

## 膀胱癌

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003292

## 肿瘤相关成纤维细胞作为预测非肌层浸润性膀胱癌复发的生物标志物的评估

印胡滨,李庭浩,陈俊睿,冯真维,苟欣,何卫阳

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

**【摘要】目的:**探究肿瘤相关成纤维细胞作为生物学标志物预测非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)患者术后复发的临床意义。**方法:**从基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数据库下载转录组数据以及对应的临床信息,分析原发性和复发性膀胱癌样本中 ACTA2 的表达差异。免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测 56 例膀胱癌样本中  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)表达。绘制无复发生存曲线(recurrence-free survival, RFS)和时间依赖性受试者工作特征曲线(time-dependent receiver operating characteristic curves, tdROC)。采用单变量和多变量 Cox 比例风险回归模型分析  $\alpha$ -SMA 作为膀胱癌患者术后复发的预测因素的可行性。**结果:**GSE13507、GSE120739 和 GSE128959 数据集复发组中 ACTA2 的表达均高于原发组( $P<0.05$ )。IHC 结果显示,  $\alpha$ -SMA 蛋白定位在肿瘤间质, 复发组中  $\alpha$ -SMA 阳性/强阳性占比 56.52%, 而在原发组中占比 16.13%, 差异有统计学意义( $P<0.001$ )。 $\alpha$ -SMA 蛋白表达与年龄、性别、病理分期、分级、肿瘤数量和大小等指标无明显相关性。 $\alpha$ -SMA 高表达组患者术后 RFS 较低表达组患者明显缩短[风险比(hazard ratio, HR)=2.76, 95% 可信区间(confidence interval, CI)=1.21~6.30,  $P=0.016$ ]。多变量 Cox 分析显示,  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平是影响患者术后 RFS 的独立危险因素( $HR=2.47$ , 95%CI=1.02~5.97,  $P=0.045$ )。tdROC 曲线提示  $\alpha$ -SMA 对复发的预测能力优于其他临床因素。**结论:**肿瘤间质的  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平与膀胱癌复发密切相关, 可作为临床预测 NMIBC 患者术后复发的标志物。

**【关键词】**非肌层浸润性膀胱癌; 肿瘤相关成纤维细胞;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 复发

**【中图分类号】**R737.14

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2023-06-04

## Assessment of tumor-associated fibroblast as a biomarker for predicting recurrence of non-muscle invasive bladder cancer

Yin Hubin, Li Tinghao, Chen Junrui, Feng Zhenwei, Gou Xin, He Weiyang

(Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the clinical significance of tumor-associated fibroblast as a biomarker in predicting postoperative recurrence of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC). **Methods:** Transcriptomic data were downloaded from the Gene Expression Omnibus database along with corresponding clinical information to analyze the differences in ACTA2 expression in primary and recurrent bladder cancer samples. Immunohistochemistry (IHC) was used to determine  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression in 56 bladder cancer samples. Recurrence-free survival (RFS) curves and time-dependent receiver operating characteristic (tdROC) curves were plotted. Univariate and multivariate Cox proportional hazard regression models were used to analyze the feasibility of  $\alpha$ -SMA as a predictor of postoperative recurrence of bladder cancer. **Results:** The expression of ACTA2 was significantly higher in the recurrence group than in the primary group in the GSE13507, GSE120739, and GSE128959 datasets ( $P<0.05$ ). IHC results showed that  $\alpha$ -SMA protein was localized in the tumor stroma, and the percentage of positive/strongly positive  $\alpha$ -SMA was 56.52% in the recurrence group and 16.13% in the primary group, with a significant difference between the two groups ( $P<0.001$ ). There was no significant correlation between  $\alpha$ -SMA protein expression and age, gender, pathological stage, grade, tumor number, and size. Postoperative RFS was significantly shorter in patients with high  $\alpha$ -SMA expression than in those with low  $\alpha$ -SMA expression [hazard ratio (HR)=2.76, 95% confidence interval (CI)=1.21~6.30,  $P=0.016$ ]. Multivariate Cox analysis showed that  $\alpha$ -SMA protein expression level was an independent risk factor for postoperative RFS in patients ( $HR=2.47$ , 95%CI=1.02~5.97,  $P=0.045$ ). tdROC curves suggested that  $\alpha$ -SMA was a better predictor of recurrence than other clinical factors. **Conclusion:**  $\alpha$ -SMA

