

前列腺癌相关基因4在前列腺癌中的表达及其与预后的关系

孟冬冬, 吴军, 黄群^①

(右江民族医学院附属医院泌尿外科, 广西 百色 533000 E-mail: mdduro@163.com)

摘要:目的 探究前列腺癌相关基因4(PAGE4)在前列腺癌中的表达及其与预后的关系。方法 以前列腺癌组织(Tum)及癌旁正常组织(Non-tum)标本85例作为研究对象,应用免疫组织化学分析的方法,检测癌组织中PAGE4蛋白表达情况,并分析其表达与临床病理参数及患者预后的关系。结果 在前列腺癌患者癌组织中PAGE4表达阳性率为92.94%,显著高于癌旁正常组织中表达阳性率18.82%($\chi^2=94.699, P<0.001$)。PAGE4表达水平与患者年龄、血清PSA水平无关。PAGE4高表达率在Gleason分级为2~4、5~7、8~10中分别为47.37%、63.89%、90.91%,三者之间差异有统计学意义($\chi^2=7.132, P=0.028$)。PAGE4高表达率在临床分期T1、T2、T3、T4中分别为25.00%、45.83%、66.67%、78.26%,四者之间差异有统计学意义($\chi^2=9.841, P=0.020$)。PAGE4高表达率在有淋巴结转移中为20.00%,显著低于无淋巴结转移的88.00%($\chi^2=39.667, P<0.001$)。PAGE4高表达率在远处转移患者中为20.83%,显著低于无远处转移患者的75.41%,差异有统计学意义($\chi^2=21.376, P<0.001$)。结论 前列腺癌组织中PAGE4蛋白高表达与患者Gleason分级及临床分期有关,低表达与淋巴结转移及肿瘤远处转移有关,高表达与患者预后不良有关,可作为前列腺癌预后判断潜在的生物标志物。

关键词: 前列腺肿瘤;前列腺癌相关基因4;预后;免疫组织化学

中图分类号: R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2018)03-0227-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.03.005

Expression of PAGE4 in prostate cancer and its relationship with prognosis

Meng Dongdong, Wu Jun, Huang Qun

(Department of Urology Surgery, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: huangqundao@163.com)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of prostate-associated gene 4 (PAGE4) in prostate cancer and its relationship with prognosis. **Methods** A total of 85 cases of prostate cancer tissue (Tum) and non-tum tissue (Non-tum) were studied. Immunohistochemistry was used to detect the expression of PAGE4 protein in cancer tissues. The relationship between the expression of PAGE4 and clinicopathological parameters and prognosis were also analyzed. **Results** The positive rate of PAGE4 expression in cancer tissues of prostate cancer patients was 92.94% which was significantly higher than that of adjacent normal tissues 18.82% ($\chi^2=94.699, P<0.001$). PAGE4 expression level had no correlation with age and serum PSA level of patients. PAGE4 high expression rate was 47.37%, 63.89% and 90.91% respectively in Gleason grade 2-4, 5-7 and 8-10, and the differences among them were statistically significant ($\chi^2=7.132, P=0.028$). The high expression rate of PAGE4 in clinical stages T1, T2, T3 and T4 was 25.00%, 45.83%, 66.67% and 78.26% respectively, and the differences among them were statistically significant ($\chi^2=9.841, P=0.020$). The high expression rate of PAGE4 in patients with lymph node metastasis was 20.00% which was significantly lower than that in patients without lymph node metastasis 88.00% ($\chi^2=39.667, P<0.001$), and the high expression rate of PAGE4 in patients with distant metastasis was 20.23% which was significantly lower than that in patients without distant metastasis 75.41% ($\chi^2=21.376, P<0.001$), and the above two differences were all statistically significant. **Conclusion** The high expression of PAGE4 protein in prostate cancer is related to the Gleason grading and clinical stage, and the low expression of it is related to lymph node metastasis and distant metastasis of tumor. The high expression of PAGE4 is also related to the poor prognosis of patients with prostate cancer and it can be used as a possible biomarker of prostate cancer prognosis.

