

· 论 著 ·

比较载脂蛋白 A-1 在前列腺癌和前列腺增生中的表达*

巩蓓, 雷婷, 张曼[△]

(首都医科大学附属北京世纪坛医院临床检验中心, 北京 100038)

摘要:目的 比较载脂蛋白 A-1(ApoA-1)在前列腺癌、前列腺增生组织中的表达情况,探索前列腺疾病鉴别诊断的新型标记物。方法 应用免疫组织化学方法检测前列腺癌(13例)和前列腺增生(37例)组织中 ApoA-1 的表达情况,分析其与血清前列腺抗原系列总前列腺特异性抗原(tPSA)、游离前列腺特异性抗原(fPSA)、fPSA 与 tPSA 比值(fPSA/tPSA)及血脂总胆固醇(CHOL)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等参数的相关性,研究 ApoA-1 在前列腺特异抗原(PSA)灰区(4~10 ng/mL)对前列腺癌诊断的特异度及血清胆固醇水平升高在前列腺癌发生发展过程中的作用。结果 ApoA-1在前列腺癌患者组织中的表达水平明显高于前列腺增生患者,比较差异有统计学意义($t = -6.182, P < 0.05$)。在 PSA 不同水平的各个区间内, ApoA-1 在前列腺癌组织中的表达明显高于相同 PSA 水平的前列腺增生组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。前列腺癌患者血清 LDL-C 水平为(3.02±0.79)mmol/L,明显高于前列腺增生患者的(2.14±0.78)mmol/L,差异有统计学意义($P < 0.05$);血清 HDL-C 水平为(1.27±0.33)mmol/L,明显低于前列腺增生患者的(1.70±1.02)mmol/L,差异有统计学意义($P < 0.05$), ApoA-1 的水平与胆固醇水平之间具有相关性($r = 0.332, P = 0.036$)。结论 ApoA-1 在前列腺癌和前列腺增生中表达具有明显差异,可作为二者的鉴别诊断标记物。

关键词:载脂蛋白 A-1; 前列腺癌; 前列腺增生; 鉴别诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)02-0150-03

Expression of apolipoprotein A-I in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*

Gong Bei, Lei Ting, Zhang Man[△]

(Clinical Laboratory Center, Beijing Shijitan Hospitals Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: Objective To investigate the different expression of apolipoprotein A-I(ApoA-1) in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, and to explore the new indicators of prostate diseases. Methods The immunohistochemistry was used to detect the expression of ApoA-1 in prostate cancer tissues (13 cases) and benign prostatic hyperplasia tissues (37 cases). The correlations between the level of ApoA-1 and the serum prostate antigen series total prostate specific antigen(tPSA), free prostate specific antigen(fPSA), the ratio of fPSA and total PSA(fPSA/tPSA), cholesterol(CHOL), triglyceride(TRIG), low-density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) and high-density lipoprotein-cholesterol(HDL-C) levels were analyzed. Results In 13 cases of prostate cancer, ApoA-1 showed strongly positive expression, while ApoA-1 was weak positive stained or even negative in 37 cases of benign prostatic hyperplasia, a significant difference was observed between them($t = -6.182, P < 0.05$). Within the same range of PSA levels, ApoA-1 was obviously higher in the cancer group than that of the benign prostatic hyperplasia patients ($P < 0.05$). The LDL-C level of prostate cancer group (3.02±0.79)mmol/L was higher than that of benign prostatic hyperplasia group(2.14±0.78)mmol/L, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The HDL-C level of prostate cancer group (1.27±0.33)mmol/L was lower than that of benign prostatic hyperplasia (1.70±1.02)mmol/L, The difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was a significant correlation between the level of ApoA-1 and the level of cholesterol($r = 0.332, P < 0.05$). Conclusion The expression of ApoA-1 is obvious different between the patients with prostate cancer and the patients with benign prostatic hyperplasia.