作者介绍: 印胡滨, Email: dr-yin-cqmu@qq.com,

研究方向: 肿瘤微环境在膀胱癌进展的作用及机制研究。

通信作者: 何卫阳, Email: weiyang361@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81874092); 重庆市博士直通车资助项目(编号: CSTB2022BSXM-JCX0037)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20230804.1634.004>

(2023-08-07)

protein expression level in the tumor stroma is closely related to the recurrence of bladder cancer and can be used as a clinical marker to predict postoperative recurrence of NMIBC.

**【Key words】**non-muscle invasive bladder cancer;tumor-associated fibroblast; $\alpha$ -smooth muscle actin;recurrence

膀胱癌是全球第十大常见恶性肿瘤。2022 年我国预计新增膀胱癌确诊病例 91 893 人,死亡 42 973 人<sup>[1]</sup>。临床上约 70% 的患者属于非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC),其主要的治疗方法为手术切除局部病灶,辅以灌注治疗。然而,术后 5 年内约 50%~80% 的患者会经历肿瘤复发,10%~20% 会进展成为肌层浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC),严重影响患者生活和生存质量<sup>[2]</sup>。因此,如何筛选出具有复发倾向的患者人群,并予以针对性个性化治疗是延缓膀胱癌复发和改善预后的关键措施。肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts, TAFs)在多种实体瘤中参与肿瘤发生、进展、治疗抵抗和免疫逃逸<sup>[3]</sup>。TAFs 的鉴定基于一系列特异性标志物,其中应用最为广泛的是 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)<sup>[4]</sup>。作为活化的成纤维细胞的标志物, $\alpha$ -SMA 是一种与转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号和高度收缩表型相关的细胞骨架蛋白,也是第一个被发现和最常见的 TAFs 生物学标志物<sup>[5]</sup>。既往研究表明, $\alpha$ -SMA 与口腔鳞癌的复发密切相关<sup>[6]</sup>。然而, $\alpha$ -SMA 在膀胱癌复发过程中的意义尚不清楚。因此,本研究检测 $\alpha$ -SMA 在原发和复发性膀胱癌组织中的表达情况,并评估其作为 NMIBC 患者复发的生物学标志物的临床价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据收集

从基因表达综合(Gene Expression Omnibus, GEO)数

据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载 GSE13507<sup>[7]</sup>、GSE120736 和 GSE128959<sup>[8]</sup>数据集。数据纳入标准:包含原发和复发信息的膀胱癌样本。从 GSE13507 数据集中纳入 126 例样本,包括 67 例原发性 NMIBC 和 59 例复发性 NMIBC;从 GSE120736 数据集中纳入 93 例样本,包括 67 例原发性 NMIBC,10 例复发性 NMIBC 和 16 例复发性 MIBC(复发前属 NMIBC);从 GSE128959 数据集中纳入 154 例样本,包括 55 例原发性 NMIBC 和 99 例复发性 NMIBC。GEO 数据集信息见表 1。通过使用 Affymetrix 的注释文件对探针进行注释和转换。

### 1.2 样本收集

回顾性收集 2017 年 12 月至 2020 年 12 月在重庆医科大学附属第一医院泌尿外科住院治疗的膀胱癌患者的临床信息,年龄 34~85 岁,平均( $65.54 \pm 12.51$ )岁。随访时间 4~70 个月,平均( $35.76 \pm 18.39$ )个月。纳入标准:①接受手术治疗,包括经尿道膀胱肿瘤电切或根治性膀胱切除术,且术后病理诊断为膀胱癌;②有详细临床病理资料,包括患者性别、年龄、肿瘤数量、大小、病理分期、分级;③随访时间大于 3 个月,且随访信息中包含患者的复发状态。排除标准:①合并有其他恶性肿瘤患者;②存留的石蜡组织较少,重庆医科大学病理科无法多次切片;③随访资料信息不完整。随访时间截至 2023 年 1 月,根据随访结果将患者分为复发组和未复发组。最后,共纳入 54 例患者,包括 31 例原发性 NMIBC 和 23 例复发性 NMIBC。54 例患者中接受经尿道膀胱肿瘤电切术者 51 例,接受根治性膀胱切除术者 3 例。对于术后多次复发患者,根据首次复发时间进行分析。该研究得到了重庆医科大学附属第一医院伦理委员会的批准。

