

· 基础研究 ·

# 肾上腺髓质素、受体活性调节蛋白 2、3 在膀胱癌的表达及意义

陈玉乐, 杨文杰, 吕伟, 刘天杰, 李磊

(西安交通大学第一附属医院泌尿外科, 陕西西安 710061)

## Expressions and significance of AM, RAMP2 and RAMP3 in bladder cancer

CHEN Yu-le, YANG Wen-jie, LÜ Wei, LIU Tian-jie, LI Lei

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**ABSTRACT:** **Objective** To determine the expressions and significance of adrenomedullin (AM) and its key receptor accessory proteins, RAMP2 and RAMP3 in bladder cancer. **Methods** Expressions of AM, RAMP2 and RAMP3 in 58 bladder cancer tissues and 25 adjacent urothelial tissues were evaluated with immunohistochemistry staining. Association between AM, RAMP2 and RAMP3 expressions and the clinicopathologic features such as grade, stage and patients' survival was analyzed. **Results** AM was widely expressed in both bladder cancer and stromal components. There was no significant difference in AM and RAMP3 expressions between adjacent urothelial tissues and bladder cancer tissues (39.6% vs. 44%, 82.8% vs. 76%, respectively). RAMP2 was overexpressed in bladder cancer tissues compared with adjacent urothelial tissues (55.2% vs. 28%). There was no association between AM and RAMP3 expressions and pathological grading, clinical stage and patients' prognosis. RAMP2 was associated with short overall survival ( $HR$  2.73, 95%  $CI$ : 1.30–5.80,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** AM in tumor microenvironment of bladder cancer was originated from both cancer cells and stromal cells. RAMP2 was overexpressed in bladder cancer and might act as a prognostic marker and key regulator of AM signaling.

**KEY WORDS:** bladder cancer; adrenomedullin; receptor activity modifying protein 2; prognosis; immunohistochemistry

**摘要:** **目的** 探讨肾上腺髓质素(AM)及其受体调节蛋白 RAMP2 和 RAMP3 在膀胱癌中的表达和意义。 **方法** 采用免疫组织化学染色检测 58 例人膀胱癌组织和 25 例癌旁尿路上皮组织中 AM、RAMP2、RAMP3 的表达,分析 AM、RAMP2、RAMP3 在膀胱癌及癌旁尿路上皮组织的表达差异以及与临床病理特征之间的关系。 **结果** AM 在膀胱癌细胞与间质细胞均有明显表达。AM 和 RAMP3 在膀胱癌组织和癌旁尿路上皮组织间表达无明显差异(39.6% vs. 44%、82.8% vs. 76%),且在癌组织中的表达与病理分级、临床分期及患者预后等无明显相关性。RAMP2 在膀胱癌组织的表达明显强于癌旁尿路上皮组织(55.2% vs. 28%)。RAMP2<sup>+</sup>的膀胱癌患者较 RAMP2<sup>-</sup>的患者具有更短的总生存期( $HR$ : 2.73, 95%  $CI$ : 1.30~5.80,  $P < 0.01$ )。 **结论** 膀胱癌微环境中的 AM 可来源于肿瘤细胞和间质细胞。RAMP2 在膀胱癌组织表达上调,是膀胱癌中 AM 下游信号的关键调节蛋白及患者预后指标。

**关键词:** 膀胱癌; 肾上腺髓质素; 受体活性调节蛋白 2; 预后; 免疫组织化学

**中图分类号:** R737.14

**文献标志码:** A

**DOI:** 10.3969/j.issn.1009-8291.2019.12.016

膀胱癌是人体泌尿系统常见恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。肾上腺髓质素(adrenomedullin, AM)是降钙素基因肽超家族成员,参与了心血管疾病、炎症和肿瘤等多种疾病的发生发展<sup>[2]</sup>。受体活性调节蛋白(receptor activity modifying protein, RAMP)2 和 RAMP3 在 AM 与其受体的结合中具有决定性的调控作用,是 AM 介导的信号传导及生物学功能的关键调节分子<sup>[2]</sup>。体外研究表明,AM 可抑制膀胱癌细胞凋亡,并促进膀胱癌细胞生长、侵袭及迁移<sup>[3-4]</sup>。然而,AM 及其下游信号关键蛋白在膀胱癌组织中的表达尚不

