

## 5 项指标在前列腺癌中的表达及其相关性研究\*

张文静(湖北省武汉市蔡甸区中医医院检验科 430100)

**【摘要】** 目的 探讨雄激素受体辅助因子 55(ARA55)、雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$ 、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、Smad7 蛋白在前列腺癌中的表达及其相关性。方法 收集人前列腺癌组织标本(30 例)、前列腺增生标本(15 例)和正常前列腺组织标本(15 例),采用免疫组织化学和实时定量 PCR 方法,分析并比较上述样本中 ARA55、雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、Smad7 蛋白和 mRNA 表达水平;根据上述指标免疫组织化学染色结果,分析 5 项指标之间表达的相关性。结果 在前列腺癌组织中,ARA55 表达下降,其表达明显低于前列腺增生组织和正常前列腺组织( $P < 0.05$ );并且 ARA55 表达水平随着前列腺癌分级的上升和分期的提高而表达下降( $P < 0.05$ );前列腺癌组织中雌激素受体  $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、Smad7 表达水平均明显高于对照组( $P < 0.05$ ),雌激素受体  $\beta$  表达水平明显低于对照组( $P < 0.05$ );雌激素受体  $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、Smad7 表达随着 Gleason 评分的升高、肿瘤分期的提高,表达明显升高( $P < 0.05$ ),雌激素受体  $\beta$  表达随着 Gleason 评分的升高、肿瘤分期的提高,表达明显降低( $P < 0.05$ )。ARA55 表达与雌激素受体  $\beta$  呈明显正相关( $P < 0.05$ ),ARA55 表达与 TGF- $\beta$  呈明显负相关( $P < 0.05$ );雌激素受体  $\beta$  表达与 TGF- $\beta$  呈明显负相关( $P < 0.05$ )。结论 前列腺癌中,ARA55 表达下降,雌激素受体  $\alpha$ 、TGF- $\beta$  及 Smad7 蛋白表达均上调,雌激素受体  $\beta$  表达下调,提示这些蛋白分子的表达改变参与前列腺癌的发生、发展的进展行为之中,可能作为标志物用来预测前列腺癌患者的预后。

**【关键词】** 雄激素受体辅助因子 55; 前列腺癌; 雌激素受体; 转化生长因子- $\beta$

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.028 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)10-1373-03

我国前列腺癌发病率逐年上升,但是目前对前列腺癌发病和进展转移机制,一直未能完全明了<sup>[1-2]</sup>。最近的研究表明,激素、家族史、种族、炎症都在前列腺癌发病中起着非常重要的作用;尤其是激素,包括雄激素、雌激素及一些雄激素受体辅助因子,在前列腺癌发病进展中的作用都是至关重要的。研究已经广泛证实,雄激素-雄激素受体信号通路在男性正常性功能维持、性腺发育等方面都发挥重要的调节作用<sup>[3]</sup>。研究表明:在胚胎时期,前列腺发生和发育过程中,前列腺的生理功能,以及前列腺癌发生进展等阶段,雄激素和雄激素受体信号通路均起到极为重要的作用。雄激素受体是一种甾体激素,属于甲状腺激素-视黄酸核受体超家族成员之一<sup>[4-5]</sup>。作为一种重要的信号转录因子,雄激素受体能够调节包括睾酮和双氢睾酮在内的雄激素在靶器官或者组织内的作用<sup>[6]</sup>。在本研究中,对人前列腺癌中的雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$ 、雄激素受体辅助因子 55(ARA55)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )和 Smad7 表达水平进行了分析,为进一步的研究提供理论依据。现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2013 年 1 月至 2014 年 12 月前列腺癌患者 30 例经病理检查证实的原发性前列腺癌组织为试验材料,并收集所有组织来源患者的病历资料;收集同期 15 例意外死亡供体来源健康男性前列腺标本作为对照标本;收集 15 例前列腺增生患者的经尿道等离子前列腺电切术手术标本。前列腺癌组患者平均年龄(69.2±6.8)岁;Gleason 评分 8~10 分 7 例,7 分 11 例,6 分 12 例;前列腺癌 TNM 分期:T1 期 4 例,T2 期 18 例,T3 期 3 例,T4 期 5 例。本研究经医院伦理学委员会审查同意,所有研究对象均签署志愿参与医学研究同意书。

