

PRC1 高表达与前列腺癌生化复发的相关性研究

韩兆冬 罗宏伟 林卓远 梁应科 陈果 吴永定 何慧婵

【摘要】 **目的** 研究细胞质分裂调控蛋白 1 (PRC1) 在前列腺癌中的表达情况及其与生化复发的相关性。**方法** 采用实时定量 PCR 及蛋白免疫印迹法检测 PRC1 在前列腺癌与癌旁前列腺组织的表达水平, 并利用 Taylor 基因芯片数据库对 PRC1 基因 mRNA 水平进行验证。Kaplan-Meier 法分析前列腺癌患者总体生存率及生化复发时间与 PRC1 mRNA 表达水平之间的关系。Cox 回归分析临床病理特征与生化复发的相关性。**结果** 12 对前列腺癌及癌旁前列腺组织中, 前列腺癌的 PRC1 mRNA 及蛋白表达均高于癌旁前列腺组织 (P 均 < 0.01)。Taylor 基因芯片数据库分析显示, PRC1 在前列腺癌组织中的表达水平高于非癌组织 ($P < 0.001$), 且出现生化复发或转移、Gleason 评分高、临床分期 \geq T3A 期者的 PRC1 mRNA 表达水平高于无出现生化复发或转移、Gleason 评分低、临床分期 $<$ T3A 期者 (P 均 < 0.05); Kaplan-Meier 分析显示, PRC1 高表达组的无生化复发率明显低于 PRC1 低表达组 ($P = 0.008$); Cox 回归分析显示, PRC1 ($P = 0.001$)、Gleason 评分 ($P < 0.001$)、术前 PSA 水平 ($P = 0.021$) 及病理分期 ($P = 0.021$) 是前列腺癌生化复发的影响因素。**结论** PRC1 在前列腺癌中的高表达与生化复发呈正相关, PRC1 表达水平有助于判断前列腺癌患者的预后。

【关键词】 细胞质分裂调控蛋白 1; 前列腺癌; 生化复发; 预后

Correlation analysis between overexpression of protein regulator of cytokinesis 1 and biochemical recurrence of prostate cancer Han Zhaodong, Luo Hongwei, Lin Zhuoyuan, Liang Yingke, Chen Guo, Wu Yongding, He Huichan. Department of Urology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China

Corresponding author, He Huichan, E-mail: xiaohejian@21cn.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation between the expression level of protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1) and biochemical recurrence of prostate cancer. **Methods** The expression levels of PRC1 protein and mRNA between the prostate cancer and adjacent benign tissues were statistically compared using Western blot and RT-PCR. The expression of PRC1 mRNA was validated by microarray-based Taylor database. Kaplan-Meier plot was performed to evaluate the overall survival and analyze the correlation between PRC1 expression and biochemical recurrence of prostate cancer. Cox proportional hazards regression model was utilized to assess the correlation between clinicopathological characteristics and biochemical recurrence of prostate cancer. **Results** Among 12 pairs of prostate cancer and adjacent benign tissues, the expression levels of PRC1 protein and mRNA in the prostate cancer tissues were significantly higher than those in the adjacent benign prostate tissues (both $P < 0.01$). Microarray-based Taylor database revealed that the expression of PRC1 in the cancer tissues was significantly up-regulated compared with that in the non-cancerous tissues ($P < 0.001$). In addition, the expression of PRC1 mRNA in patients with biochemical recurrence or metastasis of prostate cancer, high Gleason score and clinical staging \geq T3A was significantly up-regulated compared with their counterparts with no biochemical recurrence or metastasis of prostate cancer, low Gleason score and clinical staging $<$ T3A (all $P < 0.05$). Kaplan-Meier plot demonstrated that the biochemical recurrence rate of prostate cancer in patients with PRC1 overexpression was considerably lower than that in those with low PRC1 expression ($P = 0.008$). Cox proportional hazards regression model revealed that PRC1 ($P = 0.001$), Gleason score ($P < 0.001$), preoperative prostate specific antigen level ($P = 0.021$) and pathological staging (P

