

DMBT1 在乳腺癌组织中的表达及临床意义

王瑞海¹, 崔大为², 翟宏芳³

(1. 唐山市开平区医院, 河北 唐山 063000; 2. 唐山市工人医院, 河北 唐山 063000; 3. 唐山市人民医院, 河北 唐山 063000)

摘要: [目的] 探讨脑恶性肿瘤缺失基因 1 (DMBT1) 在乳腺癌组织中的表达及意义。[方法] 采用免疫组织化学方法检测 73 例乳腺癌组织及距其癌组织边缘 2cm 以上镜下未见癌浸润的正常组织中 DMBT1 蛋白的表达情况。[结果] 免疫组织化学结果表明, DMBT1 蛋白在乳腺癌组织及正常乳腺组织中的表达阳性率分别为 35.6%、70.9%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。DMBT1 蛋白表达与 T 分期、分化程度、淋巴结转移以及临床分期有关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析提示, DMBT1 表达阳性的乳腺癌患者 5 年总生存率明显高于表达阴性者, 两者比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] 乳腺癌组织中 DMBT1 蛋白表达降低, 且与乳腺癌 T 分期、分化程度、淋巴结转移、临床分期及患者预后有关。

关键词: DMBT1; 乳腺肿瘤; 预后; 肿瘤转移

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)02-0102-04

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2014.02.B005

Expression of DMBT1 in Breast Cancer Tissue and Its Clinical Significance

WANG Rui-hai¹, CUI Da-wei², ZHAI Hong-fang³

(1. Kaiping Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China; 2. Tangshan Works Hospital, Tangshan 063000, China; 3. Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of deleted in malignant brain tumor 1 (DMBT1) in breast carcinoma tissues and its significance. [Methods] Immunohistochemistry was used to detect DMBT1 protein expression in 73 cases of breast cancer tissues and 31 cases of normal tissues. [Results] The level of DMBT1 protein expression was significantly lower in breast cancer tissues than that in normal tissues ($P < 0.05$). The level of DMBT1 protein expression correlated to T stage, lymph node metastasis, clinic stage and histological grade ($P < 0.05$). Loss of DMBT1 expression correlated significantly to poor overall survival by Kaplan-Meier analysis. [Conclusion] DMBT1 expression decreases in breast cancer tissues and correlates to T stage, lymph node metastasis, clinic stage, histological grade and overall survival, suggesting that DMBT1 may play an important role in breast cancer.

Subject words: DMBT1; breast neoplasms; prognosis; metastasis

乳腺癌是女性比较常见的恶性肿瘤之一, 分子生物学的飞速发展不但逐渐了解了该病的本质, 而且推动了乳腺癌治疗的进步。因此进一步分析乳腺癌的生物学特性, 探索其治疗的新途径一直是临床关注的问题。近年研究发现脑恶性肿瘤缺失基因 1 (deleted in malignant brain tumor 1, DMBT1) 在某些肿瘤中表现出的生物学和遗传学特征具有肿瘤抑癌基因的特性, 由此推测 DMBT1 在乳腺癌的形成和

发展中具有重要作用^[1]。我们采用免疫组织化学方法研究 DMBT1 在乳腺癌中的表达情况, 并探讨其表达变化与乳腺癌临床病理参数及预后的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2008 年 1 月至 2012 年 12 月于唐山市开平区医院、唐山市工人医院手术切除的 73 例新鲜乳腺癌标本, 其中 31 例于肿瘤组织及距肿瘤边缘 2cm 以上(镜下未见癌)的正常乳腺组织处取材。所有肿瘤

通讯作者: 王瑞海, 副主任医师, 学士; 唐山市开平区医院外科, 河北省唐山市开平区开平镇东西大街 27 号 (063000); E-mail: wangruihai2013@126.com

收稿日期: 2013-09-10; **修回日期:** 2013-10-21

组织均经病理学证实,包括浸润性导管癌、髓样癌、导管内癌和浸润性小叶癌。患者全部为女性,年龄18~76岁,中位年龄54岁。其中T₁、T₂者31例,T₃、T₄者42例;高分化者26例,中低分化者47例;淋巴结转移中N₀者32例,N₊者41例;临床分期I+II期33例,III+IV期40例。所有患者术前均未经放、化疗,标本均为术后立即取材,于液氮中保存,供免疫组织化学检测。

