文章编号:1000-5404(2005)17-1799-04

论著

前列腺癌AR表达与细胞增殖的关系

刁鑫伟,叶明福,张哉根,王亚丽 (第三军医大学新桥医院病理科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨113例人前列腺癌雄激素受体(AR)与增殖相关因子表达的相关性。**方法** 应用免疫组化标记AR、细胞增殖相关因子(Ki67、PCNA)。EGFR及核仁组成区AgNOR染色,结合光镜、电镜观察及图像分析等方法,研究AR表达与PCa增殖的相互关系。**结果** 前列腺癌AR(-)组细胞增殖作用较AR(+)组明显增强。**结论** AR突变,造成PCa细胞的无限增殖能力增强,细胞生长迅速,异质性更明显,可能是PCa难于治疗的原因之一。

关键词: 前列腺癌;雄激素受体;增殖细胞核抗原;Ki67;核仁组成区;表皮生长因子受体
中图法分类号: R329.28; R392.11; R737.25 **文献标识码:** A

Relationship between proliferation of prostate cancer cells and androgen receptor expression

DIAO Xin-wei, YE Ming-fu, ZHANG Zai-gen, WANG Ya-li (Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between proliferation activity-related factors and androgen receptor (AR) expression in 113 cases of human prostate cancer (PCa). **Methods** AR and the proliferation activity-related factors (PCNA, Ki67, EGFR) in PCa were detected by immunohistochemistry and light/electron microscopy. **Results** Cell proliferation in AR-negative groups of PCa was significantly stronger than in AR-positive groups. **Conclusion** AR aberrant expression may promote proliferative ability of PCa, cell growth and heterogeneity significantly, which may be one of reasons that PCa is difficult to be cured.

Key words: prostate cancer; androgen receptor; proliferating cell nuclei antigen; Ki67; NORs; epidermal growth factor receptor

本研究应用雄激素受体(androgen receptor, AR)免疫组化标记,探讨前列腺癌(prostate cancer, PCa)中AR免疫表型突变与PCa病理形态学变化的相关性。应用细胞增殖相关因子Ki67、PCNA、EGFR等标记物AgNOR和核化组成区AgNOR染色,检测它们在AR(+)组和AR(-)组PCa中的表达特点,结合光镜、电镜观察,研究AR表达状态与PCa细胞增殖相关性,探讨AR表达变化对PCa增殖效应的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与分组

收集第三军医大学新桥医院1982-2004年间手术切除及穿刺PCa标本113例,经10%中性甲醛液固定,石蜡包埋,连续切片10张,厚度3 μm,分别行HE染色和免疫组化染色。光镜观察前列腺癌HE染色组织切片,根据Gleason分级,Gleason评分2、3、4分视为高分化腺癌;Gleason评分5、6、7分视为中分化腺癌;Gleason评分8、9、10分视为低分化腺癌及未分化腺癌。选取10例前列腺增生标本作为对照组。

1.2 试剂来源及工作浓度

免疫组化抗体均为即用型单克隆抗体,S-P试剂盒购于北京中山生物技术有限公司,抗原经微波修复;凋亡检测试剂盒购于福州迈新生物技术公司,工作浓度1:50;核仁组成区AgNORs染色试剂为本科室配制。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化 应用S-P法,采用已知阳性的BPH标本切片作阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。AR标记结果判定:计数阳性细胞数占前列腺上皮细胞的百分率及表达强度记为:(-)无明显阳性反应细胞或阳性细胞数比例小于10%,(+)阳性细胞数比例大于10%,胞核染色呈片状棕色或浅棕色;PCNA和Ki67染色结果判定:前列腺上皮细胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性,根据阳性细胞数量和表达强度进行半定量分析,在400倍视野下计数1 000个细胞中的阳性细胞数,每例切片计数3次,计算每1 000个细胞中阳性细胞数;EGFR结果判断:(-)无明显阳性细胞,(+)阳性细胞数少于25%,呈浅棕色染色;(++)阳性细胞数大于25%,小于50%,呈棕色;(+++)阳性细胞数大于50%,呈棕褐色。