Key words: apolipoprotein A-1; prostate cancer; benign prostatic hyperplasia; differential diagnosis

前列腺特异抗原(PSA)检测已广泛应用于前列腺癌的诊断及对预后的监测,但 PSA 在灰区(4~10 ng/mL)对于前列腺癌、前列腺增生鉴别诊断的敏感度和特异度均较低^[1]。载脂蛋白 A-1(ApoA-1)是新发现的潜在肿瘤标志物,由于 ApoA-1 编码基因高甲基化状态导致蛋白的表达具有高度组织特异性,除肝脏、小肠及血管内膜内有少量表达外,其余正常组织均不表达^[2],因此, ApoA-1 检测对肿瘤的早期诊断具有重要意义。在本实验室的前期研究中,应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术筛选并鉴定出 ApoA-1 在健康人、前列腺增生及前列腺癌患者的尿液中表达有差异^[3]。本研

究应用免疫组织化学方法检测了 13 例前列腺癌、37 例前列腺增生患者的前列腺组织中 ApoA-1 表达情况,旨在研究 ApoA-1 的表达及胆固醇水平的升高与前列腺癌发生的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 北京世纪坛医院泌尿外科 2012 年 5 月至 2013 年 10 月 13 例前列腺癌患者纳入前列腺癌组,37 例前列腺增生患者纳入前列腺增生组,年龄 50~91 岁,平均 72.7 岁。所有患者均行前列腺切除手术,患者术前均未进行任何化学治疗、放射治疗或内分泌治疗。所有手术切除标本均经高级病理医师确诊,病理诊断按照世界卫生组织泌尿系统和男性生殖器

* 基金项目:北京市自然科学基金项目(7122086)。 作者简介:巩蓓,女,在读研究生,主要从事尿液蛋白质组学的研究。 [△] 通讯作者, E-mail:mzhang99@aliyun.com。

官肿瘤分类标准(2004)进行^[4]。所有标本收集均经伦理专业委员会同意,患者或家属签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 ApoA-1 单克隆抗体(美国 Thermo Fisher 科技公司,批号 MAI-83002,工作浓度 1 : 500);HRP 标记羊抗鼠/兔二抗(丹麦 Dako 公司,批号 K5007);正常非免疫山羊血清(福州迈新公司,批号 SP KIT-B1);DAB 显色试剂盒(福州迈新公司,批号 DAB-0031);苏木素染液(福州迈新公司,批号 CTS-1-090)。西门子全自动生化分析仪、Roche cobas e411 全自动化学发光分析仪。

1.3 免疫组织化学检测 采用 EnVision™ 免疫组织化学二步法,主要步骤包括:切片用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱苯,去离子水水化;3%过氧化氢-甲醇封闭内源性过氧化物酶 20 min,用柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)进行微波抗原修复。正常非免疫山羊血清封闭 30 min 后滴加一抗,室温孵育 1 h;二抗室温孵育 30 min,DAB 显色 15 s,苏木素复染 60 s,水洗后脱水、透明、封片。免疫组织化学均设阳性及阴性对照。

1.4 结果判定标准 每张切片随机选取 5 个高倍视野(×1 000),每个高倍视野计数 100 个癌细胞,根据免疫组化染色强度及阳性细胞百分比分别打分,其中染色强度以多数细胞呈色反应为准:不着色记 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深褐色为 3 分;无阳性细胞为 0 分,阳性细胞数小于 25% 为 1 分,25%~<50% 为 2 分,50%~<75% 为 3 分,大于或等于 75% 为 4 分。染色深度及阳性细胞数得分相乘,0 为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)^[5]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以 *n* 表示,组间比较采用 Mann-Whitney 秩和检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;相关分析采用 Pearson 相关, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

