白在膀胱上皮癌组织中的表达情况, 并探讨其临床价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2009 年 1 月至 2016 年 6 月手术切除的膀胱上皮癌标本 86 例, 其中 57 例为经尿道膀胱肿瘤电切除、29 例为膀胱全切除术获取, 均经 HE 染色病理诊断为膀胱尿路上皮癌(BUC)。男性 58 例, 女性 28 例, 年龄 28~99 岁, 平均 54.3 ± 3.7 岁。另取 13 例病理证实的正常膀胱黏膜作为对照, 男性 8 例, 女性 5 例, 年龄 39~79 岁, 平均 58.6 ± 3.4 岁。组织学分级按照 2004 年 WHO 的膀胱癌恶性程度分级系统, 其中低级别 BUC 47 例, 高级别 BUC 39 例; 临床分期根据国际抗癌联盟(UICC)的 2009 年第 7 版 TNM 分期法, 其中非肌层浸润性 BUC (Ta, T1) 53 例, 肌层浸润性 BUC (T₂~T₄) 33 例。鉴于 Tis 虽为非肌层浸润性 BUC, 但其恶性程度高, 为避免统计结果偏倚, 未将其列入本研究。入选病例的临床和病理资料完整, 术前未进行化疗、放疗和免疫治疗等。

1.2 免疫组化检测

将存档的经福尔马林固定、石蜡包埋的 BUC 标本组织块重新制备 4 μ m 厚切片, 行免疫组化 PV-6000 二步法染色, 具体操作按说明书进行。兔抗人 caveolin-1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 一抗工作液浓度 1:150; 兔抗人 VEGF 多克隆抗体(即用型, 工作液浓度 1:200)、非生物素标记二抗试剂及 DAB 显色试剂盒等购自北京中杉生物技术有限公司。用已知结果的肾癌阳性切片作为 caveolin-1 阳性对照, 以已知肺癌阳性切片作为 VEGF 阳性对照, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断

Olympus 光学显微镜下观察, caveolin-1 和 VEGF 蛋白表达阳性细胞均表现为在胞浆和/或胞膜

呈现颗粒样黄或棕黄染色。每张切片随机选取有组织学意义的 10 个高倍视野($\times 200$), 每视野计数 100 个肿瘤细胞, 以乘法^[4]计算总得分。①根据细胞着色深度: 0 分不着色, 1 分浅黄色, 2 分棕黄色, 3 分棕褐色; ②根据阳性细胞百分比: 0 分 <5%, 1 分 5%~25%, 2 分 25%~50%, 3 分 >50%。以①和②分项相乘的得分来判断染色结果, >1 为阳性表达, ≤ 1 为阴性表达。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件包进行数据分析, caveolin-1 和 VEGF 在膀胱上皮癌不同年龄、性别、分级、分期组间表达率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法。两种蛋白表达之间的相关性采用 Spearman 等级相关性分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Caveolin-1 在膀胱上皮癌及正常黏膜组织中的表达

Caveolin-1 蛋白在 BUC 组织的阳性表达率为 59.6% (51/86), 在膀胱黏膜组织的阳性表达率 8.7% (1/13), 组间差异有统计学意义 (P=0.003)。Caveolin-1 在 BUC 组织的阳性表达见 Figure 1。Caveolin-1 表达与年龄和性别无明显相关性 (P>0.05), 但随着 BUC 组织学分级和 T 分期的提高, caveolin-1 蛋白阳性表达水平呈增高趋势, 组间差异有统计学意义 (P<0.05), 见 Table 1。

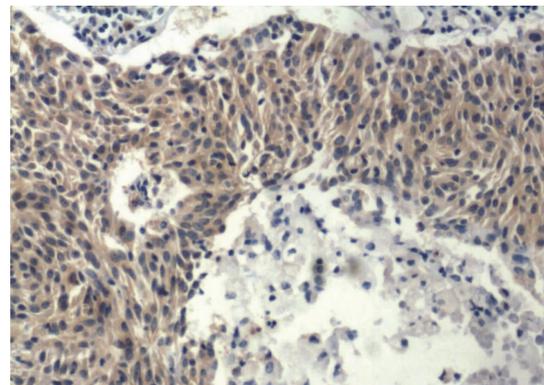


Figure 1 Positive expression of caveolin-1 in BUC [(PV-6000) $\times 200$]

2.2 VEGF 在膀胱上皮癌及正常黏膜组织中的表达

VEGF 蛋白在 BUC 组织的阳性表达率为 75.6%

Table 1 Correlation of caveolin-1 expression to clinicopathologic features of BUC

Variables	n	Caveolin-1		Positive rate(%)	χ^2	P
		+	-			
Age(years)						
≤60	42	25	17	59.5	0.002	0.967
>60	44	26	18	59.1		
Gender						
Male	58	34	24	58.6	0.201	0.654
Female	28	17	11	60.7		
Grade						
Low	47	20	27	42.6	8.865	0.005
High	39	31	8	79.5		
T stage						
T ₀ ,T ₁	53	23	30	43.4	10.358	0.002
T ₂ ~T ₄	33	28	5	84.8		

