

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00734

· 论 著 ·

转谷氨酰胺酶 4 在前列腺癌组织中的表达及意义

李磊^{1△}, 曹智^{1△}, 许传亮¹, 韦荣超¹, 张振声¹, 余永伟², 王洋², 孙颖浩^{1*}

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨转谷氨酰胺酶 4(transglutaminase 4, TGM4)在前列腺癌诊断及预后评价中的可能价值。**方法** 对 159 例前列腺癌患者的存档石蜡标本行 TGM4 免疫组织化学染色;根据染色情况将 TGM4 表达水平分为 4 级:不表达,弱表达,中表达和高表达。通过查阅病历、调用我院前列腺癌随访数据库和电话随访等方式获得患者临床病理资料及随访信息;进而对 TGM4 表达水平与前列腺癌临床病理特征及预后信息的关系进行统计学分析。**结果** 与癌旁组织相比,TGM4 在前列腺癌组织中高表达($P<0.001$),且表达水平在不同 Gleason 分级($P<0.001$)和前列腺特异抗原(PSA)水平($P=0.005$)间差异有统计学意义。单因素 Cox 回归分析提示 TGM4 高表达是前列腺癌生化复发的高危因素($P=0.020$),但多因素 Cox 回归分析并不支持 TGM4 高表达是前列腺癌生化复发的高危因素($P=0.139$)。**结论** TGM4 在前列腺癌中高表达,且在 Gleason 分级和高 PSA 水平的前列腺癌中表达更高,值得进一步研究。

[关键词] 前列腺肿瘤;免疫组织化学染色;转谷氨酰胺酶 4;生化复发

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)07-0734-05

Expression of transglutaminase 4 in prostate cancer and its clinical significance

LI Lei^{1△}, CAO Zhi^{1△}, XU Chuan-liang¹, WEI Rong-chao¹, ZHANG Zhen-sheng¹, YU Yong-wei², WANG Yang², SUN Ying-hao^{1*}

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the value of transglutaminase 4 in diagnosis and prognosis prediction of prostate cancer. **Methods** Transglutaminase 4 immunostaining was performed with paraffin sections from 159 prostate cancer patients receiving radical prostatectomy, and the staining results were divided into 4 levels: negative staining, weak staining, moderate staining, and strong staining. The clinical and pathological information of the patients were obtained by reviewing the medical records. The follow-up data were collected by reviewing medical records, prostate cancer database of our department, and telephoning the patients or their family members. Expression of transglutaminase 4 and clinical, prognosis data of patients were subjected to statistical analysis. **Results** The expression of transglutaminase 4 in the prostatic cancer tissue was significantly higher than that in the adjacent normal tissue ($P<0.001$); and the expressions were significantly different in patients with different Gleason grades ($P<0.001$) and different prostate specific antigen levels ($P=0.005$). Univariate Cox regression analysis indicated that high transglutaminase 4 expression was a risk factor of biochemical recurrence of prostatic cancer ($P=0.020$), but multivariate Cox regression analysis did not support this finding ($P=0.139$). **Conclusion** Transglutaminase 4 expression is increased in prostate cancer tissues, and the expression is stronger in malignant tissues with higher Gleason grade and prostate specific antigen level.

[Key words] prostatic neoplasms; immunohistochemistry; transglutaminase 4; biochemical recurrence

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(7):734-738]

前列腺癌是发达国家发病率最高的男性恶性肿瘤,占全球癌症死亡率第 6 位^[1]。来自上海市疾病控制中心的资料显示,前列腺癌的发病率自 2002 年起已跃居男性泌尿生殖系统恶性肿瘤的首

[收稿日期] 2013-10-27 **[接受日期]** 2014-01-09

[作者简介] 李磊, 硕士生, 住院医师. E-mail: lileidoctor@163.com; 曹智, 硕士, 住院医师. E-mail: yadianna560@126.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161718, E-mail: sunyh@medmail.com.cn

位^[2]。流行病学数据还显示,上海市前列腺癌发病率已从1993年的1.6/10万男性人口增加到2005年的7.7/10万男性人口,年增幅13%^[3]。依此推算,预计至2020年,上海市前列腺癌发病率将超过40/10万男性人口,接近欧美国家的水平,成为危害男性健康的主要肿瘤“杀手”。

