DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.025
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1573-03

论著

Clusterin、bcl-2及p53在前列腺上皮组织中的表达及相关性研究

陈 刚,唐 伟 (重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

提 要:目的 通过检测新的凋亡抑制因子Clusterin在前列腺癌组织中的表达,探讨其与前列腺癌发生发展的关系及其与bcl-2和p53表达的关系。方法 采用免疫组织化学染色法检测Clusterin、bcl-2、p53在10例正常前列腺组织、15例良性前列腺增生组织(BPH)、49例前列腺癌组织标本中的表达。结果 Clusterin在前列腺正常、增生、癌组织中的阳性及弱阳性表达率分别为10%(1/10)、66.6%(10/15)、91.8%(45/49)。前列腺癌组织中Clusterin表达水平明显高于前列腺正常组织($P<0.005$)及增生组织($P<0.005$),且在癌组织中与肿瘤临床分期($P<0.001$)、病理分级($P<0.001$)呈正相关。前列腺癌Clusterin表达与bcl-2($P<0.05$)及p53($P<0.001$)表达呈正相关关系。结论 Clusterin基因可能通过抑制凋亡在前列腺癌的发生发展中发挥重要作用,且其表达与bcl-2、p53的异常表达密切相关。

关键词:前列腺肿瘤;脱噬作用;Clusterin;p53;bcl-2;免疫组织化学
中图法分类号:R394.2;R730.231;R737.25 文献标识码:A

Relationship of expression of clusterin with expressions of bcl-2 and p53 in prostate epithelia

CHEN Gang, TANG Wei (Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of an inhibitor gene of apoptosis, clusterin, in prostate cancer and its relationship with the genesis and progression of prostate cancer and with the expressions of bcl-2 and p53. Methods The expressions of clusterin, bcl-2, and p53 in 10 cases of normal prostatic tissues, 15 cases of benign prostatic hyperplasia (BPH), and 49 cases of prostate cancer were examined by immunohistochemical staining. Results The rates of strong positive or weak positive of clusterin in normal prostatic tissues, BPH, and prostate cancer were 10% (1/10), 66.6% (10/15), and 91.8% (45/49), respectively. The expression level of clusterin in prostate cancer tissues was significantly higher than that in normal prostatic tissues ($P<0.005$) and BPH ($P<0.005$), and was positively correlated with clinical stages ($P<0.001$) and pathological grades ($P<0.001$) of prostate cancer. The expression level of clusterin in prostate cancer was positively correlated with bcl-2 expression ($P<0.05$) and p53 expression ($P<0.001$). Conclusion Clusterin, closely associated with bcl-2 and p53, may play an important role in the genesis and progression of prostate cancer through the inhibition of apoptosis.

Key words: prostatic neoplasm; apoptosis; clusterin; p53; bcl-2; immunohistochemistry

Clusterin是一种新发现的凋亡抑制因子。Clusterin基因定位于8q21,编码由448个氨基酸组成的蛋白质。本研究采用免疫组织化学染色法检测新的凋亡抑制因子clusterin在前列腺癌组织中的表达及其与bcl-2和p53表达的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集我院近年来的根治性前列腺癌手术标本49例、良性前列腺增生(benign prostate hyperplasia, BPH)摘除术标本15例及尸检前列腺组织标本10例(正常对照组)。标本均经10%甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,留一张复诊。前列腺癌按Gleason评分分级:2~5分划分为高分化腺癌,共18例;6~8分为中分化腺癌,共15例;9~10分为低分化腺癌,共16例。另按Jewett方法分为A、B、C、D四期,各期分别为10、12、15、12例。

1.2 检测方法

采用S-P法。一抗clusterin鼠单抗为Santa Cruz公司产品,p53和bcl-2鼠单抗及SP试剂盒为福建迈新公司产品。实验按试剂盒说明书进行,用PBS代替一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判定

根据各免疫组化标记物在不同分组前列腺上皮组织中的表达强度与反应特点,在光镜中高倍镜下半定量划分反应等级:弱阳性(+):阳性细胞数<10%,显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色;强阳性(+++):阳性细胞数>60%,多数细胞呈黄至棕黄色染色;中度阳性(++):阳性细胞