1.3.2 (核仁组成区)AgNORs染色 应用Ploton法,Ag-

作者简介:刁鑫伟(1974-),男,安徽省利辛县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事肿瘤病理学、前列腺癌病理学方面的研究。电话:(023)68774697

收稿日期:2005-01-15;修回日期:2005-04-28

NOR 均数计算:光镜下 400 倍视野计数 300 个 PCa 细胞中颗粒数目及大小重复 3 次,取平均值,计算每个细胞 AgNOR 颗粒数。以 PBS 代替 AgNOR 工作液作为阴性对照。

1.3.3 电镜观察 选取新鲜或石蜡块中的 PCa 标本(经脱蜡处理)计 20 例,以 3% 戊二醛磷酸缓冲液固定,0.2 mol/L 蔗糖磷酸盐缓冲液漂洗,1% 锇酸后固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂 815 包埋,半薄切片定位,超薄切片,醋酸铀-柠檬酸钙双重电子染色,JEM-2000EX 型透射电镜下观察。

1.4 统计学处理

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行样本均数间显著性 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 前列腺癌 AR 标记结果分析

在前列腺组织中 AR 阳性反应部位是前列腺上皮细胞核,呈浅棕色或棕褐色染色。在 10 例 BPH 对照组中 AR 阳性反应见于前列腺基底细胞和部分分泌上皮细胞核,在 PCa 细胞中,AR 呈弥漫或散在核阳性,个别细胞显示胞浆染色(图 1),间质细胞均为阴性。在 113 例 PCa 中,AR(+)者 61 例,占 54%,AR(-)者 52 例,占 46%。Glesaon 分级比较发现:61 例 AR(+)组中,高分化癌 26 例,中分化癌 23 例,低分化癌 12 例。52 例 AR(-)组中,高分化癌 7 例,中分化癌 15 例,低分化癌 30 例。高-中分化癌 AR 阳性例数占 AR(+)组总数的 80.3%。AR(-)组中-低分化癌占 AR(-)组的 86.54%,提示 AR(+)组随 Glesaon 分级增高 AR 阳性例数呈递减趋势,AR(-)组随 Glesaon 分级增高 AR(-)例数呈递增趋势。观察发现 AR(+)组癌细胞分化程度较 AR(-)组高,AR(+)组 AR 表达与细胞分化密切相关,在分化较好的癌细胞中,AR 表达较强,分化差的癌组织 AR 多呈弱表达。

2.2 前列腺癌 AR(+)/AR(-)组 PCNA、Ki67 及核仁组成区标记结果

观察发现 BPH 组 PCNA 表达主要在基底细胞与部分分泌性上皮细胞核,PCa 组织显示多灶性或弥漫性细胞核阳性。在 Gleason 分级高的 PCa 组织中 PCNA 阳性细胞数明显增多,在 Gleason 分级低的 PCa 组织中 PCNA 阳性细胞数相对较少。前列腺癌 AR(+)组 PCNA 阳性细胞数均值略低于前列腺癌 AR(-)组,但二者之间无显著性差异($P>0.05$)。分析发现 BPH 组与前列腺癌 AR(+)/AR(-)组相比有显著性差异($P<0.01$),见表 1。

BPH 组 Ki67 表达主要在基底细胞与分泌性上皮细胞的移行区,细胞核呈散在棕色阳性。PCa 细胞 Ki67 染色呈棕褐色弥漫性阳性,Gleason 分级低的高分化癌 Ki67 阳性细胞主要分布于排列较规则的癌性腺泡的分泌性上皮胞核内,而 Gleason 分级高的低分化癌,组织异型性明显,失去极性,阳性细胞呈弥漫分布,且阳性细胞数明显增多。分析发现 BPH 组 Ki67 表达显著低于前列腺癌组,两者差异非常显著($P<0.01$),见表 1。前列腺癌 AR(-)组因 Gleason 分级较高的例数多,Ki67 阳性细胞数高于 AR(+)组,且分布更弥漫,二者差异非常显著($P<0.01$)。

