

膀胱癌相关因子研究进展

朱娟娟^① 曾 芸^① 综述 杨宝学^② 审校

摘要 膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一,其预后较差。近年来与膀胱癌发生发展密切相关的因子成为研究的热点,标志基因的发现能够提高膀胱癌早期诊断以及治疗的敏感性和特异性,并可以此为靶标寻找新的抗肿瘤药物和方法。研究发现 survivin、TGF- β 、PLK1、Ki-67、MCM5 等蛋白的基因突变或表达异常与膀胱癌发生发展密切相关。对这些膀胱癌相关蛋白的生物学特征和作用机制的深入研究将会为诊断和治疗膀胱癌提供有意义的实验数据和理论依据,本文对该领域的研究进展进行综述。

关键词 膀胱癌 凋亡抑制基因 癌标志物 靶向治疗

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.12.015

Research progress of bladder cancer-related factors

Juanjuan ZHU¹, Yun ZENG¹, Baoxue YANG²

Correspondence to: Baoxue YANG; E-mail:baoxue@bjmu.edu.cn

¹Guangxi University School of Animal Science and Technology, Nanning 530005, China

²Department of Pharmacology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Cardio-Angiology, Beijing 100191, China

Abstract Bladder cancer is among the most commonly identified malignant tumors in the urinary system and usually has the worse outcomes. The factors related to the occurrence and progression of this urologic cancer has received considerable research attention. The discovery of marker genes enhances the sensitivity and specificity of early diagnosis and treatment of bladder cancer. Furthermore, these genes can be used as the candidate targets for antitumor drugs and methods. A large number of studies have revealed that the gene mutations or abnormal expressions of the proteins, such as surviving, TGF- β , PLK1, ki67, and mcm5, are closely associated with the occurrence and development of bladder cancer. Several studies on the biological characters and mechanism of the related proteins have provided meaningful experimental information and theoretical basis for the diagnosis and treatment of bladder cancer. In this review article, we summarized the status of the current studies in this field.

Keywords: bladder cancer, inhibitor of apoptosis genes, cancer biomarker, targeted therapy

膀胱癌(bladder cancer, BC)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,占泌尿系肿瘤的首位,90%以上为移行细胞癌(BTCC),其中80%为浸润的浅表性癌,初次治愈后复发率为70%~80%,其发病率和复发率呈逐年增加的趋势。世界各国膀胱癌的发病率相差可达10倍之多,西欧和北美最高,东欧和一些亚洲国家比较低,在我国男性膀胱癌发病率位居全身肿瘤的第8位,男性发病率为女性的3~4倍。近年来随着分子生物学技术的飞速发展,与膀胱癌发生发展相关因子的研究已经取得了很大的进展,本文就该领域的研究状况作一综述。

1 凋亡抑制基因与膀胱癌

1.1 survivin与膀胱癌

存活素(survivin),属于凋亡抑制蛋白家族(inhibitors of apoptosis proteins),定位于染色体17q2。survivin基因编码产生一个由142个氨基酸组成的分子量约16.5 kD

的细胞质蛋白,N端含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复结构(baculovirus IAP repeat, BIR),C端为40个氨基酸组成的 α 螺旋结构,此结构与纺锤体的微管蛋白特异性结合,维持有丝分裂的正常进行,从而抑制细胞凋亡^[1]。因BIR分子中含有对抑制凋亡有重要作用的氨基酸残基Thr34、Pro33和Cys84,这些残基与半胱天冬蛋白酶caspase-3和caspase-7结合抑制caspase的活性,从而阻断细胞凋亡,这一作用是通过细胞内微管的聚合和解聚来实现。

目前报道表明survivin在所有常见恶性肿瘤如脑肿瘤、膀胱癌、肝癌、乳腺癌等高表达,而在分化成熟的正常组织中,未见survivin表达,其表达上调提示肿瘤分化不良。Weiss等^[2]提出survivin高表达可以作为已进行TURBI(经尿道前列腺切除术)和做过放疗或化疗带有高复发危险的T1型膀胱癌患者复发和恶化的指标。由此可见survivin与膀胱癌发生发展和预

