

• 论 著 •

VAV 家族在膀胱尿路上皮癌中的表达及其与预后的关系*

黄 翔, 蔡宏佳, 张 能[△]

(遵义医科大学附属医院泌尿外科, 贵州 遵义 563000)

[摘要] **目的** 研究 VAV 家族(VAV1、VAV2、VAV3)在膀胱尿路上皮癌中的表达情况, 分析 VAV1、VAV2、VAV3 与膀胱尿路上皮癌患者预后的关系。**方法** 通过 TCGA 数据库下载膀胱尿路上皮癌及正常膀胱尿路上皮组织的数据, 使用 R 语言提取数据后进行分析, 获取 VAV1、VAV2、VAV3 在膀胱尿路上皮癌及正常膀胱尿路上皮组织中的表达情况, 以及根据患者结局绘制生存曲线图。进一步对在膀胱尿路上皮癌组织中进行免疫组织化学验证。**结果** VAV1 在膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱尿路上皮组织中表达比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), VAV2、VAV3 在膀胱尿路上皮癌组织中表达高于正常膀胱尿路上皮组织, 差异有统计学意义($P<0.05$), 与膀胱的分化程度无明显相关性($P>0.05$)。VAV1、VAV2 的表达与患者生存时间无明显相关性($P>0.05$), VAV3 表达越高, 患者生存时间越短($P<0.0001$)。**结论** VAV2、VAV3 可能参与膀胱尿路上皮癌的变化进展, VAV3 可能与患者不良预后有关。

[关键词] 膀胱尿路上皮癌; VAV1; VAV2; VAV3; 预后

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.01.002

中图法分类号:R737.14

文章编号:1009-5519(2024)01-0010-04

文献标识码:A

Expression of VAV family in bladder urothelial carcinoma and its relationship with prognosis*

HUANG Xiang, CAI Hongjia, ZHANG Neng[△]

(Department of Urologic Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of VAV family (VAV1, VAV2, VAV3) in bladder urothelial carcinoma, and to analyze the relationship between VAV1, VAV2, VAV3 and prognosis of the patients with bladder urothelial carcinoma. **Methods** The data of bladder urothelial carcinoma and normal bladder urothelial tissue were downloaded by the TCGA database, which were extracted by R language for conducting the analysis. The expression situation of each gene in urinary urothelial carcinoma and normal urinary urothelial tissue of bladder was obtained. The survival curve was drawn according to the patient's outcome and the expression level in bladder urothelial carcinoma was further conducted the immunohistochemistic verification. **Results** The expression levels of VAV1 had no significant difference between urothelial carcinoma and normal bladder urothelial tissue ($P>0.05$). The expression levels of VAV2 and VAV3 in the bladder urothelial carcinoma tissue were higher than that in normal bladder urothelial tissues, the difference was statistically significant ($P<0.05$), and had no significant correlation with the bladder differentiation degree ($P>0.05$). The expression levels of VAV1 and VAV2 had no significant correlation with the survival time of the patients ($P>0.05$). The higher the expression of VAV3, the shorter the survival time of the patients ($P<0.0001$). **Conclusion** VAV2 and VAV3 may be involved in the change progression of bladder urothelial carcinoma, and VAV3 may be related to the poor prognosis of the patients.

[Key words] Bladder urothelial carcinoma; VAV1; VAV2; VAV3; Prognosis

膀胱癌作为泌尿外科第二常见肿瘤,其高发病率和病死率严重困扰着临床医生和患者^[1],2020 年全球膀胱癌新发病例约 57 万例,死亡约 21 万例^[2]。其最为常见的病理类型为膀胱尿路上皮癌,主要特点为

易复发、易进展,患者往往需要行多次手术治疗及膀胱灌注化疗,给患者及家庭带来严重的经济负担。迄今为止,几乎没有特异性和有效的靶向治疗。因此,寻找膀胱癌的潜在生物标志物并确定其潜在机制可

* 基金项目:贵州省遵义市科技支撑计划项目(遵市科合 HZ 字[2019]73 号);遵义医科大学附属医院硕士科研启动基金项目(院字[2017]34 号)。

作者简介:黄翔(1989—),硕士研究生,主治医师,主要从事膀胱癌的基础研究与临床工作。 [△] 通信作者, E-mail:energy20170118@hotmail.com。

