

网络出版时间: 2019-3-26 13:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.027.html>

TPD52L1(D53) 蛋白在膀胱尿路上皮癌中的表达和预后

戴维^{1,2,3}, 梁朝朝^{1,2,3}, 张力^{1,2,3}, 陈先国^{1,2,3}, 邵胜^{1,2,3}, 尹玉⁴, 徐雨辰^{1,2,3}, 汪赛¹

摘要 目的 探讨肿瘤蛋白家族 D52 (TPD52) 的成员 TPD52L1 (D53) 蛋白在膀胱尿路上皮癌中的表达和对预后的影响。方法 采用免疫组化(二步法)检测 TPD52L1 在 72 例膀胱尿路上皮癌中的表达,分析 TPD52L1 表达水平与膀胱尿路上皮癌预后的相关性。结果 膀胱尿路上皮癌组织中 TPD52L1 蛋白表达水平显著高于正常膀胱尿路上皮组织。Kaplan-Meier 法单因素生存分析表明,膀胱尿路上皮癌疾病特异性生存期与 TPD52L1 表达强度有明显相关性 ($P < 0.001$, Log Rank 检验), Cox 回归多因素生存分析表明 TPD52L1 的高表达是膀胱尿路上皮癌疾病特异性死亡的独立危险因素 ($HR = 3.073$ $P = 0.034$)。结论 膀胱尿路上皮癌组织中 TPD52L1 表达明显高于正常膀胱尿路上皮组织。并且随着其表达水平的增高,其疾病特异性死亡率上升, TPD52L1 的高表达是膀胱尿路上皮癌预后的独立危险因素。关键词 膀胱尿路上皮癌; TPD52L1; 预后

中图分类号 R 737.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0635-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.027

膀胱癌是泌尿生殖系统常见恶性肿瘤,目前膀胱癌全球发病率排名第 9 位。2015 年,全球约有 541 000 例膀胱癌事件,其中 188 000 例死亡,每 59 例男性中有 1 人在 79 岁之前被诊断出膀胱癌,而女性中约每 239 人有 1 人确诊^[1]。在我国,膀胱癌发病率排名第 13 位,死亡率排名第 14 位,均居于泌尿系肿瘤首位^[2]。膀胱癌由于局部浸润易转移、术后高复发率的特点^[3],其筛查诊断、预后评估、复发监测是治疗的重要环节,针对膀胱癌的发生的发展分子机制和对诊断预后监测新手段的研究一直是泌尿外科研究的重点。

2018-12-28 接收

基金项目: 国家临床重点专科建设项目(编号:卫办医政函[2012]649 号); 安徽高校省级质量工程项目(编号:2014xnx028)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 泌尿外科、⁴ 病理科, 合肥 230022

² 安徽医科大学泌尿外科研究所, 合肥 230022

³ 泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室, 合肥 230022

作者简介: 戴维,男,硕士研究生;

梁朝朝,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: liang_chaozhao@163.com

TPD52L1 已被认为是一种新的乳腺癌治疗靶点,并在多种肿瘤中检测到其高表达。但其在泌尿系肿瘤中的表达水平和生理作用尚未见报道。该研究使用免疫组织化学(二步法)和半定量免疫反应评分(IRS 评分)量化 TPD52L1 在膀胱癌中的表达,评估其与临床和病理特征的潜在关联。根据疾病特异性生存期测试 TPD52L1 的表达水平对膀胱尿路上皮癌预后的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析 2013~2017 年安徽医科大学第一附属医院泌尿外科收治的膀胱癌患者临床资料,纳入标准:①病理证实为膀胱尿路上皮癌;②行根治性膀胱切除术;③术前未接受治疗的初发膀胱癌。排除标准:①临床资料不完整;②随访记录缺失;③合并其他恶性肿瘤。符合纳入标准的患者共计 72 例,其诊断年龄为 38~86 岁,中位数 66 岁(四分位距 61.25~74.00);随访时间为 3~44 个月,中位数 17 个月(四分位距 11.25~26.00),其余资料特征见表 1。调取患者蜡块制切片行免疫组化分析,使用癌旁组织作为对照。该研究中所有患者知情同意,标本按照道德规范和法律标准处理并匿名。组织学分级采用 WHO2004 膀胱尿路上皮癌恶性程度分级系统,肿瘤分期采用国际抗癌联盟(UICC)2009TNM 分期法。

