

PRL-3 基因在前列腺癌组织中的表达分析

赵 易^{1,2} 武国军¹ 张 瑞² 沈 岚² 于垂恭^{1,2} 王映梅³ 药立波² 袁建林^{1*}

(第四军医大学西京医院泌尿外科¹,基础部生物化学与分子生物教研室²,西京医院病理科³,西安 710032)

摘要 检测 PRL-3 在前列腺癌中的表达,探讨其与前列腺癌发生发展的关系。Western blot、RT-PCR 检测 52 例前列腺癌组织及其对应癌旁增生组织,12 例阳性淋巴结相对表达水平,并分析其表达水平与临床病理学指标的关系。结果 52 例前列腺癌中 PRL-3 基因表达量较相应癌旁增生组织高,差异有统计学意义($p < 0.05$),12 例淋巴结转移灶 PRL-3 表达量明显高于原发肿瘤、阴性淋巴结及癌旁增生组织($p < 0.01$)。PRL-3 基因的表达水平与前列腺癌分化程度、淋巴结转移有关($p < 0.05$),与年龄、家族史、血清 PSA 含量无关($p > 0.05$)。说明 PRL-3 的表达与前列腺癌发生发展关系密切,PRL-3 可作为前列腺癌诊断、治疗及预后判断过程中的一种较有价值的指标。

关键词 PRL-3 基因 前列腺癌 转移

中图法分类号 R737.25; 文献标志码 B

前列腺癌是一种起病隐袭、具有脏器转移及死亡率较高的恶性肿瘤^[1],其侵润及转移程度是影响预后的主要因素,然而目前决定其发生及转移的分子机制尚不明确。蛋白酪氨酸磷酸酶-3 是一种蛋白分子量只有 23 KD 的蛋白磷酸酶,属于 PRL 家族,该家族只有三个成员 PRL-1、PRL-2、及 PRL-3^[2]。其中 PRL-3 是一种新近发现的具有促进细胞生长、迁移和侵润的蛋白酪氨酸磷酸酶^[3]。因此,本研究应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、WESTERN BLOTH 检测 PRL-3 在前列腺癌和转移灶中的表达情况及其表达与病理学特征的关系,探讨 PRL-3 在前列腺癌发生发展和转移侵袭中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

均取自第四军医大学西京医院 2007 年 1 月至 2009 年 4 月间 52 例前列腺癌患者手术切除的前

腺癌组织(PCa)及癌旁增生组织,12 例转移淋巴结及阴性淋巴结,全部为首次手术治疗并资料完整,标本离体后立即液氮冻存 30 s, -70℃ 保存。52 例前列腺癌患者年龄(38—92)岁(平均年龄 52.36 岁),发生转移者 30 例,骨转移者 6 例,淋巴转移 28 例。标本经病理组织学确诊后,根据 WHO 分级并结合 Gleason 评分系统可分为,高、中、低分化前列腺癌。

1.2 主要试剂

Trizol 及 PCR 反应试剂盒购自 Takara 公司, RNA 反转录试剂盒为 Fermentas 公司,DEPC、蛋白定量试剂盒为中杉金桥公司,琼脂糖、Tris 碱、GAPDH 引物均为本实验室保存。PRL-3 引物由上海博彩生物科技有限公司合成,羊抗人 PRL-3 多克隆抗体购自 Sigma 公司,兔抗羊单克隆抗体为福建迈新公司产品。

1.3 方法

1.3.1 RT-PCR

采用 Trizol 总 RNA 提取液,每例标本取组织 50 mg 具体步骤参照说明书。凝胶电泳并用紫外分光光度仪测总 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA 为模板,按照试剂盒说明书进行反转录获得 cDNA,以 cDNA 产物为模板,PRL-3 基因和作为内参照的看家基因

2009 年 9 月 27 日收到 国家自然科学基金项目(30872583)资助
第一作者简介:赵 易(1981—),男,硕士研究生。E-mail:zywm008@163.com。

GAPDH 上下游引物序列参照文献设计,PRL-3 上游引物序列为 5'CTCAGCACCTTCATTGAGGACCTG3',下游引物序列为 5'AGGTAGGTGAGCTGCTTGCTGT-TG3',产物大小为 359 bp; GAPDH 上游引物为 5`GAGCGAGATCCCTCCAAAAT3`下游引物为 5`ACTGT-GGTCATGACTCCTTC 3`,产物长度为 233 bp。PRL-3 循环参数为 95℃ 30 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, PRL-3 循环数为 30 次, GAPDH 循环数为 28 次。PCR 结束后各取 10 μL 反应产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,用凝胶成像分析系统对条带扫描并进行分析。