1.2 主要试剂

DMBT1 兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz 公司),免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.3 免疫组织化学

将4μm石蜡切片脱蜡至水,3%过氧化氢10min阻断内源性过氧化物酶,胰酶修复20min,10%山羊血清室温封闭20min,DMBT1抗体(1:200)湿盒中4℃冰箱过夜,滴加二抗、三抗室温湿盒内各孵育20min,DAB显色,苏木精复染,常规脱水、封片。结果判定:由两名病理科医生在未知患者临床资料的情况下采用双盲法进行计数。细胞计数在显微镜(×200)下,每张切片上随机选择5个视野,每个标本计数3张切片。DMBT1表达以细胞阳性百分率及细胞染色强度得分之和进行判定。细胞阳性百分率分为4个等级:≤5%计0分,5%~25%计1分,25%~50%计2分,>50%计3分;细胞染色强度分数标准:无染色记0分,弱染色(浅黄色)计1分,中等染色(棕黄色)计2分,强染色(黄褐色)计3分。两项标准

相加:0分为阴性(-),1~2分为弱阳性(+),3~4分为中等阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。以PBS替代一抗作为阴性对照。

1.4 统计学处理

本实验结果均应用SPSS16.0统计软件处理数据。组间比较采用 χ^2 检验,单因素生存分析采用Kaplan-Meier分析。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DMBT1在乳腺癌组织中的表达

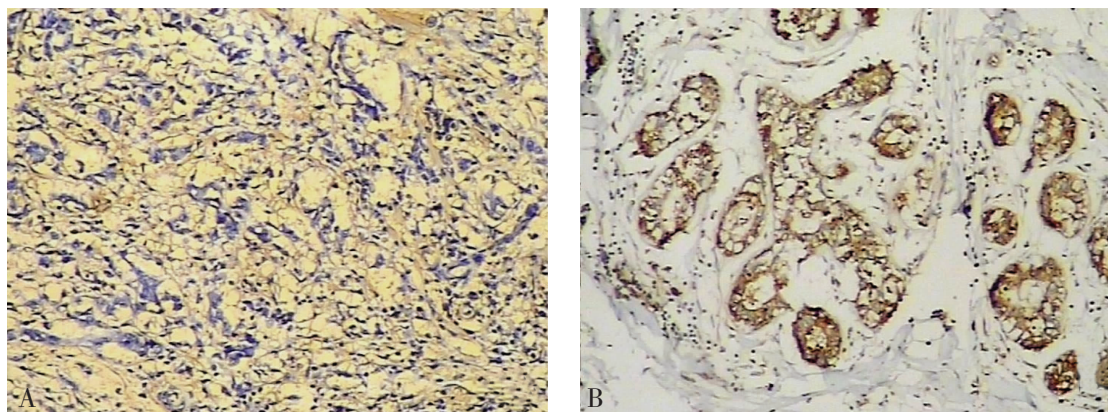
免疫组织化学结果显示DMBT1阳性表达表现主要为胞浆胞核染成浅黄色、棕黄色或黄褐色。DMBT1在乳腺癌组织、正常乳腺组织的阳性表达率分别为35.6%(26/73)及70.9%(22/31),两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)(Table 1, Figure 1)。

Table 1 Expression of DMBT1 in breast cancer tissues and normal tissues

Groups	N	Expression of DMBT1 protein				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Normal tissues	31	9	6	8	8	9.209	0.027
Cancer tissues	73	47	10	9	7		

2.2 DMBT1与临床病理参数的关系

临床因素分析表明,DMBT1蛋白在乳腺癌不同T分期、分化程度、有无淋巴结转移、临床分期中的表达差异具有统计学意义($P<0.05$);而与ER、PR及



A:breast cancer tissues;B:normal tissues

Figure 1 Expression of DMBT1 in breast cancer tissues and normal tissues(×100)

Her-2 是否阳性表达无关($P>0.05$)(Table 2)。

Table 2 Relationship between DMBT1 expression and clinical characteristics in breast cancer tissues

