

# VEGF、PCNA、p53及Survivin 与膀胱移行细胞癌病理分级、临床分期的关系研究

熊涛,唐顺利,李凯,孙刚,张楚龙,朱晓霜,周庆文

(广东医科大学附属中山医院/中山市陈星海医院泌尿外科,广东 中山 528415)

**【摘要】** 目的 探讨膀胱移行细胞癌(BTCC)组织中血管内皮生长因子(VEGF)、增殖细胞核抗原(PCNA)、p53基因及Survivin的阳性表达率,分析其与癌组织的病理分级和临床分期的相关性。**方法** 选择2015年1月至2017年5月经广东医科大学附属中山医院泌尿外科手术切除并经病理证实的BTCC组织石蜡标本67例(BTCC组)和正常膀胱黏膜组织标本17例(正常膀胱组),采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法检测其VEGF、PCNA、p53及Survivin表达,比较BTCC与正常膀胱组织、不同病理分级及不同临床分期BTCC组织中各检测指标的阳性表达差异。**结果** VEGF、PCNA、p53及Survivin在正常膀胱组中的阳性表达率均为0,在BTCC组中的阳性表达率依次为67.16%、68.66%、53.73%及74.63%,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );VEGF、PCNA、p53及Survivin在G1组中的阳性表达率依次为30.00%、25.00%、30.00%及55.00%,在G2组中的阳性表达率依次为73.33%、80.00%、53.33%及76.67%,在G3组中的阳性表达率依次为100.00%、100.00%、82.35%及94.12%,不同病理分级组之间比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ );VEGF、PCNA、p53及Survivin在Tis~T1组中的阳性表达率依次为55.10%、57.14%、40.82%及67.35%,均低于T2~T4组的100.00%、100.00%、88.89%及94.44%,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** VEGF、PCNA、p53及Survivin在正常膀胱黏膜组织中无阳性表达,在BTCC组织中的阳性表达率与病理分级、临床分期有关。

**【关键词】** 膀胱移行细胞癌;血管内皮生长因子;增殖细胞核抗原;p53基因;Survivin基因

**【中图分类号】** R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2018)03—0342—04

**Relationship between VEGF, PCNA, p53, Survivin and pathological grading, clinical staging of bladder transitional cell carcinoma.** XIONG Tao, TANG Shun-li, LI Kai, SUN Gang, ZHANG Chu-long, ZHU Xiao-shuang, ZHOU Qing-wen. Department of Urology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Guangdong Medical University/Chenxinghai Hospital of Zhongshan, Zhongshan 528415, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To explore the positive expression rate of the vascular endothelial growth factor (VEGF), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53 gene and Survivin gene in bladder transitional cell carcinoma (BTCC), and analyzed their relationship with the pathological grading and clinical staging of cancerous tissue. **Methods** A total of 67 BTCC paraffin tissue samples (BTCC group) and 17 normal bladder paraffin tissue samples (normal bladder group) were resected and pathologically confirmed in Department of Urology, the Affiliated Zhongshan Hospital of Guangdong Medical University from January 2015 to May 2017. Immunohistochemical streptavidin-peroxidase (SP) method was used to detect the expression of VEGF, PCNA, p53 and Survivin. The difference of positive expression of each tested index between normal bladder group and BTCC group of different pathological grading and clinical staging were compared. **Results** The positive expression rates of VEGF, PCNA, p53 and Survivin were all 0 in normal bladder group, versus 67.16%, 68.66%, 53.73%, 74.63% in BTCC group, respectively ( $P<0.05$ ). The positive expression rates of VEGF, PCNA, p53 and Survivin were 30.00%, 25.00%, 30.00%, 55.00% in group G1 respectively, 73.33%, 80.00%, 53.33%, 73.33% in group G2 and 100.00%, 100.00%, 82.35%, 94.12% in group G3, with statistically significant difference between each two groups ( $P<0.05$ ). The positive expression rates of VEGF, PCNA, p53, Survivin were 55.10%, 57.14%, 40.82%, 67.35% in group Tis~T1 respectively, which were significantly lower than 100.00%,

通讯作者:熊涛。E-mail:gbodzy@163.com

\*\*\*\*\*

[14] 孙云钢, 欧阳伟, 冯会娟, 等. 甲状腺乳头状癌患者术后碘摄入量与<sup>131</sup>I清除残余甲状腺组织疗效关系分析[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2015, 35(4): 268-271.

[15] Lukas J, Hitnausova B, Jiskra J, et al. Tumor aggressiveness risk factors in the differentiated thyroid carcinoma [J]. Bratisl Lek Listy, 2016, 117(2): 91-93.

