

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.08.005
文章编号: 1005-8982 (2018) 08-0023-07

ZNF267 在膀胱癌中的表达及其对 细胞增殖和转移的影响

曹正, 邱明星

(西南医科大学, 四川 泸州 646000)

摘要: 目的 研究锌指蛋白 267 (ZNF267) 在膀胱移行细胞癌 (TCC) 组织及细胞中的表达, 及其对 TCC 细胞增殖、凋亡、周期、转移及侵袭的影响。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应检测 TCC 组织及细胞中 ZNF267 的表达, 并利用 siRNA 沉默 TCC 中 ZNF267 的表达。采用 CCK-8 法检测 ZNF267 对 TCC 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测 ZNF267 对 TCC 细胞凋亡及周期的影响, Transwell 实验检测 ZNF267 对 TCC 细胞转移和侵袭的影响。**结果** TCC 组织和细胞中 ZNF267 的表达水平高于癌旁组织和膀胱上皮永生细胞系。沉默 TCC 细胞中 ZNF267 的表达后, 细胞的增殖能力受抑制, 而凋亡能力增强。此外, 与 ZNF267-NC 组细胞相比, 转染 ZNF267 siRNA 的 TCC 细胞周期被阻滞于 G₁ 期, 细胞转移和侵袭能力受抑制。**结论** ZNF267 在 TCC 中表达上调, 并可促进 TCC 细胞的增殖和转移。

关键词: 锌指蛋白 267; 膀胱移行细胞癌; 增殖; 转移;

中图分类号: R605

文献标识码: A

Expression of ZNF267 in bladder cancer and its effect on proliferation and migration of TCC cells

Zheng Cao, Ming-xing Qiu

(Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of zinc finger 267 (ZNF267) in transitional cell carcinoma (TCC), and its effect on proliferation, apoptosis, cell cycle, migration and invasion of TCC cells. **Methods** qRT-PCR was performed to detect the expression of ZNF267 in tissues and cells of TCC. ZNF267 expression of TCC cells was silenced by siRNA. After silencing the expression of ZNF267 in TCC cells, the cell proliferation was detected by CCK-8, cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. Furthermore, the effect of ZNF267 on cell migration and cell invasion was detected by Transwell assay. **Results** The expression of ZNF267 was up-regulated in the TCC tissues and cells compared with the adjacent tissues and immortalized human bladder urothelial cells. Compared with the ZNF267-normal TCC cells, the proliferation of the TCC cells transfected with ZNF267 siRNA was significantly inhibited, but the cell apoptosis ability was significantly promoted. Furthermore, the cell cycle of the TCC cells transfected with ZNF267 siRNA was arrest at G₁ stage, the cell migration and invasion were decreased in the TCC cells transfected with ZNF267 siRNA. **Conclusions** ZNF267 is significantly upregulated in TCC tissues and cells, and could promote the proliferation and migration of TCC cells.

Keywords: zinc finger 267; TCC; proliferation; migration

在中国膀胱癌发病率居泌尿生殖系统恶性肿瘤的首位^[1-2]。膀胱移行细胞癌 (transitional cell

carcinoma, TCC) 是膀胱癌最常见的类型, 部分患者将发展为肌层侵袭性膀胱癌^[1-2]。化疗可有效控制部

收稿日期: 2016-10-25

[通信作者] 邱明星, E-mail: 1303624874@qq.com; Tel: 18981838153

分肌层侵袭性膀胱癌,但无法提高大部分患者的生存期^[3]。因此,阐明膀胱癌发生、发展的分子机制显得尤为重要。Kruppel 样因子家族分子可调控多项生理进程^[4]。锌指蛋白 267 (zinc finger protein 267, ZNF267) 是 Kruppel 锌指家族成员,研究显示 ZNF267 在多种肿瘤中发挥重要作用^[5-6]。然而,尚无研究阐明 ZNF267 在膀胱癌中的表达及其功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1640 培养基 (美国 HyClone 公司),青霉素-链霉素双抗 (美国 HyClone 公司),胎牛血清 (美国 Gibco 公司)。逆转录及 RNA 提取试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 所应用的 Real Master 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, FITC 标记的 Annexin-V 及 PI 抗体 (美国 Biolegend 公司), Tranwell 小室 (美国 Milipore 公司), 人膀胱癌细胞系 T24、BIU87 及人膀胱上皮永生生化细胞系 SV-HUC-1 (中国科学院上海细胞库)。