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2016.07.005

基金项目: 广东省自然科学基金 (2014A030310066); 广州市卫生局一般引导项目 (20141A010013); 广东省科技计划项目 (2013B021800055); 广州市科技计划项目 (2014J4100072)

作者单位: 510180 广州, 广州市第一人民医院泌尿外科 (韩兆冬), 中心实验室 (韩兆冬, 罗宏伟, 林卓远, 梁应科, 陈果, 吴永定); 510230 广州, 广州医科大学附属第一医院广东省泌尿外科重点实验室 (何慧婵)

通讯作者, 何慧婵, E-mail: xiaohejian@21cn.com

= 0.021) were associated with the biochemical recurrence of prostate cancer. **Conclusions** Overexpression of PRC1 is positively correlated with the biochemical recurrence of prostate cancer. PRC1 expression level contributes to evaluate the prognosis of patients diagnosed with prostate cancer.

【Key words】 Protein regulator of cytokinesis 1; Prostate cancer; Biochemical recurrence; Prognosis

在前列腺癌预后判断的研究中, 细胞周期评分已经被证实可以有效地预测前列腺癌的侵袭性及病情变化^[1-2]。细胞质分裂调控蛋白 1 (PRC1) 是其中的一个基因, 与细胞的有丝分裂相关。已有研究表明, PRC1 可作为肿瘤细胞恶性增殖及疗效评价指标。约 20%~50% 的早期前列腺癌患者经手术或去势治疗后会出现生化复发^[3]。临床上需要寻找有助于预测患者预后的生物指标^[4]。为此, 本研究观察了 PRC1 在前列腺癌中的表达情况及其与生化复发的相关性, 旨在探讨 PRC1 的过度表达对预测前列腺癌生化复发的价值。

材料与方 法

一、材 料

12 对前列腺癌及癌旁前列腺组织来源于广州市第一人民医院, 所有病例均为首次确诊并行前列腺癌根治术, 术前均未行放射治疗或化学治疗。前列腺癌患者年龄 (65.7 ± 3.5) 岁, 按 TNM 分期 T1 3 例, T2 9 例; Gleason 评分 < 7 分 10 例, ≥ 7 分 2 例; 术前 PSA < 4 $\mu\text{g/L}$ 2 例, PSA $\geq 4 \mu\text{g/L}$ 10 例。

二、主要试剂及仪器

RNApure 高纯总 RNA 快速抽提试剂盒 (离心柱型) 购自北京百泰克生物技术有限公司, Trizol 总 RNA 抽提试剂为美国 Invitrogen 公司产品, RNA 逆转录试剂为日本 Takara 宝生物产品; PRC1 兔抗人单克隆抗体为美国 Abcam 公司产品, β -actin 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品, SuperSignal[®] 系列 Western 化学发光底物系统为美国 Thermo Scientific 公司产品; RotorGene 2000 system 实时荧光定量 PCR 分析系统为澳大利亚 Corbett Research 产品。

三、方 法

1. PRC1 mRNA 表达水平的检测

采用实时定量 PCR (RT-PCR) 检测。提取前列腺癌及癌旁前列腺组织总 RNA, 取 2 μg 总 RNA 进行逆转录。PCR 总体积 20 μl , 根据仪器提供的实验方案配制 SYBR Green PCR Master Mix, β -actin 作为内参, 按 PCR 仪附带的实验方案操作。引物

序列: PRC1 上游 5'-CCTGTGCCTACTTTGCCTGA-3', 下游 5'-CGTGGCTAACACCAAGTCCA-3', 产物长度 304 bp; β -actin 上游 5'-AGCGAGCATC-CCCCAAAGTT-3', 下游 5'-GGGCACGAAGGCTC ATCATT-3', 产物长度 285 bp。PCR 反应步骤: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预热 10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 循环 37 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s。根据标准曲线设定阈值, 使用 Rotor-Gene 5.0 软件分析数据。

