

文章编号: 1672-2019(2007)09-0720-03

·论著·

成纤维细胞生长因子受体 2 在膀胱癌中的表达及意义

张劲勃, 赵晓昆, 何 军, 朱 梁, 王新君
(中南大学湘雅附二医院 泌尿外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 考察成纤维细胞生长因子受体 2 的表达与膀胱移行细胞癌发生、进展程度关系。方法 用免疫组织化学和 Western blot 法检测 41 例膀胱移行细胞癌标本中 FGFR2 的表达, 并以 RT-PCR 法分别检测 FGFR2 b 及 FGFR2 c mRNA 量。结果 膀胱移行细胞癌患者中 FGFR2 总表达率, 低于正常膀胱黏膜($P < 0.05$), 高分化的膀胱癌表达高于低分化者($P < 0.05$), 侵袭性膀胱癌低于浅表性膀胱癌, 复发者低于无复发者($P < 0.05$), FGFR2 b mRNA 与蛋白表达情况相一致而 FGFR2 c mRNA 在各组间无明显区别。结论 FGFR2 b 的表达量与膀胱移行细胞癌的疾病严重程度呈相反趋势, FGFR2 b 与抑癌作用有关。

关键词: 成纤维细胞生长因子受体 2; 膀胱癌

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

Express and role of FGFR2 in bladder transitional cell carcinoma

ZHANG Jin-qing, ZHAO Xiao-kun, HE Jun, ZHU Liang, WANG Xin-jun
(Department of Urology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, P.R.China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of FGFR2 to the development of bladder cancer. **Method** The expression of FGFR2 in 41 bladder cancer specimens was evaluated by immunohistochemical detection, Western blot and RT-PCR. **Result** The expressing level in cancer was lower than that in the normal bladder epithelium ($P < 0.05$). The expression level was higher in the well differentiated group than the poorly differentiated group, lower in the invasive group than the superficial group and lower in the recurrent ones than the no-recurrent ones. FGFR2 b mRNA level among the groups conformed to the protein expression, but no order of FGFR2 c mRNA level were found. **Conclusion** The expression of FGFR2 b is negative related with the severity of bladder cancer, and it may be a tumor suppressor in the disease.

Key words: fibroblast growth factor receptor 2; bladder cancer

膀胱癌是泌尿系常见的恶性肿瘤, 是一种严重威胁人类健康和生命的疾病, 然而, 目前对其发病的原因、机制, 特别是分子机制还知之甚少。如果能够弄清膀胱癌发生发展的分子机制, 找到良好的生物标记物来预测膀胱癌的进展和预后, 就能更方便、客观地选择出恰当的治疗方案, 而且可能为未来的分子治疗提供理论依据。成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF) 与成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR) 是一

类调控细胞生长分化的重要分子与受体, 它们参与多种生理过程, 而且已有大量实验证实它们与肿瘤发生、发展的病理过程相关。FGFR2 是 FGFR 表达于正常膀胱移行上皮的主要类型, 可能与膀胱癌相关。为了考察 FGFR2 在膀胱肿瘤病理过程中的意义, 笔者研究了本院 41 名膀胱肿瘤患者的肿瘤标本中 FGFR2 的表达及与患者病程变化、预后的关系, 探讨 FGFR2 在膀胱癌中的作用。

