

• 论 著 •

尿肌氨酸水平检测在前列腺癌诊断中的应用研究

马妍慧¹, 丁奕星², 周韵澜¹, 张 良², 陈建华², 沈立松¹, 齐 隽^{2△}
(上海交通大学医学院附属新华医院: 1. 检验科; 2. 泌尿外科 200092)

摘 要:目的 分析尿肌氨酸在前列腺癌(CAP)诊断和病情判断方面是否优于血清前列腺特异性抗原,甚至优于后者。方法 以同位素稀释液相色谱质谱法检测 CAP 及良性前列腺增生症(BPH)患者和健康者尿肌氨酸水平,电化学发光法检测血清 PSA 水平,荧光原位杂交(FISH)技术检测前列腺组织 ERG 基因异位和 TMPRSS2/ERG 融合基因。结果 CAP 组、BPH 组和健康对照组尿肌氨酸水平分别为(6.930±5.619)、(2.250±2.237)和(2.058±1.396)μmol/L, CAP 组高于健康对照组和 BPH 组($P<0.05$)。84.6%(11/13)的 CAP 患者具有 ERG 基因异位或 TMPRSS2/ERG 融合基因。2 例疑为 CAP 的 BPH 组患者尿肌氨酸水平升高,且检出 TMPRSS2/ERG 融合基因。结论 尿肌氨酸有可能成为可用于诊断 CAP 的具有一定临床应用价值的肿瘤标志物。

关键词:前列腺肿瘤; 肌氨酸; 质谱分析法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.013 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)12-1299-02

Application of urinary sarcosine measurement for the diagnosis of carcinoma of prostate

Ma Yanhui¹, Ding Yixing², Zhou Yunlan¹, Zhang Liang², Chen Jianhua², Shen Lishong¹, Qi Jun^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Urology, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract: **Objective** To analyze whether urinary sarcosine could be as good as, or even better than serum prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis and prognosis of carcinoma of prostate (CAP). **Methods** Isotope dilution-liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) was performed for the detection of urinary sarcosine level of patient with CAP or benign prostatic hyperplasia (BPH) and healthy controls. Electrochemiluminescence assay was used for the detection of serum PSA level. Fluorescence in situ hybridization (FISH) was used for the detection of translocation gene ERG and TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate tissues. **Results** The urinary sarcosine levels of CAP, BPH and healthy control group were (6.930±5.619), (2.250±2.237) and (2.058±1.396) μmol/L, and that of CAP group was higher than the other groups ($P<0.05$). 11 cases of CAP group were positive with translocation gene ERG or TMPRSS2/ERG fusion gene. 2 cases of BHP group, with a suspect diagnosis of CAP, were with high levels of urinary sarcosine and positive with TMPRSS2/ERG fusion gene. **Conclusion** Urinary sarcosine could be used as a useful tumor marker for the diagnosis of CAP.

Key words: Prostatic neoplasms; sarcosine; mass spectrometry

前列腺癌(carcinoma of prostate, CAP)是威胁男性健康的常见肿瘤之一,病死率仅次于肺癌^[1]。中国 CAP 发病率呈明显上升趋势,大部分患者以尿路症状或骨痛就诊,仅 6.2% 因前列腺特异性抗原(prostate antigen, PSA)升高而就诊^[2-3],因此,多数患者就诊时已为晚期,导致长期预后不佳。临床医生参考各种检查结果可对 CAP 进行明确诊断,但仅凭现有实验室检查报告难以对 CAP 及良性前列腺增生症(benign prostatic hyperplasia, BPH)进行鉴别诊断,往往导致 CAP 癌患者错过最佳治疗时期。肌氨酸是甘氨酸的甲基化衍生物,是肌肉和其他组织自然产生的氨基酸,很少出现在尿液中。CAP 组织具有 ERG 相关融合基因,可使转录因子 ERG 高表达,从而促进甘氨酸-N-甲基转移酶的转录表达,引起肌氨酸升高,参与前列腺癌发生进程。肿瘤代谢组学研究也证实, CAP 患者尿肌氨酸水平可特异性增高^[4,5]。本研究对 CAP 及 BPH 患者尿肌氨酸及血清 PSA 水平进行检测,结合 Gleason 评分和 TMPRSS2/ERG 融合基因检测^[6-8],分析其与 CAP 的关系,以期为患者和临床医生提供无创、安全、高效的诊断方法和更有价值的诊断依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 7~9 月本院泌尿科收治的 CAP 患者 18 例(CAP 组),年龄(70.9±10.3)岁,根据 Gleason 评分分为低