2. PRC1 蛋白表达水平的检测

采用蛋白免疫印迹法检测。从前列腺癌及癌旁前列腺组织中提取蛋白, 取 40 μg 蛋白在十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 并转移至杂交硝酸纤维素膜上, 然后以脱脂奶粉溶于 Tris-HCl 缓冲盐溶液, 调节浓度至 5%, 封闭 1 h, 随后洗净膜并孵育 PRC1 抗体 (1:2 000) 及 β -actin 抗体 (1:2 000), 使用 SuperSignal West PICO 化学发光检测系统观察结果, β -actin 作为内参蛋白。

3. Taylor 数据库分析

由于纳入本研究的样本量较少, 所以利用 Taylor 基因芯片数据库资料进行验证, 并分析 PRC1 表达水平与前列腺癌临床病理特征关系。Taylor 数据库 [美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 高通量基因数据表达平台 (GEO), 档案编号 GSE21032] 是一个公用的数据平台, 其中 mRNA 表达谱芯片包含带有临床随访数据的 150 例原发性前列腺癌及 29 例非癌组织。

四、统计学处理

使用 SPSS 17.0 分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对样本 *t* 检验或独立样本 *t* 检验; 应用 Kaplan-Meier 法进行生存分析, 临床病理特征与生化复发的相关性应用 Cox 回归模型分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、PRC1 在前列腺癌及癌旁前列腺组织的 mRNA 及蛋白表达情况

12 例前列腺癌及癌旁前列腺组织中, PRC1 mRNA 在前列腺癌组织表达水平为 9.22 ± 2.28 , 比癌旁前列腺组织 (1.04 ± 0.29) 上调 ($t =$

10.781, $P < 0.001$), 见图 1; PRC1 蛋白在前列腺癌组织的表达水平为 3.89 ± 2.55 , 比癌旁前列腺组织 (1.00 ± 0.39) 增加 ($t = 4.653$, $P < 0.001$), 见图 2。

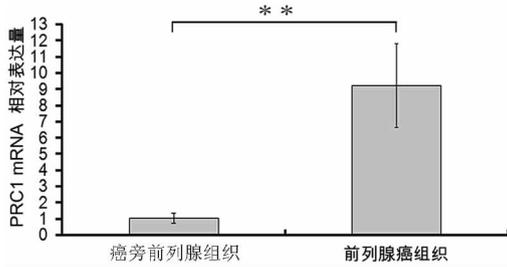


图 1 PRC1 mRNA 在前列腺癌及癌旁前列腺组织的表达情况

** $P < 0.01$

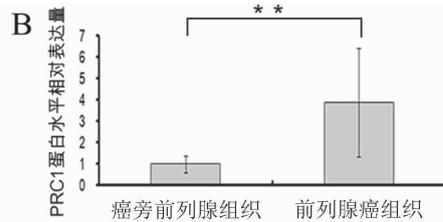
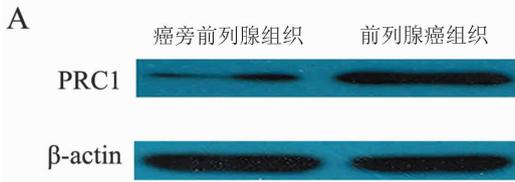


图 2 PRC1 蛋白在前列腺癌及癌旁前列腺组织的表达情况

A: 蛋白免疫印迹法结果; B: 定量分析结果, ** $P < 0.01$

表 1 PRC1 表达与前列腺癌临床特征的关系

临床特征	例数	PRC1 mRNA 表达水平	t 值	P 值
组织类型				
前列腺癌	150	6.87 ± 0.38	6.741	<0.001
非癌组织	29	6.61 ± 0.12		
年龄				
<66 岁	125	4.80 ± 0.66	0.756	0.451
≥66 岁	25	5.16 ± 0.44		
血清总 PSA				
<4 (μg/L)	24	6.85 ± 0.35	0.269	0.788
≥4 (μg/L)	123	6.87 ± 0.35		
Gleason 评分				
<8 分	117	6.80 ± 0.29	2.912	0.008
≥8 分	22	7.09 ± 0.47		
病理分期				
<T3A 期	86	6.78 ± 0.29	-2.496	0.014
≥T3A 期	55	6.94 ± 0.39		
远处转移				
否	122	6.78 ± 0.27	-4.907	<0.001
是	28	7.28 ± 0.52		

