

DMBT1 在肾癌组织中的表达及其临床意义

王瑞海¹, 崔大为², 孙国贵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) 在肾癌组织中的表达及其意义。[方法] 采用免疫组织化学方法检测 47 例肾癌组织及距其癌组织边缘 2cm 以上的镜下未见癌浸润的正常组织中 DMBT1 蛋白表达情况。[结果] 免疫组织化学结果表明, DMBT1 蛋白在肾癌组织及正常肾脏组织中的表达阳性率分别为 31.9%、76.6%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。DMBT1 蛋白表达与肾癌患者性别、年龄、肿瘤大小无关 ($P > 0.05$); 而与细胞分化程度、淋巴结转移以及肿瘤临床分期有关 ($P < 0.05$)。Kaplan-Meier 生存分析提示, DMBT1 表达阳性的肾癌患者 5 年总生存率明显高于表达阴性者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] 肾癌组织中 DMBT1 蛋白表达降低, 且与肾癌细胞分化程度、淋巴结转移、临床分期及患者预后有关。

关键词: DMBT1; 肾肿瘤; 预后; 肿瘤转移

中图分类号: R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)08-0664-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.08.B011

Expression of DMBT1 in Kidney Cancer Tissues and Its Significance

WANG Rui-hai¹, CUI Da-wei², SUN Guo-gui³

(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 kidney carcinoma tissues and its clinical significance. [Methods] Immunohistochemistry was used to detect DMBT1 protein expression of kidney cancer tissues and cancer adjacent tissues in 47 cases with kidney cancer. [Results] The level of DMBT1 protein expression was significantly lower in kidney cancer tissues (31.9%) than that in cancer adjacent tissues (76.6%) ($P < 0.05$). The level of DMBT1 protein expression did not correlate to gender, age and tumor size ($P > 0.05$), but correlated to lymph node metastasis, clinic stage and histological grade ($P < 0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that loss of DMBT1 expression correlated significantly to poor overall survival. [Conclusion] DMBT1 expression decreases in kidney cancer tissue and correlates significantly to lymph node metastasis, clinic stage, histological grade and overall survival.

Subject words: DMBT1; kidney neoplasms; prognosis; tumor metastasis

肾癌是泌尿系统比较常见的恶性肿瘤之一, 目前其主要治疗手段为手术治疗, 而生物学治疗手段亟需提高。因此分析肾癌的生物学特性, 探索其治疗的新途径成为临床关注的问题。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

在肿瘤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 在肾癌组织中的表达情况, 并探讨其表达变化与肾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

2005 年 1 月至 2008 年 12 月于唐山市开平区医院、唐山市工人医院手术切除的 47 例新鲜肾癌标

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: 2013-12-17; **修回日期:** 2014-01-16

本,分别于肿瘤组织及距肿瘤边缘 2cm 以上(镜下未见癌)的正常肾脏组织处取材。其中女性 19 例,男性 28 例;年龄 21~74 岁,中位年龄 66 岁。其中≤65 岁者 33 例,>65 岁者 14 例;肿瘤直径≤7cm 者 20 例,>7cm 者 27 例;高分化者 17 例,中低分化者 30 例;淋巴结转移中 N₀ 者 22 例,N⁺者 25 例;临床分期 I+II 期 18 例,III+IV 期 29 例。所有患者术前均未行放、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、Western blot 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、三抗室温湿盒内孵育各 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。

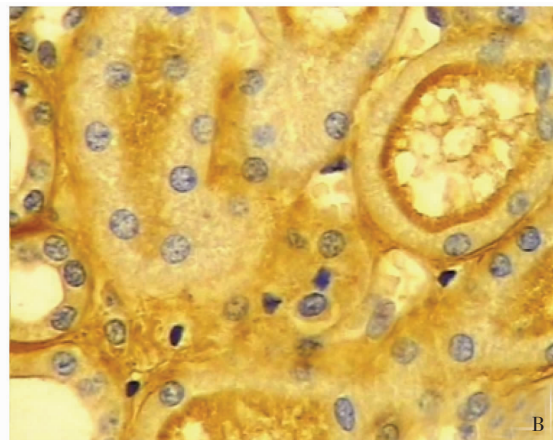
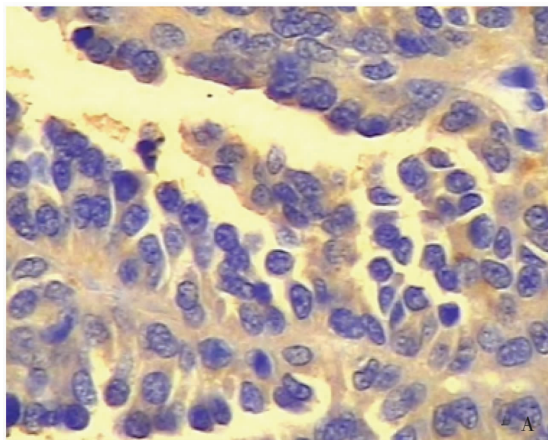
2 结 果