转谷氨酰胺酶4(transglutaminase 4, TGM4)是转谷氨酰胺酶家族中的一员,主要在前列腺内表达^[4-5],它在转录后蛋白修饰过程中催化 ϵ -(γ -谷氨酰基)赖氨酸异肽键的形成。TGM4在前列腺癌中的表达情况目前仍存在较大争议。An等^[6]报道TGM4在前列腺癌中低表达,并与Gleason评分负相关。另一项利用前列腺癌电切组织行实时定量PCR的研究表明,同正常组织相比,TGM4在前列腺癌中低表达,尤其是在低分化肿瘤中^[7]。与之相对的是,Jiang等^[5]的研究表明,同正常组织相比,TGM4在前列腺癌中高表达,并与Gleason评分正相关。

本研究通过利用存档石蜡标本行TGM4免疫组织化学染色来阐述TGM4表达水平与前列腺癌临床病理特征之间的关系,并揭示TGM4在前列腺癌诊断及预后判断中的潜在价值。

1 材料和方法

1.1 一般资料 收集第二军医大学长海医院病理科2001年10月至2008年12月期间存档的前列腺癌及癌旁组织配对石蜡标本159组;由两名病理科医师(1名教授,1名主治医师)复查组织切片,行苏木精-伊红(H-E)染色,选取能充分代表患者病理诊断情况的癌组织和癌旁组织常规石蜡切片。患者年龄49~79岁,平均(66.81±6.55)岁,其中前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)<4 ng/mL 33例,PSA 4~10 ng/mL 38例,PSA 10~20 ng/mL 35例,PSA>20 ng/mL 32例,数据无法获得21例;前列腺癌病理分期:PIN 1例,T_{2a-2b} 9例,T_{2c} 33例,T_{3a} 43例,T_{3b} 39例,数据无法获得34例;Gleason评分≤3+3者38例,Gleason评分3+4者44例,Gleason评分4+3者30例,Gleason评分≥4+4者20例,数据无法获得27例;淋巴结阳性10例,阴性127例,数据无法获得22例;手术切缘阳性64例,阴性60例,数据无法获得35例。数据无法获得主要是因

为病理报告描述不完整。本研究获得第二军医大学长海医院医学伦理委员会批准。

1.2 主要试剂 一抗:鼠抗人TGM4单克隆IgG抗体(英国Abcam公司),二抗:即用型辣根过氧化物酶标记抗鼠IgG多聚体(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB显色剂等其他免疫组化配套试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 染色方法和结果判定 采用免疫组化PV-6001法,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行;PBS代替一抗为空白对照,用非免疫血清代替一抗作阴性对照。根据染色强度将免疫组化染色分为4级,分别为0~3分;根据染色范围将免疫组化染色分为5级,分别为0~4分;总分(IE)=强度评分(I)×范围评分(E),为0~12分。根据IE评分,将染色情况分为不表达(0~2分)、弱表达(3~5分)、中表达(6~8分)和强表达(9~12分)4级。在生存分析中所提到的低表达包括不表达和弱表达,为0~5分;高表达包括中、高表达,为6~12分。

1.4 临床资料收集 (1)查阅病历收集患者年龄、家庭地址、电话号码、身份证号、术前PSA、手术日期、术前是否行内分泌治疗及术后病理情况(Gleason评分,薄膜是否累及,切缘是否阳性,精囊是否累及,是否有神经侵犯,是否有淋巴结转移)等临床病理信息;(2)利用查阅病历、长海医院前列腺癌随访数据库及电话随访等手段,了解患者术后PSA变化情况、术后接受辅助治疗情况、是否有临床转移、是否死亡等预后信息。

1.5 统计学处理 采用SPSS 18.0软件包对数据进行统计学分析。TGM4表达评分在癌组织及癌旁组织、不同手术切缘情况和不同淋巴结累及情况之间的差异采用Wilcoxon signed-rank检验分析;TGM4表达评分在不同Gleason分级、病理分级、PSA水平分级间的差异采用Kruskal-Wallis H检验分析;TGM4表达评分与前列腺癌患者术后生化复发之间的关系采用Cox回归分析;检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 组织芯片的免疫组化染色 本组标本免疫组织化学染色特异性良好;免疫组织化学阳性染色呈棕褐色,背景着色淡或不着色,反差明显,较易确认;