**1.2 主要试剂** 羊抗人 ARA55 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,SC-16176)、兔抗人雌激素受体  $\alpha$  多克隆抗体(SC-543)、羊

抗人雌激素受体  $\beta$  多克隆抗体(SC-6820)、小鼠抗人 Smad7 单克隆抗体(SC-365846)、小鼠抗人 TGF- $\beta$  单克隆抗体(SC-52829)为一抗,稀释浓度为 1:200。HRP 标记的山羊抗兔抗体、HRP 标记的鼠抗羊抗体和兔抗鼠抗体为二抗(即用型),购于 SIGMA 公司,1:2 000 稀释。其余试剂还包括氯仿(武汉生物试剂化学公司)、异丙醇(武汉生物化学试剂公司)、Taq 酶(北京博大泰克生物技术公司)、TRIzol 试剂(美国 invitrogen 公司)、溴化乙啶(美国 Alfa Aesar 公司)、无水乙醇(武汉生物化学试剂公司)、焦碳酸二乙酯(DEPC,上海华舜生物技术公司)、标记物 DNA Marker(上海天根生物工程技术有限公司)、反转录试剂盒(Fermentas 公司)、实时定量 PCR Master Mix(进口捷恩麦克生物科技 GMbiolab)。

**1.3 方法** 首先将留取的组织块石蜡包埋,切片后进行苏木精-伊红(HE)染色,参照患者术后病理切片结果,以确定前列腺癌组织的具体部位,并对留取标本进行进一步证实。将石蜡组织切片进行常规脱蜡和水化(二甲苯 3 次,每次 10 min,并用不同浓度乙醇水化);0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,每次 3 min;将切片浸入蒸馏水漂洗后,再放入苏木精水溶液中进行染色数分钟;酸溶液及氨水碱溶液中进行分色,每种溶液 10 s;自来水冲洗 10 min 后,蒸馏水漂洗;分别浸入 70%乙醇和 90%乙醇中脱水,每次 10 min;将切片放入酒精伊红染色液中进行染色,2~3 min;用 100%乙醇进行脱水,再用二甲苯浸泡切片使切片透明;中性树脂覆盖组织,切片封片;结果观察、拍照。前列腺癌组织、前列腺增生组织及正常前列腺组织的石蜡切片,进行免疫组织化学染色,检测前列腺癌 ARA55、雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$ 、TGF- $\beta$  和 Smad7 蛋白的表达;实时定量 PCR 检测 ARA55、Smad7、雌激素受体、TGF- $\beta$  mRNA 表达。以上操作均严格按照试剂盒说明进行。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,

\* 基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2014CDB06802)。

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用  $F$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 ARA55 检测结果** ARA55 在前列腺癌细胞中阳性表达, 表达在前列腺癌细胞核内, 而且在前列腺增生组织和正常前列腺组织中也有阳性表达, 见图 1。前列腺癌细胞核中的 ARA55 表达水平明显低于前列腺增生组织和正常前列腺组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。随着肿瘤分期的上升, ARA55 表达明显下降 ( $P < 0.05$ ); 而且随着 Gleason 评分的升高, ARA55 表达水平也明显下降 ( $P < 0.05$ )。但

ARA55 表达水平与患者血前列腺特异抗原 (PSA) 水平、年龄无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。见表 2。

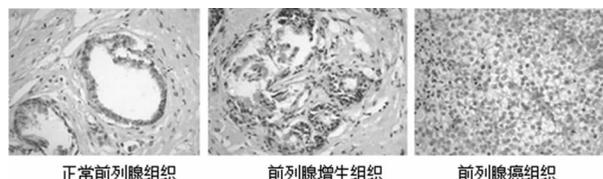


图 1 正常前列腺组织、前列腺增生组织和前列腺癌组织中 ARA55 表达 ( $\times 200$ )

