

p53、PCNA、VEGF 蛋白表达对膀胱癌术后复发的影响

王泽民 杨惠祥 于满

【摘要】 目的 结合 p53、PCNA、VEGF 三种肿瘤标志物的表达探讨膀胱肿瘤术后复发的相关因素及其临床意义。**方法** 回顾性分析承德医学院附属医院泌尿外科 2007 年 1 月至 2010 年 12 月收治的膀胱移行细胞癌患者的生存资料,并结合 p53、PCNA、VEGF 三种肿瘤标志物的表达,采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法及 Cox 比例风险模型对 p53、PCNA、VEGF 三种蛋白表达情况和年龄、性别、临床分期、病理分级、肿瘤数目、术后坚持灌注用药等影响肿瘤复发的因素进行统计分析。**结果** 单因素分析表明不同肿瘤病理分级、临床分期、手术方式、p53 表达、VEGF 表达、肿瘤数目及术后是否坚持灌注间肿瘤复发差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),Cox 回归模型多因素分析后,临床分期($RR = 4.162, P = 0.001$)、p53 表达($RR = 2.913, P = 0.038$)、VEGF 表达($RR = 3.316, P = 0.010$)作为肿瘤复发的危险因素进入模型,术后灌注化疗($RR = 0.217, P = 0.000$)作为保护性因素进入模型。**结论** 膀胱肿瘤的临床分期、p53 和 VEGF 是否表达严重影响了膀胱癌预后,术后应坚持灌注治疗以减少肿瘤复发,病理分级也与肿瘤复发相关。

【关键词】 膀胱肿瘤; 癌,移行细胞; 肿瘤抑制蛋白质 p53; 血管内皮生长因子类; 增殖细胞核抗原

The correlation of p53, PCNA and VEGF protein expression with tumor prognosis in bladder transitional cell carcinoma WANG Ze-min, YANG Hui-xiang, YU Man. Department of Urology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China
Corresponding author: YANG Hui-xiang, Email: yhx777@163.com

【Abstract】 Objective To study the correlation of p53, PCNA and VEGF protein expression and other recurrence factors with tumor prognosis, and its clinical significance in bladder transitional cell carcinoma (BTCC). **Methods** The retrospective survival analysis of BTCC patients and their age, sex, clinical staging, parameters of tumor grade, number of tumors, whether keep intravesical chemotherapy, expression of p53, VEGF and PCNA were performed by chi-square test, Cox proportional hazard model. **Results** On univariate analysis, the parameters of tumor grade, clinical staging, operative methods, the expression of p53 protein and VEGF protein, number of tumors and whether keep intravesical chemotherapy after operation were significant for tumor recurrence (all $P < 0.05$). On multivariate analysis of Cox proportional hazard model, the risk factors for tumor recurrence were tumor stage ($RR = 4.162, P = 0.001$), the expression of p53 protein ($RR = 2.913, P = 0.038$), the expression of VEGF protein ($RR = 3.316, P = 0.010$), long time intravesical chemotherapy after operation will improve the therapeutic effect of BTCC ($RR = 0.217, P = 0.000$). **Conclusions** Clinical staging, p53 and VEGF protein expression is an important yet imperfect evaluation of patients with bladder cancer, aside from the key roles, tumor grade is closely correlated with the risk of developing bladder cancer. Further intravesical therapy also has an associated improved survival.

【Key words】 Bladder neoplasms; Carcinoma, transitional cell; Tumor suppressor protein p53; Vascular endothelial growth factors; Proliferating cell nuclear antigen

膀胱癌是我国泌尿外科最常见的肿瘤,手术是主要的治疗手段,术后高复发率是困扰临床医师的重要问题。虽然相关研究较多,但各种因素对患者预后影

响的报道各异。为此,我们研究了承德医学院附属医院泌尿外科 2007 年 1 月至 2010 年 12 月收治的膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder, BTCC)患者的临床资料,结合标本蜡块切片免疫组织化学方法,检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及 p53 三种标志物的结果,进行回顾

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.02.020
基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(20090587)
作者单位:067000 河北省,承德医学院附属医院泌尿外科
通讯作者:杨惠祥,Email:yhx777@163.com