收稿日期: 2007-05-16

[通讯作者] 朱 梁, 中南大学湘雅附二医院泌尿外科, 邮编: 410011

1 材料与方法

1.1 材料

研究标本为我院泌尿外科 2006 年 7 月 ~ 12 月 41 例膀胱癌患者手术标本。其中男 34 例, 女 7 例; 年龄 44 ~ 69 岁, 平均 58.3 岁。按国际抗癌协会标准进行分期分级, 表浅性肿瘤(Ta ~ T1)19 例, 浸润性肿瘤(T2 ~ T4) 22 例; 按肿瘤细胞病理分级 级 11 例, 级 16 例 (~ 级规入 级), 级 14 例; 临床收治时初发病例 26 例, 复发病例 15 例, 随访 3 ~ 8 个月不等, 又有 4 例复发, 最终初发病例合计 24 例, 复发病例合计 17 例。手术中肿瘤离体后立即取材, 取部分肿瘤组织立即置液氮中后转 - 70 °C 冰箱做 Western blot 及 RT-PCR 用, 另取部分组织于 4% 中性甲醛固定, 石蜡包埋送湘雅附二医院病理科制成 6 μm 连续切片。用于对照的 5 例正常膀胱组织均来自自行开放手术的良性前列腺增生患者, 所有标本的诊断均经湘雅附二医院病理科病理检验证实。

1.2 方法

免疫组织化学染色: 采用英国 Abcam 公司兔抗人 anti-FGFR2 一抗、北京中杉金桥公司 SP 试剂盒及 DAB 显色试剂盒。免疫组织化学染色采用 SP 法, 一抗 anti-FGFR2 稀释为 1 : 1000, 本试验检测抗原无需修复, 阴性对照以 0.01 M PBS 液代替一抗。FGFR2 阳性表现为胞膜及胞浆染成棕黄色或棕褐色, 随机选取 5 个高倍视野 (10 × 40) 进行判断, 以总计细胞阳性数 >25% 为标本阳性判断。将结果带入统计软件 SPSS13.0 统计分析, 以卡方检验和 Fisher 概率法分析结果, 取 $\alpha = 0.05$

Western blot 采用上海碧云天研究所产的单去污剂裂解液和 PMSF, 并按其说明进行膜蛋白提取。SDS-PAGE 电泳分离胶浓度为 10%, 一抗同免疫组织化学染色, 用 TBST 稀释至 1 : 1000 浓度。用凝胶图像处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。将结果带入统计软件 SPSS13.0, 以 One-Way ANOVA 法统计各分级间结果, 以 $\alpha = 0.05$ 标准判断统计学意义。

RT-PCR 组织总 RNA 提取按 PROMEGA 公司说明书进行, 逆转录采用 MBI Fermentas 公司试剂盒并按说明进行。引物设计见表 1, 由北京奥科生物公司合成。PCR 采用 BIO BASIC 公司试剂盒并按说明进行, 采用 20 μL 反应体系, 其中 Mg²⁺ (25 μM) 1.2 μL。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min; 以 95 °C 变性 30 s, 退火 50 s, 74 °C 延伸 60 s, 循环 38 次; 72 °C

min, 4 °C 终止反应。其中 β -actin 和 FGFR2 c 退火温度采用 55 °C, FGFR2 b 退火温度采用 59 °C。

表 1 引物序列表

引物名称	序列	Tm(°C)	产物长度(bp)
FGFR2 b 上游	5'CATCGCATTGGAGGCTACAAG3'	59.8	
FGFR2 b 下游	5'CTCAATCTCTTTGTCCGTGGTGT3'	60.6	372
FGFR2 c 上游	5'CATCGCATTGGAGGCTACAAG3'	59.8	
FGFR2 c 下游	5'TTGCTGTTTTGGCAGGACAGT3'	57.9	483
β -actin 上游	5'TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA3'	62.0	
β -actin 下游	5'TCAGGAGGAGCAATGATCTTG3'	57.9	302

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

在病理分级和 FGFR2 阳性表达之间有相反趋势, FGFR2 阳性表达率随着病理分级的增加而降低, 在浸润组(T2- T4)中 FGFR2 阳性表达率明显低于表浅组(Tis- T1), 提示 FGFR2 阳性表达可能与抑制癌细胞的浸润能力有关, FGFR2 阳性表达越强, 癌细胞的浸润能力越低, 肿瘤转移或复发越少。在复发组的阳性表达率显著低于未复发组, 见表 2。

