

前列腺癌 *ERG* 基因重排与蛋白表达及其与预后的关系^{*}

潘秀懿¹, 谭琚娅¹, 聂玲¹, 尹晓雪¹, 龚静¹, 陈雪芹¹, 周桥¹, 曾浩², 陈锐^{1△}

1. 四川大学华西医院 病理科·病理研究室(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 泌尿外科(成都 610041)

【摘要】目的 检测中国前列腺癌患者 ETS 相关基因(*ERG*)重排及蛋白表达情况,分析其与患者预后的关系。**方法** 选取四川大学华西医院 2009~2014 年前列腺穿刺确诊的前列腺癌患者 482 例,采用荧光原位杂交法检测 *ERG* 基因重排情况,采用免疫组化染色法检测 *ERG* 蛋白表达情况。采用 Spearman 秩相关分析 *ERG* 基因重排与蛋白表达的相关性,采用 χ^2 检验分析 *ERG* 基因重排和蛋白表达与患者临床病理特征的关系,采用 Kaplan-Meier 法分析 *ERG* 基因重排和蛋白表达与患者预后的关系。**结果** 87 例(18.0%)患者检出 *ERG* 基因重排,其中 45 例(51.7%)为转位重排,42 例(48.3%)为缺失重排。74 例(15.4%)患者表达 *ERG* 蛋白。*ERG* 蛋白表达与基因重排正相关($r=0.849, P=0.000$)。368 例获得随访资料,*ERG* 基因重排状态及蛋白表达水平与患者年龄、Gleason 评分、初诊时前列腺特异性抗原(PSA)水平无关($P>0.05$),但发生远处转移及进展为去势抵抗性前列腺癌(CRPC)的病例中 *ERG* 蛋白表达率下降($P<0.05$)。预后分析显示 *ERG* 基因重排及蛋白表达均不能提示预后。**结论** *ERG* 基因重排状态与蛋白表达情况均不能作为前列腺癌进展为 CRPC 及总生存率的独立预测指标。

【关键词】 前列腺癌 *ERG* 基因重排 蛋白表达 预后

Prognostic Significance of *ERG* Gene Rearrangement and Protein Expression in Prostate Cancer PAN Xiu-yi¹, TAN Jun-ya¹, NIE Ling¹, YIN Xiao-xue¹, GONG Jing¹, CHEN Xue-qin¹, ZHOU Qiao¹, ZENG Hao², CHEN Ni^{1△}. 1. Department of Pathology, Laboratory of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Urology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: chenni1@163.com

【Abstract】Objective To investigate gene rearrangement and protein expression of ETS related gene (*ERG*) in prostate cancer of Chinese patients and its correlation with clinicopathological characteristics and prognosis. **Methods** This study collected 482 cases of prostatic adenocarcinomas diagnosed by prostate biopsy in West China Hospital of Sichuan University from 2009 to 2014. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunohistochemical staining (IHC) were performed to access the *ERG* rearrangement and protein expression respectively. Relationship between *ERG* rearrangement and protein expression was assessed by Spearman rank order correlation. The correlations of *ERG* rearrangement and protein expression with clinicopathological variables and prognosis were further analyzed. **Results** *ERG* rearrangement was detected in 87 (18.0%) cases, of which 45 (51.7%) was translocation and 42 (48.3%) was deletion. *ERG* protein expression was detected in 74 (15.4%) cases. Follow-up data was obtained in 368 cases. *ERG* rearrangement and protein expression had no correlations to age, Gleason score and pre-operation PSA level ($P>0.05$), but *ERG* protein level was decreased in metastatic cases or castration resistant prostate cancer (CRPC) cases ($P<0.05$). Kaplan-Meier curve showed both gene rearrangement and protein expression of *ERG* had no prognostic significance. **Conclusion** *ERG* rearrangement, as well as *ERG* protein expression, could not serve as an independent prognostic biomarker.