续表

临床特征	例数	PRC1 mRNA 表达水平	t 值	P 值
生化复发				
否	104	6.77 ± 0.27	-3.384	0.001
是	36	7.03 ± 0.43		

注: 因为数据库中有部分原始数据缺失, 所以某些统计项目的纳入病例数不相同

复发时间与 PRC1 表达量之间的联系, 高表达组的无生化复发率低于低表达组 ($P = 0.008$), 而 2 组的总体生存率比较差异无统计学意义 ($P = 0.105$), 见图 3。此外, 在单因素分析中, 高表达组与低表达组在生化复发时间上比较差异有统计学意义 ($HR = 5.08$, $95\% CI 2.51 \sim 10.26$, $P < 0.001$)。在多因素分析中, 高表达 PRC1 ($HR = 6.17$, $95\% CI 2.02 \sim 18.86$, $P = 0.001$)、高 Gleason 评分 ($HR = 2.80$, $95\% CI 1.81 \sim 4.34$, $P < 0.001$)、术前高 PSA 水平 ($HR = 1.01$, $95\% CI 1.00 \sim 1.01$, $P = 0.021$) 及高病理分期 ($HR = 2.82$, $95\% CI 1.17 \sim 6.81$, $P = 0.021$) 均为生化复发的危险因素, 见表 2。

二、PRC1 与前列腺癌临床病理特征的关系

为进一步验证 PRC1 在前列腺癌中的表达情况, 通过 Taylor 数据库检索发现 PRC1 在前列腺癌组织中的表达 (6.87 ± 0.38) 高于非癌组织 (6.61 ± 0.12) ($P < 0.001$), 且出现生化复发或转移、Gleason 评分高、临床分期 ≥T3A 期者的 PRC1 mRNA 表达水平高于无出现生化复发或转移、Gleason 评分低、临床分期 < T3A 期者 (P 均 < 0.05), 见表 1。

