

·临床研究·

前列腺特异性膜抗原新型剪接变异体 PSM-E 在外周血的定量表达

瞿 虎, 陈 羽, 丘少鹏*, 毛晓鹏, 郭胜杰
(中山大学附属第一医院泌尿外科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】检测分析前列腺特异性膜抗原(PSMA)及其新型剪接变异体(PSM-E)在前列腺癌(PCA)及良性前列腺增生(BPH)患者外周血中的表达,探讨其意义。【方法】通过实时荧光定量 PCR 方法对 PSM-E、PSMA 在前列腺癌(53 例)和前列腺增生(79 例)两组患者外周血中定量表达,分析其差异。【结果】PSM-E 相对表达量在 PCA 组(-8.22 ± 0.32)高于 BPH 组(-9.99 ± 0.41), $P < 0.001$; PSMA 相对表达量在 PCA 组(-12.51 ± 0.31)高于 BPH 组(-13.72 ± 0.48), 差异有统计学意义, $P < 0.05$; PCA 组和 BPH 组内 PSMA 与 PSM-E 相对表达量有相关性($r = 0.36, P < 0.05$; $r = 0.65, P < 0.01$), 与血清 PSA 均不相关。【结论】外周血定量检测 PSM-E 表达差异可用于区分良性前列腺增生和前列腺癌;与 PSMA 相比 PSM-E 表达量更高,其检测的灵敏度更高,PSM-E 诊断前列腺癌的敏感性和特异性更好。

关键词: 前列腺特异性膜抗原; PSM-E; 剪接变异体; 前列腺癌; 荧光定量 PCR

中图分类号: R691 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)03-0294-05

Peripheral Expression and Clinical Significance of PSM-E: A New Spliced Variant of PSMA Detected by Real time PCR

QU Hu, CHEN Yu, QIU Shao-peng*, MAO Xiao-peng, GUO Sheng-jie

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080)

Abstract: 【Objectives】 To detect the expression of PSMA and its new splicing variant PSM-E in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients by real-time PCR and to investigate its clinical significance. 【Methods】 The expression of peripheral PSMA and PSM-E in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients were detected by real-time PCR and the difference was analyzed. 【Results】 The relative expression of PSM-E was higher in the PCA group (-8.22 ± 0.32) than in BPH group (-9.99 ± 0.41), $P < 0.001$. The relative expression of PSMA in the PCA group (-12.51 ± 0.31) was higher than BPH group (-13.72 ± 0.482), with statistic significance, $P < 0.05$. The relative expression of PSMA was correlated with PSM-E in both PCA and BPH group while not correlated with PSA in either group. 【Conclusion】 The difference in peripheral PSM-E expression is useful in differentiation between BPH and PCA. PSM-E was better than PSMA in that it has higher expression and sensitivity and therefore it has better sensitivity and specificity in the diagnosis of PCA.

Key words: PSMA; PSM-E; spliced variant; prostate cancer; real-time PCR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3): 294-298]

前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen, PSMA)作为与前列腺癌密切相关的细胞跨膜蛋白,是近年来前列腺癌研究的热点,如针对

国人 PSMA 基因的克隆鉴定等^[1]。既往研究表明 PSMA 在前列腺癌及其转移灶中表达增高,其组织特异性明显优于前列腺特异性抗原 PSA^[2]。PSM-E

收稿日期: 2009-02-22

基金项目: 国家自然科学基金(30872584);教育部博士点基金(20050558065);广东省自然科学基金重点项目(8251008901000018);广东省科技计划项目(2006B36001013)

作者简介: 瞿虎, 博士生, 研究方向: 前列腺癌的诊断与治疗, E-mail: quhu74@hotmail.com; * 通讯作者, 丘少鹏, 教授, 博士生导师, 课题负责人, E-mail: urology@vip.163.com

是本研究组首次在世界上发现的一种新型 PSMA 剪接变异体,在前期研究中我们发现新剪接变异体 PSM-E 是一种较 PSMA 特异性更高的前列腺标记物,组织中 PSM-E mRNA 表达水平可用于区分正常前列腺、前列腺增生和前列腺癌^[3]。本研究中我们采用实时荧光定量 PCR 方法检测新型剪接变异体 PSM-E 在前列腺癌及良性前列腺增生患者外周血中的表达,并与 PSMA 相对比,探讨其临床意义。

