

PTEN 和 P53 在非肌层浸润性膀胱肿瘤中的表达及临床意义

李永飞¹, 唐敏¹, 王尚乾¹, 宋国新², 张炜^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院泌尿外科, ²病理科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨非肌层浸润性膀胱尿路上皮肿瘤组织中 PTEN 和 P53 的表达及其临床意义。方法:采用免疫组化 SP 法,检测 121 例术前未经化疗患者膀胱癌组织中 PTEN 和 P53 的表达情况。进行临床资料随访,分析两者表达与肿瘤的分期、分级以及复发之间的关系。结果:121 例标本中 PTEN 阳性表达 89.2%, P53 阳性表达 39.6%。相关分析证明 P53 在 T1 期、高级别肿瘤中的表达明显,与肿瘤分期、分级呈正相关($P < 0.05$), PTEN 在 T1 期、高级别肿瘤中的表达较少,与肿瘤分期、分级呈负相关($P < 0.05$)。生存分析显示膀胱癌的复发时间间隔与 P53 的表达有明显相关性,而与 PTEN 的表达无明显相关性。结论:PTEN、P53 的阳性表达可能为明确膀胱肿瘤的生物行为以及判断肿瘤术后复发提供依据。

[关键词] 膀胱肿瘤; PTEN; P53; 免疫组化

[中图分类号] R737.14

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-636-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130514

Expressions and clinical significances of PTEN and P53 gene in non-muscle-invasive bladder cancer

Li Yongfei¹, Tang Min¹, Wang Shangqian¹, Song Guoxin², Zhang Wei^{1*}

(¹Department of Urology, ²Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and significance of PTEN and P53 in non-muscle-invasive bladder cancer. **Methods:** The expression of PTEN and P53 in 121 cases of non-muscle-invasive bladder cancer tissues were determined by the immunochemical SP methods. We combined the clinical follow-up data to analyze the relationship between these two markers with tumor stage, grade and recurrence. **Results:** The expressions of PTEN and P53 protein were detected in 89.2% and 39.6% of bladder cancer specimens, respectively. The positive expression rate of PTEN was negatively correlated with the pathological grades and clinical stages of bladder cancer. However, P53 was positively correlated with the pathological grades and clinical stages of bladder cancer. P53 was significantly correlation with the postoperative recurrence. No significant correlation between PTEN in non-muscle-invasive bladder cancer. **Conclusion:** The detection of the expression of PTEN and P53 in non-muscle-invasive bladder cancer is helpful to estimate the biological behavior and postoperative recurrence.

[Key words] bladder carcinoma; PTEN; P53; immunochemistry

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 636-640]

膀胱肿瘤的发病率在所有肿瘤中排第 7 位,在首次诊断为膀胱肿瘤的患者中约 75% 为非肌层浸润型膀胱肿瘤 (Ta~T1 期), 25% 为肌层浸润型膀胱肿瘤 (T2~T4 期), 然而, 约 80% 的非肌层浸润型膀胱肿瘤患者在行经尿道膀胱肿瘤电切术后复发, 其中

约 25% 的患者会进展为肌层浸润型膀胱肿瘤^[1], 所以迫切需要寻找方便且能有效判断膀胱肿瘤预后的肿瘤标志物。传统的一些指标如肿瘤的数目、大小、分期和分级等对膀胱肿瘤复发和进展的预后有一定的价值, 但其效果有一定的局限性^[2]。肿瘤的发生、发展与许多生物分子有密切关系, 与 PTEN 和 P53 存在着一定联系^[3-4]。目前对 PTEN、P53 与膀胱肿瘤的相关性研究主要针对其在肌层浸润性膀胱肿瘤组织中的表达, 以及他们与肿瘤病理级别之间的关系。

[基金项目] 国家自然科学基金(81170612)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangwei@medmail.com.cn

而 PTEN、P53 在非肌层浸润性膀胱肿瘤中的表达以及与肿瘤复发之间关系的研究较少,本研究对此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

