

盘状大同源物 5 在肺腺癌中的表达及其临床意义

车娟娟, 甄洪超, 王 婧, 李卉惠, 曹邦伟

摘要 目的: 探讨盘状大同源物 5 (discs large homolog 5, DLG5) 在肺腺癌中的表达及其临床意义。**方法:** 采用免疫组化 SP 法检测 122 例 I 期和 IIIA 期肺腺癌组织中 DLG5 的表达情况, 并采用 Western blotting 法检测 20 对肺腺癌组织癌组织和癌旁组织 DLG5 的表达情况。统计患者的临床资料, 分析 DLG5 表达与临床特征的相关性, 采用 Kaplan-Meier 曲线对随访数据进行预后分析。**结果:** I 期肺腺癌组织中 DLG5 的阳性表达率明显高于 IIIA 期肺腺癌组织 ($P < 0.01$)。肺腺癌组织中 DLG5 的阳性表达率明显低于癌旁肺组织。DLG5 表达阳性的患者, 5 年生存率 (OS) 明显高于表达阴性的患者 (51.1% vs 28.1%, $P < 0.01$)。肺腺癌组织中 DLG5 的阳性表达水平与淋巴结转移 ($P < 0.01$)、TNM 分期 ($P < 0.01$) 和肿瘤复发 ($P < 0.01$) 呈负相关。生存分析显示 DLG5 和 TNM 分期是肺腺癌的独立预后影响因素。**结论:** DLG5 在肺腺癌中表达下降, DLG5 可能对肺腺癌患者的预后有一定的指导意义。

关键词: DLG5; 肺腺癌; 预后分析

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6948(2019)03-0257-05

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.03.002

Expression of DLG5 in Lung Adenocarcinoma and its Clinical Significance CHE Juan-juan, ZHEN Hong-chao, WANG Jing, et al. *Oncology Department of Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing (100050), China*

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of discs large homolog 5 (DLG5) in lung adenocarcinoma (AC). **Methods** SP immunohistochemistry was used to detect the expression of DLG5 in 122 cases of lung AC tissues. Western blotting was used to detect the expression of DLG5 in 20 pairs of lung AC tissues and adjacent tissues. The clinical data were detected to analyze the relationship between the expression and clinical characteristics. Kaplan-Meier curves were used to conduct survival analysis of follow-up data. **Results** The positive expression rate of DLG5 in stage I lung AC was significantly higher than that in stage IIIA ($P < 0.01$). The positive expression rate of DLG5 in lung AC tissues was significantly lower than that in adjacent tissues. In patients with positive DLG5 expression, the 5-year survival rate (OS) was significantly higher than that in patients with negative DLG5 expression (51.1% vs 28.1%, $P < 0.01$). The positive expression of DLG5 in AC was negatively correlated with lymph node metastasis ($P < 0.01$), TNM stage ($P < 0.01$) and recurrence ($P < 0.01$). Survival analysis showed that DLG5 and TNM stage were independent prognostic factors for lung AC. **Conclusion** The expression of DLG5 is decreased in lung AC, and maybe helpful for the prognosis of patients with lung AC.

Key words: Discs large homolog 5; lung adenocarcinoma; prognostic analysis

肺癌是全世界发病率和死亡率均居首位的恶性肿瘤, 其五年生存率仅为 15.9%^[1]。按照病理学类型可分为非小细胞肺癌 (NSCLC) 和小细胞肺

癌 (SCLC), 肺鳞癌和肺腺癌是 NSCLC 的主要病理类型, 其中肺腺癌的发病率逐年升高, 尽管近几年肺腺癌的诊疗手段不断进步, 但大多数肺腺癌患者发现时已是晚期, 治疗效果不佳, 预后较差。因此, 探索发现影响肺腺癌预后的生物标志物非常重要。

DLG5 是膜相关鸟苷酸激酶家族的新成员^[2],

基金项目: 2017 年度首都医科大学科研培育基金 (FYZ2017148)

首都医科大学附属北京友谊医院肿瘤科 (北京 100050)

