

PDGFR及 c-Fos 的表达与膀胱癌临床生物学特征的关系

姚华强¹ 彭瑛² 钟世镇¹ 何恢绪³ 李忠华¹ 第一军医大学临床解剖研究所 广东 广州 510515 白广州军区联勤部东皋干休所 广东 广州 510055 白广州军区总医院泌尿外科 广东 广州 510010 冤

摘要 目的 探讨膀胱移行上皮细胞癌 BTCC 组织中血小板源性生长因子受体 PDGFR 及癌蛋白 c-Fos 的表达与 BTCC 的关系 方法 应用免疫组化 SP 法检测 43 例 BTCC 组织 1 例正常膀胱组织 4 例癌旁组织中 PDGFR 及 c-Fos 的表达 结果 PDGFR 表达于胞膜 核膜和胞质 c-Fos 表达于胞核和胞质 PDGFR 和 c-Fos 在 BTCC 组织表达阳性率均显著高于正常和癌旁组织 <0.05 冤两者在 BTCC 血管中的染色明显深于正常血管 c-Fos 的表达在 BTCC 的分级中存在显著性差异 <0.05 冤 结论 PDGFR 和 c-Fos 的表达可调控膀胱的多种组织 过度表达与 BTCC 的发生密切相关 可能与肿瘤的血管形成相关 c-Fos 的表达可反映 BTCC 细胞的增殖状态 遥

关键词 膀胱肿瘤 血小板源性生长因子受体 c-Fos 蛋白

中图分类号 R737.14 文献标识码 文章编号 000-2588(2004)02-0177-03

Association of the expressions of platelet-derived growth factor receptor and c-Fos with the biological characteristics of bladder cancer

YAO Hua-qiang¹, PENG Ying², ZHONG Zhi-zhen¹, HE Hui-xu³, LI Zhong-hua¹

¹Institute of Clinical Anatomy, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Donggao Sanatorium of Combined Service Force of Guangzhou Command, Guangzhou 510055, China; ³Department of Urology, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To elucidate the relation of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) and c-Fos protein expressions with human bladder transitional epithelial cell carcinoma (BTCC). Methods The expressions of PDGFR and c-Fos were investigated in 11 normal bladder tissue samples, 14 adjacent non-carcinoma tissues and 43 BTCC tissues by means of SP immunohistochemical technique. Results The c-Fos expression was found in the cell nuclei and cytoplasm, and PDGFR in the nuclear membrane, cytoplasm, and cellular membrane. PDGFR and c-Fos were detected in 81.40% and 48.83% of the BTCC tissues respectively, at the rates both significantly higher than those in normal and adjacent non-carcinoma tissues (P<0.05). Correlation between the expression of c-Fos and the tumor grading was noted (P<0.05). The expressions of PDGFR and c-Fos in tumor blood vessels were significantly higher than those in normal vessels. Conclusions The expressions of PDGFR and c-Fos might be involved in the development of BTCC, possibly related to the angiogenesis of the tumors. c-Fos expression can indicated the cell proliferative status of the BTCC.

Key words: bladder carcinoma; platelet-derived growth factor receptor; c-Fos protein

已有研究表明生长因子和癌基因与某些肿瘤的发生发展有密切关系 膀胱移行上皮细胞癌 BTCC 是膀胱最常见的肿瘤 易于复发 且目前尚未阐明其发病机制 我们应用免疫组化方法检测血小板源性生长因子受体 PDGFR 及癌蛋白 c-Fos 在 BTCC 组织中的表达 以探讨 PDGFR 及 c-Fos 的表达状态与 BTCC 的发生生物学行为和预后的关系 遥

手术摘除 BTCC 组织 43 例 年龄 34~67 岁 中位年龄 60 岁 术前均未行化疗及放疗 按世界卫生组织 WHO 分级标准 Ⅱ级 15 例 Ⅲ级 20 例 Ⅳ级 8 例 按国际抗癌联盟 UICC 分期标准 Ⅰ期 16 例 Ⅱ期 21 例 Ⅲ期 4 例 Ⅳ期 2 例 遥 32 例获随访 8 例 随访 5 年以上 遥 1 例正常成人膀胱组织 9~31 岁 中位年龄 26 岁 冤 4 例膀胱肿瘤切除组织中距离肿瘤 2 cm 以上的膀胱组织 和癌旁组织 7~55 岁 中位年龄 47 岁 冤 作为对照 所有组织均经中性甲醛固定 4~6 h 冤 石蜡包埋 冤 切片厚 4 μm 遥 病理组织学证实所有诊断 遥

