

膀胱癌病理分级与 PGAP2 基因表达的相关性及分子生物学关系的研究

刘玉璽¹ 宋颖刚¹ 高昆¹ 高双友²

[摘要] 目的:检测不同病理分级膀胱癌患者组织 PGAP2 表达水平,并探讨其表达水平与膀胱癌病理分级及分子生物学关系。方法:选取 2011 年 8 月—2015 年 4 月于开滦总医院林西医院住院的 78 例膀胱癌患者肿瘤组织作为肿瘤组,膀胱癌患者均为尿路上皮癌,组织学分级按照 WHO 分级标准:I 级 24 例、II 级 29 例、III 级 25 例;根据膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 水平平均值,将患者分为 PGAP2 高表达组($n=39$)和 PGAP2 低表达组($n=39$);根据患者出院后 5 年内是否出现复发或因膀胱癌死亡,将患者分为预后良好 46 例和预后不良 32 例。选取膀胱癌患者相应癌旁正常组织作为正常组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测膀胱癌肿瘤组织及癌旁正常组织 PGAP2 mRNA 水平;Ualcan 数据库检索验证 PGAP2 在正常膀胱组织及膀胱癌肿瘤组织中的表达;分析肿瘤组织 PGAP2 mRNA 水平与膀胱癌患者病理分级等临床病理特征的关系;多因素 Cox 回归分析影响膀胱癌预后的因素。结果:肿瘤组 PGAP2 mRNA 水平高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),与 Ualcan 数据库结果一致;PGAP2 高表达组肿瘤多发,组织浸润深度为肌层浸润性膀胱癌、预后不良的患者比例均高于 PGAP2 低表达组,差异有统计学意义($P<0.05$);肿瘤组织 PGAP2 表达水平与膀胱癌病理组织学分级有关,差异有统计学意义($P<0.05$);病理分级、PGAP2 是影响膀胱癌预后的独立危险因素($P<0.05$)。结论:膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 表达水平与病理分级等临床病理特征密切相关,且是影响膀胱癌预后的独立危险因素,可对膀胱癌的病情评价及治疗提供一定理论依据。

[关键词] 膀胱癌;病理分级;肿瘤组织;PGAP2 基因

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2021.05.009

[中图分类号] R737.14 **[文献标志码]** A

Study on the relationship between PGAP2 gene expression and pathological grade of bladder cancer and molecular biology

LIU Yuzan¹ SONG Yinggang¹ GAO Kun¹ GAO Shuangyou²

(¹Department of Urology, Linxi Hospital of Kailuan General Hospital, Tangshan, Hebei, 063100, China; ²Department of Urology, Kailuan General Hospital)

Corresponding author: GAO Shuangyou, E-mail: gaoshuangyou@163.com

Abstract Objective: To detect the expression level of PGAP2 in different pathological grades of bladder cancer, and to explore the relationship between the expression level and pathological grades and molecular biology of bladder cancer. **Methods:** From August 2011 to April 2015, bladder cancer tissues from 78 patients in Linxi Hospital of Kailuan General Hospital were selected as tumor group, and all bladder cancer patients were urothelial cancer. According to WHO classification standard, the histological classification was: 24 cases of grade I, 29 cases of grade II, 25 cases of grade III. According to the average level of PGAP2 mRNA in bladder cancer, the patients were divided into two groups: PGAP2 high expression group ($n=39$) and PGAP2 low expression group ($n=39$). According to the recurrence or death of bladder cancer within 5 years after discharge, the patients were divided into 46 with good prognosis and 32 with poor prognosis. The normal tissues adjacent to the bladder cancer were selected as the normal group. The level of PGAP2 mRNA in tumor tissue of bladder cancer and normal tissues adjacent to the bladder cancer were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and the expression of PGAP2 in normal bladder tissue and bladder cancer tissue were verified by the search of Ualcan database. The relationship between PGAP2 mRNA level in tumor tissue and clinicopathological characteristics of bladder cancer patients was analyzed, and multivariate Cox regression was used to analyze the prognostic factors of bladder cancer. **Results:** The level of PGAP2 mRNA in tumor group was higher than that in normal group. The difference was statistically significant ($P<0.05$), which was consistent with the result of Ualcan database. The proportions of patients with multiple tumors, infiltration depth of muscle layer invasive bladder cancer and poor prognosis in PGAP2 high expression group were higher than those in PGAP2 low expression group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression level of PGAP2 was related to the histopatho-

¹ 开滦总医院林西医院泌尿外科(河北唐山,063100)

² 开滦总医院泌尿外科

通信作者:高双友, E-mail: gaoshuangyou@163.com

logical grade of bladder cancer, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Pathological grade and PGAP2 were independent risk factors for prognosis of bladder cancer ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression level of PGAP2 in bladder cancer tissues is closely related to the clinicopathological characteristics such as pathological grade, and is an independent risk factor for the prognosis of bladder cancer. It can provide a theoretical basis for the evaluation and treatment of bladder cancer.

