

DOI: 10.13376/j.cbls/2014152

文章编号: 1004-0374(2014)10-1057-10

肿瘤转移抑制基因*BRMS1*的表达分析及机制研究进展

刘雪妮, 田 恬, 乔晓京, 乔守怡*, 吴燕华*

(复旦大学生命科学学院, 上海 200433)

摘 要: 乳腺癌转移抑制基因 1 (*BRMS1*) 是一个有活性的肿瘤转移抑制基因, 参与抑制乳腺癌、黑素瘤、鼻咽癌、非小细胞肺癌、卵巢癌等恶性肿瘤的转移。*BRMS1* 编码蛋白主要通过转录调控转移相关靶基因, 参与调节细胞凋亡、细胞通讯、肿瘤血管新生等多种细胞事件。从 *BRMS1* 基因的分子结构、表达调控、生物学功能以及转移抑制机理等方面对 *BRMS1* 的研究进展做简要回顾。

关键词: 乳腺癌转移抑制基因 1; 肿瘤转移; 转录调控; 细胞凋亡; 细胞通讯; 肿瘤血管新生

中图分类号: Q255; R73-3; R730.231 文献标志码: A

Research progress on the expression analysis and mechanism exploration of tumor metastasis suppressor gene *BRMS1*

LIU Xue-Ni, TIAN Tian, QIAO Xiao-Jing, QIAO Shou-Yi*, WU Yan-Hua*

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Breast cancer metastasis suppressor 1 (*BRMS1*) has been demonstrated to be an active metastasis suppressor gene, showing metastasis suppressive role in breast cancer, melanoma, nasopharyngeal carcinoma, non-small cell lung cancer, ovarian cancer, and etc. It has been revealed that *BRMS1* protein is able to transcriptionally regulate metastasis-related genes, further to regulate multiple cell events including cell apoptosis, cell communication, tumor angiogenesis, and etc. Herein, the molecular structure, expressional regulation, biological function and metastasis suppression mechanism of *BRMS1* gene are briefly reviewed.

Key words: breast cancer metastasis suppressor 1; tumor metastasis; transcriptional regulation; cell apoptosis; cell communication; tumor angiogenesis

肿瘤是威胁全球人类健康的首要杀手, 而肿瘤转移是造成临床肿瘤患者预后差、肿瘤复发, 甚至死亡的主要原因。肿瘤转移指的是恶性肿瘤细胞脱离其原发灶, 通过循环系统转移到新的靶组织并增殖生长成肿瘤的过程。一般来说, 肿瘤转移需要经过多个必需步骤, 包括细胞从原发灶逃脱, 穿越细胞外基质屏障, 进入血液或淋巴液循环并存活, 入侵到另一器官组织, 增殖扩大形成转移灶等。研究发现, 肿瘤转移促进基因 (tumor metastasis promoting gene) 和肿瘤转移抑制基因 (tumor metastasis suppressor gene) 是肿瘤转移级联过程的特异调控因子。已鉴定的转移促进基因包括 *VEGF*、*MMPs*、*Ras*、*Mts1*、*Mt11* 等^[1], 转移抑制基因包括 *NM23*、*GSN*、*KISS-1*、*E-cadherin* 等^[2]。本文将重点回顾乳腺癌转移抑制

基因 1 (breast cancer metastasis suppressor 1, *BRMS1*) 在肿瘤转移调控中的功能与机制, 并探讨 *BRMS1* 应用于转移性肿瘤治疗的前景与干预方法。

1 *BRMS1*基因概况

1.1 *BRMS1*基因结构

BRMS1 与恶性肿瘤之间的联系首先报道于乳腺癌, 研究者发现染色体 11q13 的扩增和缺失对乳

收稿日期: 2014-05-06; 修回日期: 2014-05-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31000558); 上海市教委“晨光”计划(2012年)

*通信作者: E-mail: syqiao@fudan.edu.cn; Tel: 021-65643716(乔守怡); yanhuawu@fudan.edu.cn; Tel: 021-65643298(吴燕华)

