

非肌层浸润性膀胱癌预后相关分子标志物的研究进展

王金华 综述, 吴小候[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

[摘要] 膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,大部分为非肌层浸润性膀胱癌。研究发现,多种膀胱癌分子标志物对膀胱癌的预后判断有重要作用。膀胱癌预后相关的分子标志物具有方便、快捷、高效、无创、敏感性高的特点,对临床工作有重要意义,膀胱癌分子标志物的应用成为当前研究的热点,本文就非肌层浸润性膀胱癌雨后相关分子标志物对进展作一综述。

[关键词] 膀胱肿瘤;肿瘤浸润;肿瘤复发局部;肿瘤进展;综述

[中图分类号] R737.14

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)17-2344-03

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。在我国,膀胱癌的发病率为 6.69/10 万,病死率为 2.53/10 万,且呈逐年上升趋势^[1]。90%的膀胱癌为移行尿路上皮细胞癌,其中 15%~30%为肌层浸润性膀胱癌,由于其恶性程度高,易发生转移,临床医生极为重视,多采取积极的治疗措施,如膀胱全切、全身化疗等,均取得较好的疗效;另外 70%~85%的患者为非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC)^[2],大多恶性程度较低,因此多采取经尿道膀胱肿瘤切除,再辅以抗肿瘤药物膀胱内灌注治疗,可取得较好的临床治疗效果。但是,其中少数 NMIBC 患者的肿瘤临床表现恶性程度高、预后差,主要表现为膀胱肿瘤的快速复发,细胞肿瘤分级的增加及局部淋巴结或远处转移,这部分患者初诊时预后判断较为困难,目前多根据肿瘤大小,是否多发及细胞分化程度加以判断,多有判断不准确或误判发生。近年来,随着对肿瘤分子机制的深入研究,现已发现多种肿瘤分子标志物对膀胱癌的预后判断有巨大的潜力。在现行的研究中,主要是对膀胱癌复发和浸润转移相关肿瘤分子标志物有较多的研究,已发现多种肿瘤相关分子标志物对判断膀胱癌复发、浸润转移具有积极的作用。现将相关研究结果进行如下综述。

1 与 NMIBC 复发相关的分子标志物

膀胱癌具有高复发性,NMIBC 患者行经尿道膀胱肿瘤电切术(TURBT)后复发率为 50%~80%,且复发后进展为肌层浸润性膀胱癌(MIBC)的概率明显增加,而 MIBC 预后差,发生转移及死亡的风险高。研究发现,多种分子标志物与 NMIBC 复发密切相关,可用于预测早期膀胱癌的复发。

1.1 p53 p53 基因是位于 17 号染色体上的抑癌基因,可分为野生型和突变型。突变型 p53 广泛表达于膀胱癌组织中,在患者尿沉渣中也可被检测到,且与肿瘤高分级、高分期密切相关。为研究 p53 突变及表达与 NMIBC 复发的关系,OH 等^[3]对 275 例接受手术后卡介苗(BCG)灌注治疗的 NMIBC 患者进行 p53 蛋白表达水平的测定,发现 p53 表达水平与肿瘤复发呈正相关,高 p53 表达组(大于 60%)5 年无生化复发

生存率明显低于低 p53 表达组(小于 60%),认为 p53 强表达可提前预测 NMIBC 患者的复发。ABDELZAHER 等^[4]研究发现,Runx 相关转录因子 2(Runx2)与 p53 的表达呈正相关,表明二者具有协同作用,多因素 Cox 回归分析显示,Runx2 和 p53 是早期膀胱癌复发的预测因素,结合 Runx2 和 p53 高表达对早期肿瘤术后复发的预测具有较高的精确度(73.6%)。LLORETA 等^[5]最近也发现,叉头框转录因子 O 亚族 1(FOXO1)表达下调和 p53 高表达与膀胱癌复发相关。由此可见,p53 基因突变及 p53 蛋白表达状态对预测早期膀胱癌的复发有益。

1.2 Ki-67 Ki-67 编码的蛋白是一种与细胞周期相关的核抗原,在增殖细胞的 G₁、S、G₂ 期表达,但不表达于 G₀ 期,是反映细胞增殖的主要生物标志物。高增殖细胞的 Ki-67 表达对预测膀胱癌复发有重要的参考价值。BREYER 等^[6]对 215 例 pTa 期膀胱癌患者中 126 例复发病例进行回顾性分析,Ki-67 表达低于 10%、10%~<25%、25%~<50%、≥50% 的患者复发率分别为 14.8%、30.8%、63.9%、80.7%,Ki-67 的高表达是早期膀胱癌复发的独立预测因素。DING 等^[7]对 332 例行 TURBT 治疗的患者进行研究,发现 Ki-67 表达阳性与多灶性、较高的肿瘤分期及分级相关,是预测 NMIBC 复发的独立预测指标,欧洲癌症研究与治疗组织(EORTC)风险评分与 Ki-67 联合可以更准确地预测肿瘤复发。

