

上皮性卵巢癌患者血清及肿瘤中 Prosta^{sin} 变化及意义

陈晓红¹ 王海琳^{2△} 贺小燕¹ 陈丑彦¹

(1 兰州大学第一临床医学院 甘肃 兰州 730000 2 甘肃省人民医院妇产科 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的 检测 prosta^{sin} 在上皮性卵巢癌患者血清及组织中的表达 探讨 prosta^{sin} 在上皮性卵巢癌中的临床意义。方法 运用免疫组织化学法检测组织 prosta^{sin} 在 20 例正常卵巢组织、40 例卵巢上皮性良性肿瘤以及 26 例卵巢癌中的表达, 分析其与各临床参数间的相关性, 并通过 ELISA 法检测 26 例上皮性卵巢癌患者血清 prosta^{sin} 水平 探讨血清 prosta^{sin} 与组织 prosta^{sin} 的相关性。结果 prosta^{sin} 在正常卵巢组织中无表达, 在卵巢良性及恶性肿瘤中的表达率分别为 24.00 %和 71.47 % ,差异具有统计学意义($\chi^2=16.37$ $P<0.005$) ,prosta^{sin} 表达与病理类型、分化程度呈正相关($P=0.001$ $P=0.002$) ,与临床分期无明显相关性($P=0.154$) ;血清 prosta^{sin} 在卵巢上皮性癌组为 14.07 μ g/ml ,明显高于良性肿瘤组及正常对照组($P<0.001$) ,卵巢癌组术后 7 天血清 prosta^{sin} 水平 7.88 μ g/ml ,明显低于术前($P=0.000$) ,术前血清 prosta^{sin} 浓度与组织 prosta^{sin} 表达呈线性相关($r=0.601$)。结论 :prosta^{sin} 对上皮性卵巢癌的发生发展、诊断及预后评估具有意义。

关键词 Prosta^{sin} ;CA-125 肿瘤标志物 ;上皮性卵巢癌 ;ELISA;免疫组织化学
中图分类号 :R37.31 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)13-2479-04

Expressions and Clinical Significance of Prosta^{sin} in Epithelial Ovarian Carcinomas Serum and Tissues

CHEN Xiao-hong¹ ,WANG Hai-lin^{2△} ,HE Xiao-yan¹ ,CHEN Chou-yan¹

(1 The first clinical medicine college of Lan zhou University, 730000, Lanzhou,China;
2 The people Hospital of Gansu province, 730000, Lanzhou,China)

ABSTRACT Objective:To explore The clinic significance of prosta^{sin} in serum and tissue of the epithelial ovarian cancer. **Methods:** Use immunohistochemistry to assay expression of tissues prosta^{sin} in 20 normal ovarian tissue,40 epithelial ovarian benign and 26 ovarian carcinomas,and analyse the correlation between prosta^{sin} and its clinical parameters.Moreover, ELISA method was used to detect the expression of serum prosta^{sin} in 26 epithelial ovarian carcinomas so as to explore the relation of serum and tissues of prosta^{sin}. **Results:** The serum prosta^{sin} levels in ovarian cancer group was 14.07 μ g/ml that was higher than benign ovarian tumor group and control group ($P<0.05$); the serum prosta^{sin} level in postoperative7 day was 7.88 μ g/ml which was lower than properation($p=0.00000$); prosta^{sin} was not expression in normal ovarian tissue, but its positive rate was 24.00 %and 71.47 % respectively in benign and malignant ovarian epithelial tumors, and the difference was statistically significant ($\chi^2= 16.37$, $P<0.005$); the expression of prosta^{sin} correlated with pathological type and differentiation ($P= 0.001$, $P= 0.002$), with no significant correlation between clinical stage ($P = 0.154$); concentration of preoperative serum prosta^{sin} expression and organization of prosta^{sin} were linear correlation ($r = 0.601$). **Conclusion:** prosta^{sin} has a remarkable significance in epithelial ovarian carcinomas .