1.2 免疫组织化学染色

1.2.1 主要试剂和仪器 膀胱癌组织切片由安徽医科大学第一附属医院病理科统一制作。烤箱使用上海一恒科学仪器有限公司的电热鼓风干燥箱,一抗使用武汉三鹰生物技术有限公司的 TPD52L1 抗体(兔抗人,编号 14732-I-AP),二抗使用北京中杉金桥公司的兔二步法试剂盒(山羊抗兔,编号 PV-6001),DAB 工作液使用北京中杉金桥公司的浓缩型 DAB 试剂盒,黏附载玻片及显微镜盖玻片均购自江苏世泰公司。

1.2.2 实验方法 切片经脱蜡水化后,使用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)微波辐射行抗原修复。去除内源性过氧化物酶方法为切片置于按

1:9 配置的 3% 过氧化氢与甲醇溶液中室温下反应 12 min, 使用 2% BSA + 1% Triton + 97% PBS 封闭液封闭 1 h, 使用 1% BSA 将 TPD52L1 兔抗浓度稀释至 1:50 作为一抗工作液, 置于湿盒中 4 °C 过夜。二抗反应工作液来自兔二步法试剂盒, 室温反应 1 h 后, 使用 1:20 DAB 稀释液显色, 置于显微镜下观察, 按出现阳性棕色且棕色不再增加, 背景为无色的原则, 根据多次实验结果将显色时间统一规定为 5 s, 之后放入去离子水中终止反应。随后经复染脱色反蓝脱水封片, 封片剂为中性树脂与二甲苯 1:1 混合物, 晾干后观察结果。

表 1 膀胱尿路上皮癌患者资料

临床资料	n(%)
性别	
男	59(81.9)
女	13(18.1)
诊断年龄(岁)	
<65	31(43.1)
≥65	41(56.9)
死亡统计	
因膀胱癌死亡	19(26.0)
其他原因死亡	2(3.0)
肿瘤分级	
低级别	16(22.2)
高级别	56(77.8)
肿瘤 T 分期	
Ta	5(6.9)
T1	16(22.2)
T2	21(29.2)
T3	19(26.4)
T4	11(15.3)
肿瘤 N 分期	
N0	58(80.6)
N1	14(19.4)
肿瘤 M 分期	
M0	72(100.0)
肿瘤大小(cm)	
<3	23(31.9)
≥3	49(68.1)

1.3 免疫组化评分 使用半定量免疫反应评分 (IRS 评分) 对所有免疫组织化学染色进行评分, 按染色强度 [0(无染色反应)、1+(弱染色反应)、2+(中等染色反应)、3+(强染色反应)] 和阳性染色细胞的百分比 [0(0)、1(<10%)、2(10%~50%)、3(51%~80%)、4(>80%)] 相乘得出 IRS 值 (0~12) [4]。上述评分由两位高年资病理医师分别作出, 总结果差异无统计学意义, 评分不同个例选取了 IRS 评分较大的一方。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析, 排除 2 例意外死亡病例, 以手术治疗开始到因疾病而死亡的时间作为疾病特异性生存期 (disease specific survival, DSS), 使用 ROC 曲线将 T 分期和 IRS 评分各分为两组, 组间比较选用 χ^2 或 Fisher 确切概率法, 单因素生存分析使用 Kaplan-Meier 法和 Log Rank 检验, 多因素生存分析使用 Cox 回归模型, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IRS 评分和 T 分期的分组 通过 ROC 曲线将 IRS 评分分为高表达组和低表达组。结果显示最佳分界点为 7, 曲线下面积为 0.730, $P = 0.002$, 95% CI: 0.595~0.865 (图 1A), 定义 IRS 评分高于最佳分界点 (7) 的为高表达组, 小于最佳分界点的为低表达组。由于总样本量较小, 肿瘤 T 分期分组相对过多, 同样采用 ROC 曲线分析, 结果显示最佳分界点为 2.5, 曲线下面积为 0.871, $P < 0.001$, 95% CI: 0.787~0.954 (图 1B), 定义大于最佳分界点 (2.5) 的值为 ≥T3 组 (T3、T4), 小于最佳分界点的值为 ≤T2 组 (T0、T1、T2), 病理上体现为按肿瘤是否突破膀胱全层分为 2 组。