[16] Roy R, Kouniavsky G, Schneider E, et al. Predictive factors of malignancy in pediatric thyroid nodules [J]. Surgery, 2011, 150 (6): 1228-1233.

[17] 傅宏亮, 王辉, 吴靖川, 等. 影响分化型甲状腺癌术后<sup>131</sup>I清甲治疗疗效的因素分析[J]. 中华核医学杂志, 2009, 29(3): 149-152.

[18] 瞿源, 黄蓁, 董萍, 等. 低剂量和高剂量<sup>131</sup>I治疗中低危分化型甲状腺癌的随机对照研究[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2016, 36(5): 384-388.

[19] 廖宁, 张玲丽, 毛树悻, 等. 分化型甲状腺癌手术后首次<sup>131</sup>I清除残余甲状腺组织的疗效及影响因素分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(5): 422-423, 427.

[20] 马晓君, 吴丽娜, 刘飞, 等. 分化型甲状腺癌患者术后放射性<sup>131</sup>I治疗效果的影响因素分析[J]. 实用癌症杂志, 2016, 31(9): 1528-1530.

(收稿日期:2017-06-26)

100.00%, 88.89%, 94.44% in group T2-T4 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** VEGF, PCNA, p53 and Survivin show no positive expression in normal bladder mucous membrane tissue, while their positive expression rate in BTCC tissue were associated with pathological grading and clinical staging.

**【Key words】** Bladder transitional cell carcinoma; Vascular endothelial growth factor; Proliferating cell nuclear antigen; p53 gene; Survivin gene

膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)是由遗传易感性、吸烟及感染等多种危险因素引起的泌尿系统肿瘤,临床上较为常见,发病率居我国泌尿生殖系统肿瘤的首位,具有多发性及高复发性的生物学特点<sup>[1]</sup>。癌基因的激活或抑癌基因、凋亡基因的失活是肿瘤发生发展的内在原因,恶性肿瘤的发生与发展与细胞凋亡及增殖调节失控密切相关<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种对内皮细胞增生具有强烈刺激作用的血管内皮分裂原,可诱导血管增生<sup>[3]</sup>。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种相对分子质量为  $36 \times 10^3$  的酸性核蛋白,可反映细胞的增殖活性<sup>[4]</sup>。p53 是一种癌抑制基因,其突变与失活均可失去对细胞增殖的抑制作用,可导致细胞过度增殖,诱发肿瘤的发生并促进其发展<sup>[5]</sup>。Survivin 是一种凋亡抑制基因,其高表达可能使细胞抵御多种生理或病理凋亡信号<sup>[6]</sup>。本文分析 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 与 BTCC 的病理分级及临床分期的相关性,以期为该病的早期诊治及预后评估提供参考。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 1 月至 2017 年 5 月广东医科大学附属中山医院泌尿外科收治的 BTCC 患者 67 例为 BTCC 组。纳入标准:(1)治疗前明确诊断为原发性 BTCC<sup>[7]</sup>;(2)均采用手术治疗,术中留取癌组织标本,术后病理证实;(3)一般资料完整。排除标准:(1)复发性 BTCC 者;(2)术前有治疗史者。患者年龄 30~85 岁,平均(62.48±9.74)岁;男性 46 例,女性 21 例;膀胱全切术 28 例,膀胱部分切除术 39 例;病理分型:移行上皮细胞癌 55 例,腺癌 7 例,鳞癌 5 例;病理分级根据 WHO 发布的 BTCC 分级标准<sup>[8]</sup>分为:高分化型(G1 级)20 例,中分化型(G2 级)30 例,低分化型(G3)17 例;临床分期根据国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)制定的肿瘤淋巴结转移(tumor node metastasis, TNM)分期标准<sup>[9]</sup>分为浅表型(Tis~T1)49 例;浸润型(T2~T4)18 例。另选择正常膀胱黏膜组织标本 17 例为正常膀胱组,均来源于本院同期经膀胱手术留取的标本,其中膀胱结石 10 例,输尿管囊肿 7 例,留取的标本均经病理证实为正常膀胱黏膜组织,患者年龄 32~81 岁,平均(61.27±11.38)岁;男性 12 例,女性 5 例。两组患者的性别、年龄比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性。

## 1.2 方法

1.2.1 主要试剂 免疫组化 SP 法系列试剂盒均购于北京中山生物技术有限公司,兔抗人 VEGF 单克隆抗体、鼠抗人 PCNA 单克隆抗体、兔抗人 Survivin 多克隆抗体均为美国 Sigma 公司产品,购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,鼠抗人 p53 单克隆抗体为 Santa-Cruz 公司产品,购于上海拜力生物科技有限公司。