Key words: Prosta^{sin} ;CA125 ;Tumor markers ;Epithelial Ovarian Carcinomas ;ELISA ;Immunohistochemistry
Chinese Library Classification(CLC): R37.31 **Document code:** A
Article ID:1673-6273(2011)13-2479-04

前言

Prosta^{sin} 是一种新发现的 GPI2 膜结合型丝氨酸蛋白酶, 主要由前列腺上皮细胞产生, 亦广泛低表达于其他上皮组织中, 其确切的生理功能尚未完全明了^[1,2]。有研究表明, prosta^{sin} 基因在等多种肿瘤中过度表达, 而且与部分肿瘤的恶性临床表型密切相关^[3]。然而 prosta^{sin} 在上皮性卵巢癌 (Epithelial Ovarian Carcinomas ,EOC) 患者血清中的表达及其预后价值目前研

究不多。本研究旨在应用免疫组织化学和 ELISA 技术, 检测 EOC 组织蛋白及血清中 prosta^{sin} 的表达情况, 结合患者的临床和预后资料, 分析其临床肿瘤学意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料及标本收集

血清标本选自 2009 年 10 月 -2010 年 10 月在甘肃省人民医院妇产科收治的 66 例卵巢肿瘤患者, 经临床和病理确诊为 EOC 患者共 26 例, 平均年龄(46.5 $\pm$ 9.0)岁 ;其中浆液性囊腺癌 16 例, 粘液性腺癌 8 例, 子宫内膜样腺癌 2 例, 按肿瘤的 Silverberg 氏分级标准, G 1 级 9 例、G 2 级 12 例、G 3 级 5 例 ;按国际 FIGO 分为 4 期, 其中 I 期 8 例, II 期 18 例。40 例卵巢良性肿瘤患者作为对照, 平均年龄(42.3 $\pm$ 8.5)岁, 其中浆液

作者简介 :陈晓红 (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向 :妇科肿瘤。电话:13919318562, E-mail :chenxhong08@lzu.c
 Δ 通讯作者 :王海琳 ,wanghailinyx@163.com
(收稿日期 2010-11-29 接受日期 2010-12-31)

性囊腺瘤 27 例,黏液性囊腺瘤 9 例,子宫内膜样瘤 1 例,透明细胞瘤 3 例。30 名健康对照女性来源于体检人群,平均年龄(47.9 ± 7.7)岁。三组的年龄差异无统计学意义,所有选择病例均除外骨关节病或其他肿瘤病史。

同时收集上述所有卵巢癌患者手术切除的卵巢组织标本、卵巢良性肿瘤标本以及同期非卵巢性肿瘤患者正常卵巢组织各 15 例,另外,随机选取 2008 年 1 月至 2010 年 10 月在兰州大学附属一院妇产科手术切除的 45 例卵巢组织标本,临床病历资料完整,患者平均年龄(49.6 ± 5.0 岁),术前均未接受放化疗及生物治疗。包括①卵巢癌组织 30 例(浆液性囊腺瘤 17 例,粘液性囊腺瘤 9 例,子宫内膜样肿瘤 3 例,透明细胞癌 1 例);②卵巢良性肿瘤组织 10 例(浆液性囊腺瘤 6 例,粘液性囊腺瘤 2 例,纤维瘤及透明细胞瘤各 1 例);③正常卵巢组织 5 例。所有恶性肿瘤标本参照 2000 年 FIGO 分期,Ⅰ期 5 例、Ⅱ期 11 例、Ⅲ期 32 例、Ⅳ期 8 例,按肿瘤的 Silverberg 氏分级标准, G1 级 11 例、G2 级 21 例、G3 级 24 例。