收集 2004 年 1 月~2012 年 1 月在南京医科大学第一附属医院泌尿外科行经尿道膀胱肿瘤电切术患者的肿瘤组织标本 121 例,其中男 98 例,女 23 例,术后组织标本均经病理检查明确诊断为非肌层浸润性膀胱移行细胞癌,以下简称为膀胱癌。患者年龄 37~90 岁,中位年龄 66 岁。患者术前均未接受放疗、化疗,均常规行 B 超、膀胱镜等检查,术后随访 4~96 个月,平均随访 40 个月。肿瘤分期、分级参照 TMN (Ta、T1) 系统及世界卫生组织 (WHO) 2004 年泌尿系统肿瘤分级标准[分为低度恶性潜能的乳头状尿路上皮肿瘤 (papillary urothelial neoplasms of low malignant potential, PUNLMP)、低级别乳头状癌 (low-grade papillary carcinomas, LG)、高级别乳头状癌 (low-grade papillary carcinomas, HG)]。

1.2 方法

鼠抗人 PTEN (MAB-0369)、鼠抗人 P53 (MAB-0239) 和 SP 试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。染色步骤按试剂盒说明书进行, DAB 显色。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

结果判断:阳性结果呈棕黄色或棕褐色颗粒,不同生物学指标在细胞中的着色部位不同。每张切片随机取 3 个高倍视野,以阳性细胞比例的平均值定义为该肿瘤的阳性细胞百分比。PTEN、P53 阳性细胞为核或胞浆着色,呈棕黄色;根据切片所选的视野中阳性细胞占全部细胞的比例将其分为:阳性细胞数 < 10% 为阴性 (-); 阳性细胞数 10%~25% 为弱阳性 (+); 阳性细胞数 26%~50% 为阳性 (++) ; 阳性细胞数 > 50% 为强阳性 (+++) [5]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 进行统计分析,数据组间比较采用 χ^2 检验。相关分析采用 Spearman 等级相关分析。生存分析采用 Kaplan-Meier 法,生存率比较采用 Log-rank 检验,水准 $\alpha=0.05$, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN、P53 在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达及与肿瘤分期、分级的相关性

应用免疫组织化学方法检测 121 例非肌层浸润性膀胱癌患者肿瘤组织标本中 PTEN 和 P53 的表达 (图 1)。PTEN 阳性表达率为 89.2%, Ta 期膀胱癌组织 PTEN 阳性表达率为 94.8%, T1 期 PTEN 阳性表达率为 79.0%。PUNLMP、LG、HG 膀胱癌组织中 PTEN 阳性表达率分别为 100%、97.1%、60.7%,结果显示 PTEN 的表达在 T1 期、高级别肿瘤组织中表达减少, Spearman 等级相关分析显示 PTEN 阳性表达与肿瘤分期 ($P = 0.008$)、分级 ($P < 0.01$) 呈负相关 (表 1)。

P53 在浅表性膀胱癌组织中阳性表达率为 39.6% (表 2), 其中 Ta 期膀胱癌组织中 P53 阳性表达率为 33.3%, T1 期膀胱癌组织中 P53 阳性表达率为 51.1%。PUNLMP、LG、HG 膀胱癌组织中 P53 阳性表达率分别为 4.5%、39.4%、67.8%, 结果显示 P53 的表达在 T1 期、高级别膀胱癌中表达明显, Spearman 等级相关分析显示 P53 阳性表达与肿瘤分期 ($P = 0.012$)、分级 ($P < 0.01$) 呈正相关。

2.2 PTEN、P53 与肿瘤复发之间的关系

术后患者行门诊和电话随访,手术日至第 1 次复发 (为截止时间) 之间的时间间隔即复发时间,无复发患者以打电话时间为截止时间,死亡患者以死亡时间为截止时间。121 例随访资料完全,随访时间为 4~96 个月,平均随访 40 个月,有 51 例术后肿瘤复发。Kaplan-Meier 生存函数曲线显示,PTEN 低表达患者的肿瘤复发时间与 PTEN 高表达患者的肿瘤复发时间无明显差异 ($P > 0.05$, 图 2A); P53 低表达患者的肿瘤复发时间长于 P53 高表达的患者 (图 2B), 两组复发时间比较差异有统计学意义 ($P = 0.02$)。