明确。在本研究中,我们拟通过免疫组织化学染色方法探讨 AM、RAMP2、RAMP3 在膀胱癌中的表达和意义。

### 1 材料与方法

**1.1 实验材料** AM 和 RAMP3 抗体购自 Abcam 公司(Cambridge, UK)。RAMP2 抗体购自 Santa Cruz 公司(CA, USA)。EnVision 免疫组织化学染色试剂盒购自 DAKO 公司(CA, USA)。

**1.2 膀胱癌组织标本** 人膀胱癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司(货号:HBla-Uro105Sur-01),包含 59 例膀胱移行细胞癌和 46 例癌旁尿路上皮组织。3 张组织芯片分别用于 AM、RAMP2、RAMP3

收稿日期:2019-05-06

修回日期:2019-09-19

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81872093)

通信作者:李磊,研究员,主任医师. E-mail: lilydr@163.com

作者简介:陈玉乐(1983-),男(汉族),博士,助理研究员. 研究方向:泌尿系肿瘤进展分子机制. E-mail: cylvdwyd@126.com

的免疫组织化学染色。无尿路上皮组织或癌组织、染色过程中脱片或因有效组织太小影响结果判定者均被排除。11例标本因缺乏患者生存信息而被排除于生存分析之外。最终25例尿路上皮组织和58例膀胱癌组织被用于蛋白表达分析,47例膀胱癌组织被用于生存分析。本研究所采用的膀胱癌标本的临床和病理信息见表1。

表1 58例膀胱癌临床病理资料

项目	例数(%)	项目	例数(%)
中位年龄(岁)	68.4(44~85)	性别	
临床分期		男	49(84.5)
Tis	5(5.9)	女	9(15.5)
T1	11(19.0)	病理分级	
T2	17(29.3)	G1	3(5.2)
T3	22(37.9)	G2	32(55.2)
T4	3(5.2)	G3	23(39.7)
		中位随访时间(月)	34.1(3~82)

**1.3 免疫组织化学染色及结果评估** 采用 DAKO EnVision™+ 系统进行免疫组织化学染色。组织芯片经脱蜡、水化等处理后浸入柠檬酸缓冲液,于121℃抗原修复5 min。内源性过氧化物酶阻断15 min后滴加一抗(1:150稀释),4℃孵育12 h,随后用EnVision-HRP标记的二抗室温孵育30 min,并依次进行DAB显色、苏木素染色、盐酸分化、氨水返蓝等处理。梯度酒精溶液脱水和二甲苯透明后以中性树脂封片。染色结果评估按本实验室常用的综合染色强度与阳性细胞百分比的双重评分系统进行。由1位病理科医师在不知实验目的与患者信息的情况下进行,每例组织在高倍镜下随机挑取5个高倍视野进行评分。根据染色强度将结果分为无着色、弱着色、中等着色及强着色4类,分别得0、1、2、3分;根据阳性细胞百分比将结果分为-、<25%、25%~≤50%、>50%~≤75%、>75%共5类,分别得0、1、2、3、4分。将上述2种方法得分相乘得到介于0~12分之间的总得分,将总得分≥4分的组织定义为表达阳性。

**1.4 统计学分析** 使用SPSS 18.0软件进行统计分析。采用Pearson卡方检验( $T>5$ )或Yates'连续性校正卡方检验( $T\leq 5$ )进行不同组别间蛋白表达差异分析,采用log-rank检验进行生存分析。 $P<0.05$ 时为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AM在膀胱癌组织中的表达** 通过对25例癌