血液标本均取自术前 2-3 天及术后第 7 天空腹肘静脉全血 5 ml 置于未加抗凝剂试管中,标本采集后室温下静置 1 h,使用转速为 3000 r/min 离心机离心 15 min,将血清吸出后分装于 -70°C 冰箱保存,直至实验测试时,健康女性于体检空腹抽血时同时抽取静脉血,离心与保存方法同上,标本避免反复冻融。

卵巢组织标本于患者手术时收集被切除的卵巢组织,待测,立即置于 10 %中性甲醛中固定并在 24 小时之内石蜡包埋后保存至实验,连续切片 $4\mu\text{m}$ 厚,每例各备 2 张,分别作 HE 染色、prostin 免疫组化染色。所有切片均经病理学专家盲法认定。

1.2 试剂及实验方法

血清 CA-125、prostin 试剂盒(R&D);鼠抗人 prostin 单克隆抗体(Santa Cruz),即用型快速免疫组化 MaxVision™ 试剂盒,胃蛋白酶 Pepsin、DAB 显色剂均购自福州迈新生物技术有限公司。

血清 prostin 及 CA125 用酶联免疫吸附试验(ELISA 双抗体夹心法)检测,免疫组化采用 SP 法,实验严格按说明书操作,试剂盒内已知阳性片作为阳性对照,以 PBS 替代一抗作为阴性对照。prostin 工作浓度 1:100。

1.3 阳性判断值

组织中 prostin 结果判定以细胞质出现棕-黄色颗粒者为阳性细胞,参照文献报道,采用半定量的 9 分法:按染色的强度,阴性染色记为 0 分,弱阳性染色 1 分,中度阳性 2 分,强阳性 3 分,按阳性细胞数,400 倍显微镜下每例观察 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,计数染色阳性细胞数,当阳性细胞数少于 1%时,为 0 分;1%-10%为 1 分;11%-50%为 2 分,超过 50%为 3 分。将两者的积分相乘(即 0-9 分),记录染色结果。因为本组 20 例对照的正常卵巢组织均呈 prostin 阴性(0 分)或弱阳性(1 分)表达,按半定量的 9 分法积分均不超过 3 分,所以定义染色 0-3 分为 prostin 蛋白的正常表达,4-9 分为过度表达。血清 prostin 阳性标准值以正常对照组均值 ± 1.96 个标准差为界,即 95 %可信区间(CI)值上限值,CA125 > 35 U/ml 为阳性。

1.4 统计学处理

所有结果采用 SPSS17.0 软件进行统计处理。血清

prostin 浓度用均数 $\pm$ 标准差以及 95 %CI 表示,采用 F 检验, LSD 等方法,术前术后采用配对样本的 t 检验,prostin 与临床病理参数的分析用 pearson、Spearman 相关分析法,计数资料采用 χ^2 及 H 检验等。血清 prostin 浓度与组织中 prostin 的表达水平选用直线回归检验。P < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学结果

2.1.1 Prostin 蛋白在组织中的表达 Prostin 在正常卵巢组织中无表达或弱阳性,在卵巢良性及恶性上皮性肿瘤中的阳性表达率分别 24.00 % (6/25)、71.47 % (40/56),二者表达具有显著性差异($\chi^2 = 16.37$, P < 0.005)。在卵巢浆液性肿瘤中,prostin 在良性和恶性肿瘤中的表达差异显著(P = 0.006)。在粘液性肿瘤中,prostin 在这两者之间皆无显著差异(P = 0.376)(图 1-4)。

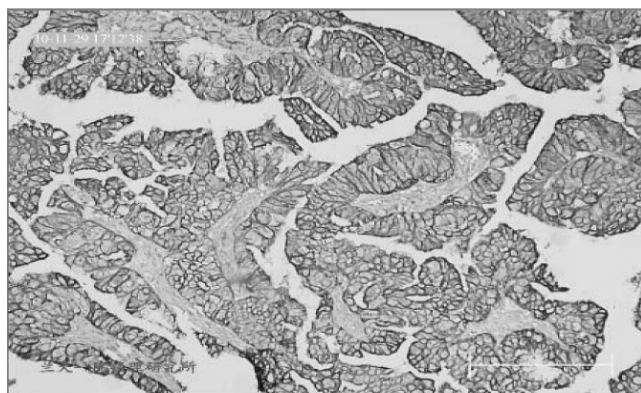


图 1 Prostin 在浆液性腺癌中的表达(200×)