【Key words】 Prostate cancer *ERG* Gene rearrangement Protein expression Prognosis

前列腺癌是老年男性泌尿生殖系统好发的恶性肿瘤。前列腺癌中最常见的融合基因为含有雄激素调节促进子区 *TMPRSS2* 基因的 5'端与 ETS 家族成员,主要是 ETS 相关基因(ETS-related gene, *ERG*)发生融合,导致 *ERG* 蛋白过表达^[1-2],可能

与前列腺癌的发生、发展相关。*TMPRSS2* 和 *ERG* 基因同位于 21 号染色体长臂,相隔 3 Mb 碱基,二者间的重排既可以是染色体间的转位,也可以是中间碱基的缺失。*ERG* 基因还可与 *SLC45A3*、*NDRG1* 等基因发生转位重排导致 *ERG* 蛋白过表达^[2-3]。因此前列腺癌中 *ERG* 基因重排方式可分为转位重排和缺失重排,西方人群中 *ERG* 基因重排以缺失重排为主^[4]。可通过荧光原位杂交(FISH)检测 *ERG* 基因重排和免疫组化检测 *ERG* 蛋白表达两种

^{*} 国家自然科学基金(No. 81272820、No. 81272848、No. 81572540 和 No. 81572541)资助

△ 通信作者, E-mail: chenni1@163.com

方法进行前列腺癌中 ERG 的检测。有研究报道 ERG 蛋白表达与基因重排一致性较高,ERG 免疫组化基本可代替基因重排检测^[5-6],也有文献认为在去势抵抗性前列腺癌(CRPC)的病例中,ERG 蛋白表达率明显低于基因重排率^[7-8]。ERG 基因重排状况与前列腺癌的进展及预后关系的报道较多,但尚存争议。

目前国内仅有少量文献报道了中国前列腺癌患者 ERG 蛋白表达情况^[9-10],尚未见大样本量的 ERG 基因重排研究。本研究采用 FISH 和免疫组化两种方法检测 482 例前列腺癌 ERG 基因重排及蛋白表达情况,分析二者的表达一致性,并分析其与一系列临床指标及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

选取四川大学华西医院病理科 2010~2014 年经穿刺确诊为前列腺癌的病例 482 例,平均年龄(71.5 ± 7.4)岁。其中 Gleason 评分 ≤ 6 分者 52 例,Gleason 评分 7 分者 177 例,Gleason 评分 ≥ 8 分者 253 例。其中 368 例获得随访资料,中位随访时间 29.6 月。

1.2 FISH 及结果判读

ERG 基因异常检测试剂盒(荧光原位杂交法)购自广州安必平医药科技有限公司,实验步骤按说明书进行。探针 75 °C 变性 5 min 后,42 °C 恒温杂交 16~18 h,DAPI 复染。使用 OLYMPUS BX 51 荧光显微镜对杂交后的切片进行观察。选择背景干净、细胞无重叠、DAPI 染色均一的肿瘤区进行观察。细胞核内出现 2 个黄色信号(红/绿信号融合或红/绿信号间距小于单个信号直径)判读为无 ERG 基因重排;细胞核内出现 1 个黄色信号和 1 对分离的红/绿信号(红/绿信号间距大于单个信号直径)为转位重排;细胞核内出现 1 个黄色信号和 1 个绿色信号(缺失 1 个红色信号)为缺失重排。每例计数 200 个肿瘤细胞核,按照试剂盒推荐阈值,信号异常细胞比例大于 5% 判断为阳性,信号异常细胞比例小于 5% 判断为阴性,若信号异常细胞比例等于 5% 则加数 200 个细胞进行判读。

1.3 免疫组织化学(IHC)染色法检测 ERG 蛋白

采用 En Vision 试剂盒(DAKO 公司,丹麦)检测 ERG 蛋白表达情况。石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,EDTA 抗原修复,ERG 抗体(克

隆号:EP111,购自北京中杉金桥公司)1:400 稀释,4 °C 孵育过夜,二抗 37 °C 孵育 1 h。组织内血管内皮细胞为自身阳性对照,省略第一抗体作为空白对照。肿瘤组织中 ERG 蛋白弥漫均一核着色判为阳性。