Factors	N	Expression of DMBT1 protein		χ^2	P
		-	+~+++		
ER					
-	26	17	9	0.018	0.894
+	47	30	17		
PR					
-	31	19	12	0.225	0.635
+	42	28	14		
Her-2					
-	29	19	10	0.027	0.870
+	44	28	16		
T stage					
T ₁ +T ₂	31	14	17	8.682	0.003
T ₃ +T ₄	42	33	9		
Clinic stage					
I~II	33	17	16	4.349	0.037
III~IV	40	30	10		
Histological grade					
I	26	11	15	8.582	0.003
II~III	47	36	11		
Lymph node metastasis					
N ₀	32	13	19	14.025	0.000
N ₊	41	34	7		

2.3 生存分析

对 73 例随访资料齐全的病例进行生存分析,随访截止于 2012 年 12 月,其中存活 35 例,死亡 38 例。DMBT1 阳性表达组共 26 例,其中 17 例存活,9 例死亡,5 年总生存率为 69.0%;DMBT1 阴性表达组共 47 例,其中 18 例存活,29 例死亡,5 年生存率为 39.0%,两者比较差异具有统计学意义($P<0.05$)(Figure 2)。

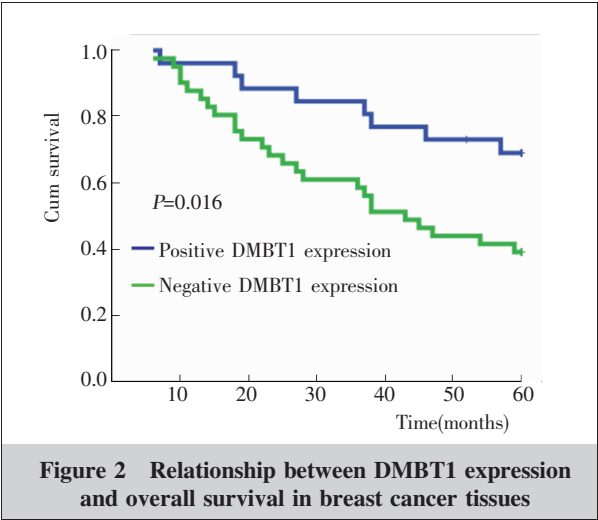


Figure 2 Relationship between DMBT1 expression and overall survival in breast cancer tissues

3 讨论

肿瘤的发生与转移是癌基因与抑癌基因参与调节的复杂过程,通过肿瘤发生与转移相关基因的过度表达,以及一系列基因产物的参与,对肿瘤发生与转移全过程进行调控^[2]。*DMBT1* 位于人类染色体 10q26.13,为近年来新发现的一种候选抑癌基因,其表达下调、缺失、突变失活与多种肿瘤,特别是与上皮细胞肿瘤的发生发展密切相关,且与淋巴结转移、肿瘤浸润深度存在明显的相关性^[3]。目前研究发现,*DMBT1* 在食管癌^[4]、胃癌^[4]、结直肠癌^[4]、膀胱癌^[5]、非小细胞肺癌^[6]等肿瘤组织表达水平与相应正常组织相比明显下调,提示 *DMBT1* 基因可能是一个重要的抑癌基因并且参与肿瘤的发生、发展。但是目前在乳腺癌中 *DMBT1* 的研究仍然鲜有报道。研究 *DMBT1* 在乳腺癌中的表达情况,并深入探讨 *DMBT1* 参与乳腺癌发生发展、增殖恶变的分子生物学机制,有助于进一步全面明确乳腺癌的恶性生物学行为及机理,并且有望为乳腺癌的临床治疗和预后判断提供新的分子指标。

本研究首次用免疫组织化学技术对乳腺癌组织及正常乳腺组织进行定位及定量检测,结果显示 *DMBT1* 蛋白在乳腺癌组织中的表达水平均显著低于正常乳腺组织,取得了一致结果。同时,本组结果的单因素分析也显示,*DMBT1* 蛋白的表达水平与乳腺癌组织有无淋巴结转移、临床分期及分化程度有关。该结果提示,*DMBT1* 的缺失是乳腺癌发生发展的主要促使因素之一,去分化是肿瘤细胞的重要生物学特性之一,本研究显示,乳腺癌中 *DMBT1* 与组织分化呈负相关,分化越低,表达越少。王越英等^[7] 研究报道,在食管癌、贲门癌、胃癌组织中,*DMBT1* mRNA 阳性表达缺失率均明显升高;其中伴有淋巴结转移的癌组织 *DMBT1* mRNA 表达缺失率均显著高于相应淋巴结无转移的癌组织;肿瘤外侵越严重,*DMBT1* mRNA 表达缺失率越高,提示 *DMBT1* 基因在上消化道癌的发生、发展及转移中起一定作用。周爱莲等^[8] 发现,原发性肺癌 *DMBT1* 基因明显缺失,而其自身癌旁正常肺组织均无 *DMBT1* 基因的缺失,低、未分化肺癌组 *DMBT1* 基因缺失率明显高于中、高分化肺癌组,伴有淋巴结转移和/或远处转移组高于不伴转移组;这说明 *DMBT1* 基因与肺癌的