### 1.3 实验试剂

$\alpha$ -SMA 小鼠单克隆抗体(货号:ab7817)购买自美国 Abcam 公司;免疫组化染色试剂盒(货号:SAP-9100)和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色液(货号:ZLI-9017)购自北京中杉金桥公司;苏木素(货号:G1080)和中性树胶(货号:

表 1 GEO 数据集基本信息

项目	GSE13507	GSE120736	GSE128959
处理平台	Illumina 人类-6 v2.0 表达	Illumina 人类 HT-12 V4.0 表达	Affymetrix 人类基因 1.0 ST 阵列
状态			
原发	67	67	55
复发	59	26	99
分期			
NMIBC	126	77	144
MIBC	0	16	0

G8590)购买自北京索莱宝公司。

#### 1.4 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC)

免疫组织化学染色的操作步骤按照以前的描述进行<sup>[9]</sup>。对甲醛固定、石蜡包埋的 5 mm 切片进行脱蜡、脱水,然后浸泡在沸腾的 0.01 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中 25 min,进行抗原修复,用 3% 浓度的过氧化氢室温下孵育 10 min,阻断过氧化物酶,在室温下用 10% 的山羊血清封闭 15 min。然后在 4 °C 条件下一抗孵育过夜。用磷酸盐缓冲盐水洗 3 次,在室温下孵育二抗 20 min。然后利用 3,3'-二氨基联苯胺对切片进行染色,并用苏木精进行反染色。最后使用中性树脂封片,保存,便于后期拍照。IHC 染色强度评分判定:0 为阴性;1 为弱阳性;2 为阳性;3 为强阳性。根据 IHC 染色强度评分将患者分为  $\alpha$ -SMA 高表达组 (强度为 2 和 3) 和低表达组 (强度为 0 和 1)。

#### 1.5 构建列线图

使用 R 软件的“rms”包 (3.5.1 版) 绘制了基于  $\alpha$ -SMA 表达和临床相关因素的预测列线图。绘制校准曲线以评估提名图的性能。在校准图中,列线图预测的疾病复发和观察到的结果分别显示在  $x$  轴和  $y$  轴上;45 度的虚线表示理想的预测结果。

#### 1.6 统计学处理

统计分析由 SPSS 22.0 版软件和 GraphPad 8.0 进行。 $\alpha$ -SMA 表达与临床病理参数之间的相关性使用卡方检验进行评估。单变量和多变量分析使用 Cox 比例危险回归模型进行预后分析。通过 Kaplan-Meier 曲线评估高表达组和低表达组的生存差异,并通过对数秩检验 (log-rank test) 进行比较。预测模型的准确性通过时间依赖性受试者工作特征曲线 (time-dependent receiver operating characteristic curves, tdROC) 进行分析,并通过曲线下面积 (area under the curve, AUC) 进行评估。2 组之间的比较独立样本  $t$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 ACTA2 在复发性膀胱癌中高表达

对 GEO 数据库中 GSE13507、GSE120736 和 GSE128959 数据集进行分析,发现与原发 NMIBC 相比,ACTA2 mRNA 表达水平在复发性 NMIBC 中明显升高 (图 1)。

### 2.2 $\alpha$ -SMA 在复发性 NMIBC 中表达上调

为进一步证实 ACTA2 基因编码的蛋白质  $\alpha$ -SMA 在复发性 NMIBC 组织中的表达和临床意义,本研究对膀胱癌组织切片进行 IHC 分析,检测  $\alpha$ -SMA 蛋白表达量及其与膀胱癌复发的相关性。复发组中  $\alpha$ -SMA 阳性/强阳性占比 56.52% (13/23),而在原发组中  $\alpha$ -SMA 多为阴性表达 (14/31) 或弱阳性表达 (12/31),少数呈现为阳性/强阳性表达 (5/31),如图 2 所示。 $\alpha$ -SMA 的定位局限在肿瘤间质。IHC 强度评分显示,复发组中  $\alpha$ -SMA 染色强度较原发组相比明显增加 (图 2)。