旁尿路上皮组织和58例膀胱移行细胞癌组织的免疫组织化学染色,观察到AM主要定位于尿路上皮细胞和膀胱癌细胞的细胞质中(图1A,红色箭头)。根据我们的评分标准,11例(44%)尿路上皮组织和23例(39.6%)膀胱癌组织被鉴定为AM阳性。统计分析显示癌旁尿路上皮组织和膀胱癌组之间无显著差异( $P>0.05$ )。AM表达与患者年龄、性别、肿瘤分期、分级无关(表2)。生存分析显示AM<sup>+</sup>组和AM<sup>-</sup>组患者总生存期无明显差异( $HR:0.68,95\%CI:0.32\sim 1.47,P=0.34$ ,图1B)。此外,间质细胞中也有AM表达(图1A,蓝色箭头),表明间质细胞也是肿瘤微环境中AM的重要来源。

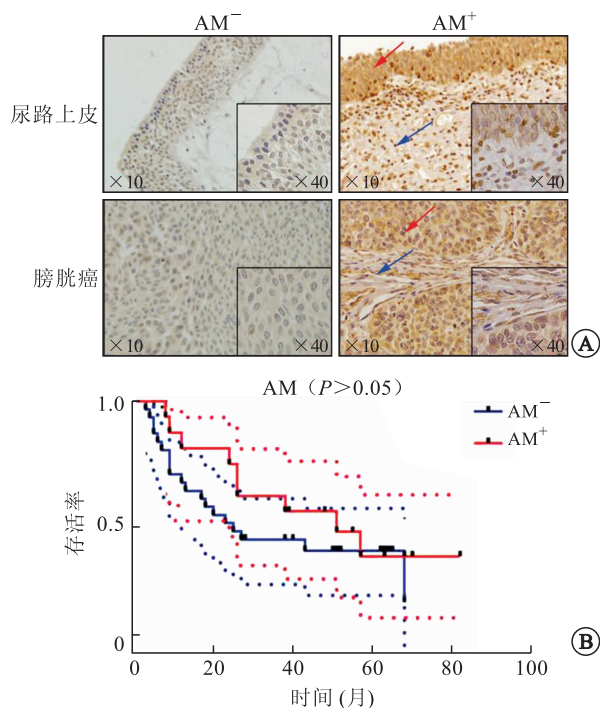


图1 AM在膀胱癌和癌旁尿路上皮组织中的表达

A:AM在膀胱癌和癌旁尿路上皮组织中的表达(红色、蓝色箭头分别示肿瘤和间质细胞中的AM表达);

B:AM<sup>+</sup>和AM<sup>-</sup>组患者总生存期比较。

**2.2 RAMP2在膀胱癌组织中的表达** 随后我们进行了RAMP2的免疫组织化学染色(图2A)。7例(28%)尿路上皮组织和32例(55.2%)膀胱癌组织被鉴定为RAMP2阳性。统计分析表明,两组间RAMP2表达具有显著性差异( $P<0.05$ )。通过对不同分级肿瘤的比较发现,3级膀胱癌具有比1~2级膀胱癌更高的RAMP2表达水平的趋势(60.9% vs. 51.4%),但差异无统计学意义(表2, $P>0.05$ )。此外,年龄<70岁的患者的RAMP2表达水平高于≥70岁的患者(表2, $P<0.05$ )。不同性别、肿瘤分期患者RAMP2表达无明显差异(表2)。与RAMP2<sup>-</sup>的患者相比,RAMP2<sup>+</sup>的患者具有更短的总生存期( $HR:$