危组(3+3, 3+4) 10 例和高危组(4+3, 4+4, 4+5) 8 例; BPH 患者 13 例(BPH 组),年龄(66.7±9.4)岁;均为病理活组织检查确诊患者,血清 PSA≥4 ng/mL;以同期于本院体检健康男性 57 例为健康对照组,年龄(54.3±7.3)岁,血清 PSA<4 ng/mL。

1.2 方法 (1)尿肌氨酸检测健康对照组采集清洁中段晨尿; CAP 及 BPH 组采集清洁中段晨尿,或采集前列腺按摩后尿液。以 API3200 三重四极杆液质联用仪(Applied Biosystems, 美国),采用同位素稀释液相色谱质谱法(liquid chromatography-mass spectrography, LC/MS),应用 EZ: faast 氨基酸分析试剂盒(Phenomenex, USA)绘制标准曲线后测定各样本肌氨酸含量。(2)荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)检测 FISH 法检测 CAP 组 13 例前列腺穿刺组织标本 ERG 基因异位及 TMPRSS2/ERG 融合基因^[9];采用金菩嘉公司前列腺癌检测试剂盒,结果在 Olympus 荧光显微镜下观察, Genus 图像软件分析图像。(3)血清 PSA 检测采用 E601 电化学发光分析仪及其配套试剂(ROCHE, 瑞士)进行检测。

1.3 统计学处理 应用 Prism5.0 软件进行数据统计学分析;计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 Mann Whitney 检验或 Welch 法近似 t 检验; $P<0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组别尿肌氨酸、血清 PSA 检测结果见表 1。2 例 BPH

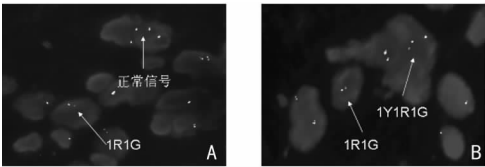
△ 通讯作者, E-mail: jiasonqi@sh163.net。

组患者疑为 CAP,其尿肌氨酸水平高于健康对照者。其中尿肌氨酸和血清 PSA 水平间无相关关系($r^2=0.03, P>0.05$)。

表 1 各组别尿肌氨酸、血清 PSA 检测结果		
组别	血清 PSA(ng/mL)	尿肌氨酸($\mu\text{mol/L}$)
健康对照组($n=57$)	1.071 $\pm$ 1.197	2.058 $\pm$ 1.396
BPH 组($n=13$)	15.610 $\pm$ 14.95*	2.250 $\pm$ 2.237
CAP 组($n=18$)	29.380 $\pm$ 27.79*	6.930 $\pm$ 5.619*#

*: $P<0.05$,与健康对照组比较;#: $P<0.05$,与 BPH 组比较。

2.2 TMPRSS2/ERG 融合基因检测 FISH 检测结果见图 1。84.6%以上(11/13)的 CAP 患者具有 ERG 基因异位或 TM-PRSS2/ERG 融合基因。2 例疑为 CAP 的 BPH 组患者在尿肌氨酸水平升高的同时,检出 TMPRSS2/ERG 融合基因。



A:正常信号及 ERG 基因异位信号;B:TMPRSS2/ERG 融合基因信号及 ERG 基因异位信号。1R1G:指荧光信号为 1 红 1 绿,表示细胞内出现 ERG 基因异位;1Y1R1G:指荧光信号为 1 红 1 绿 1 黄,表示细胞内出现 TMPRSS2/ERG 融合基因。

图 1 前列腺穿刺组织 FISH 检测

2.3 CAP 组中高危组、低危组尿肌氨酸检测结果 高危组、低危组尿肌氨酸检测结果分别为(7.335 $\pm$ 6.705)和(9.982 $\pm$ 8.048) $\mu\text{mol/L}$,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