Key words bladder cancer; pathological grade; tumor tissue; PGAP2 gene

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,大多数膀胱癌为移行尿路上皮细胞癌,易发生转移,恶性程度较高,主要治疗措施为全身化疗、膀胱全切等^[1-2]。膀胱癌的生物学特性表现为易多发、复发、浸润、转移^[3]。目前关于膀胱癌的研究焦点是正常组织与肿瘤组织中的基因差异表达,基因差异表达与膀胱癌分级、分期、复发等的相关性,即它们在膀胱癌发展过程中所起的分子生物学特性改变^[4-5]。研究表明,PGAP2 基因是与癌症转移风险密切相关的关键基因,可为胃癌精准诊疗和预后评估提供分子靶点,同时也是临床检测中的潜在生物学标记物^[6]。但目前并无关于 PGAP2 基因表达与膀胱癌相关性的研究,因此,本研究通过检测膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 表达水平,探讨其水平与病理分级等临床病理特征的关系,以期对疾病的病情评价、治疗及预后评估提供一定参考依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2011 年 8 月—2015 年 4 月于开滦总医院林西医院住院的 78 例膀胱癌患者肿瘤组织作为肿瘤组,膀胱癌患者均为尿路上皮癌,均进行根治性膀胱切除术,组织学分级按照 WHO 分级标准^[7]: I 级 24 例、II 级 29 例、III 级 25 例。其中男 61 例,女 17 例;年龄 50~78 岁,平均 (62.43 ± 10.26) 岁。根据患者出院后 5 年内是否出现复发或因膀胱癌死亡,将患者分为预后良好 46 例和预后不良 32 例。选取膀胱癌患者相应癌旁正常组织作为正常组。本研究经开滦总医院林西医院伦理委员会批准。

1.2 纳入及排除标准

纳入标准:①根据病理组织学检查及膀胱镜检查确诊,符合诊断标准^[8];②临床资料记录清晰者;③术前均未进行任何化学治疗、放射治疗或免疫治疗

者;④所有患者均为自愿参加,签署知情同意书。排除标准:①伴有严重心血管疾病者;②妊娠期及哺乳期妇女;③合并其他类型恶性肿瘤者;④同时参与其他研究者。

1.3 主要试剂与仪器

RNA 提取试剂盒(货号:R1200),购自上海恒斐生物科技有限公司;miScript SYBR[®] Green qPCR Kit 荧光定量 PCR 试剂盒(货号:218073),购自德国 QIAGEN 公司;反转录试剂盒(货号:ALH266-PTO),购自北京百奥莱博科技有限公司。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)仪(型号:7500),购自美国 ABI 公司。

1.4 研究方法

1.4.1 样品采集及保存 采集膀胱癌患者手术时的肿瘤组织及相应癌旁正常组织。所有组织标本做相应处理,包括 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、连续切片,置于 -80°C 保存待测。

1.4.2 qRT-PCR 法检测膀胱癌肿瘤组织及癌旁正常组织 PGAP2 表达水平 采用 qRT-PCR 法检测膀胱癌肿瘤组织及癌旁正常组织 PGAP2 表达水平。采用 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。采用 qRT-PCR 仪对 PGAP2 及其内参 GAPDH 进行扩增,引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程有限公司合成。qRT-PCR 反应体系共 20 μL : cDNA (50 ng/ μL) 2 μL , miScript SYBR[®] Green Mix 10 μL , 上下游引物(10 μM)各 0.8 μL , ddH₂O 6.4 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每份样品均设 3 个重复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算膀胱癌肿瘤组织及癌旁正常组织 PGAP2 mRNA 相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
PGAP2	GACTAGGTCAGCAATACGTTCA	TGCCAGTCCGTAACGTTTCAG
GAPDH	CGTTACATTGGATGAACTGTG	CTGAATCCAGTAGGCAATCTG

1.4.3 Ualcan 数据库检索 在 Ualcan 数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu>)中检索。设定 gene symbol 为 PGAP2,设定 TCGA 数据集为 Bladder

urothelial carcinoma,进行 PGAP2 表达分析。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 23.0 软件对数据进行分析,计量资

