

# PCA3 基因在前列腺组织发育中的表达

郑彦博<sup>△</sup> 胡王强 郭飞 陶志华\* 沈默 陈占国 周武 戴美洁

(温州医学院附属第一医院实验诊断中心, 温州 325000)

**摘要** 探索 PCA3 基因在前列腺组织发育过程中的表达情况。采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(FQ-RT-PCR)方法检测 18 例胎儿、27 例良性前列腺增生(BPH)患者和 15 例前列腺癌(PCa)患者前列腺组织中的 PCA3 mRNA、AMACR mRNA 和 PSA mRNA 的表达情况。结果在胎儿前列腺组 18 例标本中均未检测到 PCA3 mRNA 的表达, 不同胎龄组(13~17 周、18~21 周、22~25 周)中 PSA mRNA 含量无统计学差异( $P>0.05$ ), 13~17 周组与 18~21 周组、13~17 周组与 22~25 周组中 AMACR mRNA 含量都有显著性差异( $P<0.05$ ), 18~21 周组与 22~25 周组 AMACR mRNA 含量无统计学差异( $P>0.05$ )。胎儿前列腺组、BPH 组和 PCa 组中的 AMACR mRNA 和 PSA mRNA 含量逐步增加, 且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。PCA3 基因在胚胎组织中不表达, 在前列腺肿瘤时过表达, 提示 PCA3 基因可能是作为前列腺肿瘤发生时的重要的调节基因。而 AMACR 和 PSA 基因在胚胎组织中表达, 只是在前列腺肿瘤发生时过表达。

**关键词** PCA3; 胎儿; 前列腺; AMACR; PSA

目前, 前列腺癌抗原 3 基因(PCA3)被认为是最佳的前列腺癌特异性基因, 其在前列腺癌组织中高表达, 在良性前列腺组织中低表达或不表达, 且在前列腺以外的组织和细胞系中均不表达<sup>[1-3]</sup>, 提示 PCA3 基因在前列腺癌发生、发展过程中起着重要的作用。因此, 通过研究其在不同时期的表达情况, 逐步探究它在前列腺癌进程中发挥的作用, 可能为破解前列腺癌发病机制提供依据。据此, 我们选择胎儿前列腺标本作为主要研究对象, 采用本课题组已经建立的 FQ-RT-PCR 检测 PCA3 mRNA、 $\alpha$ -甲酰辅酶 A 旋酶基因(AMACR) mRNA 和前列腺特异性抗原基因(PSA) mRNA 的方法, 研究 PCA3、AMACR 和 PSA 基因在人类前列腺发育的特殊阶段——胎儿前列腺组织中的表达情况, 为进一步了解这些基因的表达调控机制和生物学功能打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象 18 例胎儿前列腺组织取自本院妇产科与温州市计划生育指导站, 其中 13~17 周 5 例, 18~21 周 10 例, 22~25 周 3 例。成人前列腺组织来源于本院超声影像诊断科和泌尿外科, 其中 BPH 组 27 例, 年龄 51~83 岁, 平均 70 岁; PCa 组 15 例, 年龄 53~80 岁, 平均 70 岁。标本均经过病理组织学证实。本研究经医院医学伦理委员会批准, 所有受试

对象或家属均知情同意。

1.1.2 主要试剂和仪器 总 RNA 抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司, cDNA 第一链合成试剂盒购自 Fermentas 公司, Taqman Universal PCR Master Mix 和 ABI7000PCR 仪购自 ABI 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 标本总 RNA 提取和 cDNA 合成 (1)总 RNA 提取 按照 TaKaRa 总 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 用 DU<sup>®</sup> 800 型紫外分光光度仪检测其浓度和纯度。

(2) cDNA 合成 具体操作按试剂盒说明书进行, 总反应体积 20  $\mu$ l, 取 2  $\mu$ l 用于荧光定量检测。

1.2.2 FQ-RT-PCR 检测 (1) PCA3 mRNA 检测 根据 GenBank 收录的 PCA3 mRNA (AF103907)的全序列, 在 PCA3 基因外显子 1 和 3 之间设计一对引物和探针: 上游引物: 5'-TGGTGGGAAGGACCTGATGA-3', 下游引物: 5'-TGTGTGGCCTCAGATGGTAAAGT-3'; 探针: 5'(FAM)-ACAGAGGTGAGAAATAA-(MGB)-3'。产物长度 73 bp。具体参考文献<sup>[4]</sup>检测方法。