1.4 统计学方法

ERG 基因重排与蛋白表达的相关性采用 Spearman 秩相关分析,ERG 基因重排和蛋白表达情况与临床病理指标的关系采用 χ^2 检验,生存分析采用 Kaplan-Meier 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ERG 基因重排及 ERG 蛋白表达情况

FISH 结果(图 1)显示:本组病例中 ERG 基因重排检出率为 18.0% (87/482)。其中 45 例(51.7%)为转位重排,42 例(48.3%)为缺失重排。IHC 结果(图 2)显示:本组病例中 74 例(15.4%)检出 ERG 核蛋白表达。

2.2 ERG 基因重排与蛋白表达情况的关系

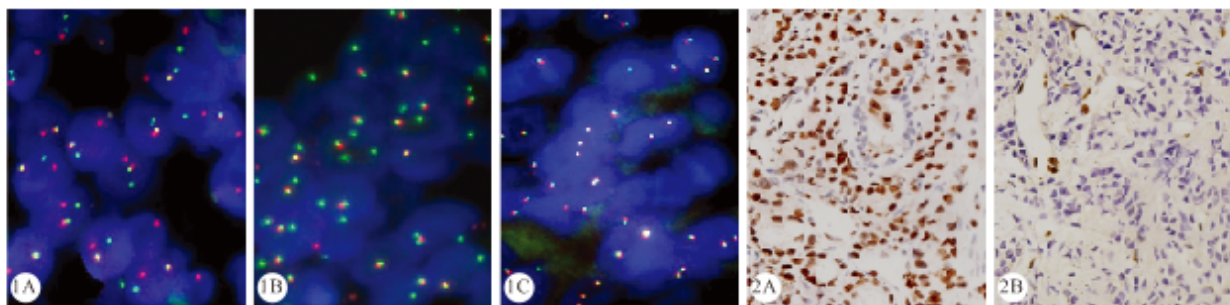
本组病例中 FISH 检出 ERG 基因重排率为 18.0%,IHC 检出 ERG 蛋白表达率为 15.4%,FISH 阳性率高于 IHC 阳性率,二者差异有统计学意义($P = 0.007$)。ERG 蛋白表达与基因重排正相关($r = 0.849$, $P = 0.000$)。与 FISH 相比,IHC 检测 ERG 蛋白表达的灵敏性为 80.5% (70/87),特异性为 99.0% (391/395)。

2.3 ERG 基因重排及蛋白表达与患者预后的关系

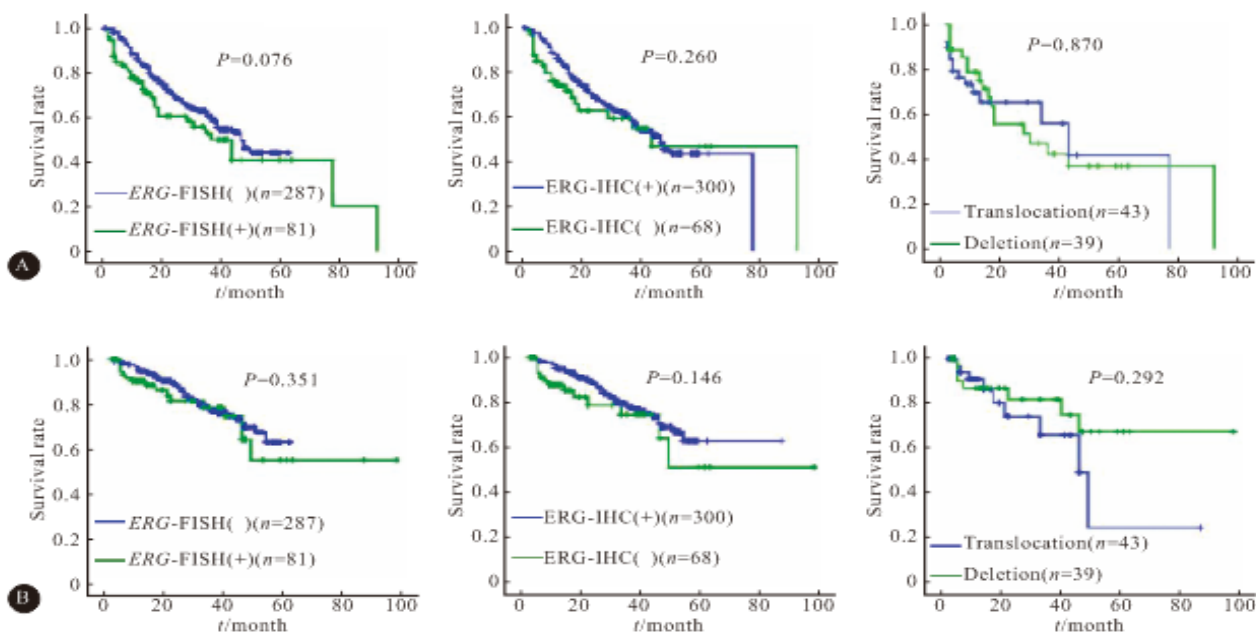
本组病例共获得 368 例随访资料,中位随访时间 29.6 月。分别以患者进入 CRPC 阶段和死亡时间为截点进行生存分析。Kaplan-Meier 生存分析显示本组病例中 ERG 基因重排及蛋白表达状况并非 CRPC 和总体生存情况的独立预后指标($P > 0.05$)。进一步亚组分析显示:缺失重排与转位重排病例疾病进展和总体生存情况差异亦无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