阴性对照组均为阴性反应。免疫组织化学阳性染色定位于胞质,评分等级情况见图 1。

2.2 前列腺癌及癌旁组织中 TGM4 的表达 结果(表 1)表明:本组 159 例患者中,能同时取得癌和癌旁组织的共有 125 例;TGM4 在前列腺内普遍表达,仅 9 例患者癌旁组织中 TGM4 不表达,而所有的癌组织中均有 TGM4 表达;TGM4 在前列腺癌组织内

表达水平明显高于癌旁组织($P < 0.001$)。

2.3 TGM4 表达与前列腺癌临床病理资料之间的关系 结果(表 1)表明:TGM4 表达水平在不同 Gleason 评分($P < 0.001$)和 PSA 水平($P = 0.005$)间差异有统计学意义,在不同病理分期($P = 0.299$)、不同淋巴结分期($P = 0.297$)和切缘阳性与否($P = 0.760$)间差异无统计学意义。

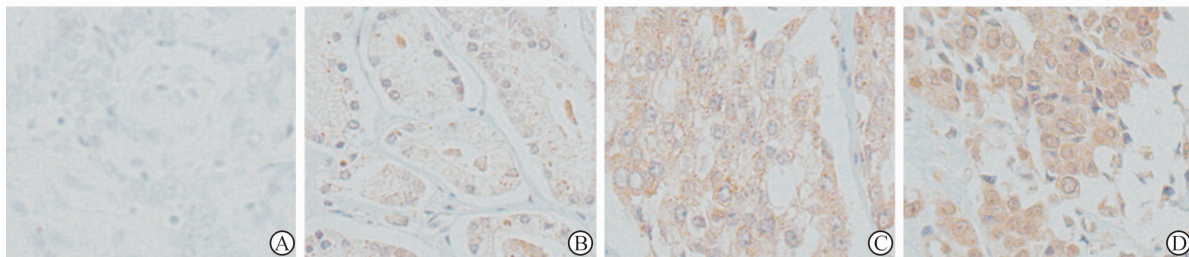


图 1 前列腺组织 TGM4 免疫组化染色结果分级

Fig 1 Four levels of TGM4 immunohistochemical staining findings in prostate tissues

A: Negative staining; B: Weak staining; C: Moderate staining; D: Strong staining

表 1 TGM4 表达水平与前列腺癌临床病理特征的相关性分析

Tab 1 TGM4 expression and clinical features of prostate cancer patients

Variable	N	TGM4 expression level <i>n</i>				P value
		Negative	Weak	Moderate	Strong	
Tissue type	125					<0.001
Para-cancerous tissue	125	9	58	55	3	
Prostate cancer	125	0	35	81	9	
pT category	115					0.299
pT _{3b}	38	0	7	26	5	
pT _{3a}	39	0	11	26	2	
pT _{2c}	30	0	10	20	0	
pT _{2a-2b}	7	0	2	3	2	
PIN	1	0	0	1	0	
Gleason score	143					<0.001
≥4+4	25	0	2	16	7	
4+3	34	0	9	23	2	
3+4	27	0	2	23	2	
≤3+3	57	0	24	31	2	
Pre-operation PSA level $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	127					0.005
>20	29	0	1	24	4	
10-20	35	0	8	24	3	
4-10	33	0	14	18	1	
<4	30	0	8	19	3	
pN category	125					0.297
pN+	9	0	0	9	0	
pN ₀	116	0	30	76	10	
Surgical margin	114					0.760
Positive	61	0	14	43	4	
Negative	53	0	15	33	5	

pT category: Pathological tumor category; PSA: Prostate specific antigen; pN category: Pathological lymph node category

2.4 TGM4 表达水平与前列腺癌生化复发的关系 159 例患者中 117 例获得随访(73.6%),平均随访时间(55.88±31.06)个月;其中 52 例发生生化复发(44.4%)。Cox 回归分析结果(表 2)表明:单

因素分析提示 TGM4 高表达的患者更易发生生化复发($P=0.020$),但多因素分析并不支持这一结论($P=0.139$)。

表 2 TGM4 表达水平与生化复发的 Cox 回归分析

Tab 2 Cox regression analysis of biochemical recurrence-free survival according to TGM4 staining score

