

DAB2IP 在膀胱移行细胞癌组织中的表达及与临床预后的相关性研究^{*}

朱建宁^{1,2}, 吴开杰¹, 管振锋^{1,2}, 刘丽霞¹, 宁忠运^{1,2}, 周建成^{1,2}, 王新阳², 范晋海^{1△}

1. 西安交通大学第一附属医院 泌尿外科(西安 710061); 2. 西安交通大学 环境与疾病相关基因

教育部重点实验室——肿瘤研究室(西安 710061)

【摘要】 目的 探讨 DAB2IP 在膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder, TCCB)组织中的表达及与膀胱癌患者预后的相关性。**方法** 收集 79 例膀胱移行细胞癌组织和 11 例正常膀胱组织,用免疫组化方法检测 DAB2IP 的表达,分析染色结果与肿瘤病理分级、临床分期、淋巴结转移和患者性别、年龄及术后 3 年生存率之间的关系。**结果** 膀胱移行细胞癌中 DAB2IP 表达量低于正常膀胱上皮,而在高级别、浸润性或转移性癌组织中 DAB2IP 的阳性表达率及评分低于低级别、浅表性、非转移性癌组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$);而且 DAB2IP 表达高的患者术后 3 年生存率高于低表达患者。**结论** DAB2IP 可能是 TCCB 发生、发展中一种重要的抑制分子,有望成为 TCCB 基因治疗的新靶点。

【关键词】 膀胱癌 DAB2IP 免疫组化 3 年生存率

DAB2IP Expression in Bladder Transitional Cell Carcinoma and Its Correlation with Clinical Outcome ZHU Jian-ning^{1,2}, WU Kai-jie¹, GUAN Zhen-feng^{1,2}, LIU Li-xia¹, NING Zhong-yun^{1,2}, ZHOU Jian-cheng^{1,2}, WANG Xin-yang², FAN Jin-hai^{1△}. 1. Department of Urology, First Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Ministry of Education of the People's Republic of China, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China
△ Corresponding author, E-mail: fanjinhai@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of DAB2IP in bladder transitional cell carcinoma (BTCC) and its correlation with clinical characteristics and prognosis of BTCC patients. **Methods** Immunohistochemical staining was applied to detect DAB2IP protein level in 79 cases of TCCB tissues and 11 cases of normal bladder tissues, and the relationships of the staining results with pathological grade, stage, lymph node metastasis, gender, age and the 3-year survival rate of the patients were analyzed. **Results** The expression of DAB2IP in BTCC tissues was significantly lower than that in normal bladder epithelium, and the expression score and rate of DAB2IP in the high-grade, invasive and metastatic BTCC were significantly lower than those in low-grade, superficial and non-metastatic BTCC ($P < 0.05$). The 3-year survival rate of the patients with high DAB2IP expression was significantly higher than that of the patients with low DAB2IP expression. **Conclusion** DAB2IP may be one of the important inhibitory factors during the occurrence and progression of BTCC.

【Key words】 Bladder cancer DAB2IP Immunohistochemistry 3-year survival rate

膀胱移行细胞癌(transitional cell carcinoma of bladder, TCCB)是我国泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,死亡率逐年增加,位于男性恶性肿瘤死亡率第九位^[1]。膀胱癌的发生、发展受多种基因的调控,虽然新的肿瘤标记物不断被报道^[2-4],但至今尚无单一的肿瘤标记物被广泛认可。DAB2IP (DOC-2/DAB2 interactive protein)是 Ras-鸟苷三磷酸酶激活蛋白(Ras GTPase activating protein, Ras-GAP)家族的新成员之一^[5,6], DAB2IP 在多种

肿瘤中表达下调^[7-9]。但其在膀胱癌中的表达情况少有报道,本研究利用免疫组化方法检测膀胱癌组织标本中 DAB2IP 的表达情况,并结合临床资料分析其与肿瘤的病理分级、临床分期、患者临床特征及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本实验检测了 79 例膀胱移行细胞癌组织中 DAB2IP 的表达。这些组织均来自于 2006 年 1 月至 2009 年 12 月西安交通大学第一附属医院泌尿外

