

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

膀胱癌组织中色素上皮衍生因子与雄激素受体的表达及其相关性

蒋华, 卜强, 吴爱斌, 曾明辉, 秦锁炳, 夏东东

引用本文:

蒋华, 卜强, 吴爱斌, 等. 膀胱癌组织中色素上皮衍生因子与雄激素受体的表达及其相关性[J]. 肿瘤防治研究, 2019, 46(10): 921-925.

JIANG Hua, BU Qiang, WU Aibin, et al. Expression and Correlation of Pigment Epithelium-derived Factor and Androgen Receptor in Bladder Cancer Tissues[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2019, 46(10): 921-925.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.19.0132>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[Integrin \$\beta\$ 1和CARMA-3蛋白在膀胱癌组织中的表达与经尿道膀胱肿瘤电切术后复发的相关性](#)

Relationship of Integrin β 1 and CARMA-3 Protein Expressions with Recurrence of Bladder Cancer After Transurethral Resection of Bladder Tumor

肿瘤防治研究. 2019, 46(3): 239-242 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1182>

[FoxO3基因与膀胱癌临床病理特征及预后的相关性](#)

Correlation of FoxO3 Gene with Clinicopathological Features and Prognosis of Bladder Cancer Patients

肿瘤防治研究. 2019, 46(1): 58-62 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.0806>

[神经生长因子及受体与早期宫颈癌嗜神经侵袭的相关性](#)

Correlation of Nerve Growth Factor and Its Receptors Expression with Perineural Invasion in Early-stage Cervical Cancer

肿瘤防治研究. 2018, 45(10): 781-785 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0216>

[胰岛素受体酪氨酸激酶底物p53蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及其对患者预后的影响](#)

Expression of IRSp53 in Epithelial Ovarian Carcinoma and Its Prognostic Significance

肿瘤防治研究. 2017, 44(4): 272-275 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.04.007>

[维生素C联合三氧化二砷对膀胱癌T-24细胞株的作用](#)

Combined Application of Vitamin C and Arsenic Trioxide in Inhibiting Bladder Cancer Cell Lines T-24 in vitro

肿瘤防治研究. 2017, 44(2): 103-107 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.02.005>



杂志官网



微信公众号

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2019.19.0132

• 临床研究 •

膀胱癌组织中色素上皮衍生因子与雄激素受体的表达及其相关性

蒋华, 卜强, 吴爱斌, 曾明辉, 秦锁炳, 夏东东

Expression and Correlation of Pigment Epithelium-derived Factor and Androgen Receptor in Bladder Cancer Tissues

JIANG Hua, BU Qiang, WU Aibin, ZENG Minghui, QIN Suobing, XIA Dongdong

Department of Urology, People's Hospital of Danyang, Danyang 212300, China

Abstract: Objective To investigate the expression and correlation of pigment epithelium derived factor (PEDF) and androgen receptor (AR) in bladder cancer tissues. **Methods** The expression of PEDF and AR in 30 cases of bladder cancer tissues were detected by immunohistochemical staining. The relation between PEDF expression and AR was analyzed by Pearson correlation. We detected the expression levels of PEDF and AR in bladder cancer TCCSUP cell line and the expression of PEDF after lentivirus-mediated AR interference by Real-time PCR and Western blot. **Results** PEDF expression was negatively correlated with AR expression ($P=0.003$). Androgen could significantly upregulate AR expression and inhibit PEDF expression. At the same time, interfering AR expression could upregulate the expression of PEDF. **Conclusion** The expression of PEDF may be inhibited by AR expression in bladder cancer tissues.

