

• 临床检验研究论著 •

DMBT1 基因纯合性缺失与乳腺癌病理特征的关系*

李 军¹, 曹爱国²

(1. 山东省济宁市第一人民医院, 山东济宁 272111; 2. 山东省济宁市中医院, 山东济宁 272137)

摘 要:目的 探讨 DMBT1 基因纯合性缺失与乳腺癌临床病理特征的关系。方法 采用聚合酶链反应检测乳腺癌 DMBT1 基因纯合性缺失, 分析其与乳腺癌临床病理特征的关系。结果 60 例乳腺癌组织标本中 27 例有 DMBT1 基因纯合性缺失, 缺失率为 45%。浸润性乳腺癌患者的 DMBT1 基因纯合性缺失率高于非浸润性乳腺癌患者, 伴有淋巴和(或)远处转移的患者 DMBT1 基因纯合性缺失率高于不伴转移的患者, I 期患者低于 II~III 期患者, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 DMBT1 基因与乳腺癌的临床病理特征有密切关系, 提示 DMBT1 的纯合性缺失可能与乳腺癌的病例特征、转移及转化有关, 同时对于乳腺癌的诊断、治疗和预后具有重要的临床意义。

关键词:乳腺癌; DMBT1 基因; 纯合性缺失; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.012 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)12-1550-03

Relationship between homozygous deletions of DMBT1 gene and pathology characteristics of breast cancer*

Li Jun¹, Cao Aiguo²

(1. Shandong Jining No. 1 People's Hospital, Jining, Shandong 272111, China;
2. Chinese Medicine Hospital of Jining City, Jining, Shandong 272137, China)

Abstract: **Objective** To study the relationship between homozygous deletions of DMBT1 gene and clinicopathology characteristics of breast cancer. **Methods** Homozygous deletions of DMBT1 gene were detected by polymerase chain reaction in 60 patients with breast tumors. **Results** Among the 60 patients, 27 cases were found with intragenic homozygous deletions of DMBT1, and the ratio of homozygous deletions was 45%. The ratio of intragenic homozygous deletions of DMBT1 in patients with invasive breast cancer was significantly higher than patients with noninvasive breast cancer ($P<0.05$). The deletions occurred significantly more often in patients with lymphoid or/and metastasis ($P<0.05$). Deletions rate in patients at I stage were significantly lower than patients at II-III stage ($P<0.05$). **Conclusion** DMBT1 gene could be closely correlated with clinicopathology characteristics of breast cancer. Homozygous deletions of the DMBT1 gene might be associated with clinicopathology characteristics, metastasis and transformation of breast cancer, which could be with important clinical significance for diagnosis, treatment and prognosis judgment of breast cancer.

Key words: breast cancer; DMBT1 gene; homozygous deletions; PCR

乳腺癌是妇女常见的恶性肿瘤, 其发病率一直居高不下^[1]。近年来有关乳腺癌的发病机制在基因水平上研究得较多, DMBT1 基因是其中之一, 它的突变失活被认为与多种肿瘤的发生和发展密切相关, 国内外研究者已对肺癌、消化系统肿瘤、子宫内膜癌等与 DMBT1 之间的关系做了一些研究^[2-3], 国内尚未见该基因纯合性缺失与乳腺癌临床病理关系的报道。本研究应用 PCR 法检测了 60 例乳腺癌组织中 DMBT1 基因纯合性缺失的情况, 并探讨了 DMBT1 基因突变与乳腺癌发生、发展和转移的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 乳腺癌组织标本来源于本院 2013 年 3~9 月乳甲外科行手术切除并经病理检查确诊为乳腺癌的患者, 病理组织学分类及组织学分级采用 2003 年 WHO 乳腺肿瘤组织学分类标准^[4]。标本分别取自乳腺癌组织及其自身远离癌灶(>5 cm) 的正常乳腺组织, 所有标本均在术后 1~2 h 内获得, 并置于-70℃冰箱保存。伴有淋巴结和(或)远处转移者 44 例, 无转移者 16 例, 其中浸润性非特殊癌 49 例, 浸润性特殊癌 10 例, 非浸润性癌 1 例。

