

MTHFD2 在非肌层浸润性膀胱癌中的表达及其临床意义^{*}

刘新城¹ 黄海花² 彭友彬¹ 黎明¹ 郑俊鸿¹ 林浩¹

[摘要] 目的:了解亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2(MTHFD2)在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达情况及其与肿瘤病理参数及患者预后的关系。方法:通过挖掘 GEPIA 数据库,分析 MTHFD2 mRNA 在膀胱癌组织中的表达情况及其表达水平与患者预后的关系;同时,采用免疫组织化学染色方法检测非肌层浸润性膀胱癌组织中 MTHFD2 蛋白的表达情况,并采用统计学方法进一步分析其表达水平与肿瘤病理参数及患者预后的关系。结果:MTHFD2 mRNA 在膀胱癌组织中的表达水平较癌旁组织明显升高,MTHFD2 蛋白在非肌层浸润性膀胱癌中的表达水平亦显著高于非癌组织($P<0.05$);非肌层浸润性膀胱癌组织中 MTHFD2 蛋白表达水平与肿瘤大小、肿瘤数目、病理分期以及复发等病理参数相关($P<0.05$);MTHFD2 高表达的膀胱癌患者术后无瘤生存率更低($P<0.05$)。结论:膀胱癌组织中 MTHFD2 高表达提示患者预后不良,有可能成为一个全新的预测膀胱癌患者预后的生物标志物。

[关键词] 膀胱癌;亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2,人;表达;病理参数;预后

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.12.006

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Expression of MTHFD2 and its clinical significance in non-muscle-invasive bladder cancer

LIU Xincheng¹ HUANG Haihua² PENG Youbin¹ LI Ming¹
ZHENG Junhong¹ LIN Hao¹

(¹Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou, Guangdong, 515065, China;² Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College)

Corresponding author: LIN Hao, E-mail: linh26@mail2.sysu.edu.cn

Abstract Objective: To investigate the expression of MTHFD2 in non-muscle-invasive bladder cancer and analyze its relationship with clinicopathological and prognosis of patients. **Method:** The expression of MTHFD2 mRNA in bladder cancer tissues and its relationship with prognosis were analyzed by mining GEPIA database. Meanwhile, the expression of MTHFD2 protein in non-muscle-invasive bladder cancer tissues was detected by immunohistochemical staining, and its relationship with pathological parameters of tumor and prognosis of patients were further analyzed by statistical methods. **Result:** The expression of MTHFD2 mRNA in bladder cancer tissues was significantly higher than that in paracancerous tissues, and the expression level of MTHFD2 protein in non-muscle-invasive bladder cancer tissues was also significantly higher than that in non-cancer tissues ($P<0.05$). Besides, the expression level of MTHFD2 protein in non-muscle-invasive bladder cancer tissues was correlated with pathological parameters such as tumor size, number of tumors, pathological stage and recurrence, and negatively related to postoperative tumor-free survival rate of patients ($P<0.05$). **Conclusion:** High expression of MTHFD2 in bladder cancer tissue indicates poor prognosis of patients, which may be a new biomarker for predicting prognosis of patients with bladder cancer.

Key words bladder cancer; methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, human; expression; pathological parameters; prognosis

膀胱癌是泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤,严

重危害人们的身体健康,近十余年来,我国膀胱癌的发病率呈逐年增高的趋势,而死亡率仍居高不下^[1]。按病理分型膀胱癌可以分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌,有研究表明 50%~70%的非肌层浸润性膀胱癌会出现复发,且有 10%~20%会进展为肌层浸润性膀胱癌,这严重影响膀胱癌患者的预后^[2]。如何在早期预测哪些患

^{*}基金项目:广东省医学科学技术研究基金(No:B2018267、A2018053);广东省自然科学基金项目(No:2018A030307047);汕头市科技计划项目(No:180709154010294)

¹汕头大学医学院第二附属医院泌尿外科(广东汕头,515065)

