

Livin、Survivin、P16、34βE12在预测膀胱低度恶性潜能泌尿上皮乳头状肿瘤复发中的临床意义

谢文华 何屹 顾燕琴 吴晓鸣 曹益方 陈昊 陈斌 何顺亮 陆林峰 邬凌峰

[摘要] **目的** 探讨Livin、Survivin、P16、34βE12在预测膀胱低度恶性潜能泌尿上皮乳头状肿瘤(PUNLMP)复发中的临床意义。**方法** 回顾性分析31例PUNLMP标本,采用免疫组织化学Envision法检测PUNLMP组织中Livin、Survivin、P16、34βE12的表达情况。**结果** Livin、Survivin、P16、34βE12在PUNLMP中的高表达率分别为51.61%、74.19%、64.52%、87.10%。随访时间12~49个月不等,中位随访时间34.00个月,在随访中发现P16和Livin的表达差异在预测PUNLMP的术后复发方面存在统计学意义(χ^2 分别=10.11、19.61, P 均 <0.05),34βE12、Survivin的表达差异在预测PUNLMP的术后复发方面无统计学意义(χ^2 分别=0.00、0.77, P 均 >0.05)。P16的表达情况与肿瘤的长径大小有关($\chi^2=5.84, P<0.05$),P16异常表达与Livin呈负相关($r=-0.46, P<0.05$),膀胱内灌注化疗能够延长PUNLMP患者术后复发时间。**结论** 联合检测Livin与P16的表达,对预测PUNLMP的复发有较高的临床意义。所有PUNLMP患者术后均需行膀胱灌注化疗,而对检测出Livin呈高表达,且伴有P16呈低表达的PUNLMP患者术后应该追加化疗次数,延长化疗时间。

[关键词] 膀胱肿瘤; 低度恶性潜能; Livin; P16; 复发

Clinical significance of Livin, Survivin, P16, and 34βE12 in predicting the recurrence of papillary urothelial neoplasms with low malignant potential of bladder XIE Wenhua, HE Yi, GU Yanqin, et al. Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China.

[Abstract] **Objective** To discuss the clinical significance of Livin, Survivin, P16, and 34βE12 in predicting the recurrence of papillary urothelial neoplasms with low malignant potential of bladder. **Methods** Totally 31 cases of PUNLMP tissue specimens were selected and detected the expression of Livin, Survivin, P16, and 34βE12 by using EnVision. **Results** High expression rates of Livin, Survivin, P16, and 34βE12 in PUNLMP were 51.61%, 74.19%, 64.52%, 87.10% respectively. The follow-up period varies from 12 months to 49 months, the median follow-up time is 34 months. The expressions of P16 and Livin for predicting recurrence of PUNLMP were significantly different ($\chi^2=10.11, 19.61, P<0.05$), while the expressions of 34βE12 and Survivin for predicting recurrence of PUNLMP were not significantly different ($\chi^2=0.00, 0.77, P>0.05$). The expression of P16 was associated with the length to diameter size of the tumor ($\chi^2=5.84, P<0.05$). The abnormal expression of P16 was negatively correlated with Livin ($r=-0.46, P<0.05$). And intravesical chemotherapy could prolong the postoperative recurrence time in PUNLMP patients. **Conclusion** The combined detection of the Livin and P16 expressions has critical clinical significance in predicting the recurrence of PUNLMP. All patients with PUNLMP need to undergo intravesical chemotherapy. For those PUNLMP patients with high expression of Livin and low expression of P16, the number of chemotherapy should be increased and the duration of chemotherapy should be prolonged.

[Key words] bladder tumors; low malignant potential; livin; P16; recurrence

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2017.04.003

基金项目:浙江省医药卫生科技计划(2012KYB204),嘉兴市医学重点学科(04-F-18)

作者单位:233000 安徽蚌埠,安徽省蚌埠医学院(谢文华);嘉兴市第一医院泌尿外科(何屹、顾燕琴、吴晓鸣、曹益方、陈昊、陈斌、何顺亮、陆林峰、邬凌峰)

通讯作者:何屹, Email:84748480@qq.com

膀胱低度恶性潜能泌尿上皮乳头状肿瘤(bladder papillary urothelial neoplasms of low malignant potential, PUNLMP)是介于膀胱乳头状瘤与低级别癌之间,