2.2 TPD52L1 在膀胱癌中的表达 免疫组化结果显示 94.4% 的膀胱尿路上皮癌中 TPD52L1 呈阳性表达, 而周围正常尿路上皮细胞均呈阴性。其中 IRS 评分小于 7 的阳性为低表达组, IRS 评分高于 7 的为高表达组, 见图 2。

2.3 TPD52L1 表达与临床病理特征的相关性分析 使用 χ^2 检验对各组资料分析, 结果表明, TPD52L1 的表达水平与膀胱尿路上皮癌患者的性别 ($P = 0.054$)、诊断年龄 ($P = 0.208$)、肿瘤分级 ($P = 0.377$)、肿瘤 N 分期 ($P = 0.154$)、肿瘤大小 ($P = 0.944$) 无明显相关性, 而与肿瘤是否突破膀胱全层有明显相关性 ($P = 0.001$), 见表 2。

2.4 单因素生存分析 通过 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析, 潜在的混杂变量包括性别、诊断年龄、TNM 分期、肿瘤病理分级和肿瘤大小, 结果显示在膀胱癌中, 膀胱尿路上皮癌特异性生存率与 TPD52L1 表达强度 ($P = 0.001$, Log Rank 检验)、肿瘤是否突破膀胱全层 ($P < 0.001$)、N 分期 ($P < 0.001$)、病理分级 ($P = 0.020$) 有明显相关性, 而诊断年龄 ($P = 0.332$)、性别 ($P = 0.376$)、肿瘤大小 ($P = 0.294$) 无明显相关性, 生存函数见图 3。

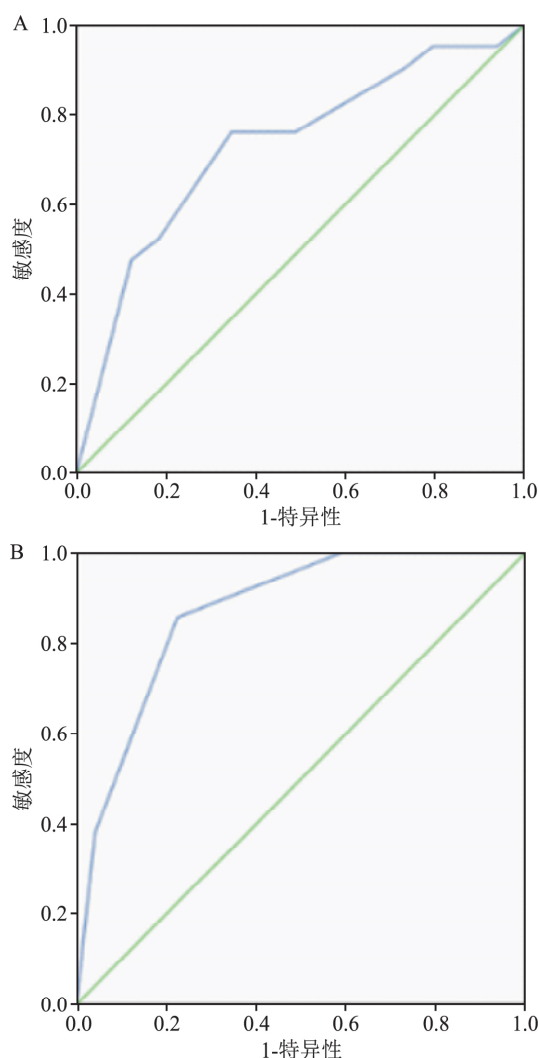


图1 ROC 曲线图

A: IRS 评分的 ROC 曲线图; B: T 分期的 ROC 曲线图

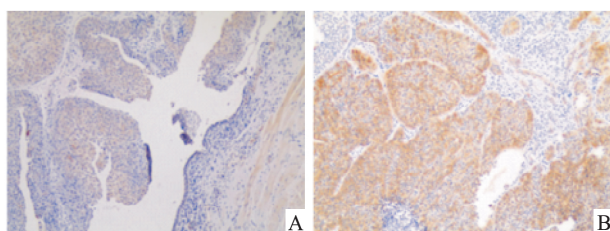


图2 膀胱尿路上皮癌及癌旁正常组织中的 TPD52L1 表达 ×100

A: 左侧为 TPD52L1 低表达的膀胱尿路上皮癌细胞, 右侧可见呈阴性的部分正常尿路上皮细胞; B: 视野内大量高表达 TPD52L1 的膀胱尿路上皮癌细胞, 右上方有部分呈阴性的正常尿路上皮细胞

