

鼻咽鳞状细胞癌病人临床病理特征的关系。综上所述,在鼻咽鳞状细胞癌病人中 iASPP 或者 ARD1 的表达明显上升,而 iASPP 或者 ARD1 的表达能够显著促进鼻咽鳞状细胞癌临床病理特征的进展。

参考文献

- [1] 郭俊英,郑瑜宏,崔兆磊,等. EB 病毒感染与 XRCC1-Arg399Gln 基因多态性在鼻咽癌发生中的交互作用[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(5): 539-544.
- [2] 吴芳,王仁生. iASPP 蛋白与肿瘤相关性的研究进展[J]. 华夏医学, 2017, 30(4): 150-153.
- [3] CHEN S C, ABE Y, FANG PT, et al. Prognosis of hippocampal function after sub-lethal irradiation brain injury in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14697.
- [4] 高燕芳,蒋丽霞,张铭. iASPP 基因在卵巢癌中的表达及其临床意义[J]. 重庆医学, 2016, 45(31): 4357-4359.
- [5] XIE X, ZENG X, CAO S, et al. Elevated pretreatment platelet distribution width and platelet count predict poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(62): 106089-106097.
- [6] WANG Y, SHEN C, LU X, et al. The incidence and prognosis of nasopharyngeal carcinoma patients with family history [J]. Oncotarget, 2017, 8(57): 97323-97330.
- [7] QIN H, WANG R, WEI G, et al. Overexpression of osteopontin promotes cell proliferation and migration in human nasopharyngeal carcinoma and is associated with poor prognosis [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2018, 275(2): 525-534.
- [8] 贾培荣,曾妍,郑军,等. ARD1 在鼻咽癌中的表达及临床意义研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(2): 183-185.
- [9] 霍庚崑,宋鑫. iASPP 在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(12): 1675-1678.
- [10] 焦红叶,薛飞,程友. iASPP 表达与鼻咽癌患者临床病理学特征及预后的关系[J]. 重庆医学, 2018, 47(2): 177-179.
- [11] 陈应智,储兵,曾玉梅,等. 广东省中山市 1647 例鼻咽活检标本的临床病理学特征分析[J]. 山东医药, 2015, 55(18): 87-89.
- [12] 黄少华,陈贤明,谢九根. 不同病理类型鼻咽癌临床特征和预后分析[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(5): 383-385.
- [13] HUANG CI, CHEN LF, CHANG SL, et al. Accuracy of a staging system for prognosis of 5-year survival of patients with nasopharyngeal carcinoma who underwent chemoradiotherapy [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2017, 143(11): 1086-1091.
- [14] 吴芳,方业颖,胡凯,等. 凋亡刺激蛋白抑制因子表达对鼻咽癌预后预测的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2017, 37(4): 273-277.
- [15] 费樱平,覃纲. 免疫机制与鼻咽癌研究进展[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 40(2): 104-108.

(收稿日期: 2020-01-29, 修回日期: 2020-03-08)

引用本文: 李纪华,景治安,毛长青,等. 成纤维细胞生长因子受体 2 剪切突变体 IIIc 在膀胱癌中的表达以及与膀胱癌 253J 细胞多柔比星耐药的关系[J]. 安徽医药, 2021, 25(5): 962-965. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2021.05.029.



