

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01088

· 论 著 ·

乏氧状态对膀胱癌全膀胱切除术后患者预后的影响

陈家璧, 庄伟*, 李毅宁

福建医科大学附属第二医院泌尿外科, 泉州 362000

[摘要] **目的** 探讨机体乏氧状态对膀胱癌全膀胱切除术后患者预后的影响。**方法** 66例膀胱尿路上皮癌行全膀胱切除手术患者,分为机体乏氧状态组(OH组, $n=19$)和机体常氧状态组(NS组, $n=47$)。免疫组化检测肿瘤组织缺氧诱导因子 1α (HIF- 1α)表达和CD105标记的肿瘤微血管密度(MVD)。随访术后生存时间,对比两组患者临床资料, Kaplan-Meier法分析两组生存率,建立Cox模型分析各变量与生存时间的相关性。**结果** OH组肿瘤组织HIF- 1α 表达的阳性率为89.5%(17/19),MVD值为 53.1 ± 19.0 ,中位生存时间为56个月;NS组表达的阳性率为66.0%(31/47),MVD值为 40.1 ± 15.2 ,中位生存时间为82个月;两组临床分期、Hb水平、HIF- 1α 表达、MVD值间差异有统计学意义($P<0.05$)。肿瘤分期高、机体乏氧、HIF- 1α 高表达和肿瘤高MVD值患者的生存期较短,而高Hb患者的生存期延长($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 机体乏氧状态下的膀胱癌组织HIF- 1α 表达上升,肿瘤微血管密度增加,不利于患者预后。

[关键词] 缺氧;膀胱肿瘤;预后;缺氧诱导因子 1α 亚基;CD105

[中图分类号] R 737.14 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)10-1088-05

Effect of hypoxia on postoperative prognosis of radical cystectomy in patients with bladder cancer

CHEN Jia-bi, ZHUANG Wei*, LI Yi-ning

Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of hypoxia on postoperative prognosis of radical cystectomy in patients with bladder cancer. **Methods** A total of 66 patients with bladder urothelial cancer undergoing radical cystectomy surgery were divided into hypoxia group (OH group, $n=19$) and the normoxic group (NS group, $n=47$). Immunohistochemical examination was used to examine the expression of HIF- 1α and CD105-assessed microvessel density (MVD). The survival of the patients was followed up and the clinical data of the two groups were compared. Kaplan-Meier analysis was used for analyzing the survival of the two groups, and a Cox model was established to analyze correlation of each variable with the survival time. **Results** In the OH group, the positive rate of HIF- 1α was 89.5% (17/19) in the tumor tissues, the MVD value was 53.1 ± 19.0 , and the median survival time was 56 months; the corresponding values in the NS group were 66.0% (31/47), 40.1 ± 15.2 , and 82 months, respectively. The clinical stages, Hb levels, HIF- 1α expression, and MVD values were significantly different between the two groups ($P<0.05$). Advanced tumor stage, hypoxia state, high HIF- 1α expression and high MVD value in tumor tissues were associated with a shorter survival of patients, and high Hb was associated with a longer survival of patients ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Hypoxic state can lead to increased HIF- 1α expression and microvessel density in bladder cancer tissues, which is harmful for patient prognosis.

[Key words] anoxia; urinary bladder neoplasms; prognosis; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; CD105

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(10):1088-1092]

膀胱移行细胞癌(transitional bladder cell carcinoma, TBCC)是我国泌尿系统发病率最高的恶性肿瘤,其发生、发展及预后与肿瘤新生血管关系密切^[1]。肿瘤新生血管可表现为内皮血管生长、马赛克血管及血管拟态形成等三大形式^[1-2],其中内皮血

管生长模式最具代表性,也是最经典的血管生成形式。缺氧可借助缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)信号转导通路等在肿瘤血管内皮生长中扮演重要角色^[3-4]。当膀胱尿路上皮癌行全膀胱切除患者本身处于因贫血、慢性肺疾病(chronic

[收稿日期] 2013-05-09

[接受日期] 2013-07-22

[作者简介] 陈家璧, 硕士, 副主任医师, E-mail: 554761115@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0595-22768074, E-mail: lx2998121314@163.com

pulmonary disease, CPD)或其他肺功能不良造成的慢性乏氧状态,是否会加重肿瘤内缺氧,进而影响肿瘤微血管生成状态以及影响患者预后目前仍不清楚。因此,本研究选取2005年1月至2010年12月福建医科大学附属第二医院泌尿外科膀胱尿路上皮癌行全膀胱切除患者66例,采用免疫组化半定量法检测HIF-1 α 表达水平评估组织乏氧状态,同时检测CD105标记的肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD),结合患者的临床资料及预后情况,探讨机体乏氧状态对膀胱癌全膀胱切除术后患者预后的影响。