临床病理特征有密切关系,其可能参与调控原发性肺癌的细胞分化和转移过程,但作用机制尚不清楚。Mollenhauer 等^[9]研究认为,DMBT1 可能在人体某些部位的发育过程中起作用,由于肿瘤形成直接来源于细胞生长的紊乱,因此 DMBT1 可能通过促进细胞的分化来抑制肿瘤的发生、发展。判断乳腺癌患者的预后是临床工作中极其重要的部分,目前研究普遍显示肿瘤分期是判断患者预后的首选指标。然而,即使处于同一分期的肿瘤患者,其预后依然存在较大的差异^[10]。因此,发现新的分子生物学标志物尤为重要。本研究进一步生存分析发现,DMBT1 表达阳性患者 5 年总生存率明显高于表达阴性患者。因此,结合 TNM 分类系统,DMBT1 的表达评分可能为临床医生选择治疗方法、判断预后或预测疾病严重程度方面提供一些有价值的信息。

本研究结果提示,乳腺癌组织中 DMBT1 蛋白的表达明显降低,且与乳腺癌淋巴结转移、临床分期及细胞分化有关,提示 DMBT1 基因可能是与肿瘤发生、转移相关的肿瘤抑制基因。虽然其抑制肿瘤发生与转移的机制并不清楚,但是为研究肿瘤发生与转移的分子机制提供了新的线索,同时为肿瘤的早期诊断、早期治疗及预后判断提供了靶基因。

参考文献:

- [1] Deng H, Gao YB, Wang HF, et al. Expression of deleted in malignant brain tumours 1 (DMBT1) relates to the proliferation and malignant transformation of hepatic progenitor cells in hepatitis B virus-related liver diseases [J]. Histopathology, 2012, 60(2): 249–260.
- [2] Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(4): 411–429.
- [3] Du J, Guan M, Fan J, et al. Loss of DMBT1 expression in human prostate cancer and its correlation with clinical progressive features[J]. Urology, 2011, 77(2): 509.e9–e13.
- [4] Mori M, Shiraishi T, Tanaka S, et al. Lack of DMBT1 expression in oesophageal, gastric and colon cancers[J]. Br J Cancer, 1999, 79(2): 211–213.
- [5] Dodurga Y, Avci CB, Yilmaz S, et al. Evaluation of deleted in malignant brain tumors 1 (DMBT1) gene expression in bladder carcinoma cases: preliminary study[J]. Biomarkers, 2011, 16(7): 610–615.
- [6] Takeshita H, Sato M, Shiwa H, et al. Expression of the DMBT1 gene is frequently suppressed in human lung cancer[J]. Jpn J Cancer Res, 1999, 90(9): 903–908.
- [7] Wang YY, Tang HJ, Shao K, et al. mRNA expression of DMBT1 in carcinoma of upper digestive tract and its significance[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2002, 19(6): 514–515. [王越英, 唐槐静, 邵康, 等. DMBT1 基因在上消化道癌组织中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(6): 514–515.]
- [8] Zhou AL, Wen HY, He JQ, et al. Homozygous deletions of DMBT1 gene in primary lung tumors [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2003, 30(3): 184–186. [周爱莲, 文海云, 何建猷, 等. DMBT1 基因纯合性缺失与原发性肺癌临床病理特征的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(3): 184–186.]
- [9] Mollenhauer J, Herbertz S, Helmke B, et al. Deleted in Malignant brain tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8880–8886.
- [10] Ridnour LA, Cheng RY, Switzer CH, et al. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment: poor prognosis or new therapeutic opportunity[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6): 1340–1346.