

肌氨酸及其在前列腺癌诊治中的作用

The Role of Sarcosine in the Diagnosis and Treatment for Prostate Cancer

XU Chao-jiang, DING Xue-ying, WANG Zhuo

徐朝江¹, 丁雪鹰², 王卓²

(1. 嘉兴第二医院, 浙江 嘉兴 314000;

2. 第二军医大学附属长海医院, 上海 200433)

摘要: 有研究提示尿液肌氨酸水平似乎可以成为诊断恶性侵袭性前列腺癌的新型分子标志物, 其比血清前列腺特异性抗原更具特异性和灵敏性, 但这一结论尚存在争议。全文结合了两种不同的研究文献, 对肌氨酸及其在前列腺癌诊治中的作用作一综述。

关键词: 肌氨酸; 前列腺肿瘤; 分子标志物; 尿液; 前列腺特异性抗原

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)08-0579-05

肌氨酸(sarcosine), 又名 N-甲基甘氨酸, 是胆碱自然代谢为甘氨酸过程中的一个非编码氨基酸中间体, 可以由氯乙酸与甲胺反应制得, 也可以由甘氨酸通过 N-甲基转移酶作用生成。肌氨酸有甜味, 溶于水, 存在于人体的肌肉及其他一些组织中, 生理状态下正常人体血清中的肌氨酸含量是(1.59±1.08)nmol/L^[1]。肌氨酸可以从饮食摄入的胆碱或蛋氨酸代谢而来, 但很快在体内转换为甘氨酸。甘氨酸作为结构性氨基酸, 在人体生理过程中发挥着重要作用, 是谷胱甘肽、肌酸、嘌呤和丝氨酸等活细胞必需成分的代谢来源。肌氨酸在精神分裂症、抑郁症等精神疾病中具有重要作用。2009年, Sreekumar等^[2]发现肌氨酸可激活前列腺癌细胞, 并且其在尿液中被检测到意味着恶性前列腺癌的发生。肌氨酸成为前列腺癌进展和转移时显著增加的一个代谢产物, 能够在尿液中被检测到, 因而被确定为前列腺癌的一个特异性指标。相对于良性前列腺上皮细胞来说, 在侵袭性前列腺癌细胞株中肌氨酸水平也增加^[3]。它比血清前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)具有更好的特异性和灵敏性, 而且具有无创、易行的优点。然而, 又陆续有一些新的报道并不支持这一结论。肌氨酸在前列腺癌诊治中究竟扮演怎样的角色? 本文就最新的研究作一综述。

通讯作者: 王卓, 副主任药师, 博士; 第二军医大学附属长海医院药理学部, 上海市杨浦区区长海路168号(200433); E-mail: wangzhuo088@yahoo.cn。

收稿日期: 2012-03-28; **修回日期:** 2012-05-31

1 阳性结论

1.1 尿液肌氨酸检测

Sreekumar等^[2]在其研究中, 使用高通量的、基于液相色谱—质谱法(LC/MS)和气相色谱—质谱法(GC/MS)的组合方法, 分别对262个前列腺癌的临床样本(其中42个组织和110对血浆和数字化直肠检查后尿液样本)中1126个与前列腺癌相关的代谢产物进行了测定分析。这些代谢组学数据能够区分良性前列腺、临床局限性前列腺癌和转移性前列腺癌。结果表明, 在前列腺癌进展为转移性前列腺癌过程中肌氨酸水平显著提高, 可以通过无创性的尿液检测来发现。相对于良性前列腺上皮细胞, 肌氨酸水平在体外恶性前列腺上皮细胞中显著升高。