1.3.2 Western blot

取 46 例前列腺癌与癌旁增生组织标本[(1-2) g],加入 5 倍湿重裂解缓冲液粉碎匀浆,4℃ 静置 24 h,4℃ 12 000 r/min 离心 40 min,提上清即为总蛋白,通过蛋白定量试剂盒按说明书行 BCA 法进行总蛋白定量,确定蛋白浓度,计算上样量。电泳(15% SDS-PAGE 凝胶)、转膜、丽春红染色。20 g/BSA 封闭,加兔抗人 PRL-3(1:500)多克隆一抗 4℃ 过夜;二抗室温孵育 2 h。ECL 发光检测,X 光片显影,扫描图像分析结果。

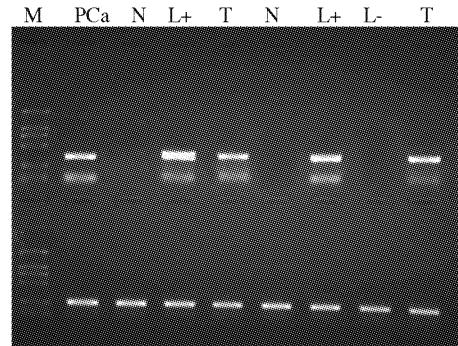
1.3.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计学软件,分别采用 χ^2 检验、*t* 检验进行统计学分析,*p* < 0.05(显著差异)定为有统计学意义,*p* > 0.05(无显著差异)定为无统计学意义。

2 结果

2.1 PRL-3 在前列腺癌与相应的增生组织及淋巴结中的表达

(1) 通过对 46 例前列腺癌患者以及相应的癌旁增生组织中 PRL-3 mRNA 的表达,发现在癌旁增生组织中 PRL-3 几乎不表达,而在癌组织中的表达明显。12 例肿瘤周围转移淋巴结 PRL-3 mRNA 表达量为 2.1 ± 0.41 ,高于对应的正常增生组织和阴性淋巴结,差异有统计学意义(*p* < 0.05)。



M—分子量标记(所有肿瘤和正常组织均有 GAPDH 表达),
PCA—前列腺癌,N—癌旁增生组织,T—对应原位癌,L+—淋巴结转移,L-—一对阴性淋巴结

图 1 RT-PCR 检测前列腺癌、癌旁增生组织及转移淋巴结中 PRL-3 的表达

(2) 通过对 46 例前列腺癌与癌旁增生组织的 Western blot 检测结果显示:PRL-3 在前列腺癌中表达高于癌旁增生组织(*p* = 0.044),分子量约为 23 kD,且有转移组表达高于无转移组(*p* = 0.040,见表 1)。

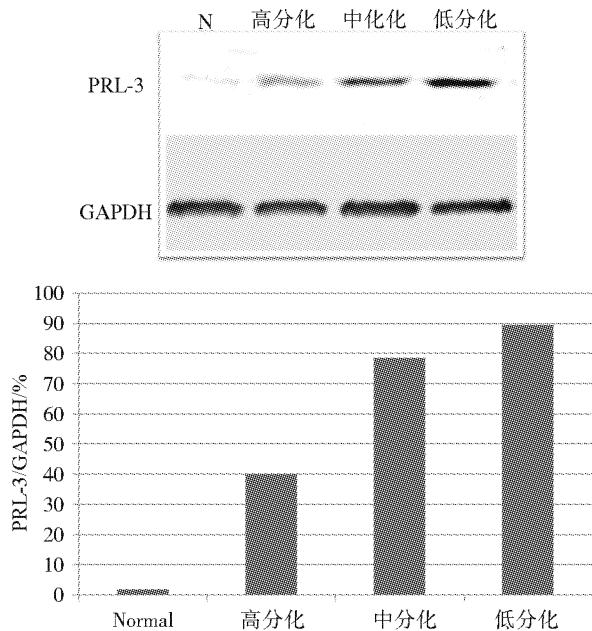


图 2 Western-blot 显示 PRL-3 蛋白在前列腺癌高、中、低分化程度以及癌旁增生组织中的表达情况

2.2 PRL-3 的表达与患者临床病理指标的关系

通过对 PRL-3 基因在前列腺癌中的表达进行统计学分析,结果显示:PRL-3 与前列腺癌的分化程度(*p* < 0.05)、淋巴转移(*p* < 0.01)呈正相关,而与患

者的年龄、家族史、血清 PSA 无明显关系(见表 1),因前列腺癌肿瘤大小、侵润程度等比较特征不明显,故未对 PRL-3 在其方面的表达做统计学分析。

表 1 52 例前列腺癌患者 PRL-3 表达与临床

病理学关系(χ^2 检验)