表 2 FGFR2 在不同分组中的表达情况

		阴性	阳性
病理分级	级	1	10
	级	7	9
	级	12	2
	正常对照	-	5 ¹⁾
分期	Tis- T1	5	14
	T2- T4	15	7 ²⁾
	初发	8	16
	复发	12	5 ³⁾

注: 1) 正常组、级、级之间有逐渐表达降低倾向, 但级间差异无显著性, $P > 0.05$

2) 浅表膀胱癌组与侵袭膀胱癌之间差异有显著性, $P > 0.05$, 浅表组高于侵袭组

3) 初发组与复发组之间差异有显著性, $P > 0.05$, 初发组高于复发组

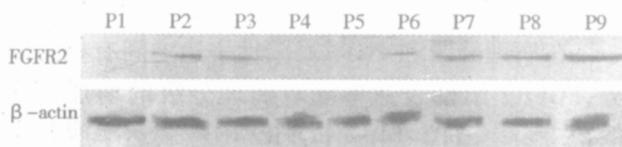
2.2 Western blot 结果

Western blot 结果与免疫组织化学染色结果相一致, 在病理分级和 FGFR2 阳性表达之间有相反趋势关系, 正常黏膜平均光密度值最高, 肿瘤分化越好 FGFR2 平均光密度值越高, 表明 FGFR2 表达随着病理分级的增加而降低, 在侵袭组(T2- T4)中 FGFR2 平均光密度明显低于表浅组(Tis- T1)。在复发组的平均光密度低于未复发组。亦提示 FGFR2 表达可能和

抑制癌细胞的侵袭能力有关, FGFR2 表达越强, 癌细胞的侵袭能力越低, 肿瘤复发越少, 见表 3、图 1。

表 3 FGFR 在各组中蛋白表达情况

		FGFR2/内参平均值	P 值	
病理分级	级	0.305 ± 0.094	各組間均 <0.05	
	级	0.223 ± 0.069		
	级	0.110 ± 0.037		
正常对照		0.486 ± 0.124		
分期	Tis- T1	0.287 ± 0.093		0.01
	T2- T4	0.137 ± 0.044		
	初发	0.265 ± 0.065	0.047	
	复发	0.124 ± 0.037		



P (person) 为采集标本序号: P1、P4、P5 为膀胱移行细胞癌 III 级, P3、P6、P8 为膀胱移行细胞癌 II 级, P2、P7 为膀胱移行细胞癌 I 级, P9 为正常膀胱黏膜

图 1 部分标本 Western blot 及其光密度值

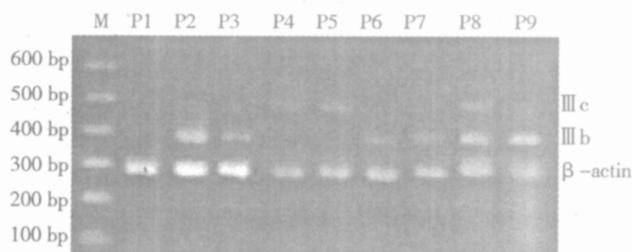


图 2 部分标本 Western blot 及其光密度值

表 4 FGFR2 b 和 FGFR2 c 各组 RT-PCR 结果

		FGFR2 b/内参平均值	FGFR2 c/内参平均值
病理分级	级	0.284 ± 0.098 ¹⁾	0.035 ± 0.052 ²⁾
	级	0.202 ± 0.079 ³⁾	0.064 ± 0.095 ³⁾
	级	0.105 ± 0.077 ³⁾	0.067 ± 0.081 ³⁾
正常对照		0.454 ± 0.084 ³⁾	0.014 ± 0.022 ³⁾
分期	Tis- T1	0.261 ± 0.095	0.045 ± 0.067 ³⁾
	T2- T4	0.130 ± 0.078 ³⁾	0.070 ± 0.092 ³⁾
	初发	0.243 ± 0.093	0.063 ± 0.083 ³⁾
	复发	0.117 ± 0.082 ³⁾	0.051 ± 0.081 ³⁾

