

膀胱癌

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003305

LAT1 表达水平与非肌层浸润性膀胱癌患者术后复发风险的相关性研究

陈江川, 张 翀, 罗华铭, 张家模
(重庆医科大学附属永川医院泌尿外科, 重庆 402160)

【摘要】目的:探讨 L 型氨基酸转运蛋白 1 (L-type amino acid transporter 1, LAT) 表达水平与非肌层浸润性膀胱癌患者术后复发风险的相关性。**方法:**选取 2021 年 2 月至 2022 年 2 月于重庆医科大学附属永川医院接受手术治疗的非肌层浸润性膀胱癌患者 108 例作为研究对象, 采用反转录酶聚合酶链反应测定膀胱癌组织 (取自肿瘤所在部位区域) 和癌旁组织 (取自邻近正常区域组织) LAT1 表达含量, 对比膀胱癌组织和癌旁组织 LAT1 表达水平。同时根据膀胱癌组织 LAT1 表达含量的二分位数将所有患者分为高表达组和低表达组, 对比 2 组临床病理参数。随访观察 12 个月观察 2 组术后复发情况, 采用 Kaplan-Meier 曲线分析对比 2 组术后复发风险, 使用多变量 Cox 比例风险回归模型确定术后复发的影响因素。**结果:**膀胱癌组织 LAT1 表达水平 (1.80 ± 0.35) 较配对的癌旁组织 LAT1 表达水平 (1.05 ± 0.17) 高 ($P < 0.05$); LAT1 高表达组吸烟史、临床分期 T_1 占比较高 LAT1 低表达组高 ($P < 0.05$); 108 例膀胱癌患者术后的平均随访时间为 (10.84 ± 1.94) 个月, 其中 33 例复发, 复发率为 30.56%。Kaplan-Meier 曲线显示, LAT1 高表达组患者总体复发率较 LAT1 低表达组高 ($\log\text{-rank } \chi^2 = 4.382, P = 0.036$); 多因素 Cox 回归分析显示, 吸烟史 ($HR = 6.539, 95\%CI = 2.439 \sim 17.531$)、临床分期为 T_1 期 ($HR = 3.658, 95\%CI = 1.808 \sim 7.398$)、LAT1 高表达 ($HR = 3.425, 95\%CI = 1.631 \sim 7.191$) 为非肌层浸润性膀胱癌患者术后复发的危险因素 ($P < 0.05$)。**结论:** LAT1 在膀胱癌组织中表达水平高, 高 LAT1 表达水平可能与膀胱癌患者术后复发风险增加有关。

【关键词】非肌层浸润性膀胱癌; L 型氨基酸转运蛋白 1; 复发; 相关性**【中图分类号】**R694**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-04-15

Correlation between LAT1 expression level and risk of postoperative relapse in patients with non-muscle invasive bladder cancer

Chen Jiangchuan, Zhang Xuan, Luo Huaming, Zhang Jiamo

(Department of Urology, Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the correlation between the expression level of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and the risk of postoperative relapse in patients with non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). **Methods:** A total of 108 patients with NMIBC who received surgical treatment in Yongchuan Hospital Affiliated to Chongqing Medical University from February 2021 to February 2022 were selected as subjects. LAT1 expression levels in the bladder cancer tissue (from the sites where tumor was identified) and paracancerous tissue (from adjacent normal areas) were measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction, and the expression levels of LAT1 in the two types of tissue were compared. Meanwhile, all patients were divided into high expression group and low expression group according to the second quantile of LAT1 expression in the bladder cancer tissue, and the clinicopathological parameters of the two groups were compared. The two groups were observed and followed up for 12 months for postoperative relapse. The Kaplan-Meier curve was used to analyze and compare the risk of postoperative relapse between the two groups. The multivariate Cox proportional hazards regression model was used to determine the influencing factors for postoperative relapse. **Results:** The LAT1 expression level in the bladder cancer tissue (1.80 ± 0.35) was significantly higher than that in the paired paracancerous tissue (1.05 ± 0.17) ($P < 0.05$). The proportion of patients with a smoking history and clinical stage T_1 was significantly higher in the high LAT1 expression group than in the low LAT1 expression group ($P < 0.05$). The mean follow-up time of 108 patients with bladder tumor was (10.84 ± 1.94) months. Among these patients, 33 had a relapse, with a relapse rate of 30.56%. The Kaplan-Meier curve showed that the overall relapse rate was significantly higher in patients with high LAT1 expression than in those with low LAT1 expression ($\log\text{-rank } \chi^2 = 4.382, P = 0.036$); the multivariate Cox regression analysis showed that smoking history [hazard ratio (HR) = 6.539, 95%CI = 2.439-17.531], clinical stage T_1 ($HR = 3.658, 95\%CI = 1.808 \sim 7.398$),