2.4 ERG 基因重排及蛋白表达与前列腺癌临床病理资料的关系

ERG 基因重排及 ERG 蛋白表达水平与患者年龄、Gleason 评分、术前前列腺特异性抗原(PSA)水平平均无关($P > 0.05$),但在发生远处转移和进展为 CRPC 的病例中 ERG 蛋白的表达率更低($P < 0.05$),见附表。

图 1 FISH 检测 *ERG* 基因重排。×1 000图 2 *ERG* 免疫组织化学染色。×400Fig 1 *ERG* rearrangement detected by FISH analysis. ×1 000Fig 2 IHC staining of *ERG*. ×400

1A: Translocation rearrangement displayed one green/one red break apart signal and one remaining normal green-red fusion signal in tumor cells; 1B: Deletion rearrangement displayed one green signal and one normal green-red fusion signal; 1C: One case without *ERG* rearrangement displayed two normal green-red fusion signals; 2A: *ERG* positive staining; 2B: *ERG* negative staining

图 3 *ERG* 基因重排及蛋白表达与预后的关系Fig 3 Correlation of *ERG* rearrangement or protein expression with prognosis

A: CRPC-free survival; B: Overall survival

3 讨论

前列腺癌中最常见的基因重排是 *ERG* 基因与 *TMPRSS2* 基因发生重排, 导致 *ERG* 蛋白过表达^[3-4]。文献报道欧美国家前列腺癌 *ERG* 基因重排率为 40%~70%^[1-2,5]。本研究检测了 482 例中国前列腺癌 *ERG* 基因重排状况, FISH 结果示 *ERG* 基因重排率为 18.05%(87/482), 远低于欧美国家, 与亚洲其他国家的重排率一致^[11-12], 提示前列腺癌中 *ERG* 基因重排状况存在地域和人种差异。

部分文献报道 *ERG* 免疫组化与基因重排结果高度一致, *ERG* 免疫组化可一定程度代替基因重排检测^[5-6]。本研究结果显示与 FISH 相比, IHC 检测 *ERG* 蛋白表达的灵敏性为 80.5%(70/87), 二者呈正相关($r = 0.849$, $P = 0.000$), 但 IHC 检测 *ERG* 蛋白的表达率(15.4%)略低于 FISH 检测 *ERG* 基因重排率(18.0%)。在 *ERG* 重排阳性而蛋白表达阴性的 17 例中, 11 例发生了 CRPC, 这与文献报道的 CRPC 的 *ERG* 蛋白表达率低于 *ERG* 基因重排率一致^[7-8]。其原因可能是 *TMPRSS2*-