注: 1) 不同分级间 FGFR2 b mRNA 差异均有显著性, P < 0.05; 2) 侵袭组与表浅组间 FGFR2 b mRNA 差异显著性, P < 0.05; 3) 复发组与初发组间 FGFR2 b mRNA 差异有显著性, P < 0.05; 4) FGFR2 c mRNA 在各分组间情况差异无显著性, P > 0.05

2.3 RT-PCR 结果

半定量的 RT-PCR 结果显示 FGFR2 b mRNA

转录随分级、分期的升高呈减少趋势, 复发病例 FGFR2 b mRNA 转录少于初发病例。而另一种亚型 FGFR2 c mRNA 转录的量无明显规律可循, 各組間差异无显著性, 见图 2、表 4。

3 讨论

膀胱移行细胞癌是我国泌尿外科最常见的恶性肿瘤, 其病因和发病机制目前尚不十分清楚。FGF 家族与其受体家族参与多种生物学过程, 包括肿瘤的发生、发展。近年来的研究发现 FGF 家族的多个成员及其受体与膀胱癌的发病机制相关。有关这一方面国内现有的文献主要集中在膀胱癌中 aFGF 和 bFGF 的有关研究, 特别是后者, 而 FGFR2 的研究国内尚无报道。

FGFR2 基因位于 10q26, 这一区带在移行细胞癌中常常存在结构异常且表达下降^[1]。这样肿瘤中该基因的表达缺失很可能是突变失活的结果, 其具体机制尚不明了。FGFR2 存在 IIIb 和 IIIc 两种主要亚型, 膀胱黏膜作为中胚层来源组织主要表达 IIIb 亚型。特别的, 在多种上皮肿瘤细胞株及肿瘤组织中人们发现 FGFR2 b 的表达量较相应的正常上皮细胞显著下降或不表达^[2,3], 推测其可能与抑癌作用相关。

本实验中通过免疫组织化学染色检测了病人的膀胱癌标本从而证实, FGFR2 的表达不仅与肿瘤的分化程度有关, 而且与分期和复发情况均有关。分化程度越好的肿瘤表达率越高, 分化越差的肿瘤表达越少或不表达, 表达 FGFR2 水平高的肿瘤相对预后较好, 复发率较低。通过 Western blot 技术分析同一批标本, 分子水平上 FGFR2 的表达情况和免疫组织化学染色的检测结果一致; 经过 RT-PCR 分析, 发现与 FGFR2 蛋白表达情况一致的为 FGFR-2IIIb 亚型的 mRNA, 由此推测 FGFR2IIIb 的表达有抑制膀胱移行细胞癌组织生长及进展的作用。

DIEZ DE MEDINA 等用半定量聚合酶链反应检测了正常人类膀胱和移行细胞癌病人标本 FGFR-2IIIb mRNA 的表达^[4]。FGFR-2IIIb 在正常膀胱黏膜中有表达, 但在其下的间质中不表达。在肿瘤中表达水平相同或稍低。表达水平低的病人的生存时间显著少于其他病人, 即 FGFR2 的表达高低与预后好坏呈相反表现, 这与本研究观察到的情况一致。RICOL 等用转染膀胱癌细胞株的方法证实了

(下转第 725 页)

亡所起作用不同,且确切的凋亡机制研究还远未达到能用于临床的程度。

体外细胞培养具有影响因素少且易于人为调控的优点,是研究人体复杂病理生理过程时常用的实验方法。本实验即采用体外原代培养大鼠 AT-II 细胞的技术,以 LPS 为单一损伤因素,观察 AT-II 细胞的 Fas 蛋白表达和凋亡。研究结果显示与对照组相比,LPS 损伤组细胞 Fas 蛋白表达明显升高且细胞凋亡率和坏死率明显升高,从而进一步证明 Fas/FasL 途径可能是 LPS 导致 AT-II 细胞凋亡的重要途径。