Key words: Bladder cancer; Pigment epithelium derived factor; Androgen receptor; Correlation

摘要: 目的 探讨膀胱癌组织中色素上皮衍生因子 (PEDF) 与雄激素受体 (AR) 的表达及其相关性。**方法** 采用免疫组织化学染色检测30例膀胱癌组织中PEDF和AR表达, 采用Pearson相关性分析PEDF表达与AR之间的关系。Real-time PCR和Western blot检测在不同浓度的雄激素处理下, 膀胱癌TCCSUP细胞株中PEDF和AR的表达水平以及慢病毒介导的AR干扰后, 细胞株中PEDF的表达水平。**结果** 相关性分析表明PEDF表达与AR表达呈负相关 ($P=0.003$)。雄激素处理后上调AR表达, 抑制PEDF表达。同时, 干扰AR的表达可以上调PEDF表达。**结论** 膀胱癌组织中PEDF的表达可能受到AR表达所抑制。

关键词: 膀胱癌; 色素上皮衍生因子; 雄激素受体; 相关性

中图分类号: R737.2

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 中国膀胱癌的发病率虽然低于欧美国家, 但是呈逐年增长的趋势^[1]。目前膀胱癌的治疗以手术切除为主, 辅以化疗和免疫治疗等措施, 但膀胱癌治疗后易复发, 有报道复发率高达80%, 其中大约16%~25%复发的肿瘤其恶性程度增加, 有10%发展为浸润性或转移性癌, 预后较差^[2]。膀胱癌的发病率呈现明显性别差异, 男性发病率是女性的3倍以上^[3]。研究发现, 性激素可能与这种性别差异有关, 雄激素介导的信号通路可能参与了膀胱癌

发生、发展, 然而具体的作用机制还不清楚^[4]。

雄激素受体 (androgen receptor, AR) 作为雄激素发挥作用的重要靶点, 一直受到人们的关注。在没有激素作用下, AR存在于胞质中; 而在与雄激素结合后, AR构象发生转变, 被激活后转移到细胞核内, 进而促进靶基因的转录翻译^[5-6]。有研究表明, 在大多数膀胱癌患者中AR表达增高, 而且相比于AR阴性患者, AR阳性患者有更高的复发率、转移率, 这说明AR可能作为膀胱癌的预后因素^[7-8]。Izumi等^[9]研究表明雄激素剥夺治疗可以显著降低膀胱癌复发的风险, 但是对于AR信号调节膀胱癌发生、发展的作用机制现在还不清楚。

色素上皮衍生因子 (pigment epithelium derived factor, PEDF) 是一种重要的内源性血管形成抑制因子, 对肿瘤有抑制作用^[10]。研究表明, PEDF可在正常组织中表达, 抑制内源性血管形成, 而在

收稿日期: 2019-02-11; 修回日期: 2019-05-22

基金项目: 镇江市卫生科技重点专项 (SHW2016020)

作者单位: 212300 丹阳, 丹阳市人民医院泌尿外科

作者简介: 蒋华 (1972-), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事泌尿系肿瘤微创治疗的研究

多种肿瘤组织中PEDF表达下调，导致肿瘤组织中血管生成增加，促进了肿瘤发生发展^[11-12]。研究表明在前列腺癌中PEDF表达受到雄激素的抑制^[13]，这说明AR可能会调控PEDF表达。

本文通过研究膀胱癌中PEDF与AR的表达变化及其之间的调控关系，为阐明性激素和膀胱癌的关系提供依据，同时也为膀胱癌的预防和治疗开辟新的途径。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集2016年2月—2018年12月江苏省丹阳市人民医院膀胱癌手术取得的石蜡包埋标本30例，病理证实均为膀胱尿路上皮癌。患者年龄51~78岁，平均年龄65岁。其中男19例，女11例。Ta~T1：12例，T2~T3：18例。病例纳入标准：依据WHO肿瘤分类诊断明确，且病历及随访资料完整者。排除标准：无明确病理诊断及病历及随访资料不完全者。所有入选者事前均告知并签署知情同意书，研究方案获得江苏省丹阳市人民医院伦理委员会的批准（批准号：20160841）。