作者简介:陈 刚(1975-),男,四川省隆昌县人,硕士研究生,医师,主要从事泌尿及男生殖系肿瘤方面的研究。电话:(023)89011009

收稿日期:2004-03-23;修回日期:2004-05-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间；凡显色强度与背景无明显差别者为阴性(－)。

1.4 统计学处理

采用SPSS12.0软件进行χ^2检验秩和检验及等级相关检验。

2 结果

2.1 Clusterin在正常前列腺组织、良性前列腺增生组织和前列腺癌组织中的表达(表1)

Clusterin的阳性表达主要位于胞浆，为黄色或黄棕色颗粒。Clusterin在前列腺癌组织中的阳性表达率为91.8%(45/49)，且多是中度阳性或强阳性；Clusterin在正常前列腺组织与良性前列腺增生组织中的阳性表达率分别为10%(1/10)和66.6%(10/15)，且是弱阳性。经秩和检验及两两组间比较表明：Clusterin在三者中的表达不同($H_C=21.28$，$P<0.05$)，在正常前列腺组织与良性前列腺增生组织中的表达差异无显著性($\chi^2=1.087$，$0.75>P>0.5$)，在正常前列腺组织与前列腺癌组织中的表达差异有显著性($\chi^2=24.54$，$P<0.05$)，在良性前列腺增生组织与前列腺癌组织中的表达差异有显著性($\chi^2=19.21$，$P<0.05$)，即前列腺癌组织中clusterin表达水平明显高于前列腺正常组织及增生组织。

表1 **Clusterin**在正常前列腺组织、良性前列腺增生组织和前列腺癌组织中的表达及与病理分级、临床分期的关系

Tab 1 Expression of clusterin in normal prostatic tissues, BPH and prostate cancer tissues and its relationship with the clinical stages and pathological types of prostate cancer

Type	*n*	Clusterin							
		－		＋		＋＋		＋＋＋	
		n	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%
Normal prostate	10	9	90.00	1	10.00	0	0	0	0
BPH	15	5	33.33	10	66.66	0	0	0	0
Prostate cancer	49	4	8.16	2	4.08	28	57.14	15	30.61
Gleason Grade									
High	18	3	16.66	1	5.55	14	77.77	0	0
Middle	15	1	6.66	1	6.66	11	73.33	2	13.33
Low	16	0	0	0	0	3	18.75	13	81.25
Stage									
A	10	2	20.00	1	10.00	7	70.00	0	0
B	12	1	8.33	1	8.33	9	75.00	1	8.33
C	15	1	6.66	0	0	10	66.67	4	26.67
D	12	0	0	0	0	2	16.67	10	83.33

2.2 前列腺癌组织中clusterin表达水平与肿瘤病理分级、临床分期的关系(表1)

等级相关检验表明：Clusterin在前列腺癌组织中的表达与肿瘤病理分级呈正相关($r_s=0.696$，$P<0.001$)，且与肿瘤临床分期呈正相关($r_s=0.645$，$P<0.001$)。

2.3 Clusterin在前列腺癌组织中的表达与bcl-2、p53表达的关系(表2)

bcl-2的阳性染色主要定位于胞浆，为黄色或黄棕色颗粒。bcl-2在前列腺癌组织中的阳性表达率为73.4%(36/49)，而p53的阳性表达则主要位于胞核，为黄色或黄棕色颗粒，其在前列腺癌组织中的阳性表达率为77.5%(38/49)。等级相关检验表明：Clusterin与bcl-2在前列腺癌组织中的表达呈正相关($r_s=0.308$，$P<0.05$)，Clusterin与p53在前列腺癌组织中的表达呈正相关($r_s=0.635$，$P<0.001$)。

表2 **Clusterin**、**bcl-2**和**p53**在前列腺癌组织中表达的关系

Tab 2 Relationship of the expression of clusterin in prostate cancer with the expressions of bcl-2 and p53

