

临床研究

OCT4在膀胱癌中的表达及其临床意义

赵朋朋,刘春晓,许凯,郑少波,李虎林,徐亚文,徐啊白,李炳坤,黄鹏
南方医科大学珠江医院泌尿外科,广东 广州 510282

摘要:目的 检测干细胞标记物OCT4在膀胱癌中的表达,并探讨其与临床病理因素及肿瘤转移的相关性。方法 采用Western blotting、qRT-PCR检测OCT4在5种膀胱癌细胞株及人膀胱上皮永生细胞株SV-HUC-1中的表达情况;同时收集46例患者膀胱癌根治手术切除的膀胱癌组织标本,应用免疫组织化学方法检测OCT4蛋白的表达。结果 OCT4在人类膀胱癌细胞株RT-4、Tcc-Sup、KK47、T24、5637中均有表达,而在人膀胱永生细胞株中无表达。OCT4在膀胱癌组织中的表达率为76.1%,在正常膀胱组织中无表达。其异性染色定位于肿瘤细胞核内;膀胱癌组织OCT4蛋白阳性表达率显著高于正常组织($P<0.05$);膀胱癌组织中的OCT4蛋白的表达与肿瘤病理分级呈正相关($P<0.05$),与膀胱癌的浸润深度无相关性($P>0.05$);与肿瘤转移呈正相关($P<0.05$);与年龄、性别、TNM分期无明显相关性。OCT4阳性膀胱癌患者及阴性患者的3年总生存率分别为42.2%和76.7%,无转移生存率分别为35.4%和59.2%,结果均有统计学意义。结论 膀胱癌组织中OCT4蛋白的表达与肿瘤分化程度及转移相关,对膀胱癌的早期诊断和预后分析有显著意义。

关键词:膀胱癌;OCT4蛋白;肿瘤转移

中图分类号:R737 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)05-0643-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.05.012

<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120427.0851.003.html>

Expression of OCT4 protein in bladder cancer and its clinicopathological implications

ZHAO Pengpeng, LIU Chunxiao, XU Kai, ZHENG Shaobo, LI Hulin, XU Yawen, XU Abai, LI Bingkun, HUANG Peng
Department of Urinary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To study the expression of OCT4 protein in bladder cancer and its correlation to the clinicopathologic features and prognosis of bladder cancer. **Methods** OCT4 mRNA and protein expression was detected in 5 bladder cancer cell lines (RT-4, Tcc-Sup, KK47, T24, and 5637) and 1 normal bladder cell lines by real-time PCR and Western blotting, respectively. Immunohistochemical analysis was used to detect the expression of OCT4 protein in 46 bladder cancer samples. **Results** All the 5 bladder cancer cell lines expressed detectable levels of OCT4 mRNA and proteins, whereas the normal bladder cell line SV-HUC-1 was negative for OCT4 expression. The clinical bladder cancer tissues showed a high positivity rate of OCT4 expression (76.1%), which was not detected in normal bladder tissues. Specific OCT-4 signals were localized mainly in the nuclei of the cancer cells. The expression rate of OCT4 protein was significantly higher in bladder cancer tissue than in normal bladder epithelium ($P<0.05$), and showed a positive correlation to the grade of tumor differentiation and metastasis ($P<0.05$) but not to the patients' age, gender or TNM stage. **Conclusion** OCT4 protein expression is associated with tumor differentiation and metastasis in bladder cancer and may play an important role in the early diagnosis and prognostic evaluation of bladder cancer.

Key words: bladder cancer; OCT4 protein; cancer metastasis

膀胱肿瘤是我国泌尿外科最常见的肿瘤,占全部恶性肿瘤的3.2%,其发病率呈逐年上升趋势。在我国泌尿、男生殖系统肿瘤中,膀胱癌的发病率和病死率仍居首位。膀胱癌的早期诊断及术后复发成为影响治愈率及改善患者生活质量的关键因素。

OCT4为POU转录因子家族中的一员,主要表达于胚胎干细胞、生殖干细胞,对维持胚胎干细胞的多潜能性和自我更新具有极其重要的作用^[1-2]。近年来,Tai等^[3]