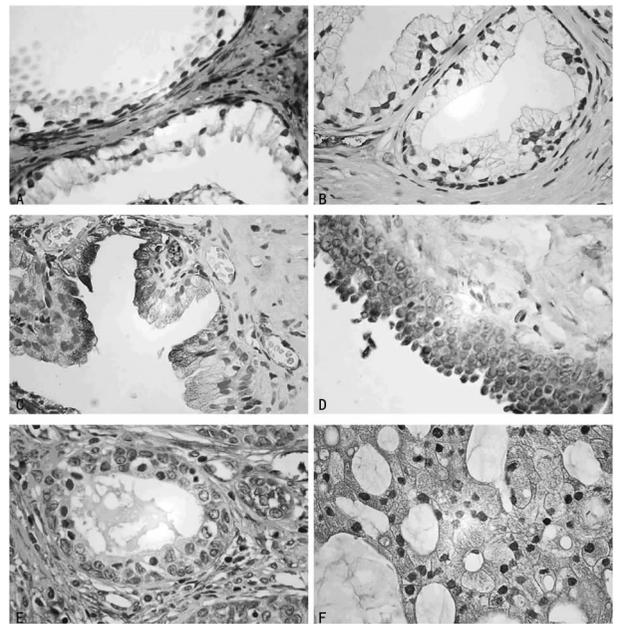
2.1 ApoA-1 在 2 组患者中的表达 ApoA-1 阳性着色定位于腺体细胞浆。13 例前列腺癌患者全部表达阳性,其中 10 例表达强阳性(+++);37 例前列腺增生患者中,33 例表达弱阳性(+),正常腺管蛋白表达阴性,镜下可见其前列腺组织增生腺管有明显的蛋白质分泌过程。ApoA-1 在前列腺癌组中的水平明显高于前列腺增生组,比较差异有统计学意义($t = -6.182, P < 0.05$)。见图 1,表 1。

表 1 2 组患者 ApoA-1 水平的比较(*n*)

组别	<i>n</i>	+	++	+++
前列腺癌组	13	0	3	10
前列腺增生组	37	34	2	1

2.2 ApoA-1 与血清 PSA 水平的关系 前列腺癌患者血清总前列腺特异性抗原(tPSA)水平为(27.17 ± 11.91)ng/mL,明显高于前列腺增生患者的(7.23 ± 8.93)ng/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$);前列腺癌患者血清游离前列腺特异性抗原(fPSA)水平为(2.87 ± 1.40)ng/mL,明显高于前列腺增生的(1.33 ± 1.21)ng/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$);前列腺癌患者血清 fPSA/tPSA 为(16.26 ± 14.10)%明显低于前列腺增生患者的(24.91 ± 11.24)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 PSA 不同水平的各个区间内,尤其 PSA 为 4~10 ng/mL 时,ApoA-1 在前列腺癌患者中的表达都明显高于相同 PSA 水

平的前列腺增生患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。



A、B:正常前列腺腺管;C、D:前列腺增生组织;E、F:前列腺癌组织。

图 1 ApoA-1 在正常前列腺腺管、前列腺增生组织及前列腺癌中的表达(免疫组化,×1 000)

表 2 2 组患者 ApoA-1 的水平与 PSA 系列的关系(*n*)

项目	前列腺癌			前列腺增生			<i>P</i>	
	+	++	+++	+	++	+++		
tPSA(ng/mL)	<4	0	2	2	13	2	0	0.002
	4~10	0	0	4	14	0	1	0.001
	>10	0	1	3	5	0	0	0.008
fPSA(ng/mL)	<0.934	0	2	4	16	2	0	0.001
	≥0.934	0	1	5	16	0	1	0.001
fPSA/tPSA	<0.15	0	0	7	8	0	0	0.001
	≥0.15	0	3	2	24	2	1	0.001