2.5 多因素生存分析 目前公认的非肌层浸润性膀胱癌预后主要危险因素包括高病理分期、高级别尿路上皮癌、 ≥ 3 cm 的肿瘤、肿瘤数量 ≥ 8 个、复发频率大于 1 次/年和伴随原位癌; 肌层浸润性膀胱癌预后主要危险因素是肿瘤浸润深度和淋巴结情况。

根据单因素分析结果, 使用 Cox 回归进行多因素生存分析, 见表 3。

表2 临床病理特征的 χ^2 检验结果 [n(%)]

项目	总计	低表达	高表达	χ^2 值	P 值
性别					
男	59(81.9)	28(73.7)	31(91.2)	3.711	0.054
女	13(18.1)	10(26.3)	3(8.8)		
诊断年龄(岁)					
<65	31(43.1)	19(50)	12(35.3)	1.583	0.208
≥ 65	41(56.9)	19(50)	22(64.7)		
肿瘤分级					
低级别	16(22.2)	10(26.3)	6(17.6)	0.780	0.377
高级别	56(77.8)	28(73.7)	28(82.4)		
肿瘤 T 分期					
$\leq T2$	42(58.3)	29(76.3)	13(39.2)	10.706	0.001
$\geq T3$	30(41.7)	9(23.7)	21(61.8)		
肿瘤 N 分期					
N0	58(80.6)	33(86.8)	25(73.5)	2.030	0.154
N1	14(19.4)	5(13.2)	9(26.5)		
肿瘤大小(cm)					
<3	23(31.9)	12(31.6)	11(32.4)	0.005	0.944
≥ 3	49(68.1)	26(68.4)	23(67.6)		

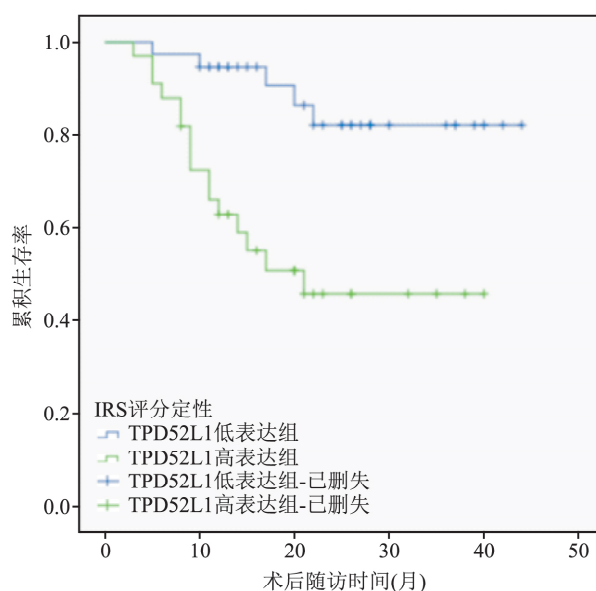


图3 TPD52L1 高、低表达组的 DSS 生存曲线

3 讨论

TPD52L1 分子是肿瘤蛋白家族 D52(tumor protein D52, TPD52) 的成员之一, 该家族蛋白特征结构是 N 端具有相类似的双股卷曲螺旋结构, 成员包括 TPD52(又称 D52、PrLZ、PC-1)、TPD52L1(TPD53、D53)、TPD52L2(TPD54、D54) 和 TPD52L3(TPD55、D55)。第 1 个 D52 样基因被鉴定已过了二十多年,

表3 DSS的多因素生存分析

项目	HR 值	95% CI	P 值	B	SE
TPD52L1					
低表达					
高表达	3.073	1.091 ~ 8.657	0.034	1.123	0.528
肿瘤分级					
低级别					
高级别	8.298	1.081 ~ 63.679	0.042	2.116	1.040
肿瘤 T 分期					
≤T2					
≥T3	6.644	1.893 ~ 23.314	0.003	1.894	0.641
肿瘤 N 分期					
N0					
N1	3.121	1.250 ~ 7.793	0.015	1.138	0.467