1.2 主要试剂 酚、氯仿和乙醇均为国产分析纯; Taq DNA

聚合酶、dNTP 和 DNA 标记物购于大连 TaKaRa 生物工程公司, 实验试剂均用无菌去离子三蒸水配制。

1.3 引物设计 引物设计参照文献[5-7], 均由上海生物工程公司合成, 包括 DMBT1 基因上 3 个特定序列片段(STS)引物和 β -肌动蛋白(β -actin)所需引物及片段长度, 见表 1。

表 1 PCR 扩增的核苷酸引物

引物	引物序列(5'~3')	扩增片段长度(bp)
β -actin	R:CTC ACA TCG TGC CCA TCT AT	415
	F:GAT CCT TGC GAA TAT CCA CA	
STS36 K	R:CTG CTA ACG TAG CCA AAT TGC	243
	F:CAT GGG AAA TGG GAA GTG AC	
STS g14	R:GGT TGA CAC AAA ACC AAC CC	230
	F:TGA GTG CCT GAC TGC AAT TC	
STS101 n	R:GGA GGG TCA GGA AAG AGA GG	311
	F:ACC TCA CCG CCA TCC TTA G	

* 基金项目:济宁市科技局基金资助项目(2012jnjc14)。 作者简介:李军,男,主管技师,主要从事临床生物化学与分子生物学研究。

1.4 方法

1.4.1 DNA 的提取 常规酚/氯仿提取乳腺癌组织 DNA,取 DNA 溶液,在 260 nm 和 280 nm 下检测光密度值,两者比值在 1.6~2.0 之间视为合格。

1.4.2 PCR 扩增 反应体系:模板 DNA(约 10 ng/ μ L) 1.5 μ L、10 $\times$ Buffer(含 MgCl₂)1.5 μ L、引物(2 pmol/ μ L)1.2 μ L、dNTP(2.5 mmol/L)0.6 μ L、Taq DNA 酶(5 U/ μ L)0.4 μ L、ddH₂O 10.3 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 开始变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 33 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

1.4.3 PCR 产物分析 取来自不同的 PCR 扩增产物,用含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并摄像。

1.4.4 结果判定 如果某位点存在纯合性缺失,则应没有相应的电泳带出现。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

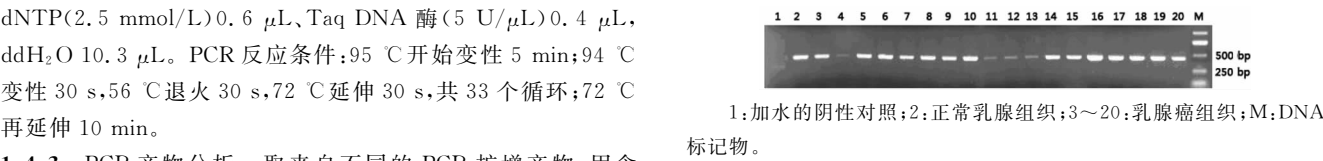


图 1 β -actin PCR 产物凝胶电泳图

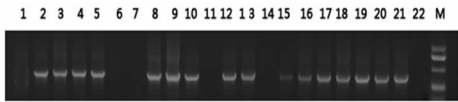


图 2 STS36 KPCR 产物凝胶电泳图

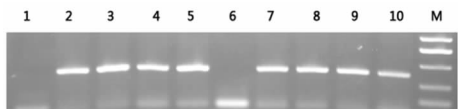


图 3 STS101n PCR 产物凝胶电泳图

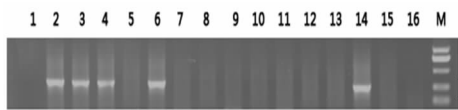


图 4 STS g14 PCR 产物凝胶电泳图

2 结 果

2.1 原发性乳腺癌患者年龄及肿瘤大小比较,差异不存在统计学意义($P>0.05$)。DMBT1 基因 3 位点(STSg14、STS36k 及 101n)发生纯合性缺失的分别有 18、12、12 例,纯合性缺失率分别为 30%、20%、20%,三者之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 乳腺癌中 DMBT1 基因纯合性缺失与临床病理因素的关系				
临床资料	<i>n</i>	DMBT1 纯合性缺失		<i>P</i>
		有缺失	无缺失	
年龄(岁)	60	56 $\pm$ 9	59 $\pm$ 8	>0.05
肿瘤大小(cm, $\bar{x}\pm s$)	60	2.98 $\pm$ 1.76	3.54 $\pm$ 1.38	>0.05
基因位点				>0.05
STS36k	60	12	48	
STS101n	60	12	48	
STSg14	60	18	42	
组织学类型				<0.05
浸润性非特殊癌	49	26	23	
浸润性特殊癌	10	1	9	
非浸润性癌	1	0	1	
组织学分级				<0.05
I 级	11	2	9	
II~III 级	49	25	24	
淋巴结转移				<0.05
有转移	44	24	20	
无转移	16	3	13	