1.2 材料及主要试剂

人膀胱癌细胞TCCSUP购自中国科学院细胞库，RPMI 1640培养基购自美国Hyclone公司，胎牛血清购自美国Gibco公司，PEDF抗体、AR抗体和GAPDH抗体均购自英国Abcam公司，免疫组织化学试剂盒购自南京建成公司，反转录酶购自美国Promega公司，LipofectamineTM 2000和定量PCR试剂盒购自美国ThermoFisher公司，雄激素二氢睾酮（dihydrotestosterone, DHT）购自美国Sigma公司，AR干扰慢病毒载体（Lv-AR shRNA）和对照载体（Lv-NC）购自美国Santa Cruz公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人膀胱癌细胞TCCSUP培养于含10%胎牛血清（FBS）和1%双抗（青-链霉素）的MEM-EBSS培养液中，并置于37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养24 h。然后用不同浓度的DHT（0、1、10、100 nmol/L）处理细胞，参照LipofectamineTM 2000转染试剂说明书对细胞进行转染：空白对照组：不做任何转染（Control）、阴性对照组：转染Lv-NC慢病毒载体（Lv-NC），转染组：转染Lv-AR shRNA慢病毒载体（AR shRNA）。

1.3.2 免疫组织化学和评分 免疫组织化学染色严格按照试剂盒操作说明进行，PEDF抗体稀释比例为1:100，AR抗体稀释比例为1:50。染色结果由

2位经验丰富的病理医师进行双盲阅片。PEDF阳性表达为细胞质呈现棕黄色颗粒，AR阳性表达为细胞核呈现棕黄色颗粒；采用半定量结果判断，分别对镜下阳性细胞的百分比和染色强度给予评分。阳性着色细胞数：每张切片上观察5个高倍视野（×200），计数阳性细胞百分比，阳性细胞数<5%为0分，5%~25%为1分，>25%~50%为2分，>50%~75%为3分，>75%~100%为4分。阳性着色强度：无色为0分，淡黄色为1分，棕黄色为2分，棕褐色为3分。两者计分相乘即为最终评分。

1.3.3 Real-time PCR检测PEDF和AR的mRNA表达 收集转染后48 h的细胞，利用TRIzol试剂从不同实验组细胞系中提取总RNA，根据反转录试剂盒说明书将RNA（1 μg）反转录成cDNA。根据NCBI数据库设计基因PEDF和AR的定量引物，引物序列见表1。以GAPDH基因作为内参，利用SYBR Green实时定量PCR染料法对相关基因的表达进行分析。按照2^{-ΔΔCT}法计算和分析各基因的表达水平。反应体积为25 μl，反应条件：94℃ 2 min；94℃ 1 min，56℃ 1 min，72℃ 1 min，40个循环；72℃ 5 min延伸。每个样品取样3次，每次设置3个重复。实验重复3次。

表1 PCR引物序列

Table1 PCR primer sequence

Primer	Sequence
PEDF	Forward: 5'-TTCAAAGTCCCCGTGAACAAG-3' Reverse: 5'-GAGAGCCCGGTGAATGATGG-3'
AR	Forward: 5'-CCAGGGACCATGTTTTGCC-3' Reverse: 5'-CGAAGACGACAAGATGGACAA-3'
GAPDH	Forward: 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' Reverse: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

1.3.4 Western blot法检测PEDF和AR的表达水平 RIPA蛋白裂解液（含1×蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂）冰上裂解细胞10 min，然后12 000 r/min、4℃离心10 min，将上清液转移至新的EP管中，用BCA法检测蛋白浓度，加入等体积的上样缓冲液，100℃煮沸10 min，取等量蛋白（40 μg）上样，SDS-PAGE进行蛋白电泳。待蛋白完全分离后，将蛋白转移至PVDF膜，将PVDF膜置于含5%脱脂奶粉的TBST（20 mmol/L Tris-HCl，150 mmol/L NaCl和0.1% Tween 20）中室温封闭1 h，然后在封闭液稀释的PEDF和AR一抗（1:1 000）、GAPDH一抗（1:5 000）中4℃孵育过夜，之后用TBST清洗10 min×3次，在封闭液稀释的二抗（1:5 000）中室温孵育1 h，TBST清洗15 min×3次后与ECL反应1 min，用Bio-Rad公司的ChemiDocTM XRX⁺成像系统获取