²汕头大学医学院第二附属医院病理科

通信作者:林浩,E-mail:linh26@mail2.sysu.edu.cn

者有可能会进展为肌层浸润性膀胱癌是目前改善膀胱癌患者预后的重要研究方向。得益于分子生物学的技术的进步,研究者们发现了许多与膀胱癌发生、发展及转移相关的癌基因,让我们对膀胱癌的发病机制及其治疗有了新的认识^[3-5]。然而,目前我们仍未能找到一种能够有效监测膀胱癌进展的指标或系统,为此,我们有必要继续努力去研究与膀胱癌进展相关的生物标志物,进一步阐明膀胱癌发生、发展的机制。

亚甲基四氢叶酸脱氢酶 2 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2, MTHFD2) 是一碳代谢的关键酶之一^[6], 1960 年首次在埃利希腹水肿瘤细胞中被发现^[7]。越来越多的研究结果显示在多种肿瘤组织中 MTHFD2 均存在过表达现象,且其表达水平与肿瘤患者的预后呈负相关^[8]; MTHFD2 可促进肿瘤细胞的增殖及侵袭能力,进而促进肿瘤的发生、发展^[9]。然而截至目前, MTHFD2 在膀胱癌中的表达情况及其作用尚缺乏较全面的研究,本研究拟探索 MTHFD2 在膀胱癌中的表达情况及其与肿瘤病理参数及患者预后的关系,并初步探讨其在膀胱癌发生、发展中的作用,为膀胱癌的监测治疗提供新方向。

1 资料与方法

1.1 GEPIA 数据库数据提取

GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 是由北京大学研制开发的用于整合分析癌症表达谱数据的交互式 web 服务器,包含来自 TCGA 和 GTEx 的 33 种恶性肿瘤 9736 个肿瘤样本和 8587 个正常样本的 RNA 测序表达数据^[10]。在本研究中使用 GEPIA 数据库通过“Expression on Box Plots”模块了解 MTHFD2 mRNA 在膀胱癌中的表达情况,然后应用“Survival Plots”模块进一步分析 MTHFD2 mRNA 与膀胱癌临床分期及生存预后之间的关系。

1.2 临床资料

随机选取 2015 年 1 月~2018 年 12 月在汕头大学医学院第二附属医院泌尿外科住院治疗的 55 例膀胱癌患者,其中男 46 例,女 9 例;≤60 岁 29 例, >60 岁 26 例;有吸烟史 27 例,无吸烟史 28 例;肿瘤单发 33 例,肿瘤多发 22 例;肿瘤直径≤2 cm 者 21 例,肿瘤直径≥2 cm 者 34 例;病理分级 I~II 级者 37 例, III 级者 18 例(病理分级采用 WHO2004 分级法)。纳入标准:①手术治疗的初发非肌层浸润性膀胱癌患者;②手术方式为经尿道膀胱肿瘤电切术;③术前未行膀胱灌注化疗等其他治疗;④术后病理证实为膀胱尿路上皮癌;⑤临床资料完整。排除标准:①合并其他器官恶性肿瘤;②术前曾行化疗、放疗,包括新辅助化疗;③合并膀

胱结石。研究中所使用的癌组织标本为肿瘤组织,非癌组织为肿瘤基底,标本经病理证实未见癌细胞。所有患者术后 2 年内每 3 个月复查 1 次,2 年后每半年复查 1 次;复查主要检查为泌尿系彩超或膀胱镜检查。本研究获汕头大学医学院第二附属医院伦理委员会审查通过,且所有患者均知情同意。

1.3 主要试剂及设备

MTHFD2 多克隆抗体购自美国 abcam 公司(ab151447);免疫组化检测试剂盒购自福州迈新生物科技公司(KIT-9901)。

1.4 免疫组织化学染色检测 MTHFD2 在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达

组织标本经 10% 中性甲醛固定 24 h 后梯度酒精脱水,透明、浸蜡后再石蜡包埋、切片;之后再将准备好的切片置于 60℃ 烤箱内 2 h,二甲苯脱蜡后梯度酒精水化,微波抗原修复 15 min,过氧化氢阻断及血清封闭后,于 4℃ 冰箱内一抗孵育过夜(抗体稀释比例为 1:200);次日再孵育二抗, DAB 显色,显微镜下显色满意后苏木素染核,梯度酒精脱水并二甲苯透明后用中性树胶封片。