三、PRC1 与前列腺癌生化复发的相关性

以 PRC1 表达水平量的中位数为分割点, 分成高表达组和低表达组。通过 Kaplan-Meier 曲线分析 Taylor 数据库中前列腺癌患者总体生存率及生化

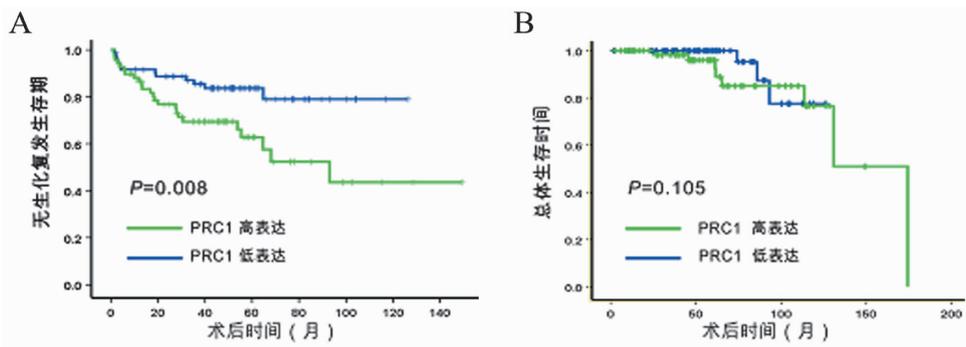


图3 前列腺癌中 PRC1 表达相关的 Kaplan-Meier 曲线

A: 生化复发时间比较; B: 总体生存率比较

表2 Cox 风险预测模型中 PRC1 表达量对生化复发的诊断价值

参 数	无生化复发生存期		总体生存期	
	风险比 (95% CI)	P 值	风险比 (95% CI)	P 值
单因素分析				
PRC1	5.08 (2.51 ~ 10.26)	<0.001	2.03 (0.56 ~ 7.39)	0.284
Gleason 评分	3.37 (2.39 ~ 4.74)	<0.001	1.20 (0.54 ~ 2.68)	0.657
术前 PSA	1.01 (1.00 ~ 1.01)	0.010	1.01 (1.00 ~ 1.01)	0.014
病理分期	5.23 (2.56 ~ 10.68)	<0.001	0.62 (0.15 ~ 2.52)	0.507
年龄	1.02 (0.97 ~ 1.07)	0.434	1.15 (1.04 ~ 1.27)	0.007
临床分期	1.03 (0.53 ~ 2.01)	0.926	1.88 (0.48 ~ 7.34)	0.363
多因素分析				
PRC1	6.17 (2.02 ~ 18.86)	0.001	2.20 (0.16 ~ 29.47)	0.552
Gleason 评分	2.80 (1.81 ~ 4.34)	<0.001	2.23 (0.76 ~ 6.55)	0.144
术前 PSA	1.01 (1.00 ~ 1.01)	0.021	1.00 (1.00 ~ 1.01)	0.433
病理分期	2.82 (1.17 ~ 6.81)	0.021	0.31 (0.05 ~ 2.12)	0.234
年龄	0.99 (0.94 ~ 1.05)	0.778	1.08 (0.94 ~ 1.26)	0.285
临床分期	0.90 (0.42 ~ 1.92)	0.783	4.80 (0.55 ~ 41.66)	0.155

讨 论

前列腺癌是严重影响男性健康的恶性肿瘤，我国前列腺癌的发病率呈上升的趋势。前列腺癌的发生、发展是一个多阶段的过程，而且有不同的机制参与肿瘤的进展及预后。生化复发是前列腺癌根治术后疾病复发的早期表现，约 17% ~ 64% 根治术后患者出现生化复发，其中约 1/3 发展为转移性前列腺癌^[5]。Punnen 等^[6]提出生化复发与前列腺癌的进展及转移密切相关。因此，对生化复发的早期预测有助于观察前列腺癌的病情变化及指导进一步的治疗。

PRC1 蛋白由 620 个氨基酸组成，主要在 G2/M 期表达，是细胞周期蛋白依赖性激酶的基质，

参与纺锤体平行微丝及缩复环的形成，与细胞的有丝分裂密切相关^[7-8]。PRC1 基因被证实直接受抑癌基因 p53 的负性调控，在 p53 缺失的肿瘤细胞中，PRC1 表达量明显增加^[9]。Kanehira 等^[10]在膀胱癌细胞株内发现 PRC1 表达量升高，沉默后可导致膀胱癌细胞的死亡。Espinosa 等^[11]发现 PRC1 在宫颈癌中高表达。临床研究发现，PRC1 不仅可以作为预测肿瘤发生的因子，也是评估肿瘤预后及疗效的参考指标之一。有研究分析 448 例非小细胞肺癌化学治疗后基因变化，发现化学治疗后 PRC1 表达下调，提示 PRC1 mRNA 表达水平可预测患者预后^[12]。Mustacchi 等^[13]发现，PRC1 与早期乳腺癌的发生及患者的预后相关，检测 PRC1 有助于治疗方案的设计。但 PRC1 在前列腺癌中的表达情况，

笔者尚未见相关报道。

本研究发现,前列腺癌中的 PRC1 在 mRNA 及蛋白表达水平均较癌旁前列腺组织明显升高,出现生化复发或转移、Gleason 评分高、临床分期 \geq T3A 期者的 PRC1 mRNA 表达水平高于无出现生化复发或转移、Gleason 评分低、临床分期 $<$ T3A 期者。说明 PRC1 是促癌因子,其表达与前列腺癌的增殖、进展有关,并随着肿瘤的恶性程度的升高而升高。与 Gleason 评分、术前 PSA、病理分期等临床指标一起构建前列腺癌生化复发回归模型结果提示,PRC1 是生化复发的影响因素,可以作为生化复发的预测指标。即 PRC1 表达越高,越早出现生化复发,预后越差。