1.2 主要仪器

液氮罐、细胞培养箱购自美国 Thermo 公司, ABI 7900 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司), BD FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 组织标本 14 例 TCC 组织及配对癌旁组织标本来自西南医科大学附属医院泌尿外科。14 例患者在根治性切除术后经病理诊断为 TCC。所有入组患者同意本研究使用其组织标本,并签署知情同意书及授权书。本研究经西南医科大学附属医院伦理委员会批准。标本收集后,储存于液氮罐中。

1.3.2 细胞培养 人膀胱癌细胞系 T24、BIU87, 以及人膀胱上皮永生生化细胞系 SV-HUC-1 用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 1640 培养基,所有细胞置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱中。

1.3.3 RNA 提取 Trizol 裂解人 TCC 组织或细胞系, 4℃、12 000 r/min 离心 15 min, 吸取水相层, 加入等体积的异丙醇。4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 所得胶状沉淀即为 RNA。

1.3.4 qRT-PCR 采用 qRT-PCR 反应检测 TCC 组织和细胞系中 ZNF267 的相对表达量, 以及 ZNF267

在 TCC 细胞中的干涉效率。将 RNA 逆转录为 cDNA 作为模板。将 125 μl 20xSYBR 溶液加入 1.0 ml 2.5x Real Master Mix 中, 所得溶液作为试剂 A。实验采用 20 μl 体系, 内含 9 μl 试剂 A, 1 μl 20x ROX Reference Dye, 1 μl 正向引物, 1 μl 反向引物, cDNA 模板 2 μl, 6 μl 去离子水。qRT-PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 20 s, 60℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环。ZNF267 正向引物: 5' -ATGGGAGCTGTGATCTTGAGA, 反向引物: 5' -GCAATGATGAATGAGTAAAGACC; β-actin 正向引物: 5' -CTCCATCTGGCCTCGCTGT-3', 反向引物: 5' -GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'。ZNF267 相对表达量: $2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{Ct_{ZNF267} - Ct_{\beta-actin}}$

1.3.5 CCK-8 法 采用 CCK-8 增殖试剂盒检测转染 ZNF267-NC 和 ZNF267 siRNA 的 TCC 细胞增殖情况。取对数生长期的人 TCC 细胞, 制备单细胞悬液, 以 2.0×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 每组实验设 8 个复孔, 分别培养 1 ~ 5 d, 加入 10 μl/孔的 CCK-8 试剂, 培养 4 h 后, 在 450 nm 波长处测定吸光度值, 所得数据作为第 1 天的 OD 值。而后每天在同一时间再次测定吸光度值, 根据 5 d 内各组所测 OD 值, 绘制细胞增殖曲线。

1.3.6 流式细胞术 采用流式细胞术检测转染 ZNF267-NC 和 ZNF267 siRNA 的 TCC 细胞周期情况。取对数生长期的人 TCC 细胞, 制备为单细胞悬液。10 ml PBS, 1 000 r/min 离心 10 min, 反复洗涤 3 次, 弃上清; 若检测细胞周期, 则在各组细胞中加入 100 μl 流式洗液和 50 μg/ml PI 5 μl, 或同型对照抗体, 避光反应 15 min。采用尼龙膜过滤细胞, 除去细胞团块后, 立即用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测。若检测细胞凋亡, 则在清洗细胞后加入 FITC 标记的 20 μg/ml Annexin-V 10 μl 和 50 μg/ml PI 5 μl, 或 Annexin-V 及 PI 的同型对照抗体, 避光反应 15 min。采用尼龙膜过滤细胞, 除去细胞团块后, 立即利用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测。

1.3.7 细胞转移及侵袭实验 ①细胞转移实验: 采用 Transwell 实验检测转染 ZNF267-NC 和 ZNF267 siRNA 的 TCC 细胞转移能力。Transwell 小室内加入 100 μl 密度为 1×10^5 个/ml 的无血清肿瘤细胞悬液, 下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基。24 h 后甲醇固定, 结晶紫染色, 切下 Transwell 膜, 封