2.73;95%CI:1.30~5.80;P<0.01,图2B)。

**2.3 RAMP3 在膀胱癌组织中的表达** 针对 RAMP3 的免疫组织化学染色(图2A)发现,19例(76%)尿路上皮组织和48例(82.8%)膀胱癌组织被鉴定为 RAMP3 阳性。统计分析表明癌旁尿路上皮

组织与膀胱癌组之间 RAMP3 表达无显著差异(P>0.05)。RAMP3 表达与患者年龄、性别及肿瘤分期、分级无关(表2)。此外,RAMP3<sup>-</sup>患者与 RAMP3<sup>+</sup>患者的总生存期也无明显差异(HR:1.36;95%CI:0.51~3.45;P>0.05,图2C)。

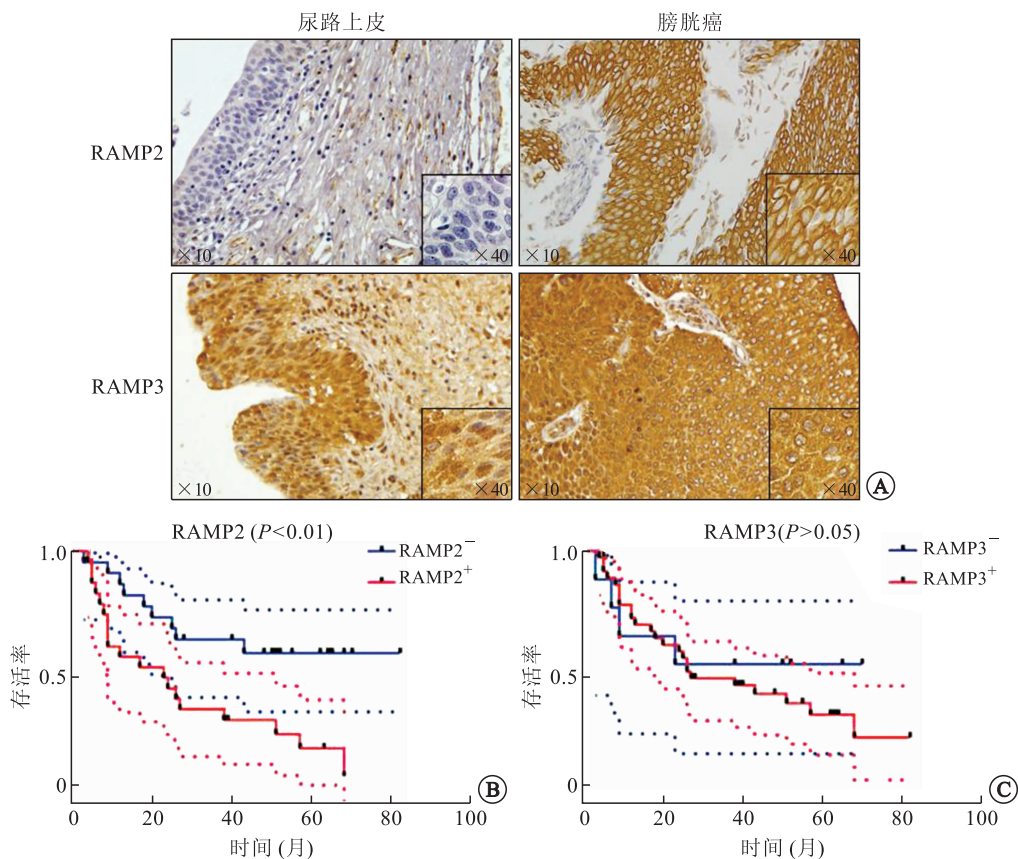


图2 RAMPs 在膀胱癌和癌旁尿路上皮组织中的表达

A:RAMP2 和 RAMP3 的表达代表图;B: RAMP2<sup>+</sup> 和 RAMP2<sup>-</sup> 组患者总生存期比较;C. RAMP3<sup>+</sup> 和 RAMP3<sup>-</sup> 组患者总生存期比较。

表2 AM、RAMP2 和 RAMP3 在膀胱癌的表达与临床病理特征的关系

[例(%)]

