

# TPX2在非肌层浸润性膀胱癌中的表达及其临床意义

彭友彬<sup>1</sup>, 林浩<sup>1</sup>, 黎明<sup>1</sup>, 黄海花<sup>2,\*</sup>

(1. 汕头大学医学院第二附属医院泌尿外科, 广东 汕头 515065; 2. 汕头大学医学院第二附属医院病理科, 广东 汕头 515065)

# Expression of TPX2 and its clinical significance in non-muscle-invasive bladder cancer

PENG Youbin<sup>1</sup>, LIN Hao<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1</sup>, HUANG Haihua<sup>2,\*</sup>

(1. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515065; 2. Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515065, Guangdong, China)

**【摘要】目的:** 研究Xklp2靶蛋白(TPX2)在非肌层浸润性膀胱癌中的表达及其临床意义。**方法:** 通过挖掘GEPID数据库中的研究数据,对TPX2 mRNA在膀胱癌组织中的表达及其与患者生存的关系进行分析;采用免疫组织化学染色检测TPX2蛋白在60例非肌层浸润性膀胱癌石蜡标本组织中的表达,并分析其表达与肿瘤临床病理指标和患者预后的关系。**结果:** GEPID数据库分析提示TPX2 mRNA在膀胱癌组织中的表达较正常组织升高( $P<0.05$ ),且TPX2 mRNA高表达组患者的无病生存率较低表达组患者降低( $P<0.05$ );免疫组织化学染色检测结果显示TPX2蛋白在非肌层浸润性膀胱癌组织中的阳性表达率为75%(45/60),而在对应的基底组织中,TPX2蛋白表达均为阴性,二者之间的差异具有统计学意义( $P<0.01$ );且TPX2的表达水平与患者肿瘤数目、肿瘤直径、病理分级及术后复发等病理指标有关( $P<0.05$ ),生存分析提示TPX2高表达的膀胱癌患者的生存期较低表达者短( $P<0.05$ )。**结论:** TPX2在非肌层浸润性膀胱癌中表达上调,且其表达水平较高的患者预后较差,TPX2可能作为预测非肌层浸润性膀胱癌患者预后的肿瘤标记物。

**【关键词】** 膀胱癌; Xklp2靶蛋白; 临床病理指标; 预后

中图分类号: R737.14

文献标志码: A

文章编号: 1004-616X(2022)01-0030-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-616x.2022.01.006

**【ABSTRACT】 OBJECTIVE:** To investigate expression of Xklp2 target protein (TPX2) in non-muscle-invasive bladder cancer and its clinical significance. **METHODS:** Data from the GEPID database were analyzed to confirm expression of TPX2 mRNA in bladder cancer and its relationship with survival of patients. In addition, immunohistochemical staining was also used to detect the expression of TPX2 protein in 60 non-muscle-invasive bladder cancer tissues. Their relationships with clinical pathological indicator of tumors and prognosis of patients were analyzed. **RESULTS:** By mining the GEPID database, TPX2 mRNA expressions were up-regulated in bladder cancer, and patients with higher expressions had lower disease-free survival rate ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical staining results showed that positive expression rate of TPX2 protein was 75% (45/60), while no positive expression was found in the corresponding basal tissues. The difference between the two groups was statistically significant ( $P<0.01$ ). Expression levels of TPX2 protein were negatively correlated with clinical pathological indicators of tumors such as tumor numbers, tumor diameters, pathological grades and postoperative recurrences ( $P<0.05$ ). Survival analyses showed that bladder cancer patients with higher expression of TPX2 had shorter survival time ( $P<0.05$ ). **CONCLUSION:** Expression of TPX2 was up-regulated in bladder cancer and its expression level was negatively correlated with prognosis of patients. Therefore, it has potential to become a tumor marker for predicting prognosis in bladder cancer patients.