1 资料和方法

1.1 一般资料 标本来源:膀胱尿路上皮癌行全膀胱切除手术标本66例,取自福建医科大学附属第二医院泌尿外科2005年1月至2010年12月6年间有完整随访资料的手术病例。病例纳入标准:术后病理证实为膀胱尿路上皮癌,并有完整随访资料,且手术前后未行放化疗。66例患者中男54例,女12例;年龄40~86岁,平均(64.6 \pm 11.0)岁。按照膀胱癌2009 TNM分期系统^[5]: I期32例, II期12例, III期13例, IV期9例。平均血红蛋白Hb(126.4 \pm 18.7) g/L。

1.2 分组标准 参照文献^[6-7]将研究对象分为如下2组。机体乏氧状态(organism hypoxia, OH)组:(1)有慢性肺部疾病史,如慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、肺气肿、哮喘、矽肺、肺结核等;(2)有慢性肺疾病的临床表现,如超过3个月的反复咳嗽、咳痰、气促、喘息、咯血等,并有肺功能检查证实肺通气或弥散功能障碍;(3)术前Hb \leq 110 g/L。符合三个条件之一者即为OH组。机体常氧状态组(normoxia state, NS)组:(1)既往无慢性肺部疾病史;(2)无慢性肺疾病的临床表现;(3)术前Hb $>$ 110 g/L。66例患者OH组19例, NS组47例。

1.3 免疫组化染色测定肿瘤组织HIF-1 α 、CD105表达

1.3.1 主要试剂及仪器 HIF-1 α 抗体、CD105抗体均为浓缩型鼠抗人单克隆抗体,由美国Santa Cruz公司提供,镇江厚普生物科技有限公司分装,分别按1:60和1:80稀释,采用S-P法进行免疫组化染色,DAB显色,苏木精复染,PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。具体步骤参照免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法。

1.3.2 结果判定 阳性细胞应首先符合下列标准:

切片染色对比度好,背景清晰;定位准确;排除出血、坏死部位及切片边缘。HIF-1 α 阳性表达的判定:以细胞核有棕黄色颗粒为阳性,采用半定量的方法,显微镜下观察染色强度和计数阳性染色细胞数。根据免疫组化染色深度及阳性细胞数量分别记分。染色强度:不着色为0分,浅棕黄色为1分,棕黄色为2分,深褐色为3分。阳性细胞百分率 $<$ 5%为0分,5%~10%为1分,10%(不包括10%)~50%为2分,50%以上为3分。两项指标之和0~1分为(-),2分为(+),3~4分为阳性(++),5~6分为强阳性(+++)^[8]。

CD105阳性表达的判定:表达于细胞膜,呈棕黄色或黄色颗粒状染色。计数CD105标记的MVD值:先用100倍光镜扫视整个切片,寻找5个高血管密度区(“热区”),再用400倍光镜计数热区被抗CD105抗体染成棕黄色的血管数目。凡看到被染色的内皮细胞群均认为是新生的肿瘤血管,就记为1个微血管数即1个MVD值。结果采用5个视野中血管数值的均数为总MVD值^[9]。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0软件包处理数据。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验,比较两组间的临床指标、HIF-1 α 表达及MVD值。Kaplan-Meier法分析生存率,采用逐步法筛选自变量,建立Cox模型分析多种变量对生存率的影响。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 随访结果及膀胱癌HIF-1 α 、CD105表达 截至2012年11月,所有病例均获随访,平均随访时间(46.2 \pm 21.8)个月,死亡25例,截尾41例。HIF-1 α 表达于膀胱癌细胞核上(图1A),呈棕黄色颗粒染色,阳性者48例,阳性表达率72.7%。CD105表达于细胞膜(图1B),呈棕黄色或黄色颗粒状染色,平均MVD值为43.8 \pm 17.3。

2.2 OH组与NS组膀胱癌HIF-1 α 、CD105表达及临床资料的比较 OH组表达HIF-1 α 的阳性率为89.5%(17/19),MVD值为53.1 \pm 19.0; NS组HIF-1 α 表达的阳性率为66.0%(31/47),MVD值为40.1 \pm 15.2。两组临床分期、Hb水平、HIF-1 α 表达阳性率、MVD值间差异有统计学意义($P<$ 0.05或 $P<$ 0.01,表1)。