1.3 成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR3) FGFR3 表达产物是一种受体酪氨酸激酶,在调节细胞增殖、分化,肿瘤血管生成及膀胱肿瘤的致癌过程中起重要作用。膀胱癌患者尿细胞 FGFR3 基因被激活而发生突变,在低级别 NMIBC 高表达,在高级别肌层 MIBC 低表达^[8]。尿沉渣检测 FGFR3 表达阳性说明预后较好,但复发率也较高。COUFFIGNAL 等^[9]通过检测 191 例膀胱癌患者尿细胞 FGFR3 基因突变发现其灵敏度为 73%,特异度为 87%;2 年随访期间,检测复发的灵敏度为 70%,特异度为 87%,有预测肿瘤复发的价值。BLANCA 等^[10]联合检测 321 例膀胱癌随访患者尿 FGFR3 基因及细胞周期蛋白 D3(Cyclin

D3)的表达,显示灵敏度和特异度分别为 73%、90%,提高了膀胱癌术后复发的检出率,认为其可作为潜在的非侵入性膀胱癌复发诊断的生物标志物。其进一步研究发现,FGFR3、PI3Kp110、PI3KClass III 及蛋白激酶(AKT)的过度表达能增加 T₁ 期膀胱癌的无复发生存率^[11]。

1.4 微 RNAs(microRNAs, miRNAs) miRNAs 是一类重要的非编码小 RNA,长度约为 22 个核苷酸,可作为癌基因或抑癌基因在膀胱癌的发生发展中起重要作用,通过与靶 mRNA 作用调节基因的表达,参与肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、侵袭和转移。AN-DREW 等^[12]应用荧光原位杂交技术检测 229 例患者膀胱尿路上皮癌组织标本 miR-34a 的表达, NMIBC 患者高 miR-34a 表达可降低其复发风险。JIANG 等^[13]用全基因组测序分析患者血清 miRNA,筛选出包含 6 个 miRNA 的基因面板(miR-152、miR-148b-3p、miR-3187-3p、miR-15b-5p、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p),利用 Kaplan-Meier 生存分析发现 miR-152 高表达和 miR-3187-3p 低表达的 NMIBC 患者无复发生存率明显降低,多变量 Cox 回归分析后 miR-152 被确定为 NMIBC 患者肿瘤复发的独立因素。其研究团队还发现,miR-22-3p 高表达和 miR-200a-3p 低表达与 NMIBC 患者无复发生存率相关^[14]。尿液中 miRNAs 也可能对膀胱癌的复发预测有重要的临床价值。KIM 等^[15]测定 138 例 NMIBC 患者尿游离 miR-214 水平,发现肿瘤复发患者的 miR-214 水平较未复发者低,多因素 Cox 回归分析显示,尿游离 miR-214 水平可作为 1 个独立的预后参数预测 NMIBC 复发($HR: 2.011, 95\%CI: 1.027 \sim 3.937, P=0.041$)。CHEN 等^[16]发现 miR-182/miR-100 比值可作为一项新的预后指标,用于区分复发风险较高的患者。以上充分说明 miRNAs 对 NMIBC 复发的预测价值较大,其在分子标志物检测中具有重要作用。

1.5 DNA 甲基化 DNA 甲基化是对基因进行修饰,进而调控基因的表达,已被证实与膀胱癌的发生发展及复发有关。CASADIO 等^[17]用甲基化特异性多重连接探针扩增技术(MS-MLPA)分析 74 例早期膀胱癌手术患者组织标本 24 个抑癌基因的甲基化状态,基因甲基化大于或等于 20%被定义为“积极的”,指出 HIC1、GSTP1 和 RASSF1A 基因能够预测肿瘤复发,且三者联合检测的灵敏度为 78%,特异度为 66%,总准确度为 72%,有助于临床医生在随访中识别需要密切监测的高复发风险患者。膀胱癌启动子高甲基化与年龄,吸烟状况,性别,肿瘤部位、分期、分级及复发有关。ZUIVERLOON 等^[18]从最初的尿液检测中选出具有最高预测值的 4 个基因(APC_a、TERT_a、TERT_b 和 EDNRB),研发了一个包括 23 个甲基化探针的 MS-MLPA 面板,用于确定肿瘤复发的概率,Logistic 回归模型分析发现该模型能够预测肿瘤复发,复发的风险与肿瘤分期和分级呈正相关,且检测组和验证组复发检测的灵敏度分别为 63%、72%。PIETRUSISKI 等^[19]发现,选定的抑癌基因甲