通信作者: 曹邦伟, E-mail: oncology@ccmu.edu.cn

DLG5 是一种多功能调节和支架蛋白,可以与多种蛋白质结合,包括 β -catenin、p53、KIF20A、突触结合蛋白 4 和枸橼酸激酶^[2-5]。DLG5 在肺叶正常发育和肺泡祖细胞分化中起重要作用^[6]。研究发现 DLG5 在多种肿瘤组织中表达下调,包括肝癌、前列腺癌、胰腺癌和膀胱癌^[2-4,6]。研究发现 DLG5 可以抑制肾上皮细胞和前列腺癌细胞的上皮间质转化 (EMT)^[5,7]。目前 DLG5 在肺腺癌中的研究非常少。

本研究应用免疫组化 SP 法检测 122 例肺腺癌组织中 DLG5 的表达情况,并运用 Western blotting 法检测 20 对肺腺癌和癌旁正常肺组织中 DLG5 的表达情况,并进行相关因素分析和预后分析,探讨 DLG5 在肺腺癌中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例收集:收集首都医科大学附属北京友谊医院 2008 年 1 月—2012 年 1 月手术切除的肺腺癌石蜡包埋标本 122 例,请高年资的病理医师复习病理切片。

病例入选标准:(1)术前行胸部 CT 扫描、脑 CT 或 MR 扫描、腹部 CT 扫描,排除肝、全脑、双侧肾上腺、对侧肺内无转移,全身 ECT 骨扫描检查(部分患者行 PET-CT 检查)排除骨转移的患者;(2)术前未接受任何放、化疗等抗癌治疗;(3)依据 NCCN 指南要求,行肺癌根治性切除术及随访资料完整患者为研究对象,排除术后 1 月内死亡病例。

治疗方式:所有患者均经手术治疗,并且给予患者手术为主的综合治疗,Ⅲ A 期患者术后予以辅助化疗,部分Ⅲ A 期患者行辅助放疗。其中化疗采用 NSCLC 的常规方案,包括培美曲塞联合顺铂或卡铂 (PP)、紫杉醇联合顺铂或卡铂 (TP)、多西他赛联合顺铂或卡铂 (TP)。

1.2 免疫组化检测方法 采用免疫组化 SP 法对所有标本中的 DLG5 蛋白表达情况进行检测,具体方法:4 μ m 厚的组织切片常规脱蜡、梯度乙醇入水。应用 3% 的 H₂O₂ 避光室温放置 20 min 封闭内源性过氧化物酶活性,使用 0.1% 枸橼酸缓冲液 (pH 6.0) 高温高压修复抗原后,滴加 10% 正常山羊血清反应 20 min,加 DLG5 一抗 (1:100 稀释, Assay Biotech, Sunnyvale, CA, USA), 4 $^{\circ}$ C 过夜后,加入生物素标记的二抗,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,二甲苯联苯胺 (DAB) 显色。封固后在光学显微镜

下观察染色结果。以前列腺癌组织染色结果作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。进行免疫组化染色的标本选取病理切片中整个视野均为肿瘤细胞且细胞形态结构完整的区域。

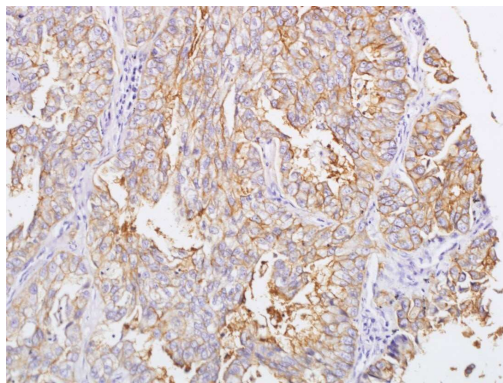
免疫组化着色结果判断 DLG5 阳性表达定位于细胞膜。免疫组化反应根据染色强度和阳性细胞百分比分级为 0~3 级。0 分:没有着色或者阳性细胞小于 10%;1 分:大于 10% 的肿瘤细胞浅着色或者 10%~40% 的细胞中等着色;2 分:大于 40% 的肿瘤细胞中等着色或者 10%~40% 的肿瘤细胞强着色;3 分:大于 40% 的细胞强着色。为了便于统计分析,将 0~1 分者定义为阴性组,将 2~3 分者定义为阳性组。