料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;多因素 Cox 回归分析影响膀胱癌预后的因素。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常组和肿瘤组组织中 PGAP2 mRNA 表达水平比较

Ualcan 数据库中,膀胱癌肿瘤组织中 PGAP2 水平高于正常膀胱组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。本研究中,肿瘤组 PGAP2 mRNA 水平(2.35 ± 0.31)高于正常组(1.00 ± 0.23),差异有统计学意义($t = 30.888, P = 0$),与 Ualcan 数据库结果一致。

2.2 膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 表达与临床病理特征的关系

根据膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 水平平均值(2.35),39 例高于平均值患者为 PGAP2 高表达组,39 例低于平均值患者为 PGAP2 低表达组。两组年龄、性别、吸烟史、肿瘤体积比较,差异

无统计学意义($P > 0.05$)。PGAP2 高表达组肿瘤多发及组织浸润深度为肌层浸润性膀胱癌的患者比例高于 PGAP2 低表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

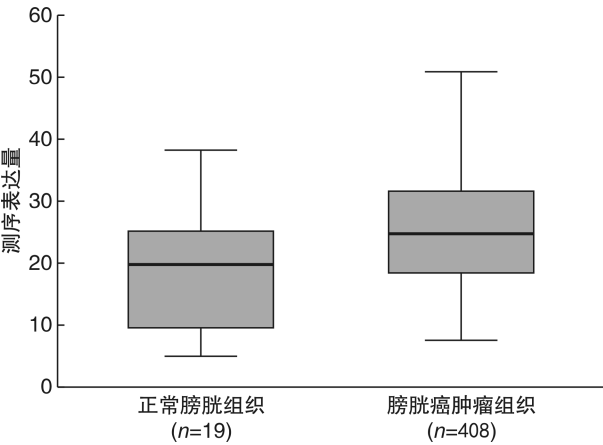


图 1 Ualcan 数据库中正常膀胱组织及膀胱癌肿瘤组织中 PGAP2 表达水平比较

表 2 膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 表达与临床病理特征的关系例(%)

临床病理特征	例数	PGAP2 低表达组($n = 39$)	PGAP2 高表达组($n = 39$)	χ^2	P
年龄/岁				0.052	0.820
≥ 60	43	22(56.41)	21(53.85)		
< 60	35	17(43.59)	18(46.15)		
性别				1.880	0.170
女	17	11(28.21)	6(15.38)		
男	61	28(71.79)	33(84.62)		
吸烟史				3.302	0.069
有	36	14(35.90)	22(56.41)		
无	42	25(64.10)	17(43.59)		
肿瘤体积/ cm^3				3.284	0.070
≤ 5.0	40	24(61.54)	16(41.03)		
> 5.0	38	15(38.46)	23(58.97)		
肿瘤个数				14.978	0
单发	35	26(66.67)	9(23.08)		
多发	43	13(33.33)	30(76.92)		
组织浸润深度				5.159	0.023
非肌层浸润性膀胱癌	42	26(66.67)	16(41.03)		
肌层浸润性膀胱癌	36	13(33.33)	23(58.97)		

2.3 膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 表达与组织学分级的关系

肿瘤组织 PGAP2 表达水平与膀胱癌病理组织学分级有关,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 表达与预后的关系

PGAP2 高表达组预后不良患者比例高于 PGAP2 低表达组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 表达与组织学分级的关系例(%)

组别	例数	组织学分级		
		I 级 ($n = 24$)	II 级 ($n = 29$)	III 级 ($n = 25$)
PGAP2 低表达组	39	19(79.17)	16(55.17)	4(16.00)
PGAP2 高表达组	39	5(20.83)	13(44.83)	21(84.00)
χ^2	—	20.037		
P	—	0		

表 4 膀胱癌患者肿瘤组织 PGAP2 mRNA 表达与预后的关系

组别	例数	预后良好 (n=46)	预后不良 (n=32)
PGAP2 低表达组	39	31(67.39)	8(25.00)
PGAP2 高表达组	39	15(32.61)	24(75.00)
χ^2	—	13.565	
P	—	0	

2.5 影响膀胱癌预后的多因素 Cox 回归分析

排除年龄、性别、吸烟史等混杂因素,以肿瘤个数、组织浸润深度、病理分级、PGAP2 为自变量进行多因素 Cox 回归分析,结果显示,病理分级、PGAP2 是影响膀胱癌预后的独立危险因素($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 影响膀胱癌预后的多因素 Cox 回归分析