是具有独特地位的膀胱移行上皮肿瘤^[1]。PUNLMP具有高复发概率(21.6%~60%)、高进展率(2.4%~29%)的特点^[2-6]。PUNLMP复发后进展为癌的概率高达(85.7%)^[2]。因此,在临床上如何可靠地预测PUNLMP的复发?针对PUNLMP高复发风险采取何种必要的预防手段?本次研究通过免疫组织化学Envision二步法检测PUNLMP患者肿瘤组织中P16、34 β E12、Survivin、Livin表达的情况,分析4种蛋白的表达差异与PUNLMP的复发是否存在相关性,旨在发现可靠的肿瘤标记物来预测PUNLMP术后预后和复发情况,给临床治疗提供指导。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2012年1月至2016年1月期间嘉兴市第一医院手术治疗后经病理检查证实的PUNLMP标本31例,该31例患者临床病理资料完整,其中男性25例、女性6例;年龄27~77岁,平均(56.38 \pm 5.64)岁。有3例患者肿瘤长径 \geq 3 cm,2例患者肿瘤多发(肿瘤病灶数目 \geq 2个)。所有患者随访中发现有8例PUNLMP术后复发,其中1例是在术后行膀胱灌注化疗8周结束后第38个月后复发,另7例术后未行膀胱灌注化疗,复发时间术后10~32个月,平均(24.36 \pm 2.32)个月。

1.2 实验方法 将31例PUNLMP患者组织分别制作成4个切片,厚度3~5 μ m,经脱蜡、水化、修复等常规步骤后,每个切片分别滴加一种抗体,如兔抗人Survivin单克隆抗体EP-2880Y(由英国Abcam公司生产);山羊抗人Livin多克隆抗体ab77190(由英国Abcam公司生产);鼠抗人单克隆抗体zm-0205(由北京中杉金桥生物技术有限公司生产);鼠抗人单克隆抗体ZM-0308(由北京中杉金桥生物技术有限公司生产),在4 $^{\circ}$ C温度下过夜,在37 $^{\circ}$ C条件下复温30 min,磷酸盐缓冲液振洗5 min \times 2次,用免疫组织化学检测试剂测试盒k5007(由丹麦Dako公司生产)孵育40 min,磷酸盐缓冲液振洗5 min \times 2次,再用HRP-复合物孵育40 min,然后二氨基联苯胺显色,苏木精染核,封片,读片。实验中用磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定 按试剂盒说明,结果判定胞浆、胞膜或胞核中出现淡黄、黄色或棕褐色小颗粒为阳性细胞。由两名观察者进行双盲判断。表达强度记分标准:①阳性细胞百分比:每张涂片选择10个高倍镜视野,统计每个视野中阳性细胞所占百分比,然后计算平均值,阳性细胞百分比 \leq 5%为0分,5%~

25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $>$ 75%为4分。②着色强度:未着色为0分,淡黄色为1分,黄色为2分,棕褐色为3分。将阳性细胞百分比和着色强度的两项积分相加作为表达强度得分,最后得分 $<$ 3分归为低表达, \geq 3分归为高表达。

1.4 治疗与随访 所有患者确诊后均接受经尿道肿瘤电切术,切除范围为肿瘤基底部周围2 cm以内,直至正常肌组织。术后16例PUNLMP患者同意术后化疗,经签订化疗知情同意后行“吡柔比星针30 mg膀胱灌注,每周1次,一共8次”的方案化疗。复发病例行二次经尿道膀胱肿瘤电切术,术后再次重复上述化疗方案。所有患者术后1年内每3~6个月复查一次膀胱镜,1年后每6~12个月复查一次泌尿系彩超、CTU或膀胱镜。31例患者均得到随访,随访时间在12~49个月,中位随访时间34个月。

1.5 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计数资料比较采用Fisher确切概率法,组间数据的相关性采用Spearman等级相关分析法。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Survivin、Livin、P16、34 β E12在PUNLMP中的表达情况如封二图1

由封二图1a1可见,Survivin以胞核着色为阳性,Survivin呈高表达,高表达率为74.19%(23/31);由封二图1a2可见,Survivin呈低表达;由封二图1b1可见,Livin以胞浆着色为阳性,Livin呈高表达,高表达率为51.61%(16/31);由封二图1b2可见,Livin呈低表达;由图封二1c1可见,P16以胞浆和胞核都着色为阳性,P16呈高表达,高表达率为64.52%(20/31);由封二图1c2可见,P16呈低表达;由图封二1d1可见,34 β E12以胞浆或胞膜着色为阳性,34 β E12呈高表达,高表达率为87.10%(27/31);由图封二1d2可见,34 β E12呈低表达。