性分析,探讨影响膀胱肿瘤复发的因素。

对象与方法

1. 研究对象:选择手术治疗的 BTCC 患者 100 例,所有标本均经病理诊断明确。68 例患者获得随访,其中男 40 例,女 28 例,平均年龄 53.2 岁;G1 ~ G2 级患者 48 例,G3 级患者 20 例;按 UICC-TNM 标准分为浅表型(Tis ~ T1) 41 例,均行经尿道膀胱肿瘤电切术(TURB-t);浸润型(T2 ~ T4) 27 例,其中行 TURB-t 术 5 例,根治性膀胱切除 2 例,膀胱部分切除 20 例;单发肿瘤患者 40 例,多发肿瘤患者 28 例。所有患者常规术后 30 min 内给予吡柔比星即刻灌注化疗。从术后 1 周开始要求所有患者进行维持灌注治疗(每周 1 次,8 次后每月 1 次,至 2 年),灌注药物主要有吡柔比星、丝裂霉素或羟喜树碱等。术后每 3 个月复查膀胱镜 1 次。68 例患者中,术后坚持灌注治疗 49 例,未坚持灌注 19 例。采用电话、登门等方法随访 5 ~ 40 个月。到随访截止,32 例因膀胱癌复发再次于我院手术,其中 3 例死于膀胱肿瘤进展,未复发患者 36 例,其中 2 例死于非肿瘤并发症,11 例患者失访。

2. 试剂:一抗采用武汉博士德公司生产的鼠抗人 p53 单克隆抗体(1:100)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:100)以及鼠抗人 PCNA 单克隆抗体(1:100);二抗采用北京中山生物技术开发有限公司生产的即用型 S-P 免疫组化试剂盒。

3. 免疫组化方法:病理标本均 4% 甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μ m 连续切片,二甲苯脱蜡,水化,以过氧化氢阻断内源性酶并行微波抗原修复,严格按试剂配套说明书中 S-P 法工作流程操作,分别滴加鼠抗人 p53 单克隆抗体、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体以及鼠抗人 PCNA 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加辣根过氧化物酶标记通用性二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, DAB 显色,最后以苏木素复染,镜下观察控制显色过程,常规脱水、封片。每次实验均以磷酸盐缓冲液 PBS 代替一抗的方法设置阴性对照,并以已知阳性切片作为阳性对照。

4. 免疫组化结果判断:p53、PCNA 为细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性染色,VEGF 为细胞质内出现棕黄色或棕色颗粒为阳性染色。选择典型部位,随机取 5 个高倍视野,计数 1000 个细胞,计算阳性细胞比例,取观察切片肿瘤细胞中阳性细胞比例的均值。

5. 统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件包,计数资料差异性比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法。采用 Cox 比例风险模型对影响肿瘤复发的因素进行生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 病理和免疫组化结果:按 WHO 分级标准(1999)确定病理分级,G1 ~ G2 级患者 48 例,G3 级患者 20 例;按 UICC-TNM 标准分为浅表型(Tis ~ T1) 41 例,浸润型(T2 ~ T4) 27 例。免疫组化结果 p53 阳性 42 例,阴性 26 例;VEGF 阳性 40 例,阴性 28 例;PCNA 阳性 38 例,阴性 30 例。

2. 单因素分析结果(表 1):单因素分析表明不同肿瘤病理分级、临床分期、手术方式、p53 表达、VEGF 表达、肿瘤数目及术后是否坚持灌注对肿瘤复发的影响均有统计学意义(均 $P < 0.05$),而患者性别、PCNA 表达对复发的影响无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 1 膀胱肿瘤复发因素的单因素分析

影响因素	例数	复发例数	P 值
性别			0.117
男	40	22	
女	28	10	
病理分级			0.014
高级别	20	14	
低级别	48	18	
临床分期			0.000
Tis ~ T1	41	11	
T2 ~ T4	27	21	
手术方式			0.000
开放手术	26	20	
TURB-t	42	12	
p53 表达			0.009
阳性	42	25	
阴性	26	7	
VEGF 表达			0.002
阳性	40	25	
阴性	28	7	
PCNA			0.127
阳性	38	21	
阴性	30	11	
肿瘤数目			0.004
单发	40	13	
多发	28	19	
术后灌注			0.000
坚持	49	16	
未坚持	19	16	