**【KEY WORDS】** bladder cancer; Xklp2 target protein; clinical pathological indicator; prognosis

膀胱癌在全世界与癌症相关的死亡原因中排第9位,也是人类泌尿系统第二常见的恶性肿瘤。研究显

示,在2020年,大约有81 400例新诊断的膀胱癌病例和17 980例膀胱癌相关死亡患者,这给全球各个国

收稿日期: 2021-07-05; 修订日期: 2021-12-09

基金项目: 汕头市医疗卫生科技计划项目(汕府科[2020]58号-31)

作者信息: 彭友彬, E-mail: 260881293@qq.com.\*通信作者, 黄海花, E-mail: wuxiuqian7311@qq.com

家带来了巨大的医疗负担<sup>[1]</sup>。根据肿瘤是否浸润膀胱肌层,膀胱癌可分为非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌;据文献报道,75%的膀胱癌患者初诊时为非肌层浸润性膀胱癌,但超过50%的患者在短期内会出现复发,此外,有10%~20%会进展为肌层浸润性膀胱癌<sup>[2-3]</sup>。由于生物学特性不同,非肌层浸润性膀胱癌和肌层浸润性膀胱癌在疾病进展、总体生存率和治疗方面均存在较大差异<sup>[4]</sup>。如何在早期准确预测哪些非肌层浸润性膀胱癌患者有可能进展为肌层浸润性膀胱癌是目前膀胱癌患者术后管理的关键问题之一。因此,识别在膀胱癌早期诊断、治疗和预后评估中有意义的生物标志物具有重要意义。

越来越多的研究表明,染色体的不稳定性在肿瘤的形成过程中发挥重要作用,表现为癌基因的异常扩增或者抑癌基因的缺失<sup>[5-6]</sup>。Xklp2靶蛋白(Xklp2 target protein, TPX2)是一种受细胞周期调控的核增殖相关蛋白,对细胞由G1/S期向G2/M期转变至关重要<sup>[7]</sup>。近年来,随着研究的深入,研究者们发现TPX2在多种肿瘤细胞中高表达,且与肿瘤的分级、分期、转移以及不良预后密切相关,被认为是肿瘤预后不良的分子标记物<sup>[8-10]</sup>。但目前TPX2与膀胱癌的关系尚不甚明确。为进一步阐明TPX2在膀胱癌中的作用,本课题拟探索TPX2在非肌层浸润性膀胱癌中的表达情况及其表达水平与临床病理指标及患者预后的关系,并探讨其在膀胱癌中的作用,为膀胱癌的诊疗提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 基于GEPIA数据库分析TPX2 mRNA的表达

GEPIA数据库(<http://gepia.cancer-pku.cn/>)是一个由中国团队开发的用于癌症和正常基因表达谱分析的公共数据库,其数据来源于TCGA和GTEx数据库中的9 736例肿瘤和8 587例正常样本的RNA测序表达数据<sup>[11]</sup>。在本实验中,我们首先使用GEPIA数据库中的“Expression on Box Plot”功能模块分析TPX2 mRNA在膀胱癌中的表达,再通过“Expression on Stage Plot”及“Survival Plots”功能模块分析TPX2 mRNA的表达水平与膀胱癌患者肿瘤分期及预后的关系。

### 1.2 膀胱癌患者临床资料

本研究纳入的60例石蜡标本选自2015年1月—2019年5月在汕头大学医学院第二附属医院泌尿外科接受治疗的非肌层浸润性膀胱癌患者,男性48例,女性12例,60岁以上28例,≤60岁32例,纳入标准为:①初发且经病理证实的非肌层浸润性膀胱癌;②

手术方式均为经尿道膀胱肿瘤电切术;③术前未行任何其他治疗(如新辅助化疗等);④术后均规律行吡柔比星膀胱灌注化疗;⑤临床资料完整。排除标准为:①患者合并其他恶性肿瘤或远处转移;②患者短期内行二次经尿道膀胱肿瘤电切术;③患者合并有膀胱结石。本文定义:石蜡切片病理证实为尿路上皮癌的膀胱肿瘤组织为癌组织,病理提示无癌细胞参与的肿瘤基底为基底组织。患者随访方案如下:术后2年内每3个月门诊复查1次,2年后为每半年1次;复查主要内容为膀胱镜检查或是泌尿系彩超检查,必要时行盆腔CT检查;术后患者行膀胱镜检查或影像学检查提示膀胱内新生物为复发。本研究方案经汕头大学医学院第二附属医院伦理委员会审查通过,且所有病例患者均签署知情同意书。