1.3 Western blotting 检测方法 取出 -80 $^{\circ}$ C 冻存的组织标本,切取绿豆粒大小的组织标本(肺腺癌组织和癌旁肺组织);将要提取总蛋白的组织标本利用液氮、研钵粉碎呈粉末状后移入 1.5 mL 的 EP 管中,加入 RIPA 裂解液,提取组织总蛋白并进行蛋白定量。进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白质湿转至 PVDF 膜上,5%BSA 封闭 2 h 后,加入 DLG5 (1:1000 dilution, Abcam, Cambridge, MA, USA) 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次,每次 8 min,加入二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次,每次 8 min,然后 ECL 显影。

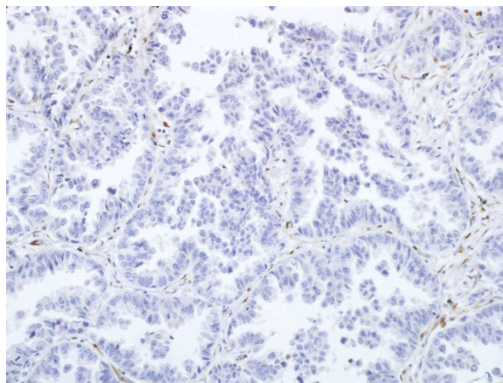
1.4 统计方法及随访 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,率的检验采用 χ^2 检验, Kaplan-Meier 法计算生存率, Log-rank 检验进行单因素分析,多因素分析利用 Cox 回归模型进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。生存时间定义为:自手术治疗之日至末次随访日或死亡的时间,以年为单位计算。失访或随访截止时仍存活者视为截尾数据,随访终止日期为 2017 年 1 月 1 日。

2 结果

2.1 DLG5 在肺腺癌中的表达情况及与临床特征的关系 免疫组化法检测 DLG5 表达如图 1, DLG5 阳性表达定位于细胞膜上。122 例肺腺癌的基本临床病理特征如表 1。分析 122 例患者中, DLG5 表达与性别、年龄、吸烟史、T 分期无相关性,而与淋巴结转移 ($P=0.003$)、TNM 分期 ($P=0.003$) 及复发转移 ($P=0.000$) 相关,结果如表 2 所示。I 期肺腺癌患者 DLG5 阳性表达率明显高于Ⅲ A 期患者。



A: DLG5阳性表达



B: DLG5阴性表达

图 1 免疫组化检测 DLG5 在肺腺癌组织表达情况

表 1 肺腺癌患者临床病理资料情况

项目	例数	百分比 (%)
性别		
男性	54	44.3%
女性	68	55.7%
年龄		
<65岁	73	59.8%
≥65岁	49	40.2%
吸烟史		
吸烟	24	19.7%
不吸烟	98	80.3%
T分期		
T1	36	29.5%
T2	73	59.8%
T3	13	10.7%
N分期		
N0	79	64.8%
N1	3	2.4%
N2	40	32.8%
TMN分期		
I	79	64.8%
IIIA	43	35.2%

表 2 122 例肺腺癌标本中 DLG5 阳性表达与临床因素的关系

临床因素	DLG5		P	
	阴性	阳性		
性别	男	24	30	0.086
	女	20	48	
年龄	< 65 岁	24	49	0.371
	≥ 65 岁	20	29	
吸烟史	是	10	14	0.524
	否	34	64	
T 分期	T1	12	24	0.916
	T2	27	46	
	T3	5	8	
淋巴结转移	N0	21	58	0.003
	N1-2	23	20	
TNM 分期	I 期	21	58	0.003
	IIIA	23	20	
复发转移	否	18	57	0.000
	是	26	21	

2.2 DLG5 在肺腺癌和癌旁肺组织中的表达情况 运用 Western blotting 方法随机检测 20 对肺腺癌和癌旁组织中 DLG5 的表达情况，并进行三次实验重复验证，结果显示 DLG5 在肺腺癌中的阳性表达率明显低于癌旁组织（T 代表肿瘤，N 代表癌旁组织），随机选取其中四对标本的结果如图 2（灰度值标识于图 2）所示。