图像。实验重复3次。

1.3.5 慢病毒转染 将(3~5)×10⁴个/毫升细胞种在12孔板,加入1 ml培养液,培养24 h,病毒感染时50%汇合。然后弃去12孔板中的培养基,每孔加入1 ml凝聚胺溶液(5 μg/ml),每孔加入20 μl病毒液(目的病毒及GFP对照病毒各5孔);孵育过夜;弃去含病毒的培养基,加入1 ml常规培养液,利用Olympus荧光显微镜检测荧光表达来评价转染效率。

1.4 统计学方法

所有数据采用SPSS19.0统计软件进行处理。两样本相关性分析采用Pearson相关分析,两组间数据比较采用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 膀胱癌组织中PEDF和AR表达呈负相关

利用免疫组织化学检测膀胱癌组织中PEDF和AR的表达,见图1,统计30例膀胱癌组织PEDF和AR表达评分,Pearson相关性分析表明膀胱癌组织中PEDF表达与AR表达呈负相关($r=-0.6569$; $P=0.003$),见图2。

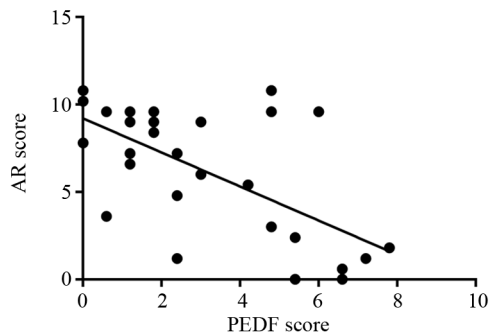


图2 膀胱癌组织中PEDF和AR表达的相关性
Figure2 Correlation between PEDF and AR expression in bladder cancer tissues

2.2 DHT处理对人膀胱癌细胞中PEDF表达的影响

不同浓度的DHT处理人膀胱癌细胞TCCSUP, Real-time PCR结果显示AR mRNA表达水平随着DHT处理浓度的增加而增加,见图3A,同时

Western blot结果也显示AR蛋白水平与基因表达水平变化趋势一致,随着DHT处理浓度的增加,AR蛋白水平也增加,见图3B。上述结果表明DHT处理细胞后可上调AR的表达。同时,Real-time PCR结果显示PEDF mRNA表达水平随着DHT处理浓度的增加而减少,见图3C,Western blot结果表明随着DHT处理浓度增加,PEDF蛋白水平减少,见图3D,这表明DHT处理细胞后下调了PEDF的表达。同时相关性分析表明经过DHT处理后的膀胱癌TCCSUP细胞中PEDF和AR表达水平也呈负相关($r=-0.958$, $P=0.042$)。

2.3 建立稳定沉默AR的膀胱癌细胞株

Real-time PCR结果显示:与Control组相比,转染组(AR shRNA)中AR mRNA表达量下降了63.1%,见图4A;Western blot结果显示,与Control组相比,转染组(AR shRNA)中AR蛋白水平下降了81.5%,见图4B。以上结果表明,AR沉默的膀胱癌细胞株构建成功,可用于下一步实验研究。

