

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.010

## MBD4 蛋白在子宫内膜腺癌中的表达及临床意义\*

刘晓丽,史晓雨,程国艳,齐丽宁,宋菲菲,李学慧<sup>△</sup>

(河北医科大学第一医院妇产科,石家庄 050011)

**[摘要]** 目的 探讨 MBD4 蛋白在子宫内膜腺癌中的表达及临床意义。方法 采用免疫组织化学 SP 法检测 45 例正常子宫内膜和 60 例子宫内膜腺癌中 MBD4 蛋白的表达,并分析其与临床分期和病理分级的关系。结果 MBD4 蛋白在正常子宫内膜和子宫内膜腺癌中的阳性表达率分别为 60% 及 25%,呈降低趋势,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。MBD4 蛋白的表达与子宫内膜腺癌的临床分期、病理分级、子宫肌层浸润深度、淋巴转移无相关性。结论 MBD4 蛋白的缺失在子宫内膜腺癌发病及治疗中有一定作用。

**[关键词]** 子宫内膜肿瘤;MBD4 蛋白;妇科肿瘤

**[中图分类号]** R711.32

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)26-3631-03

## Expression of MBD4 protein and its clinical significance in endometrial adenocarcinoma\*

Liu Xiaoli, Shi Xiaoyu, Cheng Guoyan, Qi Lining, Li Xuehui<sup>△</sup>

(Department of Obstetrics and Gynecology, First Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the expression and clinical significance of MBD4 protein in endometrial adenocarcinoma. **Methods** The MBD4 expression was examined by adopting the SP immunohistochemical method in 45 normal endometrial samples and 60 endometrial adenocarcinoma samples and to analyze its relationship with the clinical staging and pathologic grading. **Results** The positive expression rate of MBD4 protein in normal endometrium was 60%, which was significantly higher than 25% in endometrial adenocarcinoma, indicating the decreasing trend, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The MBD4 protein expression in endometrial adenocarcinoma had no obvious correlation with the clinical staging, pathologic stage, myometrium invasion depth and lymph node metastasis. **Conclusion** The lack of MBD4 protein in endometrial adenocarcinoma may play a role in the occurrence and treatment of endometrial adenocarcinoma.

**[Key words]** endometrial adenocarcinoma; MBD4 protein; gynecological tumors

子宫内膜癌(endometrial carcinoma)是女性生殖道三大恶性肿瘤之一,比例为 20%~30%,占女性全身恶性肿瘤的 7%。近年来,全世界子宫内膜癌的发病率逐年上升。每年大约 7.4 万女性死于子宫内膜癌,主要由于癌症的复发和转移<sup>[1]</sup>。手术结合放化疗为目前最主要的治疗子宫内膜癌的方法。MBD4(methyl-CpG-binding domain 4)作为一种抑癌基因,其在食管鳞状细胞癌、肺癌中的表达已有相关报道<sup>[2-4]</sup>,本文拟研究 MBD4 蛋白在子宫内膜腺癌中的表达,为子宫内膜腺癌的发现及治疗提供实验依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集河北医科大学第一医院 2010 年 1 月至 2014 年 1 月病理科各项临床资料完整的子宫内膜腺癌蜡块 60 例。所有病理诊断均由病理科主任医师复核确认。子宫内膜癌患者年龄范围为 22~75 岁,中位年龄为 52 岁。所有研究对象均未接受放疗、化疗、激素治疗或其他抗肿瘤治疗。另取同期因子宫肌瘤切除子宫并经病理检查确诊为正常子宫内膜的 45 例蜡块作为对照,正常子宫内膜者年龄范围为 25~51 岁,中位年龄为 42 岁。

**1.2 试剂** 一抗兔抗 MBD4(HPA002031)购自美国 Sigma 公司,SP 免疫组化染色试剂盒购自河北博海生物工程有限公司,DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.3 方法** 石蜡包埋组织以 5 Hm 厚度连续切片,烤箱 60~65 °C 过夜,常规脱蜡和水化,柠檬酸缓冲液煮沸修复抗原,采用 SP 免疫组化法染色,严格按照免疫组化试剂盒说明书步骤

进行:滴加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消除内源性过氧化物酶的活性;正常山羊血清封闭后滴加一抗,4 °C 过夜后,依次滴加生物素、辣根酶标记链霉卵白素,DAB 显色,自来水终止,苏木素复染,脱水、透明、封片、镜检。以已知 MBD4 蛋白阳性切片作为阳性对照,以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

