

前列腺癌患者血清腺激肽释放酶 2 检测的临床意义

谢克俭¹, 陈映鹤², 谢辉³, 李东¹, 蔡强军¹

(1. 温州医科大学医学检验诊断学实验教学中心, 浙江 温州 325035; 2. 温州医科大学附属第二医院, 浙江 温州 325000; 3. 温州医科大学附属第一医院, 浙江 温州 325000)

摘要: [目的] 探讨前列腺癌(PCa)患者血清腺激肽释放酶 2(human kallikrein 2, hK2)检测的临床意义。[方法] 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和放射免疫分析法(RIA)分别检测 30 例 PCa、30 例前列腺增生(BPH)患者和 30 名健康人血清 hK2 和前列腺特异性抗原(PSA)的水平。并随访 12 例根治性前列腺全切术后 PCa 患者 hK2 水平。[结果] PCa 组 hK2 水平为 78.8 ± 25.2 ng/L, 明显高于 BPH 组 (25.4 ± 6.28 ng/L) 和健康组 (24.1 ± 4.16 ng/L), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); BPH 组与健康组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); hK2 检测 PCa 的敏感度、特异性、准确率分别为 63.3%、90.0%、76.6%; 血清 hK2 诊断 PCa 的 ROC 曲线下面积为 0.767(95%CI: 0.642~0.891); 12 例 PCa 患者手术前和手术后 hK2 比较差异有统计学意义 (81.5 ± 24.8 ng/L vs 38.4 ± 13.5 ng/L, $P < 0.001$)。[结论] 血清 hK2 诊断 PCa, 可能可以提高其特异性, 减少不必要的活检率, 有望成为新的 PCa 检测指标预测高危人群。

关键词: 腺激肽释放酶 2; 前列腺肿瘤; 诊断

中图分类号: R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)08-0695-04

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.08.A014

Detection of Serum Human Kallikrein 2 in Patients with Prostatic Cancer and Its Clinical Significance

XIE Ke-Jian¹, CHEN Ying-he², XIE Hui³, et al.

(1. Experimental Treading Center for Laboratory Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; 3. The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the clinical significance of detection of serum human kallikrein 2 (hK2) levels in patients with prostate cancer(PCa). [Methods] The levels of hK2 and prostate specific antigen (PSA) in 30 cases with PCa, 30 cases with benign prostatic hyperplasia (BPH) and 30 healthy person were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and radioimmunoassay (RIA). Twelve cases with PCa after operation were followed up. [Results] The levels of serum hK2 in PCa group (78.8 ± 25.2 ng/L) were significantly higher than that in BPH group (25.4 ± 6.28 ng/L) and healthy person (24.1 ± 4.16 ng/L) ($P < 0.001$), and there were no statistical difference between BPH group and healthy person ($P > 0.05$). The sensitivity, specificity and accuracy of hK2 for PCa was 63.3%, 90.0% and 76.6% respectively. The area under ROC curve of hK2 for PCa diagnosis was 0.767(95% CI: 0.642~0.891). There was significant difference between in serum hK2 level of 12 patients before operation and after operation (81.5 ± 24.8 ng/L vs 38.4 ± 13.5 ng/L, $P < 0.001$). [Conclusions] Detection of serum hK2 might improve the specificity and reduce unnecessary biopsies in diagnosis of PCa, it may be a new measured marker to predict high-risk population.

Key words: human kallikrein 2; prostatic neoplasms; diagnosis

目前对前列腺癌(prostate cancer, PCa)进行早期诊断尚缺乏十分行之有效的方法, 导致部分患者

遭受不必要的前列腺活检之苦^[1]。因此通过实验室诊断技术, 发现敏感度高、特异性强与 PCa 相关的分子生物学指标是学者关注的焦点。近年来, 血循环或组织中异常的人组织激肽释放酶(kallikreins,

收稿日期: 2013-10-22; 修回日期: 2013-11-26

基金项目: 浙江省教育厅科研基金资助项目(Y201120586)

通讯作者: 谢克俭, E-mail: xkj@wzmc.edu.cn

KLKs)基因家族同恶性肿瘤的形成和发展的相互关系日益受到重视^[2,3],其与前列腺特异性抗原(PSA)一样,由前列腺上皮细胞产生。KLKs分泌到循环系统中的腺激肽释放酶2(human kallikrein 2,hK2)可能具有促进PCa增长的作用^[4],检测hK2可以增加或补充PSA对于PCa的筛选、分期和监测的敏感度、特异性^[5-7]。但是hK2对PCa的诊断价值仍处于研究阶段,而且争议颇大^[8,9]。我们采用本实验室建立的hK2联免疫定量分析法^[10]检测PCa,前列腺增生(benign prostatic hyperplasia,BPH)患者及健康人血清hK2水平,探讨血清hK2水平与PCa的相关性,为PCa的早期诊断、预后判断以及治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