(2) AMACR mRNA 检测 根据 GenBank 收录的

收稿日期: 2009-08-07 接受日期: 2009-11-10

国家自然科学基金(No.30872421)和浙江省自然科学基金(No. Y207516)资助项目

<sup>△</sup> 现工作单位: 浙江省人民医院

\* 通讯作者。Tel: 0577-88069595, E-mail: wwwtzh@wz.zj.cn

*AMACR* mRNA (NM014324)的全序列,在*AMACR*基因外显子2和3之间设计引物和探针:上游引物:5'-CGGTTAGCTGGCCACGA-3',下游引物:5'-GCATACGGATTCTCACCCTTCT-3';探针:5'(FAM)-CTTTGTCAGGTGTTCTC-(MGB)3'。产物长度83 bp。具体参考文献<sup>[5]</sup>检测方法。

(3) *PSA* mRNA 检测 根据GenBank收录的*PSA* mRNA (M26663)的全序列,在*PSA*基因外显子2和3之间设计引物和探针:上游引物:5'-GCCCACTGC-ATCAGGAACAA-3',下游引物:5'-GCTGTGGCTGAC-CTGAAATACC-3';探针:5'(FAM)-AGGCTGTGCCGACCCAGCAAGATC-(TAMRA)3'。产物长度96 bp。具体参考文献<sup>[6]</sup>检测方法。

(4) *GAPDH* mRNA 检测 上游引物:5'-AACAGCCTCAAGATCATCAGCA-3',下游引物:5'-CATGAGTCCTCCACGATACCA-3',采用SYBR Green方法检测。

以上引物和探针用Primer 5.0软件设计,由上海基康生物有限公司合成和标记。

1.2.3 检测结果的处理 *PCA3*、*AMACR*、*PSA*基因表达量分别以*PCA3* mRNA/*GAPDH* mRNA、*AMACR* mRNA/*GAPDH* mRNA和*PSA* mRNA/*GAPDH* mRNA表示。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量。同时为了便于表示,所得数据均乘以1 000。

1.2.4 统计学分析 采用SPSS 12.0统计学软件。数据呈偏态分布,实验结果以中位数(M)、 $P_{25}$ - $P_{75}$ 表示,多样本比较采用Kruskal-Wallis H检验,两独立样

本比较采用Mann-Whitney U检验。

## 2 结果

### 2.1 不同胎龄组 *PCA3* mRNA、*AMACR* mRNA 和 *PSA* mRNA 含量的变化

18例胎儿前列腺组织标本均未检测到*PCA3* mRNA的表达。13~17周组、18~21周组、22~25周组的*AMACR* mRNA含量有显著性差异( $P=0.01$ ),具有统计学意义。不同实验组的两两比较中,13~17周组与其他两组的*AMACR* mRNA含量有显著性差异( $P<0.05$ ),但18~21周组和22~25周组的*AMACR* mRNA含量无统计学差异( $P>0.05$ )。13~17周组、18~21周组、22~25周组的*PSA* mRNA含量无显著性差异( $P>0.05$ )。结果见表1。

### 2.2 不同前列腺组 *PCA3* mRNA、*AMACR* mRNA 和 *PSA* mRNA 含量的变化

18例胎儿前列腺组织标本均未检测到*PCA3* mRNA的表达;在BPH组27例和PCa组15例标本中均检测到*PCA3* mRNA的表达,且*PCA3* mRNA含量有显著性差异( $P=0.000$ ),具有统计学意义。在胎儿前列腺组、BPH组和PCa组中均检测到*AMACR* mRNA、*PSA* mRNA的表达,且*AMACR* mRNA、*PSA* mRNA含量均有显著性差异( $P=0.000$ )。不同实验组的两两比较中,任何两组之间*AMACR* mRNA、*PSA* mRNA的含量都有显著性差异( $P<0.05$ ),并且胎儿前列腺组、BPH组、PCa组*AMACR* mRNA、*PSA* mRNA的含量依次增高。结果见表2和图1。