(65/86),在膀胱黏膜组织的阳性表达率为 15.4% (2/13),差异有统计学意义(P=0.017)。VEGF 在 BUC 组织的阳性表达见 Figure 2。VEGF 表达与年龄和性别无明显相关性(P>0.05),随着 BUC 分级和 T 分期的提高,VEGF 蛋白阳性表达水平亦增高,差异有统计学意义 (P<0.05),见 Table 2。

Table 2 Correlation of VEGF expression to clinicopathologic features of BUC

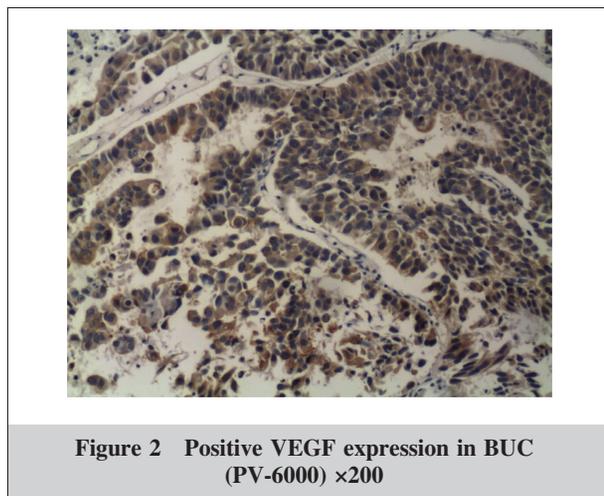
Variables	n	VEGF		Positive rate(%)	χ^2	P
		+	-			
Age(years)						
≤60	42	32	20	76.2	0.906	0.341
>60	44	33	21	75.0		
Gender						
Male	58	43	15	74.1	0.575	0.448
Female	28	22	6	78.6		
Grade						
Low	47	30	17	63.8	7.755	0.006
High	39	35	4	89.7		
T stage						
T ₀ ,T ₁	53	34	19	64.2	9.778	0.002
T ₂ ~T ₄	33	31	2	93.9		

2.3 Caveolin-1 和 VEGF 在膀胱上皮癌组织表达的相关性

Caveolin-1 和 VEGF 蛋白在 BUC 组织中的阳性表达呈正相关(P<0.05),详见 Table 3。

Table 3 Expressed correlation of caveolin-1 and VEGF

Caveolin-1	VEGF		Total	r ^s	P (Fisher's)
	+	-			
+	43	8	51	0.245	0.023
-	22	13	35		
Total	65	21	86		



3 讨论

Caveolin-1 是一种细胞膜内在蛋白质,又名窖蛋白,其相对分子质量为(2.1~2.4)×10⁴。Caveolin-1 具有调控细胞增殖、凋亡及血管生成的作用,与肿瘤的发生、发展、局部浸润和远处转移等多种生物学行为有关^[2]。作为最重要的血管生长因子之一,VEGF 与其受体 VEGFR-1、VEGFR-2 相结合后可调节肿瘤营养血管的增生,并增强血管壁通透性,提供肿瘤组织血运和细胞养分,进而促进癌肿的进展和转移过程^[5]。多项研究表明,caveolin-1 可通过多个信号传导通路机制来调节 VEGF 在血管内皮细胞的表达,促进新生血管形成,在器官组织生长代谢以及肿瘤的发展进程中发挥作用^[6-8]。

本研究应用免疫组化技术从分子蛋白水平检测了 caveolin-1 在膀胱上皮癌和正常黏膜组织中的表达状态,发现 caveolin-1 蛋白在大多数膀胱黏膜组织为阴性表达,而在 BUC 组织中的 caveolin-1 阳性表达率显著升高,组间差异有统计学意义(P<0.05),该结果提示 caveolin-1 与 BUC 的发生有关。进一步分析显示,caveolin-1 蛋白在不同组织学分级的 BUC 组织中的表达亦有差异,其中低级别尿路上皮癌的肿瘤细胞核分裂相比较少,恶性程度低,相应的 caveolin-1 阳性表达率亦较低;反之,高级别 BUC 的肿瘤细胞核分裂相多见,核仁粗大,其恶性程度较高,caveolin-1 阳性表达率亦较高,组间差异具有显著性(P<0.05);该结果说明通过 caveolin-1 蛋白的检测可以协助判断膀胱上皮癌的组织学恶性程度。同时,我们发现在

浅表性膀胱上皮癌(T_a,T₁期)中的 caveolin-1 蛋白阳性表达率低于其在肌层浸润性 BUC(T₂~T₄期)组织的表达,差异有统计学意义($P<0.05$);这一结果提示,caveolin-1 可能参与了膀胱上皮性肿瘤的侵袭性生长过程,caveolin-1 异常高表达的患者在治疗后容易局部复发和淋巴结、血行转移,在接受腔内手术后要加强监测和随访,或者需要接受根治性膀胱切除和/或尿流改道术。

