

SIRT1 在膀胱癌组织中的表达及临床意义分析

孙玲¹ 赵军¹ 滕昊林¹ 傅耀文¹ 刘念¹

[摘要] 目的:探讨沉默调节蛋白 1(SIRT1)在膀胱癌组织中的表达情况及在肿瘤进展、侵袭、转移中的作用。方法:选取 82 例不同病理分期的膀胱尿路上皮癌患者术后石蜡标本,采用免疫组织化学技术检测癌组织及癌旁正常组织中 SIRT1 的表达,分析其与临床病理特征的关系。另选取 15 例膀胱尿路上皮癌行膀胱根治术患者的癌组织和癌旁组织,应用 Real-Time PCR 技术检测 SIRT1 mRNA 表达水平。结果:SIRT1 的表达水平与临床分期、病理分级及是否转移呈相关性($P < 0.05$),与性别、年龄、是否复发无相关性($P > 0.05$)。癌组织中 SIRT1 mRNA 的表达明显高于癌旁组织的表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:SIRT1 在膀胱癌组织呈高表达,与临床分期及转移相关,有可能作为肿瘤进展的潜在标志物及治疗靶点。

[关键词] 膀胱癌;沉默调节蛋白 1;临床分期;转移

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2019.12.004

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Expression and significance of SIRT1 in bladder urothelial carcinoma

SUN Ling ZHAO Jun TENG Haolin FU Yaowen LIU Nian

(Department of Urology, First Hospital of Jilin University, Changchun, 130021, China)

Corresponding author: LIU Nian, E-mail: nianliu76@163.com

Abstract Objective: To investigate the expression of SIRT1 in bladder urothelial carcinoma and its possible role in the occurrence, progression, invasion and metastasis of bladder urinary epithelial cell carcinoma. **Method:** The expression of SIRT1 was detected by immunohistochemistry in the paraffin sections of 82 patients with different pathological stages of bladder urothelial carcinoma after operation. The correlation between the expression of SIRT1 and clinical pathological characters was explored. SIRT1 mRNA levels in bladder urothelial carcinoma tissues and those adjacent to carcinoma tissues were analyzed by real-time PCR respectively. **Result:** The expression of SIRT1 was positively correlated with pathological grade, clinical stage and metastasis, but not related with sex, age, recurrence. The relative expression of SIRT1 mRNA levels in bladder urothelial carcinoma was significantly higher than that in para cancerous tissues. **Conclusion:** The expression of SIRT1 showed much higher in bladder urothelial carcinoma, and it's related to clinical stages and metastasis. It can probably provide an ideal biomarker for tumor progression and target for therapy of urothelial carcinoma.

Key words bladder cancer; SIRT1; clinical stage; metastasis

膀胱癌的全球发病率占男性恶性肿瘤的第 4 位,我国男性发病率占第 7 位。每年全球接近 43 万人确诊为膀胱癌,90% 的患者确诊时年龄超过 65 岁,全身化疗效果不佳,原发或转移的浸润性膀胱尿路上皮癌的 5 年生存率分别为 33.0% 和 5.4%^[1~3]。沉默调节蛋白 1(SIRT1)是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组蛋白去乙酰化酶,其关键作用是调节衰老,通过减弱炎症及氧化应激反应延缓衰老^[4]。目前关于 SIRT1 在膀胱尿路上皮癌发生、发展和预后中作用报道较少。本研究主要通过免疫组织化学及定量 PCR 方法检测组织标本的蛋白及基因表达水平,结合患者的临床病理资料,探讨其在尿路上皮癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 组织标本

随机选取 2015 年 1 月~2017 年 12 月 82 例于

吉林大学第一医院病理明确为膀胱尿路上皮癌组织的石蜡标本行免疫组织化学检测。选取膀胱根治性切除的癌组织标本和癌旁组织标本(距肿瘤边缘 3~5 cm)15 例行 Real-Time PCR 检测。所有患者均为初治患者,术前均未进行放疗、化疗。术后标本的病理分级按 WHO(2004)病理分级标准执行,临床分期按国际抗癌联盟(UICC)TNM 分期标准执行。