3 讨论

目前关于应用免疫组织化学方法检测膀胱癌生物标志物,如一些细胞周期调节因子 PTEN、P53、P21、Ki67 等,预测肿瘤预后的研究较多,而迄今对于这些因子如何应用到临床还没有统一认识 [3-6], 而研究细胞周期调节因子在膀胱癌中的改变对膀胱癌预后有潜在价值。随着细胞调节因子在膀胱癌中相关机制研究的深入,认为这些细胞周期调节因子可能成为膀胱癌治疗的靶位 [2-3]。目前关于 PTEN、P53 的研究较为集中在肌层浸润性膀胱癌中,而 Tsuruta 等 [6] 在动物模型研究中证实,在非肌层浸润性膀胱癌中 PTEN 的下调通过激活 AKT 及 Ras/ERK 信号通路对非肌层浸润性膀胱癌的发生发展存在一定作

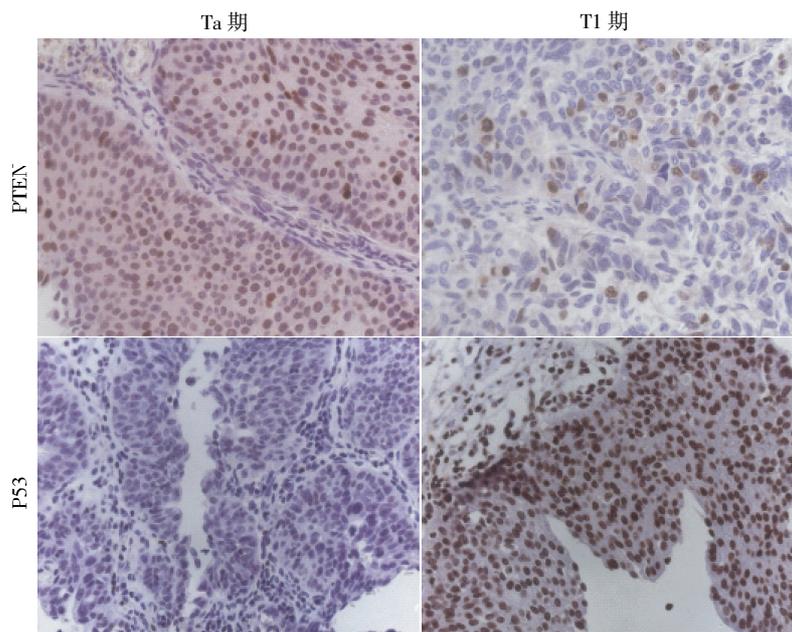


图1 PTEN和P53在非肌层浸润性膀胱癌不同分期组织中的免疫组化染色(SP法,×400)

Figure 1 Immunohistochemical staining of PTEN and P53 protein in non-muscle-invasive bladder carcinoma tissue at different stages (SP method,×400)

表1 PTEN在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达

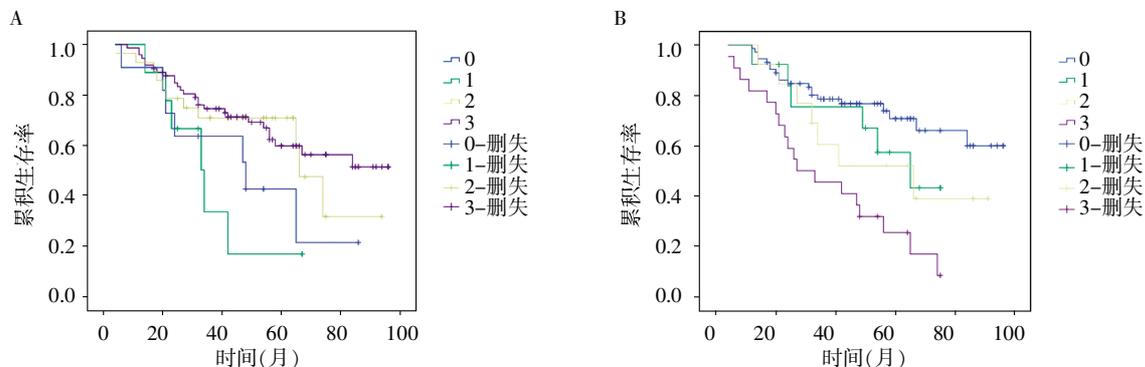
Table1 The expression of PTEN in non-muscle-invasive bladder cancer