能有助于找到新的治疗方法。

VAV 家族包括 VAV1、VAV2 和 VAV3,这些蛋白质的主要功能是作为 Rho-GTPase 家族成员的鸟苷核苷酸交换因子(GEF)^[3]。VAV 家族是一个特殊亚类,因为它们 是信号转导过程中唯一受直接酪氨酸磷酸化正向调节的 GEF。它们在细胞和组织上分布有重叠,但并不完全相同,这些蛋白质含有高度相似和复杂的结构,各自包含了多个功能结构域,并参与各种细胞信号传导过程,包括调节细胞骨架组织、细胞转化等^[4]。它们在不同的细胞类型中都扮演了关键信号分子^[5-7],还能作为促癌因素驱动下游多条通路来促进肿瘤的发生、发展。但是它们在膀胱尿路上皮癌中表达如何尚少见相关研究。为研究膀胱尿路上皮癌组织中 VAV 家族表达及意义,本实验检测了 VAV 家族在膀胱尿路上皮癌及正常膀胱尿路上皮组织中的表达,分析了 VAV 家族表达与患者预后的关系。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 数据来源 通过 TCGA 数据库网站(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载膀胱尿路上皮癌的基因数据和临床资料,一共获得 408 例膀胱原发肿瘤患者和 19 例正常尿路上皮组织受试者的有效数据。

1.1.2 标本来源 选取 2020 年 1 月至 2021 年 12 月在本院住院行膀胱肿瘤电切术且术后病理检查结果证实为膀胱尿路上皮癌的患者标本 60 例(包括低级别和高级别膀胱尿路上皮癌各 30 例),以及 30 例行膀胱癌根治术后患者的正常膀胱黏膜(镜下未发现癌细胞)。所有入选患者均有完整的临床病理资料。

1.2 方法

1.2.1 数据处理 使用 R 语言进行数据提取与分析,主要使用的 R 语言有 dplyr、tidyverse、limma、gg-

plot2、survival。

1.2.2 主要实验试剂 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司,VAV1、VAV2 一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司,VAV3 一抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2.3 免疫组织化学 膀胱尿路上皮癌组织石蜡切片脱蜡,PBS 冲洗后加入山羊血清封闭液,滴加一抗,4℃过夜,PBS 冲洗 3 次;滴加二抗,37℃ 30 min,PBS 冲洗 3 次,滴加新鲜 DAB 显色液,阳性为棕黄色,苏木素复染,将切片依次置于分度无水乙醇和二甲苯中分别浸泡,中性树胶封片。

免疫组织化学染色结果通过半定量计分的方法进行蛋白表达的评价,染色强度评分原则如下:不着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性染色的百分比评分如下:<5%为 0 分、5%~25%为 1 分、>25%~50%为 2 分、>50%~75%为 3 分、>75%为 4 分。最终免疫组织化学染色得分(0~7 分)为组织标本的染色强度加上相对应的阳性染色百分比,总分 0~1 分为阴性,2~3 分为弱阳性,4~7 分为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析,采用秩和检验对 VAV1、VAV2、VAV3 在不同组织中的表达差异进行统计学处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TCGA 数据中 VAV 家族在膀胱尿路上皮癌和正常膀胱尿路上皮组织中的表达情况 通过 R 语言软件提取 TCGA 原始数据并分析后,结果显示,VAV1 在膀胱尿路上皮癌组织及正常膀胱尿路上皮组织中表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),VAV2、VAV3 在膀胱尿路上皮癌组织中表达高于正常膀胱尿路上皮组织,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

