

膀胱移行细胞癌中粘蛋白 MUC1 的表达与肿瘤浸润性树突状细胞的分布

向松涛¹,周四维²,管维²,刘继红²,叶章群²(¹广州中医药大学附属省中医院泌尿外科,广东广州 510120;²华中科技大学同济医学院泌尿外科,湖北武汉 430030)

摘要:目的 研究膀胱移行细胞癌中粘蛋白 MUC1 表达和肿瘤浸润性树突状细胞(TIDC)分布的变化,探讨二者在膀胱癌侵袭、转移及化疗耐药过程中的作用。方法 采用免疫组织化学 SP 法检测 MUC1 和 TIDC 在膀胱移行细胞癌的表达和定位及 MUC1 在 T-24 细胞、BIU-87 和耐药株 BIU-87/A 中的表达。应用流式细胞仪检测 BIU-87、耐药株 BIU-87/A 及 T-24 细胞在阿霉素、长春新碱、顺铂 3 种化疗药物作用 48 h 后的凋亡率。结果 MUC1 在各期膀胱移行细胞癌中均表达,表达模式各有特点,MUC1 的染色分型同肿瘤的病理分级和临床分期密切相关($P<0.001$)。DC 的数量同肿瘤病理分级呈负相关,随着病理分级的升高阳性细胞数明显减少($P<0.005$)。MUC1 在 BIU-87、T-24 细胞膜、胞浆中均有浅棕色弱阳性表达,在 BIU-87/A 的胞膜、胞浆中均有深棕色强阳性表达,两者细胞平均光密度值差异有显著性($P<0.01$)。流式细胞仪检测 BIU-87、T-24 和 BIU-87/A 的自发凋亡率分别为 1.15%、1.40%、0.90%,在阿霉素、长春新碱、顺铂 3 种化疗药物作用 48 h 后,BIU-87 的凋亡率分别为 45.69%、47.70%、44.50%,T-24 的凋亡率分别为 43.79%、46.17%、44.50%,均有明显升高($P<0.01$),但两种细胞之间及 3 种化疗药之间差异无显著性($P>0.05$)。耐药株 BIU-87/A 在阿霉素、长春新碱作用 48 h 后的凋亡率分别为 19.88%、21.41%,均明显低于亲本细胞株 BIU-87($P<0.05$)。结论 MUC1 的表达模式和 TIDC 数量的监测可以作为膀胱移行细胞癌恶性程度和预后的判断指标。TIDC 的减少可能是膀胱癌免疫逃逸和耐受的重要环节,肿瘤细胞表面高密度的 MUC1 可能参与膀胱移行细胞癌侵袭转移和化疗耐药机制。

关键词:粘蛋白;树突状细胞;膀胱肿瘤;移行细胞癌

中图分类号:R737.14 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)09-1114-05

Expression of MUC1 and distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human bladder transitional cell carcinoma

XIANG Song-tao¹, ZHOU Si-wei², GUAN Wei², LIU Ji-hong², YE Zhang-qun²

¹Department of Urology, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine and Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; ²Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: Objective To study MUC1 expression and distribution of tumor-infiltrating dendritic cells (TIDCs) in human bladder transitional cell carcinoma (BTCC). **Methods** Immunohistochemical staining was employed to detect MUC1 expression and TIDC distribution in 69 surgical specimens of BTCC. MUC1 expression was also detected immunohistochemically in BIU-87, T-24 and drug-resistant BIU87/A cells. Flow cytometry was performed for determining the apoptosis rates of these 3 cells after a 48-hour treatment with adriamycin, vincristine and cisplatin, respectively. **Results** MUC1 expression was detected in the BTCC tissues of all stages and the immunohistochemical staining patterns were significantly associated with the pathological grade and clinical stage of the tumors ($P<0.001$). The number of TIDCs in the tumors was inversely correlated with tumor pathological grades and clinical stages ($P<0.005$). MUC1 expressed weakly in the cytoplasm and on the membrane of BIU-87 cells and T-24 cells, but strongly in the cytoplasm and membrane of BIU-87/A cells, showing significant differences between the drug-sensitive and -resistant cells ($P<0.05$). The apoptosis rates of BIU-87 cells and T-24 cells increased obviously after treatment with adriamycin, vincristine and cisplatin, but no significant differences were noted between the two cells or between the 3 drugs. The apoptosis rate of BIU87/A cells, however, exhibited no obvious increase after adriamycin or vincristine treatment, but showed significant increase in response to cisplatin treatment ($P<0.05$). **Conclusions** The expression

pattern of MUC1 and distribution of TIDCs can be useful markers to evaluate the degree of malignancy and prognosis of BTCC. The decrease in the number of TIDCs may have important relation to tumor immune evasion and immune tolerance, and MUC1 over-expression may lead to drug resistance of BTCC, indicating its involvement in tumor infiltration and metastasis.