Fig.1 Expression of prostin in serous adenocarcinoma(200×)

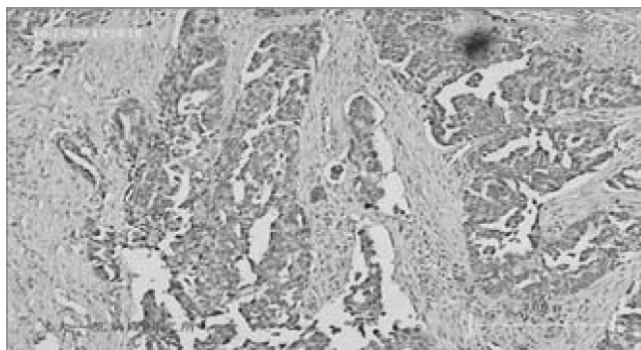


图 2 Prostin 在粘液性腺癌中的表达(200×)

Fig.2 Expression of prostin in mucinous adenocarcinoma(200×)

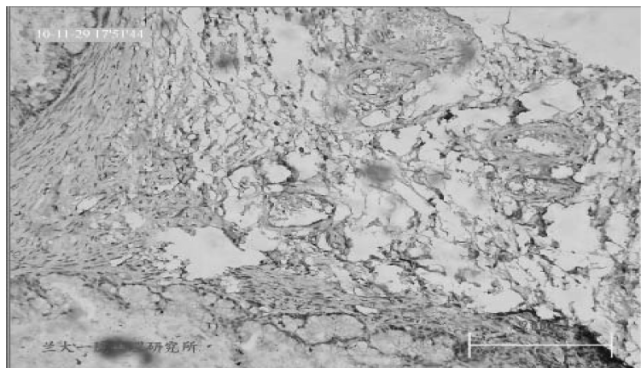


图 3 Prostin 在良性肿瘤中的表达(200×)

Fig.3 Expression of prostin in ovarian benign tumor (200×)

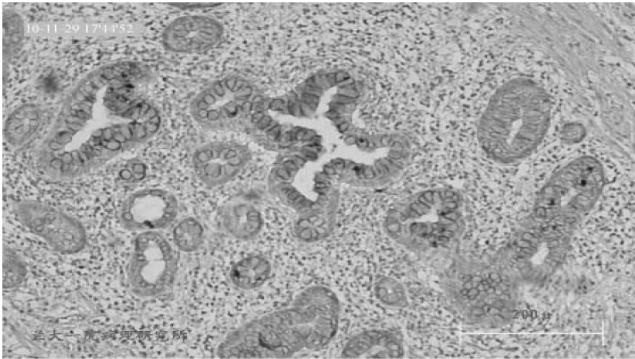


图 4 Prostasin 在正常组织中的表达(200×)

Fig.4 Expression of prostasin in normal ovarian (200×)

表 1 卵巢癌组织中 prostasin 蛋白的表达与临床病理参数的关系

Table 1 Correlation between prostasin expression and clinicopathological parameters in ovarian carcinoma

Clinicopathological Parameters		n	Expression of Prostasin protein		H(P)
			-	+/-+++	
FIGO stage		5	4 (80.00)	1 (20.00)	H=5.259
		11	5(45.45)	6(54.55)	P=0.154
		32	13(40.63)	19 (59.38)	
		8	2(25.00)	6(75.00)	
Histologic classification	G1	11	8 (72.72)	3(27.27)	H=12.28
	G2	21	10(47.62)	11(52.38)	P=0.002
	G3	24	5 (20.83)	19(79.17)	
Pathology type	Serous cystadenocarcinoma	17	11(64.71)	6(35.29)	H=10.332
	Mucinous cystadenocarcinoma	33	6(18.18)	27(81.82)	P=0.001
	Others	6	2(33.33)	4 (66.67)	

