

FGFR1、FGFR3 和 Pokemon 在膀胱癌中的表达及相关性研究*

张正潮¹ 段建敏^{*,1} 卢建中^{2,3} 张效通¹ 范康武¹

(1. 兰州大学第二医院泌尿外科, 兰州 730000; 2. 甘肃省泌尿系统疾病临床医学中心, 兰州 730000; 3. 甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室, 兰州 730000)

摘要:目的 通过观察 FGFR1、FGFR3 和 Pokemon 在膀胱癌组织的表达情况,探讨它们在膀胱癌发生、发展中的作用。方法 采用免疫组化检测 296 例膀胱癌和 48 例正常膀胱组织中 FGFR1、FGFR3 和 Pokemon 蛋白的表达情况。结果 1)FGFR1 在膀胱癌不同病理分期、分级及初发复发的表达率为:Ta-T1 期 7.5%, T2-T4 期 18.1% ($p < 0.01$); 低级别 2.8%, 低-高级别 11.9% ($p < 0.05$), 高级别 14.3% ($p < 0.01$); 初发表达 6.8%, 复发表达率 17.1% ($p < 0.01$)。2)FGFR3 在膀胱癌不同病理分期、分级的表达率为:Ta-T1 期 68.1%, T2-T4 期 35.0% ($p < 0.01$); 低级别 75.0%, 低-高级别 60.3% ($p < 0.05$), 高级别 44.9% ($p < 0.01$)。3)Pokemon 在膀胱癌不同病理分级及初发复发的表达率为:低级别 47.2%, 低-高级别 66.7% ($p < 0.01$), 高级别 80.6% ($p < 0.01$); 初发 59.2%, 复发 80.0% ($p < 0.01$)。结论 FGFR1 在膀胱癌中的表达与病理分级、分期成正相关,复发表达明显高于初发;Pokemon 在膀胱尿路上皮癌中的表达与病理分级成正相关,复发表达也明显高于初发,表明它们可能主要参与膀胱癌发展及转移等过程。FGFR3 在膀胱癌中的表达与病理分级、分期成负相关,表明它可能在膀胱癌发展早期及低级别肿瘤发展中发挥着重要作用。

关键词:膀胱癌;成纤维细胞生长因子受体 1;成纤维细胞生长因子受体 3;Pokemon 蛋白;免疫组织化学
中图分类号:R73 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1006-6055.2014.06.012

Study on Protein Expression and Clinical Correlations of FGFR1, FGFR3 and Pokemon in Bladder Cancer*

ZHANG Zhengchao¹ DUAN Jianmin^{*,1} LU Jianzhong^{2,3} ZHANG Xiaotong¹ FAN Kangwu¹

(1. Department of Urology, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000;
2. Gansu Nephro - Urological Clinical Center, Lanzhou 730000;
3. Key Laboratory of Urological Diseases in Gansu Province, Lanzhou 730000)

Abstract: Objective By the study on protein expression of FGFR1, FGFR3 and Pokemon in bladder cancer, to identify their function in the development role of bladder cancer. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect FGFR1, FGFR3 and Pokemon protein in 296 cases of bladder cancer and 48 cases of normal bladder tissue. **Results** 1) FGFR1 bladder cancer in different pathological stage, grade and onset recurrent expression was: Ta-T1 7.5%, T2-T4 18.1% ($p < 0.01$); low level 2.8%, low-high level 11.9% ($p < 0.05$), high-level 14.3% ($p < 0.01$); early publication 6.8%, the recurrence expression 17.1% ($p < 0.01$). 2) FGFR3 in various pathological staging of bladder cancer, grading expression was: Ta-T1 68.1%, T2-T4 35.0% ($p < 0.01$); low-level 75.0%, low-High level 60.3% ($p < 0.05$), high level 44.9% ($p < 0.01$). 3. Pokemon in different pathological grading of bladder cancer recurrence and the onset of expression was: 47.2% low-level, low-High level 66.7% ($p < 0.01$), high-level 80.6% ($p < 0.01$); initial issuance 59.2%, relapse 80.0% ($p < 0.01$). **Conclusion** FGFR1 expression and tumor grade in bladder cancer, staging a positive correlation, relapse was significantly higher than the initial issuance; Pokemon expression was positively correlated with tumor grade, recurrence expression was also significantly higher than the onset of bladder urothelial carcinoma, suggesting that they may be mainly involved in the process of developing bladder cancer and metastasis. FGFR3 expression and tumor grade, stage a negative correlation in bladder cancer, suggesting that it may develop in the early stage of bladder cancer and low-grade tumor development plays an important role.