为了进一步确定这一结论, 作者建立了高度特异和灵敏的同位素稀释GC/MS法用于测定生物标本中肌氨酸的浓度, 其检测限可低至10fmol(1fmol=10⁻⁶nmol)。结果表明, 一组独立的89个组织标本中, 前列腺癌标本(n=36)的肌氨酸水平远高于相邻部位的良性前列腺组织(n=25, Wilcoxon $P=4.34 \times 10^{-11}$); 转移性前列腺癌标本(n=28)的肌氨酸水平比局限性前列腺癌的肌氨酸水平更高(Wilcoxon $P=6.02 \times 10^{-11}$), 而相邻的非肿瘤组织中则检测不到(图1a)。

作者又研究了患者尿液标本中的肌氨酸水平与其前列腺组织穿刺活检结果的相关性(图1b), 其中大部分患者的PSA水平都有升高(>4.0ng/ml)。活检

阴性并不意味着其不存在前列腺癌的风险, 因为穿刺不一定正好穿到恶性组织。活检阳性患者尿液沉渣(n=49, Wilcoxon $P=0.0004$, 图 1b)及上清液(n=59, Wilcoxon $P=0.0025$) 中肌氨酸水平明显高于活检阴性的患者。

作者在体外细胞系实验中发现, 甘氨酸通过甘氨酸-N-甲基转移酶(GNMT)转变为肌氨酸的过程可能会提高前列腺癌细胞的侵袭性。此外, 肌氨酸水平还受肌氨酸脱氢酶(SARDH)和二甲基甘氨酸脱氢酶(DMGDH)调控, 肌氨酸可在前者作用下转变为甘氨酸, 而二甲基甘氨酸可在后者作用下生成肌氨酸。

这些酶可能在前列腺癌侵袭中发挥重要作用。这一假说在其后多个良性前列腺肿瘤细胞系的体外实验中得到了证实(图 1c、1d), 针对上述不同酶进行针对性的基因敲除后, 肌氨酸水平升高, 同时细胞的侵袭性增加。通过体外研究发现, 肌氨酸和其近端的调控酶, 似乎在调节肿瘤进展的细胞侵袭和迁移中发挥中介作用。*AR* 和 *ETS* 基因融合作为前列腺癌疾病进展的主转录调节因子, 显示出可以通过转录控制其调控酶而直接调控肌氨酸水平。因此, 肌氨酸途径的相关组成成分可能成为前列腺癌进展的潜在生物标志物, 以及作为干预治疗的新途径。