2.2 Livin、Survivin、P16、34 β E12在不同性别、不同年龄、不同肿瘤数目、肿瘤直径大小、是否复发中的表达见表1

由表1可见,肿瘤长径越大,P16表达强度越低,P16的表达强度与肿瘤的长径有关($\chi^2=5.84,P<0.05$),本组中3例肿瘤直径 $>$ 3 cm的PUNLMP患者病理组织P16均呈低表达,而P16的表达与患者的年龄、性别及肿瘤数目均无关(P 均 $>$ 0.05);Livin、Sur-

Survivin、34β E12的表达与患者的年龄、性别、肿瘤数目、肿瘤大小亦均无关(P 均 >0.05)。Survivin、34β E12的表达与肿瘤术后复发差异无统计学意义(χ^2 分别=0.00、0.77, P 均 >0.05)。而Livin、P16的表达与肿瘤

术后复发差异有统计学意义(χ^2 分别=10.11、19.61, P 均 <0.05)。Livin表达强度越高, P16表达强度越低或不表达, 则肿瘤越易复发。Livin与P16的表达呈负相关($r=-0.46, P<0.05$)。

表1 Livin、Survivin、P16、34β E12的表达与PUNLMP临床病理参数的关系/例

临床病理参数	n	Livin		Survivin		P16		34β E12	
		低表达	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达
年龄									
≥56岁	18	8	10	4	14	6	12	3	15
<56岁	13	7	6	4	9	5	8	1	12
性别									
男	25	14	11	5	20	10	13	2	23
女	6	1	5	3	3	1	7	2	4
肿瘤数目									
≥2个	2	1	1	0	2	1	1	0	2
<2个	29	14	15	8	21	10	19	4	25
肿瘤长径									
≥3 cm	3	0	3	1	2	3	0	0	3
<3 cm	28	15	13	2	21	8	20	4	24
术后复发									
复发	8	0	8	3	5	8	0	1	7
未复发	23	15	8	5	18	3	20	3	20

3 讨论

Livin蛋白是由定位于人染色体20q13.3上的Livin基因编码合成的人类凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)。Vucic等^[7]报道Livin是通过抑制caspase 3及caspase 9的活性而抑制细胞凋亡, 与肿瘤密切相关, 是目前肿瘤研究领域的热点之一。宋希双等^[8]认为Livin在膀胱正常组织中不表达, 而在膀胱癌组织中阳性率为78%。这与本次研究PUNLMP中Livin的阳性率51.61%存在明显差异, 说明Livin或许可以作为鉴别膀胱癌与PUNLMP指标之一。本次研究中还发现PUNLMP中Livin的表达阳性强度越高, 肿瘤复发率越高, 这与王晓光等^[9]关于Livin表达情况与肿瘤的复发密切有关的报道基本一致。P16蛋白是由定位于人染色体9p21上的P16基因编码合成的IAPs^[10]。P16蛋白作为CDK4的抑制因子, 直接参与细胞增殖周期的调节, P16在人类恶性肿瘤中普遍存在异常表达^[11]。付子乾等^[12]认为P16在膀胱移行细胞癌组织呈低表达(54.6%), 在正常膀胱组织中呈高表达(100%), P16的表达可能与肿瘤

的恶性程度及预后有关。本次研究结果中P16在PUNLMP组织中低表达率, 其表达情况与肿瘤直径大小、肿瘤复发情况均相关($P<0.05$)。因此研究认为P16是评估PUNLMP预后情况的一个重要指标, 建议对于表达低于平均水平的PUNLMP的患者需要加强术后随访, 及时发现复发和恶变转归的情况。

本次研究中8例复发PUNLMP患者术前肿瘤组织中P16均呈低表达, 且Livin均呈高表达。P16的表达情况与Livin表达呈负相关($P<0.05$), 说明两者在肿瘤的发生发展中可能存在某种共同通路, 但它们究竟有怎样的共同机制还待进一步研究。

Survivin蛋白是定位于人染色体17q25上的细胞凋亡抑制基因编码合成的IAPs。Survivin即可直接抑制终末效应蛋白Caspase3和Caspase7阻断细胞的凋亡过程^[13], 也可以间接地与周期蛋白激酶CDK4、p34、cdc2相互作用阻断凋亡信号转导通路^[14]。Volpina等^[15]报道膀胱癌组织中Survivin表达量明显高于正常组织中表达, 并且表达强度的差异与肿瘤的分期、分化程度相关; 晋学飞等^[16]认为Survivin的表