1.5 免疫组织化学染色结果判定

每例标本均由 2 位病理科医师独立阅片。MTHFD2 定位于线粒体,为胞浆染色,我们定义胞浆被染色为浅棕色至深褐色的膀胱癌细胞为阳性细胞,评分方法如下:先按照着色强度,对肿瘤组织进行评分;无着色记为 0 分,轻度着色记为 1 分,深度着色记为 2 分;然后评估阳性细胞占总体细胞的比例, <10% 记为 1 分, 10%~50% 记为 2 分, >50% 记为 3 分;最后,取染色强度以及阳性细胞分布得分的乘积为 MTHFD2 表达情况。根据上述方法对每个样本进行计分,总分 0~6 分,定义: <2 分为阴性表达, ≥2 分为阳性表达。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行分析, MTHFD2 蛋白表达水平与膀胱癌临床病理参数及复发的关系采用 χ^2 检验,膀胱癌组织中 MTHFD2 的表达水平与患者术后无复发生存率的比较采用 Kaplan-Meier 生存分析。本研究中,检验水准 α 取 0.05,采用双侧性检验。

2 结果

2.1 MTHFD2 mRNA 在膀胱癌组织与正常组织中的表达差异

通过挖掘 GEPIA 数据库,我们发现 MTHFD2 mRNA 在膀胱癌组织中的表达水平高于正常组织,但两者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 1。

2.2 MTHFD2 mRNA 与膀胱癌临床病理分期及患者预后的关系

在 GEPIA 中分析 MTHFD2 mRNA 与膀胱

癌临床病理分期的关系,我们发现,MTHFD2 mRNA 在膀胱癌Ⅲ期和Ⅳ期患者中的表达较Ⅱ期患者显著升高($P<0.05$),见图 2;同时,利用 GEPIA 数据库生存分析功能发现,MTHFD2 mRNA 高表达组膀胱癌患者的总体生存率明显低于 MTHFD2 mRNA 低表达组($P<0.05$),见图 3。

2.3 MTHFD2 蛋白在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达情况及其与肿瘤病理参数的关系

免疫组化结果显示(图 4),在 55 例非肌层浸润性膀胱癌患者中,40 例患者癌组织中的 MTHFD2 蛋白为阳性表达,阳性率为 72.7%,而在对应的非

癌旁组织中,只有 14.5%的患者表达为阳性,两者比较差异有统计学意义($P=0.000$);通过进一步分析我们发现,膀胱癌组织中 MTHFD2 蛋白表达水平与肿瘤大小、肿瘤数目、病理分期以及复发等病理参数相关($P<0.05$)。表 1。

2.4 膀胱癌组织中 MTHFD2 蛋白的表达与患者生存预后的关系

通过生存分析我们发现,MTHFD2 蛋白阳性表达组的膀胱癌患者的术后无瘤生存时间短于阴性表达组,两者比较差异有统计学意义[(36.3±2.7)个月 vs. (49.5±2.3)个月, $P=0.029$]。见图 5。