2.3 OH组与NS组患者生存率影响因素分析 Kaplan-Meier分析两组患者生存率,结果(图2)表明:OH组的中位生存时间为56个月,NS组的中

位生存时间为 82 个月,两组差异有统计学意义($P=0.002$)。采用逐步法筛选自变量,建立 Cox 回归模型分析膀胱癌各临床指标与生存率的关系,发现肿瘤分期、机体缺氧状态、Hb 含量、HIF-1 α 表达、MVD 值均是影响患者总生存率的独立危险因素(表 2)。

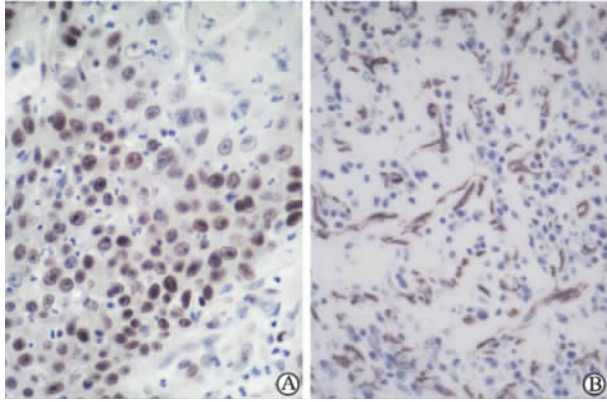


图 1 膀胱移行细胞癌 HIF-1 α (A)及 CD105(B)免疫组化染色

Fig 1 Immunohistochemistry staining of HIF-1 α (A) and CD105(B) in transitional bladder cell carcinoma tissues

Original magnification: $\times 400$

表 1 OH 组与 NS 组临床资料对比

Tab 1 Clinical data of OH group and NS group

Item	OH group (N=19)	NS group (N=47)	P value
Age ^a (year)	68.2 \pm 8.5	63.2 \pm 11.7	0.096
Sex n(%)			
Male	2(10.5)	10(21.3)	0.484
Female	17(89.5)	37(78.7)	
Tumor stage n(%)			
I - II	7(36.8)	36(76.6)	<0.05
III-IV	12(63.2)	11(23.4)	
Hemoglobin ^a $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$	110.8 \pm 22.0	131.4 \pm 12.3	<0.01
MVD value ^a	53.1 \pm 19.0	40.1 \pm 15.2	<0.05
HIF-1 α expression n(%)			
Negative(--+)	2(10.5)	16(34.0)	<0.05
Positive(++)	7(36.8)	20(42.6)	
Strong positive(+++)	10(52.6)	11(23.4)	

^a: $\bar{x} \pm s$. OH; Organism hypoxia; NS; Normoxia state; MVD; Microvessel density; HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor-1 α

对肿瘤分期、Hb 含量(以 110 g/L 为界)、HIF-1 α 表达、MVD 值(以均值 44 为界)同样进行 Kaplan-Meier 分析生存率,结果(表 3)表明:肿瘤分期高、机体缺氧、HIF-1 α 高表达和肿瘤高 MVD 值患

者的生存期较短,而高 Hb 患者的生存期延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

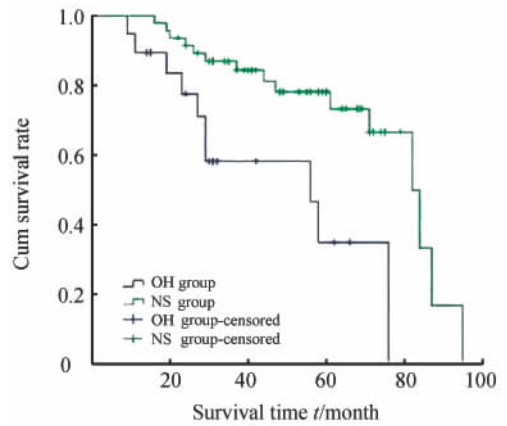


图 2 OH 组与 NS 组生存曲线的对比

Fig 2 Survival curves of OH group and NS group

OH; Organism hypoxia; NS; Normoxia state

表 2 膀胱移行细胞癌患者生存率的多因素分析结果

Tab 2 Multivariate analysis of survival rate of patients with transitional bladder cell carcinoma

Item	B	P	Exp(B)	95.0% CI
Tumor stage	1.872	<0.01	6.500	2.817-14.996
Hypoxia	1.435	<0.05	4.201	1.078-16.367
Hemoglobin	-0.055	<0.05	0.947	0.907-0.988
MVD	0.046	<0.05	1.047	1.002-1.094
HIF-1 α expression	1.665	<0.05	5.286	1.436-19.453

OH; Organism hypoxia; NS; Normoxia state; MVD; Microvessel density; HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor-1 α