Table 1 The expression of *AMACR* mRNA, *PSA* mRNA in different fetal age group (median,  $P_{25}$ - $P_{75}$ )

Fetal age	<i>n</i>	The expression of <i>AMACR</i> mRNA	The expression of <i>PSA</i> mRNA
13-17 week	5	1.13 (0.40-9.88) <sup>▲*</sup>	$0.79 \times 10^{-2}$ (0.05-1.25)
18-21 week	10	0.05 (0.02-0.20) <sup>▼</sup>	$0.14 \times 10^{-2}$ (0.00-0.82)
22-25 week	3	0.06 (0.01-0.31)	$0.88 \times 10^{-2}$ (0.00-0.03)

<sup>▲</sup> $P=0.02$ , compared with 18-21 week group; <sup>\*</sup> $P=0.04$ , compared with 22-25 week group; <sup>▼</sup> $P>0.05$ , compared with 22-25 week group;  $P>0.05$ , compared with three fetal age group of *PSA* mRNA.

Table 2 The expression of *PCA3* mRNA, *AMACR* mRNA, *PSA* mRNA in fetal prostate group, BPH group and PCa group (median,  $P_{25}$ - $P_{75}$ )

Group	<i>n</i>	The expression of <i>PCA3</i> mRNA	The expression of <i>AMACR</i> mRNA	The expression of <i>PSA</i> mRNA
Fetal prostate	18	Under detect	0.05 (0.00-0.20) <sup>▲*</sup>	$0.05 \times 10^{-1}$ (0.00-0.07) <sup>▶*</sup>
BPH	27	0.06 (0.03-0.36) <sup>■</sup>	0.91 (0.47-1.72) <sup>▼</sup>	103.66 (23.52-251.74) <sup>▲</sup>
PCa	15	20.47 (4.52-130.31)	10.17 (3.15-40.67)	554.78 (174.34-946.06)

<sup>■</sup> $P=0.000$ , compared with PCa group; <sup>▲</sup> $P=0.000$ , compared with BPH group; <sup>\*</sup> $P=0.000$ , compared with PCa group; <sup>▼</sup> $P=0.000$ , compared with PCa group; <sup>▶</sup> $P=0.000$ , compared with BPH group; <sup>\*</sup> $P=0.000$ , compared with PCa group; <sup>▲</sup> $P=0.000$ , compared with PCa group.

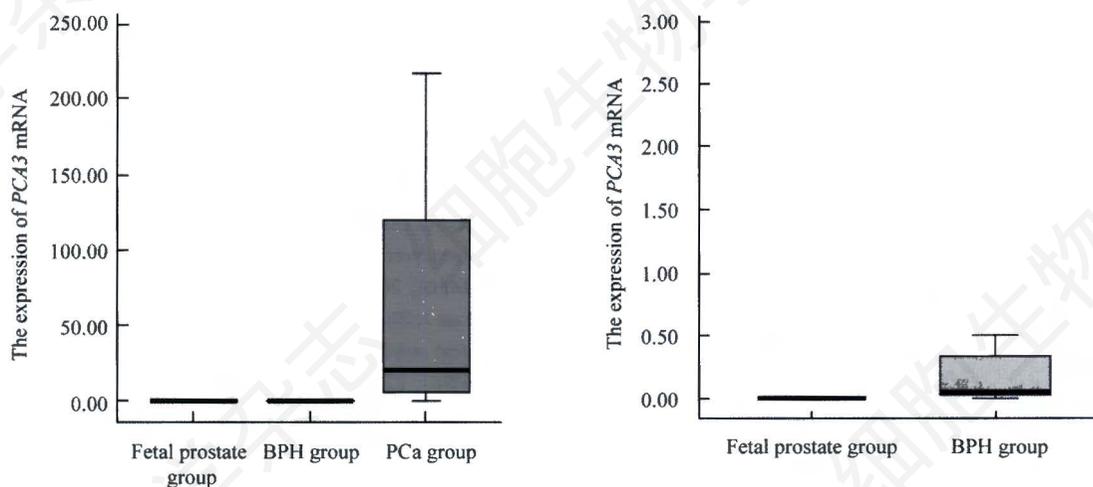


Fig.1 The expression of *PCA3* mRNA in fetal prostate group, BPH group and PCa group