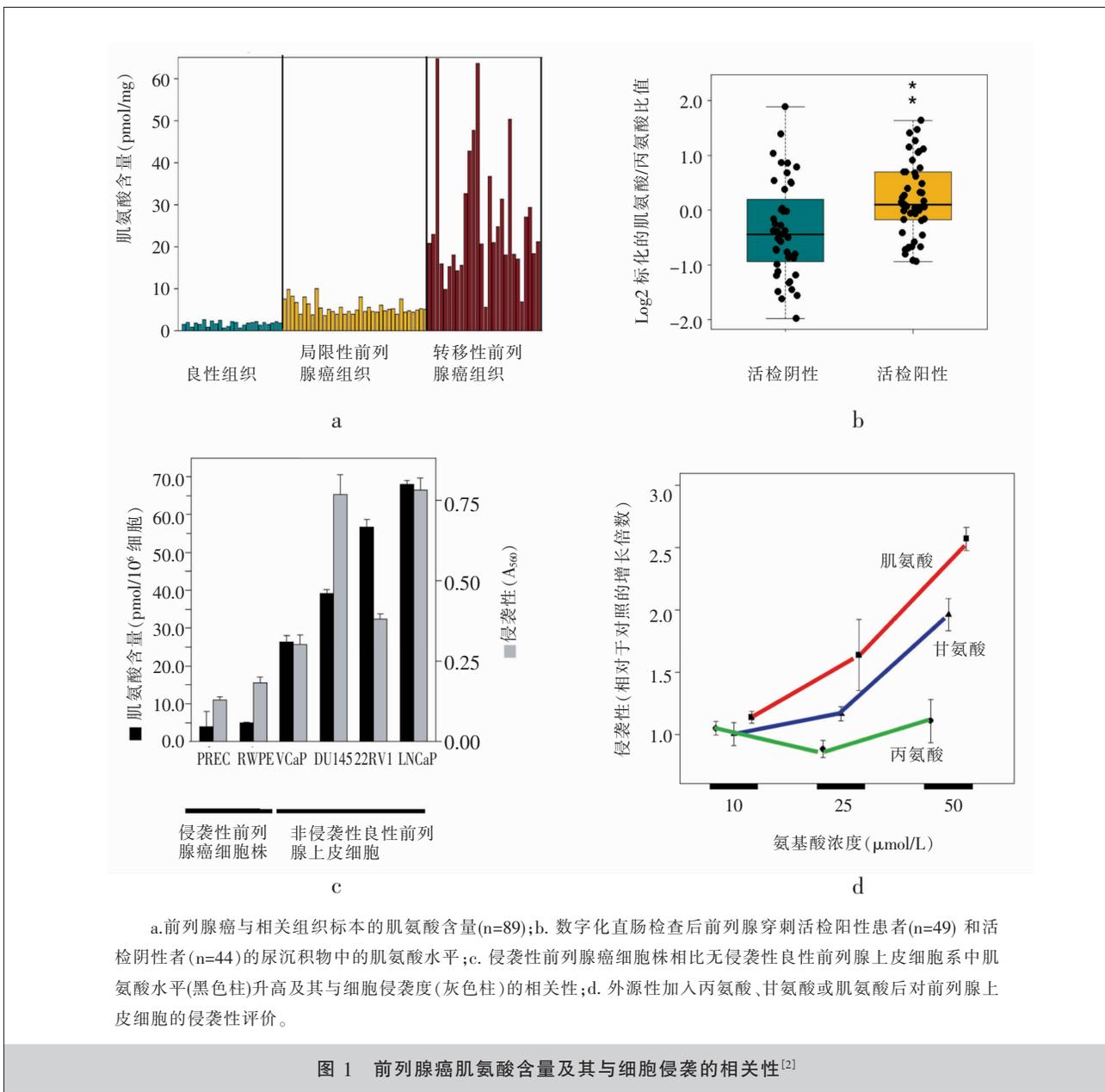


图 1 前列腺癌肌氨酸含量及其与细胞侵袭的相关性^[2]

1.2 血清肌氨酸检测

2011年3月,在欧洲泌尿大会上,意大利学者报告了其对血清肌氨酸测定在前列腺癌预测方面的作用评价^[4]。作者以前瞻性的方式研究了经8~12针前列腺活检确诊的289例前列腺癌患者和312例无恶性肿瘤证据的患者,以肌氨酸检测试剂盒(Biovision, Mountain View, CA, USA)测定了其血清肌氨酸水平。利用非参数检验和受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析法来评价该方法在血清肌氨酸测定对前列腺癌诊断上发挥的作用。结果表明,严格限制患者PSA水平在2~10ng/ml这个灰色范围内时,血清肌氨酸在预测前列腺癌的诊断方面并不比传统的tPSA(PSA总量)和fPSA(游离PSA)更有优势。在PSA<4 ng/ml(即一般认为的正常范围)的个体中,血清肌氨酸显示较PSA总量有更高的预测性。但在其余两个PSA范围内,PSA则显示出比肌氨酸更好的预测性。上述情况下,血清肌氨酸值与肿瘤的分期和分级并未显示出相关性。