PCa患者30例,年龄59~80岁。临床分期根据2002年PCa AJCC分期标准,其中Ⅰ期3例、Ⅱ期5例、Ⅲ期8例、Ⅳ期14例。BPH患者30例,年龄55~78岁。纳入标准:①PCa和BPH病例均经临床和病理诊断证实;②未因前列腺疾病而接受治疗;③采血均于直肠指诊检查前或检查后1周、活检后2周。对照组纳入标准:健康男性30名,年龄55~75岁。均符合中华医学会老年医学分会建议的健康老年人标准。

1.2 标本采集

清晨空腹静脉抽血5ml,3h内分离血清,置-30℃冰箱保存,集中检测。

1.3 检测方法

hK2检测采用本实验室建立的酶联免疫吸附试验(ELISA)^[10],hK2单克隆抗体(hK₂ mAb)、hK2多克隆抗体(hK₂ pAb)、辣根过氧化物酶(HRP)标记抗IgG,hK₂参考标准品(R&D systems公司),仪器为ELX800G型酶标仪(奥地利Dialab公司)。

操作步骤:实验前将配制的试剂盒组分(可拆包被酶标板、hK₂ pAb、HRP标记抗IgG、参考标准品、洗涤液、终止液、显色底物)置室温平衡30 min,分别向孔中加入50μl hK₂标准品或血清标本及空白对照(10g/L BSA/PBS),37℃温育1 h,洗涤3次,每孔加入1:2000稀释的hK₂pAb 100μl,37℃温育1h;

洗涤3次,加入1:8000稀释的HRP标记抗IgG 每孔100μl,37℃温育1 h,洗涤3次,加入底物液每孔100μl,37℃避光显色15 min,每孔加入2.0mol/L H₂SO₄ 50μl终止反应,酶标仪450nm波长读取各孔吸光度(A)值。根据曲线图,选择最佳线性范围,绘制标准曲线。

PSA检测采用放射免疫分析法(RIA),PSA RIA kit药盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)(PSA正常参考值<4.0 ng/ml),仪器为SN-695B型智能放免γ检测仪(上海核所日环光电仪器有限公司)。严格按照流程操作,专人负责,批内、批间达要求范围。

1.4 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件,采用均数 t 检验、方差分析、 χ^2 检验和双变量相关分析,计数资料用列联表计算比值比(OR)及其95%CI。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清hK2及PSA水平

健康组血清hK2水平为 24.1 ± 4.16 ng/L,BPH组为 25.4 ± 6.28 ng/L,PCa组为 78.8 ± 25.2 ng/L。PCa组hK2水平明显升高,与BPH组和健康组比较差异均有统计学意义($t=11.26,11.73,P$ 均 <0.001);BPH组与健康组比较差异无统计学意义($t=0.688,P=0.500$)。

12例行根治性前列腺切除术PCa患者在手术前和手术后分别检测血清hK2 2~3次,手术前组血清hK2为 81.5 ± 24.8 ng/L,手术后组为 38.4 ± 13.5 ng/L,10例术后呈明显下降趋势,仅2例无明显变化,两组比较差异有统计学意义($t=5.288,P<0.001$)。各期PCa患者血清hK2水平分别为:Ⅰ期 77.2 ± 34.6 ng/L,Ⅱ期 68.4 ± 30.3 ng/L,Ⅲ期 80.5 ± 23.6 ng/L,Ⅳ期 82.4 ± 23.0 ng/L。各期比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

血清PSA水平在BPH组为 8.97 ± 4.89 ng/ml,PCa组为 44.1 ± 22.6 ng/ml,BPH组和PCa组PSA水平均明显高于正常参考值(<4.0 ng/ml),且PCa组PSA水平升高更为明显,与BPH组比较差异有统计学意义($t=8.320,P<0.001$)。