在健康妇女、上皮性良性卵巢肿瘤及卵巢癌患者术前血清中浓度分别为 11.68 (9.49 ,13.87)、31.26 (22.69 ,39.83)、246.48 (167.43 ,325.54) U / ml。

血清 prostasin、CA-125 表达水平在 3 组间的差异有统计学意义(P<0.001)。术前卵巢癌组血清 prostasin、CA-125 的表达水平明显高于前 2 组,差异有统计学意义(P<0. 0.01),健康妇女与良性肿瘤的差异无统计学意义。卵巢癌患者术后 7 天血清 prostasin 的浓度 7.88(6.92,8.85) μg/ml,术后血清中 prostasin 水平明显低于术前(t=4.673, P=0.000 R=0.622) (图 5)。

以正常对照组均数的 95%可信区间上限值 9.19(μg/ml)为界值点 ,prostasin 在卵巢上皮性肿瘤组的灵敏度 69.2 % (18/26), 特异性 84.3 % (59/70) ,CA-125 灵敏度 80.72 % (21/26),特异性 78.57%(55/70),两者联合检测的灵敏度 96.73 %,特异性 100 %。

2.2.2 血清 prostasin 与临床病理参数的关系 卵巢癌患者术前血清 prostasin 浓度与 FIGO 分期、分化程度、组织 prostasin 蛋白表达呈正相关关系(r=0.588 P=0.006 r=0.491 P=0.019 r=0.775 P=0.000) ; 与病理类型、CA-125、年龄无相关关系。血清 prostasin 浓度不依赖于 CA-125 水平变化,提示二者在卵巢癌的诊断中可以起到良好的互补作用。

2.1.2 Prostasin 蛋白的表达与临床病理参数的关系 prostasin 蛋白在 、 、 及 期卵巢癌的阳性表达率分别是 20.00 %、54.55 %、59.38 %及 75.00 % ,结果显示, prostasin 在 期的高表达提示 prostasin 对早期上皮性卵巢癌的具有良好的诊断意义。prostasin 蛋白在高、中及低分化卵巢浆液性腺癌组阳性表达率分别为 27.27 %、57.38 %及 79.19 % ,差异有统计学意义 (P=0.000) ; 卵巢浆液性腺癌分化越差、临床分期越晚 ,prostasin 蛋白阳性表达率越高。

2.2 ELISA 检测结果

2.2.1 血清中 prostasin、CA-125 的浓度 prostasin 在健康妇女、上皮性良性卵巢肿瘤及卵巢癌患者术前血清中的浓度分别为 5.66(4.94,6.37)、7.85(6.50,9.19)、14.07(10.53,17.60)μg/ml。CA-125

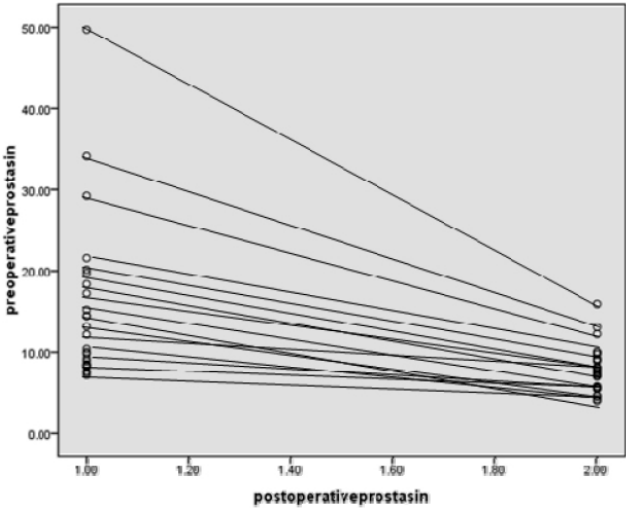


图 5 26 例卵巢癌患者术前及术后血清 prostasin 浓度(μg/ml)比较
Fig.5 Comparison of preoperative and postoperative prostasin levels (μg/ml) in 26 case patients with ovarian cancer