BPH 组织中,AgNOR 颗粒小,大小及形态一致,数量少,多位于核中央。在 PCa 中 AgNOR 颗粒数目较 BPH 组织中多,高分化癌颗粒大,大小较一致,常呈大圆形核仁颗粒;中低分化癌颗粒小,数目多,且形态多样,呈圆形,椭圆形,碎片状,团片状,不规则形,散在无规律分布于核内(图 2)。AR(-)组 AgNOR 颗粒较 AR(+)组多,不规则形颗粒增多,两者相差非常显著($P<0.01$)。AR(+)/AR(-)组随 Gleason 分级增高,数目增多,形态多样性更明显。分析发现 BPH 组与 PCa 组 AgNOR 颗粒均数值相差非常显著($P<0.01$),见表 1。

表 1 AR(+)/AR(-)组 PCNA、Ki67 及 AgNOR 标记结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 PCa AR(+)/AR(-) group labeled by PCNA, Ki67 and AgNOR ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PCNA	Ki67	AgNOR
BPH	10	243.33 ± 15.77	167.33 ± 11.55	1.12 ± 0.25
AR(+)	61	406.33 ± 15.28▲	259.67 ± 17.32▲	1.91 ± 0.66▲
AR(-)	52	417.00 ± 11.55▲★	291.00 ± 15.28▲★	2.33 ± 0.63▲★

▲: $P<0.01$, *vs* BPH group; ★: $P<0.01$, *vs* AR(+) group

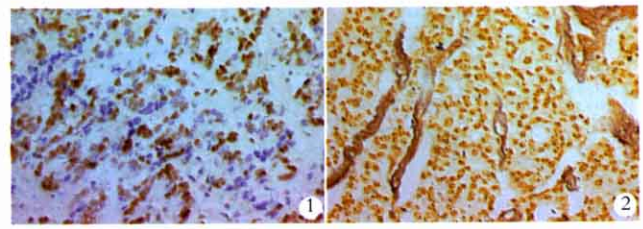


图 1 AR 阳性细胞弥漫分布或在癌性腺泡近腔面细胞呈环状核阳性,个别细胞显示胞浆阳性染色 (S-P×400)

Fig 1 AR positive granules located on the nucleus displaying ring-like and positive in cytoplasma (S-P×400)

图 2 中-低分化 PCa,AgNOR 颗粒 (AgNOR×400)

Fig 2 Middle-low differentiated PCa displaying AgNOR positive (AgNOR staining×400)

2.3 前列腺癌 AR(+)/AR(-)组 EGFR 检测结果

在 BPH 组织中,EGFR 在分泌性上皮及部分基底细胞胞浆呈浅棕色或棕色散在阳性,在 PCa 组中癌细胞胞浆呈棕褐色或棕色片团状分布。分析发现 PCa 组中 EGFR 阳性表达较 BPH 组略高,差异不显著($P>0.05$),见表 2。在 Gleason 分级低的高分化癌 EGFR 阳性表达较弱,随 Gleason 分级升高 EGFR 阳性表达明显增强。AR(+)组 EGFR 阳性表达较 AR(-)组低,差异非常显著($P<0.01$)。另外 8 例 AR(+)及 3 例 AR(-)组 PCa(共 11 例)不表达 EGFR,且形态学表现主要见于低分化前列腺癌。

表 2 前列腺癌 AR(+)/AR(-)组 EGFR 检测结果

Tab 2 EGFR detection in PCa AR(+)/AR(-) group

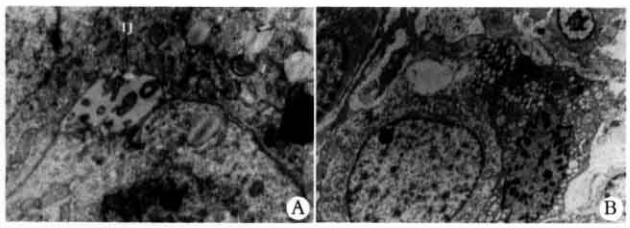
Group	n	EGFR (%)				Positive number	Positive rate (%)
		-	+	++	+++		
BPH	10	1(10.0)	3(30.0)	4(40.0)	2(20.0)	9	90
AR(+)	61	8(13.1)	19(31.1)	25(41.0)	9(14.8)	53	86.9
AR(-)	52	3(5.8)	11(21.2)	22(42.3)	16(30.8)	49	94.2★