Key words: bladder cancer; FGFR1; FGFR3; pokemon protein; immunohistochemistry

2014-07-02 收稿, 2014-08-05 接受

* 甘肃省卫生行业科研计划(GWGL2013-35), 甘肃省泌尿系疾病临床医学中心开放课题基金(MNLCZXKF-07)资助

** 通讯作者, E-mail: djmurol@163.com

1 引言

膀胱癌(Bladder Carcinoma, BC)是最常见的泌尿系统恶性肿瘤。我国男性膀胱癌发病率为3.6/10万,女性为3.6/10万,近年来有增高趋势^[1]。尿路上皮癌(Urothelial Carcinoma, UC)是膀胱癌最常见的组织亚型,占膀胱癌90%以上^[2]。膀胱癌根据临床和病理主要分两类:表浅型非肌肉浸润性膀胱癌和进展型肌肉浸润性膀胱癌^[3]。一般而言,表浅型的治疗主要是经尿道切除,特点是有一个好的愈后,但是有一部分会复发进展为高级别^[4]。高级别的膀胱癌对于临床治疗是一个很大的挑战,这些患者愈后状况差,5年生存率很低,治疗上只能采取具有严重创伤性的治疗技术比如根治性膀胱切除术和尿流改道术^[5]。从长远来看,高级别的膀胱癌患者即使手术治疗,一大部分患者复发后结局还是死亡,因此针对膀胱癌创伤小、效果好的治疗方法研发对于目前来说很重要。本文采用免疫组织化学法对人类膀胱癌中FGFR1、FGFR3、Pokemon基因表达产物进行检测,探讨其表达与膀胱癌发生发展及愈后的关系,从而为膀胱癌的分子治疗技术提供理论基础。

2 材料和方法

1)一般资料:收集膀胱癌组织标本共296例,男207例,女89例。以上均取自兰州大学第二附属医院泌尿外科2003年至2013年病理科存档的石蜡标本。诊断结果均经常规病理切片证实为膀胱癌。膀胱癌病理按照2002TNM分期:Ta-T1期213例,T2-T4期83例;按照WHO2004分级:低级别72例,低-高级别126例,高级别98例。正常膀胱组织标本48例作为正常对照。

2)实验试剂:FGFR1、FGFR3兔抗人单克隆抗体购于美国Bioworld Technology, Inc.公司,Pokemon兔抗人多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司。兔超敏二步法免疫组织化学检测试剂盒及浓缩型DAB试剂盒购于北京中杉金桥公司。

3)实验方法:将石蜡块标本切成3 μm厚的切片,采用PV9000二步法:将膀胱癌组织和膀胱正常组织的石蜡切片脱蜡、水化组织切片,高压抗原修复。3% H₂O₂去离子水孵育以阻断内源性的过氧化物酶。滴加一抗(分别为FGFR1 1:100、FGFR3 1:100、Pokemon 1:200稀释浓度工作液),37℃孵育2小时,滴加二抗工作液,37℃孵育半小时,应用DAB

溶液显色,自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片。光镜下观察结果,PBS代替一抗做阴性对照。

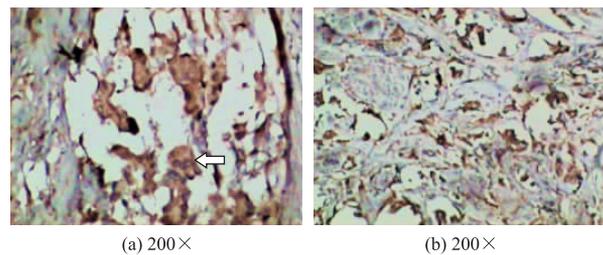
4)结果判断:免疫组化结果由病理科专科医生独立阅片,细胞质或细胞膜中呈现棕黄色染色颗粒为阳性细胞。光显色程度的判断方法,显色程度计分:无显色定为(-);浅黄色定为+;棕黄色定为++;棕褐色定为+++。

5)统计学处理:采用SPSS 21.0软件,计算数据采用X²检验,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FGFR1 在膀胱癌和正常膀胱组织中的表达

FGFR1蛋白主要表达于细胞膜,当细胞阳性表达时,阳性细胞染色成棕黄色的颗粒状,见图1(a)、图1(b)。FGFR1在正常膀胱组织阴性表达,在膀胱癌的表达与肿瘤的病理分期、分级及复发性表达有明显相关性,具有统计学意义(P<0.05),见表1。