作者介绍: 陈江川, Email: vikey_stefanie@sina.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤及微创手术。

通信作者: 张家模, Email: zhangjiamo168@163.com。

基金项目: 重庆市科卫联合资助项目 (编号: 2022MSXM108); 重庆市

永川区自然科学基金资助项目 (编号: 2022yc-jckx20054)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20230814.0904.002>

(2023-08-14)

and high LAT1 expression ($HR=3.425$, $95\%CI=1.631-7.191$) were risk factors for postoperative relapse of patients with NMIBC ($P<0.05$). **Conclusion:** The LAT1 expression level is high in the bladder cancer tissue, and high LAT1 expression levels may be correlated with an increased risk of postoperative relapse in patients with bladder cancer.

[Key words] non-muscle invasive bladder cancer; L-type amino acid transporter 1; relapse; correlation

膀胱癌是威胁人们泌尿生殖系统恶性肿瘤,该病可发生于任何年龄,且发病率随年龄增长而增加。手术是治疗该疾病的首选有效手段,术后 5 年生存率为 60%。但临床工作中术后复发率较高,可达 50%~70%,严重危及患者生命^[1]。目前尚无有效的膀胱癌诊断标志物,尿细胞学检查是一种非侵入性检查,但其敏感性仍然较低。膀胱镜检查是一种基本的诊断工具,侵入性相对较大^[2]。因此,探寻能预测膀胱癌复发的候选生物标志物具有重要意义。细胞需要大量的营养供应才能生长和繁殖,尤其是在失去正常生殖功能的癌细胞中。与邻近的正常部位相比,肿瘤组织中必需氨基酸的摄取有所增加,其中包括 L 型氨基酸转运蛋白 (L-type amino acid transporter 1, LAT) 家族在内的氨基酸。LAT 由 4 个 Na⁺ 非依赖性中性氨基酸转运蛋白组成,是必需氨基酸进入细胞的重要途径^[3]。LAT1 (基因名 *SLC7A5*) 由 12 个跨膜结构域组成,主要负责大支链和芳香族中性氨基酸流入细胞^[4]。已在多种癌症中发现 LAT1 过度表达, LAT1 蛋白的高表达与管腔 B 型乳腺癌的不良预后相关,且参与 Luminal 型乳腺癌细胞对多西紫杉醇的化疗耐药^[5]。在小细胞肺癌细胞中,通过短干扰 RNA 敲低 LAT1 通过诱导 G₁ 细胞周期停滞来抑制细胞增殖, LAT1 的表达升高与非小细胞肺癌患者的总生存期较差有关^[6]。基于上述发现,本研究假设 LAT1 可能是一种膀胱癌患者术后复发风险的有效生物标志物,因此,对 LAT1 表达水平与膀胱癌患者术后复发风险间的关联展开探究。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 2 月至 2022 年 2 月重庆医科大学附属永川医院行经尿道膀胱肿瘤电切术 (transurethral resection of bladder tumor, TURBT) 治疗的膀胱癌患者 108 例作为研究对象,纳入标准:①术前检查符合膀胱癌诊断标准^[7];②术后病理诊断为非肌层浸润性膀胱癌;③年龄 40~70 岁。排除标准:①临床资料不全;②术前接受放化疗;③初诊时已发生远处转移者。收集纳入标准的膀胱癌组织标本和配对的邻近