作者单位:①广西大学动物科学技术学院(南宁市530005);②北京大学基础医学院药理学系,分子心血管学教育部重点实验室

通信作者:杨宝学 baoxue@bjmu.edu.cn

后密切相关,检测膀胱癌组织中 survivin 表达,对判断膀胱癌预后有一定意义,可以作为判断膀胱癌发生发展、有无复发的指标之一。癌的早期发现对治疗起到至关重要的作用,有报道尿 survivin 检测比尿脱落细胞学检查对膀胱癌诊断具有更高的敏感性和特异性。Ku 等^[3]对 1997 年 8 月至 2011 年 3 月相关文献进行系统性总结,得出结论:尿液中 survivin 检测敏感性优于尿脱落细胞学检测,但缺点是达不到细胞学检测的特异性。因此尿液中 survivin 检测是否可以作为临床膀胱癌的早期诊断和复发的指标仍需做进一步研究。而 Eissa 等^[4]通过对 166 例膀胱癌患者,112 例良性膀胱损伤患者和 100 例健康志愿者三个群体的尿脱落细胞学检查,以及通过 RT-PCR 对尿脱落细胞中透明质酸酶(HYAL1),survivin 进行定性和半定量分析得出结论:1)可以通过检测尿液中 HYAL1 和 survivin 的 RNA 对早期膀胱癌做出诊断。2)通过半定量 RT-PCR 检测尿液中 HYAL1 或 survivin 的 RNA 可使尿脱落细胞学检测的敏感性得到较大提高。因此检测尿脱落细胞 survivin 的表达有望成为临床诊断、筛选膀胱癌的较可靠指标。

由于 survivin 在正常膀胱组织中不表达,是肿瘤特异的凋亡抑制蛋白,因此可以采用 siRNA 干扰或抑制其表达,同时联合抗癌药物或放疗法共同治疗膀胱癌, Seth 等^[5]利用 RNAi 技术筛选出靶向人类 survivin 和 Polo 样激酶 1 (polo-like kinases 1, PLK1) 脂质体对原位膀胱癌小鼠模型进行治疗,发现浓度为 1.0、0.5 mg/kg 分别使 survivin 和 PLK1 的 mRNA 表达抑制 90% 和 70%,同时在 3 周内呈剂量依赖性的降低了肿瘤体积。因此分子靶向 survivin、PLK1 可为临床膀胱癌治疗提供新方法、新思路。

1.2 livin 与膀胱癌

livin 是新近发现的凋亡抑制蛋白(IAP)家族成员之一^[6],研究表明, livin 在多种肿瘤细胞中呈高度表达,与肿瘤的发生发展有着密切关系。livin 是 2000 年发现的 IAP 家族中新成员,人类的 livin 基因位于染色体 20q13,全长 46 kb。 livin 蛋白 N 端仅包含一个杆状病毒 IAP 重复序列(BIR)结构,其与 caspase 蛋白结合,抑制其介导级联激活反应及多种途径引起的细胞凋亡,C 端含一个环状锌指样结构,其转录产物因剪接方式不同有两种 mRNA 亚型,即 livin α 和 livin β 。 Liu 等^[7]发现是 livin α 而不是 livin β 在膀胱癌样本中表达,正常膀胱组织中未检测到 livin 表达;复发的膀胱癌患者 livin 阳性率显著高于原发膀胱癌;此外 livin 过表达刺激了细胞增殖并抑制经化学诱导的细胞凋亡。 Liu 等^[8]报道通过转染靶向 livin 的反义寡核苷酸

于膀胱癌细胞,发现癌细胞中 livin 的表达以及癌细胞的增殖均被有效抑制,同时 caspase-3 被激活,癌细胞的生长变慢,凋亡增加。由此提示基因靶向 livin 引起癌细胞凋亡有可能是通过激活效应因子 caspase-3 而实现的, livin 可作为膀胱癌预后和发生发展的指标,并可通过阻抑 livin 的表达而提高癌细胞对化疗药物的敏感性,可将 livin 作为基因治疗膀胱癌的靶点。