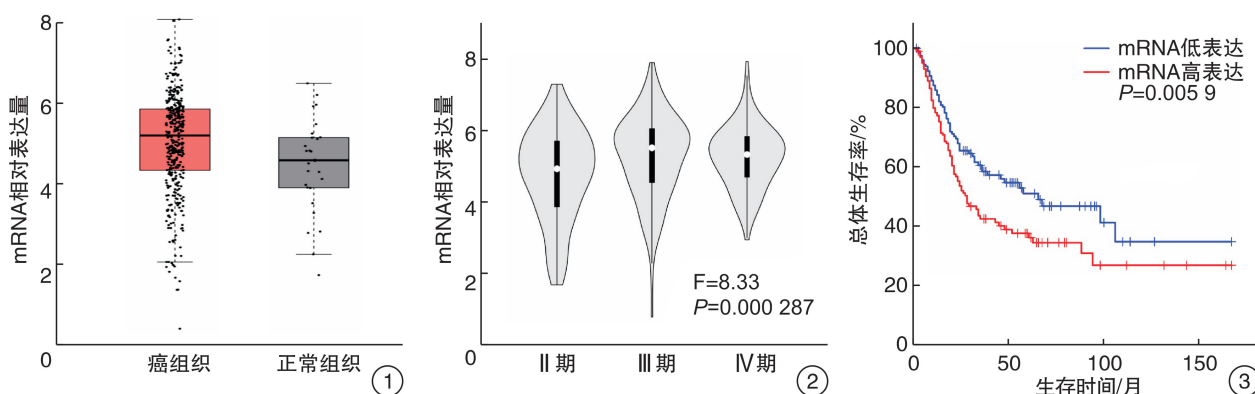
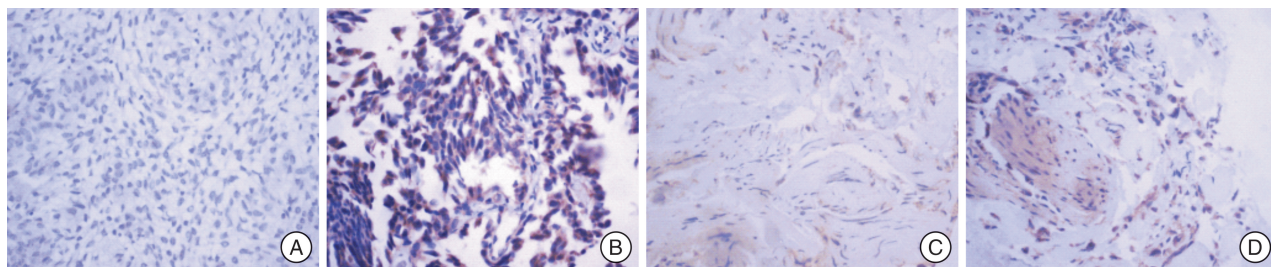


图 1 GEPIA 数据库中 MTHFD2 mRNA 在膀胱癌组织与正常组织中的表达差异;图 2 MTHFD2 mRNA 与膀胱癌临床病理分期;图 3 MTHFD2 mRNA 与膀胱癌生存曲线



A、B:膀胱癌组织中 MTHFD2 蛋白阴性及阳性表达;C、D:非癌组织 MTHFD2 蛋白阴性及阳性表达。

图 4 MTHFD2 蛋白在膀胱癌组织与非癌组织中的表达情况

3 讨论

在体内,MTHFD2 可参与叶酸代谢产物间的转化,MTHFD2 表达水平的改变可影响细胞内的正常叶酸代谢,并影响细胞内核酸甲基化水平,从而导致染色体复制过程中的不稳定,增加基因突变的概率,诱发或促进肿瘤的发生发展^[6,11]。在前期研究中,我们发现 MTHFD2 在肝细胞癌中为高表达,且 MTHFD2 的表达水平与肝癌的 TNM 分期、微癌栓以及肿瘤的复发、转移有显著相关性,通过随访我们还发现 MTHFD2 高表达的患者预后往往也较差;此外,敲低肝癌细胞中 MTHFD2 的表达后,肝癌细胞的迁移及侵袭能力均显著下降^[12],

在肾癌中我们亦得到相似的结果^[13]。而 Andrew 等^[14]通过基因分析发现 MTHFD2 高表达的人群患膀胱癌的可能性增加,且和患者的预后呈负相关。

在本研究中,我们发现 MTHFD2 在膀胱癌中的表达水平显著高于对应的非癌组织,且和膀胱癌患者的预后呈负相关,这和 MTHFD2 在其他肿瘤组织中的表达情况是一致的^[8,15];进一步统计学分析提示 MTHFD2 的表达与膀胱癌患者的肿瘤大小、数目、病理分期以及术后是否复发相关,但与患者性别、年龄、是否有吸烟史以及肿瘤部位无明显相关;此外,生存分析提示 MTHFD2 高表达的患