2.3 prostasin 在 26 例上皮性卵巢癌患者术前血清表达与卵巢癌组织中的表达相关性分析

以 prostasin 在上皮性卵巢癌组织中的免疫组化表达强弱为 X 轴, 以 prostasin 在上皮性卵巢癌患者血清中的表达值为 Y 轴绘制散点图, 经线性回归分析后二者之间有直线关系 ($r=0.601$) (图 3)。

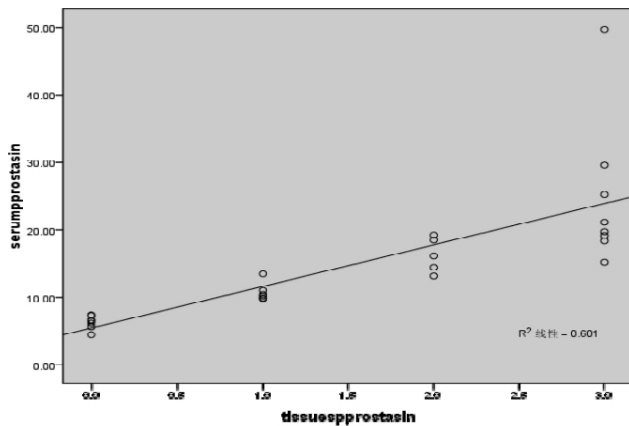


图 6 血清 prostasin 浓度与组织 prostasin 表达关系的散点图

Fig.6 The scatter between serum concentration and tissues of prostasin

3 讨论

卵巢癌因其起病隐匿, 症状不典型, 70 %-80 % 的卵巢癌患者发现时已为中晚期, 5 年生存率仅为 20 %-30 %, 而 I 期卵巢上皮性癌的 5 年生存率可达 80 %-90 %。CA125 对卵巢恶性肿瘤低的诊断率使其应用受到限制, 因此, 寻求新的特异性和敏感性均较高的肿瘤标志物, 是卵巢上皮性癌防治中的关键所在^[1]。

Prostasin 基因又称 PRSS8, 是 1994 年 Yu^[2]等利用放射免疫和免疫组化法从人的精液中纯化出来的一种 GPI- 结合的丝氨酸蛋白酶, 主要由前列腺上皮细胞合成, 是一种酸性蛋白 (PI 4.5-4.8), 分子量 40KDa。prostasin 在前列腺和精囊液中高表达 (大约为其他组织的 20 倍)^[2]以及在结肠、支气管、肝、肺等人体组织中的广泛存在提示它可能有重要的生物学功能, 但在正常的睾丸和卵巢组织中无表达^[3-8]。Laribi^[4]首次将 prostasin 作为前列腺标志物进行研究, 结果发现对照组 86 例血液样本 PCR 失于扩增, 而前列腺癌中 prostasin 阳性表达率为 36 % (35/96), 其中有淋巴结转移者 prostasin 阳性率 63 % (17/27) 而原位癌为 26 % (18/69), 提示 prostasin 可能是一种新的肿瘤侵袭和转移的抑制物。Mok^[5]等首先对 3 个卵巢癌细胞株和 3 个正常卵巢上皮细胞系进行 cDNA 微阵列分析, 发现 prostasin 的基因过度表达, 随后通过免疫组化和 RT-PCR 发现 prostasin mRNA 及蛋白在癌变的卵巢上皮细胞和基质中的表达比正常卵巢组织明显增强 (120-410 倍), 然后通过酶联免疫吸附试验检测卵巢癌患者血清 prostasin 蛋白水平, 结果 64 例卵巢癌患者血清 prostasin 蛋白平均水平为 13.7 μg/ml, 对照组 137 例血清 prostasin 蛋白平均水平为 7.5 μg/m, 显示卵巢癌患者血清 prostasin 蛋白水平明显增高; 与 CA125 联合应用时在诊断卵巢癌的灵敏度和特异度分别为 92 % 和 94 %, 在相同的特异度情况下 (94 %) 单独应用 prostasin 和单独应用 CA125 的灵敏度仅为 51.4 % 和 64.9 %。但 Mill^[6]等研究表明 prostasin 在卵巢癌