注:箭头所指为FGFR1蛋白在膀胱癌细胞膜上免疫组化阳性表达

图1 FGFR1免疫组化染色

Figure 1 The immunohistochemical staining of FGFR1

表1 FGFR1基因表达与病理因素的关系

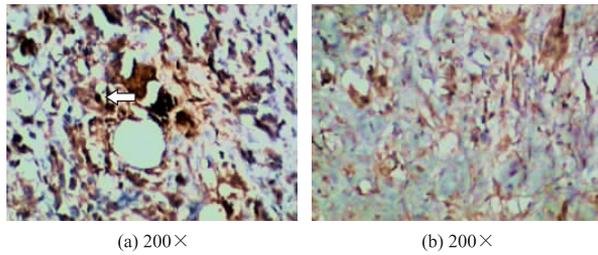
Table 1 The relationship between the expression of FGFR1 and clinical pathological factors

临床病理因素	例数(n)	FGFR1蛋白的表达		χ ²	P
		阴性	阳性(%)		
正常组织	48	48			
膀胱癌组织	296	265	31(10.5%)	5.525	<0.01
病理分期	Ta-T1	197	16(7.5%)		
	T2-T4	83	68(18.1%)	7.104	<0.01
病理分级	低级别	72	2(2.8%)		
	低-高级别	126	111(11.9%)	4.863	<0.05
初发与复发	高级别	98	84(14.3%)	6.447	<0.01
	初发	191	178(6.8%)		
	复发	105	87(17.1%)	7.721	<0.01

3.2 FGFR3 在膀胱癌和正常膀胱组织中的表达

FGFR3蛋白主要表达于细胞质和细胞核,当细胞阳性表达时,阳性细胞染色成棕黄色的颗粒状,见图2(a)、图2(b)。FGFR3在正常膀胱组织阴性表达,在膀胱癌的表达与肿瘤的病理分期、分级有明显相关性,具有统计学意义(P<0.05),与临床复发性

表达无相关性,无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。



注: 箭头所指为 FGFR3 蛋白在膀胱癌细胞胞质和胞核上免疫组化阳性表达

图 2 FGFR3 免疫组化染色

Figure 2 The immunohistochemical staining of FGFR3

表 2 FGFR3 表达与病理因素的关系

Table 2 The relationship between the expression of FGFR3 and clinical pathological factors

临床病理因素	例数 (n)	FGFR3 蛋白的表达		χ^2	P
		阴性	阳性 (%)		
正常组织	48	48			
膀胱癌组织	296	122	174 (58.8%)	57.096	<0.01
病理分期					
Ta-T1	213	68	145 (68.1%)		
T2-T4	83	54	29 (35.0%)	27.066	<0.01
病理分级					
低-高级别	126	50	76 (60.3%)	4.380	<0.05
高级别	98	54	44 (44.9%)	15.404	<0.01
初发与复发					
初发	191	77	114 (60.0%)		
复发	105	45	60 (57.1%)	0.181	>0.05

3.3 Pokemon 在膀胱癌和正常膀胱组织中的表达

Pokemon 主要表达于细胞质,当细胞阳性表达时,阳性细胞染色成棕黄色的颗粒状,见图 3(a)、图 3(b)。Pokemon 在正常膀胱组织阴性表达,在膀胱癌的表达与肿瘤的病理分级及复发性表达有明显相关性,具有统计学意义($P < 0.05$),但与病理分期无相关性,无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

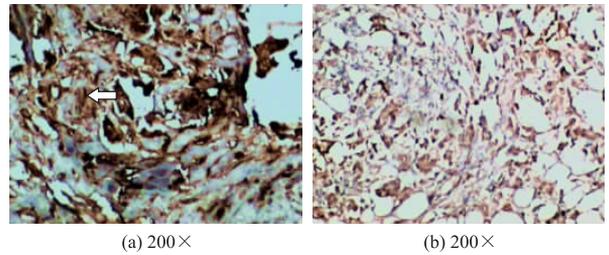
表 3 Pokemon 表达与临床病理因素的关系

Table 3 The relationship between the expression of Pokemon and clinical pathological factors

临床病理因素	例数 (n)	Pokemon 蛋白的表达		χ^2	P
		阴性	阳性 (%)		
正常组织	48	48			
膀胱癌组织	296	99	197 (66.6%)	74.758	<0.01
病理分期					
Ta-T1	213	69	144 (67.6%)		
T2-T4	83	30	53 (63.9%)	0.377	>0.05
病理分级					
低-高级别	126	42	84 (66.7%)	7.194	<0.01
高级别	98	19	79 (80.6%)	20.763	<0.01
初发与复发					
初发	191	78	113 (59.2%)		
复发	105	21	84 (80.0%)	13.216	<0.01