^{*} 国家自然科学基金(No. 81202014 和 No. 81072105)资助

△ 通讯作者, E-mail: fanjinhai@hotmail.com

科经尿道电切或者膀胱部分切除、根治性切除的膀胱癌组织标本。术后均经病理组织学证实为膀胱移行细胞癌。其中男性 66 例,女性 13 例;年龄 35~82 岁,平均年龄 63 岁。按照世界卫生组织(WHO 1973)标准作病理分级:G1 级 26 例,G2 级 32 例,G3 级 21 例;采用国际抗癌联盟(International Union against Cancer, UICC)标准作临床分期,Ta 期 1 例,T1 期 41 例,T2 期 17 例,T3 期 17 例,T4 期 3 例。以 11 例经 HE 染色确定为正常的癌旁组织作为正常对照。实验所用标本均得到患者及我院伦理委员会知情同意。

1.2 随访

自手术结束开始进行随访,术后 1 月、3 月、6 月、1 年、2 年、3 年各随访 1 次,随访资料包括生存时间,二次手术时间,死亡时间,B 超、X 线、CT、膀胱镜检查、脱落细胞检查结果,生存时间自手术之日起至 2012 年 12 月或者个体二次手术时间、死亡时间。

1.3 试剂

免疫组化试剂盒及二抗购自基因科技(上海)有限公司,GTvisionTN. III 抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(货号 GK500710);兔抗人单克隆抗体 DAB2IP 为美国德州大学西南医学中心 Jer-Tsong Hsieh 教授赠送。

1.4 染色方法

采用 Envision 二步法检测 DAB2IP 在膀胱正常黏膜组织及癌组织中的表达情况,操作步骤按试剂盒说明进行,甲醛固定组织标本,石蜡包埋,4 μm 切片,HE 染色,待染切片 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 h,二甲苯脱蜡,酒精梯度水化,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,一抗孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,用磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)代替一抗做阴性对照,二抗孵育室温 1 h,DAB 显色,苏木素复染,盐酸分化,氨水返蓝,酒精梯度水化,二甲苯透明,中性树脂封片,晾干后可显微镜下观察,照相。

1.5 结果判定

HE 染色切片由本院两位经验丰富的病理科教授在不知晓临床和病理资料的情况下进行观察,评价“正常组织”是否为正常组织,并确认膀胱移行细胞癌组织的病理分级。每张切片在高倍镜下随机挑取 10 个视野进行评分。评分采用目前免疫组化结果判断通用的综合染色强度与阳性细胞百分比双重评分系统。根据细胞核染色强度将结果分为无着色、弱着色、中等着色及强着色四等,分别得 0、1、2、3 分;根据细胞核染色阳性细胞百分比,将结果分

为 $<10\%$ 、 $10\% \sim 25\%$ 、 $25\% \sim 50\%$ 、 $50\% \sim 75\%$ 以及 75% 五等,分别得 0、1、2、3、4 分。上述两项得分相乘得到介于 0~12 分之间的总得分,总得分 <3 分的组织视为 DAB2IP 表达阴性, ≥ 3 分的组织视为 DAB2IP 表达阳性;阳性组中,总得分 <6 分为弱阳性, ≥ 6 分的认为是强阳性。

1.6 统计学方法

不同年龄、性别、转移之间的 DAB2IP 表达差异采用 Mann-Whitney U 检验;肿瘤分级和分期之间的 DAB2IP 表达差异采用 Kruskal-Wallis H 检验;肿瘤分级、分期、转移之间的 DAB2IP 表达评分差异采用单因素方差分析;正常组织与肿瘤组织之间 DAB2IP 表达差异比较采用 Mann-Whitney U 检验;DAB2IP 表达与膀胱肿瘤患者 3 年生存率之间相关关系采用直线相关分析;DAB2IP 表达与生存时间的相关关系采用 Kaplan-Meier 生存分析法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAB2IP 在正常膀胱组织、膀胱癌组织中的表达