项目	AM		RAMP2				RAMP3					
	-	+	χ <sup>2</sup> 值	P 值	-	+	χ <sup>2</sup> 值	P 值	-	+	χ <sup>2</sup> 值	P 值
病理分级			0.004	0.947			0.5	0.479			0.54	0.462
G1~2	21(36.2)	14(24.1)			17(29.3)	18(31.0)			5(8.6)	30(51.7)		
G3	14(24.1)	9(15.5)			9(15.5)	14(24.1)			5(8.6)	18(31.0)		
临床分期			1.114	0.573			0.049	0.976			0.387	0.824
Tis~T1	9(15.5)	7(12.1)			7(12.1)	9(15.5)			2(3.4)	14(24.1)		
T2	9(15.5)	8(13.8)			8(13.8)	9(15.5)			3(5.2)	14(24.1)		
T3~T4	17(29.3)	8(13.8)			11(19.0)	14(24.1)			5(8.6)	20(34.5)		
性别			<0.001	1			0.001	0.980			0.002	0.960
男	30(51.7)	19(32.7)			22(37.9)	27(46.6)			9(15.5)	40(69.0)		
女	5(8.6)	4(6.9)			4(6.9)	5(8.6)			1(1.7)	8(13.8)		
年龄(岁)			9.2	0.002			4.462	0.035			<0.001	1
<70	16(27.6)	13(22.4)			9(15.5)	20(34.5)			5(8.6)	24(41.4)		
≥70	19(32.8)	10(17.2)			17(29.3)	12(20.7)			5(8.6)	24(41.4)		

### 3 讨论

AM是一种具有舒张血管、降低血压等多重活性的分泌性蛋白,因最初是从人肾上腺嗜铬细胞瘤中分离出来而得名<sup>[5]</sup>。肿瘤微环境中AM的来源及调控复杂多变。一方面,肿瘤细胞在发生发展过程中可获得较高的AM表达水平<sup>[6]</sup>;另一方面,多种间质细胞成分如血管内皮细胞、肥大细胞、巨噬细胞和成纤维细胞等均可产生AM<sup>[7]</sup>。此外,缺氧等条件也进一步诱导肿瘤细胞表达AM<sup>[8]</sup>。AM介导的bcl-2上调对于缺氧条件下骨肉瘤细胞的存活至关重要<sup>[9]</sup>。我们最近的研究表明,肾癌细胞产生的AM可通过肥大细胞促进血管形成<sup>[10]</sup>。有学者通过实时定量聚合酶链反应及Western blot实验初步检测了AM在人膀胱癌及癌旁正常组织的表达水平,发现AM在膀胱癌的表达高于癌旁组织,并与肿瘤分期正相关。在体外培养的膀胱癌细胞系,AM可被缺氧条件诱导表达,沉默AM表达可促进细胞凋亡并抑制肿瘤生长<sup>[4]</sup>。另一项研究表明,AM可促进膀胱癌和前列腺癌细胞的侵袭和迁移<sup>[3]</sup>。本研究中,我们通过免疫组织化学染色检测了AM在膀胱癌及癌旁尿路上皮组织的表达,相对于实时定量聚合酶链反应及Western blot,免疫组织化学染色可更直观地检测蛋白在组织及细胞的定位情况。与前人研究不同的是,我们并未发现AM在膀胱癌和尿路上皮组织之间的表达差异,亦未观察到AM与肿瘤分期有关。我们在膀胱癌细胞及膀胱癌间质细胞中均观察到AM表达,表明膀胱癌组织中AM来源的复杂性,也提示AM可能是膀胱癌细胞和间质细胞之间“对话”的重要介质。