Type	*n*	Clusterin							
		－		＋		＋＋		＋＋＋	
		n	%	*n*	%	*n*	%	*n*	%
bcl-2									
－	13	2	15.38	0	0	9	69.23	2	15.38
＋	14	1	7.14	1	7.14	8	57.14	4	28.57
＋＋	14	1	7.14	1	7.14	9	64.29	3	21.43
＋＋＋	8	0	0	0	0	2	25.00	6	75.00
p53									
－	11	3	27.27	1	9.09	7	63.64	0	0
＋	12	0	0	1	8.33	9	75.00	2	16.67
＋＋	16	1	6.25	0	0	11	68.75	4	25.00
＋＋＋	10	0	0	0	0	1	10.00	9	90.00

3 讨论

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动性程序性死亡过程。凋亡的调控异常可能导致肿瘤、神经退行性疾病或其他病理的变化。许多研究证实：凋亡的抑制是肿瘤发生发展的重要原因。Clusterin是一种凋亡抑制因子。Sintich等[1]认为clusterin是一种“粘蛋白”，它可能直接与细胞毒TNF分子相互作用，而使靶细胞无法获得细胞因子。另可能clusterin是在TNF的受体水平发挥作用。Clusterin与表面分子(如鞘磷脂)相互作用，干涉TNF的信号传导。Sintich等[1]用TNF诱导前列腺癌细胞凋亡，观察到clusterin可对抗TNF的细胞凋亡作用。本实验采用免疫组织化学方法在蛋白水平检测clusterin的表达。结果表明前列腺癌组织中表达水平明显高于前列腺正常组织及增生组织，且在癌组织中与肿瘤临床分期、病理分级呈正相关。Steinberg等[2]用免疫组化测定40例前列腺癌根治术标本和穿刺活检标本(包括各期)的clusterin，发现前列腺癌标本表现出程度不同的染色，并与Gloason评分有关，故认为高水平clusterin与前列腺癌侵袭性有关。综上，clusterin基因可能通过抑制凋亡而参与前列腺癌的发生发展，可望成为前列腺癌诊断和评估预后的指标。

本实验结果表明：Clusterin在前列腺癌组织中的表达与bcl-2表达密切相关。bcl-2分布于线粒体膜上，通过改变线粒体的通透性，阻止细胞色素C的释放，并阻止细胞色素C与蛋白酶活性因子1(Apaf-1)的结合，从

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

而抑制凋亡。另 bcl-2 可能通过阻止胞浆内钙离子浓度增加来抑制凋亡。Clusterin 和 bcl-2 执行各自不同的抗凋亡功能, 在前列腺癌的发生发展过程中, 这两条抗凋亡途径可能起协同作用。本实验结果表明: Clusterin 在前列腺癌组织中的表达与 P53 表达密切相关。野生型 P53 基因诱导凋亡的作用, 对 bcl-2 基因表达有下调作用, 而对 Bax 基因进行上调。突变型 P53 则失去了诱导凋亡的功能, 而大多数肿瘤存在 P53 的高突变率。野生型 P53 基因是否也对 clusterin 基因在前列腺癌组织中的表达存在下调作用, 还有待进一步证实。

前列腺癌, 尤其是激素非依赖性前列腺癌缺乏十分有效的治疗方法。许多研究证实通过诱导凋亡有望提高其治疗效果。Mikata 等[3] 将野生型 P53 基因转染入前列腺癌 Pc3 细胞系。结果: 转染了野生型 P53 基因的肿瘤的生长被显著抑制。Gleave 等[4] 对激素非依赖性前列腺癌的小鼠模型去势后, 将 bcl-2 反义核苷酸导入小鼠模型, 结果 bcl-2 表达明显降低, PSA 水平明显下降, 瘤体缩小。Miyake 等[5] 检测反义 clusterin 寡聚多核苷酸处理过的 Shionogi 肿瘤模型, 发现肿瘤出现更快的凋亡, 雄激素非依赖性的出现明显推迟, 故认为 clusterin 是一种抗凋亡基因可加速雄激素非依赖性的进展。Gleave 等[6] 用 clusterin 反义寡核苷酸作用于雄激素非依赖性前列腺癌, 发现在动物模型中与紫彬醇有相同作用, 可提高肿瘤的凋亡率和消退率。综上, clusterin 不仅可望成为前列腺癌诊断和评估预后的指标而且有望成为前列腺癌, 尤其是激素非依赖性前列腺癌治疗的新的靶目标。

参考文献:

[1] Sintich S M, Steinberg J, Kozlowski J M, *et al*. Cytotoxic sensitivity to tumor necrosis factor-alpha in PC3 and LNCaP prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2 (clusterin) [J]. Prostate, 1999, 39 (2): 87—93.