2.3 2 组患者血脂水平比较及与 ApoA-1 表达的关系 比较 2 组患者总胆固醇(CHOL)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)等血脂水平,其中前列腺癌患者血清 LDL-C 水平为(3.02 ± 0.79)mmol/L,明显高于前列腺增生患者的(2.14 ± 0.78)mmol/L,差异差异有统计学意义($P < 0.05$);前列腺癌患者血清 HDL-C 水平为(1.27 ± 0.33)mmol/L,明显低于前列腺增生患者的(1.70 ± 1.02)mmol/L,差异差异有统计学意义($P < 0.05$);2 组患者 CHOL、TG 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。ApoA-1 的水平表达情况与胆固醇水平的升高趋势相一致,两者之间具有相关性($r = 0.332, P = 0.036$)。见表 3。

表 3 前列腺癌与前列腺增生患者血脂水平比较($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

组别	<i>n</i>	CHOL	TG	LDL-C	HDL-C
前列腺癌组	13	5.01 ± 0.92	1.09 ± 0.39	3.02 ± 0.79	1.27 ± 0.33
前列腺增生组	37	4.53 ± 0.93	1.33 ± 1.05	2.14 ± 0.78	1.70 ± 1.02
<i>P</i>	—	0.147	0.456	0.002	0.048

—:无数据。

3 讨 论

前列腺癌在国内男性泌尿生殖系统恶性肿瘤中发病率居第三位,随着人口老龄化及生活条件的改善,前列腺癌发病率有明显增加的趋势,正在影响着国内 50 岁以上男性的生活质量和预期寿命^[6]。目前,PSA 检测已被广泛应用于前列腺癌的筛选、诊断和随访中。但 PSA 对前列腺癌的诊断并无特异度,前列腺增生组织中 PSA 水平也有所升高。相关研究报道,血清胆固醇水平的升高与前列腺癌的发生具有显著相关,但机制仍未阐明^[6]。

ApoA-1 是人体血浆高密度脂蛋白的主要成分,与磷脂、胆固醇、其他载脂蛋白及血浆因子构成总胆固醇(TC)复合体,占 TC 蛋白质水平的 70% 左右^[7]。ApoA-1 介导人体重要的生理功能,参与胆固醇的逆向转运,具有抗动脉粥样硬化、抗炎、抗氧化、抗内毒素作用;与血管壁上的三磷酸腺苷(ATP)结合转运体 A-I 结合,促进胆固醇外流;激活 HDL 表面的卵磷脂胆固醇酰基转移酶诱导胆固醇逆向转运;结合内毒素-脂多糖蛋白复合物抑制内毒素引起的炎症作用;结合活化的 T 淋巴细胞表面刺激因子 X 阻止其激活单核细胞释放白细胞介素 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 等炎症反应因子,具有重要的临床意义^[8]。ApoA-1 主要在肝脏和小肠合成,其基因的甲基化状态决定了蛋白的表达呈现明显的组织特异度,仅在肝脏、小肠、胰腺及血管内膜内有少量表达^[9]。近年的文献报道,ApoA-1 在如肝癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤组织中的表达有不同程度的升高,是潜在的肿瘤标志物^[10-12]。

本研究免疫组织化学结果显示,ApoA-1 在前列腺癌组织中的表达明显高于前列腺增生组织。ApoA-1 在前列腺癌实性片状和融合的腺体中表达呈强阳性,在前列腺增生组织中表达弱阳性,正常腺管蛋白表达阴性,镜下可见增生腺管有明显的蛋白质分泌过程。在 PSA 水平的各个区间,尤其当 PSA 为 4~10 ng/mL 时,ApoA-1 在前列腺癌组织中的表达都明显高于前列腺增生组织;在 PSA 水平相同时,ApoA-1 对于前列腺癌和前列腺增生的鉴别诊断具有重要意义。比较 13 例前列腺癌与 37 例前列腺增生患者血清 CHOL、TRIG、LDL-C、HDL-C 水平,前列腺癌患者血清中胆固醇的水平明显高于前列腺增生患者,ApoA-1 的表达情况与胆固醇水平的升高趋势相一致,2 项指标水平具有相关性。