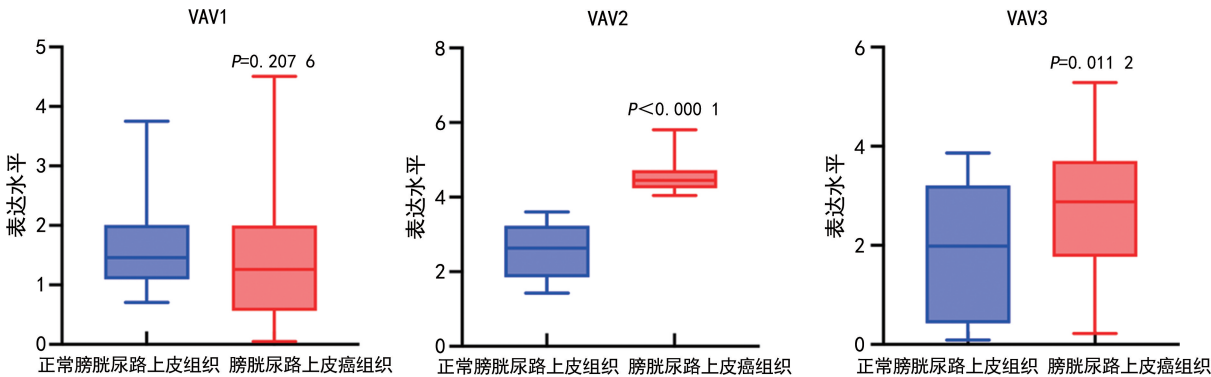


图 1 VAV 家族在正常膀胱尿路上皮组织和膀胱尿路上皮癌组织中的表达情况

2.2 免疫组织化学染色结果 通过免疫组织化学染色正常膀胱尿路上皮组织、低级别和高级别膀胱尿路上皮癌组织各 30 例,3 种类型的组织又分别染色 VAV1、VAV2、VAV3 各 10 例,结果显示,VAV1 在

正常膀胱尿路上皮组织和膀胱尿路上皮癌组织中表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),VAV2、VAV3 在膀胱尿路上皮癌中表达较在正常膀胱尿路上皮组织中增高,差异有统计学意义($P<0.05$),

VAV1、VAV2、VAV3 在不同级别膀胱癌组织中表达比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),说明 VAV1、VAV2、VAV3 与膀胱的分化程度无明显相关性($P>0.05$),见表 1、图 2。

2.3 VAV 家族与患者预后的关系 采用 R 语言进

一步分析 TCGA 数据,提取出 VAV1、VAV2、VAV3 mRNA 表达量、生存时间及结局,绘制生存曲线图,结果显示,VAV1、VAV2 的表达与患者生存时间无明显相关性($P>0.05$),VAV3 表达越高,患者生存时间越短($P<0.0001$),见图 3。

表 1 膀胱尿路上皮癌组织和正常膀胱尿路上皮组织中 VAV 家族的免疫组织化学染色结果

组别	VAV1				VAV2				VAV3			
	染色评分(分)			阳性率 (%)	染色评分(分)			阳性率 (%)	染色评分(分)			阳性率 (%)
	0~1	2~3	4~7		0~1	2~3	4~7		0~1	2~3	4~7	
正常膀胱尿路上皮组织	6	3	1	40	9	0	1	10	8	2	0	20
低级别膀胱癌组织	7	3	0	30	3	3	4	70	2	3	5	80
高级别膀胱癌组织	6	3	1	40	1	6	3	90	0	7	3	100
正常膀胱尿路上皮组织 vs. 膀胱癌组织				$P>0.05$				$P<0.05$				$P<0.05$
低级别膀胱癌组织 vs. 高级别膀胱癌组织				$P>0.05$				$P>0.05$				$P>0.05$