◇临床医学◇

成纤维细胞生长因子受体 2 剪切突变体 IIIc 在膀胱癌中的表达以及与膀胱癌 253J 细胞多柔比星耐药的关系

李纪华¹, 景治安¹, 毛长青¹, 刘彦军¹, 孔春艳²

作者单位:¹郑州市第一人民医院泌尿外科, 河南 郑州 450004; ²河南医学高等专科学校, 河南 郑州 451191

摘要: **目的** 探讨成纤维细胞生长因子受体 2 的剪切突变体 IIIc (FGFR2 IIIc) 与膀胱癌发生发展及膀胱癌 253J 细胞多柔比星耐药的关系。**方法** 选取 2016 年 1 月至 2018 年 1 月郑州市第一人民医院保存的膀胱癌组织标本 143 例, 同时选取正常膀胱组织 70 例作为对照, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测组织 FGFR2 IIIc 表达; 选取膀胱癌 253J 细胞, 同时建立耐多柔比星 253J 细胞, 采用 MTT 法检测最大半数抑制浓度, 细胞划痕试验检测细胞迁移。**结果** 膀胱癌组 FGFR2 IIIc mRNA 相对表达量为 (1.782±0.342), 明显高于正常膀胱组 ($P<0.05$); 病理分级高级别、病理分期 T2~T4 期 FGFR2 IIIc mRNA 相对表达量分别为 (1.945±0.330) 和 (1.869±0.322), 明显高于低级别和 Ta~T1 期 ($P<0.05$); 不同病理分级、病理分期病人性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 耐多柔比星 253J 细胞 FGFR2 IIIc mRNA 相对表达量和最大半数抑制浓度分别为 (2.001±0.291) 和 (13.02±1.10) g/L, 明显高于 253J 细胞 ($P<0.05$); 耐多柔比星 253J 细胞迁移率为 (23.02±3.12)%, 明显低于 253J 细胞 ($P<0.05$); 耐多柔比星 253J 细胞凋亡率为 (23.22±5.50)%, 明显低于 253J 细胞 ($P<0.05$)。**结论** FGFR2 IIIc mRNA 在膀胱癌组织中表达上调, 与病理分级和病理分期有关, 同时与 253J 细胞耐多柔比星、迁移有一定关系。

关键词: 膀胱肿瘤; 成纤维细胞生长因子受体 2 的剪切突变体 IIIc; 253J 细胞; 多柔比星; 耐药

Expression of FGFR2 IIIc in bladder cancer and its relationship with doxorubicin resistance in 253J bladder cancer cells

LI Jihua¹, JING Zhian¹, MAO Changqing¹, LIU Yanjun¹, KONG Chunyan²

Author Affiliations:¹Department of Urology, the First People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan 450004, China;

²Henan Medical College, Zhengzhou, Henan 451191, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the shear mutant of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2 IIIc) and the occurrence and development of bladder cancer and the drug resistance of bladder cancer 253J cells to doxorubicin. **Methods** 143 specimens of bladder cancer were collected from January 2016 to January 2018, and 70 normal bladder tissues were selected as controls, the expression of FGFR2 IIIc mRNA was detected by qRT-PCR; Bladder cancer 253J cells were selected and doxorubicin-resistant 253J cells were established, MTT assay was used to detect the maximum inhibitory concentration, and cell scratch test was used to detect cell migration. **Results** The relative expression of FGFR2 IIIc in bladder cancer group was (1.782 ± 0.342) , which was significantly higher than that in normal bladder group ($p < 0.05$); The relative expression levels of FGFR2 IIIc in high grade and stage T2-T4 were (1.945 ± 0.330) and (1.869 ± 0.322) , which were significantly higher than those in low grade and stage Ta-T1 ($P < 0.05$); There were no statistically significant differences in gender and age among patients with different pathological grades and stages ($P > 0.05$); The relative expression of FGFR2 IIIc and the maximum half inhibitory concentration of FGFR2 IIIc in doxorubicin-resistant 253J cells were (2.001 ± 0.291) and (13.02 ± 1.10) g/L, which were significantly higher than those in 253J cells ($P < 0.05$); The migration rate of doxorubicin-resistant-253J cells was $(23.02 \pm 3.12)\%$, which was significantly lower than that of 253J cells ($P < 0.05$); The apoptosis rate of doxorubicin 253J cells was $(23.22 \pm 5.50)\%$, which was significantly lower than that of 253J cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of FGFR2 IIIc is up-regulated in bladder cancer tissues, which are related to pathological grading and stage, and also to doxorubicin resistance and migration of 253J cells.

Key words: Urinary bladder neoplasms; Cut-off mutant of fibroblast growth factor receptor 2 IIIc; 253J cells; Doxorubicin; Drug resistance

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤。中国男性膀胱癌发病率高于女性,并且逐年上升^[1]。泌尿系肿瘤是膀胱癌最常见的亚型,占膀胱癌的90%以上。根据临床和病理类型,膀胱癌主要分为两类:浅表非肌层浸润性膀胱癌和进行性肌肉浸润性膀胱癌^[2]。化疗是膀胱癌的重要治疗方法之一。然而,肿瘤细胞通常以多种方式获得耐药性,使化疗效果较差^[3]。此外,在肿瘤细胞获得耐药性后,其他生物学行为可能会发生变化,这可能会对肿瘤复发和进展产生重要影响^[4]。成纤维细胞生长因子受体2 (FGFR2)剪切突变体FGFR2 IIIc在膀胱癌细胞中的表达促进间充质-上皮细胞转变(MET),并使病灶转移能力增强^[5]。本研究选取143例膀胱癌组织标本,探讨FGFR2 IIIc与膀胱癌发展和膀胱癌253J细胞对多柔比星耐药性的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2016年1月至2018年1月郑州市第一人民医院保存的膀胱癌组织标本143例,纳入标准:(1)均经病理学确诊;(2)病人临床资料完整,对标本保存及用途知情同意;(3)组织标本获取前未行放化疗等治疗。排除标准:(1)合并有其他恶性肿瘤;(2)复治病人。同时选取正常膀胱组织70例作为对照(来自开放手术的良性前列腺增生病人),膀胱癌组和正常膀胱组病人一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。组织取出后