腺癌影响最大,且此区域的多个已知基因参与了乳腺癌的发生和转移进程。2000年, Seraj 等^[3]从缺失区域克隆了一个新颖的功能基因——*BRMS1*。该基因位于11q13.1~q13.2,全长10 kb。2002年, Saman 等^[4]克隆了小鼠 *brms1* 基因,长度为8.5 kb,位于小鼠的第19号染色体上,并发现 *BRMS1* 和 *brms1* 的cDNA和蛋白质序列的相似度分别为85%和95%,而且 *BRMS1* 和 *brms1* 的基因结构、上游调控元件、外显子(内含子)数目以及剪接位点都非常相似。

2013年, Song 等^[5]在果蝇中克隆了 *BRMS1* 的同源基因 *dBrms1*,其编码蛋白 *dBrms1* 与 *BRMS1* 的相似度为66%,并发现 *dBRMS1* 缺失会导致果蝇在发育早期死亡, *dBRMS1* 突变会引起果蝇生长发育迟缓,不能开始变态发育。

1.2 *BRMS1*的mRNA结构

BRMS1 的 mRNA 有多个可变剪接体。其中, *BRMS1.v1* (通常用 *BRMS1* 表示) 是主要表达的剪接体,包含全部10个外显子,CDS全长741 bp,编码246个氨基酸。*BRMS1.v2* 在第10个外显子处有一个可变剪接位点,CDS全长为872 bp。*BRMS1.v3* 在第5个外显子处有一个可变剪接位点,缺少第6~9号外显子,CDS全长为376 bp。*BRMS1.v4* 在第10个外显子处有个可变剪接位点,缺少第9号外显子,CDS全长为800 bp。Hurst 等^[6]研究发现, *BRMS1* 的4种可变剪接体在不同类型的乳腺上皮细胞中分布不同: *BRMS1* 和 *BRMS1.v3* 在 MCF10A、MCF10AT、MCF10Ca.1、MCF10Cad.1 α 细胞中有分布,而 *BRMS1.v2* 和 *BRMS1.v4* 只分布于 MCF10A 和 MCF10AT 细胞中。

2013年, Wu 等^[7]在肝癌细胞及组织样品中报道了一个新的剪接本 *BRMS1.vh*。*BRMS1.vh* 缺少第7号外显子,编码215个氨基酸。*BRMS1.vh* 的生物学活性与 *BRMS1* 类似,但在抑制 RelA/p65 的乙酰化以及 NF- κ B 的反式激活水平方面具有更强的活性,也因此, *BRMS1.vh* 可抑制肝细胞癌原位瘤的生长。

1.3 *BRMS1*蛋白结构

BRMS1 编码蛋白 *BRMS1* 的相对分子质量为 2.85×10^4 ,由246个氨基酸组成,但是用 SDS-PAGE 测得的 *BRMS1* 的相对分子质量为 3.5×10^4 ,提示 *BRMS1* 可能受到修饰^[6]。*BRMS1* 有两个卷曲-卷曲基序(coiled-coiled motif, CC),分别位于N端(CC1, 51~98 aa)及C端(CC2, 130~187 aa),可形成

低聚化的卷曲-卷曲。CC结构域同样可以介导 *BRMS1* 与其他蛋白质的相互作用,如 *BRMS1* 可利用 CC1 与分选微管连接蛋白(sorting nexin 6, SNX6) 的 CC 相互作用,利用 CC2 可与 Sin3·HDAC (switch-independent 3/histone deacetylase) 复合体的 ARID4 相互作用^[8-9]。

BRMS1 蛋白有两个核定位信号(nuclear localization signal, NLS),都参与调节 *BRMS1* 的入核,NLS1 位于198~205 aa, NLS2 位于239~245 aa^[10]。NLS2 对 *BRMS1* 的转移抑制活性是必需的^[11]。此外, *BRMS1* 还有一个核输出信号(nuclear export signal, NES),位于71~95 aa,包含在CC内。当 *BRMS1* 的CC1低聚化时,隐藏了NES信号, *BRMS1* 不能从细胞核中输出;而当 *BRMS1* 低聚化的CC1解聚时,暴露出NES信号,可从细胞核转运到细胞质^[9]。