有研究显示,CAP 患者尿肌氨酸水平显著升高,尤其是转移性 CAP 患者;而在血清 PSA 水平处于临床灰色地带(2~10 ng/mL)的患者中,尿肌氨酸水平与组织活检诊断结果的一致性优于 PSA;肌氨酸与癌细胞转移密切相关,能够影响癌细胞生长,体外研究证实可使良性肿瘤细胞转化为具有侵袭能力的恶性癌细胞,提示尿肌氨酸在诊断 PCA 及判断肿瘤细胞侵袭性方面至少与 PSA 相当,甚至优于后者^[4]。E26(E-twenty six,ETS)基因的融合和 CAP 的发生、发展密切相关,TM-PRSS2/ERG 融合基因可直接诱导参与肌氨酸代谢的相关蛋白酶的转录,使肌氨酸在 CAP 组织中特异性增高。本研究以质谱法检测尿肌氨酸水平,也证实 CAP 患者尿肌氨酸水平增高,说明肌氨酸可能成为用于 CAP 诊断的极有临床应用价值的肿瘤标记物。本研究以病理检查结果作为 CAP 的诊断金标准,但穿刺部位的不同有可能导致未能取得肿瘤部位组织标本,或肿瘤细胞尚未发生形态学改变但已发生遗传学变化。因此选取了部分 PSA 高值患者利用 FISH 技术检测是否存在 ERG 融合基因,发现 3 例病理报告为 BPH 的患者中,有 2 例尿肌氨酸水平升高,且前列腺细胞中检出 TMPRSS2/ERG 融合基因。

Jentzmik 等^[10-11]的研究显示,就前列腺按摩后收集的尿液标本而言,其肌氨酸水平并不能用于 CAP 和 BPH 的鉴别诊断,也不能区分侵袭性和非侵袭性 CAP。也有研究表明,血清中肌氨酸含量不能用于判断前列腺癌^[12]。本研究中主要分析了 Gleason 评分和尿肌氨酸水平的关系,结果显示高危组和低危组间尿肌氨酸水平差异无统计学意义;分析其中原因,可能与分析前因素有关,因为 Sreekumar 等^[4]采用的是清洁中段

尿,而本研究中的尿标本来源不一,且如果 CAP 患者体内不存在 ERG 相关融合基因,则其尿肌氨酸水平也不可能很高。因此,实验设计中还需要考虑增加病例数,并按 Gleason 评分和肿瘤侵袭性分组。CAP 和 BPH 组尿肌氨酸检测结果的标准差较大,一方面是可能是由于少数 CAP 患者被纳入 BPH 组内,另一方面可能是受 LC/MS 的稳定性和重复性,以及标本中丙氨酸含量等因素的影响。

总之,本研究的目的在于建立同位素稀释 LC/MS 以监测尿肌氨酸水平,以期为患者提供无创、安全、高效的诊断方法。尿肌氨酸与血清 PSA、前列腺癌抗原 3 等指标联合应用,可以为临床提供更有价值的诊断依据,有助于减少医疗费用,避免资源浪费。肌氨酸生成、代谢途径有可能成为治疗 CAP 的新靶位,对 CAP 治疗药物的研制开辟了新的途径。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Ward R, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.

[2] Zhao Z, Shen W. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression in human prostate cancer tissues and its potential role in prostate carcinogenesis and progression of prostate cancer[J/OL]. World J Surg Oncol, 2004[2010-05-13]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15132743>.

[3] 上海市疾病预防控制中心. 2004 年上海市市区恶性肿瘤发病率[J]. 肿瘤, 2007, 27(7): 594.

[4] Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression[J]. Nature, 2009, 457(7231): 910-914.

[5] Cavaliere B, Macchione B, Monteleone M, et al. Sarcosine as a marker in prostate cancer progression; a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 400(9): 2903-2912.

[6] Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TM-PRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer[J]. Science, 2005, 310(5748): 644-648.

[7] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(7): 497-511.

[8] Narod SA, Seth A, Nam R. Fusion in the ETS gene family and prostate cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 99(6): 847-851.

[9] Clark J, Merson S, Jhavar S, et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate[J]. Oncogene, 2007, 26(18): 2667-2673.

[10] Jentzmik F, Stephan C, Miller K, et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumors[J]. Eur Urol, 2010, 58(1): 12-18.

[11] Jentzmik F, Stephan C, Lein M, et al. Sarcosine in prostate cancer tissue is not a differential metabolite for prostate cancer aggressiveness and biochemical progression[J]. J Urol, 2011, 185(2): 706-711.

[12] Struys EA, Heijboer AC, Moorselaar J, et al. Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer[J]. Ann Clin Biochem, 2010, 47(3): 282.