者预后往往也较差。这说明 MTHFD2 可能与膀胱癌的进展相关,有可能是一个预测膀胱癌进展风险的理想分子标志物和肿瘤治疗靶点。

表 1 MTHFD2 蛋白在膀胱癌组织中的表达与患者临床病理参数的关系

临床病理参数	MTHFD2 蛋白表达		P
	阴性	阳性	
性别			0.392
男	11	35	
女	4	5	
年龄/岁			0.581
≤60	7	22	
>60	8	18	
吸烟史			0.700
无	8	19	
有	7	21	
肿瘤大小/cm			0.041
≤2	9	12	
>2	6	28	
肿瘤数目/个			0.013
1	13	20	
>1	2	20	
病理分级/级			0.004
I+II	15	22	
III	0	18	
肿瘤部位			0.496
膀胱三角区	5	8	
非膀胱三角区	10	32	
术后复发			0.028
否	14	23	
是	1	17	

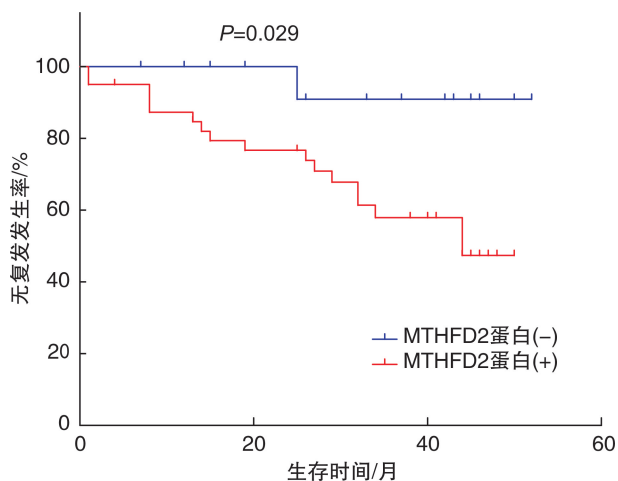


图 5 不同 MTHFD2 蛋白表达水平与膀胱癌患者术后生存预后的关系

既往研究表明,在胚胎、转化细胞和未分化的细胞中均存在 MTHFD2 的活动,而在正常组织细胞中没有 MTHFD2 的活动^[16]。然而,在本研究过程中我们发现,并不是所有的膀胱癌组织均存在 MTHFD2 过表达现象,此外,并不是所有术后出现复发的膀胱癌患者肿瘤组织内 MTHFD2 均为过表达。同时,通过 Cox 多因素回归分析分析我们发现, MTHFD2 过表达并不是影响膀胱癌患者术后的独立危险因素,我们认为这可能主要与样本数不足和不同患者间存在的个体差异有关。因此,为进一步阐明 MTHFD2 在膀胱癌发生、发展中的作用,还需要后续进一步的研究来补充。

[参考文献]

- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132.
- Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer [J]. Lancet, 2009, 374 (9685): 239-249.
- Han J, Wang JZ, Yang X, et al. METTL3 promote tumor proliferation of bladder cancer by accelerating pri-miR221/222 maturation in m6A-dependent manner [J]. Mol Cancer, 2019, 18 (1): 110.
- Chakraborty A, Dasari S, Long W, et al. Urine protein biomarkers for the detection, surveillance, and treatment response prediction of bladder cancer [J]. Am J Cancer Res, 2019, 9 (6): 1104-1117.
- 陈庭, 潘鹏, 张艳敏, 等. 锌指 E-盒结合同源异形盒-1 在膀胱癌细胞中的表达及对肿瘤细胞侵袭的影响 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2018, 33 (2): 132-136.
- Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease [J]. Cell Metab, 2017, 25 (1): 27-42.
- Scrimgeour KG, Huennekens FM. Occurrence of a dnp-linked, n5, n10-methylene tetrahydrofolic dehydrogenase in ehrlich ascites tumor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1960, 2 (3): 230-233.
- Nilsson R, Jain M, Madhusudhan N, et al. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3128.
- Lin H, Huang B, Wang H, et al. MTHFD2 Overexpression Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma and is Associated with Cell Proliferation and Vimentin-Modulated Migration and Invasion [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51 (2): 991-1000.
- Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (W1): W98-W102.