2 阴性结论

Sreekumar等^[2]关于尿液肌氨酸水平的结论一经发表就引来了不同的争论。德国研究小组Jentzmik等^[5]最早于2010年报告了不同的结果。作者检测了106例前列腺癌患者及33例无恶性肿瘤证据者(NEM)尿液中肌氨酸的含量,并将结果与临床病理资料、前列腺体积、肿瘤分期、格里森评分(Gleason score)及PSA等进行相关性分析。尿中肌氨酸浓度以商品化的氨基酸GC/MS法测定,以尿肌酐值来标化。对于各结果的诊断价值分别用非参数检验法和ROC曲线分析法来进行评价。结果表明,前列腺癌患者尿中肌氨酸/肌酐的中位值较NEM患者低13%。两组肌氨酸值并不与肿瘤分级或Gleason评分具有相关性。ROC分析表明利用肌氨酸值来区分前列腺癌和NEM并不优越于tPSA,且不如fPSA。因此,作者认为尿液肌氨酸值测定并非为鉴别前列腺癌与非前列腺癌的诊断标志物。但作者承认其研究具有一定局限性,即前列腺癌患者人数远远大于NEM患者。

此外,Struys等^[6]的研究,也认为血清肌氨酸不是前列腺癌的一个标志物。

3 争议

尽管Sreekumar等^[2]的研究主要是通过代谢组学研究发现和部分证实了肌氨酸在前列腺癌侵袭性进展中的重要作用,但由于其结果的新颖性,许多相继而来的评论性文章^[7,8]都更加关注肌氨酸是否具有诊断和预测前列腺癌的重要潜力。于是,之后的研究纷纷聚焦于肌氨酸是否具有该作用。2010年,德国研究小组^[5]发现他们并不能重复出Sreekumar小组的研究结果,甚至得出了相反的结果。于是一场激烈的讨论在*European Urology*杂志展开^[9-15]。大家对比了这两个结论不一致的研究^[2,5],发现至少存在如下几方面不同。

3.1 检测方法差异^[14]

①样品预处理:尽管两个研究均采用了LC/MS测定方法,但Sreekumar小组在文章中并未详细介绍这种方法的细节以及方法学评价,其所有代谢组学研究的测定都是在一家商业化实验室进行的。因此该文未提及尿样及各个组织样本的预处理方法及其对肌氨酸的提取回收率。Jentzmik小组使用了商品化的提取试剂盒将包括肌氨酸在内的全部氨基酸进行了提取。但上述两者均未报告其对肌氨酸的提取效率是否接近100%。因此,两种提取方法首先在提取效率上存在差别。

②内标:Sreekumar小组提及使用了同位素标记的肌氨酸作为内标,但是其数据并未显示使用该内标对检测浓度进行校正;而Jentzmik小组则根本未提及内标。

③衍生化:Sreekumar小组提及应用叔丁基二甲基硅盐作为气相色谱测定前的衍生化试剂。Jentzmik小组则使用了一种专利的衍生化试剂。两者均未提及衍生化的效率。

④色谱分离:肌氨酸和丙氨酸是同分异构体,具有相同的分子量,因此采用质谱检测方法时一定要确保其色谱分离是完全的,但两篇文章均未提供其色谱图,故无法判定其分离的可靠性。

⑤方法标化:方法的标准化是生物标志物测定方法研究时必须的,应该选择对目标待测物特异性强的方法来测定。但Sreekumar小组在代谢组学测定时待测组分多达1126个,对其一一进行标准化的操作性较差。

上述几个方面均可能导致测定方法的不可靠和
不一致,因此,就目前的研究结果来评价尿液肌氨酸
能否作为恶性前列腺癌的诊断和预测指标尚为时过
早。之后, Jentzmik 小组^[15]解释了其方法学方面的细
节,例如:提供了肌氨酸与丙氨酸完全分离的色谱
图;采用正缬氨酸为内标,提取处理的各个环节都受
到内标校正;对肌氨酸的提取回收率可在 100% 左
右。同时,作者同意作为临床决策使用的指标,应该
有按照计量溯源标准和相关指南制定的统一的检测
方法。

3.2 测定样本差异

Sreekumar 小组测试的样本是尿液沉渣,测定
的是其中肌氨酸/丙氨酸比值的对数;Jentzmik 小组
测定的则是尿液经过离心后的上清液,测定的指标
是其肌氨酸与肌酐的比值。