Key words: prostate tumor; prostate-associated gene 4; prognosis; immunohistochemistry

^① 通信作者, E-mail: huangqundao@163.com

前列腺癌(Prostate cancer, PC)是男性群体中最常见的肿瘤之一,其死亡率居西方国家恶性肿瘤的第二位,已成为全球第四大常见癌症,其发病率在我国老年男性群体中逐年上升^[1]。探究前列腺癌发生、发展的相关机制,改善患者预后以提高患者生存率成为目前研究的热点。前列腺癌相关基因 4(Prostate-associated gene 4, PAGE4)是癌症/睾丸抗原(CTAs)成员之一,其表达仅局限于前列腺、睾丸和子宫等正常生殖组织,在良性和恶性前列腺疾病中起重要作用^[2]。然而,前列腺癌组织中 PAGE4 蛋白表达与患者临床病理特征的关系,及其与患者预后的关系尚未明了,本研究以此为目的,以期前列腺癌的预后判断提供一定参考价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2011 年 8 月—2013 年 6 月行经尿道前列腺切除术(TURP)或耻骨上前列腺摘除术患者的前列腺癌组织及癌旁正常组织标本 85 例,年龄 40~85 岁,平均(68±10)岁,术后经病理确诊,所有患者于术前均未进行任何抗肿瘤治疗。术前前列腺特异性抗原(PSA)水平、临床分期、病理分级、术后转移与否等临床病理资料完整。术后随访 1~60 个月。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器 PAGE4 单克隆抗体(Bio-synthesis Biotechnology);免疫组织化学 SP 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);自动切片机(Leica);荧光显微镜(Leica)。

1.2.2 免疫组织化学 石蜡包埋组织标本的组织切片(6 μm)用二甲苯脱蜡,使用分级酒精系列水合。将样品在 0.01M 柠檬酸钠(pH 6.0)中孵育 20 min 进行抗原恢复,3%过氧化氢中孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性,10%正常山羊血清中孵育 30 min 以阻断非特异性染色。PAGE4(1:200)的一抗将切片在 4℃孵育过夜。用磷酸盐缓冲溶液(PBS)孵育的切片作为阴性对照。将切片与生物素化的二抗孵育 30

min,然后用链霉亲和素过氧化物酶孵育 15 min。每个孵育步骤均在 37℃下进行,然后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。除去 PBS,加入 100 μl DAB 溶液,于显微镜下观察,直到显色。自来水冲洗后,用苏木精进行复染,氨水反蓝后用自来水冲洗。最后,将切片在乙醇中脱水并在二甲苯中透明。

1.2.3 观察指标及评分标准 PAGE4 蛋白在细胞内染色后阳性表达呈棕黄色颗粒。染色强度由两名对临床和病理资料不知情的病理学家独立进行评分。取 10 个典型显微镜下视野观察阳性染色细胞比例,联合染色强度,共同确定表达水平:阳性细胞数比例<10%或未染色,记为(-);阳性细胞数比例 10%~20%而染色弱至中等强度,记为(+);阳性细胞比例 10%~20%而染色强,或阳性细胞比例 20%~50%而染色弱至中等,记为(++);阳性细胞比例 20%~50%而染色强,或阳性细胞比例>50%,记为(+++)。其中, PAGE4 表达(-)和(+)定义为低表达,(++)和(+++)定义为高表达。

1.3 统计学方法 本研究所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,行 *t* 检验或 *F* 检验。前列腺癌组织中 PAGE4 表达与前列腺癌患者临床病理参数之间的关系采用(*n*,%)表示,行 χ^2 检验进行分析。生存曲线评估采用 Kaplan-Meier 法,组间比较采用 Log-rank 法。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌肿瘤组织中 PAGE4 蛋白表达情况 免疫组织化学结果显示,在前列腺癌患者癌组织中 PAGE4 表达阳性率为 92.94%(79/85),而在癌旁正常组织中表达阳性率为 18.82%(16/85)。在肿瘤组织中表达阳性率显著高于癌旁正常组织($\chi^2 = 94.699$, *P* < 0.001)。镜下可见,癌组织中 PAGE4 阳性表达细胞的细胞膜和细胞质内呈棕黄色颗粒染色,而在癌旁正常组织细胞仅有弱 PAGE4 阳性表达。见图 1。