2.2 乳腺癌 DMBT1 基因纯合性缺失率在所有 60 例原发性乳腺癌中,3 个位点 STSg14、STS36k 及 101n 均检测到纯合性缺失,见图 1~4。在 49 例浸润性非特殊乳腺癌、10 例浸润性特殊癌中分别检测出 26 例及 1 例存在纯合性缺失,纯合性缺失率分别为 53.1%、11.1%;非浸润性乳腺癌 1 例,未检测出相关基因纯合性缺失。3 种类型的乳腺癌的纯合性缺失率存

在差异,且具有统计学意义($P<0.05$);在伴有淋巴结和(或)远处转移组 DMBT1 基因纯合性缺失率(54.5%,24/44)明显高于不伴转移组(18.8%,3/16),差异有统计学意义($P<0.05$);组织学分级中 I 级组 DMBT1 基因纯合性缺失率(18.2%,2/11)明显低于 II~III 级组(51.0%,25/49),差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

本研究通过对 DMBT1 基因 3 个位点进行 PCR 基因扩增,结果显示 3 个位点都存在纯合性缺失,在 60 例乳腺癌患者中所占的比例分别为 30%、20%、20%,三者之间差异无统计学意义($P>0.05$)。Somerville 等^[8]在研究多形性胶质母细胞瘤时,采用 PCR 扩增技术对 g14、g14extf、36k、60k、74k 和 101n 这 5 个 DMBT1 基因位点进行扩增,发现除 101n 没有相应条带外,其他基因位点都出现了相应的阳性条带,纯合性缺失率为 38%,本研究中,3 个位点基因都出现了阳性条带,DMBT1 纯合性缺失率为 45%(27/60)。其中 6 例乳腺癌患者存在 2 种或 3 种位点的 DMBT1 基因纯合性缺失,再次印证了乳腺癌的发生与基因纯合性缺失是密切相关的。

结合乳腺癌的临床病理及相关数据进一步分析显示,浸润性乳腺癌的 DMBT1 基因纯合性缺失率明显高于非浸润性乳腺癌($P<0.05$),I 期乳腺癌 DMBT1 基因纯合性缺失率明显低于 II~III 期乳腺癌组,伴有淋巴结转移组 DMBT1 基因纯合性缺失率明显高于非转移组($P<0.05$)。DMBT1 基因纯合性缺失与乳腺癌的细胞分化、分期及转移有密切关系,DMBT1 基因是与乳腺癌密切相关的抑癌基因。DMBT1 基因纯合性缺失是女性乳腺癌发生的重要原因,DMBT1 基因的具体功能和发挥作用机制有待于进一步研究。(下转第 1554 页)

B 细胞经治疗后也下降,降低的 CD19⁺CD5⁻CD1d⁻ B 细胞和 CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞经治疗后均升高。通过检测治疗过程中 B 细胞及其亚群的变化,发现抗结核治疗 3 个月和治疗 6 个月时是机体免疫反应最活跃的时期,各 B 细胞亚群的百分比变化最大,治疗 9 个月时机体的免疫状态逐渐趋于稳定,说明有效的抗结核治疗不仅可以清除结核菌还可以改变机体的免疫紊乱状态。

本研究中所关注的 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞被认为是一种具有免疫调节功能的 B 细胞,通过分泌 IL-10 发挥免疫抑制功能^[11],本课题组前期研究发现结核患者外周血的 CD19⁺CD5⁺CD1d⁺ B 细胞可抑制 CD4 细胞分泌 IL-17 和 IL-22,但不影响 CD4 细胞分泌干扰素 (IFN)- γ ,其作用机制是通过分泌 IL-10 和细胞间接触抑制^[12],而 CD19⁺CD5⁻CD1d⁺、CD19⁺CD5⁻CD1d⁻、CD19⁺CD5⁺CD1d⁻ B 细胞并无抑制 CD4 细胞的作用,其具体机制还有待进一步阐明。