此外,结构域预测还发现 *BRMS1* 蛋白的138~174 aa 区域有几个不完全的含锌指的亮氨酸拉链。 *BRMS1* 的N端含有谷氨酸富集区,可能是酸性的反式激活的结构域,可调节组织特异性基因表达。*BRMS1* 内部有几个cAMP/cGMP结合位点以及蛋白激酶C、酪蛋白激酶II的磷酸化位点,但未发现糖基化位点^[11-12]。

2 *BRMS1*基因的表达调控

2.1 *BRMS1*基因的表达特征

2000年, Seraj 等^[3]利用 Northern blot 检测了 *BRMS1* 在人多种正常组织中的 mRNA 表达水平,结果显示 *BRMS1* 在正常组织中广谱表达,其中睾丸、脾脏、胰腺和前列腺的表达水平最高,而脑、肺和心脏的表达水平最低。Liu 等^[13]在正常支气管上皮细胞 NL-20 以及非小细胞肺癌患者的癌旁正常组织样品中检测到 *BRMS1* 较高的蛋白表达水平。此外,在乳腺癌、黑素瘤、鼻咽癌、肝癌等多种肿瘤组织的表达分析中均检测到 *BRMS1* 在癌旁正常组织中表达。*BRMS1* 在正常组织中的广谱表达提示 *BRMS1* 对于正常细胞活动非常重要。

大量的研究工作显示, *BRMS1* 基因的表达变化与肿瘤发生发展的关系非常密切。*BRMS1* 在鼻咽癌细胞、卵巢癌上皮细胞中的 mRNA 和蛋白水平表达显著低于正常的上皮细胞^[14-15]。在黑素瘤、乳腺癌、膀胱癌、肝癌及肺癌等多种癌症中, *BRMS1* 在转移瘤中的表达显著下调^[3,16-19]。但是, Frolova 等^[20]发现 *BRMS1* 基因的蛋白表达水平在原位乳腺癌和转移瘤中的表达水平相似,都显著高于正常的

乳腺上皮细胞。Zhang 等^[21]发现在乳腺癌中, *BRMS1* 的 mRNA 含量与患者年龄、肿瘤直径、孕酮受体 (progesterone receptor, PR) 与人表皮生长因子受体 2 (HER2) 有关。当患者年龄大于 50 岁, 肿瘤直径小于 2 cm, PR 阳性和 HER2 过量表达时, *BRMS1* 的 mRNA 含量显著性地维持在高水平。

因此, 肿瘤类型、样本来源的不同是造成 *BRMS1* 基因组织表达谱不同的可能原因之一。另一方面, 无论是 mRNA 还是蛋白的检测目前均没有区分不同类型的 *BRMS1* 剪接本, 而逐渐有证据显示 *BRMS1* 基因的不同剪接体在肿瘤发生发展过程中的角色不尽相同。

近期的研究工作进一步揭示, 位于细胞核和细胞质的 *BRMS1* 基因产物在肿瘤发生发展中的组织表达谱也有重要的差异。Frolova 等^[20]发现在发生腋下淋巴结转移的乳腺癌患者中, *BRMS1* 在细胞核内的蛋白表达水平显著高于正常上皮组织, 但细胞质内的蛋白水平则出现明显下降。Slipicevic 等^[22]在黑素瘤样本的表达相关性分析中发现, 高水平的细胞质 *BRMS1* 蛋白与无病存活率之间存在正相关, 而高水平的细胞核 *BRMS1* 蛋白与无复发存活率之间存在负相关。不仅如此, 细胞质的 *BRMS1* 水平与核内的磷酸化 AKT 水平存在负相关, 而细胞核的 *BRMS1* 水平与黑素瘤侵袭标记分子 FABP7 存在正相关^[23]。这些发现强烈提示, *BRMS1* 基因的生物学作用可能与其在细胞中的位置有重要联系。综上, 更加精细和全面的表达谱分析将为 *BRMS1* 基因的生物学功能研究, 以及转移诊断标记物的开发提供重要信息。