Key words: mucins; dendritic cells; bladder transitional cell carcinoma

收稿日期:2005-03-04

基金项目:国家自然科学基金(30271300)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30271300)

作者简介:向松涛(1969-),男,2003年毕业于华中科技大学同济医学院,博士,主治医师,E-mail:tonyxst@163.com

通讯作者:周四维,教授,博士生导师,电话:027-83662364

Corresponding author: Zhou Si-wei, medical professor, Tel: 027-83662364

肿瘤抗原表达检测已成为判断肿瘤的主要手段之一,但对粘蛋白(mucins)在尿路上皮生物学作用仍不明确。早期认为 mucins 具有尿路润滑保护作用,作为可选择性的上皮屏障结构, mucins 在尿液和上皮间提供了一道生理屏障,保护尿路上皮免受非生理状态的 pH 和渗透性的影响,而且完整的 mucins 层是抑制细菌粘连和尿路晶体形成的前提^[1]。mucins 的表达增高及异常糖基化同肿瘤的侵袭和转移相关^[2]。肿瘤浸润性树突状细胞(TIDC)比外周血中的树突状细胞(DC)更能准确反映宿主的抗肿瘤免疫状态。为了观察 TIDC 的分布数量和粘蛋白 MUC1 表达的变化在膀胱移行细胞癌(BTCC)发生、发展、演进、化疗耐药过程中的作用,我们检测了 MUC1 在膀胱癌及其细胞株中的表达,并检测了细胞株在阿霉素(ADM)、长春新碱(VCR)、顺铂(DDP)3种化疗药物作用48h后的凋亡率。

1 材料与方法

1.1 组织标本

采用同济医院病理科保存的1992年2月至2002年11月间膀胱手术切除的膀胱移行细胞癌石蜡标本69例、正常膀胱粘膜组织和腺性膀胱炎石蜡标本各10例。69例肿瘤患者中细胞分级为G1级15例,G2级30例,G3级24例;肿瘤分期Ta期27例,T1期19例,T2-4期23例。术后随访复发36例,未复发33例。

1.2 细胞培养

膀胱癌细胞株BIU-87(北京泌尿外科研究所惠赠),耐药株BIU-87/A由本研究室应用ADM体外持续培养诱导膀胱癌细胞株BIU-87所得,通过检测抗癌药物50%抑制率剂量,耐药株BIU-87/A细胞对ADM的耐药程度较亲本细胞BIU-87提高57.42倍且具有多药耐药性(MDR)表型。T-24膀胱癌细胞株购于武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)。3种细胞分为两组,第一组为BIU-87与T-24细胞,于含10%胎牛血清的RPMI 1640中培养;另一组为BIU-87/A细胞,于培养液中加入ADM 0.8 mg/L置于37℃含5%CO₂的孵育箱中培养至80%饱和状态(5×10⁶/瓶),24h后换为含1%胎牛血清的RPMI 1640培养,制成细胞片或用于流式细胞仪检测。

1.3 SP法免疫组织化学染色

1.3.1 试剂 纯鼠抗人MUC1单克隆抗体由深圳晶美生物工程有限公司提供,预实验确定抗体终浓度为1:100。鼠抗人S-100的单克隆抗体及免疫组织化学SP系列试剂盒(全称过氧化物标记的链霉卵白素染色试剂盒)由北京中山生物技术有限公司提供,预实验确

定抗体终浓度为1:50。采用免疫组织化学SP法,利用MUC1和S-100单克隆抗体进行免疫组织化学染色。以膀胱癌肌层内神经作为S-100阳性对照,乳腺癌切片为MUC1的阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。RPMI 1640培养基、新鲜小牛血清为美国Gibco公司产品,ADM为广东明治医药有限公司产品,VCR上海华联制药有限公司产品,DDP山东鲁南制药厂产品。