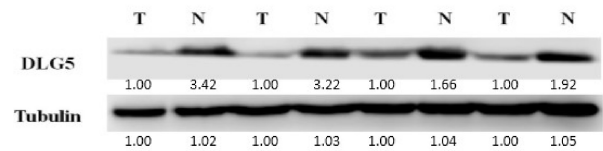


图 2 Western blot 检测肺腺癌和癌旁组织中 DLG5 的表达情况

2.3 DLG5 在肺腺癌组织中的表达及与预后的关系 患者总体中位生存期为 51.0 个月，95% CI (34.526, 67.474)，1、2 和 5 年生存率分别为 83.6%、65.5% 和 43.9%。DLG5 表达阴性的患者，中位生存期明显短于表达阳性的患者（20.0 个月 vs 67.0 个月），差异有统计学意义 ($\chi^2=8.522, P=0.004$)。

2.4 患者生存的预后因素分析 应用 Kaplan-Meier 法对 122 例肺腺癌患者相关因素进行单因素分析显示：性别、年龄、吸烟史对患者生存率的影响无统计学意义 ($P>0.05$)。而 DLG5、T 分期及 TNM 分期对患者生存率的影响有明显统计学意义 ($P<0.05$) (如表 3)。

表 3 肺腺癌患者的预后因素的单因素分析结果

项目	例数	5 年 OS (%)	P	
性别	男性	54	39.7	0.861
	女性	68	44.9	
年龄	< 65 岁	73	46.5	0.42
	≥ 65 岁	49	39.7	
吸烟史	有	24	40.2	0.485
	否	98	45.8	
T 分期	T1	36	53.8	0.001
	T2	73	41.5	
	T3	13	0.0	
N 分期	N0	79	57.2	0.000
	N1-2	43	19.8	
TNM 分期	I	79	57.2	0.000
	IIIA	43	19.8	
DLG5	+	78	51.1	0.004
	-	44	28.1	

对上述进行单因素分析的因素，包括年龄、性别、吸烟史、T 分期、N 分期、TNM 分期以及 DLG5 的表达，纳入 Cox 回归模型，行多因素分析显示：DLG5 ($P=0.000$) 和 TNM 分期 ($P=0.018$) 是肺腺癌独立的预后影响因素，其生存曲线分别如图 3、图 4 和表 4 所示。