### 1.3 免疫组织化学染色检测TPX2蛋白在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达

TPX2鼠单克隆抗体购于美国Biolegend公司;免疫组织化学染色检测试剂盒(KIT-9710)购于福州迈新生物技术开发有限公司。

膀胱癌组织及基底组织离体后立即经10%中性甲醛固定,24 h后用梯度酒精脱水,二甲苯透明后浸蜡,再用石蜡包埋并切片。然后将切好的石蜡切片放入烤箱中60℃烘烤2 h,切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后、微波抗原修复、过氧化氢阻断及封闭,孵育TPX2抗体(1:150稀释)后置于4℃冰箱,过夜后孵育二抗,再经DAB显色及苏木素染核后梯度酒精脱水,二甲苯透明后封片。

### 1.4 免疫组织化学染色的结果判定

所有组织切片染色结果均经2位病理专业人员以盲法分析确定。TPX2蛋白定位于细胞核,阳性细胞表现为组织细胞核被染色为浅棕色至深褐色。免疫组化切片评分采用半定量方法。首先按阳性细胞的染色程度进行评分:无着色计0分,轻度着色计1分,深度着色计2分;再按阳性细胞占比进行评分:<10%计1分,10%(含)~50%计2分,≥50%以上计3分;并定义阳性细胞的染色程度及阳性细胞占比评分的乘积为TPX2的表达,总分在0~6分。以<2分为TPX2蛋白阴性表达,≥2分为TPX2蛋白阳性表达。

### 1.5 统计学方法

本实验中所有数据均应用SPSS 21.0软件分析。TPX2蛋白的表达水平与肿瘤临床病理指标的关系用 $\chi^2$ 检验,TPX2与患者生存预后的关系则用Kaplan-Meier生存分析,检验水准为 $\alpha=0.05$ ,双侧检验。



## 2 结 果

### 2.1 TPX2 mRNA在膀胱癌中的表达及其与患者预后的关系

GEPIA数据库“Expression on Box Plot”功能模块分析结果提示TPX2 mRNA在膀胱癌组织中的表达水平明显高于正常组织,差异具有显著统计学意义( $P < 0.05$ ,图1)。

GEPIA数据库“Expression on Stage Plot”功能模块分析结果提示TPX2 mRNA在T2~T4期膀胱癌组织中的表达水平差异无统计学意义( $P=0.247$ ,如图2A);“Survival Plots”功能模块分析提示TPX2 mRNA高表达与低表达组患者的总体生存率之间的差异无统计学意义( $P=0.50$ ,如图2B),但TPX2 mRNA高表达组患者

的无病生存率较低表达组患者显著降低( $P=0.017$ ,图2C)。

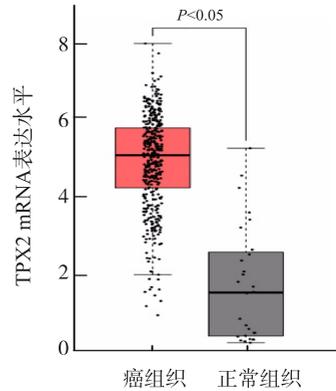
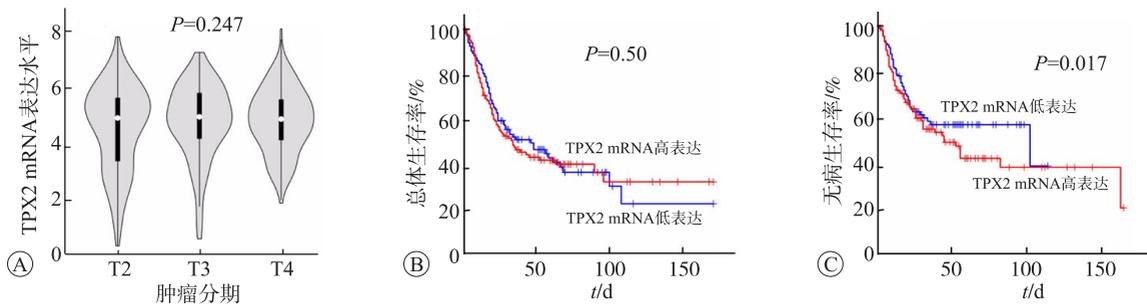