发现OCT4在成年人细胞中也有表达,并认为这可能是成年人干细胞。另外,有报道OCT4在实体肿瘤,例如肾透明细胞癌^[4]、肺癌^[5]、膀胱癌也有表达^[1-2,6]。本研究探讨OCT4在人膀胱癌细胞株及膀胱癌组织中的表达,及其与临床分期,分级,肿瘤转移和预后的相关性。为膀胱癌的深入研究、膀胱癌的早期诊断、靶向治疗及预后判断提供新的分子标记物。

1 资料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人膀胱上皮永生细胞SV-HUC-1购自中国科学院上海细胞库,膀胱癌细胞株RT-4(T2, G1)、Tcc-Sup(T4, G2)、KK47(T3, G21)、T24(T4, G3)、5637(T4, G3)为本实验室保存;以上细胞均在含有10%小牛血清

收稿日期:2012-03-21

基金项目:国家自然科学基金(81101559)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81101559).

作者简介:赵朋朋,医师,在读硕士研究生,E-mail: jnzhaopeng@sina.com

通讯作者:黄鹏,博士,E-mail: huangpeng509@gmail.com

和青霉素的 RPMI 1640、DMEM 的培养基中培养, 37 °C 含 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱。RPMI 1640、F12 购自 GIBCO 公司, OCT4 抗体购自 Cell signaling (美国), Trizol RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司、逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司, 特异性引物由 TaKaRa 公司合成。

1.2 标本及临床资料

标本取自 2008 年 1 月~2011 年 5 月在珠江医院泌尿外科接受膀胱癌根治手术治疗的患者, 均经病理确诊。标本均用甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μm 连续切片。膀胱癌 46 例, 正常膀胱 10 例(膀胱镜检时经患者同意后取得)。膀胱癌患者中男性 40 例, 女性 6 例, 患者年龄 1 岁 10 个月~86, (58.2±7.4) 岁, 组织学分型: 胚胎横纹肌肉瘤 5 例, 浸润性尿路上癌 41 例。膀胱肿瘤病理分级按 WHO2004 标准进行分类, T2 和 T3 分别为 13 和 33 例; 临床分期根据 UICC 的 TNM 法进行分期, 高分化 G1 和中低分化 G2-G3 分别为 16 和 30 例, OCT4 表达阳性和阴性分别未 35 例和 11 例, 无血管淋巴转移和有血管淋巴转移分别为 24 例和 22 例。所有患者平均随访时间 (1.9±0.2) 年。

1.3 qRT-PCR 检测

用 PrimeSsript RT reagent Kit With gDNA Erasers 试剂盒进行反转录, 根据 Gene Bank 中 OCT4cDNA 序列设计引物, 上游引物为 5'-CGTGAAGCTGGAG AAGGAGAAGCTG-3', 下游引物为 5'-CCACATCGG CCTGTGTATATCCCAG-3', 产物大小为 140 bp。内参 GAPDH 上游引物为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGA AC-3', 下游引物为 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG A-3', 产物大小为 138 bp。PCR 反应条件为: 预变性 95 °C 15 s, 变性 95 °C 5 s, 退火 60 °C 30 s, 45 个循环。PCR 结束后, 95 °C 变性 1 min, 冷却至 55 °C, 使 DNA 双链充分结合。从 55 °C 开始到 95 °C, 每一步增加 0.5 °C, 保持 4s, 同时读取吸光度, 制作溶解曲线, 以目的基因与 GAPDH 的比值进行定量分析。每个样本重复 3 次。

1.4 Western blotting 检测

离心收集细胞, 预冷的 PBS 洗 2 遍, 按每 5×10⁶ 细胞加入 200 μl 裂解缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl pH6.8, 2% 巯基乙醇, 20% 甘油, 4% SDS), 用 BCA 法进行蛋白定量, 并将蛋白样品标化。10% SDS-PAGE 电泳分离后湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 (1: 1000) 4 °C 反应过夜。TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入相应二抗 (1: 1000), 室温下反应 2 h 后, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。进行化学发光反应。以等量的 β-actin 蛋白质作对照。