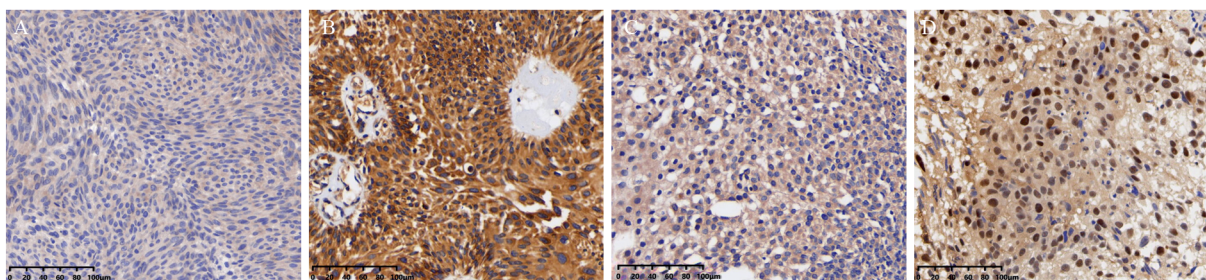
2.4 沉默人膀胱癌细胞中AR表达可以上调PEDF表达

结果发现:转染组(AR shRNA)中PEDF mRNA表达量是Control组的2倍,见图5A,Western blot结果表明转染组(AR shRNA)中PEDF蛋白水平是Control组的2.4倍,见图5B。以上结果表明膀胱癌细胞系中PEDF表达受到AR信号的抑制。

3 讨论

膀胱癌发病率呈现明显性别差异,男性发病率显著高于女性^[2]。雄激素参与了膀胱癌的发生、发展,有研究报道雄激素可能是男性膀胱癌发病率高于女性的原因^[4],但是对于雄激素如何调控膀胱癌的发生发展还需要进一步研究,清楚阐述调控机制,将为膀胱癌的预防和治疗开辟新的途径。

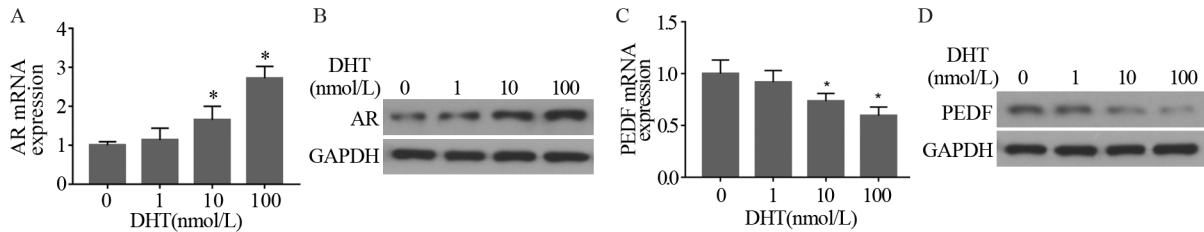
PEDF作为丝氨酸蛋白酶抑制因子超基因家族serpin成员,属于分泌型糖蛋白,具有高度保守的序



Low(A) and high(B) expression of PEDF in nucleus; low(C) and high(D) expression of AR in nucleus

图1 免疫组织化学检测膀胱癌组织中PEDF和AR的表达(比例尺: 50 μm)

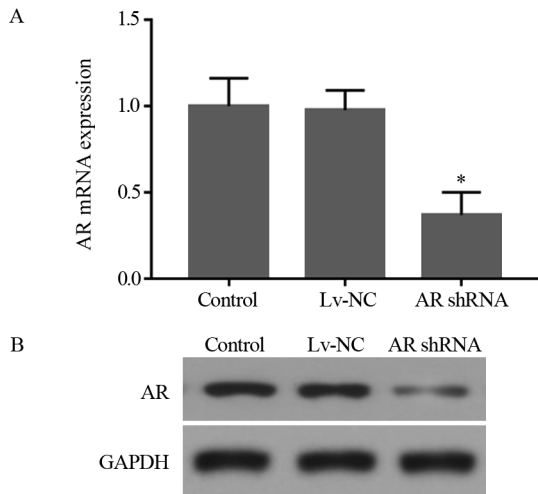
Figure1 Expression of PEDF and AR in bladder cancer tissues detected by immunohistochemistry (scale: 50 μm)