1.3 XIAP 与膀胱癌

X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是凋亡抑制蛋白(IAP)家族最有效的 caspase 抑制剂^[9],也是唯一可与凋亡启动因子 caspase-9 和效应因子 caspase-3、caspase-7 结合的凋亡抑制蛋白, XIAP 还可以通过多种信号途径参与抑制内源或外源性凋亡诱导信号引起的细胞凋亡,已报道的有肝癌、前列腺癌、胰腺癌、非小细胞型肺癌等。现已证明 XIAP 在人体的多种组织中表达,在正常组织中低水平表达,而在多种恶性肿瘤中表达明显升高。 Yang 等^[10]发现 livin、survivin、XIAP 这三个凋亡抑制蛋白同时表达于膀胱癌细胞,当同时敲低这三个基因后发现高度恶化的膀胱癌 T24 细胞的增殖和侵袭能力同时下降,而且细胞内 caspase-3、caspase-7、caspase-9 活性均显著增加。由此可见这三个基因能够成为很重要的治疗膀胱癌的多靶向基因。

2 TGF- β 与膀胱癌

转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)是一种多功能蛋白质,属于 TGF- β 超家族蛋白,有 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 三个亚型,其中 TGF- β 1 是一种具有多功能的多肽类细胞因子,机体几乎所有细胞或组织均能合成和释放 TGF- β 1 并表达相应受体。 TGF- β 可以与细胞表面的 TGF- β 受体结合而激活其受体,通过 SMAD 信号通路^[11]和(或) DAXX 信号通路^[12]传递信号,从而影响多种细胞的生长、分化、凋亡。

TGF- β 在肿瘤中的作用极其复杂,与肿瘤细胞的关系尚未阐明,目前认为 TGF- β 具有双向作用:对于正常细胞, TGF- β 通过其信号通路使细胞生长周期停滞在 G₀ 期,但当细胞恶化时, TGF- β 信号通路的组分发生改变,多种基因突变细胞对 TGF- β 耐受,使细胞逃避 TGF- β 介导的生长抑制效应,细胞生长失去控制,促进肿瘤进展。在肿瘤发生早期可作为抑癌基因抑制细胞的增殖,但在肿瘤进展期则可促进肿瘤的侵袭和转移。早期报道发现膀胱癌组织中 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 的 mRNA 水平降低^[13]。 Coombs 等^[14]报道在浸润型膀胱癌中 TGF- β 1 蛋白水平显著降低,

然而 Hung 等^[15]采用微阵列和 qRT-PCR 分析 6 种转化生长因子,发现 TGF- β 1 蛋白在膀胱癌组织过表达与膀胱癌的发生发展有关:TGF- β 1 mRNA 水平在浅表型和浸润型膀胱癌细胞中高表达,并通过膀胱癌模型发现 TGF- β 1 蛋白水平的过表达可能由于 TGF- β 受体 1 和受体 2 的降低有关,进一步研究发现 TGF- β 受体 1 低水平表达与膀胱癌肌肉浸润和淋巴结转移或复发以及预后不良有关。因此 TGF- β 1 和 TGF- β 受体 1 有望成为治疗膀胱癌的药物靶点。

3 PLK1 与膀胱癌

Polo 样激酶 1 (polo-like kinase 1, PLK1) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,属于 Polo 样激酶 (polo-like kinases, PLKs) 家族成员,人体内有 4 种亚型: PLK1、PLK2、PLK3 和 PLK4。研究最多最透彻的为 PLK1,分子量为 66 kd,含有 603 个氨基酸,其 N 端为激酶结构域,C 端为 30 个氨基酸序列组成的两个保守 polo 小盒,发挥着调节 PLK1 活性的作用^[16]。PLK1 在细胞的有丝分裂、中心体成熟、细胞质分离、基因稳定等方面发挥重要作用。已有研究^[17]报道 PLK1 的过表达会增加中心粒的大小或数量,而这将会引起染色体的不正确分离,异倍体的形成以及肿瘤发生。PLK1 过表达不仅存在于膀胱癌,很多人类癌症也是如此,如肝细胞癌、胰腺癌、肺癌等^[18-19]。Zhang 等^[20]检测 120 例膀胱癌中 PLK1 的表达,发现 PLK1 在膀胱癌中高表达,并且与膀胱癌病理分级和临床分期,以及膀胱癌的复发、转移密切相关。体外实验发现,膀胱癌细胞的增殖和转移能力随着 PLK1 的抑制剂 scytone-min 剂量的增大而显著降低,并使细胞周期阻滞在 G₂/M 期。目前已发现很多靶向 PLK1 的小分子抑制剂,如 GSK461364、HMN-214、BI6727 等,而多种 PLK1 的抑制剂均表现出了高效低毒的特性。表明 PLK1 与膀胱癌的发生发展密切相关,可以 PLK1 为靶标筛选治疗膀胱癌的药物和方法。