### 2.3 $\alpha$ -SMA 的临床相关性分析

基于 54 例膀胱癌 IHC 染色强度评分结果,本研究对  $\alpha$ -SMA 表达与临床病理参数的相关性进行分析。根据 IHC 染色强度评分将膀胱癌患者分为高表达组 (2~3 分) 和低表达组 (0~1 分)。Kaplan-Meier 生存曲线显示, $\alpha$ -SMA 高表达组患者术后无复发生存期 (recurrence-free survival, RFS) 较低表达组患者明显缩短 [风险比 (hazard ratio, HR)=2.74, 95% 置信区间 (confidence interval, CI)=1.14~6.57,  $P=0.012$ ],如图 3 所示。然而,卡方检验结果显示, $\alpha$ -SMA 表达与患者年龄、性别、肿瘤分期、分级、大小和数量等临床病理因素无相关性 ( $P>0.05$ , 表 2)。

单因素 Cox 回归分析发现, $\alpha$ -SMA ( $HR=2.76$ , 95%CI=1.21~6.30,  $P=0.016$ )、年龄 ( $HR=3.99$ , 95%CI=1.35~11.77,  $P=0.012$ ) 和病理分期 ( $HR=2.29$ , 95%CI=1.01~5.22,  $P=0.048$ ) 与

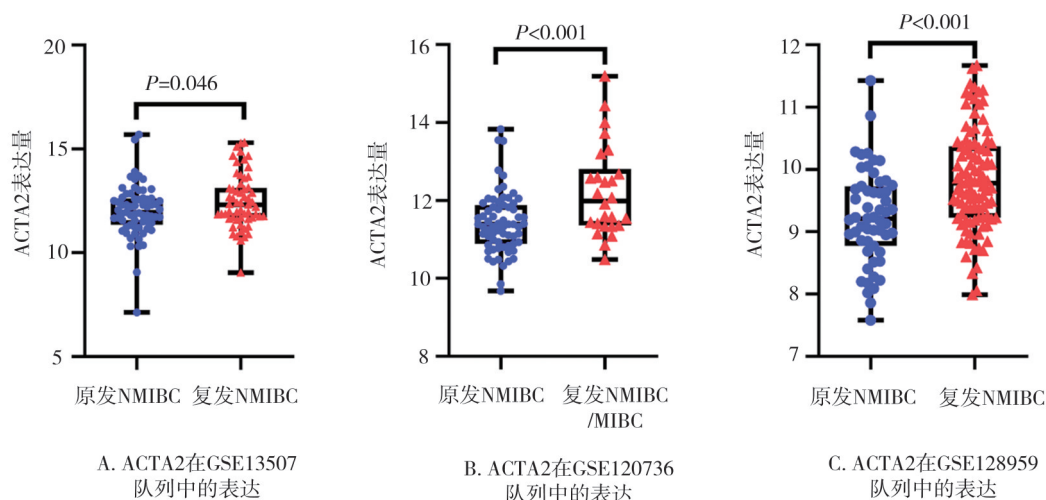


图 1 ACTA2 在原发性和复发性膀胱癌中的表达差异

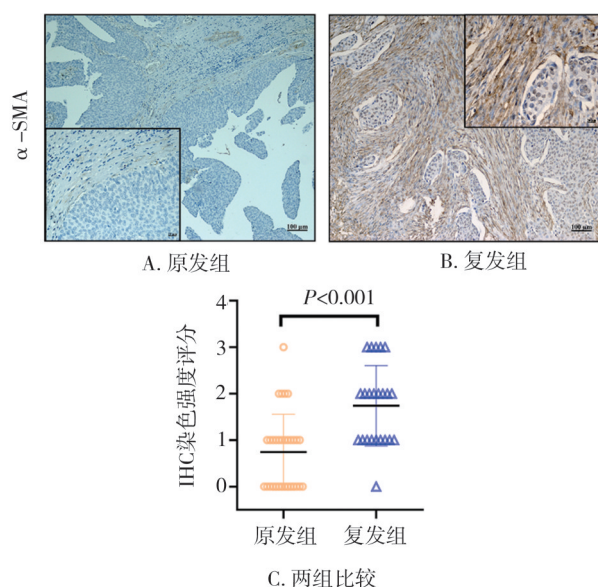


图2 免疫组织化学法分析原发性和复发性NMIBC组织中  
α-SMA蛋白表达水平(100×和400×)