*: $P < 0.05$, compared with 0 nmol/L DHT group; DHT: dihydrotestosterone

图3 不同浓度DHT处理后AR和PEDF的表达情况

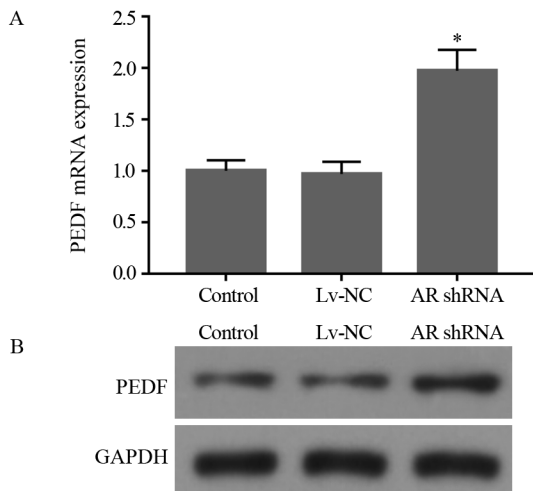
Figure3 Expression of AR(A,B) and PEDF(C,D) after different concentration of DHT treatment detected by Real-time PCR and Western blot



DHT: dihydrotestosterone; *: $P < 0.05$, compared with Control group

图4 转染AR shRNA后膀胱癌细胞株中AR的表达情况

Figure4 AR expression in TCCSUP cells transfected with AR shRNA detected by Real-time PCR(A) and Western blot (B)



*: $P < 0.05$, compared with Control group

图5 沉默AR后对PEDF表达的影响

Figure5 PEDF expression after AR shRNA treatment detected by Real-time PCR(A) and Western blot(B)

列, 相对分子质量为50 kDa, 是一种重要的内源性血管形成抑制因子^[14], 在胰腺癌^[13]、前列腺癌^[15]等的研究中表明过表达PEDF可以抑制肿瘤新生血管生

成, 抑制肿瘤生长。这些结果显示其在抗肿瘤方面有十分重要的作用。Ek等^[16]研究也发现PEDF可以减少骨肉瘤细胞UMR 106-01和SAOS-2的侵袭, 抑制骨肉瘤的肺转移, 抑制肿瘤发展。尽管PEDF在多种肿瘤中的作用已被揭示, 但是PEDF与膀胱癌的关系鲜有报道。Doll等^[17]在前列腺癌中的研究表明雄激素可以抑制PEDF的表达, 而雄激素剥夺则恢复了PEDF的水平, 抑制肿瘤生长和转移, 因此PEDF表达可能受到雄激素的影响。为了分析PEDF表达与AR表达之间关系, 我们利用免疫组织化学检测膀胱癌组织中PEDF和AR的表达, 统计30例膀胱癌组织PEDF和AR表达评分, 结果表明膀胱癌组织中PEDF表达与AR表达呈负相关。

有诸多研究表明, 雄激素阻断可以降低AR水平, 减少化学药物诱导的膀胱癌发生, 并且抑制肿瘤细胞生长和转移^[18-20], 同时Izumi等^[9]的研究也表明雄激素剥夺治疗可以显著降低膀胱癌复发, 提高膀胱癌患者的生存期。但是雄激素是否影响PEDF参与膀胱癌发生发展过程, 还不清楚。为了研究雄激素与PEDF之间关系, 本实验用不同浓度的DHT处理人膀胱癌细胞TCCSUP后, 发现随DHT处理浓度增加, AR表达增加, PEDF表达减少, 相关性分析表明PEDF和AR的表达水平呈负相关, 结果表明DHT处理人膀胱癌细胞后会显著上调AR表达, 下调PEDF表达。进一步利用慢病毒介导干扰AR表达, 结果发现PEDF表达水平上调, 这表明膀胱癌中PEDF表达可能受到AR信号的抑制。但是在膀胱癌中AR信号如何调控PEDF表达还需要进一步研究。

总之, 本文通过研究PEDF与AR的表达变化及其关系, 为阐明性激素和膀胱癌的关系提供依据, 改善患者的治疗方案, 同时也为膀胱肿瘤的预防和治疗开辟新途径。

参考文献:

[1] Wang Y, Chang Q, Li Y. Racial differences in urinary bladder cancer in the United States[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 12521.