正常膀胱组织标本,应用实时定量聚合酶链反应技术检测膀胱癌组织标本或癌旁组织标本中 LAT1 表达水平,根据 LAT1 表达含量的二分位数分为高表达组和低表达组。本研究通过重庆医科大学附属永川医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 一般资料收集 记录患者年龄、性别、基础疾病 (高血压、糖尿病)、吸烟史、组织分级 (低级别、高级别)、肿瘤直径、肿瘤数目、临床分期 (T_a 、 T_1)。

1.2.2 LAT1 表达水平检测 取膀胱癌组织和配对的癌旁组织标本储存于液氮中,并采用美国加利福尼亚州卡尔斯巴德 Invitgen 公司生产的 TRIzol 试剂在提出总 RNA 后测定 RNA 含量和纯度,经反转录得到 cDNA。将 cDNA 产物掺入 PCR 反应系统中进行扩增。PCR 的扩增条件: (总反应体系为 10 μ L): 1 μ L cDNA, 正引物: 0.5 μ g, 反引物: 0.5 μ g; 1 μ L ROXII (10 \times), 2 μ L H₂O, 5 μ L Taq PCR Master Mix (2 \times), 混匀。反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 循环 40 次, 末次循环结束后测定熔解曲线, LAT1 正向引物: 5'-CAGGAGGCAGTGGACATCGTA-3'; 反向引物: 5'-CAGAGCAGGAGGTTGGAACAGA-3'。U6 正向引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'; 反向引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTCTCAT-3', 循环反应结束后, 软件自动生成荧光反应结果曲线以及独立标本在反应体系中的扩增效率及 CT 值。将所得数据 (CT 值) 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理, 得出 LAT1 目的基因相对管家基因的相对表达量。

1.3 术后复发评估

术后采用电话、门诊随访形式观察 12 个月, 每 3 个月复查膀胱镜及增强 CT, 随访的终点事件定义为通过膀胱镜检查或 CT 确诊肿瘤复发, 均以月为单位进行计算。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件分析。无序二分类资料或多分类资料均采用卡方检验, 连续变量均符合正态分布以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验; 用 Kaplan-Meier 方法绘制生存曲线, 并通过 log-rank 检验分析高 LAT1 表达组和低 LAT1 表达组复发率的差异。使用多变量 Cox 比例风险回归模型来确定复发的影响因素。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 膀胱癌组织与配对的癌旁组织中 LAT1 表达水平对比

膀胱癌组织 LAT1 表达水平 (1.80 ± 0.35) 较配对的癌旁组织 LAT1 表达水平 (1.05 ± 0.17) 高 ($t=14.164$, $P<0.05$)。

2.2 高 LAT1 表达组和低 LAT1 表达组临床特征对比

LAT1 高表达组吸烟史、临床分期 T_1 占比较 LAT1 低表达

组高 ($P<0.05$), 其余资料对比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

表 1 高 LAT1 表达组和低 LAT1 表达组临床特征对比 ($\bar{x} \pm s; n, \%$)

项目	LAT1 高表达组 ($n=54$)	LAT1 低表达组 ($n=54$)	t/χ^2 值	P 值
年龄/岁	52.67 \pm 5.95	52.17 \pm 6.60	0.413	0.680
男/女	34/20	37/17	0.370	0.543
基础疾病				
高血压	8(14.81)	7(12.96)	0.077	0.781
糖尿病	8(14.81)	7(12.96)	0.077	0.781
吸烟史	39(72.22)	28(51.85)	4.757	0.029
肿瘤直径/cm	4.42 \pm 1.04	4.14 \pm 0.96	1.454	0.149
临床分期			3.896	0.048
T _a	28(48.18)	38(70.74)		
T ₁	26(51.85)	16(29.63)		
组织分级			0.047	0.828
低级别	39(72.22)	40(74.07)		
高级别	15(27.78)	14(25.93)		
肿瘤数目			0.055	0.814
单发	43(79.63)	42(77.78)		
多发	11(20.37)	12(22.22)		