### 3 讨论

前列腺癌是一种复杂的疾病,涉及遗传、内分泌和其他渐变性因素,其发病机制仍不十分清楚<sup>[7-10]</sup>。随着近些年对前列腺癌分子水平的研究,人们发现了几种前列腺癌标志物,如 *PCA3*<sup>[1-3]</sup>、*AMACR*<sup>[11-14]</sup>、*PSA*<sup>[15]</sup>等。它们具有一个共同的特点,即在前列腺肿瘤发生时表达显著增多。

肿瘤胚胎性抗原标记物是原本只有在胎盘期才具有的蛋白类物质,随胎儿的出生而逐渐停止合成和分泌,但因某种因素的影响,特别是肿瘤状态时,会使得机体一些“关闭”的基因激活,而重新生成和分泌这些胚胎、胎儿期的蛋白质。在本实验中,我们选择了胎儿前列腺标本作为主要研究对象,检测 *PCA3*、*AMACR*、*PSA* 基因在人类前列腺发育的特殊阶段表达情况,来展示这些肿瘤相关基因表达调控模式是否类似于肿瘤胚胎性抗原标记物。

检测结果中,*AMACR*、*PSA* 基因在胎儿前列腺组织、BPH组织和PCa组织中均表达,且*AMACR*基因在13~17周组中的表达量要明显高于18~21周组和22~25周组,提示*AMACR*基因在人类胎儿前列腺发育过程中的一种表达调节模式,即*AMACR*基因可能主要在胎儿前列腺发育阶段的早期表达并发挥作用,而到了胎儿前列腺发育中晚期,它的表达减弱,在前列腺发生肿瘤时,*AMACR*基因高度表达。表达模式类似于肿瘤胚胎性抗原标记物。*PSA*基因在不同胎龄前列腺组织中的*PSA* mRNA表达量没有明显不同,提示该基因在胎儿前列腺生长、发育的大部分时期可能都处于表达状态,在胎儿前列腺发育的大部

分进程中都有不可或缺的作用。*PSA*基因在PCa组织中并非十分特异,可能与这有关。

*PCA3*基因是Bussemakers等<sup>[1]</sup>通过差异显示PCR分析法发现的PCa特异性标记物,在PCa组织中高表达,在正常前列腺和BPH组织中极低表达或无表达,在前列腺以外的组织和细胞系中均不表达。本实验中,18例胎儿前列腺组织均未检测到*PCA3* mRNA。与*PSA*、*AMACR*基因相比较,*PCA3*基因在胎儿前列腺阶段不表达,提示*PCA3*基因在前列腺肿瘤发生过程中扮演更重要的角色;在诊断价值上可能优于*AMACR*和*PSA*基因。

另外,在检测*AMACR* mRNA的实验中,在胎儿前列腺组织、BPH组织和PCa组织中表达量依次升高,PCa组织中*AMACR* mRNA表达量中位数较胎儿前列腺组织和BPH组织分别升高了202倍和10倍,后者升高的倍数与Luo等<sup>[13]</sup>结果一致。在检测*PSA* mRNA的实验中,胎儿前列腺组织、良性BPH组织和PCa组织中表达量也依次升高。在检测到*PCA3* mRNA试验中,PCa组织较BPH组织*PCA3* mRNA表达量的中位数升高了340倍。PCa、BPH表达量差异结果与Hessels等<sup>[16]</sup>和Tinzi等<sup>[17]</sup>的报道结果一致。

*PCA3*、*AMACR*和*PSA*基因在人类前列腺生长、发育进程中的不同表达情况提示三种基因不同的调控模式。在前列腺肿瘤的功能研究领域中,或许,这个实验能让我们在人类胎儿前列腺发育这一端打开一扇门,能为以后对这些基因表达调控机制和生物学功能的研究提供一点启示。