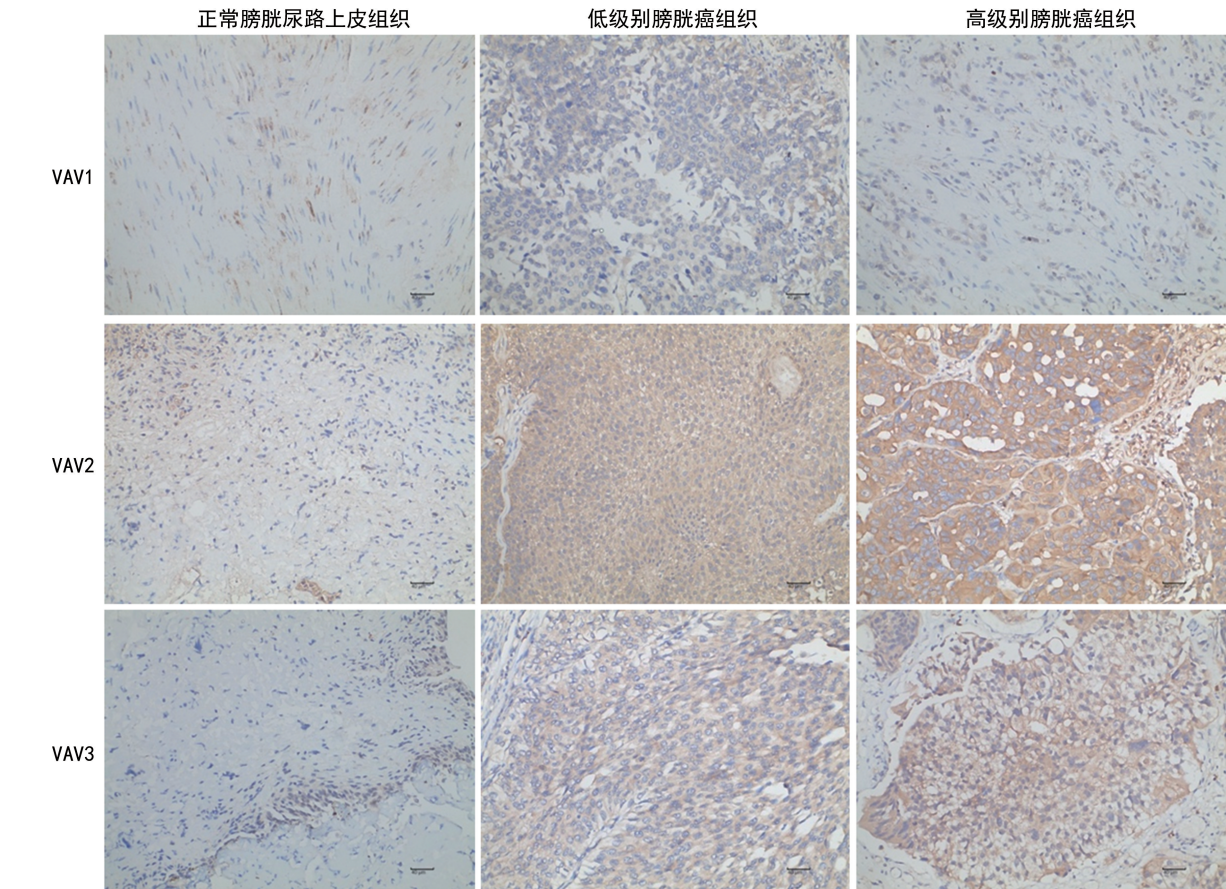


图 2 VAV 家族在正常膀胱尿路上皮组织、低级别和高级别膀胱癌组织中的表达情况(免疫组织化学染色,20×)

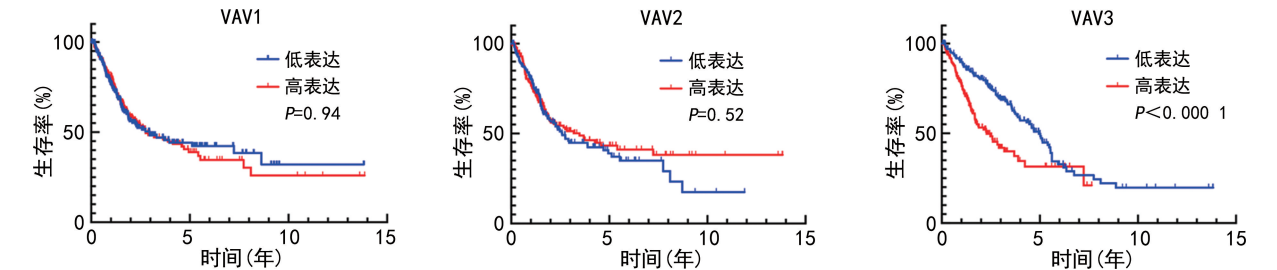


图 3 VAV 家族不同表达的膀胱癌患者生存曲线

3 讨 论

VAV 家族是 GEF 中的 Dbl 同源性亚家族中最著名的一类蛋白, GEF 是催化 Rho 蛋白中鸟苷二磷酸(GDP)与三磷酸(GTP)交换的酶, 使 GTP 酶在细胞信号传导过程中从非活性快速转变为活性 GTP 结合状态。VAV 蛋白在蛋白酪氨酸激酶控制的许多生物过程中发挥着关键作用。它们可以作为衔接蛋白, 因此也体现了大多数 Rho-GEF 的调控复杂性。VAV 蛋白对中枢神经、心血管和免疫系统的稳态至关重要^[3,8]。

在本研究中, 使用 R 语言提取 TCGA 的原始数据, 分析结果发现 VAV1 在膀胱尿路上皮癌与正常膀胱尿路上皮组织中表达无明显差异, 而 VAV2 和 VAV3 在膀胱尿路上皮癌中的表达均高于正常膀胱尿路上皮组织。为验证此结果, 收集膀胱尿路上皮癌患者病理标本行免疫组织化学验证, 其结果与生物信息学数据相符。通过分析 VAV2 和 VAV3 与膀胱癌患者预后的关系, 发现 VAV3 的高表达与患者不良预后有明显相关性, 因此, VAV3 作为膀胱癌重要的调节因子具有进一步探索的意义。