图1 TPX2 mRNA在膀胱癌组织中的表达情况



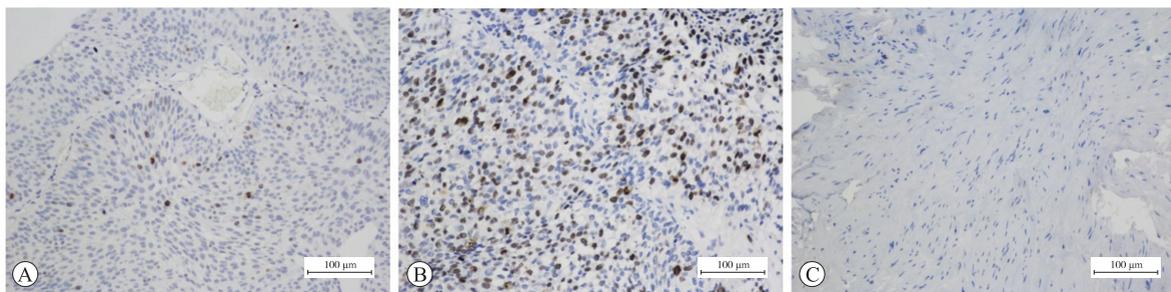
A: TPX2 mRNA在不同分期膀胱癌组织中的表达; B: TPX2 mRNA表达量与患者总体生存率的关系; C: TPX2 mRNA表达量与患者无病生存率的关系。

图2 TPX2 mRNA的表达与肿瘤分期及患者预后的关系

### 2.2 TPX2蛋白在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达情况

免疫组织化学染色结果(图3)显示,在所有非肌层

浸润性膀胱癌组织中,TPX2蛋白的阳性表达率为75%(45/60),而在对应的基底组织中,TPX2蛋白表达均为阴性,二者之间的差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。



A: TPX2蛋白表达阴性的膀胱癌组织; B: TPX2蛋白表达阳性的膀胱癌组织; C: TPX2蛋白表达阴性的基底组织。

图3 TPX2蛋白在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达情况

### 2.3 TPX2蛋白与非肌层浸润性膀胱癌临床病理指标和患者预后的联系

通过统计学分析,我们发现,本研究中膀胱癌组织中TPX2蛋白表达水平与肿瘤数目、肿瘤直径、病

理分级及术后是否复发等病理指标有关( $P < 0.05$ ,表1);Kaplan-Meier生存分析提示TPX2蛋白表达阳性的膀胱癌患者的术后无复发生存时间[(46.9±3.7)月]显著短于阴性表达患者[(67.0±2.9)月]( $P < 0.05$ ,图4)。

表1 TPX2蛋白在非肌层浸润性膀胱癌组织中的表达与患者临床病理指标的关系

临床病理指标	TPX2蛋白阴性 (15例)	TPX2蛋白阳性 (45例)	P
性别			0.709
男	11	37	
女	4	8	
年龄			0.550
≤60岁	7	25	
>60岁	8	20	
吸烟史			0.766
无	8	22	
有	7	23	
肿瘤直径			0.030
≤3 cm	9	13	
>3 cm	6	32	
肿瘤数目/个			0.023
1	13	22	
>1	2	23	
病理分级			0.010
I+II	15	24	
III	0	21	
肿瘤部位			0.389
三角区	5	10	
非三角区	10	35	
复发			0.019
否	14	25	
是	1	20	