1 材料和方法

1.1 病例资料

选取 2006 年 11 月-2008 年 12 月泌尿外科患者,前列腺癌(prostate cancer, PCA)患者 53 例,前列腺增生(benign prostate hyperplasia, BPH)患者 79 例。PCA 纳入标准:病理证实为 PCA,分期不

限;BPH 纳入标准:临床诊断及病理证实为 BPH。随机编号,受试前 1 周禁止作前列腺直肠指诊,停用与雄激素有关的治疗。

1.2 仪器及材料

荧光定量 PCR 仪 Chromo 4 Real-Time PCR Detector 为美国 MJ Research 公司产品。淋巴细胞分离液为北京鼎国生物技术公司产品,总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒均为 TOYOBO 公司产品,SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara 公司。PSM-E、PSMA 重组质粒 pcDNA3.0/PSM-E 和 pcDNA3.0/PSMA 及内参基因 β -actin 质粒为本研究组此前已构建成功并保存。

1.3 引物序列

设计 PSM-E、PSMA 特异性引物以区分其它剪接变异体,同时将 β -actin 设为内参基因。引物均由 Invitrogen 公司合成。引物序列见表 1。

表 1 定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of primers used in real-time PCR assays

Gene name	Primer	Sequence (5'-3')	Product size(bp)
PSMA	Forward primer	TCTGCTCGCGCCGAGATGTC	148
	Reverse primer	ATTTTATAAACCCACCCGAAG	
PSM-E	Forward primer	GAATCTCCTTCACGAAACCG	220
	Reverse primer	ATAAACCCACCCAGCCTCTC	
β -actin	Sense primer:	GCTCGTCGTCGACAACGGCTC	353
	Antisense primer:	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	

1.4 外周血单个核细胞的提取

用 EDTA 抗凝管集取患者外周静脉血 5 mL,按说明书操作收集有核细胞,保存于 -80 °C 保存备用。

1.5 总 RNA 的提取及反转录

总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒均为 TOYOBO 公司产品,按照说明书进行。

1.6 荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 反应体系:cDNA 模板 3 μ L、上游引物 0.5 μ L、下游引物 0.5 μ L、SYBR Premix Ex Taq™ 12.5 μ L、双蒸水 8.5 μ L, Total 25 μ L; 荧光定量 PCR 反应参数:共 40 循环,第一循环中 94 °C 2 min; 循环 2-40: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s; 72 °C 20 s; 80 °C 1 s; Melting Curve 60 ~ 95 °C, 每 1 °C 4 s。分别以质粒 pcDNA3.0/PSM-E、pcDNA3.0/PSMA 及自行构建的 β -actin 质粒作为扩增 PSM-E、PSMA、 β -actin 的标准品,用核酸蛋白分析仪于

260 nm 测定光密度值。根据测定的质粒浓度计算 pcDNA3.0/PSM-E、pcDNA3.0/PSMA 及 β -actin 的质粒拷贝数,公式如下:质粒 copies = $(OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 \mu\text{g/mL} \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23} \times 10^{-3}) / (660 \text{ g/mol} \times \text{碱基对数})$ 。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 软件包对数据进行处理分析。上述荧光定量 PCR 分析得出的 PSM-E、PSMA 表达相对量原始数据直方图显示非正态分布,进行对数转换后其结果接近正态分布,采用 t 检验、方差分析、Pearson 相关性分析等行统计分析。

2 结 果

2.1 两组 PSM-E/PSMA 相对表达量分析

前列腺癌(PCA)患者组内 PSM-E 的相对表达量为 (-8.22 ± 0.32) , PSMA 相对表达量为 $(-12.51$

± 0.31), 差值的均数为 -4.29 , $P < 0.001$ 。数据相关性检验, PCA 组内 PSMA 相对表达量与 PSM-E 相对表达量数据相关, 相关系数 $r = 0.36$, $P < 0.05$ 。PSMA 及 PSM-E 与 TPSA 数据均不相关。