1 材料和方法

1.1 标本取材

收稿日期 003-08-09

基金项目 广东省科技计划项目 302020401 冤

Supported by Science and Technology Development Program of Guangdong Province(A302020401)

作者简介 姚华强 1966- 冤 男 广西北海人 第一军医大学在读博士研究生 主治医师 冤 e-mail: y99333@2911.net

1.2 方法和试剂

采用免疫组化 SP 法 遥 DAB 显色 冤 苏木素复染 冤 PBS 替代一抗 冤 抗阴性对照 遥 PDGFR 和 c-Fos 多克隆抗体 冤 均 冤 为 Santa Cruz 公司产品 冤 P 试剂盒为 Zymed 公司产品 遥 DAB 为 DaKo 公司产品 遥

1.3 结果判定

胞质尧胞膜尧胞核或核膜着棕黄色颗粒为阳性细胞遥高倍镜下选择 10 个具有代表性的视野避开受挤压变形尧切片边缘和组织坏死的部位冤每个视野 100 个细胞遥PDGFR 的表达阳性细胞数 = 0 为阴性(-)袁25% 为弱阳性(+)袁5%~50% 为中等强度阳性(++)袁50% 为强阳性(+++)曰-Fos 的表达阳性细胞数 = 0 为阴性(-)袁16% 为弱阳性(+)袁6%~30% 为中等强度阳性(++)袁30% 为强阳性(+++)遥

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件分析袁DGFR 及 c-Fos 在 3 种组织中的表达采用 R 便 表资料的 字检验模块曰PDGFR 及 c-Fos 的表达与 BTCC 分级尧分期的关系采用多个等级 / 频数表资料的比较模块渊ruskal Wallis Test冤

2 结果

2.1 PDGFR 和 c-Fos 的阳性染色分布

2.1.1 表达的部位 PDGFR 表达于胞质尧胞膜及核膜曰-Fos 主要表达于胞核尧偶见散在胞质表达遥

2.1.2 表达的细胞 PDGFR 表达于正常移行上皮和间质细胞袁在癌组织中癌细胞尧血管平滑肌和内皮细胞染色曰-Fos 表达于正常膀胱上皮基层细胞和血管平滑肌细胞袁在癌组织中血管平滑肌细胞尧内皮细胞和癌细胞染色遥PDGFR 和 c-Fos 在肿瘤血管的表达明显深于正常血管袁并且出现肿瘤组织血管内皮细胞染色遥

2.2 3 种组织 PDGFR 和 c-Fos 的染色结果

表 1 示 BTCC 组织 PDGFR 和 c-Fos 的阳性率明显高于正常和癌旁组织的阳性率袁而正常组织和癌旁组织的阳性率在统计学上无显著性差异遥

表 1 PDGFR 和 c-Fos 在不同组织中的表达
Tab.1 Expressions of PDGFR and c-Fos in the BTCC specimens

Group	n	Positive PDGFR expression					Positive c-Fos expression				
		-	+	++	+++	Rate (%)	-	+	++	+++	Rate (%)
BTCC tissue	43	8	14	12	9	81.40*	22	7	6	8	48.83*
Normal bladder tissue	11	7	3	1	0	36.36	10	0	1	0	9.09
Non-carcinoma bladder tissue	14	8	4	2	0	42.86	12	2	0	0	14.28

* P<0.01 vs normal bladder tissue or non-carcinoma bladder tissues. PDGFR: Platelet-derived growth factor receptor; BTCC: Bladder transitional epithelial cell carcinoma

2.3 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 病理分级的关系

表 2 示 PDGFR 的表达在 BTCC 不同分级中无显著性差异袁-Fos 在 BTCC 分级中存在显著性差异袁在 Grade 芋 组中表达较高遥

表 2 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 病理分级的关系
Tab.2 Association of the expressions of PDGFR and c-Fos with WHO grade of the BTCC

WHO grade	n	PDGFR expression				c-Fos expression			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Grade 玉	15	3	3	7	2	13	1	1	0*
Grade 域	20	4	7	3	6	9	5	3	3
Grade 芋	8	1	4	2	1	0	1	2	5

* P<0.01 vs grade 芋

2.4 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 临床分期的关系

表 3 示 PDGFR 和 c-Fos 在 BTCC 不同分期中的表达无显著性差异遥

2.5 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 预后的关系

随访 5 年以上的 18 例患者中袁生存满 5 年者 8 例袁DGFR 和 c-Fos 阳性表达分别为 6 例和 5 例袁阴性表达 2 例和 3 例曰生存未 5 年者 10 例袁DGFR 和 c-Fos 阳性表达分别为 7 例和 5 例袁阴性表达 3 例和 5 例遥PDGFR 和 c-Fos 的表达与 BTCC 的 5 年生