早期低表达且敏感性不及 CA-125, 但可作为晚期卵巢癌的最佳标志物, 两者之间并无明显的相关性, 联合这两种标志物可提高敏感度。张晓霞^[7]用基因芯片技术筛查卵巢癌差异表达基因, 结果发现卵巢癌差异表达基因 58 个, 其中表达增高基因 30 个, 表达降低基因 28 个, prostasin 为表达增高基因。然后应用 RT-PCR 及免疫组化法检测 prostasin mRNA 及蛋白表达, 结果显示卵巢癌细胞中的阳性表达率均明显高于正常卵巢及卵巢良性肿瘤细胞, 其表达程度与卵巢癌的分化程度及临床分期相关。

本研究结果提示 prostasin 在卵巢癌中的表达与临床分期、病理分级及血清 prostasin 表达相关, prostasin 在早期的高表达提示 prostasin 对上皮性卵巢癌具有早期诊断意义。prostasin 是一种具有比 CA125 更高特异性和灵敏度的新的卵巢癌肿瘤标志物, 与 CA125 联合检测可以提高早期卵巢癌诊断率, Prostasin 有望成为卵巢癌临床检测的一个新指标, 并为卵巢癌的治疗提供了一个新思路。但 prostasin 在卵巢组织中的表达情况以及在不同组织表达的差异性可能是由于 prostasin 通过不同途径或信号通路参与不同组织调节, 其具体机制尚需进一步研究。

致谢: 感谢兰州大学第一附属医院病理科曾峰、孙少华、冯颖老师对此次实验的大力指导和帮助。

参考文献 (References)

- [1] 吕晓红, 熊英, 崔恒. 卵巢上皮性癌标志物的研究进展 [J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(1): 66-68
- [2] Chang xiao-hong, xiong ying, cui heng. The progress of epithelial ovarian cancer marker [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2008, 43(1): 66-68
- [3] Yu J.X, Chao L, Chao J. Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland [J]. J Biol Chem, 1994, 269(29): 18843-18848
- [4] Fernanda Pires Costa, Eraldo Luis Batista Junior, Alice Zelmanowicz, et al. Prostasin a potential tumor marker in ovarian cancer-A pilot study [J]. Clinical Science, 2009, 64(7): 641-644
- [5] Laribi A, Berteau P, Gala J, et al. Blood-borne RT-PCR assay for prostasin-specific transcripts to identify circulating prostate cells in cancer patients [J]. Eur Urol, 2001, 39(1): 65-71
- [6] Mok SC, Chao J, Skates S, et al. Prostasin, serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93 (19): 1458-1464
- [7] Mills G B, R. C Bast, Jr, et al. Future for ovarian cancer screening: novel markers from emerging technologies of transcriptional profiling and proteomics [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(19): 1437-1439
- [8] 张晓霞. 应用基因芯片技术筛查差异表达基因在卵巢癌早期诊断研究中的意义 [D]. 吉林大学博士学位论文, 2008
- [9] Zhang xiao-xia. The significance of screening differential expression gene in ovarian cancer in early diagnosis by using cDNA microarray [D]. PhD thesis, jilin university, 2008
- [10] Chen Y W, Wang J K, Chou F P, et al. Regulation of the matriptase-prostasin cell surface proteolytic cascade by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 during epidermal differentiation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(41): 31755-31762