论著

文章编号:1000-5404(2008)03-0244-03

前列腺癌组织中核干因子基因表达的临床意义

杨俊福,张 辉,武玉东,赵亚兵,梁 宏 (郑州大学第一附属医院泌尿外科,郑州 450052)

摘 要:目的 探讨核干因子(nucleostemin gene, NS)基因在前列腺癌(prostate cancer, PCa)组织中的表达及其与血清前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)的关系。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组织化学法检测NS在PCa及良性前列腺增生(BPH)组织中的表达,分析其在PCa中的表达水平与血清PSA的关系。结果 45例PCa组织标本中,NS mRNA的阳性表达率为80.0%(36/45)。20例BPH组织中均未见阳性表达。在高分化、中分化、低分化PCa组织中NS蛋白阳性表达例数分别为4、19、13例。NS蛋白表达与PCa恶性程度呈正相关($r=0.954$, $P<0.05$),与患者血清PSA水平无明显相关性($r=0.237$, $P>0.05$)。结论 NS蛋白表达与PCa的分级密切相关,可作为一种诊断PCa的新肿瘤标志物。

关键词:核干因子基因;前列腺肿瘤;基因表达
中图法分类号:R394.3;R730.23;R737.25 文献标识码:A

Expression of nucleostemin gene in prostate cancer and its correlation with prostate specific antigen

YANG Jun-fu, ZHANG Hui, WU Yu-dong, ZHAO Ya-bing, LIANG Hong (Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of nucleostemin gene (NS) in prostate cancer and its correlation with prostate specific antigen (PSA). Methods The expressions of nucleostemin mRNA and protein were measured by RT-PCR and immunohistochemical stain in 20 specimens of benign prostate hyperplasia and 45 specimens of prostate cancer, and the relation between their levels and serum PSA was analyzed. Results NS gene expression was detected in 36 specimens of prostate cancer (80.0%). The positive expression of NS gene was in 4, 19, 13 specimens of high, moderate, low grade of prostate cancer. The expression of nucleostemin gene was related significantly to the tumor grade ($r=0.954$, $P<0.05$), and no significant relationship between nucleostemin expression and PSA was found ($r=0.237$, $P>0.05$). Expression of nucleostemin gene was not detected in benign prostate hyperplasia tissues. Conclusion The expression of nucleostemin gene in prostate cancer is closely correlated with the grading of tumors and may serve as a marker in estimating the malignancy of prostate cancer.

Key words: nucleostemin; prostatic neoplasm; gene expression

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是老年男性最常见的恶性肿瘤之一,近年来我国的发病率呈逐年上升趋势,早期诊断PCa对其预后意义重大。目前发现的一些肿瘤标志物由于缺乏特异性,临床应用尚有一定的局限性[1,2]。因此迫切需要寻找PCa特异性的肿瘤标志物。近来发现核干因子(nucleostemin gene, NS)对维持干细胞和癌细胞的无限增殖状态是必须的[3],在多种恶性肿瘤中均发现其高表达,并且其表达水平与肿瘤的恶性程度相关。我们应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及免疫组织化学技术对不同前列腺组织中NS基因的表达情况进行研究,探讨其在PCa中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

45例PCa织标本均取自本院2001-2004年手术治疗的PCa患者,平均(49~79)67.4岁,均经病理证实为PCa。依照

作者简介:杨俊福,男,河南省西平县人,副主任医师,副教授,主要从事泌尿外科肿瘤方面的研究。电话:(0371)66913287
收稿日期:2007-04-19;修回日期:2007-06-20

Gleason 评分标准，其中高分化癌（2 ~ 4 分）10 例，中分化癌（5 ~ 7 分）22 例，低分化癌（8 ~ 10 分）13 例。20 例 BPH 组织是取自经尿道前列腺切除术经病理证实的前列腺增生（BPH）患者，平均（52 ~ 84）69. 8 岁。每例取新鲜标本 2 块，1 块用 10% 福尔马林液固定，石蜡包埋后，切片行免疫组织化学检测；另 1 块于离体 10 min 内行液氮速冻待检。PCa 患者术前未接受内分泌和抗肿瘤治疗。PCa 患者和 BPH 患者在年龄上无显著性差异（$P > 0.05$）。

1.2　材料与试剂

抗 NS 羊多克隆抗体购自美国 Biocompare 公司，免疫试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司，Trizol 购自美国 Invitrogen 公司，RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司，PSA EIA 试剂盒购自美国 Biocheck 公司，核酸定量仪及 PCR 仪均购自德国 Eppendorf 公司。

1.3　RT-PCR 检测

①总 RNA 抽提及鉴定：Trizol 一步法从癌组织中提取 RNA，实验步骤按其说明书进行。核酸定量仪鉴定总 RNA 的质量。②引物设计及合成：根据 NS cDNA 序列设计并合成引物，上游：5′-GGATCCGTTCCAAACAGTGCTCCC-3′，下游：5′-AAGCTTCTG-GCATCCAACACCTC-3′，产物 315 bp。内参照 β-actin 引物：上游：5′-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3′，下游：5′-GGATCTTCAT-GAGGTAGTCAGTC-3′，产物 620 bp。③RT-PCR：RT-PCR 反应体系及参数按一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行，PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后，于紫外灯下观察。