2.3 高 LAT1 表达组和低 LAT1 表达组术后复发风险对比

108 例膀胱肿瘤患者术后的平均随访时间为 (10.84 \pm 1.94) 个月, 其中 33 例复发, 复发率为 30.56%。Kaplan-Meier 曲线显示, LAT1 高表达组患者总体膀胱癌复发率较 LAT1 低表达组高 (\log -rank $\chi^2=4.382, P=0.036$), 如图 1 所示。

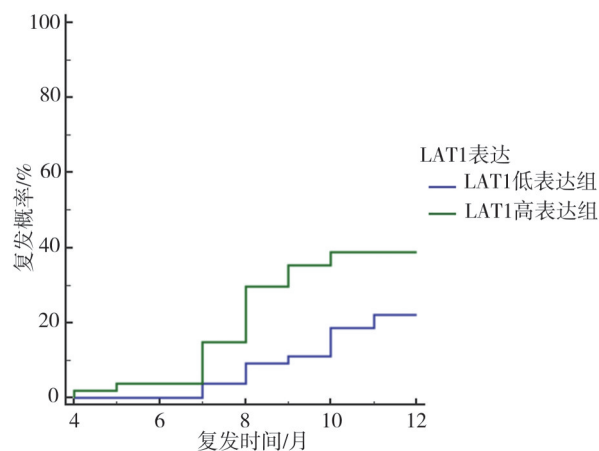


图 1 高 LAT1 表达组和低 LAT1 表达组术后复发风险 Kaplan-Meier 曲线

2.4 膀胱癌患者术后复发风险的单因素和多因素 Cox 回归分析

将术后复发情况作为因变量 (1=复发, 0=未复发), 多因素 Cox 回归分析显示: 吸烟史 ($HR=6.539, 95\%CI=2.439\sim 17.531$)、临床分期为 T₁ 期 ($HR=3.658, 95\%CI=1.808\sim 7.398$)、LAT1 高表达 ($HR=3.425, 95\%CI=1.631\sim 7.191$) 为膀胱癌患者术后复发的危险因素 (均 $P<0.05$), 见表 2~4。

表 2 膀胱癌患者术后复发风险 Cox 回归分析赋值表

相关因素	变量	赋值
年龄	X_1	实测值
男/女	X_2	1=男, 0=女
高血压	X_3	1=是, 0=否
糖尿病	X_4	1=是, 0=否
吸烟史	X_5	1=是, 0=否
肿瘤直径	X_6	实测值
临床分期	X_7	1=T ₁ , 0=T _a
组织分级	X_8	1=高级别, 0=低级别
肿瘤数目	X_9	1=多发, 0=单发
LAT1 表达	X_{10}	1=高表达, 0=低表达

表 3 膀胱癌患者术后复发风险单因素 Cox 回归分析

变量	β	SE	Wald χ^2	P	HR	95%CI
年龄	-0.015	0.280	0.289	0.591	0.985	0.933~1.040
男/女	-0.497	0.350	2.017	0.156	0.608	0.307~1.208
高血压	0.523	0.426	1.506	0.220	1.687	0.732~3.887
糖尿病	0.416	0.452	0.849	0.357	1.516	0.626~3.673
吸烟史	1.412	0.486	8.439	0.004	4.103	1.583~10.636
肿瘤直径	-0.006	0.175	0.001	0.972	0.994	0.705~1.400
临床分期	1.019	0.349	8.525	0.004	2.770	1.398~5.488
组织分级	0.047	0.379	0.015	0.902	1.048	0.499~2.201
肿瘤数目	0.175	0.451	0.150	0.698	1.191	0.492~2.885
LAT1 表达	0.717	0.362	3.920	0.048	2.049	1.007~4.169