1.3.2 SP法步骤 石蜡切片,常规脱蜡至水,以纯二甲苯液中脱蜡10min共2次,逐级乙醇100%,95%,80%中各1min后置入蒸馏水中。2切片室温下于3%过氧化氢溶液浸泡10min,以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗3min共3次,PBS液洗5min共3次。将切片浸于0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)的烧杯中,置于700 W微波炉中煮沸15min。室温冷却,PBS洗5min共3次。室温下滴加正常兔血清封闭液10min,倾去,不洗。滴加1:100鼠抗人MUC1单克隆抗体,湿盒中4℃冰箱过夜(16~18h),PBS液洗5min共3次。滴加生物素化二抗,37℃孵育30min。PBS液洗5min共3次。滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育30min。PBS液洗5min共3次。取1ml蒸馏水DAB试剂盒中A、B、C试剂各1滴,混匀后加至切片上,室温显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤以终止反应。苏木素轻度复染,自来水充分冲洗后,梯度酒精脱水,二甲苯透明、中性树胶封片。

流式细胞术检测具体方法步骤参考文献[3]。

1.4 结果判定

MUC1的组织表达以细胞出现棕黄色颗粒为阳性细胞,并根据染色分布、程度不同分为3型即A型(以腺腔侧细胞膜表面着浅棕色为主),B型(腺腔侧细胞膜、细胞质着色同时伴有间质、基底层细胞胞质着浅棕色)和C型(胞膜、胞浆皆呈深棕色强染的细胞呈岛状、团块状分布在肿瘤组织各层)。TIDC呈S-100阳性反应,根据S-100阳性细胞分布、数量,选择TIDC最多的视野,计数10个高倍镜视野(×400),取其平均值进行分级:TIDC数目≤5个细胞为阴性(-);TIDC数目>5个为阳性(+);TIDC数目≥10个为强阳性(++)。细胞株表达强弱以细胞平均光密度值进行比较。

1.5 统计学方法

采用Fisher's exact test及t检验。

2 结果

2.1 MUC1在各期BTCC中均表达(图1~5)

表1为双向分类的列联表资料,显示MUC1的

染色分型同肿瘤的病理分级和临床分期密切相关 ($P<0.001$),结合本资料可见 MUC1 B 型、C 型染色有随肿瘤分期、分级增高而增多的趋势。

表 1 MUC1 表达分型同肿瘤分级、分期的关系

Tab.1 The relation between MUC1 expression typing and tumor grade or stage

	n	A	B	C
Tumor grade				
G1	15	11	3	1
G2	30	15	13*	2*
G3	24	2	17*	5*
Tumor stage				
Ta	27	21	6	0
T1	19	7	12**	0
T2-4	23	0	15**	8**

* $P<0.001$ vs G1; ** $P<0.001$ vs Ta

2.2 TIDC 的表达 (图 6)

表 2 显示肿瘤病理不同分级间 TIDC 的阳性率有显著性差异,随着病理分级的升高阳性细胞数明显减少 ($P<0.005$)。

表 2 TIDC 表达同肿瘤分级的关系

Tab.2 Relation between tumor infiltrating dendritic cells (TIDCs) and tumor grade

	G1	G2	G3
TIDC ⁺	6	5*	0**
TIDC ⁺⁺	4	4*	0**
TIDC	5	21	24

* $P<0.005$ vs G1; ** $P<0.005$ vs G2

2.3 MUC1 在 BIU-87、T-24 细胞中的表达

图 7~9 示 MUC1 在 BIU-87、T-24 细胞膜、胞质中均有浅棕色弱阳性表达,在 BIU-87/A 的胞膜、胞质中均有深棕色强阳性表达,两者细胞平均光密度值差异有显著性 ($P<0.01$)。

2.4 TIDC 阳性表达与肿瘤复发

术后随访调查研究发现 19 例 TIDC 阳性表达的患者仅 2 例复发,50 例阴性表达的患者有 34 例复发 (表 3)。两组患者 TIDC 阳性率差异有显著性 ($P<0.005$),结合本资料说明 TIDC 阳性的患者,肿瘤复发率低。两组患者 MUC1 染色分型构成不同 ($P<0.005$),结合本资料说明复发组中 B、C 两型比重较未复发组大。

2.5 流式细胞仪检测凋亡率

BIU-87、T-24 和 BIU-87/A 自发凋亡率分别为 1.15%、1.40%、0.90%,均在 2% 以下,说明细胞生长状态稳定。BIU-87、T-24 在 ADM、VCR、DDP3 化疗药物作用 48h 后的凋亡率均有明显升高,BIU-87 凋亡