3.3 对照指标差异

Sreekumar 小组未选用明确的对照指标;
Jentzmik 小组选用血清 PSA 及 fPSA 百分比 (%) 作
为其对照指标。

3.4 受试人群差异

Sreekumar 小组测定的标本量比较大,品种也
比较多。主要包括 262 个前列腺相关的生物样本(其
中包括 42 个组织标本和 110 对配对的血浆和数字化
直肠检查后的尿液标本),110 例患者中 59 例活检
阳性,51 例活检阴性。42 个组织标本中 16 个来自前
列腺良性疾病、14 个来自局限性前列腺癌、12 个来
自侵袭性前列腺癌患者。作者在这些标本中鉴定了
1 126 个代谢成分,在 110 对血浆和尿液标本中未
发现活检阳性与阴性患者之间有何显著差异,故将
注意力转移至组织标本。在组织标本中共分离到
626 个代谢物,其中有 515 个代谢物覆盖 3 个不同
的诊断级别。其中有 60 个代谢物仅在前列腺癌患者
标本中检测到,而良性前列腺疾病标本中未测得。其
中有 6 个在良性前列腺进展至局部前列腺癌乃至恶
性侵袭性前列腺癌不同阶段有明显上升,因而引起
特别关注。其中之一就是肌氨酸。

Jentzmik 小组则纳入了 106 例前列腺癌患者及
33 例 NEM 患者的尿液,这些患者以标准化数字直
肠检查后 8~12 针前列腺活检来确诊,还包括 12 名
健康男性和女性的尿液标本。

4 讨论

前列腺癌是男性特有的一种恶性疾病,严重威
胁着男性的健康。尽管自 1992 年起,随着对该疾病
的认识和治疗水平逐渐提高,其死亡率每年约下降
4%,但该疾病仅在美国每年仍可致死 30 000 人^[16]。
在诊断前列腺癌的生物标志物中,常用的 PSA 测试
具有一定的缺陷,首先该测试并不能区分潜在形式
的和侵袭性的前列腺癌;其次,在一些良性前列腺疾
病,如前列腺增生和前列腺炎中,该指标也可能上
升。因此血清 PSA 检测往往会导致对前列腺癌的过
度诊断(尤其是对潜在形式的前列腺癌),由此可能
导致相应的过度治疗及其引起的相关不良反应。显
然,我们迫切需要能够区分鉴别侵袭性和非侵袭性
前列腺癌的标志物来解决上述问题。

肌氨酸是甘氨酸的衍生物,是一组甲基从 S-腺
苷酶转移到甘氨酸后生成的。该反应受甘氨酸-N-甲
基转移酶催化,该酶主要表达在前列腺癌和其他组
织。甘氨酸-N-甲基转移酶是调节循环中 S-腺苷浓
度的主要成员。S-腺苷是调节基因表达和蛋白质活
动中很多重要反应的甲基供体,包括 DNA 胞嘧啶甲
基化、组蛋白赖氨酸甲基化和组蛋白及其他蛋白质精
氨酸甲基化^[7]。

为了证实肌氨酸在前列腺癌进展中可能发挥
的重要作用,Sreekumar 等不厌其烦地进行实验研究。
例如,他们发现良性前列腺上皮细胞中加入肌氨酸
可以提高其侵袭性;而减少前列腺癌细胞的甘氨酸-
N-甲基转移酶可以降低其侵袭性。其他证据包括,在
转移性前列腺癌组织和前列腺癌细胞株中,肌氨酸
的浓度都有上调。RNA 干扰研究表明敲除促进肌氨
酸合成的基因可减少细胞的侵袭性,而敲除肌氨酸
降解的相关基因,则可增加细胞的侵袭性。此外,已
经建立了雄激素与 v-ets 成红细胞增多症病毒 E26
癌基因同源(ETS)基因家族信号及基因相关的肌氨
酸合成(上调)和降解(下调)之间的关联。表明前
列腺癌进展的主要转录调节基因(雄激素受体和 ETS
基因融合)^[17]似乎直接通过转录调控其调控酶来调
节肌氨酸浓度。肌氨酸可能在前列腺癌组织中积累
并增加恶性潜能。