附表 *ERG* 基因重排及蛋白表达与前列腺癌临床病理资料的关系

Table Relationship between *ERG* rearrangement or protein expression with clinicopathological variables

Item	<i>ERG</i> -FISH/case			<i>ERG</i> -IHC/case		
	Positive	Negative	<i>P</i>	Positive	Negative	<i>P</i>
Age/yr.			0.177			0.924
<70	38	142		28	152	
≥70	49	253		46	256	
Gleason score			0.585			0.448
6	7	45		7	45	
7	31	146		32	145	
≥8	49	204		35	218	
Pre-PSA/(ng/mL)			0.233			0.094
<4	3	3		3	3	
4-10	7	11		6	12	
>10	63	178		53	188	
Metastasis			0.195			0.001
Yes	39	139		26	152	
No	20	47		23	44	
CRPC			0.544			0.043
Yes	34	108		20	122	
No	54	172		52	174	

ERG 融合基因上游启动子区受雄激素调控^[13],在CRPC病例中,*TMPRSS2-ERG* 融合基因上游启动子区对雄激素调控的反应降低,不能促进 *ERG* 蛋白表达^[7, 14]。与西方国家相比,中国前列腺癌患者尤其是西部地区前列腺癌患者就诊时临床分期偏晚,内分泌治疗后出现 CRPC 的患者比例高,可能是导致表达率差异的原因之一。导致表达率差异的另一个原因可能是抗体克隆的差异,本组病例使用的 *ERG* 抗体克隆号为 EP111,文献报道克隆号为 EPR3864 的 *ERG* 抗体与 FISH 基因重排比较敏感性高达 95.7%,特异性为 96.5%^[6],可能是不同克隆号抗体识别的位点不同所致。另外,前列腺癌具有多病灶、异质性的特点,同一病例不同部位的标本检测结果可能不同^[4, 15]。

本组研究资料显示,*ERG* 基因重排状态及蛋白表达水平与患者年龄、Gleason 评分、术前 PSA 水平无关($P>0.05$),*ERG* 基因重排状态与前列腺癌远处转移及进展为 CRPC 状态也无关,而发生远处转移及进展为 CRPC 的病例中 *ERG* 蛋白表达率下降($P<0.05$),这与文献报道一致^[16]。提示 *ERG* 基因重排可能发生在前列腺癌起始阶段^[17],部分病例在疾病进展过程中可能受到负调控因素的影响导致 *ERG* 蛋白表达丢失。

ERG 基因重排与患者预后的关系尚存争议。部分研究认为 *ERG* 基因重排预示前列腺癌预后差^[5, 11];也有研究认为有 *ERG* 基因重排与疾病进展或预后无关^[18-19];甚至有文献报道 *ERG* 基因重

排患者预后较好^[20]。本组病例显示 *ERG* 基因重排及蛋白表达并非前列腺癌患者发生 CRPC 和总体生存率的独立预测指标,这与另一组中国病例报道的结果一致^[9],可能不同人种或不同分级分期病例间 *ERG* 的预后价值存在差异,需要进一步的研究证实。

文献报道欧美国家前列腺癌以 *ERG* 缺失重排为主。本研究结果显示本组病例 *ERG* 转位重排比例(51.7%)略高于缺失重排(48.3%),但两者预后并无差异,需要更多的病例进一步证实。

综上所述,中国前列腺癌患者 *ERG* 基因重排比例远低于西方国家,转位重排比例略高于缺失重排;IHC 检测 *ERG* 蛋白表达阳性率低于 FISH 检测基因重排阳性率;发生远处转移及进展为 CRPC 的病例中 *ERG* 蛋白表达率明显下降;*ERG* 基因重排及 *ERG* 蛋白表达均不能作为前列腺癌进展为 CRPC 及总生存率的独立预测指标。

参 考 文 献

[1]

TOMLINS SA, RHODES DR, PERNER S, *et al.* Recurrent fusion of *TMPRSS2* and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*,2005,310(5748):644-648.

[2]

HAN B, MEHRA R, DHANASEKARAN SM, *et al.* A fluorescence *in situ* hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations; identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res*,2008,68(18):7629-7637.