影响因素	B	SE	Wald	OR	95%CI	P
PGAP2	0.698	0.472	2.187	2.009	1.382~2.921	0.006
病理分级	0.727	0.469	2.403	2.069	1.414~3.026	0.002
组织浸润深度	0.250	0.326	0.588	1.283	0.512~3.217	0.062
肿瘤个数	0.291	0.274	1.128	1.337	0.642~2.785	0.091

3 讨论

膀胱癌是泌尿系统肿瘤中发病率较高的一种恶性肿瘤,尤其是膀胱移行尿路上皮细胞癌最为常见,其中男性发病率高于女性^[9-10]。研究表明,膀胱癌的发生、发展及恶性行为是多因素作用的结果,且与遗传上的分子生物学改变,也即基因表达和功能改变有密切联系^[11-12]。肿瘤的生物行为是由细胞内单个或多个基因的改变决定的^[13]。因此,对肿瘤基因的研究不仅有助于肿瘤的诊断,而且对肿瘤发病机制的研究有着重要的指导意义,进而为疾病的治疗及预后评估提供可靠的依据。在膀胱癌手术治疗方面,腹腔镜根治性膀胱癌切除术、开放性根治性膀胱切除术以及机器人辅助根治性膀胱切除术 3 种手段并存,且新的免疫联合疗法及靶向治疗药物也层出不穷^[14]。

PGAP2 基因位于 11p15.4,其编码的蛋白参与糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白合成后的重构,而糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白与肿瘤关系密切^[15-16]。其中,糖基化磷脂酰肌醇锚定的前列腺特异性抗原、癌胚抗原、胚盘型碱性磷酸酶等已作为肿瘤标志物^[17-19]。此外,肝癌和肺癌的相关研究表明,PGAP2 与 FUT2、RTP3、AAMP、GTF3C5 等基因共同调节细胞增殖及蛋白质相互作用,成为抗癌研究的靶基因^[20-21]。本研究结果显示,膀胱癌患者肿瘤组织中 PGAP2 mRNA 表达水平高于癌旁正常组织。为验证此结果,本研究在 Ualcan 数据库中检索 PGAP2 基因在膀胱尿路上皮癌中的表达水平,得到的结果与本研究结果一致。这些结果均提示 PGAP2 基因高表达与膀胱癌的发生、发展密切相关,且其可能是通过影响糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白合成后的重构过程,使其无法锚定于肿瘤细胞表面,从而影响其抗肿瘤功能,使癌细胞增多,病情严重,进而造成患者出现复发或死亡等不良预后。

本研究结果显示,PGAP2 高表达组肿瘤多发、组织浸润深度为肌层浸润性膀胱癌、预后不良的患者比例均高于 PGAP2 低表达组,肿瘤组织 PGAP2 表达水平与膀胱癌病理组织学分级有关。提示 PGAP2 表达水平与膀胱癌病理分级等临床病理特征有密切联系,PGAP2 基因可能通过高表达影响糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白的抗肿瘤功能,使癌症进一步发展,肿瘤个数增多、病理分级进展为 3 级、组织浸润程度加深,同时影响患者预后,使膀胱癌复发或死亡患者比例增加。进一步多因素 Cox 回归分析结果显示,病理分级、PGAP2 均是影响膀胱癌预后的独立危险因素。提示临床中应对病理分级为 3 级、PGAP2 高表达的患者提供个体化治疗方案、进行术后特别护理,预防肿瘤复发,以避免不良预后给患者生理、心理带来严重的影响。

综上所述,膀胱癌患者肿瘤组织中 PGAP2 mRNA 表达水平高于癌旁正常组织,且本研究通过 Ualcan 数据库对 TCGA 数据进行挖掘,证实了 PGAP2 基因在膀胱癌患者肿瘤组织中高表达。此外,PGAP2 mRNA 表达水平与膀胱癌患者病理分级等临床病理特征密切相关,可能参与膀胱尿路上皮癌的发生、发展及复发。PGAP2 有望成为干预膀胱癌发生、发展及复发的潜在生物学靶点,为进一步阐明膀胱癌的病理机制提供了实验依据,同时为治疗方案的确定及预后评估提供了有利的参考,但其具体的分子机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王庆伟,张涛,文建国,等. 上尿路尿路上皮癌预后多因素分析及术后再发膀胱癌危险因素分析[J]. 临床泌尿外科杂志,2018,33(5):385-389.
- [2] Longdon E, Mistry H, Pratt O, et al. Variables associated with survival in patients with invasive bladder cancer with and without surgery [J]. Anaesthesia, 2020,75(7):887-895.