置于福尔马林固定液中。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

表1 膀胱癌组和正常膀胱组一般资料比较

组别	例数	男/女/例	年龄/ (岁, $\bar{x} \pm s$)
正常膀胱组	70	46/24	59.82±12.03
膀胱癌组	143	98/45	60.01±12.43
$t(\chi^2)$ 值		(0.170)	0.106
P 值		0.680	0.916

1.2 膀胱癌253J细胞培养及耐药细胞株建立 人膀胱癌253J细胞系由西安交通大学研究所提供,用含胎牛血清的DMEM培养基进行培养,建立多柔比星耐药253J/DOX细胞系。在实验前,将253J/DOX细胞在不含多柔比星的正常培养基中培养1周。253J细胞系先在低浓度多柔比星(2×10^{-5} g/L)的培养基中培养,稳定生长(3×10^{-5} g/L)后逐渐增加药物浓度,6个月后,在含有 1×10^{-4} g/L多柔比星的培养基中培养。

1.3 MTT法检测 用胰蛋白酶消化321J细胞和253J/DOX细胞后,计数并调节细胞浓度,并以5 000细胞/孔的浓度接种在96孔板中用于常规过夜培养。弃去培养上清液,用含有不同浓度多柔比星的培养基培养,设置5个平行孔。48 h后,加入PBS 200 μ L,洗涤3次。每孔加入20 μ L MTT,在培养箱

中孵育4 h;吸出PBS,每孔加入150 μ L二甲基亚砜(DMSO)。酶标仪波长设置为490 nm检测吸光度。通过SPSS软件计算半数最大抑制浓度(IC₅₀)。

1.4 细胞划痕试验 在调节253J细胞和253J/DOX细胞的细胞浓度后,将细胞以 5×10^5 细胞/孔的密度接种在6孔板中,用PBS洗涤细胞3次,并加入无血清DMEM培养基中24 h。然后用200 μ L枪头垂直6孔板平面画横线,用PBS洗涤细胞3次,然后加入无血清培养基。在划痕后0、8、16 h记录照片。通过测量多个观察点的划痕宽度来计算划痕愈合率。

1.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 将逆转录反应产物浓度调节至0.2 g/L,通过SYBRGreen I嵌合荧光法在样品上样1 μ L进行实时PCR反应。GAPDH正向引物为5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3',反向引物为5'-GACGGTGCCATGGAATTTGC-3';FGFR2 III c正向引物是5'-CCGGTGTTAACACCACGGACAAA-3',反向引物是5'-CA GAAGTGTCAACCATGCAGAGT-GAAA-3'。

1.6 统计学方法 采用SPSS22.0进行统计分析,FGFR2 III c mRNA相对表达量、细胞迁移率等资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 t 检验,性别比较使用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 膀胱癌组和正常膀胱组FGFR2 III c mRNA表达比较 膀胱癌组FGFR2 III c mRNA相对表达量(1.782 ± 0.342)明显高于正常膀胱组(1.082 ± 0.200),差异有统计学意义($t=15.839, P=0.000$)。

2.2 FGFR2 III c mRNA表达与膀胱癌临床病理特征关系 病理分级高级别、病理分期T2~T4期FGFR2 III c mRNA相对表达量明显高于低级别和Ta~T1期($P<0.05$),见表2。

2.3 不同病理分级、病理分期病人性别、年龄比较 不同病理分级、病理分期病人性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

2.4 253J和耐多柔比星253J细胞FGFR2 III c mRNA相对表达量等比较 耐多柔比星253J细胞FGFR2 III c mRNA相对表达量和最大半数抑制浓度明显高于253J细胞($P<0.05$),见表4。

2.5 253J和耐多柔比星253J细胞迁移率比较 耐多柔比星253J细胞迁移率(23.02 ± 3.12)%明显低于253J细胞(64.48 ± 2.01)%($t=32.291, P=0.000$)。