[3]

PFLUEGER D, RICKMAN DS, SBONER A, *et al.* N-myc

- downstream regulated gene 1 (*NDRG1*) is fused to ERG in prostate cancer. *Neoplasia*, 2009, 11(8): 804-811.
- [4] MEHRA R, HAN B, TOMLINS SA, *et al.* Heterogeneity of *TMPRSS2* gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma; molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 7991-7995.
- [5] BERG KD, BRASSO K, THOMSEN FB, *et al.* ERG protein expression over time: from diagnostic biopsies to radical prostatectomy specimens in clinically localised prostate cancer. *J Clin Pathol*, 2015, 68(10): 788-794.
- [6] PARK K, TOMLINS SA, MUDALIAR KM, *et al.* Antibody-based detection of *ERG* rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia*, 2010, 12(7): 590-598.
- [7] UDAGER AM, SHI Y, TOMLINS SA, *et al.* Frequent discordance between *ERG* gene rearrangement and ERG protein expression in a rapid autopsy cohort of patients with lethal, metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Prostate*, 2014, 74(12): 1199-1208.
- [8] GSPONER JR, BRAUN M, SCHEBLE VJ, *et al.* *ERG* rearrangement and protein expression in the progression to castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2014, 17(2): 126-131.
- [9] 滕梁红, 高 巍, 卢德宏. ERG 和 SPINK1 蛋白在前列腺癌中表达的相互排斥性及其与预后的相关性. *中华病理学杂志*, 2014, 43(3): 149-153.
- [10] 肖 立, 王 燕, 龚 芸, 等. *TMPRSS2-ERG* 融合基因在转移性前列腺癌中的表达. *中华病理学杂志*, 2011, 40(6): 392-396.
- [11] RAYMUNDO EM, DIWA MH, LAPITAN MC, *et al.* Increased association of the ERG oncoprotein expression in advanced stages of prostate cancer in Filipinos. *Prostate*, 2014, 74(11): 1079-1085.
- [12] RAWAL S, YOUNG D, WILLIAMS M, *et al.* Low frequency of the *ERG* oncogene alterations in prostate cancer patients from India. *J Cancer*, 2013, 4(6): 468-472.
- [13] KUMAR-SINHA C, TOMLINS SA, CHINNAIYAN AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(7): 497-511.
- [14] HERMANS KG, VAN MARION R, VAN DEKKEN H, *et al.* *TMPRSS2:ERG* fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10658-10663.
- [15] MERTZ KD, HORCIC M, HAILEMARIAM S, *et al.* Heterogeneity of ERG expression in core needle biopsies of patients with early prostate cancer. *Hum Pathol*, 2013, 44(12): 2727-2735.
- [16] TENG LH, WANG C, BEGIN LR, *et al.* ERG protein expression and gene rearrangements are present at lower rates in metastatic and locally advanced castration-resistant prostate cancer compared to localized disease. *Urology*, 2013, 82(2): 394-399.
- [17] PERNER S, MOSQUERA JM, DEMICHELIS F, *et al.* *TMPRSS2-ERG* fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol*, 2007, 31(6): 882-888.
- [18] XU B, CHEVARIE-DAVIS M, CHEVALIER S, *et al.* The prognostic role of ERG immunopositivity in prostatic acinar adenocarcinoma; a study including 454 cases and review of the literature. *Hum Pathol*, 2014, 45(3): 488-497.
- [19] EGUCHI FC, FARIA EF, SCAPULATEMPO NETO C, *et al.* The role of *TMPRSS2:ERG* in molecular stratification of PCa and its association with tumor aggressiveness; a study in Brazilian patients. *Sci Rep*, 2014(4): 5640 [2015-12-10]. doi: 10.1038/srep05640.
- [20] TARIS M, IRANI J, BLANCHET P, *et al.* ERG expression in prostate cancer: the prognostic paradox. *Prostate*, 2014, 74(15): 1481-1487.

(2016-01-20 收稿, 2016-05-06 修回)

编辑 余 琳