2.2 hK2对PCa的诊断价值

以hK2水平升高为异常,经健康组正态分布总

Table 1 Diagnostic value of serum hK2 and PSA for PCa

Index	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Accuracy
hK2(>31.1ng /L)	63.3%(19/30)	90.0%(27/30)	86.4%(19/22)	71.0%(27/38)	76.6%(46/60)
PSA(>4.0ng/ml)	93.3%(28/30)	50.0%(15/30)	65.1%(28/43)	88.1%(15/17)	71.6%(43/60)
P	0.010	0.002	0.085	0.303	0.677

体均值统计学处理,以健康组单侧 95%观察值上限 31.1ng/L($\bar{x}+1.64s$)作为阳性界值,30 例 PCa 组 hK2 升高 19 例(63.3%),30 例 BPH 组仅 3 例(10%)升高。以 PSA <4.0 ng/ml 作为阳性界值,30 例 PCa 组和 BPH 组 PSA 分别升高 28 例(93.3%)和 15 例(50%)。hK2 与 PSA 诊断 PCa 的敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确率见 Table 1。

用列联表通过比值比(odds ratio,OR)和 95% CI 计算 hK2 高水平者患 PCa 的相对危险度,结果显示与低 hK2 水平患者相比,高 hK2 水平 PCa 患者的相对危险度(OR)为 15.55(95%CI:3.81~63.36, $P<0.001$)。血清 hK2 诊断 PCa 的 ROC 曲线下面积为 0.767(95%CI:0.642~0.891),标准误为 0.064。说明 hK2 对 PCa 具有较高的诊断价值。

3 讨论

早在 1987 年就发现了 *KLK2* 基因的存在,hK2 与 PSA 在核苷酸序列上有 80%的同源性^[11],主要在前列腺的上皮细胞表达,其他组织表达量较低^[12]。在循环系统中,PSA 和 hK2 共同存在,两者可能具有某种功能关系,明确的是 hK2 能激活无活性的 PSA 前体,还可通过水解胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)而控制生长因子。研究发现,尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)与癌症转移的启动有关,hK2 能够在体外激活单链 uPA^[4],PSA 则无此功能^[13]。推测 hK2 可能具有促进 PCa 增长的作用,是 PCa 发病途径中的一个因素。研究认为 PSA 轻度或中度升高的人群中,血清 hK2 升高与 PCa 发生呈强相关^[6],高水平的 hK2 者患 PCa 的风险增加 5~8 倍。

本研究表明,PCa 组的 hK2 明显高于 BPH 组和健康组,而 BPH 组 hK2 与健康组无显著性差异。提示 hK2 的升高可能增加了 PCa 的危险性。另外 hK2 诊断 PCa 的 ROC 曲线下面积为 0.767,也显示对 PCa 的诊断有较高的准确性。

单用 PSA 检测 PCa,取界值为 4.0ng/ml,其敏感

度(93.3%)虽高,但特异性(50.0%)较低。而 PCa 组 hK2 升高的阳性率(63.3%)虽然不如 PSA,但 BPH 组 hK2 升高的阳性率(10.0%)远远低于 PSA,相比 PSA,血清 hK2 检测 PCa 的特异性提高了 40.0%,准确率也略高于 PSA。提示联合检测 hK2 和 PSA,可能可以提高检测 PCa 的敏感度和特异性,有助于筛选出需要进行前列腺穿刺活检的人群,减少或避免不必要的前列腺活检。

PCa 治疗的预后与患者的生活质量密切相关,是临床关注的焦点。目前,临床上对 PCa 根治术后生化复发(BCR)的危险性评估主要依赖血清 PSA、切除组织病理分期和 gleason 评分。由于 hK2 在血循环中活性比较稳定,当 PCa 患者血清中具有较高浓度的 hK2 时,可以被用作前体药物,用来检测 PCa 患者化疗用药剂量和术后疗效观察^[14]。本文随访了 12 例行根治性前列腺全切术 PCa 患者手术后血清 hK2 水平,10 例术后呈明显下降趋势,仅 2 例无明显变化,显示血清 hK2 在 PCa 的 BCR 预测方面有重要作用,可能有望作为肿瘤局部进展和术后复发的有效监测指标。

Haese 等^[15]、Stephan 等^[16]认为肿瘤的恶性程度高,分泌 hK2 的恶性肿瘤上皮细胞增加,组织屏障破坏,导致血清 hK2 的水平明显升高,hK2 有望成为 PCa 病理分级、分期评估指标。本研究结果显示,各期 PCa 组中血清 hK2 水平比较均无显著性差异,血清 hK2 与 PCa 的分期无明显相关性,这一结果与相关报道不一致。我们认为可能与 hK2 检测方法、入组的个体差异以及本研究观察的病例数较少等有一定关系。其次 PCa 的分期均为临床分期,而多数研究证实^[17]临床分期与手术后的病理分期存在一定差异,也可能导致分期误差。这些都有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Xie KJ,Chen XH,Zhu HB,et al. Clinical significance of serum insulin-like growth factor-1 levels in prostatic can-