1.2.2 标本处理 所有标本均采用 10% 的中性福尔马林固定 24 h,自来水漂洗过夜后采用酒精梯度脱水,二甲苯透明处理后常规石蜡包埋,连续切成 4 μm 厚的切片,共切 6~8 张,一张用于 HE 染色提供组织学观察及病理诊断,其余的用于免疫组化 SP 染色检测 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin。

1.2.3 免疫组化 SP 法步骤 先将用于免疫组化的切片置于 60℃ 的二甲苯中脱蜡 10 min,再置于 37℃ 的二甲苯中脱蜡 3 min,然后依次置于 100%、95%、80%、75% 的梯度酒精中各 3 min 以水化,采用自来水冲洗约 3 min 至透明保存备用;切片置于 3% 的过氧化氢中 10 min 以阻断内源性过氧化物酶的活性,置于 0.1 m 磷酸盐缓冲液(PBS)中震荡 3 次,3 min/次;滴加 50 μL 正常小牛血清以封闭组织中的非特异性吸附,去血清;滴加一抗(VEGF、PCNA、p53 及 Survivin)50 μL 后在室温下孵育 1 h,用 PBS 冲洗 3 次,3 min/次;用 PBS 代替一抗作为阴性对照;滴加二抗生物标记物 50 μL 在室温下孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加三抗链霉菌抗生物素蛋白过氧化酶溶液 50 μL 在室温下孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;加二氨基联苯胺(DAB)显色剂 1~2 滴,显微镜下观察 3~10 min 后采用自来水冲洗终止显色,苏木精复染,采用盐酸乙醇分化,脱水、透明后采用中性树胶封片。

1.2.4 结果判读 取至少 5 个具有代表性的高倍视野(采用 40×10 的高倍显微镜进行观察,不少于 1 000 个细胞),由 2 名具有丰富经验的高级职称病理医师在不知临床及病理资料的情况下独立观察,当两名医师评估结果不一致时共同讨论作出最后的判断。阳性染色判断标准:VEGF:细胞质出现棕黄色或棕色颗粒为阳性染色;PCNA、p53:细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性染色;Survivin:细胞浆被染色成淡黄或棕黄色为阳性染色。阳性病例判断标准:阳性细胞比例 ≥ 10% 为阳性病例,无着色或阳性细胞比例 < 10% 为阴性病例。

1.3 观察指标 (1)比较BTCC组与正常膀胱组 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 的阳性表达率。(2) BTCC组以病理分级为分组依据,进一步分为G1级组、G2级组、G3级组,比较不同组 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 的阳性表达率。(3) BTCC组以临床分期为分组依据,进一步分为Tis~T1组、T2~T4组,比较两组的 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 的阳性表达率。

1.4 统计学方法 应用SPSS18.0统计学软件进行数据分析,计数资料以率(%)表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 BTCC组与正常膀胱组各指标阳性表达率比较 在正常膀胱黏膜组织中均未检测到 VEGF、

PCNA、p53 及 Survivin 的阳性表达,正常膀胱组各个检测指标的阳性表达率均为0;BTCC组各检测指标的阳性表达率均高于正常膀胱组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表1。

2.2 各指标与BTCC病理分级的关系 BTCC分化程度越低,VEGF、PCNA、P53 及 Survivin 的阳性表达率越高,病理分级由G1~G3级,VEGF、PCNA、P53 及 Survivin 的阳性表达率逐渐增高,不同病理分级组之间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表2。

2.3 各指标与BTCC临床分期的关系 Tis~T1(浅表型)组 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 的阳性表达率低于T2~T4(浸润型)组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表3。

表1 BTCC组 VEGF、PCNA、P53 及 Survivin 的阳性表达与正常膀胱组比较[例(%)]

组别	例数	VEGF		PCNA		P53		Survivin	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
BTCC组	67	45 (67.16)	22 (32.84)	46 (68.66)	21 (31.34)	36 (53.73)	31 (46.27)	50 (74.63)	17 (25.37)
正常膀胱组	17	0 (0)	17 (100.00)	0 (0)	17 (100.00)	0 (0)	17 (100.00)	0 (0)	17 (100.00)
$\chi^2$ 值		24.592		25.800		15.985		31.343	
P值		0.000		0.000		0.000		0.000	