片。②细胞侵袭实验: 采用 Transwell 实验检测转染 ZNF267-NC 和 ZNF267 siRNA 的 TCC 细胞侵袭能力。Transwell 小室预先铺基质胶, 其余步骤同细胞转移实验。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用方差分析或 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF267 在人 TCC 组织及细胞系中的表达

2.1.1 TCC 组织 14 例 TCC 组织中 ZNF267 mRNA 的相对表达量为 (3.743 ± 1.513) , 14 例癌旁组织为 (1.107 ± 0.539) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 2.947, P = 0.036$), TCC 组织中 ZNF267 mRNA 的表达水平高于癌旁组织。见图 1。

2.1.2 细胞系 ZNF267 mRNA 在人膀胱上皮永生生化细胞 SV-HUC-1 中的相对表达水平为 (1.000 ± 0.050) , 在人 TCC 细胞系 T24 和 BIU-87 细胞中分别为 (2.327 ± 0.044) 和 (3.146 ± 0.036) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 3.895, P = 0.027$)。人 TCC 细胞系中 ZNF267 的表达水平高于人膀胱上皮永生生化细胞。见图 2。

2.2 ZNF267 siRNA 在 TCC 细胞中的沉默效率

2.2.1 T24 细胞 人膀胱癌细胞系 T24 中 ZNF267-NC 组的 ZNF267 mRNA 相对表达水平为 (1.000 ± 0.05) , ZNF267 siRNA 组为 (0.384 ± 0.061) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.176, P = 0.032$), ZNF267-NC 组高于 ZNF267 siRNA 组。见图 3A。

2.2.2 BIU87 细胞 人膀胱癌细胞系 BIU87 中 ZNF267-NC 组的 ZNF267 mRNA 相对表达水平为 (1.000 ± 0.05) , ZNF267 siRNA 组为 (0.417 ± 0.031) ,

经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 3.175, P = 0.038$), ZNF267-NC 组高于 ZNF267 siRNA 组。见图 3B。

2.3 ZNF267 对 TCC 细胞增殖的影响

2.3.1 T24 细胞 转染 ZNF267-NC 和 ZNF267 siRNA 后第 3 天起, T24 细胞中 ZNF267 siRNA 组的 OD 值为 (0.517 ± 0.061) , ZNF267-NC 组为 (0.982 ± 0.067) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 3.518, P = 0.031$), ZNF267 siRNA 组低于 ZNF267-NC 组。见图 4A。

2.3.2 BIU87 细胞 转染 ZNF267-NC 和 ZNF267 siRNA 后 3 天起, BIU87 细胞中 ZNF267 siRNA 组的 OD 值为 (0.841 ± 0.053) , ZNF267-NC 组为 (1.176 ± 0.071) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 3.107, P = 0.036$), ZNF267 siRNA 组低于 ZNF267-NC 组。见图 4B。

2.4 ZNF267 对 TCC 细胞凋亡的影响

2.4.1 T24 细胞 ZNF267-NC 组的 T24 细胞凋亡率为 $(1.713 \pm 0.232)\%$, ZNF267 siRNA 组为 $(8.153 \pm 2.348)\%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.416, P = 0.021$), ZNF267-NC 组低于 ZNF267 siRNA 组。见图 5A。

2.4.2 BIU87 细胞 ZNF267-NC 组的 BIU87 细胞凋亡率为 $(0.913 \pm 0.481)\%$, ZNF267 siRNA 组为 $(11.329 \pm 3.591)\%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 6.461, P = 0.016$), ZNF267-NC 组低于 ZNF267 siRNA 组。见图 5B。