其表达的同名蛋白家族成员间可以相互作用^[5],功能涉及细胞增殖、细胞凋亡和囊泡运输。其中研究最多的是 D52,早期研究^[6]显示 D52 最常见的生理作用是调节囊泡运输和外部细胞分泌,通过响应胃壁或胰腺腺泡细胞的分泌刺激而磷酸化。研究表明其在多种癌组织中过表达如乳腺癌^[7]、卵巢癌^[8]、结直肠癌^[9]、前列腺癌等。D52 在前列腺癌中研究较多,结果显示其可显著降低前列腺癌细胞 G0/G1 比例并增加 S 期细胞比例,促进细胞周期进程;抑制雷帕霉素诱导的细胞自噬(可能是通过显著促进 PI3K 家族激酶 mTOR 蛋白下游分子 4E-BP1 水平升高及对细胞周期相关蛋白的调节);通过 wnt/beta-catenin 途径促进 c-myc 基因在前列腺癌细胞中的表达,并促进前列腺癌向激素抵抗型进展;通过磷酸化 Akt/Stat3 并上调 Bcl-2 表达,抑制低雄激素水平诱导的前列腺癌细胞凋亡过程,进而促进肿瘤进展为激素难治性前列腺癌^[10]。最新研究显示在鼻咽癌^[11]和宫颈癌^[12]细胞的体外实验中抑制 TPD52 可抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。

关于 TPD52L1 的研究较少,这种 TPD52 样蛋白是卷曲螺旋基序蛋白,首先通过其在人乳腺癌中的表达被鉴定出来,在结肠癌、卵巢癌和乳腺癌细胞系中表达强烈,被认为代表信号中间体和囊泡运输的调节剂。TPD52L1 可与其他 TPD52 家族成员形成同源二聚体或异二聚体^[5],并参与细胞增殖和钙信号传导。有报道称其在体外增加了突触融合蛋白 1 和 VAMP2 蛋白之间的相互作用,而最重要的研究结果显示其在乳腺癌中高表达并被认为是乳腺癌细胞中的细胞周期调节蛋白,TPD52L1 的表达在乳腺癌细胞的 G2-M 转换时特异性地显著上调,并且在 G2 至早前期的细胞中达到最大值,这与细胞周期蛋白 B1 表达呈平行关系,而其中期降至几乎间期

水平,并且其表达在转录后和翻译后水平均受到调节,这表明 TPD52L1 表达在有丝分裂期间受到严格调节。此外,富集的 G2-M 转换细胞显示 TPD52L1 和 14-3-3 之间的相互作用增加,这是一种负调节 G2-M 转换的衔接蛋白^[13-14]。考虑 TPD52L1 作为与 D52 结构相似且可互相作用的蛋白家族成员,其在泌尿生殖系肿瘤中或存在高表达情况,本研究选用膀胱癌进行实验,通过二步法免疫组化检测到 94.4% 的膀胱尿路上皮癌中有 TPD52L1 的表达,而周围正常尿路上皮细胞普遍呈阴性,随后行 IRS 评分并用 ROC 曲线分为高、低表达组,使用 χ^2 检验分析各组资料显示 TPD52L1 表达水平与肿瘤是否突破膀胱全层相关,之后本研究用单因素生存分析显示膀胱尿路上皮癌的特异性生存率与 TPD52L1 的表达强度有明显相关性,研究最后通过根据多因素生存分析证实了 TPD52L1 的高表达与肿瘤突破膀胱全层、已有淋巴结转移、病理分级为高级别一样可作为膀胱尿路上皮癌预后的独立风险因子,而后者三是公认的膀胱癌预后主要危险因素。

总之,本研究显示膀胱尿路上皮癌组织中 TPD52L1 的表达明显高于正常膀胱尿路上皮组织中的表达,其表达水平的高低与癌组织是否突破膀胱全层相关,并且随着其表达水平的增高,其疾病特异性死亡率上升。本实验研究价值主要在于:① TPD52L1 作为膀胱尿路上皮癌预后的独立危险因素,有望成为新的膀胱癌预后标志;② 术前活检若发现为高表达 TPD52L1 的膀胱尿路上皮癌,提示肿瘤很大可能已突破膀胱全层。本实验不足之处在于总样本数较少,其临床作用需待进一步验证。

参考文献

- [1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Akinyemiju T F, et al. Global, regional and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016: A systematic analysis for the global burden of disease study [J]. JAMA Oncol 2018; 4(11): 1553-68.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin 2016; 66(2): 115-32.
- [3] Carneiro B A, Meeks J J, Kuzel T M, et al. Emerging therapeutic targets in bladder cancer [J]. Cancer Treat Rev 2015; 41(2): 170-8.
- [4] Sikic D, Keck B, Wach S, et al. Immunohistochemical subtyping using CK20 and CK5 can identify urothelial carcinomas of the upper urinary tract with a poor prognosis [J]. PLoS One 2017; 12(6): e0179602.

