

生长分化因子-9 在人膀胱癌组织中的表达及其临床意义*

符骏¹ 杜鹏² 杨勇²

【摘要】 目的:探讨生长分化因子-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)在人膀胱癌组织中的表达及其与膀胱癌病理分级和临床分期的关系。**方法:**运用免疫组化技术检测 GDF-9 在 50 例不同分期分级的膀胱癌组织和 15 例正常膀胱组织之间的蛋白表达情况。**结果:**①正常人膀胱组织中 GDF-9 呈高表达,且 GDF-9 蛋白主要定位于膀胱移行上皮细胞的胞浆中。而膀胱癌组织中 GDF-9 呈低表达或不表达。②GDF-9 阳性表达率在膀胱癌病理分级间分别:Ⅰ级 47.6%(10/21),Ⅱ级 26.7%(4/15),Ⅲ级 7.1%(1/14),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。GDF-9 阳性表达率在膀胱癌临床分期间分别: $T_a \sim T_1$ 期 40.6%(13/32), $T_2 \sim T_3$ 期 11.1%(2/18),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**GDF-9 在膀胱癌组织中低表达或不表达,且与膀胱癌病理分级和临床分期呈负相关。GDF-9 可能是一个潜在的人膀胱肿瘤抑癌基因。

【关键词】 膀胱肿瘤;生长分化因子-9

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2013)07-0509-04

Expression and its clinical significance of growth differentiation factor-9 in bladder cancer

FU JUN¹ DU Peng² YANG Yong²

(¹Department of Urology, Beijing Jingmei Group General Hospital, Beijing, 102300, China;

²Key laboratory of Carcinogenesis and Translational Research, Ministry of Education; Department of Urology, Peking University Cancer Hospital & Institute)

Corresponding author: DU Peng, E-mail: dupeng9000@126.com

Abstract Objective: To investigate the expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9) in bladder transitional cell carcinoma (BTCC) and its clinical significance in the malignancy of BTCC. **Method:** Immunohistochemical methods was used to detect GDF-9 protein in 50 cases of BTCC and 15 cases of normal bladder mucosa served as the controls. **Result:** In normal bladder tissues, stronger staining of GDF-9 was seen in transitional cells, both in the cytoplasm and in the nucleus. In contrast, the staining of GDF-9 was notably weak or absent in cancer cells of tumour tissues. The positive expression rate of GDF-9 in Grade I, II and III according to pathological grade of BTCC was 47.6% (10/21), 26.7% (4/15) and 7.1% (1/14), respectively. There were significant differences among the three pathological grades. The positive expression rate of GDF-9 in Stage $T_a \sim T_1$ and $T_2 \sim T_3$ according to clinical stages of BTCC was 40.6% (13/32) and 11.1% (2/18), respectively. There were significant differences between the two clinical stages. **Conclusion:** GDF-9 is expressed at lower levels in human bladder cancer tissues compared with normal transitional cells of the bladder. GDF-9 levels are inversely correlated with the pathological grade and clinical stages of bladder cancer. It suggests that GDF-9 is a potential tumour suppressor in human bladder cancer.

Key words bladder cancer; growth differentiation factor-9

膀胱癌是最常见的泌尿系统肿瘤,在我国的泌尿系统肿瘤中,膀胱癌不论是发病率还是死亡率均占首位^[1]。膀胱癌的预后与肿瘤细胞的生物特性、浸润程度和治疗及时与否密切相关^[2],通常认为肿瘤的发病机制既与癌基因突变有关,又与抑癌基因

的缺失或失功等有关。但到目前为止,对于膀胱肿瘤的发病和进展机制仍不清楚。而生长分化因子-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)是第一个被发现的卵母细胞来源的生长因子,具有调节卵泡和促进排卵的作用^[3]。近年来研究发现,GDF-9 属于转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)超家族的骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)家族成员之一^[3],与 BMP-15 具有高度同源性,与某些肿瘤的发生和进展有关^[4]。在乳腺癌中,高侵袭性的乳腺癌细胞中 GDF-9 表达下调^[5],但 GDF-9 在高度恶性的口