3. Cox 比例多因素分析结果:将通过单因素分析筛选出的有意义影响因素进入 Cox 模型,前进法分析, $P \leq 0.05$ 时选入变量, $P > 0.05$ 时剔除变量(表 2)。结果表明,临床分期($RR = 4.162, P = 0.001$)、p53 表达

($RR = 2.913, P = 0.038$)、VEGF 表达($RR = 3.316, P = 0.010$)作为肿瘤复发的危险因素进入模型,术后灌注化疗($RR = 0.217, P = 0.000$)作为保护性因素进入模型(表3)。

表2 膀胱肿瘤预后的影响因素与赋值

影响因素	变量名	赋值说明
患者年龄	x1	实际年龄(岁)
病理分级	x2	低级别 = 1, 高级别 = 0
临床分期	x3	Tis ~ T1 = 0, T2 ~ T4 = 1
手术方式	x4	开放手术 = 1, TURb-t = 0
P53 表达	x5	阳性 = 1, 阴性 = 0
VEGF 表达	x6	阳性 = 1, 阴性 = 0
肿瘤数目	x7	多发 = 1, 单发 = 0
术后坚持灌注	x8	是 = 1, 否 = 0
无瘤生存时间	t	实际无瘤生存时间
患者的结局	Y	复发 = 0, 截尾 = 1

讨 论

膀胱肿瘤是一个多因素、多环节的复杂疾病,目前对膀胱肿瘤术后复发的详细机制还不明确。我们通过免疫组化对三种肿瘤标志物进行规范的半定量分析,并结合临床随访资料试图寻找导致肿瘤复发的关键因素。

研究表明,p53 蛋白表达失控是膀胱癌预后不佳的重要指标之一。p53 蛋白分为野生型和突变型,Schrier 等^[1]的研究表明,突变型 p53 的表达增高与 BTCC 的侵袭性有密切关系。温机灵等^[2]的研究中认为突变型 p53 表达与膀胱肿瘤病理分级、临床分期呈正相关,如果浅表性膀胱癌的突变型 p53 高表达,肿瘤极易进展、复发。本研究结果与上述研究结果一致,p53 表达与膀胱肿瘤复发情况显著相关,p53 阳性患者术后与 p53 阴性患者相比,肿瘤复发风险为 2.913 倍。膀胱肿瘤的血管丰富,其生长、浸润、转移、复发、进展等与肿瘤新生血管生成密切相关,而 VEGF 是已知最强的一组促血管形成物质。O'Brien 等^[3]对 53 例膀胱标本进行实验,结果显示膀胱癌中 VEGF 的表达率显著高于正常膀胱组织,并且复发的浅表性 BTCC 组织中 VEGF 的表

达程度是未复发者的 4 倍,作者认为 VEGF 是研究 BTCC 生物学行为的重要标志物,是评价膀胱癌术后复发很有意义的指标。本研究结果支持上述观点,VEGF 阳性患者术后较 VEGF 阴性患者肿瘤复发风险高 3.316 倍,说明 VEGF 加快了 BTCC 的进展,VEGF 可作为评估肿瘤复发的独立指标。

PCNA 直接参与 DNA 合成,在各种恶性肿瘤组织中均过度表达,它的表达水平反映了膀胱肿瘤细胞的增殖活跃程度。有学者认为 PCNA 不仅与肿瘤的分期分级相关,而且是判断肿瘤细胞活力的重要指标,如果 PCNA 呈强阳性表达,肿瘤很可能已进展为浸润性癌,易复发,需密切随访^[4,5]。但我们的研究表明,单因素和多因素分析时,PCNA 表达均未能对肿瘤复发有显著影响,这可能由于 PCNA 蛋白参与了 p53 蛋白和 VEGF 蛋白诱导肿瘤复发的中间环节,是肿瘤细胞高增殖状态的外在表现,并非是导致膀胱肿瘤复发的独立性因素,也可能与选择病例在分期分布不均有关。

虽然目前在术后膀胱灌注用药及灌注最适剂量、保留时间、最适方案等临床处置上无统一定论,但术后维持灌注化疗对降低 BTCC 复发率有巨大帮助已达成共识。Witjes 等^[6]在对膀胱肿瘤术后灌注化疗的各种药物进行远期临床效果观察时发现,术后即刻灌注并且术后坚持定期灌注组患者 2 年内复发风险显著低于常规给药组,术后 5 年复发率也降低,认为电切术后即刻灌注化疗对预防非肌层浸润性膀胱肿瘤复发的长期效果肯定。本研究结果再次证明膀胱肿瘤术后坚持膀胱灌注治疗作为保护性因素对预防复发是切实有效的。