1.2 免疫组织化学染色

石蜡切片标本经二甲苯、乙醇梯度脱蜡至水、内源性过氧化物酶阻断,抗原修复缓冲液中进行高温抗原修复,冷却后山羊血清封闭,一抗孵育过夜,二抗室温孵育 1 h, DAB 显色,复染,封片,显微镜下观察并记录,一抗鼠抗人 SIRT1 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司(1:500),二抗选择 HRP 标记兔抗鼠 IgG 抗体购自北京碧云天生物公司(1:1000)。抗体外试剂均购自武汉博士德生物公司。免疫组织化学染色阳性信号为棕黄色或褐色,在高

¹ 吉林大学第一医院泌尿外科(长春,130021)

通信作者:刘念, E-mail: nianliu76@163.com

倍镜下观察,根据染色阳性细胞数所占百分比计分:阳性细胞数占比为 0 计 0 分;1%~33%计 1 分;34%~66%计 2 分;67%~100%计 3 分。染色强度计分:无着色计 0 分,黄色为弱阳性计 1 分,浅棕色为中等阳性计 2 分,棕褐色为强阳性计 3 分。根据染色强度和阳性细胞数计分之和进行判断:0~2 分为低表达,3~6 分为高表达。

1.3 SIRT1 的 mRNA 的测定

取 50 mg 癌组织或癌旁组织分别加入 1 ml Trizol(Thermo),用组织匀浆机打碎混匀,按照标准的 RNA 提取步骤提取总 RNA。测定 mRNA 浓度后,取 3 μ g mRNA 按逆转录试剂盒 MMLV(In-vitrogen 公司)说明合成 cDNA,sybgreen 试剂盒(ABI 公司)进行基因扩增。引物序列:SIRT1,上游 5'-TGGCAAAGGAGCAGATTAGTAGG-3',下游 5'-CTGCCACAAGAACTAGAGGATAAGAT-3';内参基因 GAPDH,上游 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3',下游 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'。PCR 反应体系(50 μ l):5 μ l cDNA、25 μ l Master Mix、18 μ l RNase-free ddH₂O、1 μ l 上游目的引物和 1 μ l 下游目的引物。

PCR 反应条件:50℃ 2 min,95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验或 t' 检验(检验前均对变量行正态性和方差齐性分析);计数资料以例(%)表示,比较采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

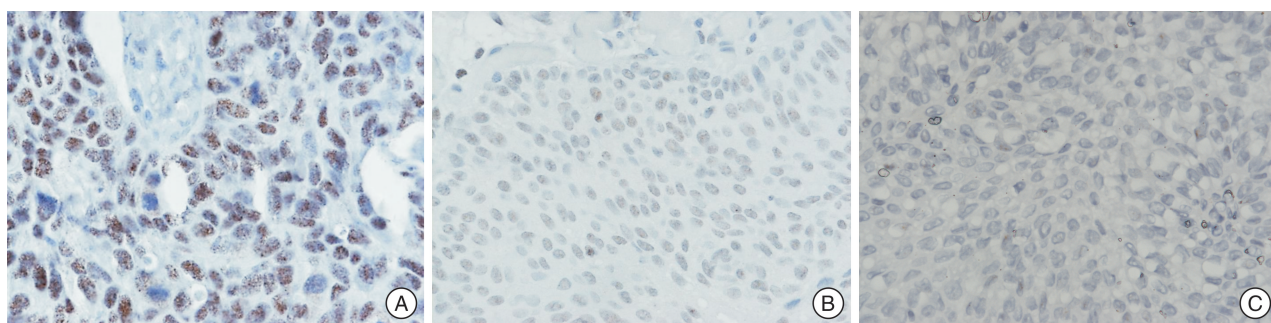
2 结果

2.1 膀胱尿路上皮癌 SIRT1 的表达与临床病理特征的关系

膀胱尿路上皮癌 SIRT1 表达主要集中在细胞核内,部分细胞胞浆中也有少量表达,见图 1。SIRT1 的表达与肿瘤的病理分级、临床分期以及是否转移呈相关性($P < 0.05$),与年龄、性别、是否复发无相关性($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 SIRT1 在膀胱尿路上皮癌组织及癌旁正常组织 mRNA 表达水平