存率无相关关系渊>0.05冤

表 3 PDGFR 和 c-Fos 蛋白表达与 BTCC 病理分期的关系
Tab.3 Association of the expressions of PDGFR and c-Fos with the UICC stage of the BTCC

UICC stage	n	PDGFR expression				c-Fos expression			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Stage T1	16	5	4	4	3	6	4	3	3
Stage T2	21	2	8	6	5	14	2	3	2
Stage T3	4	1	1	2	0	2	1	0	1
Stage T4	2	0	1	0	1	0	0	0	2

2.6 PDGFR 和 c-Fos 表达的相关性

BTCC 组织 PDGFR 和 c-Fos 同时表达的阳性率为 39.53%袁正常和癌旁组织分别为 0%和 7.14%遥未发现 PDGFR 和 c-Fos 在 3 种组织中的表达存在相关关系渊>0.05冤

3 讨论

3.1 PDGFR 和 c-Fos 表达于不同类型细胞和多部位表达的意义

PDGF 是细胞有丝分裂强有力的刺激原袁通过自分泌或旁分泌作用与其受体结合后发挥多种生物学

功能参与体内细胞的分化和增殖并参与胞外基质的合成癌基因 c-fos 属即刻早期应答基因其编码相对分子质量为 6 200 的核蛋白 c-Fos 与 Jun 蛋白形成复合物通过选择性启动子刺激目的基因转录发挥生物学效应遥本研究显示在膀胱组织的多种细胞核核膜和胞质中检测到 PDGFR 表达在胞核和胞质中检测到 c-Fos 的表达结果提示 PDGFR 和 c-Fos 可能有不同的功能状态正常膀胱组织的结构和生理功能依赖于 PDGFR 和 c-Fos 的表达遥

3.2 PDGFR 表达与 BTCC 的关系

PDGFR 的过度表达可直接介导或通过其他因子间接介导肿瘤细胞的分化和增殖但与 BTCC 的关系不十分清楚遥本实验观察到 1.40% BTCC 组织表达 PDGFR 明显高于正常组织提示 PDGFR 的过度表达与 BTCC 的发生密切相关遥但鉴于正常膀胱组织和 BTCC 组织均能表达 PDGFR 可排除 PDGFR 的表达与 BTCC 形成的因果关系也鉴于部分 BTCC 组织未能表达 PDGFR 推测 PDGFR 在 BTCC 病因中并非起决定性作用遥

目前有关 PDGFR 表达与肿瘤的分级分期研究不多遥 Fudge 等^[10]观察到前列腺癌组织 PDGFR 表达在 Gleason 分级 >7 级的标本上染色较深 6 级的标本上染色较浅 Cotrota^[11]亦发现 PDGFR 在乳腺癌的表达与细胞增殖核抗原成正相关但与乳腺癌的分期分期无关遥本实验发现远处转移的 BTCC 组织 PDGFR 阳性表达率较高但未能提示 PDGFR 表达与 BTCC 分期分期相关遥 PDGF 具有促使细胞外基质合成和分解催化细胞迁移的作用但此功能是否给予或增强 BTCC 的侵袭转移能力值得进一步深入探讨遥

3.3 c-Fos 表达与 BTCC 的关系

有报道显示体外培养的人尿路上皮细胞在其衰老时期无法表达 c-fos^[12]而致膀胱癌变伴随着膀胱尿路上皮 c-fos 基因的上调表达^[13]遥这些研究说明 c-fos 的过度激活与移行细胞增殖相关遥本研究发现 48.83% 的病例表达 c-Fos 明显高于正常组织提示 c-Fos 的异常表达与 BTCC 的发生密切相关遥鉴于正常组织同时表达 c-Fos 说明 c-Fos 可调节细胞的正常分化^[14]也说明 BTCC 的发生不只依赖 c-Fos 的表达遥

迄今为止 c-fos 及 c-Fos 的表达与 BTCC 的关系仍不清楚遥韩国学者 Kee^[15]曾报道 c-Fos 的表达与 BTCC 的进展无关遥本组发现 c-Fos 表达与 BTCC 的分级存在显著性差异但与分期无差异遥这些提示 c-Fos 表达与 BTCC 恶化程度相关反映癌细胞的增殖状态能否作为恶性程度的指标仍需要深入研究遥