1.5 免疫组织化学染色

标本经 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μm 连续切

片, 采用链霉素抗生素-过氧化物酶法 (SP) 法。二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性, 枸橼酸缓冲液中抗原修复, 滴加 OCT4 抗体 (1: 200 稀释, #2750) 4 °C 孵育过夜。二抗为生物素化抗兔 SP 试剂盒。DAB 显色, 苏木素复染, 封片。判断标准: OCT4 主要表达于细胞核, 少量表达于细胞质, 以细胞核中呈现棕黄色均匀颗粒作为阳性标准。正常膀胱组织作为阴性对照。

采用 Image-pro plus 图像分析软件进行染色结果分析。测定条件: 每张切片随机观察 5 个高倍视野 (放大 400 倍) 计算均值, 阳性结果判断根据平均每高倍视野阳性癌细胞数占所观察癌细胞总数的百分率。以阳性细胞数 < 5% 为 (-), 5%~25% 为 (+), 26%~50% 为 (++) , > 50% 为 (+++) 区分染色强度。最后随机摄取 5 个高倍视野照相 (放大 400 倍), 由图象分析软件检测该总视野内阳性反应细胞的总面积和积分光密度 做半定量分析。平均光密度=积分光密度/总面积。

1.6 统计学分析

全部数据经统计软件 SPSS17.0 处理, 计量资料以阳性例数或阳性率表示, 两组之间的均数比较采用 *t* 检验, 计数资料比较选用卡方检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OCT4 在人类膀胱癌细胞株及 SV-HUC-1 细胞株中的表达

RT-PCR 检测发现 SV-HUC-1 细胞不表达 OCT4 RNA; 膀胱癌细胞株 RT-4、Tcc-Sup、KK47、T24、5637 中均表达 OCT4 RNA, 但是各种细胞株的表达程度有所不同; 通过 Western blot 分析上述 6 种细胞中 OCT4 的表达, 肿瘤细胞株均表达, 但是在 SV-HUC-1 细胞中未发现 OCT4 蛋白的存在 (图 1~2)。

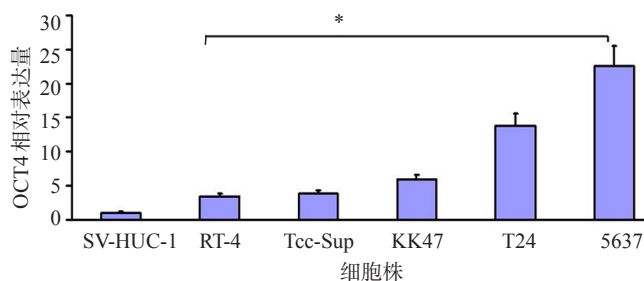
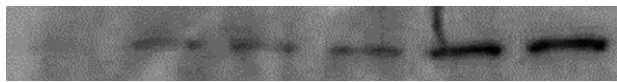


图 1 OCT4 基因在各细胞株中表达的定量 PCR

以 GAPDH 为内参, SV-HUC-1 细胞株以 GAPDH 为标准, 设定为 1, 其他细胞株中 OCT4 mRNA 含量与 SV-HUC-1 中 GAPDH 含量所得结果。与 SV-HUC-1 比较 **P* < 0.05

Fig.1 OCT4 mRNA expression in normal human bladder and cancer cells as determined by quantitative real-time RT-PCR.



SV-HUC-1 RT-4 Tcc-Sup KK47 T24 5637

图2 OCT4蛋白在各种细胞中的表达

Fig.2 Western blot analysis of OCT4 protein expression in normal human bladder and cancer cell lines.

2.2 OCT4在膀胱癌组织及正常组织中的表达

本实验中使用的46例膀胱癌组织中,OCT4阳性为35例,占总例数的76.1%,在正常膀胱组织中未能检测出OCT4的表达。

2.3 OCT4蛋白的表达与膀胱癌临床病理因素的关系

OCT4蛋白的表达情况与肿瘤病理分级呈正相关

($P < 0.05$),但与膀胱癌的浸润深度无相关性($P > 0.05$);与肿瘤转移呈正相关($P < 0.05$);与年龄、性别、TNM分期无明显相关性(表1)。

2.4 OCT4蛋白的表达与膀胱癌患者预后的关系

本实验对象的平均随访时间为22.7月,患者膀胱癌根治术后的1年和3年的总生存率为80.3%和54.8%;1年和3年的无转移生存率分别为61.3%和40.5%。单因素分析发现,OCT4阳性患者的生存时间及无转移生存率均低于OCT4阴性组。OCT4阳性患者组中位无转移生存时间为9.6月,3年无转移生存率为35.4%,明显低于OCT4阴性组的21.8月和59.2%($P < 0.005$,图3,表1)。