表 3 MUC1 表达分型、TIDC 表达阳性同肿瘤复发关系

Tab.3 Association of MUC1 expression and TIDC distribution with tumor recurrence

Group	n	MUC1			TIDC	
		A	B	C	+	-
Recurrence	36	6	22*	8*	2	34**
Non-recurrence	33	22	11	0	17	16

* $P<0.005$ vs type A; ** $P<0.005$ vs TIDC⁺

率分别为 45.69%、47.70%、44.50%,T-24 凋亡率分别为 43.79%、46.17%、44.50%均有明显升高,差异有显著性 ($P<0.01$),两种细胞之间及 3 种化疗药之间差异无显著性 ($P>0.05$)。BIU-87/A 在 ADM、VCR 作用 48 h 后的凋亡率分别为 19.88%和 21.41%,均明显低于亲本细胞株 BIU-87 ($P<0.05$),说明多药耐药性的存在。BIU-87/A 在 DDP 作用 48 h 后的凋亡率为 43.98%,同亲本细胞差异无显著性 ($P>0.05$),说明 BIU-87/A 保持对 DDP 敏感。

3 讨论

TIDC 比外周血 DC 更能准确反映宿主的抗肿瘤免疫状态,因而对 TIDC 的研究对阐明肿瘤的免疫逃逸机制具有重要意义。目前对肿瘤组织和微环境中的 DC 即 TIDC 的数量、功能的研究较少,已有的研究发现在肾癌和前列腺癌的 TIDC 的数量极少,活性很低,认为肿瘤微环境中的某些成分抑制了 DC 的激活和共刺激分子的表达,因而不能有效地提呈抗原活化细胞毒 T 细胞 (CTLs),从而导致肿瘤免疫耐受 [4]。临床肿瘤组织的研究均证实 TIDC 存在且数量极少 [5],说明 TIDC 浸润程度因肿瘤的类型和恶性程度会有所不同。本研究发现 TIDC 在膀胱癌中表达量较低,肿瘤病理不同分级间 TIDC 的阳性率有显著性差异,说明随着肿瘤分级的升高 TIDC 的阳性表达率明显下降。而复发组与未复发组患者 TIDC 阳性率差异有显著性,说明 TIDC 阳性率高的患者,肿瘤复发率低。本研究显示 TIDC 的减少或缺陷是膀胱移行细胞癌免疫逃逸和耐受的可能因素,可导致膀胱移行细胞癌复发、转移。

Mucins 是位于上皮性细胞表面的一类高相对分子质量的跨膜糖蛋白,相对分子质量 $>200\ 000$ 。按其 cDNA 克隆出的顺序,命名为 MUC1-MUC4、MUC5B、MUC5A-C、MUC6-8。小卫星序列的多态性是 mucins 基因家族一个重要特征,不同小卫星重复序列中其内部核心序列有极高同源性,这可能是 mucins 上皮细胞特异性表达的基因基础 [6,7]。Mucins 各自独特结构在于内部核心蛋白区域的特异性及外周糖链的变