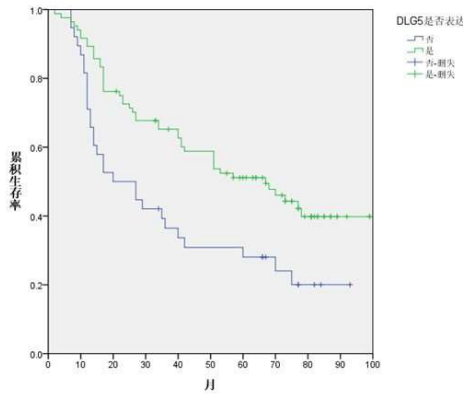


图 3 肺腺癌患者中不同 DLG5 表达的生存曲线

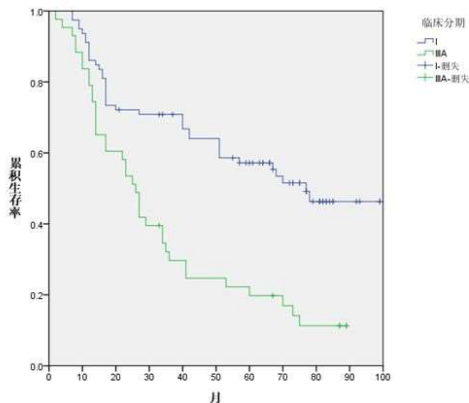


图 4 不同 TNM 分期肺腺癌患者的生存曲线

表 4 肺腺癌患者的预后因素的多因素分析结果

项目	HR	95% CI	P
TNM (I/IIIA)	0.567	0.354-0.908	0.000
DLG5	2.514	1.582-3.994	0.018

3 讨论

盘状大同源物 5 (DLG5) 是膜相关鸟苷酸激酶 (MAGUK) 家族成员 [2]。MAGUK 蛋白包括催化失活鸟苷酸激酶结构域，PDZ 结构域和 SH3 结构域 [2,8]，所有这些结构域都与蛋白-蛋白间的相互作用相关，因此支持 DLG5 是一种多功能调节蛋白和支架蛋白。Tomiyama 等研究发现 DLG5 可以与 Vixin 蛋白相结合，并且发现 DLG5 可以与 β -连环蛋白在细胞膜共定位 [9]。DLG5 还可以与其他蛋白相结合，包括 p55、KIF20A、syntaxin 4 和柠檬酸激酶 [2-4,6]。DLG5 具有许多重要的生理作用，DLG5 在调节细胞迁移和维持上皮细胞极性方面发挥了重要作用 [6,10,11]。基因敲除小鼠模型发现 DLG5 是维持细胞极性和细胞间粘附连接的必需蛋白 [6]。DLG5 参与构成细胞的紧密连接，并且在哺乳动物大脑、肾脏 [6] 和肺 [11] 上皮细胞的极性维持中发挥了重要作用。近期研究发现 DLG5 可以通过减弱 TGF- β [12-13] 信号通路抑制肾上皮细胞和前列腺上皮细胞发生上皮间质转化 (EMT)。在许多侵袭性强的恶性肿瘤中也检测到 DLG5 表达下调 [9-10,14-15]。Tomiyama 等研究发现慢病毒敲除 DLG5 可以使前列腺癌细胞的侵袭和转移能力明显增强 [9]。Smolen 等研究发现高组织学分级和预后较差的乳腺癌组织 DLG5 表达下调，并且敲除 DLG5 可以诱导乳腺上皮细胞迁移 [10]。本研究通过运用免疫组化方法检测了 210 例 I 期和 IIIA 期肺腺癌组织中 DLG5 的表达情况，DLG5 表达与淋巴结转移呈负相关。并且进一步运用 Western blot 方法检测发现肺腺癌组织中 DLG5 的阳性表达率明显低于癌旁组织。这些研究结果提示我们 DLG5 可能作为一种抑癌因子发挥作用。

目前国内外有关 DLG5 与肿瘤预后的相关研究较少，Ke 等研究发现人肝细胞癌组织中 DLG5 的表达量明显低于癌旁非肿瘤组织，并且肝细胞癌细胞中 DLG5 的表达量也明显低于正常肝细胞。进一步研究发现 DLG5 低表达与肝细胞癌较晚分期，较短总生存期 (OS) 和 DFS (disease-free survival) 相关，体内实验结果表明，DLG5 过表达可以显著抑制肝细胞癌肝内转移和肺转移，

DLG5 可以作为 HCC 患者的预后预测因子^[16]。Liu 等^[17] 研究发现与乳腺癌组织相比, DLG5 在正常乳腺组织中的表达量明显增加, DLG5 在低级别乳腺癌组织中的表达量明显高于高级别肿瘤组织, 在 I 期乳腺癌组织中的表达量高于 II 期, 而 II 期高于 III 期。我们的研究结果显示 IIIA 期肺腺癌组织中 DLG5 的阳性表达率明显低于 I 期患者。DLG5 表达阴性的患者, 中位生存期明显短于表达阳性的患者 (20.0 个月 vs 67.0 个月), 差异有统计学意义 ($\chi^2=8.522, P=0.004$)。生存分析显示 DLG5 是肺腺癌的独立预后影响因素。这些研究表明 DLG5 可能作为肺癌预后的预测因子。

我们的研究发现肺腺癌组织中 DLG5 的阳性表达率明显低于癌旁肺组织, DLG5 与肺腺癌淋巴结转移相关, DLG5 是肺腺癌的独立预后影响因素。同时我们的结果也显示 TNM 分期也是影响非小细胞肺癌预后独立的因素, 随着分期的推后, 预后逐渐变差, 因此合理精确的分期能够指导术后恰当的综合治疗。目前随着综合治疗手段的不断提升, 包括靶向治疗、免疫治疗, 另外随着整个人群健康意识的提高, 生活方式的改变与调整, 可能都会对非小细胞肺癌患者预后产生一定的影响。