本研究发现,VEGF 蛋白在 BUC 中的阳性表达率明显高于膀胱黏膜组织,并且与膀胱上皮癌的组织学分级和临床分期密切相关($P<0.05$),该结果提示 VEGF 在膀胱癌的发生和发展中发挥重要作用;这一结论和国内外类似的研究所见相一致^[9,10]。作为一种癌转移相关基因,VEGF 是血管生成的关键分子。以 VEGF-VEGFR 为靶向的几种药物已用于肾癌、肾上腺皮质癌和肺癌等多种晚期肿瘤的治疗并取得初步疗效^[11]。贝伐单抗、舒尼替尼、索拉非尼等药物在部分患者总生存期的延长方面值得肯定,靶向治疗在晚期膀胱癌综合治疗中的应用前景值得期待。

本组资料显示 86 例 BUC 组织中 caveolin-1 和 VEGF 蛋白二者联合阳性表达者多达 43 例 (50%, 43/86),Spearman 等级相关分析显示两种蛋白在膀胱上皮癌组织中表达呈正相关($r^2=0.245, P<0.05$);推测出现这一结果所存在的机制,可能系阳性表达的 caveolin-1 蛋白促进了 BUC 癌肿的发生,而在膀胱上皮癌的发展过程中,caveolin-1 或许激活了某种信号转导通路反应,促使 VEGF 异常活化;而 VEGF 的持续高表达又通过调控肿瘤血管生成效应等作用,和 caveolin-1 共同促进膀胱上皮癌细胞的侵袭性生长和转移进程,对于两者共阳性表达的患者,提示预后不良。当然,本研究仅仅从蛋白水平上揭示了这一现象,其具体作用机制尚需更深入的探讨。

综上所述,作为与膀胱上皮癌相关的生物学标记物,caveolin-1 和 VEGF 在 BUC 组织均呈高表达,两者的阳性表达提示癌肿恶性程度高,且易浸润性生长。同期进行 caveolin-1 和 VEGF 蛋白的免疫组化检测,对于膀胱上皮癌综合治疗方案的制定和预后判断具有一定的临床价值。

参考文献:

[1] Na YQ, Ye ZQ, Sun YH, et al. Urological disease diagnosis and treatment guidelines of China (2014)[M]. Beijing:

People's Medical Publishing House, 2014. 21-22. [那彦群,叶章群,孙颖浩,等.2014 版中国泌尿外科疾病诊断治疗指南(M).北京:人民卫生出版社,2014.21-22.]

- [2] Ren XY, Wei JX. The relations of caveolin-1 along with tumors and the role in the development of urological tumors[J]. Chin J Surg Oncol, 2011, 3(3):176-178. [任选义,魏金星. Caveolin-1 与肿瘤的关系及其在泌尿系肿瘤发展中的作用[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2011, 3(3):176-178.]
- [3] Ren WH, Tong JZ. Research advance on the correlation between VEGF-VEGFR system and tumor growth[J]. Journal of Chinese Oncology, 2015, 21(7):611-614. [任卫华,仝甲钊. 血管内皮生长因子及其受体系统与肿瘤生长相关性的研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2015, 21(7):611-614.]
- [4] Huang K, Chen G, Li Y, et al. Expression of PAK1 in bladder cancer and its influence on invasion of bladder cancer cells [J]. Nati Med J China, 2016, 96 (40):3227-3231. [黄凯,陈刚,李岩,等. PAK1 在膀胱癌中的表达及其对膀胱癌细胞侵袭能力的影响 [J]. 中华医学杂志, 2016, 96(40):3227-3231.]
- [5] Chen J, Hou EC. Progress of VEGF and its receptors in HCC angiogenesis and antiangiogenesis therapy[J]. Modern Urology, 2016, 24(3):498-502. [陈杰,候恩存. VEGF 及其受体与肝细胞癌血管生成和抗血管治疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(3):498-502.]
- [6] Andrews AM, Rizzo V. Microparticle-induced activation of the vascular endothelium requires caveolin-1/caveolae[J]. PLoS One, 2016, 11(2):e0149272.
- [7] Braet F. Rac1, caveolin-1 and vascular endothelial growth factor-mediated liver sinusoidal endothelial cell angiogenesis [J]. Liver Int, 2009, 29(2):143-144.
- [8] Podar K, Shrigarpure R, Tai YT, et al. Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib[J]. Cancer Res, 2004, 64(20):7500-7506.
- [9] Jiang YQ, Zhong TF, Dang YW, et al. Overexpression and clinicopathological contribution of DCR3 in bladder urothelial carcinoma tissues[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(21):9137-9142.
- [10] Zaravinos A, Volanis D, Lambrou GI, et al. Role of the angiogenic components, VEGFA, FGF2, OPN and RHOC, in urothelial cell carcinoma of the urinary bladder[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4):1159-1166.
- [11] Haas NB, Manola J, Uzzo RG, et al. Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial [J]. Lancet, 2016, 387 (10032):2008-2016.