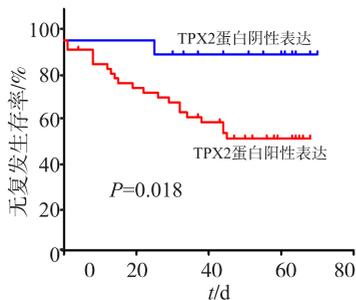


图4 TPX2蛋白表达与膀胱癌患者术后生存情况的关系

### 3 讨论

在染色体水平，肿瘤细胞内存在许多异倍体和多倍体，导致肿瘤细胞的基因组变得极不稳定，在一定程度上促进了肿瘤的发生和发展；而细胞内异倍体的产生与细胞的有丝分裂过程密切相关，众所周知，有丝分裂的关键环节是DNA的复制和姐妹染色单体均等分裂到两个子细胞中，在这一环节中，中心体和随之形成的纺锤体发挥着重要作用<sup>[12-13]</sup>。近年来关于肿瘤发生发展机制的研究也由细胞周期、细胞凋亡等逐渐转移到与有丝分裂相关的中心体及纺锤体上，这提示细胞有丝分裂中关键基因的表达可能成为肿瘤分子治疗的新方向<sup>[14-15]</sup>。

TPX2在1997年被Heidebrecht等<sup>[7]</sup>首次发现，位于

人染色体20q11.2，相对分子质量100 k，它一方面通过与Xklp2蛋白质结合使其附着在微管上从而引导中心体正确分向两极；另一方面它与在有丝分裂以及细胞周期进展过程中发挥重要作用的Aurora A相互作用使其附着在微管上从而启动纺锤体的组装；同时它可与Aurora A的结构域结合使其发生磷酸化激活<sup>[7, 16-17]</sup>。Li等<sup>[18]</sup>在通过对165例膀胱癌组织进行基因共表达、功能富集及蛋白质共表达分析后发现TPX2低表达的膀胱癌患者的总体生存率更高<sup>[18]</sup>。Jiang等<sup>[19]</sup>采用siRNA特异性敲低人宫颈癌细胞中TPX2的表达后可诱导肿瘤细胞出现凋亡，且肿瘤细胞的增殖及侵袭能力显著下降<sup>[19]</sup>。Zou等<sup>[20]</sup>发现TPX2在胆管细胞癌组织中呈高表达，且与患者的预后呈负相关；此外，他们还发现敲低胆管癌细胞株中TPX2的表达后肿瘤细胞内上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白亦出现相应变化<sup>[20]</sup>。TPX2在肿瘤中的这些作用充分说明其潜在的探索价值，有可能成为新的肿瘤治疗的理想分子靶点。

在本研究中，通过挖掘GEPIA数据库及采用免疫组织化学染色实验，我们发现TPX2 mRNA及蛋白在膀胱癌组织中均存在高表达，这与TPX2在其他肿瘤组织中的表达情况基本一致<sup>[19-20]</sup>。同时，统计学分析提示膀胱癌组织中TPX2蛋白的表达水平与肿瘤直径、数目、病理分级及术后复发情况等显著相关。虽然GEPIA数据库生存分析提示TPX2 mRNA高表达与低表达组患者之间总体生存率的差异无显著统计学意义，但TPX2 mRNA高表达组患者的无病生存率较低表达组患者明显降低；此外，通过统计学分析我们发现TPX2蛋白阳性表达组的膀胱癌患者术后无复发生存时间亦明显缩短；这说明膀胱癌组织中TPX2的表达水平升高可影响患者预后，由此我们认为TPX2与膀胱癌进展有关，有可能成为预测膀胱癌进展的肿瘤标志物。