参 考 文 献:

- [1] KITAMURA Y, HASHIMOTO S, MIZUTA N, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3Pt1): 762-769.
- [2] DOBBS LG. Isolation and culture of alveolar type II cells[J]. *Am J Physiol*, 1990, 258(4 Pt 1): L134-L147.
- [3] LORRAINE BW, MICHAEL AM. The acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18): 1334-1349.
- [4] 黄英,刘国祥.肺泡II型上皮细胞凋亡在急性肺损伤中的作用[J].*中国现代医学杂志*,2002,12(3):35-37.

- [4] HUANG Y, LIU GX. The role of apoptosis of alveolar type II cells in acute lung injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2002, 12(3): 35-37. Chinese
- [5] 宋勇,施毅,Alden HH,等.内毒素诱导小鼠肺泡II型上皮细胞凋亡不依赖 TNF- α 的研究 [J]. *医学研究生学报*,2003,16(6): 420-423.
- [5] SONG Y, SHI Y, ALDEN HH, et al. Induction of apoptosis in mouse type II alveolar epithelial cells by LPS does not require TNF- α [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2003, 16 (6): 420-423. Chinese
- [6] CLEVELAND JL, IHLE JN. Contenders in FasL/TNF death signaling[J]. *Cell*, 1995, 81(4): 479-482.
- [7] ALBERTINE KH, SOULIER MF, WANG Z, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(5): 1783-1796.
- [8] NEFF TA, GUO RF, NEFF SB, et al. Relationship of acute lung inflammatory injury to Fas/FasL system[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166(3): 685-694.
- [9] MARTIN TR, HAGIMOTO N, NAKAMURA M, et al. Apoptosis and epithelial injury in the lungs[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(3): 214-220.
- [10] DE SOUZA PM, LINDSAY MA. Apoptosis as a therapeutic target for the treatment of lung disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5(3): 232-237.

(张蕾 编辑)

(上接第722页)

FGFR-2IIIb的抑制肿瘤作用^⑤。BERNARD-PIERROT等利用T24细胞株进行研究,不仅证实了FGFR-2IIIb的抑制肿瘤生长作用,还对其机制进行了探讨,认为与其激酶活性无关^⑥。

总之,本实验证实了FGFR2IIIb的表达与肿瘤的恶性程度与进展情况呈相反趋势,结合文献,可以被作为一种候选的抑癌基因,在未来的医疗中有望成为预测膀胱癌发展、预后的检测指标。其作用具体分子机制尚不明,有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] CAPPELLEN D, GIL DIEZ DE MEDINA S, CHOPIN D, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder[J]. *Oncogene*, 1997, 14(25): 3059-3066.

- [2] CARSTENS RP, EATON JV, KRIGMAN HR, et al. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) in human prostate cancer[J]. *Oncogene*, 1997, 15(25): 3059-3065.
- [3] LAROCHELLE WJ, DIRSCH OR, FINCH PW, et al. Specific receptor detection by a functional keratinocyte growth factor-immunoglobulin chimera[J]. *J Cell Biol*, 1995, 129(2): 357-366.
- [4] DIEZ DE MEDINA SG, CHOPIN D, EL MARJOU A, et al. Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas [J]. *Oncogene*, 1997, 14(3): 323-330.
- [5] RICOL D, CAPPELLEN D, EL MARJOU A, et al. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer[J]. *Oncogene*, 1999, 18(51): 7234-7243.
- [6] BERNARD-PIERROT I, RICOL D, CASSIDY A, et al. Inhibition of human bladder tumour cell growth by fibroblast growth factor receptor 2b is independent of its kinase activity. Involvement of the carboxy-terminal region of the receptor[J]. *Oncogene*, 2004, 23(57): 9201-9211.

(张立芳 编辑)