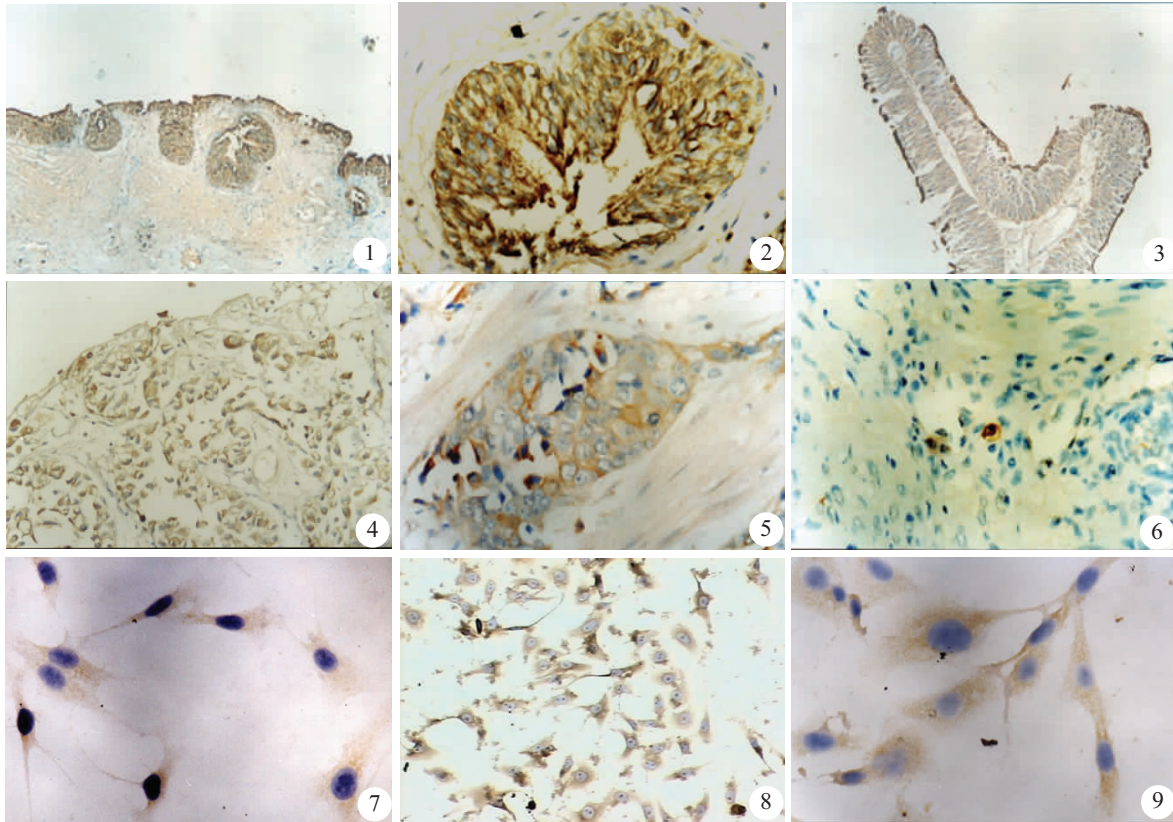


图1 腺性膀胱炎及其周边正常组织 MUC1 染色 A 型、B 型 (×100)

Fig.1 Types A and B MUC1 immunohistochemical staining of cystitis glandularis and adjacent normal tissues (Original magnification: ×100)

图2 腺性膀胱炎组织 MUC1 染色 B 型 (×400)

Fig.2 Type B MUC1 immunohistochemical staining of cystitis glandularis tissues (Original magnification: ×400)

图3 G1 级膀胱移行细胞癌 MUC1 染色 A 型 (×200)

Fig.3 Type A MUC1 immunohistochemical staining of grade G1 human bladder transitional cell carcinoma (BTCC) tissue (Original magnification: ×200)

图4 G3 级膀胱移行细胞癌 MUC1 染色 B 型 (×200)

Fig.4 Type B MUC1 immunohistochemical staining of grade G3 BTCC tissue (Original magnification: ×200)

图5 T2-3 期 G3 级膀胱移行细胞癌 MUC1 染色 C 型 (×400)

Fig.5 Type C MUC1 immunohistochemical staining of grade G3 BTCC tissue in T2-3 stage (Original magnification: ×400)

图6 肿瘤浸润的树突状细胞阳性染色 (×200)

Fig.6 Positive immunohistochemical staining of the TIDCs (Original magnification: ×200)

图7 MUC1 蛋白在 BIU-87 细胞胞膜、胞浆的阳性表达 (×400)

Fig.7 MUC1 expression in the cytoplasm and on the membrane of BIU-87 cells (Original magnification: ×400)

图8 MUC1 蛋白在 T24 细胞的阳性表达 (×200)

Fig.8 MUC1 expression in T24 cells (Original magnification: ×200)

图9 MUC1 蛋白在 BIU-87/A 细胞的阳性表达 (×400)

Fig.9 MUC1 expression in BIU-87/A cells (Original magnification: ×400)

异,也决定了 Mucins 生化特征和免疫原性^[7,8]。

相关肿瘤研究显示 MUC1、3、12、13 在肿瘤组织表达均高于正常组织^[9],本实验研究结果(图 1~5)显示 MUC1 在移行细胞癌和腺性膀胱炎组织中表达均高于正常粘膜,说明上皮特异性粘蛋白 MUC1 的高表达反映粘膜上皮代谢活跃的增生特征,并不是恶变

的标志。但 MUC1 的表达程度和分布在不同组织,不同分级、分期的膀胱癌却各不同。腺性膀胱炎及 G1、Ta 移行细胞癌主要以 A 型表达为主,G3 及 T2-4 移行细胞癌主要以 B 型、C 型表达为主。而对复发组与未复发组染色类型分布研究显示 MUC1 染色分型构成不同($P<0.005$),复发组中 B、C 两型比重较未复发