(下转第 970 页)

- 5 Bush NC, Snodgrass W. Pre-incision urethral plate width does not impact short-term Tubularized Incised Plate urethroplasty outcomes[J]. J Pediatr Urol, 2017, 13(6):625. e1—625. e6.
- 6 Khalil M, Gharib T, El-Shaer W, et al. Mathieu technique with incision of the urethral plate versus standard tubularised incised-plate urethroplasty in primary repair of distal hypospadias: A prospective randomised study [J]. Arab J Urol, 2017, 15(3):242—247.
- 7 Snodgrass W, Bush N. Is distal hypospadias repair mostly a cosmetic operation? [J]. J Pediatr Urol, 2018, 14(4):339—340.
- 8 Snodgrass W, Bush NC. Re-operative urethroplasty after failed hypospadias repair; how prior surgery impacts risk for additional complications [J]. J Pediatr Urol, 2017, 13(3):289. e1—289. e6.
- 9 Ozturun K, Bagbanci S, Dadali M, et al. A retrospective analysis of mathieu and tip urethroplasty techniques for distal hypospadias repair; a 20 year experience[J]. Arch Esp Urol, 2017, 70(7):679—687.
- 10 Alshafei A, Cascio S, Boland F, et al. Comparing the outcomes of tubularized incised plate urethroplasty and dorsal inlay graft urethroplasty in children with hypospadias; a systematic review and meta-analysis[J]. J Pediatr Urol, 2020, 16(2):154—161.
- 11 Winberg H, Anderberg M, Arnbjörnsson E, et al. Tubularized incised plate (TIP) repair improves outcome of hypospadias repair[J]. J Surg, 2016, 4:1—4.
- 12 Duan S, Jiang X, Zhang X, et al. Megameatus intact prepuce treated with urethral plate-preserving surgery: a retrospective study of an unusual hypospadias variant [J]. Transl Androl Urol, 2019, 8(6):583—590.
- 13 Turkyilmaz Z, Karabulut R, Atan A, et al. Redo Hypospadias Repair: Comparison of Three Different Methods [J]. Urol Int, 2020, 104(5—6):391—395. .
- 14 Aguilera-Pujabet M, Gander R, Royo GF, et al. Is the Mathieu urethroplasty a useful technique for urethrocuteaneous fistula repair after hypospadias surgery? [J]. Cir Pediatr, 2018, 31(4):176—181.
- 15 Winberg H, Arnbjörnsson E, Anderberg M, et al. Post-operative outcomes in distal hypospadias; a meta-analysis of the Mathieu and tubularized incised plate repair methods for development of urethrocuteaneous fistula and urethral stricture [J]. Pediatr Surg Int, 2019, 35(11):1301—1308.

(收稿日期:2019-12-12)

(上接第 966 页)

- 11 Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases[J]. Gene, 2014, 533(1):11—20.
- 12 Liu X, Huang Y, Jiang C, et al. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 overexpression is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Dig Liver Dis, 2016, 48(8):953—960.
- 13 Lin H, Huang B, Wang H, et al. MTHFD2 Overexpression Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma and is Associated with Cell Proliferation and Vimentin-Modulated Migration and Invasion[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(2):991—1000.
- 14 Andrew AS, Gui J, Sanderson AC, et al. Bladder cancer SNP panel predicts susceptibility and survival[J]. Hum Genet, 2009, 125(5—6):527—539.
- 15 Green NH, Galvan DL, Badal SS, et al. MTHFD2 links RNA methylation to metabolic reprogramming in renal cell carcinoma [J]. Oncogene, 2019, 38(34):6211—6225.
- 16 Mejia NR, MacKenzie RE. NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase is expressed by immortal cells[J]. J Biol Chem, 1985, 260(27):14616—14620.

(收稿日期:2020-03-29)