由图 1 可见,DAB2IP 在正常膀胱组织中的表达评分高于膀胱癌组织[(2.73 $\pm$ 0.47) vs. (2.03 $\pm$ 0.82)], $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2.2 DAB2IP 的表达与患者临床特征的关系

由表 1、表 2 可见,不同年龄组、性别组患者之间的 DAB2IP 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),而不同病理分级、临床分期组的患者之间的 DAB2IP 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),随着膀胱癌病理分级、临床分期的升高,DAB2IP 阳性表达率及评分有明显的减弱趋势,有无转移的患者之间 DAB2IP 表达差异也有统计学意义($P = 0.003$),有转移患者的 DAB2IP 阳性率表达及评分低于非转移患者。

2.3 DAB2IP 的表达水平与患者术后生存时间的关系

Kaplan-Meier 法结果说明(图 2),DAB2IP 高表达的膀胱癌患者生存时间明显长于低表达患者,DAB2IP 强阳性表达患者平均生存时间为 33.97 个月,3 年生存率为 92.59%;弱阳性表达患者平均生存时间为 26.07 个月,3 年生存率为 78%;DAB2IP 阴性患者平均生存时间为 20.37 个月,3 年生存率为 56%。DAB2IP 在膀胱癌组织中的表达与膀胱癌患者术后 3 年生存率呈正相关($r = 0.375$, $P = 0.001$)。

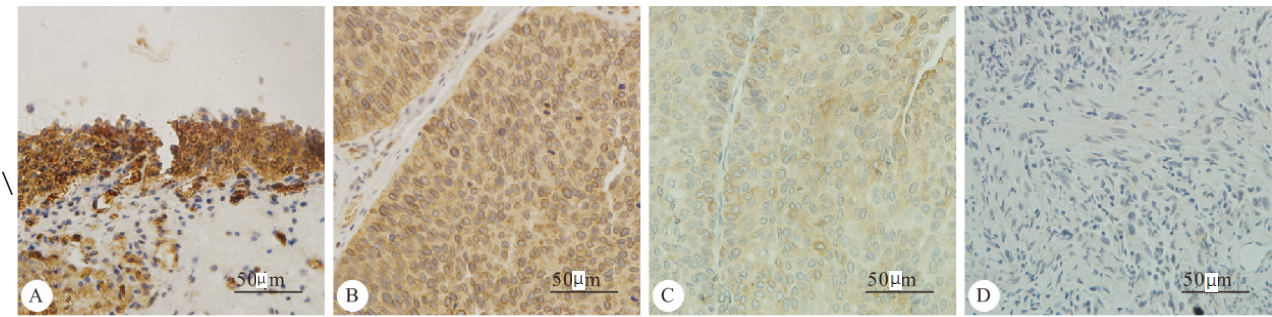


图 1 正常膀胱上皮和膀胱移行细胞癌组织免疫组化染色图片。Envision ×400

Fig 1 Immunohistochemical staining images of normal bladder urothelium and bladder transitional cell carcinoma tissues. Envision ×400
A; Normal bladder epithelium; B; Grade 1 bladder cancer tissue; C; Grade 2 bladder cancer tissue; D; Grade 3 bladder cancer tissue

表 1 膀胱移行细胞癌中 DAB2IP 的表达与临床特征的关系〔例数（%）〕

Table 1 The relationship between clinical characteristics and DAB2IP expression in bladder transitional cell carcinoma〔case（%）〕					
Clinical feature	n	Strongly positive	Weakly positive	Negative	P
Age					0.839
≤60 yr.	31	10 (32.26)	12 (38.71)	9 (29.03)	
>60 yr.	48	15 (31.25)	17 (35.42)	16 (33.33)	
Gender					0.790
Male	66	19 (28.79)	26 (39.39)	21 (31.82)	
Female	13	6 (46.15)	2 (15.38)	5 (38.46)	
Pathological grading					<0.001
G1	26	21 (80.77)	1 (3.85)	4 (15.38)	
G2	32	3 (9.38)	23 (71.88)	6 (18.75)	
G3	21	1 (4.76)	4 (19.05)	16 (76.19)	
Clinical stage					<0.001
T1	42	25 (59.52)	11 (26.19)	6 (14.29)	
T2	17	0	13 (76.47)	4 (23.53)	
T3-T4	20	0	4 (20.00)	16 (80.00)	
Metastasis					0.003
Yes	10	0	1 (10.00)	9 (90.00)	
No	69	25 (36.23)	27 (39.13)	17 (24.64)	