尽管现有的研究还不足以确定尿液肌氨酸可以

作为诊断和预测前列腺癌侵袭性的可靠指标,但至少已经在众多相关的代谢产物中进行了大量细致的筛选,并且在机制研究方面取得了较有意义的进展。因此,亟需标准化测定方法及统一设计和测试的大型研究来对上述研究结论进行进一步确认。

参考文献:

- [1] Allen RH,Stabler SP,Lindenbaum J. Serum betaine,N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism [J]. *Metabolism*,1993,42(11):1448-1460.
- [2] Sreekumar A,Poisson LM,Rajeniran TM,et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression [J]. *Nature*,2009,457 (7231): 910-914.
- [3] Couzin J. A urine test for prostate cancer? [J/OL]. *Science now*. <http://news.sciencemag.org/sciencenow/2009/02/11-01.html>,2009-02-11.
- [4] Lucarelli G,Larocca A,Fanelli M,et al. Serum sarcosine increases the accuracy of prostate cancer detection in low range PSA [J]. *Eur Urol (Suppl)*, 2011,10(2):205,s633.
- [5] 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 tumours [J]. *Eur Urol*,2010,58(1):12-18.
- [6] Struys EA,Heijboer AC,van Moorselaar J,et al. Serum sarcosine is not a marker for prostate cancer [J]. *Ann Clin Biochem*,2010,47(Pt 3):282.
- [7] Abate-Shen C,Shen MM. Diagnostics: the prostate-cancer metabolome [J]. *Nature*,2009,457(7231): 799-800.
- [8] Couzin J. Metabolite in urine may point to high-risk prostate cancer [J]. *Science*,2009,323(5916): 865.
- [9] Schalken JA. Is urinary sarcosine useful to identify patients with significant prostate cancer? The trials and tribulations of biomarker development [J]. *Eur Urol*, 2010,58(1):19-20.
- [10] Colleselli D,Stenzl A,Schwentner C. Re:Florian Jentzmik, Carsten Stephan,Kurt Miller,et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours [J]. *Eur Urol*,2010,58(5):e51.
- [11] Stephan C,Jentzmik F,Jung K. Reply from authors re: Jack A Schalken. Is urinary sarcosine useful to identify patients with significant prostate cancer? The trials and tribulations of biomarker development [J]. *Eur Urol*, 2010,58(1):20-21.
- [12] Sreekumar A,Poisson LM,Rajeniran TM,et al. Re: Florian Jentzmik,Carsten Stephan,Kurt Miller,et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours[J]. *Eur Urol*,2010,58 (3): e29-e30.
- [13] Jentzmik F,Stephan C,Jung K. Reply to Arun Sreekumar, Laila M Poisson,Thekkelnaycke M Rajendiran,et al.'s letter to the editor re:Florian Jentzmik,Carsten Stephan, Kurt Miller,et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours [J]. *Eur Urol*, 2010,58 (3): e31-e32.
- [14] Hewavitharana AK. Re:Florian Jentzmik,Carsten Stephan, Kurt Miller,et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours [J]. *Eur Urol*, 2010,58(4):e39-e40.
- [15] Jentzmik F,Stephan C,Jung K. Reply to Amitha K Hewavitharana's letter to the editor re: Florian Jentzmik, Carsten Stephan,Kurt Miller,et al. Sarcosine in urine after digital examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours [J]. *Eur Urol*, 2010,58(4): e41-e42.
- [16] Barry MJ. Screening for prostate cancer: the controversy that refuses to die [J]. *N Engl J Med*,2009,360(13):1351-1354.
- [17] Tomlins SA,Mehra R,Rhodes DR,et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression [J]. *Nat Genet*,2007,39(1):41-51.