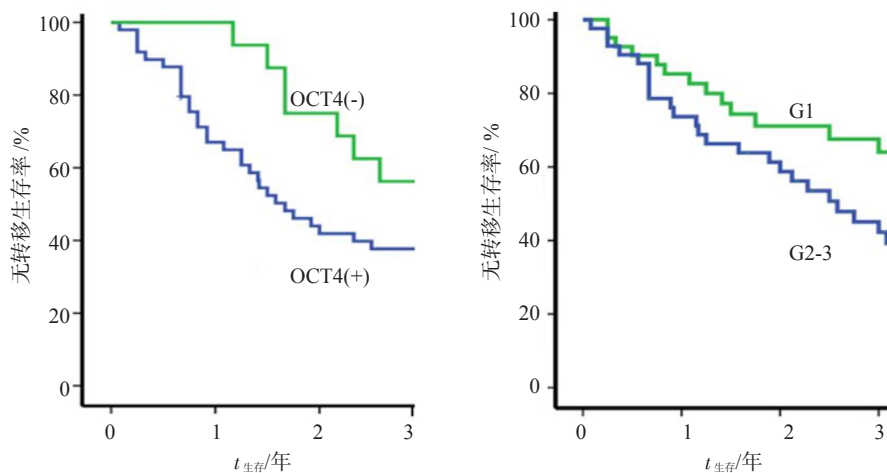


图3 膀胱癌组织中OCT4的表达与术后无转移生存率(左)及肿瘤分化程度与术后无转移生存率(右)的关系

Fig.3 Kaplan-Meier analysis of the overall metastasis-free survival according to OCT4 expression status (left) and cancer grade (right). Statistical differences were calculated by log-rank comparisons.

表1 膀胱癌组织中OCT4阳性表达与病理因素的相关分析

Tab.1 Association of OCT4 expression with the clinicoathological features of bladder cancer

项目		n	阴性	阳性	P
性别	男(%)	40	10(25.0%)	30(75.0%)	0.655
	女(%)	6	1(16.7%)	5(83.3%)	
病理分期	T2 (%)	11	4(30.8%)	9(69.2%)	0.494
	T3 (%)	33	7(22.6%)	26(77.4%)	
分化程度	高分化G1(%)	16	9(56.3%)	7(43.7%)	<0.001
	中低分化 G2-G3 (%)	30	2(6.6%)	28(93.3%)	
转移	无转移(%)	24	9(37.5%)	15(62.5%)	<0.001
	有血管淋巴转移(%)	22	2(9.1%)	20(90.1%)	

3 讨论

肿瘤的复发性及多转移性是膀胱癌的重要特征,有研究表明膀胱癌的复发及多转移性与肿瘤祖细胞有关^[7-8]。肿瘤干细胞可能为定向祖细胞突变后获得自我更新能力后形成的^[9-10]。而OCT4又是自我更新的关键调节因子,因此检测OCT4在膀胱癌中的表达有助于我们理解其与膀胱癌的发生、复发的关系。

OCT4基因也被称为OCT3、POU5F1、OTF4,为

POU转录因子家族中的一员。OCT4主要表达于胚胎干细胞、生殖干细胞以及未分化胚胎癌中,对维持胚胎干细胞的多潜能性和自我更新具有极其重要的作用^[11]。OCT4的存在增加了胚胎干细胞的恶性分化潜能,并存在一定的剂量依赖性。OCT4作为人干细胞标志物、人生殖肿瘤干细胞标志物^[12],其表达水平随分化进行降低或消失^[13]。但近年来研究显示,除胚胎和生殖细胞肿瘤如睾丸生殖细胞瘤、精原细胞瘤、胚胎性癌和胚胎癌细