| 指标 | 例数 | PTEN 蛋白表达水平 | | | | P 值 |
|--------|----|-------------|---|----|-----|--------|
| | | - | + | ++ | +++ | |
| 分期 | | | | | | 0.008 |
| Ta | 78 | 4 | 5 | 16 | 53 | |
| T1 | 43 | 9 | 3 | 11 | 20 | |
| 分级 | | | | | | <0.010 |
| PUNLMP | 22 | 0 | 0 | 0 | 22 | |
| LG | 71 | 2 | 5 | 21 | 43 | |
| HG | 28 | 11 | 3 | 6 | 8 | |

表2 P53在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达

Table2 The expression of P53 in non-muscle-invasive bladder cancer

| 指标 | 例数 | P53 蛋白表达水平 | | | | P 值 |
|--------|----|------------|----|----|-----|--------|
| | | - | + | ++ | +++ | |
| 分期 | | | | | | 0.012 |
| Ta | 78 | 52 | 10 | 8 | 8 | |
| T1 | 43 | 21 | 3 | 5 | 14 | |
| 分级 | | | | | | <0.010 |
| PUNLMP | 22 | 21 | 0 | 0 | 1 | |
| LG | 71 | 43 | 12 | 11 | 5 | |
| HG | 28 | 9 | 1 | 2 | 16 | |



A: 生存分析显示 PTEN 在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达对肿瘤复发时间的估计,0、1、2、3分别代表 PTEN 染色强度-、+、++、+++，复发时间与 PTEN 表达之间无明显相关性(log-rank 检验, $P > 0.05$); B: 生存分析显示 P53 在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达对肿瘤复发时间的估计,0、1、2、3分别代表 P53 染色强度-、+、++、+++，复发时间间隔与 P53 表达之间有明显相关性(log-rank 检验, $P < 0.05$)。

图2 PTEN和P53表达的非肌层浸润性膀胱癌患者的生存分析

Figure 2 Kaplan-Meier cumulative survival analyses of the non-muscle-invasive bladder carcinoma with PTEN and P53 expression

用。而 PTEN 通过直接或间接调节 P53 共同参与膀胱癌的发生以及发展^[7]。因而,本研究结合临床资料着重研究 PTEN 和 P53 在非肌层浸润性膀胱癌中的表达以及其生物学特性。

PTEN 基因是一种抑癌基因,位于人类染色体 10q23 中,大量研究证实该区域染色体的丢失与乳腺、肺以及肾等器官肿瘤的发生、发展有密切的关系^[8]。其编码的蛋白能将磷酸根从酪氨酸中去除,抑制酪氨酸的磷酸化,对细胞增殖起负调控作用,对肿瘤细胞起抑制作用。目前研究认为 PTEN 基因抑癌机制有:通过对局部黏着斑激酶的去磷酸化抑制细胞的转移及浸润;通过使 PIP3 去磷酸化抑制细胞周期、促进细胞凋亡,通过抑制促细胞分裂素激活的蛋白激酶细胞信号转导途径而抑制细胞分化。在膀胱肿瘤中有实验证实 PTEN 基因有突变或丢失现象,并随着肿瘤病理级别的升高其蛋白表达量降低^[9-10]。本研究免疫组织化学方法检测结果显示 PTEN 的表达随着肿瘤分期、分级的升高而表达减少,与肿瘤分期、分级呈负相关($P < 0.05$),这与前期 Sun 等^[11]研究结果一致,证明膀胱癌分期、分级的增高与 PTEN 的丢失存在一定的相关性。生存分析显示非肌层浸润性膀胱癌患者的复发时间与其肿瘤组织中 PTEN 的表达强度没有明显相关性。与 Schultz^[12]、Han 等^[13]的研究结果一致,证明 PTEN 作为非肌层浸润性膀胱癌复发标志物的价值有限。