3.4 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 血管形成的关系

血管形成是 BTCC 生长侵袭甚至转移的必要前提遥有研究表明 PDGFR 表达与血管内皮细胞增殖新生血管形成正相关^[16]而 c-fos 的激活也参与血管平滑肌细胞的增殖调控过程^[17]遥本实验观察到相对于正常组织 BTCC 组织中血管平滑肌细胞内皮细胞过度表达 PDGFR 和 c-Fos 提示 PDGFR 和 c-Fos 的表达与 BTCC 血管生成相关遥进一步表明 PDGFR 和 c-Fos 的表达与 BTCC 的形成生长密切相关遥鉴于正常组织血管也表达 PDGFR 和 c-Fos 因此 PDGFR 和 c-Fos 的表达可调节正常血管的功能表过渡表达可刺激 BTCC 血管的增殖遥

3.5 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 预后的关系

BTCC 的预后受许多因素的影响如患者年龄病程长短伴随疾病初次治疗手段术后辅助治疗是否复发复发后的治疗等遥 BTCC 的预后是临床关注的另一重点遥涉及术后患者的生活质量等诸多问题寻找预后指标是研究 BTCC 的重要课题遥但因受到存活病例数少研究手段等限制本组研究未发现 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 的 5 年生存率相关因而他们不能作为 BTCC 的预后指标遥

3.6 PDGFR 和 c-Fos 表达的相互关系

近来研究证实 DGF 与其受体结合启动的级联式信号传递可转化多种参与 c-fos 基因转录的反式作用因子或诱导其表达进而上调 c-fos 基因的 mRNA 转录及表达^[18]遥 Whiteside 等^[19]发现 PDGF 可使增殖状态的肾小球膜细胞增强 c-fos mRNA 的表达遥理论上两者应有一定的关系遥本实验虽检测到 PDGFR 及 c-Fos 在 BTCC 组织中同时过度表达但未发现两者存在相关关系提示 BTCC 组织中生长因子和癌基因的相互调控机制复杂遥是否膀胱组织中 PDGFR 和 c-Fos 表达是两个独立的事件需要进一步的研究遥

4 小结

总之本组研究结果提示 PDGFR 和 c-Fos 表达与 BTCC 的形成密切相关特别是与 BTCC 的血管形成紧密相关并能反映肿瘤细胞的恶性程度遥但总体来说 PDGFR 和 c-Fos 表达尚不能作为 BTCC 生物学行为及预后的指标遥

参考文献

- 1 Fudge K, Wang CY, Stearns ME. Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor alpha and beta-receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Mod Pathol*, 1994, 7(3): 549-54.

Affymetrix 公司受到严格专利保护的原位合成 20 多个碱基的寡核苷酸芯片^①是人工合成 60 碱基长度的探针打印制备的芯片表它与 cDNA 芯片^②PCR 片段制备的芯片本质差别在于后两种芯片的探针都是双链 DNA 表且长度都在几百至上千碱基^③寡核苷酸芯片探针为人工合成的单链 DNA 表一般为几十个碱基表长度短表具有严格的特异性表目的基因即使有部分同源也难以结合牢固而不会产生杂交信号表因而寡核苷酸芯片杂交特异性高表病原体基因检测准确率高表出现假阳性或假阴性的可能性小遥

本研究中阳性对照探针由通用引物重复序列组成遥因样品处理后均带有与通用引物互补的接头序列表可与阳性对照探针杂交表检测样品标记是否成功遥阴性对照探针设计自水稻基因组表验证来自其他物种的探针是否存在与样品的非特异性杂交遥从杂交结果来看表病毒感染样品杂交信号较强表阴性样品除了阳性对照探针有信号外几乎都没有杂交信号表阳性样品与阴性对照探针也没有杂交信号表表明该芯片特异性较好表诊断结果明确遥另外几组信号较强的探针中表每组探针在病毒各个感染阶段的杂交信号比值较均一表说明该芯片对于各感染阶段病毒的检测都具有较高敏感性表有希望应用于病毒感染早期诊断遥

在实际应用中表寡核苷酸芯片由于探针片段短表固定比较困难表需要较高的探针浓度才可以达到理想的杂交效果表探针合成量要求较大表但采用自己处理的多聚赖氨酸包被的玻片片基比采用 Corning 等成品片基大大降低了成本遥合成纯化 1~2 个 D 液量的寡核苷酸探针大约可制备 200~400 块芯片表每块芯片检测 2~3 个样品表能以较低的成本应用于临床表是一种值得推广的新型检测手段遥