表 3 膀胱癌患者生存率独立影响因素分析

Tab 3 Analysis of independent factors influencing survival of bladder cancer patients

Item	n	Meta-survival t/month	P value
Grouping			
OH group	19	56	<0.01
NS group	47	82	
Hemoglobin $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$			
≥ 110	55	82	<0.05
< 110	11	45	
MVD			
≥ 44	31	56	<0.01
< 44	35	87	
HIF-1 α expression			
Negative	18	95	<0.01
Positive	27	84	
Strongly positive	21	37	
Tumor stage			
I - II	43	84	<0.01
III - IV	23	29	

OH; Organism hypoxia; NS; Normoxia state; MVD; Microvessel density; HIF-1 α ; Hypoxia inducible factor 1 α

3 讨论

局部乏氧状态是肿瘤微环境的基本特征之一, 根源于肿瘤的高生长、高代谢率导致的局部氧耗增加以及肿瘤内盲端、癌栓、血栓形成致微血管阻塞导致的血管结构改变等^[6,10]。在乏氧状态下, 细胞内许多与肿瘤血管生成相关的基因转录和表达发生改变, 从而对缺氧作出复杂的应激反应^[11], 进而影响肿瘤的血管生成。HIF-1 是在乏氧状态下哺乳动物细胞中广泛表达的调控因子, HIF-1 蛋白表达增高是组织缺氧的重要表现, 可评价组织的缺氧程度。HIF-1 是由 α 亚基和 β 亚基组成的异源二聚体, 组织和细胞缺氧条件可诱发其表达活性增加, 在乏氧状态下的细胞新陈代谢、组织血管形成、肿瘤的发展和转移中发挥着重要作用^[3]。HIF-1 α 是 HIF-1 唯一的氧调节亚单位, 可以决定 HIF-1 的活性^[12], 缺氧可以使 HIF-1 α 与 VEGF 基因 5' 末端的增强子结合, 使 VEGF 表达上调, 促进肿瘤内皮依赖血管的形成^[4,13]。而内皮依赖性血管是一种经典的肿瘤血管生成方式。血管内壁由分化成熟的内皮细胞衬覆, 肿瘤细胞不参与血管壁构成。以往多认为 CD34 可以良好地标记血管, 但现在认为 CD34 多标记大血管, 无法敏锐反映肿瘤的微血管生长状态, 而 CD105 则主要标记肿瘤新生的小血管, 在较大的血管中不表达或弱表达, 与以往泛血管内皮标记因子相比, 是一种较佳的新生血管生成标记物^[14-16]。根据 CD105 的染色评估微血管密度的方法是目前公认的肿瘤血管生成的量化标准, 其标记 MVD 是大多数肿瘤患者生存的预后影响因素之一^[17-18]。

本研究不同于以往单纯停留于膀胱癌中 HIF-1 α 和 CD105 的表达研究, 进一步研究活体乏氧状态下膀胱癌中 HIF-1 α 和 CD105 的表达差异, 并追踪其在膀胱癌预后分析中的地位, 以期能更深入客观揭示缺氧因素在肿瘤发生发展中的地位。慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、肺气肿、哮喘、矽肺、肺结核等慢性肺部疾患可以影响肺部的通气和换气功能, 从而导致肺的通气血流比值失调, 动脉血氧分压下降, 进而造成全身性低氧血症。贫血是恶性肿瘤的常见症状, 贫血时血液携氧能力下降, 同样可造成组织的乏氧状态。因此, 机体在慢性肺疾病造成的肺泡有效通气量下降, 或贫血造成的血液携氧能力

下降两种状态下, 均可使机体处于某种程度的乏氧状态, 最终加剧肿瘤组织内部的乏氧程度。

本研究发现膀胱癌中 HIF-1 α 的阳性表达率为 72.7%, 以 CD105 标记的 MVD 值为 43.8 ± 17.3 , 与以往的研究结果^[19-20]相近。进一步对比乏氧状态和普通状态下的膀胱癌患者, OH 组表达 HIF-1 α 的阳性率为 89.5%, MVD 值为 53.1 ± 19.0 , 高于 NS 组的 66.0% 和 40.1 ± 15.2 , 中位生存时间为 56 个月, 低于 NS 组的 82 个月, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。OH 组还表现出肿瘤分期更高。上述结果提示, 乏氧状态下的患者肿瘤倾向 HIF-1 α 表达上升, 微血管密度增加, 肿瘤分期更高, 生存期更短。结果表明在机体处于有慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、肺气肿、哮喘、矽肺、肺结核等慢性肺部疾患以及贫血状态下, 可以进一步加重原本处于乏氧状态的肿瘤微环境, 促进肿瘤的生长分化, 进而减少患者生存寿命。其可能的机制为: 乏氧状态下, 肿瘤组织中 HIF-1 α 表达增加, 通过促使 VEGF、PDGF、TGF 及 EGFR 等细胞因子表达增多^[21-22] 来促进肿瘤微血管的发生发展, 从而促进肿瘤生长浸润, 最终影响患者预后。