综上所述,本研究通过对 TB 患者外周血的 B 细胞及其亚群的研究,发现 B 细胞及其亚群在结核病的发生和发展中起到重要作用,了解抗结核治疗过程中 B 细胞各亚群百分比的变化可以作为疗效考核的参考指标。

参考文献

[1] Ulrichs T, Kosmiadi GA, Jorg S, et al. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma[J]. J Infect Dis, 2005, 192(1): 89-97.

[2] Zhang M, Wang Z, Graner MW, et al. B cell infiltration is associated with the increased IL-17 and IL-22 expression in the lungs of patients with tuberculosis[J]. Cell Immunol, 2011, 270(2): 217-223.

[3] Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, et al. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10(B10 cells) requires

antigen receptor diversity and TLR signals[J]. J Immunol, 2009, 182(12): 7459-7472.

[4] Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic[J]. Cytochemistry B Clin Cytom, 2010, 78 Suppl 1: S47-60.

[5] Noh J, Choi WS, Noh G, et al. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B cells in human peripheral blood mononuclear cells: human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) regulatory B cell (Breg)[J]. Immune Netw, 2010, 10(6): 247-249.

[6] Bao W, Zhong H, Manwani D, et al. Regulatory B-cell compartment in transfused alloimmunized and non-alloimmunized patients with sickle cell disease[J]. Am J Hematol, 2013, 88(9): 736-740.

[7] 张影, 陆坚, 邱振纲, 等. 结核病患者外周血 B 细胞及其亚群的检测[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(6): 1053-1055.

[8] Maglione PJ, Xu J, Chan J, et al. B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with Mycobacterium tuberculosis[J]. J Immunol, 2007, 178(11): 7222-7234.

[9] Ordway D, Palanisamy G, Henao-Tamayo M, et al. The cellular immune response to Mycobacterium tuberculosis infection in the guinea pig[J]. J Immunol, 2007, 179(4): 2532-2541.

[10] Hernandez J, Velazquez C, Valenzuela O, et al. Low number of peripheral blood B lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis[J]. Immunol Invest, 2010, 9(3): 197-205.

[11] Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses[J]. Immunity, 2008, 28(5): 639-650.

[12] Zhang M, Zheng X, Zhang J, et al. CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses[J]. Cell Immunol, 2012, 274(1/2): 89-97.

(收稿日期: 2014-01-17)

(上接第 1551 页)

参考文献

[1] Yang W, Guan L. Bridging the US and China together to conquer cancer: report of the 4th annual meeting of the US Chinese Anti-Cancer Association(USCACA)[J]. Chin J Cancer, 2012, 31(7): 315-318.

[2] 罗文彦. DMBT1, CD44v6, E-cadherin 在食管癌中的表达及其生物学意义[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2006.

[3] Helmke BM, Renner M, Poustka A, et al. DMBT1 expression distinguishes anorectal from cutaneous melanoma[J]. Histopathology, 2009, 54(2): 233-240.

[4] Tavassoli EF, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs[M]. Lyon, France: IARC Press, 2008: 111-113.

[5] Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, et al. DMBT1, a new

member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25. 3-26. 1 is deleted in malignant brain tumours[J]. Nat Genet, 1997, 17(1): 32-39.

[6] Mueller W, Mollenhauer J, Stockhammer F, et al. Rare mutations of the DMBT1 gene in human astrocytic gliomas[J]. Oncogene, 2002, 21(38): 5956-5959.

[7] Mollenhauer J, Herbertz S, Holmskov U, et al. DMBT1 encodes a protein involved in the immune defense and in epithelial differentiation and is highly unstable in cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1704-1710.

[8] Somerville RPT, Shoshan Y, Eng C, et al. Molecular analysis of two putative tumour suppressor genes, PTEN and DMBT, which have been implicated in glioblastoma multiforme disease progression[J]. Oncogene, 1998, 17(13): 1755-1757.

(收稿日期: 2014-01-08)