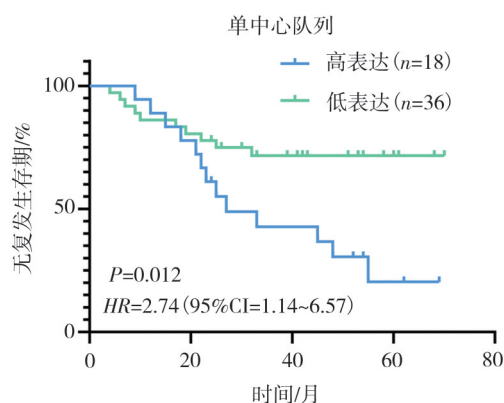


图3 α-SMA与NMIBC患者的RFS的关系

RFS相关。而病理分级( $HR=2.17$ ,  $95\%CI=0.89\sim5.27$ ,  $P=0.089$ )和肿瘤大小( $HR=2.03$ ,  $95\%CI=0.89\sim4.60$ ,  $P=0.091$ )虽无统计学意义,但整体呈现出具有差异的趋势。进一步的多因素Cox回归分析发现仅有α-SMA( $HR=2.47$ ,  $95\%CI=1.02\sim5.97$ ,  $P=0.045$ )是预测膀胱癌术后复发的独立危险因素(表3)。

表2 α-SMA与膀胱癌临床病理参数的相关性分析

项目	例数	α-SMA 表达		$\chi^2$ 值	P值
		高	低		
年龄/岁				0.266	0.606 <sup>a</sup>
<65	22	18	4		
≥65	32	23	9		
性别				0.203	0.653 <sup>b</sup>
男性	41	13	28		
女性	13	5	8		
病理分级				0.606	0.436 <sup>b</sup>
G1-G2	23	9	14		
G3	31	9	22		
病理分期				0.159	0.690 <sup>b</sup>
Ta	34	12	22		
T1	20	6	14		
肿瘤大小/cm				0.959	0.328 <sup>b</sup>
≥3	22	9	13		
<3	32	9	23		
肿瘤数量				0.038	0.845 <sup>b</sup>
单发	32	11	21		
多发	22	7	15		

注:a,使用校正后卡方检验计算P值;b:使用卡方检验计算P值

#### 2.4 检验α-SMA作为膀胱癌复发预测因素的效能

在tdROC分析中,α-SMA在2年、3年和5年的AUC分别达到了0.671,0.727,0.724,如图4A所示。且相较于其他临床病理因素,如年龄、病理分期、病理分级、肿瘤大小和数量,α-SMA对膀胱癌术后复发的预测效果更具优势(图4B)。以上研究结果提示,α-SMA可以作为预测膀胱癌患者术后RFS的可靠生物标志物。

#### 2.5 构建列线图以预测NMIBC复发

为开发一种临床实用的模型来预测NMIBC患者复发风险,将α-SMA、年龄、病理分期、分级和肿瘤大小等因素整合在一起,共同构建预测3年和5年RFS的列线图(图5A)。与理想模型相比,基于列线图的校准曲线可以很好地预测3年和5年RFS(图5B),这提示该模型的预测准确性较好。

表3 单变量和多变量Cox回归分析

变量	单因素分析		多因素分析	
	HR(95%CI)	P值	HR(95%CI)	P值
年龄	3.99(1.35~11.77)	0.012	2.49(0.79~7.90)	0.121
性别	1.19(0.47~3.04)	0.712		
病理分期	2.29(1.01~5.22)	0.048	1.44(0.48~4.36)	0.517
病理分级	2.17(0.89~5.27)	0.089	1.53(0.46~5.09)	0.484
肿瘤大小	2.03(0.89~4.60)	0.091	1.29(0.54~3.07)	0.568
肿瘤数量	1.05(0.46~2.39)	0.910		
α-SMA表达	2.76(1.21~6.30)	0.016	2.47(1.02~5.97)	0.045