VAV3 是 Rho-GTP 酶核苷酸交换因子 VAV 家族的第 3 个成员, 参与各种细胞信号传导过程, 其通过经典的 Dbl 结构域激活 Rho 家族 GTP 酶, 如 RhoA、Rac1 和 Cdc42^[9-10]。各种受体酪氨酸激酶(RTK)激活 VAV 蛋白, 导致其底物的 Dbl 结构域开放^[9,11]。VAV3 还具有调节细胞运动、增殖和分化的功能。VAV3 与癌症的进展和复发相关, 并介导对某些癌症治疗的抵抗^[12]。

在 VAV 家族中, VAV3 的缺乏会导致骨量密度增加^[13]、交感神经过度活跃、心血管功能障碍和伤口愈合受损^[13-15]。VAV3 在肿瘤的发生和转移中也扮演了重要角色。在前列腺癌中, VAV3 通过提高 AR-V7 的活性导致去势抵抗前列腺癌的发生^[16]。在胃癌患者中也发现 VAV3 表达与肿瘤分化、肿瘤浸润、淋巴结转移、神经血管浸润和临床病理分期显著相关, 表明 VAV3 的表达与癌症的浸润、转移和恶化呈正相关($P < 0.05$), 同时生存分析也显示, 高表达 VAV3 的患者预后更差及生存时间更短^[17]。

尽管本研究结果仅显示 VAV3 与膀胱癌患者的不良预后有明显关系, 但是其他研究结果却发现 VAV2 和 VAV3 在乳腺癌中共同作用可导致患者在总体生存率、肿瘤复发及转移事件方面产生更加不良的预后。当 VAV2 或 VAV3 缺失时, 癌症细胞向肺的转移能力受到损害, 而当 2 种 VAV 蛋白同时缺失时, 癌症的转移能力消失。VAV2; VAV3 敲低细胞中 2 种 VAV 蛋白的异位共表达挽救了原发性肿瘤发生和肺转移; 相反, 2 种单一 VAV 蛋白中任何一种的再表达均未能恢复 VAV2; VAV3 敲低细胞的致瘤特性^[18]。针对这一结果, 考虑可能文献的实验结果是来

自动物实验, 而作者的分析结果来源是 TCGA 下载的临床数据, 相同的基因在动物和人类中的表达情况或对预后的影响可能会出现差异, 或者是因为 TCGA 的数据量不足而导致差异有统计学意义($P < 0.05$)。对于 VAV2 是否单独或联合 VAV3 产生作用, 接下来还将通过科学研究来进一步验证。

本研究结果显示, VAV3 的表达可能是预测膀胱尿路上皮癌患者预后的一个有价值的独立危险因素, 可能为进一步了解膀胱尿路上皮癌的发病机制带来新思路, 也能为治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] PANG X, FU X, CHEN S, et al. Overexpression of CIP2A promotes bladder cancer progression by regulating EMT [J]. Clin Trans Oncol, 2016, 18(3): 289-295.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] BUSTELO X R. Vav family exchange factors: An integrated regulatory and functional view [J]. Small GTPases, 2014, 5(2): 9.
- [4] UEN Y H, FANG C L, HSEU Y C, et al. VAV 3 oncogene expression in colorectal cancer: clinical aspects and functional characterization [J]. Sci Rep, 2015, 5: 9360.
- [5] LIU B, CHEN J M, SHANG F J, et al. Tumor-Derived exosome FGD5-AS1 promotes angiogenesis, vascular permeability, and metastasis in thyroid cancer by targeting the miR-6838-5p/VAV2 axis [J]. J Oncol, 2022, 2022: 4702855.
- [6] LORENZO-MARTÍN L F, FERNÁNDEZ-PAREJO N, MENACHO-MÁRQUEZ M, et al. VAV2 signaling promotes regenerative proliferation in both cutaneous and head and neck squamous cell carcinoma [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4788.
- [7] TSUBOI M, TANIUCHI K, FURIHATA M, et al. VAV3 is linked to poor prognosis of pancreatic cancers and promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells [J]. Pancreatology, 2016, 16(5): 905-916.
- [8] BUSTELO X R. RHO GTPases in cancer: known facts, open questions, and therapeutic challenges [J]. Biochem Soc Trans, 2018, 46(3): 741-760.
- [9] ZENG L, SACHDEV P, YAN L, et al. VAV3 mediates receptor protein tyrosine (下转第 19 页)

Physiol,2021,11(3):2135-2190.