表 2 膀胱移行细胞癌 DAB2IP 表达评分与临床特征 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Clinical characteristics and the DAB2IP expression score in bladder transitional cell carcinoma ($\bar{x}\pm s$)

Clinical feature	Score	F	P
Pathological grading		48.97	<0.001
G1 (n=26)	8.40±3.06		
G2 (n=32)	4.33±1.40		
G3 (n=21)	2.38±1.75		
Clinical stage		15.19	<0.001
Ta-T1 (n=42)	6.94±3.18		
T2 (n=17)	3.91±1.48		
T3 (n=17)	2.33±1.81		
T4 (n=3)	2.98±1.47		
Metastasis		9.603	0.003
Yes (n=10)	2.49±2.12		
No (n=69)	5.58±3.18		

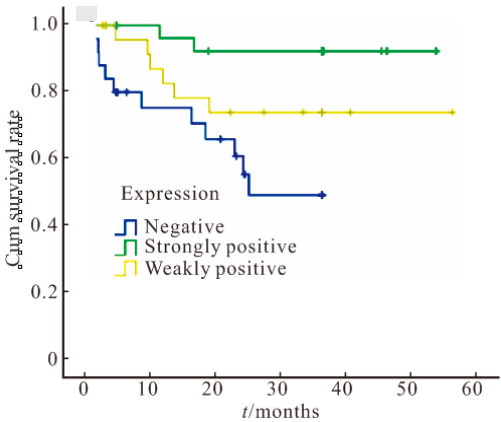


图 2 不同 DAB2IP 表达水平的患者的术后生存时间
Fig 2 The survival time of different patients with different DAB2IP expressions

3 讨论

1998 年 Hsieh 教授实验室率先应用差异显示 PCR 技术发现并克隆了 *DOC-2/DAB2* 基因^{〔10〕},同时应用酵母双杂交系统筛选方法最早发现了

DAB2IP 蛋白, 鉴定其为可与 DOC-2/DAB2 的 N 端相互作用的一个崭新的 RAS-GAP 家族成员, 是 DAB2 信号途径的下游效应器^[5]。DAB2IP 基因是多条与肿瘤相关的信号转导通路中的重要环节, 如 MAPK/ERK 通路和 NF- κ B 途径^[11]; ASK1-JNK 信号通路^[12], PI3K-Akt 信号通路^[13], GSK-3 β -catenin 信号通路^[14]。DAB2IP 基因率先在前列腺癌中被发现^[6], 被证实是维系前列腺上皮细胞自身稳定的重要支架蛋白, 其表达缺失可促发细胞内信号紊乱, 引起癌细胞耐受凋亡、生长失控和侵袭转移。有研究表明, DAB2IP 在前列腺癌细胞中表达下调, 特别是在雄激素依赖的前列腺癌细胞中表达受到明显抑制, 而转染 DAB2IP 基因可使前列腺癌细胞生长阻滞, 凋亡增加^[15]。目前研究表明 DAB2IP 在肿瘤发生发展过程中其表达受到抑制, 主要机制是启动子区域的 DNA 甲基化^[6-9]和组蛋白甲基化^[15]。DAB2IP 基因作为一种最新发现的抑癌基因, 关于其与肿瘤关系和抑癌机制的研究正在不断深入。且在膀胱癌中, DAB2IP 的表达与临床预后的关系, 目前还少有报道。