* 基金项目:首都医科大学基础与临床合作基金(编号 12JL11)

¹ 北京京煤集团总医院泌尿外科(北京,102300)

² 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所泌尿外科恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室(原单位:首都医科大学附属北京医院泌尿外科)

通信作者:杜鹏, E-mail: dupeng9000@126.com

腔癌细胞株中表达上调^[6]。另外,在前列腺癌中,GDF-9 能够促进前列腺癌细胞系 PC-3 和 DU-145 生长^[7]。但 GDF-9 在膀胱癌中的作用尚不清楚。我们前期研究发现,GDF-9 在膀胱癌细胞系 RT112 和 EJ138 中表达下调;而过表达 GDF-9 能够抑制膀胱癌细胞生长,降低其粘附和迁移能力^[8]。但 GDF-9 在人膀胱癌组织中的作用尚不清楚。本研究首次运用免疫组化技术检测 GDF-9 在不同分期分级的膀胱肿瘤患者膀胱和正常膀胱黏膜之间的蛋白表达差异,以期明确 GDF-9 因子是否是一个潜在的人膀胱肿瘤抑癌基因。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2005~2007 年首都医科大学附属北京朝阳医院京西院区泌尿外科手术切除膀胱移行细胞癌 50 例,男 35 例,女 15 例,年龄 26~80 岁,平均(50.9±13.1)岁。其中行经尿道膀胱肿瘤电切术 34 例,膀胱全切 16 例。按 WHO 肿瘤分级标准:I 级 15 例,II 级 21 例,III 级 14 例。UICC-TNM 标准分期: $T_a \sim T_1$ 期 32 例, $T_2 \sim T_3$ 期 18 例。所有患者术前均未行放疗和化疗。15 例正常膀胱黏膜组织取自膀胱癌患者膀胱全切后远离肿瘤组织的正常膀胱黏膜组织。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 兔抗人 GDF-9 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。各种标记抗体、DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术公司。

1.2.2 免疫组织化学染色 采用 SP 法,即石蜡切片常规处理后加 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 消化 30 min/或微波修复 10 min。滴加一抗(兔抗 GDF-9 多克隆抗体 1:100),37℃ 孵育 1 h 或 4℃ 孵育过夜。然后滴加二抗(生物素标记的山羊抗兔 IgG 1:200),37℃ 孵育 30 min;然后滴加三抗(辣根过氧化物酶标记的链霉素/卵白素复合物 SA/HRP 1:200),37℃ 孵育 30 min。加入 DAB-H₂O₂ 显色液显色。实验同时采用正常兔血清和 PBS 代替一抗的方法作为阴性对照。

1.2.3 GDF-9 阳性结果判定 光镜下细胞核和(或)胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。400 倍显微镜下每张载玻片计数 5 个视野,每个视野 100 个细胞,计算阳性细胞百分率: $<5\%$ (-); $5\% \sim 25\%$ (+); $25\% \sim 50\%$ (++); 50% (+++)。标本中阳性细胞百分数 $<50\%$ 为低表达, $50\% \geq$ 为高表达或过度表达。

1.3 统计学处理

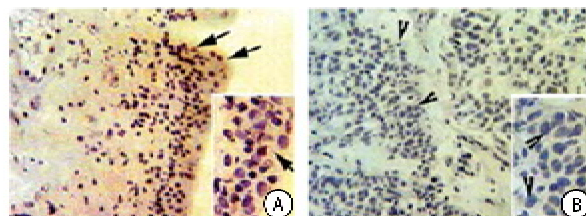
采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间资料的比较采用 One-Way ANOVA 方差分析,组间

两两比较采用 LSD 法或 Dunnett's T3 法,同组治疗前后比较采用配对 t 检验。计数资料采用 χ^2 检验、精确概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GDF-9 在正常膀胱黏膜组织和膀胱癌组织的表达