2.6 253J和耐多柔比星253J细胞凋亡率比较 耐多柔比星253J细胞凋亡率(23.22 ± 5.50)%明显低于253J细胞(43.32 ± 4.44)%($t=20.331, P=0.000$)。

表2 膀胱癌组织143例成纤维细胞生长因子受体2的剪切突变体III c(FGFR2 III c) mRNA表达与膀胱癌病理特征

		关系/ $\bar{x} \pm s$		
临床病理特征	例数	FGFR2 III c mRNA相对表达量	t 值	P 值
年龄			0.264	0.792
≤60岁	54	1.791±0.312		
>60岁	89	1.777±0.305		
性别			0.313	0.755
男	98	1.788±0.335		
女	45	1.769±0.341		
病理分级			-6.034	0.000
低级别	72	1.621±0.312		
高级别	71	1.945±0.330		
病理分期			-4.622	0.000
Ta~T1期	48	1.610±0.305		
T2~T4期	95	1.869±0.322		
肿瘤大小			0.334	0.739
>3 cm	51	1.794±0.315		
≤3 cm	92	1.775±0.332		
数目			0.248	0.805
单发	72	1.789±0.331		
多发	71	1.775±0.345		

表3 不同病理分级、病理分期病人性别、年龄比较

组别	例数	男/女/例	年龄/ (岁, $\bar{x} \pm s$)
病理分级			
低级别	72	44/28	59.28±9.19
高级别	71	54/17	61.19±10.21
$t(\chi^2)$ 值		(3.702)	-1.176
P 值		0.054	0.242
病理分期			
Ta~T1期	48	35/13	59.10±10.22
T2~T4期	95	63/32	61.02±12.11
$t(\chi^2)$ 值		(0.644)	-0.942
P 值		0.422	0.348

表4 253J和耐多柔比星253J细胞成纤维细胞生长因子受体2的剪切突变体III c(FGFR2 III c) mRNA相对表达量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	最大半数抑制浓度/ (g/L)	FGFR2 III c mRNA 相对表达量
耐多柔比星253J细胞	13.02±1.10	2.001±0.291
253J细胞	2.03±0.67	1.102±0.302
t 值	12.011	11.921
P 值	0.000	0.000

3 讨论

化疗在膀胱癌的治疗中起着重要作用。然而,肿瘤细胞可能由于天然表达或长期受到化学治疗药物的作用获得各种抗药性基因,从而降低治疗效果甚至引起化疗失败^[5-6]。由多药抗性基因MDR1

编码的蛋白质产物 P-gp 是具有多种底物的转运蛋白,并且是肿瘤中临床化学抗性的主要原因之一^[7]。P-gp 在膀胱癌等肿瘤中的表达可导致肿瘤细胞对许多传统化疗药物产生耐药性,并与病人预后不良密切相关。已有研究^[8]通过增加浓度方法建立了人膀胱癌 253J 的 253J / DOX 耐药细胞系,与亲代细胞相比,253J / DOX 细胞中 P-gp 呈现高表达并且对多柔比星具有显著耐药性,该结果表明多柔比星耐药 253J 细胞的耐药性表型与 P-gp 相关,耐药细胞系的建立可以为研究膀胱癌的化疗耐药性和肿瘤发展过程提供可靠的细胞模型。

FGFR 是酪氨酸激酶受体,其通过与其相应的配体成纤维细胞生长因子(FGF)结合而介导细胞信号传导^[9]。FGFR 在肿瘤发展中起关键作用,并且研究已经证实靶基因异常是由点突变,扩增和染色体易位引起的。在肿瘤进展等过程中,上皮产生的细胞可逐渐丧失上皮细胞的特征而获得间质细胞的相关表型,这种现象称为上皮-间质转化(EMT)^[10]。肿瘤细胞的局部浸润能力增强,但是向远处转移的能力减弱^[11]。间质肿瘤细胞在该过程中的主要作用是通过降解细胞外基质来帮助上皮肿瘤细胞实现远处转移^[12]。然而,在高级膀胱癌组织中,肿瘤细胞通常通过 EMT 失去上皮表型。Chaffer 等^[13]发现 FGFR2 裂解突变体 FGFR2 III c 在高级膀胱癌细胞中的表达使肿瘤细胞通过 MET 恢复上皮表型,然后形成肿瘤转移灶。