2.2 *BRMS1* 基因的表达调控

2.2.1 染色质水平的调控

如前所述, 乳腺癌患者的肿瘤细胞常携带染色体畸变, 而在 40%~65% 的乳腺癌患者中可见染色体 11q 丢失。*BRMS1* 基因位于 11q13.1~q13.2, 因此, 11q13 区染色体的扩增或者缺失都会影响 *BRMS1* 的表达, 进而影响 *BRMS1* 的肿瘤转移抑制作用^[3]。

2.2.2 表观水平的调控

BRMS1 基因的启动子上有两个 CpG 岛, 分别是 CG1 (-3,477→-2,214) 和 CG2 (-531→+608)^[24]。Nagji 等^[24]发现在非小细胞肺癌患者的肿瘤细胞中, *BRMS1* 的 CG2 相对于癌旁正常组织出现高甲基化, 而 CG1 的甲基化没有明显差异, 且 *BRMS1* 启动子的甲基化水平与患者年龄、性别、组织类型有关。此外, *BRMS1* 启动子甲基化水平还与非小细胞肺癌

患者是否吸烟有关, 过多的摄入尼古丁可能是 *BRMS1* 启动子甲基化的诱因^[25-26]。除了非小细胞肺癌, 一些乳腺癌和黑素瘤的样本分析也发现了 *BRMS1* 启动子的异常甲基化^[26-27]。不同肿瘤中的 *BRMS1* 甲基化位点略有不同, 提示 CpG 岛的甲基化具有组织特异性。

2.2.3 蛋白质水平的调节

BRMS1 基因的 mRNA 水平和蛋白水平不是显著相关的^[6], 造成差异的可能原因是 *BRMS1* 蛋白稳定性的调控机制。已知 *BRMS1* 蛋白的稳定性受到泛素连接酶 Cul3-SPOP 和分子伴侣 Hsp90 (heat shock protein 90) 的调节。*BRMS1* 蛋白可通过接头蛋白 SPOP 与 Cul3 结合, 随后被泛素化, 通过蛋白酶体途径发生降解; 而分子伴侣 Hsp90 可稳定 *BRMS1*, 逃避蛋白酶体降解途径^[28-29]。

3 *BRMS1* 的功能

BRMS1 属于肿瘤转移抑制基因, 不影响原位肿瘤的生长但抑制肿瘤转移。2000 年, Seraj 等^[3]将 *BRMS1* 的 cDNA 导入转移性的 MDA-MB-435 细胞中, 可以显著抑制肺部转移瘤和淋巴结转移瘤的形成, 却不影响乳腺癌细胞的原位生长。后续的研究工作发现, *BRMS1* 在黑素瘤、非小细胞肺癌、鼻咽癌、卵巢癌等肿瘤中都表现出显著的转移抑制活性^[13-15,17]。现有的研究结果证明, *BRMS1* 在恢复细胞间隙通讯连接、增强细胞凋亡的敏感性、抑制癌细胞结构及生物力学的变化、血管形成、细胞的化学趋药性、细胞免疫应答方面都有作用。

3.1 恢复细胞间的同型细胞间隙连接

Saunders 等^[30]对 MDA-MB-435 细胞间的同型细胞间隙连接 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 进行含量测定, 发现 *BRMS1* 表达可以显著提高细胞间的 GJIC, 上调连接蛋白 Cx43 的表达, 下调连接蛋白 Cx32 的表达。随后 Kapoor 等^[31]研究发现, *BRMS1* 的表达可影响同型 GJIC, 但对异型 GJIC 无明显作用。由于肿瘤细胞的同型 GJIC 和异型 GJIC 的相对比例对肿瘤细胞转移具有重要作用, 因此, 推测 *BRMS1* 可能通过恢复细胞间的同型 GJIC 抑制肿瘤转移。

3.2 改变细胞的生物力学及生物化学性质

细胞的黏附力、弹力、硬度和 Young' 模量在肿瘤转移过程中发挥重要作用。Wu 等^[32]和 McEwen 等^[33]发现, *BRMS1* 过量表达的乳腺癌细胞的黏附力、弹力、硬度及 Young' 模量均有显著提高,