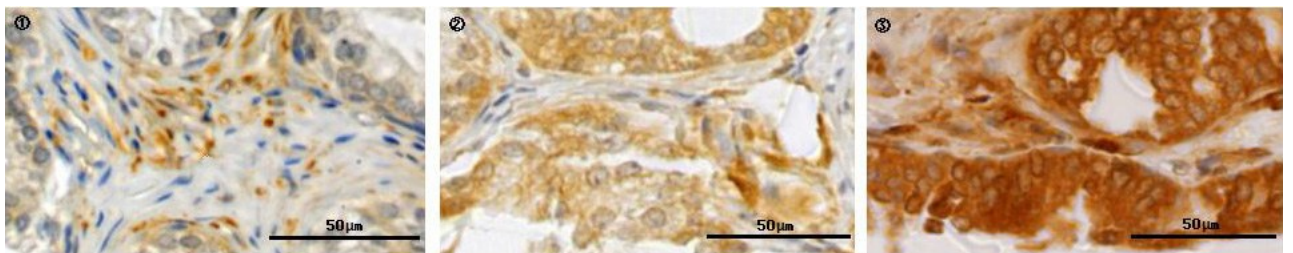


图 1 前列腺癌肿瘤组织中 PAGE4 蛋白表达情况

注:①癌旁正常组织;②PAGE4 低表达肿瘤组织;③PAGE4 高表达肿瘤组织

2.2 PAGE4 表达与前列腺癌患者临床病理特征的关系

PAGE4 表达与患者年龄、血清 PSA 水平无关,而

与 Gleason 分级、临床分期、淋巴结转移、远处转移等临床病理特征有关。PAGE4 高表达率在 Gleason 分级为 2~4、5~7、8~10 三者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PAGE4 高表达率在临床分期 T1、T2、T3、T4 三者之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PAGE4 在有淋巴结转移患者中的表达率低于无淋巴结转移患者,且 PAGE4 在远处转移患者中的表达率低于无远处转移患者,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 PAGE4 表达与前列腺癌患者临床病理特征的关系

| 临床病理特征 | n | PAGE4 表达 (n, %) | | χ^2 | P |
|---------------|----|-----------------|-----------|----------|--------|
| | | 低表达 | 高表达 | | |
| 年龄(岁) | | | | 1.561 | 0.212 |
| <65 | 26 | 13(50.00) | 13(50.00) | | |
| ≥65 | 59 | 21(35.59) | 38(64.41) | | |
| 血清 PSA(ng/ml) | | | | 1.919 | 0.166 |
| <4 | 11 | 7(63.64) | 4(36.36) | | |
| ≥4 | 74 | 27(36.49) | 47(63.51) | | |
| Gleason 分级 | | | | 7.132 | 0.028 |
| 2~4 | 38 | 20(52.63) | 18(47.37) | | |
| 5~7 | 36 | 13(36.11) | 23(63.89) | | |
| 8~10 | 11 | 1(9.09) | 10(90.91) | | |
| 临床分期 | | | | 9.841 | 0.020 |
| T1 | 8 | 6(75.00) | 2(25.00) | | |
| T2 | 24 | 13(54.17) | 11(45.83) | | |
| T3 | 30 | 10(33.33) | 20(66.67) | | |
| T4 | 23 | 5(21.74) | 18(78.26) | | |
| 淋巴结转移 | | | | 39.667 | <0.001 |
| 无 | 50 | 6(12.00) | 44(88.00) | | |
| 有 | 35 | 28(80.00) | 7(20.00) | | |
| 远处转移 | | | | 21.376 | <0.001 |
| 无 | 61 | 15(24.59) | 46(75.41) | | |
| 有 | 24 | 19(79.17) | 5(20.83) | | |

2.3 PAGE4 表达与前列腺癌患者预后的关系 85 例患者在 5 年随访过程中死亡 37 例,其中 PAGE4 高表达患者 30 例,低表达患者 7 例。Kaplan-Meier 生存分析显示,85 例患者的 5 年总体生存率为 56.47% (48/85),其中 PAGE4 高表达患者 5 年总体生存率为 41.18% (21/51),低于 PAGE4 低表达患者的 79.41% (27/34), $\chi^2 = 12.133$, $P = 0.002$ 。从图 2 可以看出,高表达组较低表达下降速度快,高表达组生存率较低。

3 讨论

PAGE4 是一种本质上无序的蛋白质(IDP),其作为应激反应蛋白起到抑制活性氧并防止 DNA 损伤的作用。此外,PAGE4 也是一种转录调节因子,能促进致癌基因 c-Jun 的反式激活,而 c-Jun 进一步通过与 Fos 家族成员异源二聚体化形成 AP-1 复合物,从而在前列腺的发育和病理学中起重要作用^[3]。已有研究发现,PAGE4 蛋白在前列腺、睾丸、输卵管、子宫及胎盘