前列腺增生(BPH)患者组内, PSM-E 的相对表达量为 (-9.99 ± 0.41) , PSMA 相对表达量为 (-13.72 ± 0.48) , 差值的均数为 -3.73 , $P < 0.001$ 。数据相关性检验, BPH 组内 PSMA 相对表达量与 PSM-E 相对表达量相关, 相关系数 $r = 0.65$, $P < 0.01$ 。PSMA 及 PSM-E 与 TPSA 数据均不相关。

PSMA 表达在 PCA 组和 BPH 组间差异有统计学意义, $t = 2.38$, $P < 0.05$, PSM-E 在 PCA 组和 BPH 组间差异有统计学意义, 有显著性差异, $t = 3.75$, $P < 0.001$ 。

2.2 ROC 曲线分析

ROC 曲线 (receive operating characteristic curve), 通过将连续变量设定出多个不同的临界值, 从而计算出系列敏感性和特异性, 再以敏感性为纵坐标、(1-特异性)为横坐标绘制成曲线, 曲线下面积越大, 诊断准确性越高。在 ROC 曲线上最靠近坐标图左上方的点为敏感性和特异性均较高的临界值。ROC 分析显示 PSME 在诊断 PCA 的敏感性和特异性方面要优于 PSMA (图 1)。

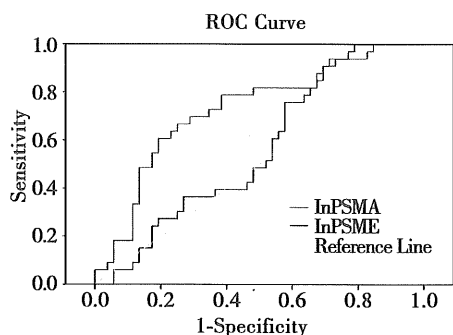


图1 ROC 曲线

Fig.1 ROC curve

The upper is PSME curve, the lower is PSMA curve. The sensitivity and specificity of PSME in identification of malignant tumor is better than PSMA.

3 讨论

在肿瘤的早期阶段就有癌细胞进入血循环, 运用高灵敏度的方法检测外周血中的 PSMA mRNA 的表达将有助于 PCA 血行播散的判断及早

期诊断, Israeli 等^[4-5]用高灵敏的聚合酶链反应技术(RT-PCR)检测 PCA 患者血标本, PSMA 的特异性和敏感性优于 PSA。Grasso 等^[6]用同样的方法进行研究得到同样的结果。国内的余斌等^[7]的研究也表明用巢式 RT-PCR 检测外周血中 PSMA 及 PSA, 在 PCA 的诊断中 PSMA 的真实性和可靠性明显优于 PSA, 其特异性更高。PSMA 存在可变剪接现象^[8], 通过可变剪接可以改变原有蛋白的功能, 并且与肿瘤的发生发展、侵袭转移有关, 即可能形成对肿瘤的发生发展、侵袭转移有不同调控功能的蛋白质分子^[9-10]。

3.1 新型剪接变异体 PSM-E

新型剪接变异体 PSM-E 是本研究组于国家自然科学基金课题“基因重组酵母 PSMA 疫苗抗前列腺癌的实验研究”中^[11]在构建 PSMA 全长的同时也在世界上首次发现, 与 PSMA 其他剪接变异体 PSM'、PSM-C 和 PSM-D 都位于胞内不同, 是一种分子量为 100 ku 的跨膜蛋白。在此前研究的基础上我们采用荧光定量 PCR 的方法检测新型剪接变异体 PSM-E 在 BPH 及 PCA 患者外周血中的定量表达, 并与 PSMA 相比较, 分析其差异。