细胞外形为梭形, 表面光滑, 且细胞骨架平行, 不利于癌细胞浸润和转移。

3.3 增强细胞凋亡的敏感性

多项研究工作均提示 *BRMS1* 基因参与调节肿瘤细胞对凋亡刺激的敏感性。Phadke 等^[34] 首先在乳腺癌中发现, *BRMS1* 的表达可以提高促凋亡蛋白 Bim、Bcl-2 的表达, 增强细胞对脱巢凋亡刺激的敏感性, 降低转移过程中细胞的存活率。Hedley 等^[35] 发现, 表达 *BRMS1* 可以在体外提高乳腺癌细胞在低氧和脱巢条件下的细胞凋亡水平, 在体内降低转移至肺部血管中的肿瘤细胞的存活率。Wu 等^[16] 利用悬浮培养和血清饥饿这两种凋亡刺激诱导肝癌细胞凋亡, 发现表达 *BRMS1* 的细胞对抗凋亡刺激的能力均显著下降, 细胞内 caspase 活性显著提高; 进一步研究发现, *BRMS1* 蛋白可通过下调骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 的表达增强细胞凋亡。综上, *BRMS1* 可增强细胞对脱巢、低氧、压力诱导的多种凋亡刺激的敏感性, 降低肿瘤细胞的存活率, 从而抑制肿瘤转移。

3.4 抑制肿瘤血管新生

趋化因子受体 4 (chemokine receptor 4, CXCR4) 可通过刺激血管生成因子, 如血管内皮生长因子和 IL-6 的分泌而促进血管的生成。在卵巢癌和黑素瘤的研究工作中发现, *BRMS1* 蛋白可通过调节 NF- κ B 的转录活性抑制 CXCR4 及 IL-6 的表达, 从而抑制肿瘤血管新生^[36-37]。也有研究发现, *BRMS1* 的另一个转录调控靶基因 *OPN* 可以通过激活血管内皮细胞内的 PI3K/AKT 信号通路促进血管的形成^[38]。

4 *BRMS1* 的转移抑制调节机制

有关 *BRMS1* 肿瘤转移调节机制的研究主要围绕 *BRMS1*·Sin3·HDAC 复合物调节染色质转录水平以及 *BRMS1* 蛋白调节 NF- κ B 转录因子活性这两方面展开 (图 1)。此外, *BRMS1* 蛋白还与磷酸肌醇途径、蛋白质降解、蛋白质运输及细胞骨架等有重要联系。