2.5 ZNF267 对 TCC 细胞周期的影响

2.5.1 T24 细胞 转染 ZNF267-NC 的 T24 细胞 G_1

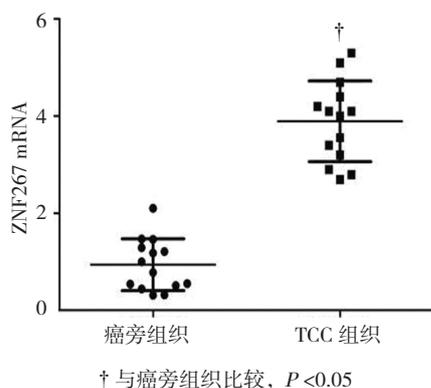


图 1 ZNF267 在人 TCC 组织中的表达

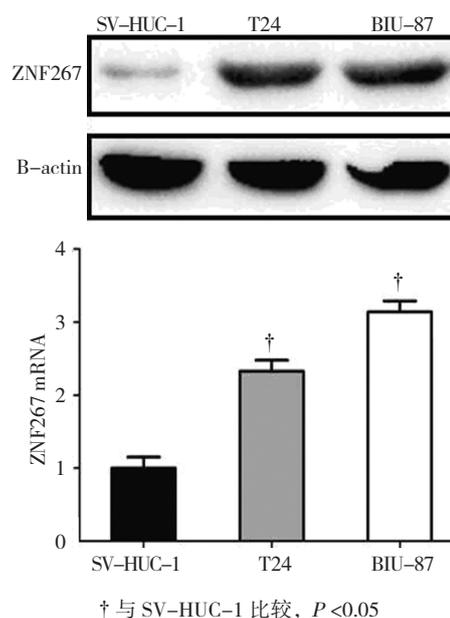
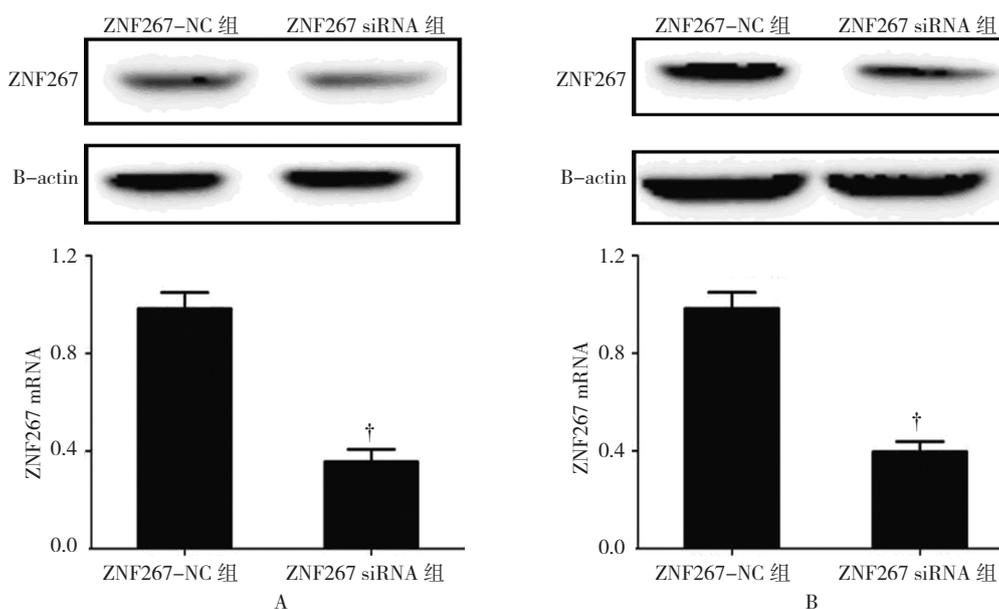
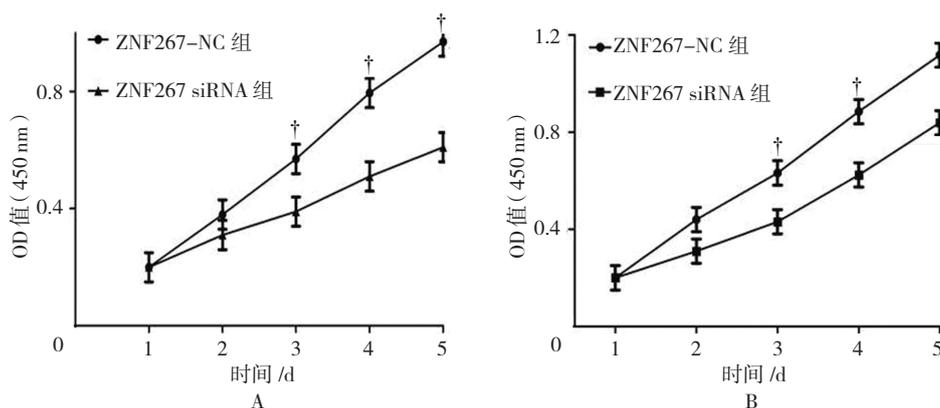