组大。有研究也同样显示 MUC1、2、5AC 在不同肿瘤表达模式不同的特性具有鉴别诊断的意义^[10]。MUC1 在 B 型、C 型表达分布特点显示肿瘤细胞组织结构混乱(图 4、5),MUC1 除细胞浆、间质表达以外,更多的集中在基底侧。这同研究显示的微小浸润性乳头状癌形态分布特点相似,而这种变异分布高表达的 MUC1 粘蛋白可能是细胞分离、移位的主要形态发生学因素,可能是细胞浸润、转移的机制^[11]。进一步统计分析显示 MUC1 的染色分型同移行细胞癌的病理分级和临床分期密切相关($P < 0.001$,表 1),说明变异分布、高表达的 MUC1 参与了移行细胞癌的恶性演进和侵袭转移等生物学特性,具体机制有待进一步研究。对复发膀胱移行细胞癌研究显示其隐含的 MUC5AC 抗原决定簇被认为是癌胚抗原的再表达,被认为是膀胱组织分化转向的可能机制^[12]。图 7~9 显示 MUC1 蛋白在不同细胞系 BIU-87、T-24 及 BIU-87/A 的细胞膜和胞浆均有表达,而在耐药细胞株表达均明显增强。说明 MUC1 蛋白可能也参与了 BIU-87/A 细胞系耐药的形成。而流式细胞仪检测三种细胞株凋亡率显示 ADM、VCR 和 DDP 3 种化疗药物均可通过增加肿瘤细胞凋亡杀伤肿瘤细胞。高表达 MUC1 的 BIU-87/A 耐药细胞株在 ADM、VCR 作用 48 h 后的凋亡率分别为 19.88%和 21.41%,均明显低于亲本细胞株 BIU-87,说明多药耐药性的存在及耐药机制的复杂性。分析可能的机制是耐药细胞表面高密度的丝状 MUC1 分子阻碍了膜表面相应的配体与受体结合,降低了药物跨膜转运,或因糖链的糖基化不完全,导致膜表面新的糖链表位和新的肽链表位形成,改变了细胞膜表面空间结构,影响药物跨膜转运。或参与抑制细胞凋亡。真正的机制有待进一步研究证实。

另外本实验研究结果显示 MUC1 的移行细胞癌染色分型对判断肿瘤恶性程度和临床分期有一定指

导作用。

参考文献:

- [1] Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1994, 17(3): 153-80.
- [2] Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Graff A, *et al*. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast and ovary[J]. *J Pathol*, 1997, 182(4):385-91.
- [3] Chen Y, Wang Y, Xu W, *et al*. Analysis on the mechanism of Helicobacter pylori-induced apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823[J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16(4):741-45.
- [4] Troy AJ, Summers KL, Davidson PJT, *et al*. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(3): 585-93.
- [5] Tsujitani S, Kakeji Y, Watanabe A, *et al*. Infiltration of dendritic cells in relation to tumor invasion and lymph node metastasis in human gastric cancer[J]. *Cancer*, 1990, 66(9): 2012-6.
- [6] Kim YS, Gum J Jr, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia [J]. *Glycoconj J*, 1996,13(5): 693-707.
- [7] Seregini E, Botti C, Massaron S, *et al*. Structure, function and gene expression of epithelial mucins[J]. *Tumori*, 1997, 83 (3): 625-32.
- [8] Roussel P, Lamblin G, Lhermitte M, *et al*. The complexity of mucins [J]. *Biochimie*, 1988, 70(4): 1471-82.
- [9] Packer LM, Williams SJ, Callaghan S, *et al*. Expression of the cell surface mucin gene family in adenocarcinomas[J]. *Int Oncol*, 2004, 25(4): 1119-26.
- [10] Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study[J]. *Am J Clin Pathol*, 2004,122(1):61-9.
- [11] Nassar H, Pansare V, Zhang H, *et al*. Pathogenesis of invasive micropapillary carcinoma: role of MUC1 glycoprotein[J]. *Mod Pathol*, 2004,17(9): 1045-50.
- [12] Kunze E, Francksen B, Schulz H, *et al*. Expression of MUC5AC apomucin in transitional cell carcinomas of the urinary bladder and its possible role in the development of mucus-secreting adenocarcinomas[J]. *Virchows Arch*, 2001, 439(5): 609-15.