4.1 与 mSin3·HDAC 相互作用

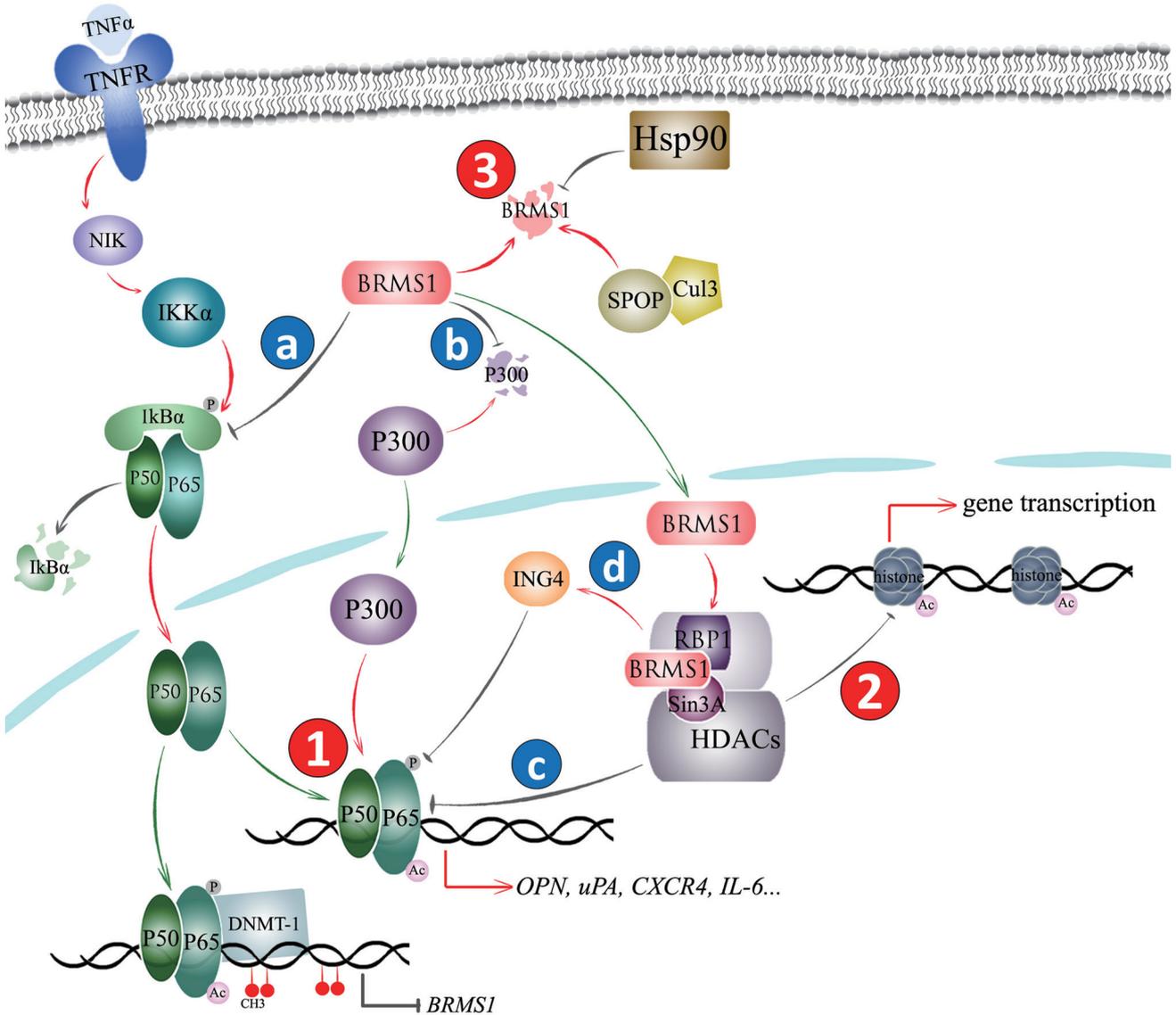
2004 年, Meehan 等^[39] 利用酵母双杂交技术, 以 *BRMS1* 表达克隆为诱饵, 以人的乳腺、胎盘和前列腺的 cDNA 表达文库为猎物蛋白, 筛选 *BRMS1* 的互作蛋白。结果显示, 在正常人组织中, *BRMS1* 可以和视网膜母细胞瘤结合蛋白 (RBP1)、mSds3 等 mSin3a·HDAC1 复合物组分互作。后续的研究工作几乎都选择了出现 *BRMS1* 表达沉默的肿

瘤细胞进行转基因研究, 结果证明在多种肿瘤中, 外源表达的 *BRMS1* 可以通过参与 mSin3a·HDAC1 复合物调控特异染色质的转录水平, 从而影响与肿瘤转移相关的靶基因^[40-42]。*BRMS1* 通过 Sin3·HDAC 复合体调节的基因包括 *OPN*、*uPA*、*EGFR*、*PLAU*、*PI4P5K1A*、*FABP7*、*Cx43*、*Cx32* 等。Sin3·HDAC 利用 ARID4A (AT-rich interactive domain 4A) 和 SUDS3 (suppressor of defective silencing 3) 结构域与 *BRMS1* 相互作用^[23,43-44]。但有趣的是, *BRMS1* 与 Sin3·HDAC 复合物的互作并不是其转移抑制作用所必需的, 可能原因是 *BRMS1* 还可通过其他互作蛋白发挥作用, 或者 Sin3·HDAC 所介导的染色质重塑作用并不是 *BRMS1* 肿瘤转移抑制作用所必需的^[44]。因此, *BRMS1* 与 RBP1·Sin3·HDAC 复合物的功能联系还需要进一步研究。