表2 不同病理分级组 VEGF、PCNA、P53 及 Survivin 的阳性表达率比较[例(%)]

组别	例数	VEGF		PCNA		P53		Survivin	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
G1级组	20	6 (30.00)	14 (70.00)	5 (25.00)	15 (75.00)	6 (30.00)	14 (70.00)	11 (55.00)	9 (45.00)
G2级组	30	22 (73.33)	8 (26.67)	24 (80.00)	6 (20.00)	16 (53.33)	14 (46.67)	23 (76.67)	7 (23.33)
G3级组	17	17 (100.00)	0 (0)	17 (100.00)	0 (0)	14 (82.35)	3 (17.65)	16 (94.12)	1 (5.88)
$\chi^2$ 值		27.635		29.413		21.446		15.796	
P值		0.000		0.000		0.000		0.000	

表3 不同临床分期组 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 的阳性表达率比较[例(%)]

组别	例数	VEGF		PCNA		p53		Survivin	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
Tis~T1组	49	27 (55.10)	22 (44.90)	28 (57.14)	21 (42.86)	20 (40.82)	29 (59.18)	33 (67.35)	1 (32.65)
T2~T4组	18	18 (100.00)	0 (0)	18 (100.00)	0 (0)	16 (88.89)	2 (11.11)	17 (94.44)	1 (5.56)
$\chi^2$ 值		27.635		29.413		21.446		15.796	
P值		0.000		0.000		0.000		0.000	

## 3 讨论

BTCC是临床上常见的泌尿系统恶性肿瘤,其临床症状主要表现为血尿、尿频、尿急、尿痛。目前,BTCC的早期诊断主要依靠影像学方法和实验室检查<sup>[10]</sup>,各种影像学方法检查诊断BTCC均存在一定的局限性,如B超检查对浸润较深的肿瘤病灶及膀胱周围盆腔脏器显示欠佳、排泄性尿路造影对肿瘤较小者在膀胱区不易发现充盈缺损、CT或MRI不进行增强扫描诊断的准确性不是很理想等。随着组织免疫学、分子生物学理论及实验技术的迅速发展,实验室检查在BTCC的早期诊断、治疗方案制定及预后评估中的价值日益凸显,而寻找BTCC生物标志物也更加具有实际意义。

VEGF是一种分子质量为34~45 kD的同二聚体

糖蛋白,其基因全长28 kb,位于染色体6p21,编码VEGF的基因长约14 kb,包含8个外显子和7个内含子,被公认为已知的作用最强的血管通透因子,而血管通透性的增加是内皮细胞迁移、新血管生成的基础。正常机体中VEGF含量较低,肿瘤组织受肿瘤细胞自身、肿瘤浸润的肥大细胞和巨噬细胞等因素的影响,VEGF含量升高<sup>[11]</sup>。本研究显示:BTCC组与正常膀胱组、不同病理级别的BTCC组织、不同临床分期的BTCC组织的VEGF的阳性表达率比较差异有统计学意义。这提示,VEGF参与了BTCC的发生与发展,可作为BTCC的早期诊断指标。PCNA的相对分子质量为 $36 \times 10^3$ ,存在于细胞核内,其直接参与了DNA的合成,是DNA合成不可缺少的物质。PCNA活跃情况与

细胞周期有关,当肿瘤细胞处于增殖活跃期时,PCNA 表达明显增强(在肿瘤细胞处于 S 期时其表达增强尤为明显)<sup>[12]</sup>。本研究显示:BTCC 组与正常膀胱组、不同病理级别的 BTCC 组织、不同临床分期的 BTCC 组织的 PCNA 的阳性表达率比较差异有统计学意义。这提示,PCNA 参与了 BTCC 的发生与发展,可作为 BTCC 的早期诊断指标。p53 基因位于 17 号染色体短臂,是一种抑癌基因,分为野生型(正常)和突变型(失活),其中野生型具有显性转化作用,通过调控细胞周期发挥抗癌作用,当其失活时抗癌功能丧失。多种肿瘤中野生型 p53 基因容易发生突变,免疫组化检测到的 p53 基因为失活的无功能突变型<sup>[13]</sup>。本研究显示:BTCC 组与正常膀胱组、不同病理级别的 BTCC 组织、不同临床分期的 BTCC 组织的 p53 基因的阳性表达率比较差异有统计学意义。这提示,突变型 p53 基因的阳性表达仅出现在 BTCC 组织中,其阳性表达率与 BTCC 病理分级和临床分期有关,其参与了 BTCC 的发生与发展,可作为 BTCC 的早期诊断指标。Survivin 是凋亡抑制蛋白家族成员中结构最简单的蛋白分子,由 1.96 kb 的 mRNA 所编码,包含 3 个内含子和 4 个外显子,基因全长 14.7 kb。Survivin 抗细胞凋亡功能显著,其过度表达能显著抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,从而致使细胞的异常增殖或向恶性转化<sup>[14-15]</sup>。本研究显示:BTCC 组与正常膀胱组、不同病理级别的 BTCC 组织、不同临床分期的 BTCC 组织的 Survivin 基因的阳性表达率比较差异有统计学意义。这提示,Survivin 基因的阳性表达仅出现在 BTCC 组织中,其阳性表达率与 BTCC 的病理分级和临床分期有关,其参与了 BTCC 的发生与发展,可作为 BTCC 的早期诊断指标。