Real-Time PCR 结果显示癌组织 SIRT1 mRNA 表达显著高于癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



A:SIRT1 高表达组;B:SIRT1 低表达组;C:SIRT1 无表达组。

图 1 免疫组织化学检测 SIRT1 在不同膀胱尿路上皮癌组织样本中的表达情况($\times 400$)

3 讨论

SIRT1 在不同的肿瘤中具有相反的作用,一方面可以通过抑制炎症、减少肿瘤血管生成等阻止肿瘤进展,另一方面可以通过调节肿瘤相关基因、维持肿瘤干细胞存活等促进肿瘤的增殖及转移^[5~7]。在乳腺癌、胃癌、结肠癌等多种实体肿瘤中 SIRT1 均起到促进肿瘤生长的作用,它可使 p53 去乙酰化,抑制 p53 依赖性的细胞周期停滞及凋亡^[8]。SIRT1 通过增加 DNA 损伤修复而维持基因组稳定性,进而促进肿瘤细胞增殖和抗凋亡作用。

膀胱癌是一个多因素、多步骤的复杂变化过程,与多种环境因素有关。特异性膀胱癌相关分子生物标记物能提高膀胱癌早期诊疗敏感性和特异性^[9]。目前,关于 SIRT1 在膀胱癌中的研究甚少。蓝宇等^[10]报道了 SIRT1 在膀胱尿路上皮癌的表达,

初步证实了 SIRT1 与病理分级和临床分期的关系。为了进一步明确 SIRT1 在膀胱癌不同病理分级及临床分期组织中的表达特点,以及其与复发和转移的关系,本研究对 82 例临床标本进行了免疫组织化学的检测,结果显示:SIRT1 的表达水平在不同病理特征的标本中存在差异,病理级别越高、临床分期晚的患者 SIRT1 的表达水平高,提示 SIRT1 在膀胱癌中可能起到促进肿瘤生长及浸润的作用。SIRT1 的表达对预示膀胱癌的恶性程度、临床进展可能具有一定的参考价值。本研究同时发现在发生转移与未发生转移的膀胱癌样本中 SIRT1 表达存在显著差异,这也进一步提示 SIRT1 对膀胱癌的侵袭和转移也起到重要的促进作用。有研究发现,SIRT1 在部分肿瘤上皮间质转化的过程中具有调节作用^[11~14]。下调 SIRT1 能够增加

表 1 SIRT1 在膀胱尿路上皮癌组织中表达水平与临床病理特征间的关系 例(%)

分组	例数 (n=82)	SIRT1 表达		P 值
		低表达	高表达	
年龄/岁				0.597
>55	53(64.6)	26(31.7)	27(32.9)	
≤55	29(35.4)	16(19.5)	13(15.9)	
性别				0.740
男	69(84.1)	39(47.6)	30(36.5)	
女	13(15.9)	8(9.8)	5(6.1)	
病理分级				0.014
G ₁	27(32.9)	20(24.4)	7(8.5)	
G ₂ ~G ₃	55(67.1)	25(30.5)	30(36.6)	
临床分期				0.031
T _a ~T ₁	45(54.8)	29(35.3)	16(19.5)	
T ₂ ~T ₄	37(45.2)	15(18.4)	22(26.8)	
是否复发				0.176
是	24(29.3)	11(13.4)	13(15.9)	
否	58(71.7)	36(43.9)	22(26.8)	
是否转移				0.019
是	21(25.6)	8(9.8)	13(15.8)	
否	61(74.4)	41(50.0)	20(24.4)	