表 1 各组织免疫组织化学分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

组织类型	n	雌激素受体 $\alpha$	雌激素受体 $\beta$	TGF- $\beta$	smad7	ARA55
正常前列腺组织	15	72.81 $\pm$ 3.03	6 132.24 $\pm$ 208.55	21.63 $\pm$ 1.77	481.84 $\pm$ 30.26	6 408.50 $\pm$ 318.01
前列腺增生组织	15	93.24 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>	59.13 $\pm$ 6.04 <sup>a</sup>	4 371.93 $\pm$ 130.93	4 646.88 $\pm$ 301.04	3 683.58 $\pm$ 251.52
前列腺癌组织	30	5 081.99 $\pm$ 217.67 <sup>ab</sup>	33.90 $\pm$ 2.58 <sup>ab</sup>	7 131.83 $\pm$ 492.74 <sup>ab</sup>	9 771.21 $\pm$ 171.62 <sup>ab</sup>	1 337.49 $\pm$ 229.85 <sup>ab</sup>

注: 与正常前列腺组织比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与前列腺增生组织比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 前列腺癌组织中各指标表达与临床参数之间的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标		ARA55	雌激素受体 $\alpha$	雌激素受体 $\beta$
Gleason 评分	6 分	1 430.92 $\pm$ 287.03	4 588.41 $\pm$ 1 166.32	6 737.14 $\pm$ 1 345.95
	7 分	1 322.64 $\pm$ 185.93 <sup>a</sup>	5 211.64 $\pm$ 1 061.12 <sup>a</sup>	6 130.64 $\pm$ 888.64 <sup>a</sup>
	8~10 分	1 105.00 $\pm$ 275.66 <sup>a</sup>	5 803.71 $\pm$ 880.20 <sup>a</sup>	5 810.67 $\pm$ 825.51 <sup>a</sup>
肿瘤分期	T1~T2	1 390.15 $\pm$ 206.36	4 889.65 $\pm$ 1 068.85	7 772.50 $\pm$ 363.33
	T3~T4	827.75 $\pm$ 76.12 <sup>b</sup>	6 471.00 $\pm$ 358.64 <sup>b</sup>	6 190.35 $\pm$ 1 024.12 <sup>b</sup>
血 PSA 水平	<10 ng/mL	1 364.5 $\pm$ 230.29	4 882.46 $\pm$ 1 156.72	5 802.09 $\pm$ 972.07
	10~20 ng/mL	1 364.5 $\pm$ 230.29	5 603.36 $\pm$ 1 141.45	6 792.46 $\pm$ 917.72
	>20 ng/mL	1 245.43 $\pm$ 414.74	4 708.88 $\pm$ 976.52	6 687.38 $\pm$ 1 261.26
年龄	<60 岁	1 201.00 $\pm$ 303.00	4 954.00 $\pm$ 2 309.66	6 396.67 $\pm$ 1 610.63
	60~70 岁	1 383.89 $\pm$ 279.79	4 815.89 $\pm$ 1 040.58	6 546.00 $\pm$ 1 029.46
	>70 岁	1 299.83 $\pm$ 274.69	5 267.22 $\pm$ 999.72	6 329.72 $\pm$ 1 120.58

注: 与 Gleason 评分 6 分比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 T1~T2 分期比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$  的表达** 前列腺癌组织细胞核表达雌激素  $\alpha$  和  $\beta$  受体阳性, 见图 2。正常前列腺上皮组织和前列腺增生中的前列腺上皮细胞同样也表达雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$ 。前列腺癌组织中的雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$  表达水平明显高于正常前列腺组织和前列腺增生组织 ( $P < 0.05$ ), 前列腺增生组织中的雌激素受体  $\alpha$  和  $\beta$  表达水平也高于正常前列腺上皮细胞 ( $P < 0.05$ )。雌激素受体  $\alpha$  与前列腺癌分期上升, 以及 Gleason 评分升高有明显关系 ( $P < 0.05$ ); 随着肿瘤分期的上升, 以及 Gleason 评分的升高, 雌激素受体  $\beta$  表达下降 ( $P < 0.05$ ); 但是雌激素  $\alpha$  受体和  $\beta$  受体表达与患者的年龄和血 PSA 之间没有相关关系 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。雌激素受体  $\beta$  水平与 ARA55 表达具有明显正相关关系 ( $r = 0.43, P < 0.05$ ); 而雌激素受体  $\alpha$  与