基化可能是一个项潜在的生物标志物,可利用非侵入性尿试验提高 NMIBC 复发的诊断符合率。

2 与 NMIBC 进展相关的分子标志物

NMIBC 易进展为 MIBC,后者预后差。若能早期预测 NMIBC 患者的进展情况,进行个体化治疗,可明显提高患者的生存率。在 NMIBC 的发生发展过程中,多个分子表达异常,分子标志物对 NMIBC 进展及预后判断有巨大的应用价值。

2.1 p53 大量研究发现,p53 过表达与早期膀胱癌进展有关。BEN ABDELKRIM 等^[20]对 71 例 NMIBC 患者术后随访 3~77 个月发现,p53 的表达与临床分期,病理分级、进展和生存有关,80%进展至 MIBC 的患者的 p53 表达阳性,因此认为 p53 是 NMIBC 进展的一个独立因素。DU 等^[21]对 12 项研究 712 例患者进行 Meta 分析,探讨 p53 在 T₁ 期 NMIBC 的预后价值,p53 蛋白过表达与 T₁ 期 NMIBC 进展率高明显相关($RR: 2.32, 95\%CI: 1.59 \sim 3.38$),并在研究中观察到中度的异质性($I^2 = 39\%, P < 0.01$),表明 p53 蛋白过表达可作为早期膀胱癌进展的预测指标。

2.2 血红素氧合酶 1(HO-1) HO-1 是一种应激反应蛋白,与细胞增殖、血管生成、淋巴管生成,以及血管内皮生长因子(VEGF)和环氧化酶 2(COX-2)的表达有关。KIM 等^[22]研究了 HO-1 在预后判断中的意义,发现 HO-1 的高表达可能与原发 NMIBC 的临床进展和肿瘤生物侵袭性相关,对无进展生存期(PFS)有明显的预测作用。MATSUO 等^[23]用免疫组织化学方法检测 147 例 NMIBC 患者术后组织标本中 HO-1 的表达,高级别 T₁ 期膀胱癌 HO-1 表达水平明显高于低级别 Ta 期膀胱癌,HO-1 高表达提示患者预后不佳,可有效预测膀胱癌患者的进展及侵袭。

2.3 角蛋白 20(CK20) CK20 在正常膀胱尿路上皮伞细胞中表达,在膀胱移行尿路上皮癌中,CK20 的表达超过尿路上皮厚度的 10%,预示更高的病理分级,并增加了早期膀胱癌进展的风险。常用反转录 PCR(RT-PCR)检测尿液 CK20 mRNA 确认 CK20 的表达。BERTZ 等^[24]研究表明,CK20 和 Ki-67 组合的表达会显著降低 NMIBC 患者 TURBT 术后无进展生存率。MALMSTRM 等^[25]发现,免疫组织化学 CK20、Ezrin 和 Ki-67 是 NMIBC 患者 BCG 灌注治疗后的潜在的进展及疗效预测指标。且 ABDUL-MAKSOUUD 等^[26]也有类似报道。因此,CK20 的表达可作为膀胱癌进展的预测指标。