表 4 膀胱癌患者术后复发风险的多因素 Cox 回归分析

变量	β	SE	Wald χ^2	P	HR	95%CI
吸烟史	1.878	0.503	13.927	<0.001	6.539	2.439~17.531
临床分期	1.297	0.349	13.020	<0.001	3.658	1.808~7.398
LAT1 表达	1.231	0.362	10.578	0.001	3.425	1.631~7.191

3 讨论

非肌层浸润膀胱癌的发生发展与染色体异常、基因多态性、表观遗传学改变等分子学机制关系密切。从分子角度上看, 癌症的进展与癌细胞摄取氨基酸的增加有关, 通过特定的转运蛋白进入细胞后, 外源氨基酸可合成蛋白质、核酸和脂质并产生 ATP^[8]。必需氨基酸亮氨酸对于维持与癌症相关的信号通路也十分重要, 通过上调氨基酸转运蛋白, 癌细胞获得更多外源氨基酸以支持慢性增殖、维持代谢途径并增强某些信号转导途径^[9]。LAT1 介导必需氨基酸的摄取, 其表达在多种癌症的进展过程中上调, 该水平过度表达与多种癌症不良结局相关, 提示 LAT1 可能是肿瘤的重要病理预测因子。

LAT1 能提供癌细胞中蛋白质合成所需的必需氨基酸, 并通过刺激 mTOR 信号通路促进癌细胞生

长。在前列腺癌^[10]、肝细胞癌^[11]、卵巢癌^[12]等多种癌症中高表达,高 LAT1 表达已被确定为预后不良的独立标志物。1 项系统回顾和荟萃分析评估 LAT1 在实体癌中的预后价值,高 LAT1 水平与患者较差的总生存期、无病生存期和无进展生存期相关,该荟萃分析揭示了 LAT1 蛋白表达在各种实体癌患者中的可靠性和潜在预后价值^[13]。Maimaiti M 等^[14]报道 LAT1 表达是接受根治性膀胱切除术的膀胱癌患者总生存期的独立预测因子。本研究结果显示,膀胱癌组织 LAT1 表达水平显著高于配对的癌旁组织,说明在膀胱癌中 LAT1 呈高表达状态。

欧洲癌症研究与治疗组织 (European Organization for Research on Treatment of Cancer, EORTC) 风险评分是预测膀胱癌患者短期及长期复发和进展概率的使用最广泛的模型^[15],值得注意的是该风险评分系统未考虑个体肿瘤的生物学背景,要预测个体患者的临床结果,需要一种有效的分子标记。研究人员已尝试使用分子标记 Ki-67^[16]、FGFR3 突变^[17]、p53^[18]等预测膀胱癌患者术后复发,但这些分子标志物显示出异质性结果,并且没有充分验证可用于临床实践。Sawazaki H 等^[19]在 EORTC 基础上增加 LAT1 建立新的模型,结果发现新建立的 LAT1 综合风险模型提高了原有 EORTC 模型评估复发风险的判别性能,提示 LAT1 表达与膀胱癌术后复发有关。本研究随访观察发现, LAT1 高表达组患者总体复发率较 LAT1 低表达组高,提示高 LAT1 表达与膀胱癌术后复发风险有关。其中可能与 LAT1 氨基酸转运、整合素信号、促进肿瘤生长和转移等功能关系密切有关,这些结果提示 LAT1 是一个潜在的术后复发标志物。

综上所述, LAT1 在膀胱癌组织中表达水平高,高 LAT1 表达水平可能与膀胱癌患者术后复发风险增加有关。靶向 LAT1 刺激不同 LAT 转运蛋白 (LAT2、LAT3 或 LAT4) 或不同转运蛋白系统 (SNAT 氨基酸转运蛋白) 的代偿性上调的可能性在膀胱癌中也值得调查。本研究因各种因素的限制,仅对 LAT1 展开探究,后续将弥补这一不足深入研究。