- [2] Siegel R, Ward E, Brawley O, *et al.* Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 212-236.
- [3] Mashhadi R, Pourmand G, Kosari F, *et al.* Role of steroid hormone receptors in formation and progression of bladder carcinoma: a case-control study[J]. *Urol J*, 2014, 11(6): 1968-1973.
- [4] Moschini M, Zaffuto E, Karakiewicz P, *et al.* The effect of androgen deprivation treatment on subsequent risk of bladder cancer diagnosis in male patients treated for prostate cancer[J]. *World J Urol*, 2019, 37(6): 1127-1135.
- [5] Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, *et al.* Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2015, 12(1): 26-36.
- [6] Tsui KH, Chang YL, Feng TH, *et al.* Capillarisin blocks prostate-specific antigen expression on activation of androgen receptor in prostate carcinoma cells[J]. *Prostate*, 2018, 78(4): 242-249.
- [7] Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen receptor signaling in bladder cancer[J]. *Cancers(Basel)*, 2017, 9(2). Pii: E20.
- [8] Miyamoto H, Yang Z, Chen YT, *et al.* Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(7): 558-568.
- [9] Izumi K, Taguri M, Miyamoto H, *et al.* Androgen deprivation therapy prevents bladder cancer recurrence[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(24): 12665-12674.
- [10] Zhu L, Xie J, Liu Z, *et al.* Pigment epithelium-derived factor/vascular endothelial growth factor ratio plays a crucial role in the spontaneous regression of infant hemangioma and in the therapeutic effect of propranolol[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(6): 1981-1994.
- [11] Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4): 258-271.
- [12] Harries RL, Owen S, Ruge F, *et al.* Impact of pigment epithelium-derived factor on colorectal cancer in vitro and in vivo[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(27): 19192-19202.
- [13] Rivera-Pérez J, Monter-Vera MDR, Barrientos-Alvarado C, *et al.* Evaluation of VEGF and PEDF in prostate cancer: A preliminary study in serum and biopsies[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1): 1072-1078.
- [14] Stevens AR, Ahmed U, Vigneswara V, *et al.* Pigment epithelium-derived factor promotes axon regeneration and functional recovery after spinal cord injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2019. [Epub ahead of print]
- [15] Filleur S, Volz K, Nelius T, *et al.* Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 5144-5152.
- [16] Ek ETH, Dass CR, Contreras KG, *et al.* Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis[J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(7): 616-626.
- [17] Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, *et al.* Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas[J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 774-780.
- [18] Tyagi A, Chandrasekaran B, Kolluru V, *et al.* Combination of androgen receptor inhibitor and cisplatin, an effective treatment strategy for urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Urol Oncol*, 2019, 37(7): 492-502.
- [19] Gheewala T, Skwor T, Munirathinam G. Photodynamic therapy using pheophorbide and 670nm LEDs exhibits anti-cancer effects in-vitro in androgen dependent prostate cancer[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2018, 21: 130-137.
- [20] Xiong Y, Wang L, Li Y, *et al.* The long non-coding RNA XIST interacted with MiR-124 to modulate bladder cancer growth, invasion and migration by targeting androgen receptor (AR)[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 405-418.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]

作者贡献:

蒋 华: 设计实验、论文撰写

卜强、吴爱斌: 临床样本收集及实验实施

曾明辉、秦锁炳: 细胞实验实施

夏东东: 数据统计分析