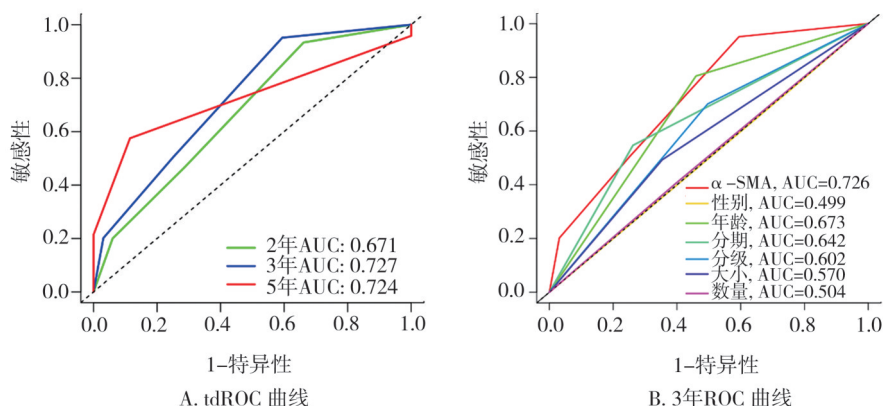


图4 评估 NMIBC 患者术后复发的 tdROC 曲线

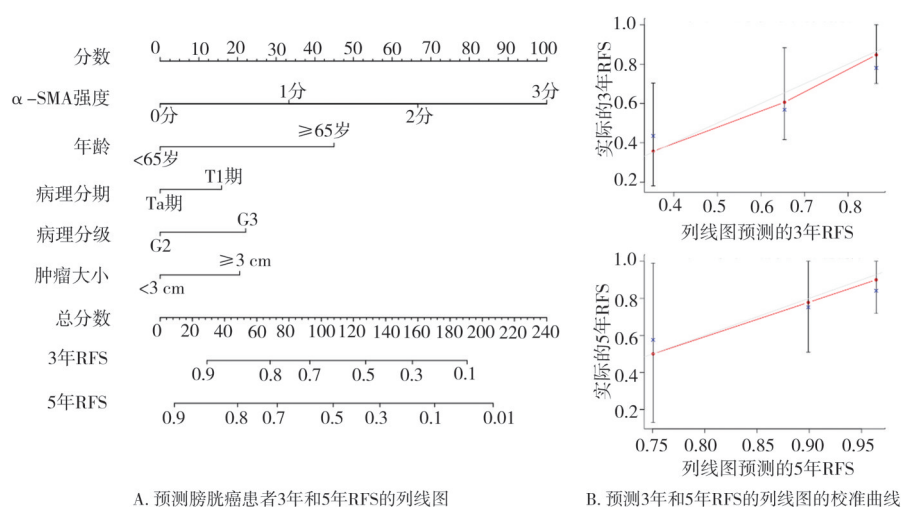


图5 构建列线图预测3年和5年RFS

### 3 讨论

70% 以上的膀胱癌患者属于 NMIBC。尽管 NMIBC 的预后通常较好,5 年生存率在 80% 以上,但仍有相当高比例的患者会经历膀胱内复发。因此复发与否成为了评估膀胱癌患者预后的重要指标。最新的研究报告发现,影响膀胱癌患者术后复发的因素包括了肿瘤数量、肿瘤大小、年龄、吸烟史、病理分级、病理分期、控制营养状况(control of nutritional status, CONUT)得分等<sup>[10-11]</sup>。而基于临床病理特征的欧洲癌症研究与治疗组织(European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC)、欧洲泌尿外科协会(European Association of Urology, EAU)和西班牙肿瘤治疗泌尿外科俱乐部(Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico, CUETO)评分量表也被用于评估 NMIBC 的复发和进展风险<sup>[12]</sup>。然而,不同风险分类的患者的患病率是不相称的,且