BRMS1 还可通过 HDAC 复合体间接调节肿瘤相关 miRNA 的转录, 抑制促进肿瘤转移的 miRNA, 如 *miR-10b*、*miR-373* 和 *miR-520c* 等的表达, 促进抑制肿瘤转移的 miRNA, 如 *miR-146a*、*miR-146b*、*miR-335* 等的表达, 这些 miRNA 进一步可通过调控其他肿瘤转移相关基因控制肿瘤转移^[45]。例如, *BRMS1* 可上调 *miR-146a* 的表达, 而 *miR146a* 又可以抑制 IL-8、IL-6、基质金属蛋白酶等转移相关基因的表达, 间接影响肿瘤转移级联过程^[46]。

4.2 与 NF- κ B 信号通路的关系

BRMS1 蛋白与 NF- κ B 通路存在密切联系。*BRMS1* 可以抑制 NF- κ B 的基础转录活性和 TNF 诱导的转录活性, 从而抑制 NF- κ B 下游肿瘤转移相关基因的表达, 包括上述抗凋亡基因和促血管新生基因。目前已知 *BRMS1* 可以通过如下几种机制来抑制 NF- κ B 的活性。(1) 作为 HDAC1 或者 HDAC3 的共阻遏物。*BRMS1* 募集 HDAC 结合 NF- κ B, 引起 NF- κ B 的 RelA/p65 亚基的 K310 去乙酰化, 降低 RelA/p65 与靶基因启动子的结合能力, 抑制 NF- κ B 的反式激活转录活性, 下调靶基因 *OPN*、*uPA*、*CXCR4* 等的表达^[13,39,47]。(2) 抑制 I κ B α 的磷酸化。*BRMS1* 可特异性抑制 IKK α 复合体的活性, 导致 I κ B α 磷酸化水平和降解水平的下降, 阻止 RelA/p65 的入核, 抑制 NF- κ B 的转录激活活性^[39]。(3) *BRMS1* 的 E3 连接酶活性。NF- κ B 的转录共激活分子 CBP/P300 可磷酸化 RelA/p65 的 K310, 并提高 RelA/p65 的反式激活作用。*BRMS1* 的 CXD 序列具有 E3 连接酶活性, 可引起 CBP/P300 的多聚泛素化, 介导 CBP/P300 进入蛋白酶体降解途径,



(1) BRMS1蛋白主要通过调节NF-κB的转录活性发挥基因调控作用, 从而参与肿瘤转移的调节。a: BRMS1可通过抑制IKKα的活性, 而降低IκBα的磷酸化和降解水平, 导致RelA/p65不能入核, 最终引起NF-κB转录激活活性下降。b: BRMS1可通过它的E3连接酶活性降解NF-κB的转录共激活剂p300, 从而降低NF-κB的活性。c: BRMS1召集HDAC与NF-κB互动, 引起NF-κB的RelA/p65亚基的K310去乙酰化, 降低RelA/p65与靶基因启动子的结合能力, 抑制NF-κB的反式激活转录活性。d: BRMS1诱导NF-κB反式转录激活活性的抑制剂ING4的表达。(2) BRMS1与mSin3·HDAC形成复合体直接调节组蛋白的乙酰化水平, 最终调节下游靶基因的转录活性。(3) BRMS1的转录水平受到NF-κB和DNA甲基转移酶1(DNMT-1)的调节, BRMS1蛋白降解受到Hsp90和SPOP-Cul3的调节。

图1 BRMS1信号转导通路示意图

最终抑制 NF-κB 的活性^[13,48]。(4) 调节 NF-κB 的互作蛋白 ING4。BRMS1 可诱导细胞周期调节蛋白 ING4 的表达, 而 ING4 可与 NF-κB 直接相互作用并抑制其反式转录激活活性^[49]。(5) BRMS1 可通过与 Hsp27 形成复合体共同调节 NF-κB 的活性。体内实验发现, BRMS1 和 Hsp27 都可抑制 NF-κB 的活性。此外, Hsp27 也可抑制 TNFα 和 IKK 介导的