达情况可以评价肿瘤的复发。然而本次研究中Survivin表达与PUNLMP的预后情况无相关性,或许,这是对于将PUNLMP从膀胱癌中独立分类出来的一个有力证据,其病理学类型和生物学行为都和高级别以及低级别膀胱癌不同。34βE12是一组高分子量细胞角蛋白,最早用于前列腺相关疾病的研究,近几年来在甲状腺癌、乳腺癌等研究中也取得新的成果。狄方等^[17]研究认为大部分上皮细胞中34βE12低表达或不表达时高度提示为癌。Varma等^[18]认为膀胱肿瘤中34βE12阳性提示病变来自尿路上皮细胞,34βE12可以用于膀胱肿瘤细胞来源的鉴别。本次研究结果显示34βE12在PUNLMP中为高表达(87.10%),说明PUNLMP不归类为恶性肿瘤,且肿瘤细胞来源于尿路上皮,但34βE12在PUNLMP中的表达差异与其临床病理参数及肿瘤复发均无相关性,所以,34βE12只能用于辅助PUNLMP鉴别诊断,不能用于确诊PUNLMP和预测PUNLMP预后情况。

综上所述,若PUNLMP肿瘤组织中Livin表达强度越高,P16表达强度越低,则该PUNLMP患者肿瘤复发的概率越大;P16的表达情况与Livin呈负相关,两者联合检测对于预测PUNLMP术后复发具有临床意义,并能指导PUNLMP的术后治疗。临床中应该对所有PUNLMP患者术后行常规膀胱灌注化疗,而对检测出Livin呈高表达,且伴有P16呈低表达的PUNLMP患者术后应该追加化疗次数,延长化疗时间。

参考文献

- Humphrey PA, Moch H, Cubilla A, et al. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part b: prostate and bladder tumours[J]. *Eur Urol*, 2016, 70(1):106–119.
- Zhang XK, Wang YY, Chen JW, et al. Bladder papillary urothelial neoplasm of low malignant potential in Chinese: a clinical and pathological analysis[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5):5549–5555.
- Fujii Y, Kawakami S, Koga F, et al. Long-term outcome of bladder papillary urothelial neoplasms of low malignant potential[J]. *BJU Int*, 2003, 92(6):559–562.
- Samaratunga H, Makarov DV, Epstein JI. Comparison of WHO/ISUP and WHO classification of noninvasive papillary urothelial neoplasms for risk of progression[J]. *Urology*, 2002, 60(2): 315–319.
- 程亮, 张绍渤, 黄受方. 低度恶性潜能之乳头状尿路上皮肿瘤[M]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(9): 520–522.
- Lee TK, Chaux A, Karram S, et al. Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential of the urinary bladder: clinicopathologic and outcome analysis from a single academic center[J]. *Human Pathol*, 2011, 42(11):1799–1803.
- Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas[J]. *Curr Biol*, 2000, 10(21): 1359–1366.
- 宋希双, 张志伟, 车翔宇, 等. 凋亡抑制基因Livin在膀胱癌中的表达及意义[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2006, 27(4): 37–39.
- 王晓光, 卢绩, 陈歧辉, 等. Livin基因在浅表性膀胱癌中的表达及其与肿瘤复发的关系[J/CD]. *中华腔镜泌尿外科杂志(电子版)*, 2010, 4(2): 148–151.
- Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(10): 1961–1966.
- Klein MA, Mayo KH, Kratzke RA, et al. p16(INK4a) Peptide mimetics identified via virtual screening [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(1): 403–405.
- 付子乾, 黎玮. E-CD和P16在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其临床意义[J], 2011, 28(2): 284–285.
- Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(2): 164–171.
- Stein JP, Penson DF, Lee C, et al. Long-term oncological outcomes in women undergoing radical cystectomy and orthotopic diversion for bladder cancer[J]. *J Urol*, 2009, 181(5): 2052–2058.
- Volpina OM, Zavalishina LE, Volkova TD, et al. The apoptosis inhibitor survivin in transitional cell carcinoma of the urinary bladder[J]. *Arkh Patol*, 2011, 73(2): 8–10.
- 晋学飞, 吴冰, 谭九峰, 等. 生存素、Livin和zeste同源物-2在膀胱癌组织中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 3(6): 1230–1232.
- 狄方, 王念黎. 细胞角蛋白34βE12在鉴别乳腺良、恶性肿瘤中的意义[J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33(1): 31–35.
- Varma M, Morgan M, Amin MB, et al. High molecular weight cytokeratin antibody (clone 34βE12): a sensitive marker for differentiation of high-grade invasive urothelial carcinoma from prostate cancer[J]. *Histopathology*, 2003, 42(2): 167–172.

(收稿日期 2017-05-03)

(本文编辑 蔡华波)