4 MCM5 与膀胱癌

微小染色体维持蛋白 (MCM) 是一组与 DNA 复制密切相关的蛋白,是真核生物 DNA 复制的主要调控因子,启动真核细胞 DNA 复制,调控细胞由 G₁ 期进入 S 期^[21]。正常细胞中 MCM 蛋白的 mRNA 水平随着细胞周期的变化而改变,在 G₁/S 期达到峰值,而在 G₀ 期和分化衰老时,MCM 表达水平下降甚至检测不到,因此其能很好的反应细胞增殖情况。MCM5 是调节有核细胞染色体复制的重要因子,其是 MCM 蛋白中 6 个成员之一,检测 MCM5 可以直接反应 MCM 蛋白的水平。由于肿瘤的形成是以肿瘤细胞的过度增殖和控制细胞周期检测点的基因突变或者丢失而造成的

基因不稳定为特征,因此 MCM 蛋白可用于肿瘤的生物特性研究。目前国内外很多学者在多种肿瘤细胞中检测到 MCM 过表达,而在静止期的细胞中较少表达,并将其作为一个诊断肿瘤的标记物。由于正常膀胱黏膜细胞不易脱落或仅脱落表层细胞,而膀胱肿瘤大多突出到膀胱黏膜表面,受尿液冲刷容易脱落,因此,检测尿脱落细胞 MCM5 表达可用于膀胱癌的诊断。

Brems-Eskildsen 等^[22]通过检测尿液沉淀物中 MCM5 的 mRNA 水平评估其与膀胱癌复发的相关性,认为可以通过检测尿液沉淀物中 MCM5 的表达水平进而检测膀胱癌的复发,而且检测的敏感性高于脱落细胞学检查,通过联合脱落细胞学检查和 MCM5 水平的检测可以明显提高检测率。MCM5 在膀胱癌中过表达预示着膀胱癌的复发和不良预后。

5 Ki-67 与膀胱癌

Ki-67 是一种位于细胞核内的大分子蛋白质,其包含 200 个以上磷酸化部位,人类 Ki-67 基因定位于染色体 10q25,是一种与细胞周期相关的增殖细胞核蛋白,是界定一个细胞凋亡和增殖的标记物,能准确反映肿瘤细胞的增殖活性,并与多种肿瘤的发展、转移和预后相关。其从 G₁ 后期开始出现,S、G₂ 期升高,M 期达到高峰,细胞脱离增殖周期后迅速降解丢失抗原决定簇^[23],半衰期均为 1 h。Ki-67 和其他肿瘤分子标记物相结合,能较好的反映肿瘤增殖活性,对判断肿瘤的恶性程度,预后和指导肿瘤的术后辅助治疗有着极其重要的意义。PT1 和 PTa 期 (非浸润性肿瘤) 合称为浅表性膀胱肿瘤,但是 PT1 期肿瘤的预后比 PTa 期差,因此若临床能够正确诊断 PT1 期肿瘤将对选择治疗方案和估计预后非常重要。Bertz 等^[24]通过分析 309 例 PT1 期膀胱癌,进行评估细胞角蛋白 20 (ck20)、Ki-67、p53 的预后价值,认为可以通过 Ki-67 和 ck20 表达来预测 PT1 期膀胱癌患者的预后。Ki-67 联合脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS) 探讨与膀胱癌发生发展的关系,发现 Ki-67 和 FAS 的高表达预示着膀胱癌的预后不良,通过单因素分析 Ki-67 和 FAS 发现两者不相关,但联合 FAS 和 Ki-67 的表达来预测膀胱癌的发生发展比通过单一因子预测的结果更有说服力^[25]。