综上所述,PRC1 的表达增高与前列腺癌的恶性程度及生化复发密切相关,与现有的临床指标联合应用能更有效预测前列腺癌的预后。虽然 PRC1 的作用机制仍有待进一步研究,但我们的结果仍然有望为前列腺癌治疗提供新的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Arsov C, Jankowiak F, Hiester A, Rabenalt R, Quentin M, Schimmöller L, Blondin D, Antoch G, Albers P. Prognostic value of a cell-cycle progression score in men with prostate cancer managed with activesurveillance after MRI-guided prostate biopsy—a pilot study. *Anticancer Res*, 2014, 34 (5): 2459-2466.
- [2] Sommariva S, Tarricone R, Lazzeri M, Ricciardi W, Montorsi F. prognostic value of the cell cycle progression score in patients with prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*, 2016, 69 (1): 107-115.
- [3] Planas J, Morote J. Biochemical recurrence criteria after radical prostatectomy. Natural history of the disease. *Arch Esp Urol*, 2012, 65 (1): 4-11.
- [4] 张增强, 叶永康, 黄亚强, 吴永定, 李牧, 何慧婵. 人肌球蛋白轻链 9 在前列腺癌的表达水平及其对生化复发的预测价值. *新医学*, 2015, 46 (11): 732-736.
- [5] 鲁欣, 任善成, 孙颖浩. 前列腺癌根治术后生化复发的诊断和治疗. *中华泌尿外科杂志*, 2007, 28 (12): 861-863.
- [6] Punnen S, Cooperberg MR, D'Amico AV, Karakiewicz PI, Moul JW, Scher HI, Schlomm T, Freedland SJ. Management of biochemical recurrence after primary treatment of prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol*, 2013, 64 (6): 905-915.
- [7] Freedland SJ, Gerber L, Reid J, Welbourn W, Tikishvili E, Park J, Younus A, Gutin A, Sangale Z, Lanchbury JS, Salama JK, Stone S. Prognostic utility of cell cycle progression score in men with prostate cancer after primary external beamradiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86 (5): 848-853.
- [8] Shrestha S, Wilmeth LJ, Eyer J, Shuster CB. PRC1 controls spindle polarization and recruitment of cytokinetic factors during monopolar cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 2012, 23 (7): 1196-1207.
- [9] Li C, Lin M, Liu J. Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis. *Oncogene*, 2004, 23 (58): 9336-9347.
- [10] Kanehira M, Katagiri T, Shimo A, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y. Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer. *Cancer Res*, 2007, 67 (7): 3276-3285.
- [11] Espinosa AM, Alfaro A, Roman-Basaure E, Guardado-Estrada M, Palma Í, Serralde C, Medina I, Juárez E, Bermúdez M, Márquez E, Borges-Ibáñez M, Muñoz-Cortez S, Alcántara-Vázquez A, Alonso P, Curiel-Valdez J, Kofman S, Villegas N, Berumen J. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. *PLoS One*, 2013; 8 (2): e55975.
- [12] Tang H, Xiao G, Behrens C, Schiller J, Allen J, Chow CW, Suraokar M, Corvalan A, Mao J, White MA, Wistuba II, Minna JD, Xie Y. A 12-gene set predicts survival benefits from adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (6): 1577-1586.
- [13] Mustacchi G, Sormani MP, Bruzzi P, Gennari A, Zanconati F, Bonifacio D, Monzoni A, Morandi L. Identification and validation of a new set of five genes for prediction of risk in early breast cancer. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (5): 9686-9702.

(收稿日期: 2016-02-25)

(本文编辑: 林燕薇)