## 参考文献(References)

- [1] Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, *et al.* *DD3*: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer, *Cancer Res*, 1999, 59(23): 5975-5979
- [2] Marks LS, Bostwick DG. Prostate cancer specificity of *PCA3* gene testing: examples from clinical practice, *Rev Urol*, 2008, 10(3): 175-181
- [3] Hessels D, Schalken JA. The use of *PCA3* in the diagnosis of prostate cancer, *Nat Rev Urol*, 2009, 6(5): 255-261
- [4] 毛晓露, 陶志华, 陈晓东, 等. 荧光实时定量 RT-PCR 检测 *DD3* mRNA 方法的建立, *临床检验杂志*, 2006, 24(5): 335-337
- [5] 徐伟, 陶志华, 王彩虹, 等. 实时荧光 RT-PCR 定量检测前列腺癌组织中 *AMACR* 基因表达, *中国男科学杂志*, 2008, 22(4): 14-18
- [6] 毛晓露, 陶志华, 徐伟, 等. *DD3* 和 *PSA* 基因在前列腺癌组织中的定量表达分析, *中华泌尿外科杂志*, 2006, 27(9): 624-627
- [7] 夏同礼. 前列腺癌研究的现状, *中华医学杂志*, 2003, 83(15): 1289-1291
- [8] Culig Z, Steiner H, Barstsch G, *et al.* Mechanisms of endocrine therapy-responsive and unresponsive prostate tumours, *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12(2): 229-244
- [9] Steiner MS, Gingrich JR. Gene therapy for prostate cancer: where are we now, *J Urol*, 2000, 164(4): 1121-1136
- [10] Koeneman KS, Kao C, Ko SC, *et al.* Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis, *World J Urol*, 2000, 18(2): 102-110
- [11] Xu J, Stolk JA, Zhang X, *et al.* Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray, *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1677-1682
- [12] Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, *et al.*  $\alpha$ -Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer, *JAMA*, 2002, 287(13): 1662-1670
- [13] Luo J, Zha S, Gage WR, *et al.*  $\alpha$ -Methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer, *Cancer Res*, 2002, 62(8): 2220-2226
- [14] Jiang Z, Woda BA, Rock KL, *et al.* *P504S*: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma, *Am J Surg Pathol*, 2001, 25(11): 1397-1404
- [15] 孙月庭, 刘斌剑. 前列腺特异性抗原在诊断前列腺疾病中的研究进展, *国际检验医学杂志*, 2006, 27(6): 548-550
- [16] Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, *et al.* *DD3<sup>PCA3</sup>*-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer, *Eur Urol*, 2003, 44(1): 8-16
- [17] Tinzl M, Marberger M, Horvath S, *et al.* *DD3<sup>PCA3</sup>* RNA analysis in urine — a new perspective for detecting prostate cancer, *Eur Urol*, 2004, 46(2): 182-187

Expression of *PCA3* Gene in Prostate Tissue Development

Yan-Bo Zheng<sup>A</sup>, Wang-Qiang Hu, Fei Guo, Zhi-Hua Tao\*, Mo Shen, Zhan-Guo Chen, Wu Zhou, Mei-Jie Dai  
(Center for Clinical Laboratory Diagnosis, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**Abstract** To study the expression of *PCA3* gene in prostate tissue development. We used real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (FQ-RT-PCR) method to detect the expression of *PCA3* mRNA, *AMACR* mRNA and *PSA* mRNA in 18 fetal prostate tissues, 27 benign prostate hypertrophy (BPH) tissues and 15 prostate cancer (PCa) tissues. Results showed that no *PCA3* mRNA was detected in fetal prostate group. Among 13–17 weeks group, 18–21 weeks group and 22–25 weeks group the expression of *PSA* mRNA had no statistical significance ( $P>0.05$ ) and the expression of *AMACR* mRNA had statistical significance ( $P<0.05$ ), however, it was statistically insignificant between 18–21 weeks group and 22–25 weeks group ( $P>0.05$ ). The expression of *AMACR* mRNA and *PSA* mRNA in fetal prostate group, BPH group and PCa group gradually increasing, and the difference among them had statistical significance ( $P<0.05$ ). The results suggested that *PCA3* gene may be an important regulatory gene in prostate cancer. Furthermore, *AMACR* and *PSA* gene express in embryonic tissue and only over-express in prostate cancer.

**Key words** *PCA3*; fetus; prostate; *AMACR*; *PSA*

Received: August 7, 2009 Accepted: November 10, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872421) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y207516)

<sup>A</sup>Now he is working at Zhejiang Provincial People's Hospital

\*Corresponding author. Tel: 86-577-88069595, E-mail: wwwtzh@wz.zj.cn