- [3] 苏宏伟,刘军超,李婷,等. T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1在膀胱癌组织中的表达及其与膀胱癌复发的关系[J]. 广西医学, 2019, 41(11): 1376-1380.
- [4] 韩耕宇,李华福,许宸,等. 不同侵袭性膀胱癌患者预后与基因差异表达研究[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(11): 14-18.
- [5] Abbosh PH, Plimack ER. Molecular and Clinical Insights into the Role and Significance of Mutated DNA Repair Genes in Bladder Cancer[J]. Bladder Cancer, 2018, 4(1): 9-18.
- [6] 陈奇,武惠韬,孙金秀,等. 胃癌转移的分子特征分析及预后评估[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40(8): 745-749.
- [7] 黄文斌,程亮. 2016版WHO膀胱肿瘤新分类解读[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(7): 441-445.
- [8] 何天基,葛波. 肌层浸润性膀胱癌新辅助治疗现状及展望[J]. 临床泌尿外科杂志, 2020, 35(2): 158-161.
- [9] Moschini M, Zaffuto E, Karakiewicz P, et al. The effect of androgen deprivation treatment on subsequent risk of bladder cancer diagnosis in male patients treated for prostate cancer[J]. World J Urol, 2019, 37(6): 1127-1135.
- [10] Yao Z, Jiang Y, Zhu X, et al. Risk factors and oncological outcomes of urethral recurrence in male patients with muscle invasive bladder cancer after radical cystectomy combined with urinary diversion; a propensity score-matched case control study[J]. Int J Clin Oncol, 2020, 25(7): 1377-1384.
- [11] Saleh AA, Gohar SF, Hemida AS, et al. Evaluation of ASPM and TEF Gene Expressions as Potential Biomarkers for Bladder Cancer[J]. Biochem Genet, 2020, 58(3): 490-507.
- [12] 刘忠清,任明华,贾光,等. 代谢酶的基因多态性与膀胱癌易感性关系的研究与进展[J]. 国际遗传学杂志, 2018, 41(1): 50-55.
- [13] Guo X, Liu M, Hou H, et al. Impact of prostate cancer radiotherapy on the biological behavior and specific mortality of subsequent bladder cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2019, 24(8): 957-965.
- [14] 姜帅,项卓仪. 2019年膀胱癌诊治进展[J]. 上海医学, 2020, 43(6): 336-340.
- [15] 吴腾辉,彭镜. PIG/PGAP基因及其相关表型研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(9): 714-717.
- [16] 韩倩倩,周琴,张兰兰,等. uPAR在肿瘤诊断与治疗中的研究进展[J]. 生物学杂志, 2019, 36(5): 85-88.
- [17] Nieder C, Haukland E, Pawinski A, et al. Seven-month prostate-specific antigen (PSA) is prognostic in patients with prostate cancer initially diagnosed with distant metastases [J]. Med Oncol, 2018, 35(4): 46-56.
- [18] 王明丽,徐笑红,单绿虎,等. 癌胚抗原、铁蛋白等肿瘤标志物对肺癌的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(1): 1-3.
- [19] Ejaz SA, Saeed A, Shah S, et al. Distinctive inhibition of alkaline phosphatase isozymes by thiazol-2-ylidene-benzamide derivatives; Functional insights into their anticancer role [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(8): 6501-6513.
- [20] Fogeron ML, Müller H, Schade S, et al. LGALS3BP regulates centriole biogenesis and centrosome hypertrophy in cancer cells [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1531.
- [21] Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks [J]. Nature, 2017, 545(7655): 505-509.

(收稿日期:2020-07-17)

(上接第376页)

- [10] Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis [J]. Chem Rev, 2011, 111(10): 5821-5865.
- [11] Kim B H, Kim C I, Chang H S, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in chronic inflammation associated with benign prostatic hyperplasia; is it related to apoptosis and angiogenesis of prostate cancer? [J]. Korean J Urol, 2011, 52(4): 253-259.
- [12] Jain S, Chakraborty G, Raja R, et al. Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7750-7759.
- [13] Kim J, Yang P, Suraokar M, et al. Suppression of prostate tumor cell growth by stromal cell prostaglandin D synthase-derived products [J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6189-6198.
- [14] Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, et al. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase [J]. Cell, 1997, 90(6): 1085-1095.
- [15] Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? [J]. Clin Immunol, 2005, 114(2): 100-109.
- [16] Kaikkonen S, Paakinaho V, Sutinen P, et al. Prostaglandin 15d-PGJ(2) inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells [J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(2): 212-223.

(收稿日期:2021-03-02)