GDF-9 阳性信号主要位于胞浆和/或细胞核,呈棕黄色颗粒(图 1)。15 例正常膀胱黏膜组织全部呈现 GDF-9 高表达,而在 50 例膀胱癌组织中仅有 13 例呈现 GDF-9 阳性表达且为低表达,其阳性表达率为 30.0%(15/50),两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 22.750, P = 0.000$)。



A:正常膀胱黏膜组织;B:膀胱癌组织

图 1 GDF-9 在膀胱癌组织中的表达(免疫组化染色)

2.2 GDF-9 表达与膀胱癌病理分级和临床分期的关系

GDF-9 阳性表达率在膀胱癌病理分级间分别:I 级 47.6%(10/21),II 级 26.7%(4/15),III 级 7.1%(1/14),差异有统计学意义($\chi^2 = 6.667, P = 0.036$)。GDF-9 阳性表达率在膀胱癌临床分期间分别: $T_a \sim T_1$ 期 40.6%(13/32), $T_2 \sim T_3$ 期 11.1%(2/18),差异有统计学意义($\chi^2 = 4.778, P = 0.029$)。

3 讨论

直接影响膀胱癌患者死亡率的因素是膀胱肿瘤的侵犯及转移。尽管对于此转移过程了解甚少,但普遍认为是一些蛋白质家族与膀胱癌的发生和进展相关,其中转化生长因子 β (TGF- β)超家族是目前研究的热点^[9,10]。TGF- β 被证实是在多种肿瘤细胞类型,包括膀胱癌细胞中的一个有力的生长抑制因子^[11]。而骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs),被认为是 TGF- β 超家族的一个分支^[12]。BMPs 是多功能的生长因子,在许多细胞中可以调节多种重要的细胞过程,包括细胞生长,凋亡,分化和侵袭^[13]。现已证明 BMPs 与几种不同类型的癌症发病机制有关联^[14~16]。在人肝癌中,小干扰 RNA(siRNA)针对 BMP-2 显著抑制肝癌细胞中 BMP-2 的表达,并降低肝癌细胞的迁移和侵袭力^[17]。在卵巢癌,BMP-2 能够增加卵巢上皮癌细胞的运动能力。而使用 BMP-2 能抑制

上皮性卵巢癌细胞株形成球体的能力,提示该因子抑制细胞与细胞之间的粘附力。BMP-2 在卵巢癌患者肿瘤组织中的表达与患者生存率呈负相关。在乳腺癌中, BMP-10 能抑制乳腺癌细胞的侵袭性,并与患者不良预后相关^[18]。在前列腺癌,发现不同亚型的 BMP 表达。与正常前列腺上皮细胞相比, BMP-2、-4、-7、-9 和-10 的表达是下降的^[19,20],另外, BMP-6 和-2 能抑制前列腺癌细胞的生长^[21]。最近研究表明, BMP-9 和-10 能够抑制前列腺癌细胞的生长、黏附和侵袭功能,而这种作用是通过 Smad 1,5 和 8 介导的前凋亡因子 Par-4 上调而发挥的^[20,22]。