在本研究中 PSMA 及 PSM-E 的实时荧光定量 PCR 外周血检测检出低限可达到 10^{-7} , 即其灵敏度达到在 10^8 个单核细胞中仅含有 10 个前列腺肿瘤细胞即可被检出^[12]。当以 10^{-7} 为检测低限时, PCA 组患者中, PSMA 的阳性检出率为 79.25% (42/53 例), PSM-E 的阳性检出率为 81.13% (43/53 例), 两者无显著性差异; BPH 组患者中, PSMA 的阳性检出率为 40.51% (32/79 例), PSM-E 的阳性检出率为 51.90% (41/79 例)。虽然 PCA 组阳性检出率无显著性差异, 但定量 PCR 分析结果显示 PSM-E 的相对表达量在 PCA 组要高于 BPH 组; PSMA 相对表达量在 PCA 组高于 BPH 组。PSM-E 及 PSMA 在 PCA 患者外周血中的表达均高于 BPH 患者, PSM-E 在两组间差异性更为显著, 这表明采用实时定量 PCR 检测外周血中 PSM-E 的表达差异同 PSMA 检测一样可用以区分 PCA 患者和 BPH 患者。

组内分析显示两组内 PSM-E 的相对表达量皆高于 PSMA 的相对表达量, 且两者相关, 但两组内 PSM-E 及 PSMA 表达与血清 PSA 均不相关。与 PSA 为分泌型蛋白不同, PSMA 及 PSM-E 为跨膜蛋白, 外周血中 PSMA 及 PSM-E 的检出均与血循

环中存在的前列腺(肿瘤)细胞数量密切相关,因此 PSM-E 与 PSMA 的相对表达量有相关性,但两者与血清 PSA 水平无关联。在 PCA 及 BPH 两组内 PSM-E 的相对表达量均明显高于 PSMA,校正后的相对拷贝数表达 PSM-E 检测较 PSMA 要高出 2~3 个指数量级,这说明 PSM-E 在检测的灵敏度上要优于 PSMA。

3.2 前列腺癌的筛查诊断指标

目前临床多采用血清 PSA 作为前列腺癌的筛查诊断指标^[13],然而 PSA 是一个组织特异性而非肿瘤特异性的标记物。在本研究中 PCA 组血清 TPSA 均 > 4 ng/mL, BPH 组中有 34.18% (27/79 例) 的患者显示 TSPA > 4 ng/mL; PCA 组中有 15.09% (8/53 例) 的患者 TSPA < 10 ng/mL, BPH 组中 13.92% (11/79 例) 患者 TPSA > 10 ng/mL。本研究中均为行手术治疗且病理确诊患者,均有重度下尿路梗阻症状或出现过尿潴留情况,导致整体 PSA 水平偏高而不具代表性,同样因 PCA 患者 Gleason 评分几乎均在 7 分以上而未能行 PSM-E 表达与 Gleason 评分相关性分析。既往的研究只证明血清 PSA 水平越高,前列腺癌的可能性越大,当 PSA < 4 ng/mL 时,大约有 20% 的假阴性患者漏诊;传统的临界值 (4 ng/mL) 只能使大约 25% PCa 被早期察觉,只有当 PSA > 10 ng/mL 时,诊断 PCA 的阳性率才能提高到 50%~70%。我们同样发现当设定不同的检测低限值时,两组患者中 PSM-E 和 PSMA 的阳性检出率有很大的不同,当以 10^{-6} 为检出低限时,PCA 组中 PSMA 检出阳性率为 45.28% (24/53 例),PSM-E 为 69.81% (37/53 例),BPH 组中 PSMA 检出阳性率为 21.52% (17/79 例),PSM-E 为 45.57% (36/79 例);当以 10^{-5} 为检出低限时,PCA 组中 PSMA 的阳性检出率为 20.75% (11/53 例),PSM-E 为 66.04% (35/53 例);BPH 组中 PSMA 的阳性检出率为 7.59% (6/79 例),PSM-E 的检出率为 36.71% (29/79 例)。可以发现当检测低限提高至 10^{-6} 和 10^{-5} 时,PSM-E 对 PCA 患者仍有很高的阳性检出率且显著高出 PSMA 的阳性检出率,而对 BPH 患者的阳性检出率两者均明显下降。我们对 PSM-E 和 PSMA 数据进行 ROC 曲线分析,结果表明与 PSMA 相比较 PSM-E 曲线更贴近 sensitivity 和上面的横轴,PSM-E 曲线下面积要大于 PSMA,本研究中对 PCA 及 BPH 患者研究数据分析表明 PSM-E 在诊断 PCA