图 2 ZNF267 在人 TCC 细胞系中的表达



A: T24 细胞; B: BIU87 细胞。† 与 ZNF267-NC 组比较, $P < 0.05$

图 3 ZNF267 siRNA 在 TCC 细胞中的沉默效率



A: T24 细胞; B: BIU87 细胞。† 与 ZNF267 siRNA 组比较, $P < 0.05$

图 4 ZNF267 对 TCC 细胞增殖的影响

期细胞百分比为 $(41.164 \pm 3.247)\%$, 转染 ZNF267 siRNA 为 $(56.838 \pm 3.546)\%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 5.147$, $P = 0.027$), ZNF267 siRNA 组细胞周期与 ZNF267-NC 组比较, 阻滞于 G_1 期, 细胞增殖受抑制。见图 6A。

2.5.2 BIU87 细胞 转染 ZNF267-NC 的 BIU-87 细胞 G_1 期细胞百分比为 $(47.363 \pm 3.254)\%$, 转染 ZNF267 siRNA 为 $(62.663 \pm 2.581)\%$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.149$, $P = 0.031$), ZNF267 siRNA 组细胞周期与 ZNF267-NC 组比较, 阻滞于 G_1 期, 细胞增殖受抑制。见图 6B。

2.6 ZNF267 对 TCC 细胞转移能力的影响

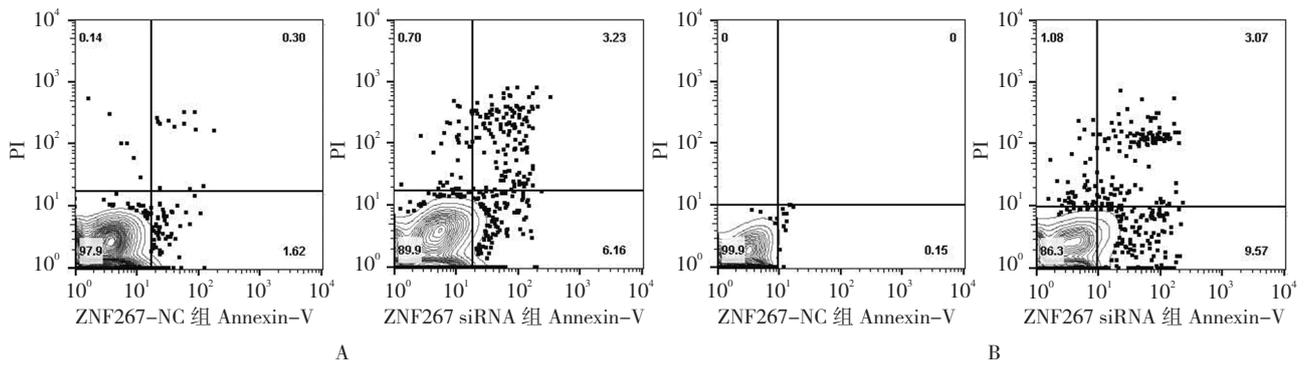
2.6.1 T24 细胞 ZNF267-NC 组的 T24 细胞转移

细胞增加 (1.000 ± 0.032) 倍, ZNF267 siRNA 组为 (0.353 ± 0.083) 倍, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 4.775$, $P = 0.034$), ZNF267-NC 组高于 ZNF267 siRNA 组。见图 7A。

2.6.2 BIU87 细胞 ZNF267-NC 组的 BIU87 细胞转移细胞增加 (1.000 ± 0.028) 倍, ZNF267 siRNA 组为 (0.215 ± 0.035) 倍, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 6.648$, $P = 0.018$), ZNF267-NC 组高于 ZNF267 siRNA 组。见图 7B、C。