2.1 DMBT1 在肾癌组织中的表达

免疫组织化学结果显示,DMBT1 主要位于细胞浆,DMBT1 阳性表达主要表现为胞浆或胞核染成浅黄色、棕黄色或黄褐色。DMBT1 在肾癌组织、正常肾脏组织的阳性表达率分别为 31.9%(15/47)及 76.6%(36/47),两组之间差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (Table 1, Figure 1)。

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

Groups	N	Expression of DMBT1 Protein				χ^2	P
		-	+	++	+++		
Cancer tissues	47	32	7	5	3	21.179	0.000
Normal tissues	47	11	9	13	14		



A: kidney cancer tissues; B: normal tissues

Figure 1 Expression of DMBT1 in kidney cancer tissues and normal tissues(×400)

2.2 DMBT1 与临床病理参数的关系

临床因素分析表明,DMBT1 蛋白表达与肾癌患者性别、年龄、肿瘤大小无关($P>0.05$);而在不同肿瘤分化、是否淋巴结转移以及不同肿瘤临床分期中的表达差异具有统计学意义 ($P<0.05$)(Table 2)。

2.3 生存分析

对 47 例随访资料齐全的病例进行生存分析,所有病例随访截止于 2012 年 12 月,随访时间 60 个月,其中存活 17 例,死亡 30 例,绘制生存曲线。DMBT1 阳性表达组共 15 例,其中 9 例存活,6 例死亡,其 5 年生存率为 63.6%,DMBT1 阴性表达组共 32 例,其中 8 例存活,24 例死亡,其 5 年生存率为 27.2%。DMBT1 高表达组病例的 5 年生存率明显高于 DMBT1 阴性表达组,两者比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)(Figure 2)。

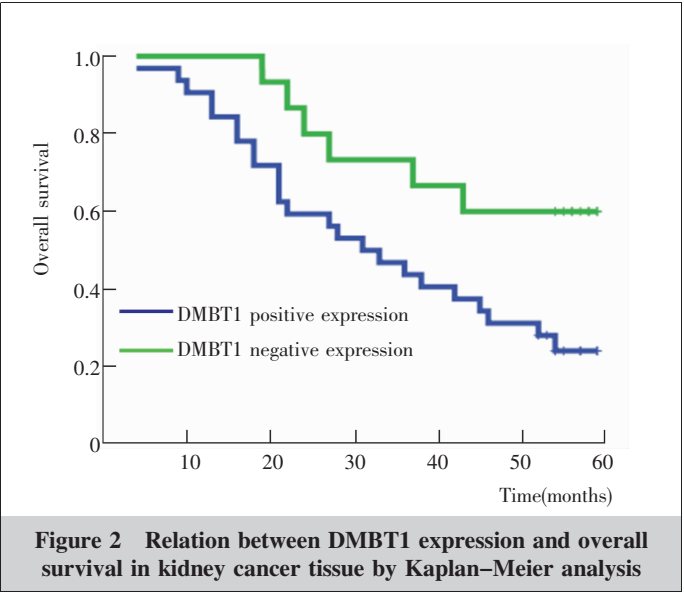
3 讨 论

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个候选抑癌基因,它的表达下调、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。但是目前在肾癌中 DMBT1 的研究仍然鲜有报道。研究 DMBT1 在肾癌中的表达情况,并深入探讨 DMBT1 参与肾癌发生发展、增殖恶变的分子生物学机制,有助于进一步全面明确肾癌的恶性生物学行为及机理,并且有望为肾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肾癌组织及正常肾脏组织进行定位及定量检测,结果显示

Table 2 Relation between DMBT1 expression and clinical characteristics in kidney cancer tissues

Factors	N	Expression of DMBT1 Protein		χ^2	P
		-	+~+++		
Gender					
Male	28	18	10	0.460	0.498
Female	19	14	5		
Age (years)					
≤65	33	22	11	0.103	0.749
>65	14	10	4		
Tumor length (cm)					
≤7	20	13	7	0.152	0.696
>7	27	19	8		
Clinic stage					
I~II	18	9	9	4.391	0.036
III~IV	29	23	6		
Histological grade					
I	17	8	9	5.419	0.020
II~III	30	24	6		
Lymph node metastasis					
N ₀	22	11	11	6.226	0.013
N ⁺	25	21	4		



DMBT1 蛋白在肾癌组织中的表达水平均显著低于正常肾脏组织,取得了一致结果。同时,本组结果的单因素分析也显示,DMBT1 蛋白的表达水平与肾癌组织淋巴结转移、临床分期及分化程度有关,而与肾癌患者性别、年龄、肿瘤大小无关。该结果提示,DMBT1 的缺失是肾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,肾癌中 *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。判断肾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* 表达阳性患者的 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提供一些有价值的信息。

本研究结果提示,肾癌组织中 *DMBT1* 蛋白的表达明显降低,且与肾癌淋巴结转移、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^[11]。

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.
- [11] Wang S, Wang Z. Epigenetic aberrant methylation of tumor suppressor genes in small cell lung cancer [J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(4): 532–537.