胞系中表达外,在非生殖系统肿瘤细胞如胰腺癌 Capan-2、pan-1 细胞系、肝癌 Mahlava 细胞系、宫颈癌 Hela 细胞株、人乳腺癌 MCF-7 细胞系也有表达^[14-15]。OCT4 同样表达于肿瘤组织中,如肾透明细胞癌和肺鳞癌及大细胞癌^[14],人乳腺癌及骨肉瘤组织^[16-18]中。OCT4 在分化完全的实体肿瘤组织中有表达,而且实验研究证实通过 siRNA 干扰技术上调 miR-145 抑制 OCT4 的表达可以诱导分化并且抑制肿瘤生长^[19],这说明了肿瘤干细胞存在的可能性及 OCT4 在肿瘤的发生中有着重要促进作用。

本实验选用不同病理分级膀胱癌细胞株及人膀胱上皮永生细胞株,检测各细胞株中 OCT4 mRNA 及蛋白的表达水平。从本实验 qRT-PCR 及 Western blot 结果显示,各膀胱癌细胞株内均有 OCT4 表达;SV-HUC-1 细胞无 OCT4 mRNA 及 OCT4 蛋白的表达。近期有研究证实,以肿瘤细胞株为研究对象,通过 miR-145 转染子宫内膜癌细胞可以抑制 OCT4 的表达,从而促进癌细胞向正常细胞转化。因此,我们可以以膀胱癌细胞株为研究对象,以如何抑制 OCT4 表达为方向做进一步研究方向,为以 OCT4 为靶点的膀胱癌检测、治疗提供新思路。

同时,我们通过免疫组织化学方法检测膀胱癌组织及正常膀胱组织中 OCT4 的表达,寻找其表达量与膀胱癌组织病理、复发等相关因素的关系。结果显示肿瘤组织中阳性率高,正常组织中无表达,这说明 OCT4 蛋白在膀胱癌组织中的表达有特异性。从阳性切片结果分析,膀胱肿瘤细胞并非全部为阳性细胞,而是呈点状或片状存在,这同以前的实验结果相似,也在一定程度上印证肿瘤干细胞学说。OCT4 蛋白的表达强度与膀胱癌病理分级正相关,其中膀胱横纹肌肉瘤的表达强度最高,说明其在胚胎性肿瘤中高表达。值得一提的是,在膀胱癌周围血管淋巴转移患者组织中其表达量高于未完全侵犯全肌层患者,存在统计学差异。可以根据患者活检组织、经尿道肿瘤电切组织或膀胱全切肿瘤组织组织中 OCT4 蛋白的表达量,医生可针对患者具体情况决定患者治疗及术后复查方案。OCT4 蛋白的表达量与肿瘤浸润程度、肿瘤临床分期、年龄、性别无明显相关性。

综上所述,OCT4 蛋白在膀胱癌组织中的表达率高于正常膀胱组织,其表达量与肿瘤病理分级、复发有密切相关性。本实验为肿瘤干细胞在膀胱癌发生及复发的研究中提供一定的依据,同时提示 OCT4 有望成为早期检测膀胱癌及评估患者预后的一个分子生物学指标,乃至成为药物治疗的新靶点。

参考文献:

[1] Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2244-50.

- [2] Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells[J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(9): 432-38.
- [3] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(2): 495-502.
- [4] Bussolati B, Bruno S, Grange C, et al. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas [J]. *FASEB J*, 2008, 22(10): 3696-705.
- [5] Chiou SH, Wang ML, Chou YT, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10433-44.
- [6] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1598-602.
- [7] Denzinger S, Mohren K, Knuechel R, et al. Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses[J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(2): 143-51.
- [8] Junker K, Wolf M, Schubert J. Molecular clonal analysis of recurrent bladder cancer[J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(2): 319-23.
- [9] Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(12): 895-902.
- [10] Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7274-82.
- [11] Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, et al. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 361-370.
- [12] Cheng L, Sung MT, Cossu-Rocca P, et al. OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia[J]. *J Pathol*, 2007, 211(1): 1-9.
- [13] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 372-6.
- [14] Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2244-50.
- [15] Abate-Shen C. Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(5): 329-30.
- [16] Ezech UI, Turek PJ, Reijo RA, et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2255-65.
- [17] Yu H, Fang D, Kumar SM, et al. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 1879-88.
- [18] Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(11): 967-76.
- [19] Wu Y, Liu S, Xin H, et al. Up-regulation of microRNA-145 promotes differentiation by repressing OCT4 in human endometrial adenocarcinoma cells[J]. *Cancer*, 2011, 117(17): 3989-98.

(编辑:吴锦雅)