★: $P<0.01$, *vs* AR(+)

2.4　电镜观察

AR(+)组：分泌颗粒大部分呈空化状态，聚于核上区近腔端胞质中，数目多，较规则，高尔基复合体丰富，细胞间紧密连接、中间连接、桥粒连接发育好，有较短的微绒毛(图 3A)，部分可见大核仁，溶酶体、线粒体散在分布。

AR(-)组：分泌颗粒高尔基复合体多位于核下区，或失去极性，微绒毛短而稀疏，近腔面连接复合体少，分泌颗粒少，散在分布，糖原颗粒丰富，线粒体多，内质网扩张，核大而不规则，异染色质增多(图 3B)，可见双核或多核及怪异核形，微腺腔较少，其他细胞器较少，溶酶体增多。



A: Secretory granule (SG) located on cytoplasma near glandulose, tight junctions (TJ) between cells and short microvilli (TEM × 6 000); B: Cancer tissue had two kinds of cells: dark cells had abundant abnormal chromatins, bright cells showed, evident nucleolus (←), some swollen mitochondria (→), vanishing crista (TEM ×4 200)

图 3　PCa AR(+)组和 PCa AR(-)组细胞超微结构

Fig 3　The cellular ultrastructure of PCa AR (+) group and PCa AR(-)

3　讨论

增殖细胞核抗原(PCNA)是 DNA 复制的辅助因子，在 G_1 期表达增加，G_1 晚期至 S_1 期达到高峰，G_2/M 期减少。PCNA 标记能较好的反映细胞增殖活性[2-4]。本实验对 113 例前列腺癌 AR(+)/AR(-)组 PCNA 标记结果显示，随 Glesaon 分级增高 PCNA 阳性细胞数增加，表明随分化程度降低癌细胞增殖活性升高。前列腺癌 AR(+)组 PCNA 阳性细胞数均值略低于前列腺癌 AR(-)组，初步提示 AR(-)组增殖活性稍高于 AR(+)组，但两者之间无显著性差异($P > 0.05$)，与文献[5]报道结果一致。

核增殖抗原 Ki67 是增殖细胞的组蛋白性核蛋白，是构成核基质及染色体支架的一种组分[6]，Ki67 在 G_0 期和 G_1 早期不表达，可特异反映细胞周期中的增殖活性，是判断前列腺癌增殖和预后的标志[4]。本实验对 113 例前列腺癌 AR(+)/AR(-)组及 10 例 BPH 标本 Ki67 标记结果显示，在正常前列腺上皮细胞与基底细胞移行区表达较强，在前列腺癌中，AR(-)组 Ki67 表达高于 AR(+)组，且分布更弥漫，两者差异非常显著($P < 0.01$)。与 Bubendorf 等[3]报道 AR 缺失促进 Ki67 表达上调的结果相一致。进一步提示 AR(-)组增殖活性高于 AR(+)组。AR(-)组与 AR(+)组这种差异在 Gleason 分级较高的病例中更显著，提示在 AR 表达缺失的前列腺癌中，随着肿瘤细胞分化转差，肿瘤异质性增强，其无限增殖能力较 AR(+)组增加。与 PCNA 标记比较，Gleason 分级较低的前列腺癌 Ki67 阳性指数明显低于 PCNA 阳性指数，而在 Gleason 分级较高的前列腺癌中，Ki67 指数与 PCNA 指数差异不显著，提示 Gleason 分级较高的前列腺癌中处于 G_0 期及 G_1 早期细胞减少，G_1 晚期 M 期细胞增加，细胞增殖活性增强。提示 Ki67 与 PCNA 标记联合应用更有助于判断前列腺癌细胞周期中各期的增殖活性，并有助于判断前列腺癌的预后，Ki67 阳性指数高或接近 PCNA 指数则细胞生长更迅速，预后变差[4]。