参 考 文 献

- [1] Dobruch J, Oszczudłowski M. Bladder cancer: current challenges and future directions[J]. *Medicina*, 2021, 57(8): 749–759.
- [2] Ng K, Stenzl A, Sharma A, et al. Urinary biomarkers in bladder cancer: a review of the current landscape and future directions[J]. *Urol Oncol*, 2021, 39(1): 41–51.
- [3] Stepka P, Vsiansky V, Raudenska M, et al. Metabolic and amino acid alterations of the tumor microenvironment[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(7): 1270–1289.
- [4] Häfliger P, Charles RP. The L-type amino acid transporter LAT1—an emerging target in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(10): 2428–2442.
- [5] Kurozumi S, Kaira K, Matsumoto H, et al. Association of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) with the immune system and prognosis in invasive breast cancer[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 2742–2757.
- [6] Rajasinghe LD, Hutchings M, Gupta SV. Delta-tocotrienol modulates glutamine dependence by inhibiting ASCT2 and LAT1 transporters in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells: a metabolomic approach[J]. *Metabolites*, 2019, 9(3): 50–71.
- [7] 中国非肌层浸润性膀胱癌治疗与监测循证临床实践指南 (2018 年标准版)[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2019, 24(7): 516–542.
- [8] Evidence-based clinical practice guidelines for the treatment and monitoring of non-muscular invasive bladder cancer in China (2018 standard edition)[J]. *J Mod Urol*, 2019, 24(7): 516–542.
- [9] Fattahi MJ, Haghshenas MR, Ghaderi A. Immunometabolism in the bladder cancer microenvironment[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2022, 22(12): 1201–1216.
- [10] Sivanand S, Vander Heiden MG. Emerging roles for branched-chain amino acid metabolism in cancer[J]. *Cancer Cell*, 2020, 37(2): 147–156.
- [11] Martinez RS, Salji MJ, Rushworth L, et al. SLFN5 regulates LAT1-mediated mTOR activation in castration-resistant prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2021, 81(13): 3664–3678.
- [12] Park Y, Han Y, Kim D, et al. Impact of exogenous treatment with histidine on hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancers*, 2022, 14(5): 1205.
- [13] Sato K, Miyamoto M, Takano M, et al. Significant relationship between the LAT1 expression pattern and chemoresistance in ovarian clear cell carcinoma[J]. *Virchows Arch*, 2019, 474(6): 701–710.
- [14] Lu JJ, Li P, Yang Y, et al. Prognostic value of LAT-1 status in solid cancer: a systematic review and Meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233629.
- [15] Maimaiti M, Sakamoto S, Yamada Y, et al. Expression of L-type amino acid transporter 1 as a molecular target for prognostic and therapeutic indicators in bladder carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1292–1306.
- [16] Park J, Shin DW, Kim TH, et al. Development and validation of the Korean version of the European organization for research and treatment of cancer quality of life questionnaire for patients with non-muscle invasive bladder cancer: EORTC QLQ-NMIBC24[J]. *Cancer Res Treat*, 2018, 50(1): 40–49.
- [17] Mitin T, Choudhury A. The role of biomarkers in bladder preservation management of muscle-invasive bladder cancer[J]. *World J Urol*, 2019, 37(9): 1767–1772.
- [18] Scholtes MP, Alberts AR, Ifflé IG, et al. Biomarker-oriented therapy in bladder and renal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2832–2850.
- [19] Lindskog SV, Prip F, Lamy P, et al. An integrated multi-omics analysis identifies prognostic molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder cancer[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2301–2319.
- [19] Sawazaki H, Arai Y, Ito Y, et al. Expression of L-type amino acid transporter 1 is a predictive biomarker of intravesical recurrence in patients with non-muscle invasive bladder cancer[J]. *Res Rep Urol*, 2021, 13: 603–611.

(责任编辑:冉明会,曾 玲)