综上所述, 本研究通过 Cox 分析全膀胱切除患者的生存预后, 发现肿瘤分期高、机体乏氧、HIF-1 α 高表达可以增加患者的死亡风险, 而高 Hb 则有助患者的生存期延长。结果提示对于膀胱癌术后的患者, 注意对肺部基础疾病的治疗、充足均衡的营养, 保证正常的血红蛋白水平, 以及必要时配合适当的氧疗可能对预后积极意义。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Vartanian A A, Stepanova E V, Gutorov S L, Solomko E S, Grigorieva I N, Sokolova I N, et al. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Can J Urol*, 2009, 16: 4726-4732.
- [2] Dennie C J, Veinot J P, McCormack D G, Rubens F D. Intimal sarcoma of the pulmonary arteries seen as a mosaic pattern of lung attenuation on high-resolution CT [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2002, 178: 1208-1210.

- [3] Qi J, Pelliccia M, Ronai Z A. The SIAH2-HIF-FoxA2 axis in prostate cancer-new markers and therapeutic opportunities[J]. *Oncotarget*, 2011, 1: 379-385.
- [4] Fan Y Z, Sun W. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in tumors and potential tumor-target therapy [J]. *World J Gastrointest Surg*, 2010, 2: 117-127.
- [5] Sobin L H, Gospodariwicz M K, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer[M]. 7th ed. London: Wiley-Blackwell, 2009: 262-265.
- [6] 周雅, 徐冉, 杨明根, 李松超, 赵晓昆. 机体缺氧状态与肾透明细胞癌预后的关系[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2012, 33: 598-602.
- [7] Jeong C W, Ku J H, Kwak C, Kim H H, Lee S E. Chronic pulmonary disease negatively influences the prognosis of patients with advanced prostate cancer[J]. *World J Urol*, 2009, 27: 643-652.
- [8] 周锦棠, 蔡志明, 李宁忱, 那彦群. 缺氧诱导因子1和葡萄糖转运因子1蛋白在肾癌和膀胱癌组织表达的临床意义[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86: 1970-1974.
- [9] 吴后男, 李玉林, 张丽红, 朱桂彬, 蔡金花. 血管内皮生长因子和 E26 转录因子在乳腺癌中的表达及意义[J]. *中华病理学杂志*, 2002, 31: 222-226.
- [10] 李新丰, 庄伟, 王高雄. 肝细胞癌中内皮抑素和血管内皮生长因子的表达意义[J]. *中华消化外科杂志*, 2010, 9: 44-47.
- [11] Semenza G L. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 721-732.
- [12] Song I S, Wang A G, Yoon S Y, Kim J M, Kim J H, Lee D S, et al. Regulation of glucose metabolism-related genes and VEGF by HIF-1 alpha and HIF-1 beta, but not HIF-2 alpha, in gastric cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2009, 41: 51-58.
- [13] Su M, Feng Y J, Yao L Q, Cheng M J, Xu C J, Huang Y, et al. Plasticity of ovarian cancer cell SKOV3ip and vasculogenic mimicry *in vivo* [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18: 476-486.
- [14] 李清明, 张宝泉, 彭培宏. CD105 在喉癌组织中的表达及临床病理意义[J]. *基础医学与临床*, 2009, 29: 322-325.
- [15] Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers [J]. *Pathol Int*, 2006, 56: 717-723.
- [16] 王怀志, 赵困强, 窦科峰, 宋振顺. 肝细胞癌 CD105 和 CD34 标记微血管密度的差异及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 16: 2087-2090.
- [17] Lopez-Novoa J M, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299: 959-974.
- [18] Bernabeu C, Lopez-Novoa J M, Quintanilla M. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792: 954-973.
- [19] 朱德淳, 刘禄成, 黄海龙, 李然伟. 缺氧诱导因子-1 及血管内皮生长因子在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 2: 477-478.
- [20] 王晓辉, 李志军, 程涛, 程远合, 张建国, 梁豪. CD105、TSP-1 在膀胱移行细胞癌中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤外科杂志*, 2012, 4: 11-14.
- [21] Maxwell P. HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 2712-2722.
- [22] Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1469-1480.

[本文编辑] 贾泽军