核仁组成区 AgNORs 是核仁中嗜银性非组蛋白，与核糖体的形成及细胞内蛋白质的合成关系密切，AgNORs 可反映核仁结构及功能。研究表明 AgNOR 颗粒数目、大小及形态对鉴别良恶性肿瘤及判断预后有重要价值，同时 AgNOR 通过反映 DNA 倍体变化及核糖体的功能，进一步反映肿瘤的生长速度及分化程度[7]。本实验通过 AgNOR 染色研究前列腺癌的增殖性发现，AR(+)/AR(-)组随 Gleason 分级增高，数目增多，形态多样性更明显。AR(-)组 AgNOR 颗粒较 AR(+)组多，不规则形颗粒增多，分布更弥漫，两者相差非常显著($P < 0.01$)。表明 AR(-)组非整倍体 DNA 增多，核糖体功能增强，细胞增殖活性增强。

表皮生长因子受体(EGFR)是原癌基因 C-erbB-1 的表达产物[8]，属 I 型跨膜酪氨酸激酶生长因子受体，具有受体型蛋白酪氨酸激酶活性[9]，其配体包括 EGF、TGFα、VGF 及双调蛋白等[10]。EGFR 在许多肿瘤细胞中扩增其表达增强提示瘤细胞增殖活性上升，是恶性程度增高的标记[11]。Tyagi 等[12]证实 EGFR 表达与前列腺癌分级之间存在相关性，可作为前列腺癌分化的标志。配体激活的 EGFR 将信号传至核内促进 DNA 合成及癌基因 Ras、Jun 表达，介导细胞增殖活化信号，调节细胞生长与浸润。Olapade[13]认为 EGFR 水平上调，可调控钙粘蛋白的表达，提高肿瘤的侵袭力。本实验中对 113 例前列腺癌 AR(+)/AR(-)组及 10 例 BPH 标本 EGFR 标记发现，PCa 组中 EGFR 阳性率较 BPH 组略高，差异不显著($P > 0.05$)，与 Kumar 等[14]报道一致，但 Sherwood 等[10]研究认为 BPH 较 PCa 的 EGFR 阳性率高，且表达较强。与本实验结果不一致。高分化癌 EGFR 阳性表达较弱，随 Gleason 分

级升高 EGFR 阳性表达明显增强。表明 EGFR 阳性表达随分化程度降低而增高，与肿瘤分化程度呈负相关。AR(+)组 EGFR 阳性表达较 AR(-)组低，差异非常显著($P<0.01$)，提示 AR(-)组细胞恶性增殖能力增强。同时我们发现 AR(+)组中 AR 表达较强的病例，EGFR 表达较弱。且相同 Gleason 分级病例中 EGFR 表达随 AR 表达强度增高而减弱，而 AR(-)组 EGFR 表达较 AR(+)组相同 Gleason 分级病例增强。提示 EGFR 可能与 AR 表达有相关性，雄激素及其受体信号途径可能参与调控了 EGFR 的表达水平及活性。Guthman 等研究认为在 BPH 中，雄激素负性调节 EGFR 水平，维持细胞生长。Graves 认为雄激素及其受体通过调节 PSA 及 EGF 水平间接降解 EGFR 细胞外配体结合区，降低了 EGFR 的表达水平[15]。但 Harper 等[16]研究认为 AR 与 EGFR 表达呈正相关。Turner 与 Sherwood 等[17]研究认为雄激素及其受体，EGF 及 TGFα 可能共同调控了 EGFR 的表达。因此 AR 突变改变了调控 EGFR 的表达的信号途径，使 EGFR 逃避了雄激素的生长抑制调控，EGFR 异常表达和激活，导致前列腺癌细胞增殖活性增强[15]。另外研究表明 8 例 AR(+)及 3 例 AR(-)组 PCa(共 11 例)不表达 EGFR，且形态学表现主要见于低分化前列腺癌，可能与癌细胞分化较差，异质性更明显，胞浆中亚细胞结构退化，跨膜分子表达减弱有关。