- cer[J]. Chin J Urol, 2003, 24(2): 117-118. [谢克俭, 陈筱华, 竺海波, 等. 前列腺癌患者血清胰岛素样生长因子-1 检测的临床意义 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2003, 24(2): 117-118.]
- [2] Avgeris M, Mavridis K, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases in prostate, breast, and ovarian cancers: from pathobiology to clinical relevance [J]. Biol Chem, 2012, 393(5): 301-317.
- [3] Debela M, Beaufort N, Magdolen V, et al. Structures and specificity of the human kallikrein-related peptidases KLK 4, 5, 6, and 7[J]. Biol Chem, 2008, 389(6): 623-632.
- [4] Yousef GM, Diamandis PD. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease[J]. Endocr Rev, 2001, 22(2): 184-204.
- [5] Yang D, Dong SL. Human kallikrein 2 and prostate cancer [J]. Chemistry of Life, 2008, 28 (6): 731-736. [杨丹, 董守良. 人体激肽释放酶 2 与前列腺癌 [J]. 生命的化学, 2008, 28(6): 731-736.]
- [6] Shariat SF, Scherr DS, Gupta A, et al. Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis[J]. Arch Esp Urol, 2011, 64(8): 681-694.
- [7] Nam RK, Diamandis EP, Toi A, et al. Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(5): 1036-1042.
- [8] Martin B J, Cheli C D, Sterling K, et al. Prostate specific antigen isoforms and human glandular kallikrein 2-which offer the best screening performance in a predominantly black population? [J]. J Urol, 2006, 175(1): 104-107.
- [9] Magklara A, Scorilas A, Catalona WJ, et al. The combination of human glandular kallikrein and free prostate-specific antigen(PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA [J]. Clin Chem, 1999, 45 (11): 1960-1966.
- [10] Xie KJ, Jiang AY, Cai QJ, et al. Development and study on the technology of double antibodies sandwich ELISA method for quantitative detection of human glandular kallikrein 2 [J]. Chinese Journal of Immunology, 2013, 29 (4): 416-418. [谢克俭, 姜爱英, 蔡强军, 等. 腺激肽释放酶 2 酶联免疫定量分析法的建立及其方法学研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(4): 416-418.]
- [11] Clements JA. Current perspectives on the molecular biology of the renal tissue kallikrein gene and the related tissue kallikrein gene family [J]. Biol Res, 1998, 31(3): 151-159.
- [12] Olsson AY, Bjartell A, Lilja H, et al. Expression of prostate-specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) in ileum and other extraprostatic tissues [J]. Int J Cancer, 2005, 113(2): 290-297.
- [13] Frenette G, Tremblay RR, Lazure C, et al. Prostatic kallikrein hK2, but not prostatespecific antigen (hK3) activates single-chain urokinase-type plasminogen activator [J]. Int J Cancer, 1997, 71(5): 897-899.
- [14] Janssen S, Rosen DM, Ricklis RM, et al. Pharmacokinetics, biodistribution, and antitumor efficacy of a human glandular kallikrein 2 (hK2)-activated thapsigargin prodrug [J]. Prostate, 2006, 66(4): 358-368.
- [15] Haese A, Becker C, Noldus J, et al. Human glandular kallikrein 2: a potential serum marker for predicting the organ confined versus non-organ confined growth of prostate cancer [J]. J Urol, 2000, 163(5): 1491-1497.
- [16] Stephan C, Jung K, Nakamura T, et al. Serum human glandular kallikrein 2 (hK2) for distinguishing stage and grade of prostate cancer [J]. Int J Urol, 2006, 13(3): 238-243.
- [17] Liu M, Su HX, Wang X, et al. Association of prostate-specific antigen and digital rectalexamination with prostate cancer [J]. Chin J Urol, 2012, 33(11): 872-875. [刘明, 苏鸿学, 王鑫, 等. 血清前列腺特异性抗原及直肠指检与前列腺癌的相关性研究[J]. 中华泌尿外科杂志, 2012, 33(11): 872-875.]