3 展 望

早期膀胱癌的发生发展与某些分子的异常表达密切相关,随着对膀胱癌分子机制的进一步研究,越来越多的分子标志物将被发现,用于预测膀胱癌患者的肿瘤复发及进展。以上几种分子标志物对 NMIBC 患者预后具有重要的预测价值,但仍需大样本的临床实验验证其应用效果,以筛选更理想的分子标志物,为临床医生对早期膀胱癌患者的随访策略及个体化治疗方案提供参考,减少患者行膀胱镜检随访次数及痛苦,最终让患者获得益处。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] GREGG J R, DAHM P, CHANG S S. Guideline-based management of non-muscle invasive bladder cancer [J]. *Indian J Urol*, 2015, 31(4): 320-326.
- [3] OH J J, JI S H, CHOI D K, et al. A six-week course of bacillus Calmette-Gurin prophylaxis is insufficient to prevent tumor recurrence in nonmuscle invasive bladder cancer with strong-positive expression of p53 [J]. *Oncology*, 2010, 79(5/6): 440-446.
- [4] ABDELZAHER E, KOTB A F. High coexpression of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and p53 independently predicts early tumor recurrence in bladder urothelial carcinoma patients [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2016, 24(5): 345-354.
- [5] LLORETA J, FONT-TELLO A, JUANPERE N, et al. FOXO1 down-regulation is associated with worse outcome in bladder cancer and adds significant prognostic information to p53 overexpression [J]. *Hum Pathol*, 2017(62): 222-231.
- [6] BREYER J, SHALEKENOV S, AZIZ A, et al. Increased proliferation as independent predictor of disease recurrence in initial stage pTa urothelial bladder cancer [J]. *Bladder Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 2017, 3(3): 173-180.
- [7] DING W, GOU Y, SUN C, et al. Ki-67 is an Independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC [J]. *Urol Oncol*, 2014, 32(1): 42.
- [8] LIU X, ZHANG W, GENG D, et al. Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer; a systematic review and Meta-analysis [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 1109-1120.
- [9] COUFFIGNAL C, DESGRANDCHAMPS F, MONGIAT-ARTUS P, et al. The diagnostic and prognostic performance of urinary FGFR3 mutation analysis in bladder cancer surveillance; a prospective multicenter study [J]. *Urology*, 2015, 86(6): 1185-1190.
- [10] BLANCA A, REQUENA M J, ALVAREZ J, et al. FGFR3 and cyclin D3 as urine biomarkers of bladder cancer recurrence [J]. *Biomark Med*, 2016, 10(3): 243-253.
- [11] BLANCA PEDREGOSA A M, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ Á, CARRASCO VALIENTE J, et al. Expression of proteins FGFR3, PI3K, AKT, p21Waf1/Cip1 and cyclins D1 and D3 in patients with T1 bladder tumours; clinical implications and prognostic significance [J]. *Actas Urol Esp*, 2017, 41(3): 172-180.
- [12] ANDREW A S, MARSIT C J, SCHNED A R, et al. Expression of tumor suppressive microRNA-34a is associated with a reduced risk of bladder cancer recurrence [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(5): 1158-1166.
- [13] JIANG X, DU L, WANG L, et al. Serum microRNA expression signatures identified from genome-wide microRNA profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(4): 854-862.
- [14] DU L, JIANG X, DUAN W, et al. Cell-free microRNA expression signatures in urine serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40832-40842.
- [15] KIM S M, KANG H W, KIM W T, et al. Cell-Free microRNA-214 from urine as a biomarker for non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Korean J Urol*, 2013, 54(11): 791-796.
- [16] CHEN Z, WU L, LIN Q, et al. Evaluation of miR-182/miR-100 ratio for diagnosis and survival prediction in bladder cancer [J]. *Arch Iran Med*, 2016, 19(9): 645-651.
- [17] CASADIO V, MOLINARI C, CALISTRI D, et al. DNA methylation profiles as predictors of recurrence in non muscle invasive bladder cancer; an MS-MLPA approach [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32(1): 94.
- [18] ZUIVERLOON T C, BEUKERS W, VAN DER KEUR K A, et al. A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine [J]. *BJU Int*, 2012, 109(6): 941-948.
- [19] PIETRUSINSKI M, KEP CZYNSKI Ł, JEDRZEJCZYK A, et al. Detection of bladder cancer in urine sediments by a hypermethylation panel of selected tumor suppressor genes [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 18(1): 47-59.
- [20] BEN ABDELKRIM S, RAMMEH S, ZIADI S, et al. Expression of topoisomerase II alpha, ki67, and p53 in primary non-muscle-invasive urothelial bladder carcinoma [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2014, 35(4): 358-367.
- [21] DU J, WANG S H, YANG Q, et al. p53 status correlates with the risk of progression in stage T1 bladder cancer: a meta-analysis [J]. *World J Surg Oncol*, 2016(14): 137.
- [22] KIM J H, PARK J. Prognostic significance of heme oxygenase-1, S100 calcium-binding protein A4, and syndecan-1 expression in primary non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(9): 1830-1838.
- [23] MATSUO T, MIYATA Y, MITSUNARI K, et al. Pathological significance and prognostic implications of heme oxygenase 1 expression in non-muscle-invasive bladder cancer; correlation with cell proliferation, angiogenesis, lymphangiogenesis and expression of VEGFs and COX-2 [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 275-280.
- [24] BERTZ S, OTTO W, DENZINGER S, et al. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer [J]. *Eur Urol*, 2014, 65(1): 218-226.
- [25] MALMSTRM P U, HEMDAN T, SEGERSTEN U. Validation of the ezrin, CK20, and Ki-67 as potential predictive markers for BCG instillation therapy of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Urol Oncol*, 2017, 35(8): 532.
- [26] ABDUL-MAKSOU D R S, SHALABY S M, ELSAYED W S, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 and cytok-eratin 20 expressions and their relation to prognostic variables in bladder cancer [J]. *Gene*, 2016, 591(2): 320-326.