	Biochemical recurrence-free time	
	RR(95%CI)	P value
Univariate		
High staining score(score 0-5)	1	
Low staining score(score 6-12)	0.331(0.131-0.838)	0.020
Multivariate		
Staining score(low/high)	0.477(0.179-1.270)	0.139
Gleason grade($\leq 3+4/\geq 4+3$)	0.367(0.179-0.752)	0.006
Prostate specific antigen level($\leq 10/>10$ ng/mL)	0.719(0.368-1.404)	0.334
Pathological tumor category(T_2+PIN/T_3)	0.642(0.265-1.553)	0.325

3 讨论

PSA 的出现对前列腺癌的诊疗具有划时代的意义,它使众多的前列腺癌患者被筛查出来得以接受适当的治疗。然而,仍有约 1/4 的患者在接受前列腺癌根治术后发生生化复发^[1],严重降低了患者的生存质量和无疾病生存期。如果能早期识别高复发患者,进而采取适当的辅助治疗,则可以有效延长无瘤生存期。寻找新的诊断预测标记物成为前列腺癌研究的一个重要方向。在癌和癌旁组织中差异表达,并在癌变过程中发挥关键作用的分子可以作为潜在的预测因子。

尽管早在 20 世纪 90 年代,Grant 等^[8]就从前列腺的 cDNA 文库中发现了 TGM4,但是目前对 TGM4 的研究报道仍然较少。虽然 TGM4 是一种蛋白质,但目前的研究主要集中在 RNA 水平。An 等^[6]的研究表明,TGM4 在前列腺癌中表达降低,尤其在高 Gleason 评分的前列腺癌和转移癌中。Jiang 等^[5]采用定量方法在 RNA 水平分析 TGM4 的表达情况,发现 TGM4 在前列腺癌中的表达明显高于正常组织,且在高 Gleason 评分的癌组织中明显高于低 Gleason 评分的癌组织。另一项在 RNA 水平采用定量 RT-PCR 方法的研究表明,TGM4 在癌组织的表达水平低于正常组织^[7]。

此外,TGM4 在前列腺分泌物中的表达水平目前也未达成一致。在一项研究中,质谱分析提示

TGM4 在局限于包膜的前列腺癌中表达水平低于侵犯至包膜外的前列腺癌,而蛋白质印迹检测得到了相反的结论^[9]。在另一项研究中,蛋白质印迹检测提示 TGM4 在癌组织中表达水平低于正常组织^[10]。值得一提的是,上述两项研究采用的抗体是羊抗人多克隆 IgG 抗体,而多克隆抗体的特异性较差,常存在交叉反应,且这两项研究的样本量较小。

本研究结果显示,TGM4 在前列腺癌中的表达水平明显高于正常组织,且在高 Gleason 分级和高 PSA 水平的前列腺癌中表达较高。这提示 TGM4 可能在前列腺癌的进展中扮演着重要角色,而既往研究表明 TGM4 与前列腺癌细胞的侵袭运动能力密切相关。CA-HPV-10 是一种表达 TGM4 的前列腺癌细胞系,当敲除 TGM4 基因后,其体外侵袭性明显降低^[11]。相比之下,Jiang 等^[12]报道 TGM4 与 RON 在前列腺癌细胞内共定位,而 RON 作为一种酪氨酸蛋白激酶是 HGF-L/MSP 的受体;当 TGM4 在 PC-3 细胞内过表达时,PC-3 的细胞运动能力明显增加,这与 RON 对 HGF-L/MSP 的反应性增强有关。在 Jiang 等^[13]的另一项研究中发现,当 TGM4 在 PC-3 细胞内过表达时,PC-3 对血管内皮细胞的黏附能力明显增加;而当 TGM4 在 CA-HPV-10 中被敲除后,CA-HPV-10 对血管内皮细胞的黏附能力明显降低。还有研究表明,TGM4 参与上皮细胞间质化,这在肿瘤进展中扮演着关键的作用^[14]。