P53 基因是目前发现与人类肿瘤发生、发展相关性最高的基因,正常细胞中野生型 P53 基因是一种抑癌基因,能抑制细胞周期、诱导凋亡、促进分化、降低细胞突变的发生机率,在维持基因组稳定性中发挥重要作用。研究证实 P53 基因是人类肿瘤中最常发生突变的基因,P53 基因突变后丧失肿瘤抑制功能,获得致癌功能。正常 P53 基因编码的蛋白不易被免疫组织化学方法检测,其检测到的 P53 蛋白为突变型 P53 蛋白^[14]。本研究采用免疫组化检测结果显示 P53 的表达随着肿瘤分期、分级的增高而表达增高,与肿瘤分期、分级呈正相关($P < 0.05$)。生存分析显示非肌层浸润性膀胱癌患者术后的复发时间与其肿瘤组织中 P53 的表达强度有明显相关性,随着 P53 表达强度的增高,肿瘤复发的时间缩短,表明 P53 在非肌层浸润性膀胱癌中的生物学行为与其在肌层浸润性膀胱癌中有类似性^[15-16],说明膀胱癌组织中 P53 可作为非肌层浸润性膀胱癌预后的肿瘤标志物。这对今后研究 P53 在非肌层浸润性膀胱癌中的作用机制提供了参考。

PTEN、P53 的表达可能在非肌层浸润性膀胱癌的发生和发展中起重要作用,为膀胱癌的病因、发病学研究提供了有用的分子生物学检测指标,同时可为临床诊断、治疗提供参考依据,有望成为膀胱癌的标记物和预后评价的指标。

[参考文献]

- [1] Eltze E, Wild PJ, Wülfing C, et al. Expression of the endothelin axis in noninvasive and superficially invasive bladder cancer: Relation to clinicopathologic and molecular prognostic parameters [J]. *Eur Urol*, 2009, 56 (5): 837-847
- [2] Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials [J]. *Eur Urol*, 2006, 49(3): 466-477
- [3] Neto JC, Ikoma MM, Carvalho KC, et al. MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 92(1): 20-26
- [4] Lopez-Beltran A, Luque RJ, Alvarez-Kindelan J, et al. Prognostic factors in survival of patients with stage Ta and T1 bladder urothelial tumors: the role of G1-S modulators (p53, p21Waf1, p27Kip1, cyclin D1, and cyclin D3), proliferation index, and clinicopathologic parameters [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, 122(3): 444-452
- [5] Visapää H, Seligson D, Huang Y, et al. Ki67, gelsolin and PTEN expression in sarcomatoid renal tumors [J]. *Urol Res*, 2003, 30(6): 387-389
- [6] Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, et al. Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8389-8396
- [7] Freeman JD, Li AG, Wei G, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and-independent mechanisms [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(2): 117-130
- [8] Zhang P, Chen JH, Guo XL. New insights into PTEN regulation mechanisms and its potential function in targeted therapies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 66(7): 485-490
- [9] Qian CN, Furge KA, Knol J, et al. Activation of the PI3K/AKT pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(21): 8256-8264
- [10] Saal LH, Johansson P, Holm K, et al. Poor prognosis in carcinoma associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(18): 7564-7569

[11] Sun CH, Chang YH, Pan CC. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder[J]. *Histopathology* 2011, 58(7):1054-1063

[12] Schultz L, Albadine R, Hicks J, et al. Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy [J]. *Cancer*, 2010, 116(23):5517-5526

[13] Han KS, Jeong IG, Joung J Y, et al. Clinical value of PTEN in patients with superficial bladder cancer[J]. *Urol Int*, 2008, 80(3):264-269

[14] Rodríguez-Alonso A, Pita-Fernández S, González-Carrero J, et al. P53 and Ki67 expression as prognostic factors for cancer-related survival in stage T1 transitional cell bladder carcinoma[J]. *Eur Urol*, 2002, 41(2):182-189

[15] Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(19):1259-1264

[16] Mitra AP, Lin H, Datar RH, et al. Molecular biology of bladder cancer: prognostic and clinical implications [J]. *clin genitourin cancer*, 2006, 5(1):167-177

[收稿日期] 2012-12-07

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字,必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号,尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名,这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序,写法为:姓前名后,姓全部大写,名的首字母大写,其余字母小写,名间加连字符,如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位,如“南京医科大学第一附属医院心内科”,“南京医科大学公共卫生学院流行病学与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”,并在论文首页下补充基金的名称、编号,以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑:接雅俐)