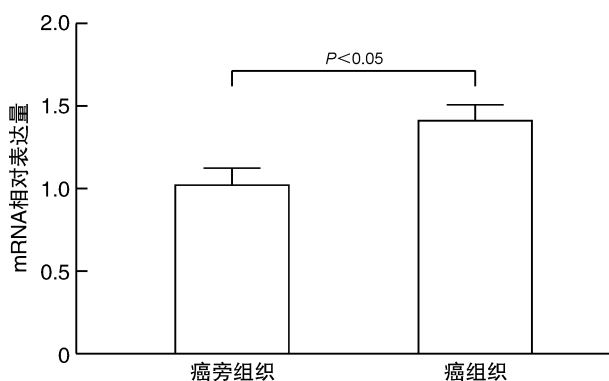


图 2 Real-time PCR 检测 SIRT1 在膀胱尿路上皮癌组织及癌旁正常组织中的表达

细胞间的黏附作用,降低肿瘤细胞的侵袭力,减弱 Wnt 信号通路下游蛋白的表达,从而抑制 Wnt 介导的细胞迁移。

在明确 SIRT1 蛋白表达情况基础上,为探讨膀胱癌中 SIRT1 基因转录水平的差异,本研究对膀胱癌组织及癌旁正常组织的 mRNA 进行了检测,结果提示,肿瘤组织 SIRT1 mRNA 水平明显高于癌旁正常组织。SIRT1 在调节基因表达的同时,自身也受到肿瘤相关基因的调节,研究证实细胞癌基因 c-Myc 可结合于 SIRT1 的启动子并诱导其表达,miRNA 对 SIRT1 表达也具有调节作用^[15,16]。

综上所述,SIRT1 在膀胱癌组织中呈高表达,表达水平与病理分级、临床分期、是否转移密切相关,提示其在膀胱癌的发展中具有一定作用,其具体机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- 1 黄传书,蒋国松,黄超.膀胱癌治疗基础及临床转化研究的前沿和热点[J].临床泌尿外科杂志,2017,32(10):735-740.
- 2 DeSantis C E, Lin C C, Mariotto A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(4):252-271.
- 3 陈万青,郑荣寿,张思维,等.2013 年中国老年人群恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中华肿瘤杂志,2017,39(2):60-66.
- 4 Della-Morte D, Ricordi C, Rundek T. The fountain of youth: role of sirtuins in aging and regenerative medicine[J]. Regen Med, 2013, 8(6):681-683.
- 5 Yang H, Bi Y, Xue L, et al. Multifaceted modulation of SIRT1 in cancer and inflammation[J]. Crit Rev Oncog, 2015, 20(12):49-64.
- 6 Wang Q, Yan C, Xin M, et al. Sirtuin 1 (Sirt1) Overexpression in BaF3 Cells Contributes to Cell Proliferation Promotion, Apoptosis Resistance and Pro-Inflammatory Cytokine Production[J]. Med Sci Monit, 2017, 23:1477-1482.
- 7 Suzuki M, Bartlett J D. Sirtuin1 and autophagy protect cells from fluoride-induced cell stress[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(2):245-255.
- 8 Yi J, Luo J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804(8):1684-1689.
- 9 刘正升,陈磊,邢金春.膀胱癌新型基因和生物标记物研究进展[J].临床泌尿外科杂志,2017,32(2):157-160.
- 10 蓝宇,刘东东,林明恩,等.沉默信息调节因子 1 在膀胱尿路上皮癌中的表达与意义[J].癌症畸变突变,2015,27(2):125-128.
- 11 Byles V, Zhu L, Lovaas J D, et al. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis[J]. Oncogene, 2012, 31(43):4619-4629.
- 12 Hao C, Zhu P X, Yang X, et al. Overexpression of SIRT1 promotes metastasis through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014, 14:978.
- 13 Palmirotta R, Cives M, Della-Morte D, et al. Sirtuins and Cancer: Role in the Epithelial-Mesenchymal Transition[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:3031459.
- 14 Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. Ac-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation[J]. J Cell Biol, 2009, 185(2):203-211.
- 15 Li J, Dong G, Wang B, et al. MiR-543 promotes gastric cancer cell proliferation by targeting SIRT1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 469(1):15-21.
- 16 Zhang L, Wang X, Chen P, et al. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial-mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells[J]. BMC Cancer, 2013, 13:290-298.

(收稿日期:2018-10-12)