ARA55 表达无相关性 ( $P > 0.05$ )。

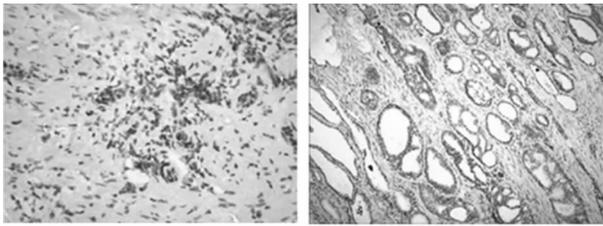
**2.3 TGF- $\beta$  和 Smad7 表达** 在前列腺癌中, TGF- $\beta$  和 Smad7 表达水平均高于前列腺增生组织和正常前列腺组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。雌激素受体  $\beta$  表达水平与 TGF- $\beta$  呈明显负相关 ( $r = -0.52, P < 0.05$ )。ARA55 与 TGF- $\beta$  表达水平亦呈明显负相关 ( $r = -0.32, P < 0.05$ )。

**2.4 各组织中 5 项指标的 mRNA 表达** 前列腺癌组织中的雌激素受体  $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、Smad7 的 mRNA 表达水平均高于相应的前列腺增生组织和正常前列腺组织, ARA55 和雌激素受体  $\beta$  的 mRNA 表达水平低于相应的前列腺增生组织和正常前列腺组织, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。这也与免疫组化染色的结果一致。见表 3。

表 3 各组织中 5 项指标的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组织类型	n	雌激素受体 $\alpha$	雌激素受体 $\beta$	TGF- $\beta$	Smad7	ARA55
正常前列腺组织	15	1.00 $\pm$ 0.01	6.13 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.02
前列腺增生组织	15	3.21 $\pm$ 0.03	3.02 $\pm$ 0.02	2.71 $\pm$ 0.05	3.08 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.01
前列腺癌组织	30	6.06 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	5.84 $\pm$ 0.03 <sup>ab</sup>	6.16 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.14 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>

注: 与正常前列腺组织比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与前列腺增生组织比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。



雌激受体α (×100)                      雌激受体β (×200)

图 2 前列腺癌组织中雌激素受体 α 和 β 表达

### 3 讨 论

事实上,在众多甾体类激素辅助激活蛋白分子中,ARA70 是第 1 个被发现的雄激素受体的辅助因子,但是 ARA55 与其具有同源性。虽然前列腺癌细胞 DU-145 的 ARA55 和 ARA70 转录活性均发生下调,但是研究也同时发现,这两种雄激素受体辅助因子还是具有一定的差别。首先,ARA55 与甾体类激素受体的亲和力强,而 ARA70 与雄激素受体的亲和力更强,这也就从另一个侧面证实本文的推测,ARA55 除了能够调节雄激素受体的活性以外,很可能还能够与其他甾体类激素相互作用,调节前列腺癌细胞的生长。其次,在雌激素,尤其是雌二醇存在的情况下,或者氟他胺存在的情况下,ARA55 上调雄激素受体转录活性的能力会明显下降;但是在同样条件下,对 ARA70 的研究却没有发现此现象。此外,也有研究认为,ARA55 能够上调癌细胞中 TGF-β 的水平,而其他一些研究则发现,雌激素能够上调乳腺癌细胞中的 TGF-β,从而促进乳腺癌的增殖、侵袭和转移。在小鼠中的研究也得到了类似的结果<sup>[7]</sup>。

前列腺癌组织中的免疫组织化学染色结果也表明,前列腺癌组织中 ARA55、雌激素受体 β 表达降低,两者呈明显正相关。ARA55 在前列腺癌中的作用远比想象的要复杂得多,很多研究结果并不一致,甚至是相悖的。因此这也促进本文去探究 ARA55 在前列腺癌中的作用。结果证实前列腺癌组织中 ARA55 表达是下降的,这也与大多数的研究结果是一致的。这表明 ARA55 虽然在一些研究中能够上调雌激素受体表达,但是可能存在其他通路,抑制前列腺癌的发展。