1.4　免疫组织化学法检测

采用免疫组化二步法，4 μm 石蜡切片常规脱蜡入水，3% 过氧化氢孵育 10 min，PBS 冲洗，微波修复抗原，加 1∶50 稀释的一抗 4 ℃过夜，PBS 替代一抗作为阴性对照，加兔抗山羊 IgG-HRP 多聚体 37 ℃孵育 40 min，PBS 冲洗，DAB 显色，苏木精复染，中性树脂封片。

1.5　结果判定[4]

所有切片均有 2 位病理医师采用盲法独立检测，取平均值。高倍镜下观察至少 6 个视野，细胞质内出现黄色至棕褐色为阳性细胞标志，计算阳性细胞百分率。染色结果分为阴性（－）：阳性细胞率 < 5%；弱阳性（＋）：阳性细胞率 5% ~ 25%；阳性（＋＋）：阳性细胞率 > 25%。

1.6　术前血清 PSA 检测

所有患者均在术前作血清 PSA 检测，采用美国 Biocheck 公司 PSA EIA 试剂盒，按操作说明书进行检测。

1.7　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件，对 NS 蛋白表达与血清 PSA 的关系行 Searman 等级相关分析。

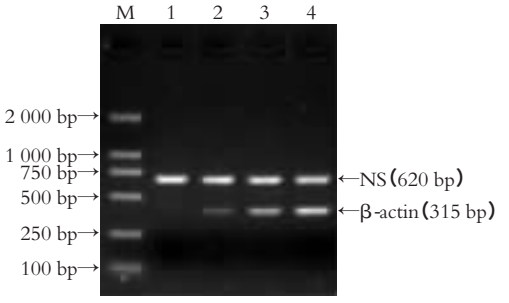
2　结果

2.1　RT-PCR 检测结果

PCa 组织标本中 NS mRNA 的阳性表达率为 80. 0%（36/45），BPH 组织中未见 NS mRNA 的阳性表达，并且在相同底物的情况下，RT-PCR 产物随着 Gleason 评分的增高而增多（图 1）。

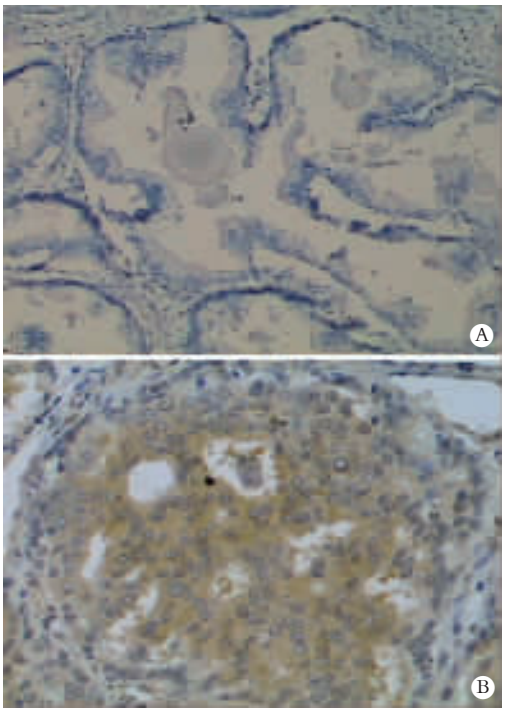
2.2　免疫组织化学染色结果

PCa 细胞细胞质呈现黄色至棕黄色，而 PCa 周围正常组织中却未见着色。PCa 组织中 NS 的表达阳性率与病理分级呈正相关（$r = 0.954$，$P < 0.05$）。不同前列腺组织中 NS 蛋白的表达见图 2，表 1。图 2 中可见组织中基底细胞未见着色，仅分泌细胞中偶见很浅的淡黄色。



M：DNA 标准（DL 2000）；1：BPH 组织；2：高分化 PCa；3：中分化 PCa；4：低分化 PCa

图 1　NS mRNA 在不同前列腺组织中的表达



A：BPH 组织，NS 蛋白呈阴性表达（×200）；B：低分化 PCa 组织，NS 蛋白呈阳性表达（×400）

图 2　NS 蛋白在不同前列腺组织中的表达　（二步法）

表 1　不同前列腺组织中 NS 蛋白的表达

组织	n	NS 表达强度		
		－	＋	＋＋
BPH	20	19	1	0
高分化 PCa	10	6	4	0
中分化 PCa	22	3	12	7
低分化 PCa	13	0	5	8

2.3 NS 在 PCa 中的表达与血清 PSA 的关系

PCa 患者血清 PSA 水平(43.50 ± 17.57)明显高于 BPH(7.01 ± 4.79)($P < 0.01$)。中分化 PCa 患者血清中 PSA 水平(45.59 ± 31.39)与低分化 PCa(51.25 ± 24.54)比较,差异无显著性($P > 0.05$,表 2)。PCa 组织中 NS 的表达与 PCa 患者血清 PSA 水平无明显相关性($r = 0.237$,$P > 0.05$)。