4 结束语

成纤维细胞生长因子受体 (Fibroblast Growth Factor receptors, FGFRs) 属于酪氨酸激酶类受体,它们通过与其相应的配体成纤维细胞生长因子 (Fi-



注: 箭头所指为 Pokemon 蛋白在膀胱癌细胞胞质上免疫组化阳性表达

图 3 Pokemon 免疫组化染色

Figure 3 The immunohistochemical staining of Pokemon

broblast Growth factor, FGF) 结合后介导细胞信号传递。FGFRs 在肿瘤发展中起着至关重要的作用,研究证实通过点突变、扩增及染色体易位导致目的基因异常^[6]。其中,FGFR1 是人类癌症中最常见的扩增基因^[7]。自 1993 首次证实 FGFR1 在乳腺癌中超表达到现在,体内及体外实验已经证实 FGFR1 过度表达具有致癌性^[8]。FGFR1 超表达在食管鳞状细胞癌、口腔鳞状细胞癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、横纹肌肉瘤和肺癌中报道^[9]。FGFR3 是通过易位和在体细胞突变被激活的,FGFR3 突变已在多发性骨髓瘤、膀胱癌中被证实^[9]。FGFR1 在膀胱尿路上皮癌中是通过激活 MAPK 通路 (the mitogen-activated protein kinase, 有丝分裂原激酶蛋白激酶通路) 完成信号传导的^[10]。FGFR3 在膀胱尿路上皮癌中是通过激活 PI3-K/ AKT 通路 (PI3-K: 磷脂酰肌醇 3-激酶; AKT: 亦称 PKB, 蛋白磷酸激酶 B, 丝氨酸/苏氨酸磷酸激酶) 进行信号传导的。MAPK 通路在调控细胞增殖分化中起重要作用,PI3-K/ AKT 通路在细胞存活中起主要作用^[11]。Beat Roth 等通过免疫组化、PCR 等方法研究发现 FGFR1 和 FGFR3 在调节膀胱癌增殖与分化方面所起到的作用机制是完全不同的^[12]。谢庆祥等通过免疫组化研究表明 FGFR1 在膀胱癌中呈高表达,与肿瘤分期、分级密切正相关,提示 FGFR1 参与膀胱癌的发病过程^[13]。Liu X 等通过研究 FGFR3 在膀胱癌的表达,发现 FGFR3 在膀胱癌低级别、早期出现高表达,在高级别、晚期出现低表达^[14]。

Pokemon (POK Erythroid Ontogenic Factor), 即 POK 红系髓性致癌因子基因,已被确认为原癌基因。Pokemon 蛋白是转录抑制因子 POK 家族的一员。Pokemon 位于人类染色体 19P13.3,是转录抑制因子 POK 家族成员之一,含 2 个外显子和 2 个内含子,其编码的产物具有 BTB 域和锌指结构^[15]。Meada^[16]等利用 Pokemon 单克隆抗体芯片技术检测 Pokemon 在人类肿瘤中的表达,发现 Pokemon 在人

类肺癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌和膀胱癌中过表达。其中 Pokemon 的致癌机理是通过特异地抑制肿瘤抑制基因 ARF 的转录实现的。彭波等应用 PCR、免疫组化技术研究发现 Pokemon 蛋白和 mRNA 在膀胱癌的表达与复发、TNM 分期无关; Pokemon 蛋白和 mRNA 表达与分级有关, Pokemon 可能在膀胱癌发生发展中起重要作用, 且与肿瘤恶化进展相关^[17]。