**1.4 免疫组化结果判定** MBD4 在子宫内膜细胞核及细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。每张切片随机选出 10 个不重复、不重叠高倍视野( $\times 400$ ),计数取各视野平均值。采用 Allred score 评分系统,Allred score=阳性细胞比例分值+阳性强度分值。阳性细胞比例分值:无染色 0 分,<1%染色为 1 分,1%~10%染色为 2 分,11%~33%为 3 分,34%~66%为 4 分,67%~100%为 5 分。阳性强度分值:阴性 0 分,弱阳性 1 分,中等阳性 2 分,强阳性 3 分,相加分值范围为 0~8 分。相加分值大于或等于 3 分为阳性<sup>[5]</sup>。需注意染色阳性仅出现在组织边缘视为边缘效应不计入分值;染色模糊考虑人工假象需排除。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计数资料用百分率表示,不同组间采用卡方检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MBD4 在正常和子宫内膜腺癌组织中的表达** 正常子宫内膜组织中 27 例阳性,阳性率为 60%(图 1A、图 1B)。子宫内膜腺癌组织中阳性表达为 15 例,阳性表达率为 25%(图 1C、图 1D)。统计分析结果显示子宫内膜腺癌的阳性表达率与正常子

\* 资助基金:河北省自然科学基金资助项目(H2012206040)。作者简介:刘晓丽(1970-),本科,主治医师,主要从事临床妇产科工作。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail: xzblxh@aliyun.com。

宫内膜比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

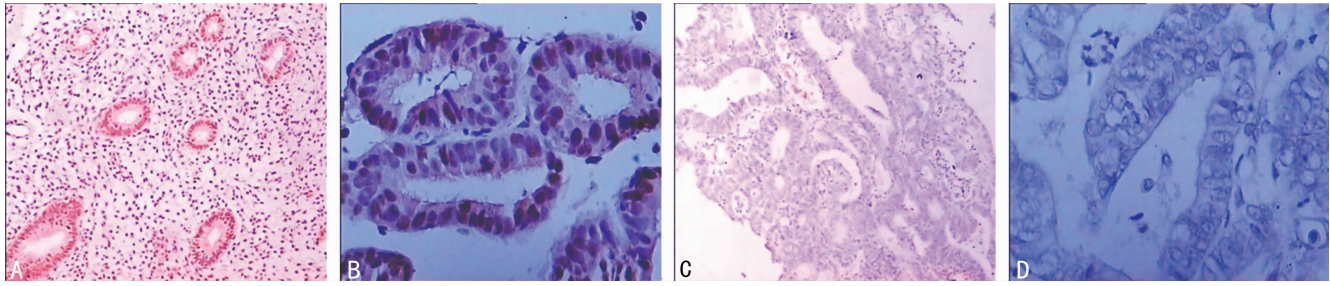


图 1 MBD4 在子宫颈内膜中的表达  
A: 正常子宫颈内膜腺体中的阳性表达(SP×40); B: 正常子宫颈内膜腺体中的阳性表达(SP×100); C: 子宫颈内膜腺体中的阴性表达(SP×40); D: 子宫颈内膜腺体中的阴性表达(SP×100)。

图 1 MBD4 在子宫颈内膜中的表达

表 1 MBD4 在正常子宫颈内膜和子宫颈内膜腺癌组织中的表达

组别	n	阳性	阴性	$\chi^2$	P
正常子宫颈内膜组织	45	27	18		
子宫颈内膜腺癌	60	16	44	11.815	0.001

表 2 MBD4 蛋白表达与子宫颈内膜腺癌患者临床病理特征关系

临床病理因素	n	MBD4	$\chi^2$	P
年龄(岁)			4.365	0.037
<50	25	5		
≥50	35	11		
血压(mm Hg)			0.669	0.413
<140/90	33	10		
≥140/90	27	6		
血脂			0.043	0.836
正常	24	7		
高血脂	19	5		
血糖			0.131	0.717
正常	30	11		
高血糖	14	2		
手术病理分期			0.860	0.354
I 期	28	8		
II~IV 期	32	7		
病理分级			1.773	0.183
G <sub>1</sub> ~G <sub>2</sub>	37	12		
G <sub>3</sub>	19	3		
子宫肌层浸润			0.328	0.567
≤1/2	31	10		
>1/2	22	4		
淋巴结是否转移			0.103	0.748
是	5	1		
否	37	11		