通过对前列腺癌增殖相关因子标记及光镜、电镜观察显示，前列腺癌 AR(-)组较 AR(+)组细胞增殖效应更显著。提示 AR 突变，雄激素及其受体信号通路调控前列腺上皮生长、分化及内分泌功能异常，前列腺癌生长不被 AR 信号通路所抑制，造成前列腺癌的无限增殖能力增强，体现在细胞生长迅速，异质性更明显，去势手术及内分泌治疗更加困难等方面[18,19]。

参考文献：

[1] Debes J D, Tindall D J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2002, 187(1-2): 1-7.

[2] 汤群辉，杨力军，王 禾. Rb 基因和 PCNA 在前列腺癌中表达的意义及相关性分析[J]. 第四军医大学学报，2001，6：534-537.

[3] Bubendorf L, Tapia C, Gasser TC, *et al*. Ki67 labeling index in core needle biopsies independently predicts tumor-specific survival in prostate cancer[J]. Hum Pathol. 1998, 29(9): 949-954.

[4] Sulik M, Guzinska-Ustymowicz K. Expression of Ki-67 and PCNA as proliferating markers in prostate cancer[J]. Rocz Akad Med Bialymst, 2002, 47(3): 262-269.

[5] Barton J, Blackledge G, Wakeling A. Growth factors and their receptors: new targets for prostate cancer therapy[J]. Urology, 2001, 58(2): 114-122.

[6] Pollack A, Cowen D, Troncoso P, *et al*. Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x[J]. Cancer, 2003, 97(7): 1630-1638.

[7] Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology[J]. Micron, 2000, 31(2): 133-141.

[8] Visakorpi T, Kallioniemi O P, Koivula T, *et al*. Expression of epidermal growth factor receptor and ERBB2 (HER-2/Neu) oncoprotein in prostatic carcinomas[J]. Mod Pathol, 1992, 5(6): 643-648.

[9] 顾方六. 现代前列腺病学[M]. 北京：人民军医出版社，2002. 290-294.

[10] Sherwood E R, Lee C. Epidermal growth factor-related peptides and the epidermal growth factor receptor in normal and malignant prostate [J]. World J Urol, 1995, 13(5): 290-296.

[11] Rajvir D, Celeste L, Peter C, *et al*. Differential gene expression of transforming growth factors alpha and beta, epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, and their receptors in fetal and adult human prostatic tissues and cancer lines[J]. Urology, 1996, 48(6): 963-970.

[12] Tyagi A, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits EGF-induced and constitutively active mitogenic signaling but activates JNK in human prostate carcinoma DU145 cells: possible role in antiproliferation and apoptosis[J]. Oncogene, 2003, 22(9): 1302-1316.

[13] Olapade-Olaopa E O, Moscatello D K, MacKay E H, *et al*. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer[J]. Br J Cancer, 2000 82(1): 186-194.

[14] Kumar V L, Majumder P K, Gujral S, *et al*. Comparative analysis of epidermal growth factor receptor mRNA levels in normal, benign hyperplastic and carcinomatous prostate[J]. Cancer Lett, 1998, 134(2): 177-180.

15] Itoh N, Patel U, Skinner MK. Developmental and hormonal regulation of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in isolated prostatic epithelial and stromal cells [J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1369-1377.

[16] Harper ME, Glynne-Jones E, Goddard L, *et al*. Expression of androgen receptor and growth factors in premalignant lesions of the prostate [J]. J Pathol, 1998, 186(2): 169-177.

[17] Sherwood E R, Van-Dongen J L, Wood C G, *et al*. Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 1998, 77(6): 855-861.

[18] Mackey T J, Borkowski A, Amin P, *et al*. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer[J]. Urology, 1998, 52(6): 1085-1090.

[19] Chia S J, Tang W Y, Elnatan J, *et al*. Prostate tumours from an Asian population: examination of bax, bcl-2, p53 and ras and identification of bax as a prognostic marker[J]. Br J Cancer, 2000 83(6): 761-768.

（编辑 陈聪连）