的敏感性、特异性方面要优于 PSMA。

3.3 小结

我们的研究结果表明,外周血中 PSM-E 表达在 PCA 及 BPH 患者间存在差异,通过高灵敏检测手段可用于区分两类患者,PSM-E 外周血检测灵敏度高于 PSMA,PSM-E 在诊断 PCA 的敏感性和特异性方面要优于 PSMA,PSM-E 外周血检测有望成为前列腺癌的新的特异性诊断指标。后续研究中将进一步扩大例数及完整设计,以具体评定 PSM-E 外周血检测的诊断标准,探讨其替代及联合 PSA 检测诊断 PCA 的可能及意义。

参考文献:

- [1] 黄海,黄健,潘秋辉,等.中国人前列腺特异性膜抗原基因的克隆及鉴定[J].中山大学学报:医学科学版,2005,26(1):84-87.
- [2] Mhawech-Fauceglia P, Zhang S, Terracciano L, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) protein expression in normal and neoplastic tissues and its sensitivity and specificity in prostate adenocarcinoma: an immunohistochemical study using multiple tumor tissue microarray technique [J]. Histopathology, 2007, 50(4):472-483.
- [3] Cao KY, Mao XP, Wang DH, et al. High expression of PSM-E correlated with tumor grade in prostate cancer: A new alternatively spliced variant of prostate-specific membrane antigen[J]. Prostate, 2007, 67(16): 1791-1800.
- [4] Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, et al. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays [J]. Cancer Res, 1994, 54(24):6306-6310.
- [5] Israeli RS, Miller WH Jr, Su SL, et al. Sensitive detection of prostatic hematogenous tumor cell dissemination using prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction [J]. J Urol, 1995, 153(3 Pt 1):573-577.
- [6] Grasso YZ, Gupta MK, Levin HS, et al. Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage [J]. Cancer Res, 1998, 58(7):1456-1459.
- [7] 余斌,王禾,武国军,等.巢式 RT-PCR 检测前列

- 腺癌患者外周血中 PSA mRNA 和 PSM mRNA 的比较 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(24): 2253-2256.
- [8] Schmittgen TD, Teske S, Vessella RL, et al. Expression of prostate specific membrane antigen and three alternatively spliced variants of PSMA in prostate cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2003, 107 (8): 323-329.
- [9] Davis M I, Bennett M J, Thomas L M, et al. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(17): 5981-5986.
- [10] Kim E, Goren A, Ast G. Insights into the connection between cancer and alternative splicing [J]. *Trends Genet*, 2008, 24(1): 7-10.
- [11] 陈贤璟, 丘少鹏, 毛晓鹏, 等. 前列腺特异性膜抗原基因片段在酿酒酵母中的诱导表达及意义 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(6): 631-634.
- [12] 杨睿, 张立国, 符蓉, 等. 实时定量 PCR 技术检测前列腺癌微小转移的研究 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2008, 10, 5(41): 27-31.
- [13] 黄伟刚, 赖建生, 林津, 等. 健康男性与前列腺疾病患者的血清前列腺特异抗原水平差异 [J]. 新医学, 2004, 35(9): 551-552.

(编辑 张恩健)

(上接第 283 页 from page 283)

- Interleukin-18 knockout mice display maladaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(2): 552-558.
- [10] Chandrasekar B, Mummidi S, Claycomb WC, et al. Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(6): 4553-4567.
- [11] Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 2023-2039.
- [12] Wang D, Oparil S, Feng JA, et al. Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse [J]. *Hypertension*, 2003, 42(1): 88-95.
- [13] Gullestad L, Aass H, Fjeld JG, et al. Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure [J]. *Circulation*, 2001, 103(2): 220-225.
- [14] Krishnamurthy P, Rajasingh J, Lambers E, et al. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR [J]. *Circ Res*, 2009, 104(2): e9-18.
- [15] Chalikias GK, Tziakas DN, Kaski JC, et al. Interleukin-18: interleukin-10 ratio and in hospital adverse events in patients with acute coronary syndrome [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 182(1): 135-143.

(编辑 刘清海)