本研究表明 VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 在 BTCC 中的阳性表达率显著高于正常膀胱组织,且其阳性表达率与 BTCC 的临床分析和病理分级有关,但本研究未分析各指标之间的相关性及对 BTCC 诊断价值的大小,后续研究中将采用专题研究的形式进一步分析 BTCC 组织中 VEGF、PCNA、P53 及 Survivin 等各指标表达水平的相关性,并探讨其对 BTCC 诊断价值的大小,以为临床提供更明确的指导。

综上所述,VEGF、PCNA、p53 及 Survivin 在正常膀胱黏膜组织中无阳性表达,在 BTCC 中的阳性表达率与癌细胞的病理分级和临床分期有关,可作为

BTCC 早期诊断的有效指标。

#### 参考文献

- [1] 吴鹏杰,朱刚,魏东,等.原发性上尿路移行细胞癌患者根治术后发生膀胱癌的多因素分析[J].中华老年医学杂志,2015,34(7):774-777.
- [2] 佟锐,杨清,王纯雁,等.抑癌基因 OVCA1 的研究进展[J].生物技术通讯,2015,26(2):258-263.
- [3] Cesário JM, Brito RB, Malta CS, et al. A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in T24 human bladder cancer cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017, 53(3): 272-276.
- [4] 李治龙,李晗,李晓岫,等.植物增殖细胞核抗原的结构与功能[J].生物技术通讯,2016,27(1):133-137.
- [5] Wang ZP, Chen SY, Tian Y. Wild-type p53-induced phosphatase 1 is a prognostic marker and therapeutic target in bladder transitional cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(2): 875-880.
- [6] 祝丽双,王浩,刘畅,等.肿瘤中与 survivin 有关的信号通路及分子以及靶向 survivin 的治疗前景[J].现代生物医学进展,2015,15(11):2181-2184.
- [7] 谢文杰,祖雄兵,陈金波,等.趋化因子受体 7 联合 CT 诊断膀胱移行细胞癌淋巴结转移[J].中国现代医学杂志,2015,25(33):32-35.
- [8] 宁晨,郝钢跃,杨培谦,等.年轻膀胱移行细胞癌患者的临床病理特征分析[J].中国现代医学杂志,2016,26(22):92-95.
- [9] 杨龙海,叶波,魏星,等.最新国际肺癌 TNM 分期标准(第 8 版)修订稿解读[J].中国医刊,2016,51(9):22-25.
- [10] 徐卫波,侯俊清,刘广超,等.细胞核增殖抗原与 E-钙黏蛋白在膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义[J].中华实验外科杂志,2015,32(1):185-186.
- [11] 康元上,孙道冬,蒙明森,等.膀胱移行细胞癌患者血清骨形成蛋白-2 和血管内皮生长因子水平变化[J].中国中西医结合外科杂志,2014,20(4):375-377.
- [12] Madka V, Mohammed A, Li Q, et al. TP53 modulating agent, CP-31398 enhances antitumor effects of ODC inhibitor in mouse model of urinary bladder transitional cell carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(10): 3030-3041.
- [13] Madka V, Mohammed A, Li Q, et al. Targeting mTOR and p53-Signaling inhibits muscle invasive-bladder-cancer *in vivo* [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2016, 9(1): 53-62.
- [14] 崔忠,赵清涛,孙建斌,等.肝细胞癌患者癌组织中 survivin、PTEN、EGFR 表达水平及临床意义[J].空军医学杂志,2017,33(1):30-32,68.
- [15] Makboul R, Refaiy AE, Badary FA, et al. Expression of survivin in squamous cell carcinoma and transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a comparative immunohistochemical study [J]. *Korean J Urol*, 2015, 56(1): 31-40.

(收稿日期:2017-07-10)