2.2 MBD4 蛋白表达与临床病理特征的关系 实验结果显示, MBD4 蛋白在子宫颈内膜腺癌中的表达与患者的血压、血脂、血

糖高低、临床分期、病理分级、子宫肌层浸润、淋巴转移无明显相关性( $P > 0.05$ )。MBD4 蛋白在高年龄组子宫颈内膜腺癌组织中表达高于低年龄组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

### 3 讨论

MBD4 基因可编码 MBD4 蛋白, 该蛋白又称甲基化 CpG 结合域蛋白 4, 是 DNA 碱基切除修复通路(base excision repair, BER)的重要成员之一。自 1998 年被分离鉴定以来, 大量的功能学研究结果证实: MBD4 在肿瘤的发生发展、临床治疗及预后中发挥重要的作用。MBD4 蛋白可以特异性地切除 DNA 序列中甲基化或半甲基化的胞嘧啶(C)和错配的胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U), 从而维护基因组的稳定性, 抑制基因突变, 因而 MBD4 基因被认为是一种抑癌基因<sup>[6]</sup>。近年来研究结果指出, MBD4 除具有碱基切除修复的特异生物学功能外, 还具有其他广泛的功能, 如可以与 MHL1 蛋白结合参与 DNA 的错配修复通路, 与 Fas 相关死亡结构域蛋白(fas-associated death domain protein, FADD)结合参与细胞的程序性细胞凋亡<sup>[7]</sup>, 可通过调节 P21 蛋白的表达而阻滞细胞周期<sup>[8]</sup>, 可影响铂类等多种化疗药物发挥功能<sup>[9-12]</sup>, 通过多种途径影响肿瘤的发生、发展及预后。本实验结果显示 MBD4 蛋白在子宫颈内膜腺癌的阳性表达与正常子宫颈内膜的阳性表达有统计学意义, 不少学者也证明 MBD4 的多态性和对肿瘤易感性的关系, 例如食管鳞状细胞癌、肺癌等<sup>[2-4]</sup>由此推断, MBD4 蛋白的缺失可一定程度上导致了子宫颈内膜腺癌的发生。

MBD4 蛋白在子宫颈内膜腺癌中的表达情况与临床分期、病理分级、子宫肌层浸润、淋巴转移无明显相关性, 可以考虑 MBD4 蛋白缺失是子宫颈内膜腺癌发生的原因之一, 而与其发展和转移等中晚期事件无关, 可以推断 MBD4 蛋白不能作为评估子宫颈内膜腺癌恶性程度和判断预后的参考指标, 考虑到样本量的选择和各个分期的构成比差异会导致一定的抽样误差, 进一步增加样本量进行研究是必要的。MBD4 基因表达与铂类化疗药物的临床疗效发挥有关<sup>[9]</sup>, 同时, MBD4 基因缺失小鼠不能正常修复铂类引起的 DNA 损伤, 研究发现, MBD4 基因的较短剪切产物可以造成整个基因组的突变, 甚至导致化疗药物的耐受<sup>[13]</sup>, 此截短突变与染色体的重组有关, DLD1 细胞系中 MBD4(tru)基因型的过表达影响了铂类制剂暴露后的存活时间<sup>[14]</sup>, 铂类是子宫颈内膜腺癌治疗常用的化疗药物, 以上研究结果提示 MBD4 基因改变与子宫颈内膜腺癌临床化疗的疗效及预后存在相关性, 可能是子宫颈内膜腺癌的预后因素。此外, MBD4 蛋白参与调控细胞周期, 尤其是 DNA 损伤后的细胞周期阻滞和凋亡过程<sup>[15]</sup>, 这也提示 MBD4 基因改变可能影响细胞周期化疗药物和放射治疗的临床疗效, 从多个方面影响肿瘤