降钙素受体样受体(calcitonin-receptor-like receptor,CRLR)隶属G蛋白偶联受体,是AM的主要受体<sup>[7]</sup>。CRLR与AM的结合受RAMPs调控。当CRLR与RAMP1结合时,形成降钙素受体而与降钙素结合。当CRLR与RAMP2或RAMP3结合时,形成AM受体,与AM结合并介导其生物学功能。因此,RAMPs可决定AM与CRLR的亲合力,是AM下游信号的重要调节蛋白<sup>[2]</sup>。研究表明,AM可通过CRLR/RAMP2、CRLR/RAMP3实现对血管内皮细胞增殖、迁移、分化和凋亡的调控。

然而,RAMP2与RAMP3的功能并不完全相同。CRLR/RAMP2只能被AM激活,而CRLR/RAMP3对AM和intermedin(也称为AM2)具有相同的亲合力,因而可以被这两种配体激活<sup>[2]</sup>。动物实验显示AM或RAMP2敲除小鼠由于血管异常而在子宫内死亡,但RAMP3敲除小鼠正常出生,且未被发现

明显异常,表明CRLR/RAMP2和CRLR/RAMP3具有不同的功能<sup>[5]</sup>。在本研究中,我们发现与尿路上皮组织相比,RAMP2在膀胱癌组织中上调,并且与不良预后相关。然而,尿路上皮组织和膀胱癌组织都具有较强的RAMP3表达,且膀胱癌中的RAMP3表达对患者的存活无明显影响。由于RAMP2与CRLR形成特异性AM受体,因此我们推测RAMP2可能是膀胱癌中AM信号的下游关键调节蛋白。

综上所述,在本研究中我们发现AM广泛表达于膀胱癌细胞及膀胱癌间质细胞,表明肿瘤细胞和间质细胞均是膀胱癌微环境中AM的来源。RAMP2在膀胱癌组织高表达并与患者不良预后有关,提示RAMP2是膀胱癌中AM信号的关键调节蛋白,并可能参与了膀胱癌进展。后续研究将进一步通过体外实验和动物模型等来明确AM/CRLR/RAMP2信号在膀胱癌进展中的详细作用及分子机制。

#### 参考文献:

- [1] MARTINEZ RODRIGUEZ RH, BUISAN RUEDA O, IBARZ L. Bladder cancer: Present and future[J]. *Med Clin*, 2017, 149 (10): 449-455.
- [2] SCHONAUER R, S ELS HEINDLA G BECK SICKINGER. Adrenomedullin-new perspectives of a potent peptide hormone[J]. *J Pep Sci*, 2017, 23 (7/8): 472-485.
- [3] OULIDI A, BOKHOBZA A, GKIKI D, et al. TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of prostate and urothelial cancer cell adhesion, migration and invasion[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e64885.
- [4] LIU AG, ZHANG XZ, LI FB, et al. RNA interference targeting adrenomedullin induces apoptosis and reduces the growth of human bladder urothelial cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2013, 30 (3): 616-624.
- [5] YAMAUCHI A, SAKURAI T, KAMIYOSHI A, et al. Functional differentiation of RAMP2 and RAMP3 in their regulation of the vascular system[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 77: 73-85.
- [6] LI M, LI HONG, LIAO M, et al. Expression and clinical significance of focal adhesion kinase and adrenomedullin in epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10 (2): 1003-1007.
- [7] LARRAYOZ IM, MARTINEZ-HERRERO S, GARCIA-SANMARTIN J, et al. Adrenomedullin and tumour microenvironment[J]. *J Translat Med*, 2014: 12339-12354.
- [8] MASOUD G NW LL. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy[J]. *Acta pharm Sin B*, 2015, 5 (5): 378-389.
- [9] WU XY, HAO CP, LING M, et al. Hypoxia-induced apoptosis is blocked by adrenomedullin via upregulation of Bcl-2 in human osteosarcoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(2): 787-794.
- [10] CHEN Y, LI C, XIE H, et al. Infiltrating mast cells promote renal cell carcinoma angiogenesis by modulating PI3K → AKT → GSK3beta → AM signaling[J]. *Oncogene*, 2017, 36 (20): 2879-2888.

(编辑 何宏灵)