临床资料及 病理学特征	例数	PRL-3 阳性 数率/%	p 值
年龄			
≤50	31	27(87.1%)	
>50	21	15(71.4%)	$p > 0.05$
分化程度			
低分化	19	17(89.5%)	
中分化	28	22(78.6%)	
高分化	5	2(40.0%)	$p < 0.05$
家族史			
有	17	11(64.7%)	
无	35	24(68.6%)	$p > 0.05$
淋巴转移			
+	28	23(82.1%)	
-	24	9(37.5%)	$p < 0.01$
血清 PSA			
≤20ng/ml	12	7(58.3%)	
>20ng/ml	40	14(35.0%)	$p > 0.05$

3 讨论

在欧美发达国家前列腺癌的发生比率仅次于肺癌位居男性恶性肿瘤之次,而近年来随着我国人民生活水平的日益提高以及生活方式的改变,前列腺癌的发病率在我国已经呈现逐年上升的趋势。前列腺癌具有起病隐袭,难以早期诊断和预防性干预效果不理想等特点,一旦确诊为前列腺癌,往往已经进入到疾病的晚期发展阶段,并多发有骨骼、消化器官等多种脏器的转移,尤其是发展至激素非依赖性阶段,药物敏感性明显降低,且因肿瘤的多器官脏器转移而失去了手术治疗的指征,因此随着分子生物学的发展,基因治疗寄希望成为前列腺癌治疗方法上的新的突破点。

PRL 家族包括了 PRL-1、PRL-2、PRL-3 三个成员,是新近发现的小分子 PTP 酶其家族成员具有 76%—87% 的同源性^[1],而 PRL-2 已被报道证实在包括前列腺癌在内的多种肿瘤中呈现高表达,与肿瘤恶性程度密切相关^[4]。PRL-3 也被证实存在于胃癌、肝癌、结肠癌等肿瘤中高表达^[5—9],参与肿瘤的发生发展过程。本研究结果表明,PRL-3 mRNA 和蛋白在前列腺癌组织中均有表达,并且在前列腺癌中表达明显高于癌旁增生组织,转移阳性淋巴结中表达高于阴性淋巴结及相应原位癌,提示了 PRL-3 基因在人前列腺癌的形成和恶性演进中具有重要的作用。由于目前 PRL-3 在人前列腺癌中的表达情况分析及研究尚未见到,本实验结果表明,PRL-3 表达的增高与前列腺癌的恶性程度及转移有关,这对于前列腺癌的生物学行为、预后和指导治疗具有重要意义,也提示了 PRL-3 可能成为前列腺癌治疗的新靶点。

参 考 文 献

- Kozlov G, Cheng J, Ziomek E, et al. Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3. Journal of Biological Chemistry, 2004;279:11882—11889
- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians, 2008;58:71—96
- Zeng Q, Dong J M, Guo k, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion and metastasis. Cancer Res, 2003; 63: 2716—2722
- Kato H, Semba S, Miskad U A, et al. High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver and lung metastases. Clin Cancer Res, 2004;10(21):7318—7328
- Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. In, 2001;294:1343—1346
- Radke I, Gotte M, Kersting C, et al. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer. British journal of cancer, 2006;95(3):347—354
- Peng L, Ning J, Meng L, et al. The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2004;130(9):521—526
- Li Z, Zhan W, Wang Z, et al. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed re-

- duces peritoneal metastasis. Biochemical and Biophysical Research Communications,2006;348(1):229—237
- interactions in prostate cancer identifies PTPCAAX2 as a potential oncogene. Cancer letters,2002;175 (1):63—69
- 9 Wang Q, Holmes D, Powell S, et al. Analysis of stromal-epithelial

Expression and Analysis of PRL-3 in Prostatic Carcinoma Tissues

ZHAO Yi^{1,2}, WU Guo-jun¹, ZHANG Rui², SHEN Lan², YU Chui-gong^{1,2},
WANG Ying-mei³, YAO Li-bo², YUAN Jian-lin^{1*}.

(Department of Urology, Xijing hospital¹, Faculty of Biokgy Chemistrg and Moleadar Biology², Department of Patholoy³,
the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China)

[Abstract] To detect the expression of PRL-3 relationship with tumor occurrence and metastasis in prostatic carcinoma tissues. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of PRL-3 in prostatic carcinoma tissues and paired paratumor normal tissues from 52 PCA patients, metastatic lymph nodes from 12 cases with metastasis. It is resulted that PRL-3 level was increased in primary PCA tissues as compared with paired paratumor normal tissues ($P < 0.05$). However, the PRL-3 levels of metastatic lymph nodes in 12 cases were significantly high compared with the matched primary lesions, negative-lymph nodes and normal tissues ($P < 0.01$). There was significant relation of the expression of PRL-3 with the clinicopathological features including degree of differentiation and metastatic ($P < 0.05$), but no relation with age, family medical history, PSA was found ($P > 0.05$). It is concluded that PRL-3 gene plays an important role in metastasis and carcinogenesis of PCA, strongly suggesting that the leve of PRL-3 can be used to indicate the potential of metastasis.

[Key words] PRL-3 gene metastasis prostatic carcinoma