GDF-9 作为一种卵母细胞生长因子,现已确定为 TGF- β 超家族的 BMPs 家族的成员之一^[23]。人 GDF-9 基因定位于 5q31.1 染色体上,包含 2 个长度分别为 397 bp 和 968 bp 的外显子和 1 个 1.6 kb 的内含子。BMP-15 与 GDF-9 具有高度同源性,其定位于人类 XP11.2,同样包含了 2 个外显子,但长度为 328 bp 和 851 bp,其内含子长为 4.2 kb^[5]。GDF-9 和 BMP-15 属于 TGF- β 超家族成员,由卵母细胞分泌,是卵泡发育过程中重要的旁分泌因子,在调节卵泡和排卵过程中发挥着重要的作用,能够调控卵泡细胞间的相互作用,促进卵泡发育^[3]。近年研究发现, GDF-9 和 BMP-15 基因的异常表达与某些肿瘤的发生和进展密切相关。一项 GDF-9 在乳腺癌细胞中的表达研究表明,过度 GDF-9 表达后,乳腺癌细胞侵袭力明显下降^[5],这提示 GDF-9 可能是一种肿瘤抑制因子。但另一组研究则表明 GDF-9 能保护细胞免受 caspase-3 介导细胞凋亡的伤害,从而促进 PC-3 和 DU-145 两种前列腺癌细胞系的生长速率,这表明 GDF-9 可能促进前列腺癌的进展^[7],这与 GDF-9 是一种肿瘤抑制因子的结论相驳。因此,我们推测 GDF-9 在不同的恶性肿瘤中所发挥的作用不同,但 GDF-9 在膀胱癌中的作用尚不清楚。在前期研究^[8]发现 GDF-9 在膀胱癌细胞系 RT112 和 EJ138 中表达下调的基础上,我们首次运用免疫组化技术检测 GDF-9 在不同分期分级的膀胱肿瘤患者膀胱和正常膀胱黏膜之间的蛋白表达差异情况,结果发现与正常的膀胱移行上皮细胞相比,在不同分期分级的人膀胱癌组织中 GDF-9 蛋白表达水平不同,正常人膀胱组织中 GDF-9 呈高表达,且 GDF-9 蛋白主要定位于移行上皮细胞的胞浆中。而 GDF-9 在膀胱癌组织中呈低表达或不表达,且随着膀胱肿瘤细胞分化程度的升高, GDF-9 阳性表达率明显降低;浅表性膀胱癌($T_a \sim T_1$ 期) GDF-9 阳性表达率明显高于浸润性膀胱癌($T_2 \sim T_3$ 期); GDF-9 阳性表达者 5 年生存率明显高于 GDF-9 阴性表达者,提示 GDF-9 与膀胱癌病理分级和临床分期及呈负相

关。因此,可认为 GDF-9 表达可以反映膀胱癌细胞分化状态及恶性程度,与肿瘤浸润程度亦相关,可以作为一项判定预后的评估指标。这与 Bokobza 等^[7]在乳腺癌中的研究认为 GDF-9 是一种肿瘤抑制因子的结论相一致。

综上所述, GDF-9 在膀胱癌组织中低表达或不表达,且与膀胱癌病理分级、临床分期及预后呈负相关。GDF-9 可能是一个潜在的人膀胱肿瘤抑制基因。

[参考文献]

- 1 张思维, 马建辉, 李鸣, 等. 中国部分市县膀胱癌发病趋势比较研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2009, 30(10): 673-676.
- 2 Ploeg M, Aben K K, Kiemeny L A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world [J]. World J Urol, 2009, 27: 289-293.
- 3 Aaltonen J, Laitinen M P, Vuojolainen K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84: 2744-2750.
- 4 Bokobza S M, Ye L, Kynaston H, et al. Growth and differentiation factor 9 (GDF-9) induces epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 349: 33-40.
- 5 Hanavadi S, Martin T A, Watkins G, et al. The role of growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its analog, GDF-9b/BMP-15, in human breast cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14: 2159-2166.
- 6 Zhuang Z, Jian P, Longjiang L, et al. Oral cancer cells with different potential of lymphatic metastasis displayed distinct biologic behaviors and gene expression profiles [J]. J Oral Pathol Med, 2009, 39: 168-175.
- 7 Bokobza S M, Ye L, Kynaston H G, et al. GDF-9 promotes the growth of prostate cancer cells by protecting them from apoptosis [J]. J Cell Physiol, 2010, 225: 529-536.
- 8 Du P, Ye L, Li H, et al. Growth differentiation factor-9 expression is inversely correlated with an aggressive behaviour in human bladder cancer cells [J]. Int J Mol Med, 2011, 29: 428-434.
- 9 Yang S D, Sun R C, Mu H J, et al. The expression and clinical significance of TGF-beta1 and MMP2 in human renal clear cell carcinoma [J]. Int J Surg Pathol, 2010, 18: 85-93.
- 10 Pelletier S, Tanguay S, Lee S, et al. TGF-alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas [J]. Cancer Immunol Immunother, 2009, 58: 1207-1218.
- 11 Helmy A, Hammam O A, El Lithy T R, et al. The role of TGF-beta-1 protein and TGF-beta-R-1 receptor in immune escape mechanism in bladder cancer [J]. MedGenMed, 2008, 9: 34.
- 12 Margulis V, Maity T, Zhang X Y, et al. Type III

- transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor mediates apoptosis in renal cell carcinoma independent of the canonical TGF-beta signaling pathway[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5722-5730.
- 13 Chen D, Zhao M, Mundy G R. Bone morphogenetic proteins[J]. *Growth Factors*, 2004, 22: 233-241.
 - 14 Blanco Calvo M, Bolos Fernandez V, Medina Villaamil V, et al. Biology of BMP signalling and cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11: 126-137.
 - 15 Bokobza S M, Ye L, Kynaston H G, et al. Growth and differentiation factor-9 promotes adhesive and motile capacity of prostate cancer cells by up-regulating FAK and Paxillin via Smad dependent pathway[J]. *Oncol Rep*, 2010, 24: 1653-1659.
 - 16 Ye L, Bokobza S, Li J, et al. Bone morphogenetic protein-10 (BMP-10) inhibits aggressiveness of breast cancer cells and correlates with poor prognosis in breast cancer[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101: 2137-2144.
 - 17 Wu J B, Fu H Q, Huang L Z, et al. Effects of siRNA-targeting BMP-2 on the abilities of migration and invasion of human liver cancer SMMC7721 cells and its mechanism[J]. *Cancer Gene Ther*, 2011, 18: 20-25.
 - 18 Le Page C, Puiffe M L, Meunier L, et al. BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis[J]. *J Ovarian Res*, 2009, 2: 4.
 - 19 Bobinac D, Maric I, Zoricic S, et al. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer[J]. *Croat Med J*, 2005, 46: 389-396.
 - 20 Ye L, Kynaston H, Jiang W G. Bone morphogenetic protein-9 induces apoptosis in prostate cancer cells, the role of prostate apoptosis response-4[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6: 1594-1606.
 - 21 Brubaker K D, Corey E, Brown L G, et al. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 91: 151-160.
 - 22 Ye L, Kynaston H, Jiang W G. Bone morphogenetic protein-10 suppresses the growth and aggressiveness of prostate cancer cells through a Smad independent pathway[J]. *J Urol*, 2009, 181: 2749-2759.
 - 23 Su Y Q, Sugiura K, Wigglesworth K, et al. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes; BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells[J]. *Development*, 2008, 135: 111-121.

(收稿日期:2013-01-12)

(上接第 508 页)

- 13 Pawinski A, Sylvester R, Kurth K H, et al. A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer[J]. *J Urol*, 1996, 156: 1934-1940, discussion 1940-1941.
- 14 Oosterlinck W, Sylvester R, Babjuk M, et al. Should all patients receive an immediate chemotherapeutic drug instillation after resection of papillary bladder tumors[J]. *Eur Urol*, 2011, 59: 374-376.
- 15 Brausi M, Witjes J A, Lamm D, et al. A review of current guidelines and best practice recommendations for the management of nonmuscle invasive bladder cancer by the International Bladder Cancer Group[J]. *J Urol*, 2011, 186: 2158-2167.
- 16 Lee C T, Barocas D, Globe D R, et al. Economic and humanistic consequences of preventable bladder tumor recurrences in nonmuscle invasive bladder cancer cases[J]. *J Urol*, 2012, 188: 2114-2119.
- 17 Pan J S, Slocum H K, Rustum Y M, et al. Inhibition of implantation of murine bladder tumor by thiotepa in cauterized bladder[J]. *J Urol*, 1989, 142: 1589-1593.
- 18 Kaasinen E, Rintala E, Hellström P, et al. Factors explaining recurrence in patients undergoing chemoinmunotherapy regimens for frequently recurring superficial bladder carcinoma[J]. *Eur Urol*, 2002, 42: 167-174.
- 19 Hendricksen K, Witjes W P, Idema J G, et al. Comparison of three schedules of intravesical epirubicin in patients with non-muscle-invasive bladder cancer[J]. *Eur Urol*, 2008, 53: 984-991.

(收稿日期:2013-02-07)