本研究结果显示, FGFR1 在正常膀胱组织阴性表达, 有显著统计学差异 ($P < 0.01$), 说明 FGFR1 蛋白只有在部分膀胱癌组织超表达, 它可能参与了膀胱癌的发病过程。FGFR1 基因表达率与膀胱尿路上皮癌分期与分级成正相关, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$), 提示 FGFR1 基因可能参与膀胱癌晚期的发生、发展及转移等过程, 这与国外报道的 FGFR1 基因在调控膀胱癌增殖作用低于 FGFR3 一致, 它的作用主要表现在促进膀胱癌浸润周围组织和转移^[12]。FGFR3 在正常膀胱组织阴性表达, 有显著统计学差异 ($P < 0.01$), 说明 FGFR3 蛋白只有在部分膀胱癌组织超表达, 它可能参与了膀胱癌的发病过程。FGFR3 基因表达率与膀胱尿路上皮癌分期与分级成负相关, 膀胱癌低级别、低分期表达率明显高于高级别、高分期, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$), 表明它可能在膀胱癌发展早期及低级别肿瘤发展中发挥着重要作用。国外研究已经证实, FGFR3 表达阳性的大部分膀胱癌提示临床上会有更好的愈后, 同时还可以更好地指导临床治疗^[14]。Pokemon 在正常膀胱组织阴性表达, 有显著统计学差异 ($P < 0.01$), 说明 Pokemon 蛋白只有在部分膀胱癌组织超表达, 它可能参与了膀胱癌的发病过程。Pokemon 表达率与膀胱尿路上皮癌分级成正相关, 复发表达率明显高于初发, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$), 提示 Pokemon 基因可能参与膀胱癌的发展及转移等过程, 这与国外报道的 Pokemon 基因主要在膀胱癌复发与进展中发挥很重要的作用相一致^[18]。

研究表明, FGFR1、Pokemon 可能与膀胱癌的发生、发展及转移有重要关系。因此, FGFR1、Pokemon 有望作为靶向治疗为中晚期膀胱癌患者的治疗带来希望, 提高患者的愈后。FGFR3 可能与膀胱癌发展过程的初始阶段的发生有重要关系, 一方面可以作为判断膀胱癌愈后的一个标准, 另一方面以 FGFR3 为靶点进行靶向治疗延迟膀胱癌的进展。随着对膀胱癌基因研究的深入, 会推动膀胱癌的基因治疗, 对膀胱癌的治疗带来新的方向和更加广阔的前景。

参考文献

- [1] ISA F, XIE L P, HU Z, et al. Dietary consumption and diet diversity and risk of developing bladder cancer: results from the South and East China case-control study[J]. *Cancer Causes Control*, 2013, 24(5): 885-895.
- [2] JACOBS B L, LEE C T, MONTIE J E. Bladder cancer in 2010: how far have we come? [J]. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2010, 60(4): 244-272.
- [3] GOEBELL P J, KNOWLES M A. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium[J]. *Urologic Oncologic*, 2010, 28(4): 409-428.
- [4] PASIN E, JOSEPHSON D Y, MITRA A P, et al. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history[J]. *Reviews in Urology*, 2008, 10(1): 31-43.
- [5] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. *A Cancer Journal for Clinicians* 2010, 60(5): 277-300.
- [6] TUMER N, GROSE R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2010, 10(2): 116-129.
- [7] BASS A J, WATANABE H, MEMEL C H, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(11): 1 238-1 242.
- [8] 张炎, 李庆霞. FGFR1 在乳腺癌内分泌治疗中的研究进展 [J]. *实用肿瘤杂志*, 2012. 2012(05): 554-557.
- [9] DUTT A, RAMOS A H, HAMMEMAN P S, et al. Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20351.
- [10] TOMLINSON D C, LAMONT F R, SHNYDER S D, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 promotes proliferation and survival via activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in bladder cancer [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(11): 4 613-4 620.
- [11] JUANPERE N, AGELL L, LORENZO M, et al. Mutations in FGFR3 and PIK3CA, singly or combined with RAS and AKT1, are associated with AKT but not with MAPK pathway activation in urothelial bladder cancer [J]. *Human Pathology*, 2012, 43(10): 1 573-1 582.
- [12] CHENG T, ROTH B, CHOI W, et al. Fibroblast growth factor receptors-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis; implications for therapeutic targeting [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57284.
- [13] 谢庆祥, 林福地, 汪鸿, 等. 膀胱癌中 bFGF 及其受体和受体后活化水平的研究 [J]. *临床军医杂志*, 2002, 30(1): 38-39.
- [14] LIU X, ZHANG W, GENG D, et al. Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(1): 1 109-1 120.
- [15] ZHAO X, NING Q, SUN X, et al. Pokemon reduces Bcl-2 expression through NF-kappa Bp65: A possible mechanism of hepatocellular carcinoma [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011, 4(6): 492-497.
- [16] MAEDA T, HOBBS R M, MERGHOUB T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression [J]. *Nature*, 2005, 433(7023): 278-285.
- [17] 彭波, 李虹, 郑军华. Pokemon 在膀胱癌中的表达 [J]. *中华实验外科杂志*, 2010, (10): 1 544-1 544.
- [18] GUO C, ZHU K, SUN W, et al. The effect of Pokemon on bladder cancer epithelial-mesenchymal transition [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443(4): 1 226-1 231.