膀胱癌是一类异质性非常高的疾病,这使得 NMIBC 复发的风险是受多种因素影响的,仅靠临床参数很难充分评估其生物学特征,缺乏对整体风险的综合评估。因此,有必要进一步挖掘新的分子生物学标志物,综合个体的基因信息、临床特征和生活方式等多种因素进行评估,开发出更为精准的预测模型。

TAFs 是肿瘤微环境中的一种重要细胞类型,已被证实在肿瘤进展和耐药性中起到关键作用。除了  $\alpha$ -SMA, FAP、PDGFR $\beta$ 、S100A4、PDPN 等也被认为是 TAFs 的标志物<sup>[13]</sup>,在多种实体瘤中与患者预后密切相关。在肝内胆管癌中,TAFs 含量丰富的患者的总生存期(overall survival, OS)缩短,累积肝脏复发率提高<sup>[14]</sup>。多变量分析发现, $\alpha$ -SMA 高表达是壶腹癌 RFS 的独立危险因素<sup>[15]</sup>。TAFs 中 PDPN 阳性状态与较短的无病生存期和疾病特异性生存期显著相关<sup>[16]</sup>。有研究表明,TAFs 在 NMIBC 的复发中也发挥了重要作用。在 T1G3 膀胱癌中,肿瘤感兴趣区域(tumor region of interest, TOI)的 FAP 表达在进展

组患者中明显较高,并且FAP是RFS、无进展生存期(progression-free survival,PFS)、癌症特异性生存期(cancer-specific survival,CSS)和OS的预后因子<sup>[17]</sup>。而在本研究中,我们发现肿瘤间质的 $\alpha$ -SMA蛋白表达水平与NMIBC患者的复发密切相关,能可靠地预测3年和5年RFS,且多变量Cox回归分析发现 $\alpha$ -SMA是预测NMIBC术后复发的独立危险因素。这些结果表明,TAFs有可能成为预测NMIBC复发的生物标志物,具有潜在的临床应用价值。此外, $\alpha$ -SMA对于膀胱癌患者预后的预测价值同样不可忽视。基于GEO数据集和TCGA数据库的生存分析显示, $\alpha$ -SMA表达水平较高的膀胱癌患者总生存期缩短<sup>[18-19]</sup>,这与TAFs对膀胱癌恶性生物学行为的调控密切相关。有研究表明,TAFs通过旁分泌IL-6信号诱导膀胱癌细胞上皮-间质转化,促进癌细胞侵袭转移<sup>[20]</sup>。TAFs中异常表达的miR-146a-5p一方面通过增加对转录因子YY1的招募,上调TAFs中的SVEP1;另一方面,miR-146a-5p靶向膀胱癌细胞中ARID1A和PRKAA2的mRNA的3'UTR,引起STAT3和mTOR通路活化,这促进了癌症干性和化疗耐药<sup>[21]</sup>。TAFs衍生的MFAP5通过与NOTCH2受体的直接作用引起NOTCH2/HEY1信号通路的激活,从而刺激了N2ICD的释放,这导致膀胱癌细胞增殖和转移能力增强;而利用中性抗体阻断NOTCH2能够逆转MFAP5诱导的膀胱癌细胞恶性行为<sup>[22]</sup>。正是由于TAFs多层面、多维度的促癌效应,使得 $\alpha$ -SMA高表达的患者复发和进展的风险增加,而靶向干预TAFs可能是延缓膀胱癌进展的一种有潜力的治疗策略。

综上所述,在NMIBC复发风险评估方面,需要更加全面、多元化地考虑评估标准。而TAFs作为NMIBC复发预测生物标志物具有一定的潜在临床应用。然而,本文仅为单中心的小样本研究,未来仍需要进一步扩大样本量和研究范围,以充分评估其作为预测标志物的可靠性和准确性。此外,还需要深入探究TAFs与膀胱癌恶性生物学行为的相关性及具体分子机制,以明确TAFs与NMIBC复发之间的确切关系。

