文章编号:1000-5404(2009)13-1243-03

论著

膀胱移行细胞癌中整合素连接激酶的表达及意义

蓝建华,王德林, 杨宗珂, 李 曾 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

摘 要: 目的 检测膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)和癌旁正常膀胱组织中整合素连接激酶(ILK)蛋白和mRNA的表达,探讨其在BTCC发生、发展中的作用。**方法** 利用免疫组织化学S-P法检测56例BTCC和30例癌旁正常膀胱组织中ILK蛋白的表达,同时运用逆转录聚合酶链反应法检测这些组织标本中ILK mRNA的表达,并与临床病理资料进行相关性分析。**结果** 56例BTCC中,ILK蛋白阳性表达率为53.6%(30/56),ILK mRNA阳性表达率为58.9%(33/56);而30例癌旁正常膀胱组织中ILK蛋白阳性表达率为10%(3/30),ILK mRNA表达阳性率为13.3%(4/30),ILK mRNA和蛋白在癌组织和癌旁正常膀胱组织表达有显著差异($P<0.01$)。临床病理资料的相关性分析显示,BTCC中,ILK mRNA和蛋白的表达分布与病理分级有相关性($P<0.05$),但与临床分期无相关性($P>0.05$)。**结论** ILK基因转录和蛋白表达可能参与BTCC的发生过程,ILK可能成为早期发现BTCC的一个肿瘤标志物和治疗BTCC的新靶点。

关键词: 膀胱肿瘤; 整合素连接激酶;免疫组织化学;逆转录聚合酶链反应
中图法分类号: R345; R730.23; R737.14 **文献标识码**: A

Expression of integrin-linked kinase in human bladder transitional cell carcinoma and the related significance

LAN Jian-hua, WANG De-lin, YANG Zong-ke, LI Zeng (Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of integrin-linked kinase (ILK) protein and mRNA in the development of human bladder transitional cell carcinoma (BTCC). **Methods** The expressions of ILK protein and ILK mRNA in specimens from 56 cases of human BTCC and from 30 cases of adjacent normal bladder were detected by immunohistochemistry S-P method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. The correlation of the expressions of ILK protein and mRNA to the clinicopathological parameters of human BTCC was analyzed statistically. **Results** The positive rates of ILK protein and mRNA in malignant specimens were 53.6% (30/56) and 58.9% (33/56), respectively, while those in the adjacent normal bladder tissue were 10% (3/30) and 13.3% (4/30), respectively. Significant difference was found in the expressions of ILK protein and mRNA between BTCC and adjacent normal bladder specimens ($P<0.01$). Further statistical analysis showed that the ILK protein and mRNA expressions were correlated to the pathological grades of BTCC ($P<0.05$), but not to the clinical stage of BTCC ($P>0.05$). **Conclusion** ILK gene transcription and protein expression may be involved in the developmental process of BTCC. ILK might be a new marker for early diagnosis of BTCC and a new target gene for BTCC treatment.

Key words: bladder neoplasms; integrin-linked kinase; immunohistochemistry; reverse transcriptase polymerase chain reaction

膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)是膀胱癌中最常见的病理类型,其发生、发展和侵袭扩散机制尚不清楚。研究发现细胞增殖/凋亡失衡可能与大多数肿瘤(包括BTCC)的发生、发展有密切关系。整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是一个具有Ser/Thr蛋白激酶活性的细胞内蛋白,可被整合素或生长因子以依赖于PI-3K的方式激活,并通过磷酸化激活下游底物PKB/Akt和GSK-3β等使细胞外信号得以向下游传递,调节细胞的生长、增殖、分化和凋亡[1]。最近研究发现ILK在前列腺癌[2]、卵巢癌[3]、结肠癌[4]、胃癌[5]等多种恶性肿瘤中均有异常高水平表达和活化,能通过多种途径抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,但ILK在BTCC中表达情况及其与BTCC发生、发展的关系尚不清楚。本研究主要探讨ILK在BTCC的表达情况及其临床意义。

基金项目:国家人事部留学回国人员科技活动择优资助项目(2005-12);重庆市自然科学基金(CSTC2005BB5033)
Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Ministry of Personnel of China (2005-12) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5033)

作者简介:蓝建华,男,四川省广安市人,硕士研究生,主要从事泌尿系肿瘤基础与临床方面的研究。电话:(023)89011022, E-mail: ljhdoctor@yeah.net
通信作者:王德林,电话:(023)89011022,E-mail: dlwangws@sina.com