[21] SINGH Y, LAKSHMINRUSIMHA S. Pathophysiology and management of persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. Clin Perinatol,2021,48(3):595-618.

[22] MARTINHO S, ADÃO R, LEITE-MOREIRA AF, et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn: Pathophysiological mechanisms and novel therapeutic approaches[J]. Front Pediatr,2020,8:342.

[23] ELIA D, CAMINATI A, ZOMPATORI M, et al. Pulmonary hypertension and chronic lung disease: where are we headed? [J]. Eur Respir Rev,2019,28(153):190065.

[24] NIKITOPOULOU I, MANITSOPOULOS N, KOTANIDOU A, et al. Orotracheal treprostinil administration attenuates bleomycin-induced lung injury, vascular remodeling, and fibrosis in mice [J]. Pulm Circ, 2019, 9 (4): 2045894019881954.

[25] RATHINASABAPATHY A, BRYANT A J, SUZUKI T, et al. rhACE2 therapy modifies bleomycin-induced pulmonary hypertension via rescue of vascular remodeling[J]. Front Physiol,2018,9:271.

[26] RATHINASABAPATHY A, HOROWITZ A, HORTON K, et al. The selective angiotensin II type 2 receptor agonist, compound 21, attenuates the progression of lung fibrosis and pulmonary hypertension in an experimental model of bleomycin-induced lung injury [J]. Front Physiol,2018,9:180.

[27] AVOUAC J, KONSTANTINOVA I, GUIGNABERT C, et al. Pan-PPAR agonist IVA337 is effective in experimental lung fibrosis and pulmonary hypertension [J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(11):1931-1940.

[28] JIANG Q, LIU C, LIU S, et al. Dysregulation of BMP9/BMP2/SMAD signalling pathway contributes to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension induced by bleomycin in rats[J]. Br J Pharmacol,2021,178(1):203-216.

(收稿日期:2023-05-08 修回日期:2023-10-21)

(上接第 13 页)

kinase signaling, regulates GTPase activity, modulates cell morphology, and induces cell transformation [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20 (24):9212-9224.

[10] BUSTELO X R. Regulatory and signaling properties of the Vav family[J]. Mol Cell Biol,2000,20(5):1461-1477.

[11] MOORES S L, SELFORS L M, FREDERICKS J, et al. Vav family proteins couple to diverse cell surface receptors[J]. Mol Cell Biol,2000,20(17):6364-6373.

[12] REN W L, XU C W, WANG S Y, et al. The effect of VAV3 polymorphisms on thyroid cancer[J]. Endocrine,2022,75(1):178-184.

[13] FACCIO R, TEITELBAUM S L, FUJIKAWA K, et al. Vav3 regulates osteoclast function and bone mass[J]. Nat Med,2005,11(3):284-290.

[14] SAUZEAU V, SEVILLA M A, RIVAS-ELENA J V, et al. VAV3 proto-oncogene deficiency leads to sympathetic hyperactivity and cardiovascular dysfunction [J]. Nat Med, 2006, 12 (7):841-845.

[15] SINDRILARU A, PETERS T, SCHYMEINSKY J, et al. Wound healing defect of VAV3-/- mice due to impaired {beta}2-integrin-dependent macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils [J]. Blood, 2009, 113 (21):5266-5276.

[16] PEACOCK S O, FAHRENHOLTZ C D, BURNSTEIN K L. VAV 3 enhances androgen receptor splice variant activity and is critical for castration-resistant prostate cancer growth and survival[J]. Mol Endocrinol,2012,26(12):1967-1979.

[17] TAN B B, LI Y, SHI X M, et al. Expression of VAV3 protein and its prognostic value in patients with gastric cancer[J]. Pathol Res Pract, 2017, 213(5):435-440.

[18] CITTERIO C, MENACHO-MÁRQUEZ M, GA-RCÍA-ESCUADERO R, et al. The rho exchange factors VAV2 and VAV3 control a lung metastasis-specific transcriptional program in breast cancer cells [J]. Sci Signal, 2012, 5(244):ra71.

(收稿日期:2023-07-04 修回日期:2023-10-11)