目前,关于 ApoA-1 参与肿瘤发生发展相关机制的报道比较少见。大量临床调查及流行病学研究表明胆固醇是促使前列腺癌发生、发展的重要危险因素之一,胆固醇代谢产物和睾酮、雄烯二酮可通过调控雄激素受体刺激前列腺上皮和基质细胞的生长^[13]。本研究证实前列腺癌患者的血清 LDL-C 水平明显高于前列腺增生患者,前列腺癌患者血清 HDL-C 水平明显低于前列腺增生患者,说明血清胆固醇水平升高可能是前列腺癌发生的潜在危险因素。ApoA-1 与胆固醇的逆向转运有关,负责将游离胆固醇酯化并转移至脂蛋白微粒内核向肝脏运输。前列腺癌组织中 ApoA-1 的表达升高可能与血清中升高的胆固醇有密切关系。ApoA-1 的表达具有高度选择性,不同发育阶段体内激素水平的变化、甲基化作用和 SP1、ARP-1、RXR α 、HNF-4 等转录因子的调控作用,共同导致了 ApoA-1 基因表达的组织特异度和发育阶段特异度。甾体激素、膳食中摄入的胆固醇、甲状腺素和维甲酸分别通过其受体 HNF-4、Ear-3、hT3R α 1、RXR α 等介导来调控 ApoA-1 基因的转录。

ApoA-1 基因甲基化导致蛋白选择性表达升高等相关研究为进一步探索 ApoA-1 与前列腺癌等泌尿系统肿瘤发生发展的关系提供了一定的理论依据^[14-15]。

参考文献

- Perdona S, Cavadas V, Di Lorenzo G, et al. Prostate cancer detection in the "grey area" of prostate-specific antigen below 10 ng/mL: Head-to-Head comparison of the updated PCPT calculator and Chun's nomogram, two risk estimators incorporating prostate cancer antigen 3[J]. *Eur Urol*, 2011, 59(1): 81-87.
- Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, et al. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(14): 2710-2721.
- 赵旭宏, 田野, 靳胜, 等. 前列腺增生的尿液蛋白质组学分析[J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(3): 277-281.
- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, et al. 泌尿系统及男性生殖器官肿瘤病理学和遗传学[M]. 冯晓莉, 何群, 陆敏, 等, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 303-305.
- Zhou X, Lawrence TJ, He Z, et al. The expression level of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) correlates to the progression of prostate cancer[J]. *Exp Mol Pathol*, 2012, 92(1): 105-110.
- 顾方六. 国内良性前列腺增生和前列腺癌发病调查[J]. *北京医科大学学报*, 2000, 32(1): 30-33.
- Segrest JP, Harvey SC, Zannis V, et al. Detailed molecular model of apolipoprotein A-I on the surface of high-density lipoproteins and its functional implications[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2000, 10(6): 246-252.
- Davidson WS, Thompson TB. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(31): 22249-22253.
- van Linthout S, Spillmann F, Riad AA, et al. Human apolipoprotein A-I gene transfer reduces the development of experimental diabetic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2008, 117(12): 1563-1573.
- Clarke CH, Yip C, Badgwell D, et al. Proteomic biomarkers apolipoprotein A1, truncated transthyretin and connective tissue activating protein III enhance the sensitivity of CA125 for detecting early stage epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(3): 548-553.
- Muntoni S, Atzori L, Mereu R, et al. Serum lipoproteins and cancer[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009, 19(3): 218-225.
- Farias-Eisner G, Su F, Robbins T, et al. Validation of serum biomarkers for detection of early- and late-stage endometrial cancer[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 202(1): 73-75.
- Platz EA, Clinton SK, Giovannucci E. Association between plasma cholesterol and prostate cancer in the PSA era[J]. *Int J Cancer*, 2008, 123(7): 1693-1698.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 6-21.
- van Hemelrijck M, Walldius G, Jungner IA, et al. Low levels of apolipoprotein A-I and HDL are associated with risk of prostate cancer in the Swedish AMORIS study[J]. *Cancer Causes Control*, 2011, 22(7): 1011-1019.