收稿日期:2009-02-25;**修回日期**:2009-03-27

1 材料与方法

1.1 一般资料

所有标本均取自本院2006年1月至2008年11月膀胱癌手术患者,均行开放性膀胱全切或部分切除术。56例患者中男性42例,女性14例;年龄42~68岁,中位年龄50岁;初次发病44例,复发12例;术后病理诊断均为膀胱移行细胞癌,病理分级:Ⅰ级16例、Ⅱ级25例、Ⅲ级15例;TNM分期:非浸润性BTCC(Tis~T_1期)9例、浸润性BTCC(T_2期~T_4期)47例。对手术切除后标本,离体5 min内进行取材,取56例癌组织、30例癌旁正常膀胱组织(距肿瘤3 cm或3 cm以上,并经病理检查证实为膀胱正常组织)各2块,1份置于经DEPC(二乙酯焦碳酸)水处理的冻存管内,经液氮冻凝后,-80 ℃超低温保存为RT-PCR备用;另1份取材后置于10%福尔马林液中固定为免疫组化备用。

1.2 方法

1.2.1 材料 TRIzol试剂购自美国GIBCOL/BRL公司,*Taq* DNA聚合酶及DL-2000 Marker(2 000、1 000、750、500、250、100 bp)购自北京博迈德科技发展有限公司;琼脂糖为中国SABC公司进口分装产品;DNase Ⅰ、RNasin、DEPC及逆转录试剂盒购自PRoMEGA;ILK鼠抗人单克隆抗体购自美国Santa Cruz生物技术公司。S-P试剂盒购自晶美生物有限公司。酚、氯仿、乙醇等其他生化试剂为国产分析纯。

1.2.2 免疫组化染色 采用链菌素亲生物素-过氧化酶连接法(S-P法)染色。鼠抗人ILK抗体工作浓度为1∶150,4 ℃过夜孵育;DAB显色5 min。PBS液代替一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。判断标准参考文献[2,5]:ILK阳性蛋白表达定位于细胞浆,主要由3位独立的病理医师独立观察阳性细胞的染色强度:染色细胞数<10%为0分,10%~50%为1分,50%~90%为2分,染色细胞数>90%为3分。染色强度:无染色为0分,淡黄色为1分,黄色为2分,棕黄色为3分。1分为阴性(-),2-3分为弱阳性(+),4-5分为阳性(++),6分为强阳性(+++)。

1.2.3 总RNA提取及测定 取-80℃冷冻组织约0.5 g,用研钵充分碾磨后,加1 ml TRIzol提取液于EP管中彻底匀浆,参照TRIzol试剂盒说明书,用一步法抽提总RNA,DNase Ⅰ消化痕量DNA进行RNA纯化后,用20 μl DEPC水溶解,置20 ℃冰箱保存。采用紫外分光光度法测定RNA纯度(A260/A280)。提取产物A260/A280值均在1.8~2.0。

1.2.4 两步法RT-PCR

1.2.4.1 引物设计 引物设计参照文献[5],上游5′-GCACTCAATAGCCGTAGTG-3′,下游5′-CCTACTTGTCCTG-CATCTTC-3′,扩出目的片段约为406 bp。内参照选用β-actin,上游:5′-GAGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3′,下游:5′-ATGGTG-GTGCCGCCAGACAG-3′,扩增片段为303 bp。

1.2.4.2 逆转录反应 即cDNA的合成,取上述提取的总RNA 4 μl,加入200 U/μl M-MLV(鼠源性逆转录酶)1 μl,0.5 μg/μl oligo$(dT)_{18}$ 1 μl,5x reaction buffer 4 μl,Ribonuclease inhibitor(20 U/μl)1 μl,10 mmol/L dNTP mix 2 μl,1 U/μl RNasin达总体积20 μl,混匀,42℃恒温水浴中逆转录60 min,反应结束后,70 ℃ 10 min(破坏MLV)终止反应。保存-20℃冰箱,或直接用作PCR模板。

1.2.4.3 PCR反应 取合成的cDNA模板4 μl,加入目的基因和内参照引物各1 μl、2 * MasterMix 12.5 μl及ddH_2O 6.5 μl达反应体系总体积25 μl。充分混匀后94 ℃ 3 min预变性,再经94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,共30个循环后,72 ℃终末延伸5 min。

1.2.4.4 电泳分析 取4 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察结果并照相。ILK mRNA表达阳性者在琼脂糖凝胶电泳带表现为对应于DL-Marker 250~500 bp的区带显示阳性条带,其远端对应303 bp处则为β-actin内参条带,并对结果照相。