目前对于雌激素受体 β 在前列腺癌中的作用,研究相对比较深入。体外前列腺癌细胞系的研究结果发现,在 LNCaP, DU-145 中都发现雌激素受体 β 转录和表达,而在前列腺癌细胞系 PC-3 中,同时发现了雌激素受体 α 和 β 的表达。此外研究还发现雌激素受体 β 的转录水平随着前列腺癌非雄激素依赖的出现,其表达水平出现下降<sup>[8]</sup>。因此,推测雌激素受体 β 与前列腺癌的进展有关。本文的研究结果也证实了这个推测。研究同时还发现,雌激素受体 β 在雄激素非依赖的前列腺癌和转移性的前列腺癌中广泛表达<sup>[9]</sup>,但是目前对前列腺癌细胞中雌激素受体 β 的转录后的调节机制还不明确,目前相关的研究结果不多。另一方面,关于雌激素受体 α 在前列腺癌的表达的研究相对不多。根据现有的研究,雌激素受体 α 表达在前列腺癌的间质细胞,通过旁分泌的方式促进前列腺癌上皮细胞增殖。流行病学调查表明,雌激素受体 α 基因多态性与前列腺癌预后不良有关。对成年的雌激素受体 α 敲除小鼠注射雌二醇后,没有发现前列腺鳞状上皮化生<sup>[10]</sup>,但发现,前列腺内雌激素受体 α 的表达水平明显上升。但是在雌激素受体 α 表达阴性的大鼠中,却发现前列腺上皮内瘤的发生率明显降低。

TGF-β 是一种雌激素诱导的生长因子调节剂,能够诱导前

列腺上皮细胞的增殖。在大鼠中,上皮细胞和间质细胞均表达 TGF-β<sub>1</sub>、2、3。TGF-β<sub>2</sub> 的 mRNA 表达水平在去势以后明显上升,因此推测 TGF-β 能够引起前列腺上皮细胞的增殖。本研究也证实了前列腺癌组织中的 TGF-β 表达水平是明显上升的,至少说明 TGF-β 参与了前列腺癌的进展。另一方面本研究还发现,前列腺癌中 TGF-β 信号下游的抑制蛋白 Smad7 同样表达上升,但是具体原因并不清楚,本课题组也将在接下来的试验中继续探讨。

综上所述,本研究发现 ARA55、雌激素受体 β 在前列腺癌组织中低表达,雌激素受体 α 表达上调;且雌激素受体 β 表达与 ARA55 表达具有明显正相关关系,这与其他前列腺癌研究中观察到的现象是一致的。

### 参考文献

- [1] Morgentaler A. Testosterone therapy in men with prostate cancer: scientific and ethical considerations [J]. J Urol, 2013, 189(Suppl 1): S26-33.
- [2] Kumar R, Atamna H, Zakharov MN, et al. Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer and spinal and bulbar muscular atrophy [J]. Life Sci, 2011, 88(13/14): 565-571.
- [3] Bluemn EG, Nelson PS. The androgen/androgen receptor axis in prostate cancer [J]. Curr Opin Oncol, 2012, 24(3): 251-257.
- [4] Vasaitis TS, Njar VC. Novel, potent anti-androgens of therapeutic potential: recent advances and promising developments [J]. Future Med Chem, 2010, 2(4): 667-680.
- [5] Shah S, Small E. Emerging biological observations in prostate cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2010, 10(1): 89-101.
- [6] Mackinnon AC, Yan BC, Joseph LJ, et al. Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update [J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(7): 1033-1040.
- [7] Yang Z, Chang YJ, Miyamoto H, et al. Suppression of androgen receptor transactivation and prostate cancer cell growth by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 via interaction with androgen receptor coregulator ARA54 [J]. Endocrinology, 2007, 148(3): 1340-1349.
- [8] Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Arita S, et al. Hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) as a potential therapeutic target for vascular and other disorders [J]. J Atheroscler Thromb, 2012, 19(7): 601-607.
- [9] Li X, Martinez-Ferrer M, Botta V, et al. Epithelial Hic-5/ARA55 expression contributes to prostate tumorigenesis and castrate responsiveness [J]. Oncogene, 2011, 30(2): 167-177.
- [10] Wang Y, Li JQ, Shao C, et al. Androgen receptor coregulators NOCR1, TIF2, and ARA70 may account for the hydroxyflutamide insensitivity of prostate cancer cells [J]. Ir J Med Sci, 2011, 180(4): 865-872.