许多研究进一步探讨了 DLG5 在肿瘤侵袭转移中的可能机制。Ke 等运用基因敲除技术沉默正常人肝细胞 HepG2 DLG5 的表达后, 促进了 HepG2 细胞发生 EMT 和伪足形成, 并增强了伪足相关的侵袭能力^[16]。Liu 等研究发现 DLG5 表达缺失可以诱导乳腺癌细胞发生 EMT, 表现为 ZO1 表达减低而 Vimentin 表达增加。并且 DLG5 表达缺失可以扰乱上皮细胞极性, 进而增强乳腺癌细胞的侵袭转移能力^[17]。Tomiyame 等研究发现 DLG5 可以与 Girdin 相互作用, 抑制 Girdin 的活性, 进而抑制前列腺癌细胞的迁移能力^[9]。我们将进一步探讨 DLG5 对肺腺癌侵袭转移能力影响的可能机制。

参考文献:

- [1] Piperdi B, Merla A, Perez-Soler R. Targeting angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. *Drugs*, 2014, 74(4): 403-413.
- [2] Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, et al. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55[J]. *Febs Letters*, 1998, 433 (1-2) : 63-67.
- [3] Chang Y, Klezovitch O, Walikonis RS, et al. Discs large 5 is required for polarization of citron kinase in mitotic neural precursors[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9 (10) : 1990-1997.
- [4] Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, et al. Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell[J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (1) : 105-112.
- [5] Sezaki T, Inada K, Sogabe T, et al. Role of Dlg5/lp-dlg, a membrane-associated guanylate kinase family protein, in epithelial-mesenchymal transition in LLC-PK1 renal epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (4) : e35519.
- [6] Nechiporuk T, Fernandez TE, Vasioukhin V. Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in Dlg5^{-/-} mice[J]. *Dev Cell*, 2007, 13 (3) : 338-350.
- [7] Sezaki T, Tomiyama L, Kimura Y, et al. Dlg5 interacts with the TGF-beta receptor and promotes its degradation[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587 (11) : 1624-1629.
- [8] Shah G, Brugada R, Gonzalez O, et al. The cloning, genomic organization and tissue expression profile of the human DLG5 gene[J]. *BMC Genomics*, 2002, 3: 14.
- [9] Tomiyama L, Sezaki T, Matsuo M, et al. Loss of Dlg5 expression promotes the migration and invasion of prostate cancer cells via Girdin phosphorylation[J]. *Oncogene*, 2015, 34 (9) : 1141-1149.
- [10] Smolen GA, Zhang J, Zubrowski MJ, et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple RSK-dependent regulators of cell migration[J]. *Genes Dev*, 2010, 24 (23) : 2654-2665.
- [11] Nechiporuk T, Klezovitch O, Nguyen L, et al. Dlg5 maintains apical aPKC and regulates progenitor differentiation during lung morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2013, 377 (2) : 375-384.
- [12] Sezaki T, Inada K, Sogabe T, et al. Role of Dlg5/lp-dlg, a membrane-associated guanylate kinase family protein, in epithelial-mesenchymal transition in LLC-PK1 renal epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (4) : e35519.
- [13] Sezaki T, Tomiyama L, Kimura Y, et al. Dlg5 interacts with the TGF-beta receptor and promotes its degradation[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587 (11) : 1624-1629.
- [14] Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, et al. Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection[J]. *Oncogene*, 2004, 23 (11) : 2385-2400.
- [15] Zhou Z, Guo Y, Liu Y, et al. Methylation-mediated silencing of Dlg5 facilitates bladder cancer metastasis[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 331 (2) : 399-407.
- [16] Ke Y, Bao T, Zhou Q, et al. Discs large homolog 5 decreases formation and function of invadopodia in human hepatocellular carcinoma via via Girdin and Tks5[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(2): 364-376.
- [17] Liu J, Li J, Ren Y, et al. DLG5 in cell polarity maintenance and cancer development[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(5): 543-549.

(收稿: 2019-03-06 修回: 2019-04-10)

(审理专家: 孔 隼)