本次研究结果显示,膀胱癌组和正常膀胱组 FGFR2 III c mRNA 的表达明显高于正常膀胱组。差异具有统计学意义。提示膀胱癌细胞可通过上调 FGFR2 III c 表达获得肿瘤病灶向远处转移。FGFR2 III c mRNA 的表达与膀胱癌的临床病理特征相关,FGFR2 III c mRNA 在高级病理分级和病理分期 T2~T4 中的相对表达显著高于低级和 Ta-T1 期。这表明 FGFR2 III c mRNA 表达与肿瘤分期和分级密切相关,表明 FGFR2 III c 参与膀胱癌的发病机制。FGFR2 III c mRNA 的相对表达和 253J 和耐多柔比星 253J 细胞的最大半抑制浓度显著高于 253J 细胞。与 253J 和多柔比星耐药的 253J 细胞的细胞迁移率相比,多柔比星耐药的 253J 细胞的迁移率和凋亡率显著低于 253J 细胞。分析原因是 253J 细胞对多柔比星产生耐药性后,通过 MET 重新得到上皮细胞表型,使体外迁移能力下降。据推测,EMT 和 MET 都是肿瘤细胞衍生的化疗耐药表型中常见的现象。在临床化疗期间,肿瘤细胞经历这种表型变化,导致局部上皮细胞和间质细胞共存,这促进肿瘤细胞恶性生长和远处转移^[14]。在高级别膀胱肿瘤中,化疗后耐药细胞中 FGFR2 III c 的高表达可能导致一些

肿瘤细胞通过 MET 重新获得上皮表型,进而形成转移灶^[15]。

综上所述,FGFR2 III c mRNA 在膀胱癌组织中表达上调,与病理分级和病理分期有关,同时与 253J 细胞耐多柔比星、迁移有一定关系。

参考文献

- [1] 陈印,顾鹏,李秋艳,等. FGFR3 在膀胱癌发生及靶向治疗中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(37):94-97.
- [2] 王娟娟,朱熹,李艾为,等. 膀胱癌耐药机制的研究进展[J]. 肿瘤, 2017, 37(2):86-91.
- [3] YANG X, SHI L, YI C, et al. MiR-210-3p inhibits the tumor growth and metastasis of bladder cancer via targeting fibroblast growth factor receptor-like 1.[J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(8): 1738-1753.
- [4] MARQUÉS M, REAL FX. Picking on fibroblast growth factor receptors as bladder cancer therapeutic targets[J]. European Urology, 2017, 71(6):863-865.
- [5] CAO W, MA E, ZHOU L, et al. Exploring the FGFR3-related oncogenic mechanism in bladder cancer using bioinformatics strategy[J]. World Journal of Surgical Oncology, 2017, 15(1):66-68.
- [6] 张道秀,赵会平,高丽娜,等. 肌层浸润性膀胱癌保留膀胱术后不同化疗给药途径疗效分析[J]. 癌症进展, 2018, 16(4): 448-451.
- [7] DAS J, CHOI YJ, HAN JW, et al. Nanoceria-mediated delivery of doxorubicin enhances the anti-tumour efficiency in ovarian cancer cells via apoptosis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):9513-9514.
- [8] 倪钊,王勤章,李应龙,等. LRIG3 基因过表达对膀胱癌耐药细胞株顺铂敏感性的作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(2):268-271.
- [9] 王娟娟,朱熹. EMT 介导膀胱癌耐药的机制及相关分子[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(8):813-817.
- [10] 王群,胡卫红,胡乃刚. 多柔比星灌注治疗对行 TURBT 术后浅表性膀胱癌患者临床疗效及相关指标的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(36):5091-5094.
- [11] MIKHAIL AS, NEGUSSIE AH, PRITCHARD WF, et al. Lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin for treatment of bladder cancer[J]. Int J Hyperthermia, 2017, 33(7):733-740.
- [12] LU CS, SHIEH GS, WANG CT, et al. Chemotherapeutics-induced Oct4 expression contributes to drug resistance and tumor recurrence in bladder cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30844-30858.
- [13] ZHANG H, GUO Y, SONG Y, et al. Long noncoding RNA GAS5 inhibits malignant proliferation and chemotherapy resistance to doxorubicin in bladder transitional cell carcinoma [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 79(1):49-55.
- [14] HAN MH, LEE DS, JEONG JW, et al. Fucoidan Induces ROS-Dependent Apoptosis in 5637 Human Bladder Cancer Cells by Downregulating Telomerase Activity via Inactivation of the PI3K/Akt Signaling Pathway[J]. Drug Dev Res, 2017, 78(1):37-48.
- [15] WANG S, MENG Q, XIE Q, et al. Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(3):1179-1187.

(收稿日期:2020-02-25,修回日期:2020-03-23)