## 参 考 文 献

- [1] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5): 584-590.
- [2] Ieda T, Muto S, Shimizu F, et al. Development and validation of a novel recurrence risk stratification for initial non-muscle invasive bladder cancer in Asia[J]. EBioMedicine, 2016, 12: 98-104.
- [3] Chhabra Y, Weeraratna AT. Fibroblasts in cancer: Unity in heterogeneity[J]. Cell, 2023, 186(8): 1580-1609.
- [4] Rudnick JA, Kuperwasser C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression[J]. Clin Exp Metastasis, 2012, 29(7): 663-72.
- [5] Han C, Liu T, Yin R. Biomarkers for cancer-associated fibroblasts[J]. Biomark Res, 2020, 8(1): 64.
- [6] Dourado MR, Guerra E, Salo T, et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: a systematic review and Meta-analysis[J]. J Oral Pathol Med, 2018, 47(5): 443-453.
- [7] Lee JS, Leem SH, Lee SY, et al. Expression signature of E2F1 and its associated genes predict superficial to invasive progression of bladder tumors[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(16): 2660-2667.
- [8] Sjö Dahl G, Eriksson P, Patschan O, et al. Molecular changes during progression from nonmuscle invasive to advanced urothelial carcinoma[J]. Int J Cancer, 2020, 146(9): 2636-2647.
- [9] Yin H, He W, Li Y, et al. Loss of DUSP2 predicts a poor prognosis in patients with bladder cancer[J]. Hum Pathol, 2019, 85: 152-161.
- [10] Daza J, Grauer R, Chen S, et al. Development of a predictive model for recurrence-free survival in pTa low-grade bladder cancer[J]. Urol Oncol, 2023, 41(5): 256.e9-256.e15.
- [11] Zhao L, Sun J, Wang K, et al. Development of a new recurrence-free survival prediction nomogram for patients with primary non-muscle-invasive bladder cancer based on preoperative controlling nutritional status score[J]. Cancer Manag Res, 2021, 13: 6473-6487.
- [12] Jobczyk M, Stawiski K, Fendler W, et al. Validation of EORTC, CUETO, and EAU risk stratification in prediction of recurrence, progression, and death of patients with initially non-muscle-invasive bladder cancer(NMIBC): a cohort analysis[J]. Cancer Med, 2020, 9(11): 4014-4025.
- [13] 汪玉倩, 徐可, 詹月萍, 等. 肿瘤相关成纤维细胞及其标记物的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(17): 2094-2097.
- [14] Wang YQ, Xu K, Zhan YP, et al. Current status of research on tumor-associated fibroblasts and their markers[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2022, 38(17): 2094-2097.
- [15] Eguchi S, Yamada D, Kobayashi S, et al. Automated analysis for the prevalence of cancer-associated fibroblasts in resected specimens of intrahepatic cholangiocarcinoma is a simple and reliable evaluation system[J]. Ann Surg Oncol, 2023, 30: 5420-5428.
- [16] Takagi K, Noma K, Nagai Y, et al. Impact of cancer-associated fibroblasts on survival of patients with ampullary carcinoma[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1072106.
- [17] Kubouchi Y, Yurugi Y, Wakahara M, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts unfavourable prognosis in patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma[J]. Histopathology, 2018, 72(3): 490-499.
- [18] Muilwijk T, Akand M, Daelemans S, et al. Stromal marker fibroblast activation protein drives outcome in T1 non-muscle invasive bladder cancer[J]. PLoS One, 2021, 16(9): e0257195.
- [19] Hu J, Zhou L, Song Z, et al. The identification of new biomarkers for bladder cancer: a study based on TCGA and GEO datasets[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(9): 15607-15618.
- [20] Li P, Cao J, Li J, et al. Identification of prognostic biomarkers associated with stromal cell infiltration in muscle-invasive bladder cancer by bioinformatics analyses[J]. Cancer Med, 2020, 9(19): 7253-7267.
- [21] Goulet CR, Champagne A, Bernard G, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 137.
- [22] Zhuang J, Shen L, Li M, et al. Cancer-associated fibroblast-derived miR-146a-5p generates a niche that promotes bladder cancer stemness and chemoresistance[J]. Cancer Res, 2023, 83(10): 1611-1627.
- [23] Zhou Z, Cui D, Sun MH, et al. CAFs-derived MFAP5 promotes bladder cancer malignant behavior through NOTCH2/HEY1 signaling[J]. FASEB J, 2020, 34(6): 7970-7988.

(责任编辑:冉明会,曾玲)