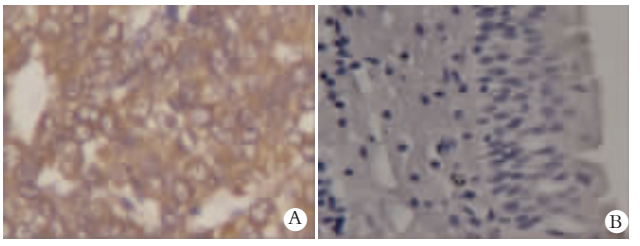
1.3 统计学方法

采用SPSS 12.0软件进行统计学分析,选用t检验、χ^2检验和Spearman等级相关分析法处理统计结果。

2 结果

2.1 BTCC和癌旁正常膀胱组织中ILK蛋白表达

56例BTCC中,ILK蛋白表达阳性率为53.6%(30/56),30例癌旁正常膀胱组织ILK蛋白表达阳性率为10%(3/30),二者比较差异有显著性($P<0.01$)。镜下可见阳性染色主要定位于肿瘤细胞胞浆内,显色为棕黄或棕褐色(图1)。

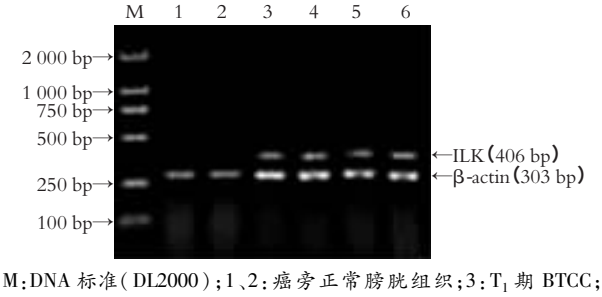


A:ILK在BTCC中的阳性表达,细胞浆呈棕黄色;B:ILK在癌旁正常膀胱组织呈阴性表达

图1 膀胱移行细胞癌和癌旁正常膀胱组织中ILK蛋白表达 (S-P×400)

2.2 膀胱移行细胞癌和癌旁正常膀胱组织中ILK mRNA表达

56例BTCC中,33例有ILK mRNA表达,阳性率为58.9%;30例癌旁正常膀胱组织中仅有4例表达,阳性率为13.3%,二者比较差异有显著性($P<0.01$)。与蛋白表达相比,ILK mRNA表达率稍高(图2),但无显著差异($P>0.05$)。



M:DNA标准(DL2000);1、2:癌旁正常膀胱组织;3:T_1期BTCC;4:T_2期BTCC;5:T_3期BTCC;6:T_4期BTCC

图2 膀胱移行细胞癌和癌旁正常膀胱组织中ILK mRNA表达

2.3 ILK蛋白和mRNA表达的相关性

我们使用等级相关分析法(Spearman检验),对56例BTCC组织中所检测到的蛋白和mRNA表达进行统计分析,发现ILK蛋白和mRNA表达呈正相关($r=0.932$,$P<0.05$)。

2.4 ILK蛋白和mRNA表达与BTCC临床病理的关系

56例BTCC临床病理分析提示ILK蛋白表达和mRNA表

达与病理分级有关($P<0.05$),ILK 蛋白表达和 mRNA 表达的阳性率都随着病理分级的升高而增加;而 ILK 蛋白表达和 mRNA 表达与临床分期无明显相关性($P>0.05$),但 ILK 蛋白表达和 mRNA 表达的阳性率都随着临床分期的升高而有增加的趋势(表 1)。

表 1　BTCC 组织中 ILK 的蛋白和基因表达与临床病理的关系

项目	例数	ILK 蛋白表达					P 值	ILK mRNA 表达			P 值
		+++	++	+	−	阳性率		+	−	阳性率	
WHO 分级											
G_1	16	2	2	2	10	37.5%		7	9	43.8%	
G_2	25	4	5	3	13	48.0%	<0.05	13	12	52.0%	<0.05
G_3	15	8	3	1	3	80.0%		13	2	86.7%	
TNM 分期											
T_{is}-T_1	9	1	1	1	6	33.3%	>0.05	3	6	33.3%	>0.05
T_{2-4}	47	13	9	5	20	57.4%		30	17	63.8%	

3　讨论

目前大量的研究证实,ILK 的过度表达与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关,认为其能够通过多种途径抑制细胞凋亡,促进细胞增殖,从而导致肿瘤的发生[6]。将高表达 ILK 的上皮细胞和前列腺癌上皮导入裸鼠内可快速形成肿瘤,肿瘤细胞显示为高度侵袭性表型[7-8];抑制 ILK 的表达可抑制蛋白激酶 B(PKB/AKT)的活性,导致细胞周期停滞和诱导细胞凋亡,抑制肿瘤生长[9],这表明 ILK 可能是个癌基因。ILK 过表达或持续性激活将导致细胞非贴壁依赖性生存、致瘤性转化、增加成瘤性及肿瘤的侵袭潜力[10]。最近,Fuchs 等[11]在研究 EGFR 靶向治疗肝细胞癌耐药机制时发现,其耐药机制与 ILK 传导通路有关,通过干扰 ILK 可以克服肝癌耐受表皮生长因子受体的抑制作用,提示 ILK 可能成为肝细胞癌的新治疗靶点。ILK 在人类肿瘤发生中的作用已受到广泛关注,在多种恶性肿瘤中发现 ILK 过高水平表达和异常活化[2-5]。