综上所述，TPX2在膀胱癌中表达上调，且其表达水平较高的患者预后较差。然而，在本研究中，我们发现，所有病例基底组织中TPX2蛋白未见阳性表达，这与TPX2在其他组织中的表达不一致，此外，多因素回归分析提示TPX2高表达并不是影响膀胱癌患者预后的独立危险因素，我们推测，这可能与样本误差及我们定的阳性表达标准相关，接下来我们将继续加大样本量进行分析；同时，我们还将通过细胞实验及动物实验等进一步验证TPX2在膀胱癌进展中的作用。



## 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7–30.
- [2] ANTONI S, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends[J]. *Eur Urol*, 2017, 71(1): 96–108.
- [3] KAUFMAN D S, SHIPLEY W U, FELDMAN A S. Bladder cancer[J]. *Lancet*, 2009, 374(9685): 239–249.
- [4] BERDIK C. Unlocking bladder cancer[J]. *Nature*, 2017, 551(7679): S34–S35.
- [5] JOHNSON S C, MCCLELLAND S E. Watching cancer cells evolve through chromosomal instability[J]. *Nature*, 2019, 570(7760): 166–167.
- [6] TIJHUIS A E, JOHNSON S C, MCCLELLAND S E. The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity[J]. *Mol Cytogenet*, 2019, 12: 17.
- [7] HEIDEBRECHT H J, BUCK F, STEINMANN J, et al. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M[J]. *Blood*, 1997, 90(1): 226–233.
- [8] VAN GIJN S E, WIERENGA E, VAN DEN TEMPEL N, et al. TPX2/Aurora kinase A signaling as a potential therapeutic target in genomically unstable cancer cells[J]. *Oncogene*, 2019, 38(6): 852–867.
- [9] ZOU J, HUANG R Y, JIANG F N, et al. Overexpression of TPX2 is associated with progression and prognosis of prostate cancer[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 2823–2832.
- [10] GLASER Z A, LOVE H D, GUO S H, et al. TPX2 as a prognostic indicator and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Urol Oncol: Semin Orig Investig*, 2017, 35(5): 286–293.
- [11] TANG Z, LI C, KANG B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(w1): W98–W102.
- [12] SONG S M, MARU D M, AJANI J A, et al. Loss of TGF- $\beta$  adaptor  $\beta$ 2SP activates notch signaling and SOX9 expression in esophageal adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2159–2169.
- [13] VICENTE J J, WORDEMAN L. The quantification and regulation of microtubule dynamics in the mitotic spindle[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 60: 36–43.
- [14] HARRISON L E, BLEILER M, GIARDINA C. A look into centrosome abnormalities in colon cancer cells, how they arise and how they might be targeted therapeutically[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 147: 1–8.
- [15] OU S R, TAN M H, WENG T, et al. LIM kinase1 regulates mitotic centrosome integrity via its activity on dynein light intermediate chains[J]. *Open Biol*, 2018, 8(6): 170202.
- [16] ALFARO-ACO R, PETRY S. How TPX2 helps microtubules branch out[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(17): 1560–1561.
- [17] BAYLISS R, SARDON T, VERNOS I, et al. Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle[J]. *Mol Cell*, 2003, 12(4): 851–862.
- [18] LI S, LIU X, LIU T, et al. Identification of biomarkers correlated with the TNM staging and overall survival of patients with bladder cancer[J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 947.
- [19] JIANG P Y, SHEN K X, WANG X R, et al. TPX2 regulates tumor growth in human cervical carcinoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(6): 2347–2351.
- [20] ZOU Z, ZHENG B, LI J, et al. TPX2 level correlates with cholangiocarcinoma cell proliferation, apoptosis, and EMT[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1286–1293.

(上接第29页)

- [33] 姜明, 乔锐. 丹参酮 II A 磺酸钠注射液联合贝那普利治疗冠心病心力衰竭的临床疗效及其对心功能、血液流变学的影响[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(10): 96–99.
- [34] 姜海瑞, 郝利国. 丹参酮 II A 磺酸钠注射液与舒血宁注射液治疗气虚血瘀型冠心病心绞痛的效果比较[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(1): 145–148, 152.