参考文献院

- 咱暂 Lapa S, Mikheev M, Shchelkunov S, et al. Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip 咱暂 J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 753-7.
- 咱暂 Kane MD, Jatkoe TA, Stumpf CR, et al. Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays 咱暂 Nucleic Acids Res, 2000, 28(22): 4552-7.
- 咱暂 Upton C, Slack S, Hunter AL, et al. Poxvirus orthologous cluster: toward defining the minimum essential poxvirus genome 咱暂 J Virol, 2003, 77(13): 7590-600.
- 咱暂 Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, et al. The complete DNA sequence of vaccinia virus 咱暂 Virology, 1990, 179(1): 247-66.
- 咱暂 马文丽, 郑文岭, James FB. 限制性显示淋 D-PCR 冤一种新的差异显示技术 咱暂 孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展 咱暂北京: 军事医学科学出版社, 1998. 99-113.
- 咱暂 Zhang B, Ma WL, Wu QH, et al. Constuction of a cDNA fragment library from SH-SY5Y cells using restriction display PCR 咱暂 Br J Biomed Sci, 2002, 59(1): 35-7.
- 咱暂 毛向明, 马文丽, 姜立, 等. 应用 RD-PCR 方法制备 K562 细胞表达谱芯片基因探针 咱暂第一军医大学学报, 2002, 22(6): 548-53.
- 咱暂 Mao XM, Ma WL, Jiang L, et al. Application of restriction display PCR in preparing the probes of the gene chip for investigating gene expression profile of K562 cells 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- 咱暂 李凌, 马文丽. DNA 芯片技术 新一代基因诊断技术 咱暂第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(4): 309-11.
- 咱暂 Cutler DJ, Zwick ME, Carrasquillo MM. High-throughput variation detection and genotyping using microarrays 咱暂 Genome Res, 2001, 11(11): 1913-25.
- 咱暂 朱利娜, 马文丽, 毛向明, 等. 人胎盘基因表达谱芯片的初步研究 咱暂第一军医大学学报, 2002, 22(5): 400-2.
- 咱暂 Zhu LN, Ma WL, Mao XM, et al. Preliminary study of DNA microarray of human placenta gene expression profile 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(5): 400-2.

渊上接 179 页冤

- 咱暂 Cotrota MD, Wang J, Porter PL, et al. Expression of platelet-derived growth factor B-chains and platelet-derived growth factor receptor 茁 subunit in human tissue and breast carcinoma 咱暂 Cancer Res, 1995, 55(10): 2703-9.
- 咱暂 Puthenveettil JA, Burger MS, Reznikoff CA. Replicative senescence in human uroepithelial cells 咱暂 Adv Exp Med Biol, 1999, 462(1): 83-91.
- 咱暂 Simeonova PP, Wang S, Toriuma W, et al. Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation 咱暂 Cancer Res, 2000, 60(13): 3445-53.
- 咱暂 温进坤, 石纓, 韩梅, 等. 原癌基因 c-fos 和 c-jun 在血管平滑肌细胞增殖调控中的作用 咱暂河北医科大学学报, 1996, 17(1): 1-3.
- 咱暂 Wen JK, Shi Y, Han M, et al. Role of proto-oncogenes c-fos and c-jun in regulation of rat VSMC proliferation[J]. J Hebei Med Univ,

1996, 17(1): 1-3.

- 咱暂 Kee KH, Lee MJ, Ro JY. Oncoprotein changes in the flat lesions with atypia and invasive neoplasms of the urinary bladder 咱暂 Oncol Rep, 2001, 8(3): 579-83.
- 咱暂 Battergay EJ, Rupp J, Luisa IA, et al. PDGF-BB modulated endothelial and angiogenesis in vitro via PDGF-receptors 咱暂 J Cell Biol, 1994, 125(3): 917-23.
- 咱暂 于士柱, 浦佩玉, 江德华, 等. 胶质瘤细胞 c-fos 和 c-myc 基因表达与血小板源生长因子 B 链的纯合二聚体血分泌活性的观察 咱暂中华病理学杂志, 1999, 28(3): 182-6.
- 咱暂 Yu SS, Pu PY, Jian DH, et al. Observations on expression of c-fos and c-myc genes and activity of PDGF-BB autocrine loop in 67 human gliomas 咱暂 Chin J Pathol, 1999, 28(3): 182-6.
- 咱暂 Whiteside C, Munk S, Zhou X, et al. Chelation of intracellular calcium prevents mesangial cell proliferative responsiveness 咱暂 J Am Soc Nephrol, 1998, 9(1): 14-25.