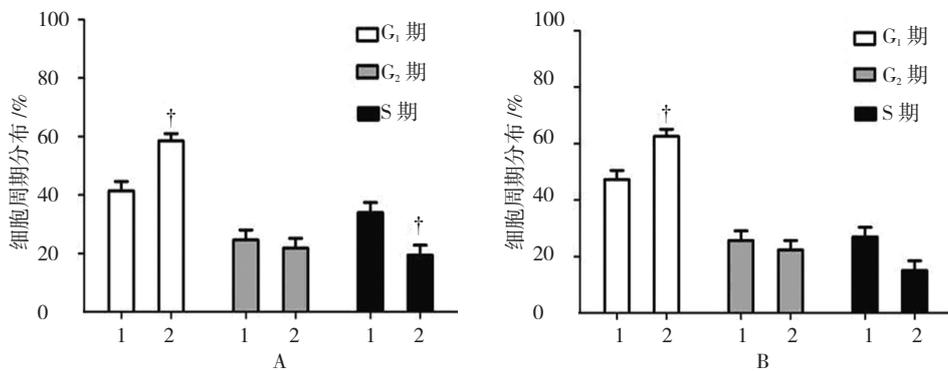
2.7 ZNF267 对 TCC 细胞侵袭能力的影响

2.7.1 T24 细胞 ZNF267-NC 组的 T24 细胞侵袭细胞增加 (1.000 ± 0.044) 倍, ZNF267 siRNA 组



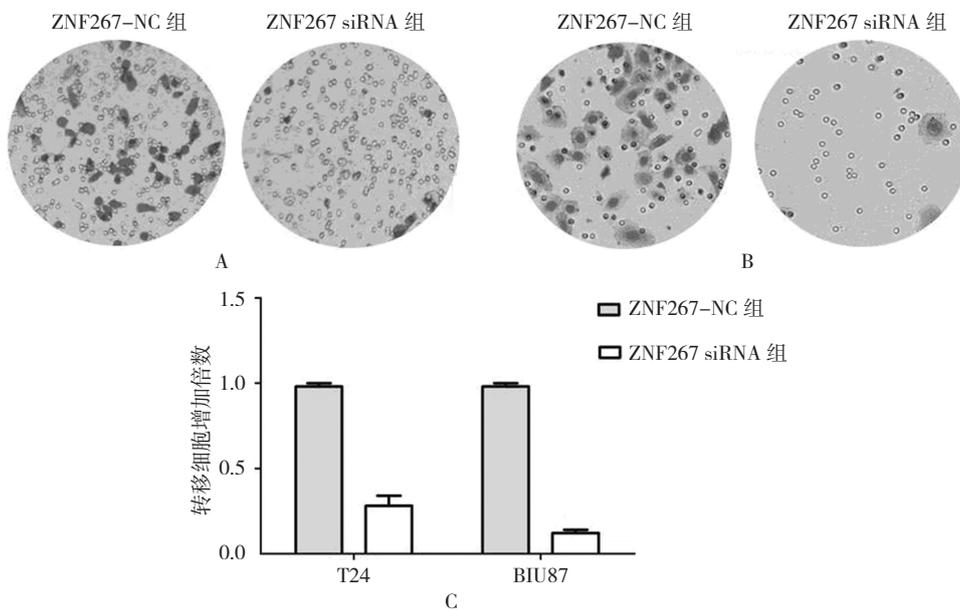
A: T24 细胞; B: BIU87 细胞

图 5 ZNF267 对 TCC 细胞凋亡的影响



A: T24 细胞; B: BIU87 细胞。1: ZNF267-NC 组; 2: ZNF267 siRNA 组。† 与 ZNF267 siRNA 组比较, $P < 0.05$