表 2 NS 在不同 PSA 水平 PCa 组织中的表达

PSA(ng/ml)	n	NS 表达强度		
		−	+	+ +
< 10	22	4	12	6
≥10	23	5	9	9

3 讨论

PCa 的发生和发展是多种基因表达水平改变的结果,基因表达的改变打破了正常的生理机能,导致肿瘤的发生。早期诊断、治疗 PCa 可以显著改善预后、提高生活质量,延长生存时间。Tsai 等[3-6] 发现 NS 是一种 P53 结合蛋白,存在于胃癌、肝癌、乳腺癌、膀胱癌等多种体外培养癌细胞系及组织中,但是在各种分化成熟的细胞中均未见表达。NS 蛋白可以通过其 NH_2-末端的基本结构域与 P53 蛋白结合形成复合体,从而抑制 P53 蛋白调节细胞周期与诱导细胞凋亡的功能,以至于损伤的 DNA 得不到修复,并且细胞很容易通过细胞周期,癌变概率增大。应用 siRNA 抑制 NS 基因表达可使骨肉瘤细胞 U2OS 等增殖活性显著下降,甚至造成细胞大批死亡[3]。在未分化的细胞中,NS 基因显著表达,维持其增殖活性;当细胞开始分化时,NS 基因表达急剧下调,P53 蛋白被释放,重新发挥其细胞周期调节因子的作用,分化成熟后,NS 基因表达停止[3]。本实验 RT-PCR 结果表明,NS mRNA 在 PCa 组织中表达较高,并且其表达与肿瘤的分化程度相关,分化越差,NS 表达越高,因此其表达强度可作为判断肿瘤恶性程度的一个指标[7]。

本研究表明,PCa 组织中 NS 蛋白高表达,并且在 PCa 组织中只表达于 PCa 细胞,周围正常前列腺组织中未见表达,表明 NS 的高表达与 PCa 细胞肿瘤的转化有关。同时本研究也表明,NS 的表达水平与 PCa 的分级呈正相关($r = 0.954$,$P < 0.05$),肿瘤的分级与患者的预后及肿瘤的侵袭性密切相关,低分化 PCa 中 NS 的表达更为显著,提示 NS 的高表达与 PCa 的进展有关,NS 表达越高,预后越差。推断 NS 在促进癌细胞增殖方面发挥重要作用,抑制 NS 活性可能对肿瘤有防治作用[8]。

PSA 是目前诊断 PCa 最常用的指标,但 BPH 和前列腺炎患者的血清 PSA 也可出现增高,并且在对国外进行回顾性研究时结果显示,当 PSA < 10 ng/ml 时不能与 BPH 很好的鉴别,也不能预测患者的预后[9,10]。本研究表明,NS 在 PCa 中的表达与血清 PSA 无明显相关性,其表达与肿瘤的分级呈正相关,在 PSA 大于等于或者小于 10 ng/ml 的 PCa 患者组织中的表达差异无明显相关性($r = 0.237$,$P > 0.05$),表明 NS 的表达水平与 PCa 的分化和预后关系更密切,可作为一种新的诊断 PCa 的肿瘤标志物。

目前关于 NS 的生物学功能及其调控癌细胞细胞周期的机制尚不清楚,因此,这方面的深入研究必将为阐明肿瘤的发生机制,以及为肿瘤的早期诊断、治疗和预后判断提供理论基础。

参考文献:

[1] Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A M. Molecular markers to identify patients at risk for recurrence after primary treatment for prostate cancer [J]. Urology, 2003, 62(Suppl 1): 19 – 35.

[2] Tavtigian S V, Simard J, Teng D H, *et al*. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p[J]. Nat Genet, 2001, 27(2): 172 – 180.

[3] Tsai R Y, McKay R D. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(23): 2991 – 3003.

[4] 谷建琦,张英怀,杨 威,等. 脆性组氨酸三聚体基因及错配修复基因 $hMLH_1$ 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 151 – 153.

[5] Liu S J, Cai Z W, Liu Y J, *et al*. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(9): 1246 – 1249.

[6] 刘秉乾,王广有,李沛寰,等. Nucleostemin 基因在膀胱移行细胞中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(1): 120.

[7] 武玉东,刘秉乾,张雪培,等. 前列腺癌组织中骨桥蛋白及基质金属蛋白酶 – 2 检测[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005, 40(4): 654 – 656.

[8] Normile D. Cell proliferation. Common control for cancer, stem cells [J]. Science, 2002, 298(5600): 1869.

[9] Stamey T A. Preoperative serum prostate-specific antigen(PSA) below 10 microg/l predicts neither the presence of prostate cancer nor the rate of postoperative PSA failure[J]. Clin Chem, 2001, 47(4): 631 – 634.

[10] 胡望平,冯福英,叶桂云,等. 血清 c-PSA 及 C/T 在提高前列腺癌诊断特异性中的探讨[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(18): 1815 – 1817.

(编辑 陈聪连)