本研究认为肿瘤的临床分期对复发有显著影响,浸润性膀胱癌的复发风险是 Tis ~ T1 期肿瘤的 4.162 倍。我们分析,这是因为浸润性膀胱癌难以彻底手术切除,而且术后膀胱灌注的药物往往是大分子物质,难以在膀胱壁深部达到有效浓度。病理分级在单因素分析中对肿瘤复发有影响,多因素分析时却未能进入模型,我们认为病理分级对肿瘤复发的影响比临床分期的影响弱,可能的原因是一些膀胱肿瘤初发时虽然可以为 G3 级,但多为浅表性,TURb-t 操作难度并不大,彻底切除后预后较好。

表3 膀胱肿瘤预后 Cox 比例风险模型

影响因素	β	SE	Wald	RR	95% CI	P 值
临床分期	1.426	0.430	11.010	4.162	1.793 ~ 9.664	0.001
P53 表达	1.069	0.516	4.301	2.913	1.060 ~ 8.003	0.038
VEGF 表达	1.199	0.466	6.617	3.316	1.330 ~ 8.267	0.010
术后灌注	-1.530	0.422	13.169	0.217	0.095 ~ 0.495	0.000

膀胱肿瘤具有多中心性生长的特点, Rodríguez-Alonso 等^[7]的临床统计结果得出多发肿瘤较单发肿瘤更易复发。本研究单因素分析结果与之一致,肿瘤数目对复发确有影响,但在多因素分析时,肿瘤数目因素被剔除,可能因为随着电切手术的成熟,多发非浸润性膀胱肿瘤并不妨碍术者较彻底切除,肿瘤数目对复发的影响很有限。同样,单因素分析时手术方式影响肿瘤预后,但多因素分析时该因素被剔除,显然并不是手术方式导致肿瘤复发。

总之,膀胱肿瘤的临床分期、p53 和 VEGF 是否表达严重影响了膀胱癌预后,术后应坚持灌注治疗以减少肿瘤复发,病理分级和肿瘤数目也影响肿瘤复发。经免疫组化检测,p53、PCNA、VEGF 均为阳性表达的浸润性肿瘤提示预后不佳,需密切监测。当然,由于病例随访时间较短,还需要进一步跟踪研究。

参 考 文 献

[1] Schrier BP, Vriesema JL, Witjes JA, et al. The predictive value of p53, p27(kip1), and alpha-catenin for progression in superficial blad-

der carcinoma. *Eur Urol*, 2006, 50:76-82.

- [2] 温机灵,周祥福,冯智英,等. p53、p21、ki-67 和 VEGF 与膀胱癌分级、分级以及预后的关系. *临床泌尿外科杂志*, 2007, 22:328-331.
- [3] O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, et al. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res*, 1995, 55:510-513.
- [4] Stone R 2nd, Sabichi AL, Gill J, et al. Identification of Genes Correlated with Early-Stage Bladder Cancer Progression. *Cancer Prev Res*, 2010, 3:776-786.
- [5] 赵志德,李玉林,寇伯君,等. 膀胱移行细胞癌增殖细胞核抗原与肿瘤间质微血管密度的表达与临床预后的意义. *中国肿瘤临床*, 2000, 27:271-273.
- [6] Witjes JA, Hendriksen K. Intravesical pharmacotherapy for non-muscle-invasive bladder cancer: a critical analysis of currently available drugs, treatment schedules, and long-term results. *Eur Urol*, 2008, 53: 45-52.
- [7] Rodríguez-Alonso A, Pita-Fernández S, González-Carrero J, et al. Multivariate analysis of survival, recurrence, progression and development of metastasis in T1 and T2a transitional cell bladder carcinoma. *Cancer*, 2002, 94:1677-1684.

(收稿日期:2012-10-09)

(本文编辑:郝锐)

王泽民,杨惠祥,于满. p53、PCNA、VEGF 蛋白表达对膀胱癌术后复发的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(2):366-369.

中华医学会