图 6 ZNF267 对 TCC 细胞周期的影响



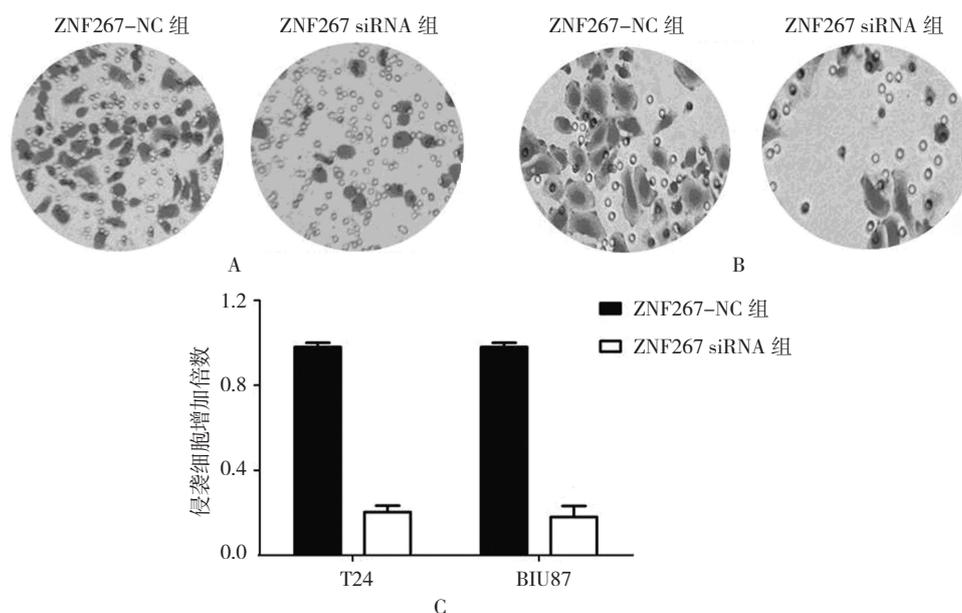
A: T24 细胞; B: BIU87 细胞; C: TCC 细胞转移细胞增加倍数比较

图 7 ZNF267 对 TCC 细胞转移的影响

为 (0.321 ± 0.931) 倍, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.106, P=0.011$), ZNF267-NC 组高于 ZNF267 siRNA 组。见图 8A。

2.7.2 BIU87 细胞 ZNF267-NC 组的 BIU87 细胞侵

袭细胞增加 (1.000 ± 0.048) 倍, ZNF267 siRNA 组为 (0.258 ± 0.125) 倍, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.451, P=0.008$), ZNF267-NC 组高于 ZNF267 siRNA 组。见图 8B、C。



A: T24 细胞; B: BIU87 细胞; C: TCC 细胞侵袭细胞增加倍数比较

图 8 ZNF267 对 TCC 细胞侵袭的影响

3 讨论

ZNF267 Kruppel 样锌指家族成员, 其结构包括一个氨基酸末端的高度保守的 Kruppel 相关盒结构域, 并通过连接区与锌指结构区分隔^[7]。研究发现, 一氧化氮 NO 治疗后, 静脉内皮细胞中 ZNF267 mRNA 表达水平上调^[8]。此外, 在肝星状细胞活化过程及肝硬化组织中 ZNF267 的表达同样上调^[9]。更为重要的是, 研究证实 ZNF267 在肝细胞癌中表达上调, 并可促进肿瘤细胞的增殖与转移^[6]。然而, 尚无研究阐明 ZNF267 在 TCC 中的表达及功能。本课题研究发现, ZNF267 在 TCC 组织中的表达高于癌旁组织。细胞学实验结果显示, ZNF267 在 TCC 细胞系中的表达亦高于永生化膀胱上皮细胞。利用 RNA 干扰技术沉默 TCC 细胞中 ZNF267 的表达后, TCC 细胞增殖受抑制, 而凋亡能力增强。研究还发现, 沉默 ZNF267 在 TCC 中表达后, 细胞周期被阻滞于 G₁ 期; 细胞转移和侵袭能力也受到抑制。本研究首次阐明 ZNF267 在 TCC 组织及细胞中的表达及其对 TCC 细胞功能的影响。

既往研究显示, 转录因子 Ets-1 为 ZNF267 的关键调控分子, 可诱导 ZNF267 表达上调^[6]。Ets-1 可通过活化基质金属蛋白酶和尿激酶型溶酶原活化物等多种酶的转录, 在多种肿瘤的发生、发展、侵袭及转移中发挥重要作用^[9-11]。研究发现 Ets-1 在 TCC 组织中的表达高于癌旁组织, 且特异性干涉 Ets-1 表达后,