本实验在国内外率先研究了 BTCC 组织中 ILK mRNA 和蛋白的表达情况。对 56 例 BTCC 组织和 30 例癌旁正常膀胱组织标本分别采用免疫组织化学和 RT-PCR 方法检测了 ILK 蛋白和 mRNA,其蛋白表达率为 53.6%,mRNA 表达率为 58.9%;30 例癌旁膀胱正常组织中 ILK 蛋白表达率为 10%,mRNA 表达率为 13.3%。BTCC 组织中 ILK 蛋白和 mRNA 表达率明显高于癌旁正常膀胱组织,有统计学意义($P<0.01$)。此结果和其他大多数肿瘤的研究发现一致,提示 ILK 可能与 BTCC 的发生有密切关系。相关分析发现,ILK 蛋白和 mRNA 表达呈显著正相关,表明 ILK 的基因转录和蛋白表达是平行的。进一步结合临床病理资料进行综合分析,发现 ILK 基因转录和蛋白表达与 BTCC 的病理分级有关($P<0.05$),随着肿瘤病理分级的升高,ILK 基因转录活性逐渐增加,ILK 蛋白表达相应增强;而统计分析提示 ILK 基因转录和蛋白表达与临床分期无明显关系($P>0.05$),可能与本研究的有限标本量有关,但发现 ILK 基因转录和蛋白表达的阳性率都随着临床分期的升高(从非浸润到浸润癌)而有增加的趋势。说明在 BTCC 早期即有 ILK 高表达,ILK 表达越高,肿瘤的恶性程度越高,ILK 参与了 BTCC 的发生、发展过程,并可能成为早期发现 BTCC 的一个肿瘤标志物。最近又有研究显示,将 ILK 反义寡核苷酸转染恶性胶质瘤细胞,能明显抑制 PKB 的活性,诱导癌细胞凋亡和减缓肿瘤生长[12]。提示 ILK 可能成为治疗 BTCC 的新靶点。

参考文献:

[1] Naska S, Park K J, Hannigan G E, *et al*. An essential role for the integrin-linked kinase -glycogen synthase kinase-3 beta pathway during dendrite initiation and growth [J]. J Neurosci, 2006, 26(51): 13344 – 13356.

[2] Kieffer N, Schmitz M, Plancon S, *et al*. ILK as a potential marker gene to ascertain specific adenocarcinoma cell mRNA isolation from frozen prostate biopsy tissue sections [J]. Int J Oncol, 2005, 26(6): 1549 – 1558.

[3] Ahmed N, Riley C, Oliva K, *et al*. Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid [J]. J Pathol, 2003, 201(2): 229 – 237.

[4] Marotta A, Parhar K, Owen D, *et al*. Characterisation of integrin-linked kinase signalling in sporadic human colon cancer [J]. Br J Cancer, 2003, 88(11): 1755 – 1762.

[5] Ito R, Oue N, Zhu X, *et al*. Expression of integrin-linked kinase is closely correlated with invasion and metastasis of gastric carcinoma [J]. Virchows Arch, 2003, 442(2): 118 – 123.

[6] Abboud E R, Coffelt S B, Figueroa Y G, *et al*. Integrin-linked kinase: a hypoxia-induced anti-apoptotic factor exploited by cancer cells [J]. Int J Oncol, 2007, 30(1):113 – 122.

[7] McDonald P C, Fielding A B, Dedhar S. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology [J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 19): 3121 – 3132.

[8] Zhang X, Li Y, Huang Q, *et al*. Increased resistance of tumor cells to hyperthermia mediated by integrin-linked kinase[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(3): 1155 – 1160.

[9] Persad S, Attwell S, Gray V, *et al*. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3207 – 3212.

[10] Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and beta-catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1691(1): 1 – 15.

[11] Fuchs B C, Fujii T, Dorfman J D, *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells [J]. Cancer Res, 2008, 68(7): 2391 – 2399.

[12] Koul D, Shen R, Bergh S, *et al*. Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(11): 1681 – 1688.

(编辑　王　红)