本研究进一步分析了 TGM4 表达水平与前列腺癌生化复发之间的关系。单因素 Cox 回归分析提示, TGM4 过表达与前列腺癌根治术后早期生化复发相关, 而这一结论并未被多因素 Cox 回归分析所确认。尽管这个结果并不是非常肯定, 但仍提示 TGM4 可能是前列腺癌根治术后早期生化复发的潜在预测因子。如果能进一步得到确认, TGM4 可以在临床中评估前列腺癌根治术后患者生化复发的危险性, 并指导是否应该接受适宜的辅助治疗; 同时能够使部分患者避免接受不适宜的辅助治疗, 从而避免相应的并发症发生。

综上所述, TGM4 在前列腺癌中的表达水平明显高于癌旁组织, 且在高 Gleason 分级和高 PSA 水平的前列腺癌中表达较高, 值得进一步研究以应用于临床。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Potters L, Klein E A, Kattan M W, Reddy C A, Ciezki J P, Reuther A M, et al. Monotherapy for stage T1-T2 prostate cancer: radical prostatectomy, external beam radiotherapy, or permanent seed implantation [J]. *Radiother Oncol*, 2004, 71:29-33.

[2] 上海市疾病预防控制中心. 2002年上海市市区恶性肿瘤发病率[J]. *肿瘤*, 2006, 26:496.

[3] 叶定伟, 李长岭. 前列腺癌发病趋势的回顾和展望[J]. *中国癌症杂志*, 2007, 17:177-180.

[4] Dubbink H J, Verkaik N S, Faber P W, Trapman J, Schröder F H, Romijn J C. Tissue specific and androgen-regulated expression of human prostate-specific transglutaminase[J]. *Biochem J*, 1996, 315(Pt 3): 901-908.

[5] Jiang W G, Ablin R J, Kynaston H G, Mason M D. Expression of the prostate typetransglutaminase (TGase-4) in clinical prostate cancer [C/OL]//Proceedings of the 98th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 14-18 April 2007; Los Angeles, CA, USA. [2014-06-05]. http://www.aacrmeetingabstracts.org/cgi/content/meeting_abstract/2007/1_Annual_Meeting/2659?maxtoshow=&hits=10&RE-SULTFORMAT=&fulltext=transglutaminase&andorexactfulltext=and&searchid=1&

FIRSTINDEX=10&sortspec=relevance&resource-type=HWCIT

- [6] An G, Meka C S, Bright S P, Veltri R W. Human prostate-specific transglutaminase gene: promoter cloning, tissue-specific expression, and down-regulation in metastatic prostate cancer [J]. *Urology*, 1999, 54: 1105-1111.
- [7] Shaikhbrahim Z, Lindstrot A, Buettner R, Wernert N. Analysis of laser-microdissected prostate cancer tissues reveals potential tumor markers [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28:605-611.
- [8] Grant F J, Taylor D A, Sheppard P O, Mathewes S L, Lint W, Vanaja E, et al. Molecular cloning and characterization of a novel transglutaminase cDNA from a human prostate cDNA library [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 203:1117-1123.
- [9] Kim Y, Ignatchenko V, Yao C Q, Kalatskaya I, Nyalwidhe J O, Lance R S, et al. Identification of differentially expressed proteins in direct expressed prostatic secretions of men with organ-confined versus extracapsular prostate cancer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: 1870-1884.
- [10] Principe S, Kim Y, Fontana S, Ignatchenko V, Nyalwidhe J O, Lance R S, et al. Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses of expressed prostatic secretions in urine [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11:2386-2396.
- [11] Davies G, Ablin R J, Mason M D, Jiang W G. Expression of the prostate transglutaminase (TGase-4) in prostate cancer cells and its impact on the invasiveness of prostate cancer [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2007, 6:257-264.
- [12] Jiang W G, Ye L, Ablin R J, Kynaston H G, Mason M D. The prostate transglutaminase, TGase-4, coordinates with the HGFL/MSP-ROn system in stimulating the migration of prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2010, 37:413-418.
- [13] Jiang W G, Ablin R J, Kynaston H G, Mason M D. The prostate transglutaminase (TGase-4, TGaseP) regulates the interaction of prostate cancer and vascular endothelial cells, a potential role for the ROCK pathway [J]. *Microvasc Res*, 2009, 77:150-157.
- [14] Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance [J]. *Cancer Sci*, 2009, 101:293-299.