- [5] Byrne J A ,Nourse C R ,Basset P ,et al. Identification of homo-and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system [J]. *Oncogene* 1998 ,16(7) : 873 – 81.
- [6] Boutros R , Fanayan S , Shehata M ,et al. The tumor protein D52 family: many pieces , many puzzles [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ,325(4) : 1115 – 21.
- [7] Zhang Z ,Wang J ,Gao R ,et al. Downregulation of MicroRNA-449 promotes migration and invasion of breast cancer cells by targeting tumor protein D52(TPD52) [J]. *Oncol Res* 2017 ,25(5) : 753 – 61.
- [8] Shridhar V ,Lee J ,Pandita A ,et al. Genetic analysis of early-versus late-stage ovarian tumors[J]. *Cancer Res* 2001 ,61(15) : 5895 – 904.
- [9] Li J ,Li Y ,Liu H ,et al. The four-transmembrane protein MAL2 and tumor protein D52(TPD52) are highly expressed in colorectal cancer and correlated with poor prognosis[J]. *PLoS One* 2017 ,12(5) : e0178515.
- [10] Li L ,Xie H ,Liang L ,et al. Increased PrLZ-mediated androgen receptor transactivation promotes prostate cancer growth at castration-resistant stage [J]. *Carcinogenesis* 2013 ,34(2) : 257 – 67.
- [11] Zhao X ,Chu J. MicroRNA-379 suppresses cell proliferation , migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma by targeting tumor protein D52 [J]. *Exp Ther Med* 2018 ,16(2) : 1232 – 40.
- [12] Wu Y ,Huang J ,Xu H ,et al. Over-expression of miR-15a-3p enhances the radiosensitivity of cervical cancer by targeting tumor protein D52 [J]. *Biomed Pharmacother* 2018 ,105: 1325 – 34.
- [13] Ross D T ,Scherf U ,Eisen M B ,et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines [J]. *Nature Genet* , 2000 ,24(3) : 227 – 35.
- [14] Boutros R ,Byrne J A. D53(TPD52L1) is a cell cycle-regulated protein maximally expressed at the G2-M transition in breast cancer cells [J]. *Exp Cell Res* 2005 ,310(1) : 152 – 65.

Expression and prognosis of TPD52L1(D53) protein in bladder urothelial carcinoma

Dai Wei¹ ,Liang Chaozhao^{1 2 3} ,Zhang Li^{1 2 3} ,et al

(¹Dept of Urology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022;

²The Urological Institute of Anhui Medical University ,Hefei 230022;

³Anhui Province Key Laboratory of Genitourinary Diseases ,Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To find the expression of TPD52L1 (D53) protein which as a member of tumor protein family D52(TPD52) in bladder urothelial carcinoma and its impact on prognosis. **Methods** Immunohistochemistry (two steps) was used to analyze the expression of TPD52L1 in 72 cases of bladder urothelial carcinoma , and analyzed the correlation between the expression level of TPD52L1 and the prognosis of bladder urothelial carcinoma. **Results** The expression level of TPD52L1 protein in bladder urothelial carcinoma was significantly higher than that in normal urothelial tissue. Univariate survival analysis by Kaplan-Meier showed that the disease specific survival of bladder urothelial carcinoma was significantly correlated with the expression intensity of TPD52L1($P < 0.001$,Log Rank test) . Multivariate survival analysis using Cox regression showed that the high expression of TPD52L1 was an independent risk factor for disease specific death in bladder urothelial carcinoma($HR = 3.073$, $P = 0.034$) . **Conclusion** The expression of TPD52L1 in bladder urothelial carcinoma is significantly higher than that in normal bladder tissue . Moreover , with the increase of its expression level , its disease specific mortality increases , high expression of TPD52L1 is an independent risk factor for the prognosis of bladder urothelial carcinoma.

Key words bladder urothelial carcinoma; TPD52L1; prognosis