6 展望

随着分子生物学和蛋白组学技术的不断发展以及研究的深入,膀胱癌发生发展相关的特异性蛋白因子逐渐被发现。但是这些相关因子的详细作用机制和作为靶向性药物和治疗靶点的研究仍处于初级阶段,实验室来源的研究数据将会为膀胱癌的分

诊断、治疗和预后提供非常有用的信息和理论基础。

参考文献

- Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. *Nature*, 1998, 396(6711):580–584.
- Weiss C, von Römer F, Capalbo G, et al. Survivin expression as a predictive marker for local control in patients with high-risk T1 bladder cancer treated with transurethral resection and radiochemotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 74(5):1455–1460.
- Ku JH, Godoy G, Amiel GE, et al. Urine survivin as a diagnostic biomarker for bladder cancer: a systematic review[J]. *BJU Int*, 2012, 110(5):630–636.
- Eissa S, Swellam M, Shehata H, et al. Expression of HYAL1 and survivin RNA as diagnostic molecular markers for bladder cancer[J]. *J Urol*, 2010, 183(2):493–498.
- Seth S, Matsui Y, Fosnaugh K, et al. RNAi-based therapeutics targeting survivin and PLK1 for treatment of bladder cancer[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(5):928–935.
- Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(6):401–410.
- Liu HB, Kong CZ, Zeng Y, et al. Livin may serve as a marker for prognosis of bladder cancer relapse and a target of bladder cancer treatment[J]. *Urol Oncol*, 2009, 27(3):277–283.
- Liu C, Wu X, Luo C, et al. Antisense oligonucleotide targeting livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism involving caspase 3[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29:63.
- Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(7):550–556.
- Yang D, Song X, Zhang J, et al. Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(2):137–144.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. *Nature*, 1997, 390(6659):465–471.
- Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, et al. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(8):708–714.
- Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, et al. Expression of transforming growth factors β -1, β 2 and β 3 in human bladder carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 1997, 75(12):1753–1760.
- Coombs LM, Pigott DA, Eydmann ME, et al. Reduced expression of TGF β is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 1993, 67(3):578–584.
- Hung TT, Wang H, Kingsley EA, et al. Molecular profiling of bladder cancer: involvement of the TGF- β pathway in bladder cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2008, 265(1):27–38.
- Hanisch A, Wehner A, Nigg EA, et al. Different Plk1 functions show distinct dependencies on Polo-Box domain-mediated targeting[J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(1):448–459.
- Takai N, Hamanaka R, Yoshimatsu J, et al. Polo-like kinases (Plks) and cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24(2):287–291.
- Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2010, 51(3):857–868.
- Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, et al. Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(3):578–588.
- Zhang Z, Zhang G, Kong C. High expression of polo-like kinase 1 is associated with the metastasis and recurrence in urothelial carcinoma of bladder[J]. *Urol Oncol*, 2011, 29(6):589–601.
- Labib K, Kearsley SE, Diffley JF. MCM2–7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint[J]. *Mol Biol Cell*, 2001, 12(11):3658–3667.
- Brems-Eskildsen AS, Zieger K, Toldbod H, et al. Prediction and diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary content of hTERT, SENP1, PPP1CA, and MCM5 transcripts[J]. *BMC Cancer*, 2010, 10:646.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67[J]. *J Immunol*, 1984, 133(4):1710–1715.
- Bertz S, Otto W, Denzinger S, et al. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2012, 61(5):869–874.
- Sugino T, Baba K, Hoshi N, et al. Overexpression of fatty acid synthase in human urinary bladder cancer and combined expression of the synthase and Ki-67 as a predictor of prognosis of cancer patients[J]. *Med Mol Morphol*, 2011, 44(3):146–150.

(2012-10-22 收稿)

(2013-01-21 修回)

(本文编辑:邢颖)