[2] Steinberg J, Oyasu R, Lang S, *et al*. Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(10): 1707—1711.

[3] Mikata K, Uemura H, Ohuchi H, *et al*. Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of P53 gene: gene transfer by electroporation[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(4): 247—252.

[4] Gleave M, Tolcher A, Miyake H, *et al*. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisene Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(10): 2891—2898.

[5] Miyake H, Nelson C, Rennie P S, *et al*. Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(1): 170—176.

[6] Gleave M E, Miyake H, Zellweger T, *et al*. Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, Clusterin/testosterone-repressed prostate message 2 to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer[J]. Urology, 2001, 58(2 Suppl 1): 39—49.

(编辑　陈聪连)

(上接 1572 页)

2　结果

RT-PCR 扩增人的 TNFRI 片段, 获得大小约 712 bp 的 DNA 片段, 因有非特异性扩增, 采用巢式 PCR 技术扩增特异性片段, 可见约 500 bp 的 DNA 片段, 将其纯化后克隆于 PDM18-T 载体测序。结果所获得序列经 GenBank 检索为 TNFRI。将目的片段克隆于 PGBKT7-DNA-BD 中经 *Sal*Ⅰ 和 *Eco*RⅠ 双酶切筛选阳性重组子最后获得 TNFI 的酵母双杂交表达载体。

3　讨论

人的 TNFRI 由 455 个氨基酸组成, 由一个疏水信号肽, 一个富含半光氨酸的细胞外区(约 182 氨基酸), 一个越膜区和一个细胞内区组成[2]。TNF-α 与细胞膜表面的 TNFRI 结合后[1], 激活膜结合的磷酸酰胆碱特异性的磷脂酶 C (PC-PLC)和酸性神经磷脂酶(asmase), asmase 进一步降解 I-KB, 从而激活 NF-KB, 调控基因的表达[3]。酵母双杂交系统是一个完整的已 GAL4 为基础的双杂合系统, 它不但可以鉴定蛋白质间的相互作用, 还有助于发现新基因, 对肽类药物的筛选也很有应用价值。酵母双杂交系统的原理主要是基于真核转录激活因子的转录激活作用是由功能相对独立的 DNA 结合结构域(binding domain, BD)和转录活化结构域(activation domain, AD)共同完成的[2], 这两个结构域通过共价或非共价连接建立的空间联系是导致结合和激活发生的关键[3,4]。根据这一特点, 如果使可能存在相互作用的两种蛋白 X 和 Y 分别以和 BD/AD 形成杂合蛋白的形式在酵母中表达并分布于细胞核中, X 与 Y 之间的相互作用就可以将 BD 和 AD 在空间结构上重新联结为一个整体而与报告基因的上游激活序列(upstream activation sequence)结合, 进而发挥激活转录的功能, 使受调控的报告基因得以表达。根据这一原理, 双杂交系统通过简便的酵母遗传分析对报告基因表型进行检测即可实现对于蛋白质间相互作用的研究。构建人的 TNFRI 受体酵母双杂交载体, 因其在酵母中表达, 很可能具有蛋白质天然构象。通过 TNF-RI 酵母双杂交表达载体的构建, 建立一个稳定的蛋白质间相互作用的方法, 为类似的研究提供了一个可靠的技术平台。

关键词: TNFRIcDNA; RT-PCR; 载体; 构建
中图法分类号: R394-33; R394.3　文献标识码: B

参考文献:

[1] 陆华中. TNF-α 与 TNF 受体超家族介导的信号传导[J]. 国外医学分子生物学分册, 1997, 19(3): 105—109.

[2] Sugana M, Tsuchida K, Toalita H, *et al*. Increased proliferation of endothelial cells with overexpression of soluble TNF-α receptor I gene[J]. Atherosclerosis, 2002. 162(5): 77—84.

[3] Knofler M, Mosl B, Bauer S, *et al*. TNF-α/TNFR in primary and immortalized first trimester cytorophoblasts[J]. Placenta, 2000, 21(6): 525—535.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net