TCC 的恶性表型受抑制。Ets-1 在 TCC 的发生、发展中发挥促癌分子作用^[12]。TCC 中高表达的 Ets-1 转录因子可诱导 ZNF267 的表达上调, 从而使 ZNF267 发挥促癌分子作用。ZNF267 表达水平的另一调控机制为 HIF-1 α 通过调控 Ets-1 而间接调控 ZNF267 的表达。研究显示, 抑制 Ets-1 在肝细胞活性的重要调控分子缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)^[13], 则 ZNF267 在肝细胞癌中的表达亦降低。缺氧可提高肝细胞癌中 HIF-1 α 的表达^[14], 并促进 ZNF267 的表达。在膀胱癌中, HIF-1 α 亚基与膀胱癌的分期、分级及转移潜能密切相关^[15]。HIF-1 α 及葡萄糖转运蛋白 1 为膀胱癌预后的独立预测指标^[16-17]。根据本研究结果, HIF-1 α 可能亦通过间接上调 ZNF267 的表达, 而促进膀胱癌的发生、发展。ZNF267 参与 Ets-1 和 HIF-1 α 调控 TCC 发生、发展的分子机制仍需进一步研究。

本研究发现, ZNF267 在膀胱癌组织及细胞中表达上调, 沉默其表达后, 细胞增殖、转移及侵袭受抑制, 细胞凋亡增强, 细胞周期被阻滞于 G₁ 期。本研究为阐明 ZNF267 在 TCC 发生、发展中的机制奠定了基础, 为膀胱癌的治疗提供潜在可利用的分子靶点。

参 考 文 献:

- [1] SUN M, TRINH Q D. Diagnosis and staging of bladder cancer[J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2015, 29(2): 205-218.

- [2] CZERNIAK B, DINNEY C, MCCONKEY D. Origins of Bladder Cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 149-174.
- [3] RESNICK M J, CHANG S S. Optimizing outcomes for octogenarians with invasive bladder cancer: one size does not fit all[J]. *Urol Oncol*, 2013, 31(1): 1-4.
- [4] MCCONNELL B B, YANG V W. Mammalian kruppel-like factors in health and diseases[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4): 1337-1381.
- [5] SCHNABL B, HU K, MUHLBAUER M, et al. Zinc finger protein 267 is up-regulated during the activation process of human hepatic stellate cells and functions as a negative transcriptional regulator of MMP-10[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(1): 87-96.
- [6] SCHNABL B, VALLETTA D, KIROVSKI G, et al. Zinc finger protein 267 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes tumor cell proliferation and migration[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(3): 695-701.
- [7] ABRINK M, AVESKOGH M, HELLMAN L. Isolation of cDNA clones for 42 different kruppel-related zinc finger proteins expressed in the human monoblast cell line U-937[J]. *DNA Cell Biol*, 1995, 14(2): 125-136.
- [8] SCHAFER U, SCHNEIDER A, NEUGEBAUER E. Identification of a nitric oxide-regulated zinc finger containing transcription factor using motif-directed differential display[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1494(3): 269-276.
- [9] KEEHN C A, SMOLLER B R, MORGAN M B. Expression of the ets-1 proto-oncogene in melanocytic lesions[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(8): 772-777.
- [10] NAKAYAMA T, ITO M, OHTSURU A, et al. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human colorectal carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(5): 415-422.
- [11] SAEKI H, KUWANO H, KAWAGUCHI H, et al. Expression of ets-1 transcription factor is correlated with penetrating tumor progression in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus[J]. *Cancer*, 2000, 89(8): 1670-1676.
- [12] LIU L, LIU Y, ZHANG X, et al. Inhibiting cell migration and cell invasion by silencing the transcription factor ETS-1 in human bladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18): 25125-25134.
- [13] MAEGDEFRAU U, AMANN T, WINKLMEIER A, et al. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression[J]. *J Pathol*, 2009, 218(4): 520-529.
- [14] AMANN T, MAEGDEFRAU U, HARTMANN A, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1544-1552.
- [15] DENIZ H, KARAKOK M, YAGCI F, et al. Evaluation of relationship between HIF-1alpha immunoreactivity and stage, grade, angiogenic profile and proliferative index in bladder urothelial carcinomas[J]. *Int Urol Nephrol*, 2010, 42(1): 103-107.
- [16] CHAI C Y, CHEN W T, HUNG W C, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with focal macrophage infiltration, angiogenesis and unfavourable prognosis in urothelial carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(5): 658-664.
- [17] ORD J J, AGRAWAL S, THAMBOO T P, et al. An investigation into the prognostic significance of necrosis and hypoxia in high grade and invasive bladder cancer[J]. *J Urol*, 2007, 178(2): 677-682.

(童颖丹 编辑)