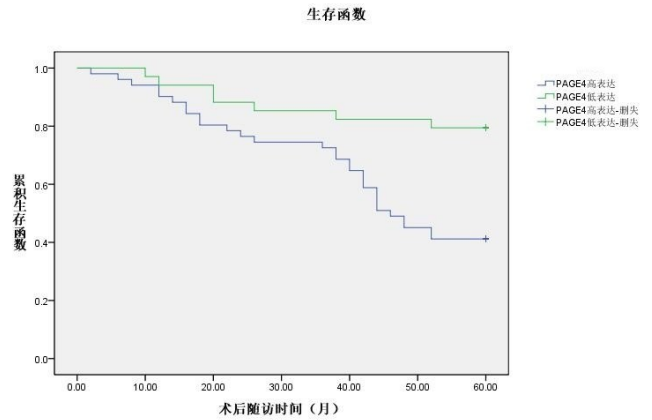


图 2 PAGE4 表达与前列腺癌患者预后的关系

组织等生殖系统中特异性表达,而在非生殖组织中,PAGE4 仅在胰腺组织中少量表达^[4],PAGE4 优先在正常的雄性和雌性生殖组织以及包括前列腺癌在内的多种癌症中表达。PAGE4 不仅在前列腺癌组织中高度表达,且在良性前列腺增生组织的基质和平滑肌细胞中表达上调,且在前列腺癌中阳性表达率显著高于良性前列腺病变^[5]。本研究中发现,与癌旁正常前列腺组织相比,PAGE4 蛋白在前列腺癌组织中的阳性表达率显著增加。然而,前列腺癌组织中 PAGE4 蛋白表达情况与患者临床病理特征的关系,及其对患者预后的预测价值尚不明了。

本研究发现,PAGE4 表达水平与患者年龄、血清 PSA 水平无关,而与 Gleason 分级、临床分期、淋巴结转移、远处转移等临床病理特征有关。随肿瘤恶性程度的增加,PAGE4 蛋白表达逐渐上调,PAGE4 表达上调与前列腺癌 Gleason 分级有关。研究表明,PAGE4 表达可作为前列腺癌 Gleason 分级和恶性程度判断的生物指标之一。另外,随着前列腺癌临床分期的增加,PAGE4 表达水平逐渐上调,表明 PAGE4 表达上调与疾病进展相关。这些结果说明,癌组织 PAGE4 表达失调与前列腺癌的发病进程相关,可预测前列腺癌的发病进展,并判断患者的恶性程度。过往研究发现,在转移性前列腺癌中 PAGE4 mRNA 呈低表达^[6],与此一致。本研究发现,有淋巴结转移或远处转移患者 PAGE4 表达率显著低于无淋巴结转移或无远处转移患者,提示当出现淋巴结转移时,前列腺癌肿瘤组织中 PAGE4 表达水平降低。然而,PAGE4 表达在肿瘤浸润、转移中的作用及相关机制还有待深入探究。

对患者进行 Kaplan-Meier 生存分析发现,PAGE4 高表达患者 5 年生存率显著低于 PAGE4 低表达患者,说明,PAGE4 表达失调与前列腺癌患者的生存预后有关,可作为前列腺癌预后判断的潜在生物标志物。

(下转第 253 页)

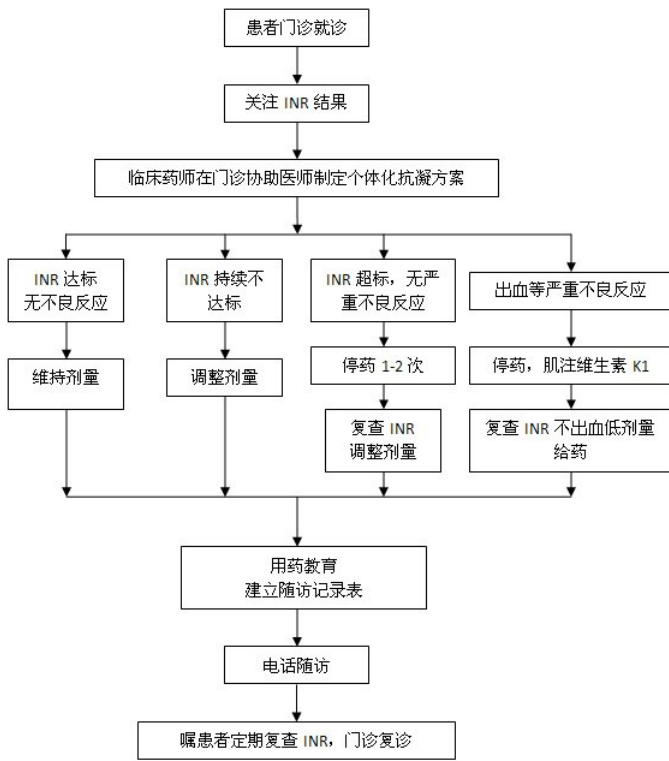


图 1 门诊患者华法林抗凝治疗药学服务模式

本研究结果还显示,随访组与对照组均发生 1 例主要出血不良反应,需门诊注射维生素 K₁ 注射液,差异无统计学意义。但从临床实际情况考虑,我们认为抗凝门诊模式的建立能及时判断出血是否因为服用华法林导致,提供药学干预或许有助于降低出血药物不良反应的发生率。