本研究发现, DAB2IP 在膀胱移行细胞癌组织中的表达明显低于正常膀胱组织, 而在有淋巴结转移的膀胱癌组织表达明显低于无淋巴结转移的膀胱癌组织, 这与前列腺癌等其他肿瘤中的表达情况类似^[7-9]。DAB2IP 在膀胱癌组织中的表达与膀胱癌病理分级、临床分期密切相关, 提示 DAB2IP 的下调与膀胱癌的发生、发展密切相关。DAB2IP 的表达与患者术后生存时间的生存分析显示, 膀胱癌患者中强阳性表达 DAB2IP 的患者生存时间明显高于弱阳性表达的患者, 且与患者的年龄、性别无关, 这也提示 DAB2IP 对预测膀胱癌患者预后具有重要意义, 甚至可能为膀胱癌的诊断和治疗提供新的分子标记。在今后的临床诊断和预后评估中, DAB2IP 可作为一个具有临床意义的重要指标。

综上所述, DAB2IP 的表达下调与膀胱癌的发生、发展及预后密切联系, 可能成为提示膀胱癌进展预兆的一种新的生物标记分子和潜在的治疗新靶点。但目前有关 DAB2IP 的基础与临床的研究都还处于探索期, DAB2IP 作为抑癌基因用于基因治疗的研究更有待进一步深入和完善。

参 考 文 献

1 中华人民共和国卫生部. 中国卫生统计年鉴 2010. 北京: 中国

协和医科大学出版社, 2010; 261-262.

- 2 Mhawech-Fauceglia P, Cheney RT, Fischer G, *et al.* FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2006; 32(2): 231-237.
- 3 Margulis V, Lotan Y, Karakiewicz PI, *et al.* Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 labeling index in patients with urinary bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2009; 101(2): 114-119.
- 4 Shariat SF, Ashfaq R, Karakiewicz PI, *et al.* Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer*, 2007; 109(6): 1106-1113.
- 5 Wang Z, Tseng CP, Hsieh JT, *et al.* The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with N-terminal domain of DOC-2/DAB2. *J Biol Chem*, 2002; 277(15): 12622-12631.
- 6 Chen H, Pong RC, Hsieh JT, *et al.* Differential regulation of the human gene DAB2IP in normal and malignant prostatic epithelia: cloning and characterization. *Genomics*, 2002; 79(4): 573-581.
- 7 Dote H, Toyooka S, Shimizu N, *et al.* Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in gastrointestinal tumour. *Br J Cancer*, 2005; 92(6): 1117-1125.
- 8 Yano M, Toyooka S, Shimizu N, *et al.* Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers. *Int J Cancer*, 2005; 113(1): 59-66.
- 9 Qiu GH, Xie H, Hooi SC, *et al.* Differential expression of hDAB2IPA and hDAB2IPB in normal tissues and promoter methylation of hDAB2IPA in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2007; 46(4): 655-663.
- 10 Tseng CP, Ely BD, Hsieh JT, *et al.* Regulation of rat DOC-2 gene during castration-induced rat ventral prostate degeneration and its growth inhibitory function in human prostatic carcinoma cells. *Endocrinology*, 1998; 139(8): 3542-3553.
- 11 Min J, Zaslavsky A, Beroukhim R, *et al.* An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB. *Nat Med*, 2010; 16(3): 286-294.
- 12 Zhang H, Zhang R, Luo Y, *et al.* AIP/DAB2IP, a novel member of the Ras-GAP family, transduces TRAF2-induced ASK1-JNK activation. *J Biol Chem*, 2004; 279(43): 44955-44965.
- 13 Xie D, Gore C, Zhou J, *et al.* DAB2IP coordinates both PI3K-Akt and ASK1 pathways for cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106(47): 19878-19883.
- 14 Xie D, Gore C, Liu J, *et al.* Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010; 107(6): 2485-2490.
- 15 Chen H, Toyooka S, Gazdar AF, *et al.* Epigenetic regulation of a novel tumor suppressor gene (h DAB2IP) in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem*, 2003; 278(5): 3121-3130.

(2013-10-15 收稿, 2014-02-18 修回)

编辑 汤洁