的预后。

总之, MBD4 蛋白的表达在子宫内膜腺癌临床治疗和预后的各个环节发挥着重要作用, 有望成为子宫内膜腺癌的易感标志物和预后因子, 具有潜在的子宫内膜腺癌防治和个体化临床治疗的指导意义, 但在 MBD4 蛋白与子宫内膜腺癌发展中的作用, 需要进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Van der Horst PH, Wang Y, Vandenput I, et al. Progesterone inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in endometrial cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30840.
  - [2] Hao B, Wang H, Zhou K, et al. Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12): 4378-4384.
  - [3] Shin MC, Lee SJ, Cha SI, et al. Glu346Lys polymorphism in the methyl-CpG binding domain 4 gene and the risk of primary lung cancer[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2006, 36(8): 483-488.
  - [4] Miao R, Gu H, Liu H, et al. Tagging single nucleotide polymorphisms in MBD4 are associated with risk of lung cancer in a Chinese population[J]. *Lung Cancer*, 2008, 62(3): 281-286.
  - [5] Madeira KP, Daltoé RD, Sirtoli GM, et al. Comparison of immunohistochemical analysis with estrogen receptor SP1 and 1D5 monoclonal antibodies in breast cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2012, 208(11): 657-661.
  - [6] Millar CB, Guy J, Sansom OJ, et al. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice[J]. *Science*, 2002, 297(5580): 403-405.
  - [7] Screaton RA, Kiessling S, Sansom OJ, et al. Fas-associated death domain protein interacts with methyl-CpG binding domain protein 4; a potential link between genome surveillance and apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(9): 5211-5216.
  - [8] Donner AJ, Szostek S, Hoover JM, et al. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes[J]. *Molecular Cell*, 2007, 27(1): 121-133.
  - [9] Cortellino S, Turner D, Masciullo V, et al. The base excision repair enzyme MED 1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15071-15076.
  - [10] Sansom OJ, Zabkiewicz JB, Bishop SM, Bird A, et al. MBD4 deficiency reduces the apoptotic response to DNA-damaging agents in the murine small intestine[J]. *Oncogene*, 2003, 22(46): 7130-7136.
  - [11] Parsons BL. MED 1: a central molecule for maintenance of genome integrity and response to DNA damage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 14601-14602.
  - [12] Turner DP, Cortellino S, Schupp JE, et al. The DNA N-glycosylase MED 1 exhibits preference for halogenated pyrimidines and is involved in the cytotoxicity of 5-iododeoxyuridine[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7686-7693.
  - [13] Bader SA, Walker M, Harrison DJ. A human cancer-associated truncation of MBD4 causes dominant negative impairment of DNA repair in colon cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(4): 660-666.
  - [14] Abdel-Rahman WM, Knuutila S, Peltomaki P, et al. Truncation of MBD4 predisposes to reciprocal chromosomal translocations and alters the response to therapeutic agents in colon cancer cells[J]. *DNA Repair*, 2008, 7(2): 321-328.
  - [15] Donner AJ, Szostek S, Espinosa JM. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes[J]. *Molecular Cell*, 2007, 27(1): 121-133.
- (收稿日期: 2015-04-08 修回日期: 2015-06-14)
- 
- (上接第 3630 页)
- et al. The significance of Treg cells in defective tumor immunity[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2008, 56(3): 181-191.
- [9] 陈欣然, 王玲, 共刺激分子 B7-H4 在小鼠食管癌前病变进展中脾淋巴细胞表面的表达[J]. *肿瘤*, 2014, 34(11): 1010-1015.
  - [10] 邓敏端. 宫颈癌前病变和宫颈鳞癌组织中 Foxp3 的表达及临床意义[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2011, 12(5): 338-341.
  - [11] Zeng C, Yao Y, Jie W, et al. Up-regulation of Foxp3 participates in progression of cervical cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(3): 481-487.
  - [12] Tuve S, Chen BM, Liu Y, et al. Combination of tumor site-located CTL-associated antigen-4 blockade and systemic regulatory T-cell depletion induces tumor-destructive immune responses[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5929-5933.
  - [13] 陈春燕, 睦文妍, 李维, 等. B7-H4 及 Foxp3 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 19(22): 4279-4285.
  - [14] Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, et al. Prevalence of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(18): 5423-5434.
  - [15] Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, et al. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(3): 902-911.
  - [16] 朱森良, 孙晓青. siRNA 靶向沉默 B7-H4 基因对人前列腺癌 DU145 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *河南外科学杂志*, 2012, 18(6): 1-4.
  - [17] Salceda S, Tang T, Kmet M, et al. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 306(1): 128-141.
- (收稿日期: 2015-04-08 修回日期: 2015-06-16)