由于本研究的随访周期短,随访期间,所有患者均未出现因血栓栓塞再次住院的不良事件。因此本文难以评估,抗凝门诊模式对血栓栓塞发生的风险。今后

可通过延长随访时间、涉及更多病种及科室、收集更多患者等方式调查抗凝门诊模式的建立对血栓发生的影响。

参考文献:

[1] 王长江,费爱丽,朱航,等. 我院非瓣膜性房颤患者抗凝治疗现状调查分析[J]. 中国药房,2017,28(11):1459-1462.

[2] 郑必龙,刘俊. 某三甲医院心房颤动患者华法林规范化抗凝治疗现状调查分析[J]. 药学与临床研究,2016,24(4):332-335.

[3] 中华医学会心血管病学分会,中国老年学学会心脑血管专业委员会. 华法林抗凝治疗的中国专家共识[J]. 中华内科杂志,2013,52(1):76-82.

[4] 朱国旺. 我国房颤抗凝治疗极低[J/OL]. 中国医药报,2013-11-7.

[5] 尤国皎,都丽萍,陈跃鑫,等. 我国已上市新型抗凝药物的特点及临床应用进展[J]. 临床药物治疗杂志,2017,15(1):1-7.

[6] 杜晓明,陈闯,秦炎寒,等. 非瓣膜性房颤患者华法林应用调查分析[J]. 中国药学杂志,2015,50(22):2000-2003.

[7] 柳亚敏,葛卫红. 美国抗凝治疗及药师角色[J]. 药学服务与研究,2009,9(6):425-427.

[8] BOUNDA Guy-Armel,郝智慧,葛卫红,等. 世界各地抗凝门诊简介及其对中国内地抗凝管理的启示[J]. 中国临床药学杂志,2010,19(4):257-262.

[9] Maynard G, Humber D, Jenkins I. Multidisciplinary initiative to improve inpatient anticoagulation and management of Venous thromboembolism [J]. Am J Health Syst Pharm,2014,71(4):305-310.

[10] 广东省药学会. 药师与医师抗栓治疗协议推荐文本[J]. 今日药学,2017,27(4):217-224.

[11] 丁征,王莹,潘文斐,等. 抗凝门诊模式的建立和展望[J]. 临床药物治疗杂志,2016,14(2):40-43.

收稿日期:2018-04-09;修回日期:2018-06-15

(上接第 229 页)

综上所述,淋巴结转移、肿瘤远处转移与 PAGE4 蛋白表下调有关,Gleason 分级及临床分期与 PAGE4 蛋白表达上调有关,其高表达与患者预后不良有关,可作为前列腺癌预后判断的潜在生物标志物。

参考文献:

[1] 张强,尚东浩,陈博君,等. 直肠超声引导下经会阴 24 针前列腺饱和穿刺活检术在 PSA 4~10μg/L 前列腺癌患者筛查中的作用研究[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(3):218-221.

[2] Gjerstorff MF, Ditzel HJ. An overview of the GAGE cancer/testis antigen family with the inclusion of newly identified members[J]. Tissue Antigens,2008,71(3):187-192.

[3] Rajagopalan K, Qiu R, Mooney SM, et al. The Stress-re-

sponse protein prostate-associated gene 4, interacts with c-Jun and potentiates its transactivation[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1842(2):154-163.

[4] 蓝天,陈丽华,庄然,等. PAGE-4 单克隆抗体的制备及表达分布[J]. 第四军医大学学报,2004,25(23):2117-2120.

[5] Prakash Kulkarni, A Keith Dunker, Keith Weninger, et al. Prostate-associated gene 4 (PAGE4), an intrinsically disordered cancer/testis antigen, is a novel therapeutic target for prostate cancer[J]. Asian Journal of Andrology,2016,18(5):695-703.

[6] Takumi S, Naoki T, Zeng Y, et al. Cancer/Testis antigens as potential predictors of biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy[J]. Journal of Translational Medicine,2011,9(1):1-9.

收稿日期:2018-04-24;修回日期:2018-06-21