NF-κB 活性, 因此推测 BRMS1 可能和 Hsp27 形成复合体来调节 NF-κB 的活性, 从而促进凋亡基因和抑制促转移基因的表达^[50]。

NF-κB 可以转录调节多种肿瘤相关靶基因的表达, BRMS1 可通过抑制 NF-κB 调节肿瘤转移级联过程中的多种细胞行为与性质, 与 BRMS1 转移抑制活性相关的且受 NF-κB 调控的关键靶基因包括

OPN、*uPA*、*CXCR4*、*IL-6* 等。(1) *OPN* 是转移促进基因, 编码磷酸糖蛋白 *OPN*。敲除内源性 *OPN* 可以显著抑制 *BRMS1* 介导的肿瘤细胞的浸润和转移^[51]。在细胞水平, *OPN* 蛋白可以缓和凋亡压力对细胞的刺激, 赋予肿瘤细胞生长和生存优势^[13,16,27]。*OPN* 也可通过激活内皮细胞的 *PI3K/AKT* 活性诱导血管的新生。此外, 它还能影响细胞黏附、迁移、改变细胞外基质, 从而促进癌细胞的浸润和转移^[51]。*OPN* 的受体包括整合素 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_9\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$, 它们的表达也与肿瘤转移存在联系, 并同样受到 *BRMS1* 的调控^[51-52]。(2) *uPA* 是一种丝氨酸蛋白酶, 参与细胞外基质的重塑, 刺激无活性的血纤蛋白酶原转化为血纤蛋白溶酶, 降解细胞外基质蛋白成分如纤连蛋白、胶原蛋白、层黏连蛋白, 以及间接激活基质金属蛋白酶等, 从而调节细胞浸润^[39,53]。(3) *CXCR4* 是趋化因子受体。当 *CXCR4* 与细胞表面受体结合后, 可促进细胞沿着 *CXCR4* 的浓度梯度进行定向迁移。基质细胞源因子 (stromal cell-derived factor-1, *SDF-1*) 可与 *CXCR4* 结合, 属于癌细胞的归巢因子。*SDF-1/CXCR4* 信号通路参与肿瘤的局部浸润、转移以及转移灶细胞存活与增殖^[36-37]。(4) *IL-6* 是一种细胞因子, 参与增强体内免疫和其他细胞因子的分泌, 也参与肿瘤转移过程中的血管新生^[36,54]。

最近的一项研究显示, *BRMS1* 和 *NF- κ B* 通路之间存在双向调节, 即 *NF- κ B* 也能够调节 *BRMS1* 的基因表达。Liu 等^[55] 发现在肿瘤坏死因子 (*TNF- α*) 的刺激下, *RelA/p65* 亚基可以招募 DNA 甲基转移酶 1 (*DNMT-1*) 结合到 *BRMS1* 基因的启动子区, 诱导 *BRMS1* 启动子的甲基化, 抑制 *BRMS1* 的转录表达。

4.3 调节磷酸肌醇信号通路

磷酸肌醇和磷脂酰肌醇是细胞内钙浓度的重要调节因子。DeWald 等^[56] 发现, *BRMS1* 基因表达可显著特异性地下调磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate, *PIP2*) 水平, 进而抑制磷酸肌醇信号通路, 从而降低表皮生长因子 (epidermal growth factor, *EGF*) 和血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, *PDGF*) 诱导的细胞内钙离子的释放和流动。由于细胞内游离钙离子也可促进癌细胞的浸润和转移, 因此, *BRMS1* 可能通过下调磷酸肌醇信号通路而影响癌细胞的浸润和转移。

此外, *BRMS1* 还可以间接调节磷酸肌醇通路。表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 与配体结合后, 通过激活细胞内的 *PI3K/*

AKT 信号途径调节细胞内 *PIP2* 的水平。Vaidya 等^[57] 研究发现 *BRMS1* 表达可以下调 *EGFR* 的表达, 从而影响细胞内 *PIP2* 水平, 抑制钙流动, 影响肿瘤转移。Hurst 等^[46] 的研究显示, *BRMS1* 蛋白的转录调控靶基因 *miR146a* 和 *miR146b* 也可以通过抑制 *EGFR* 的表达间接调节磷酸肌醇通路。

4.4 *BRMS1* 的其他互作蛋白

BRMS1 可与分选微管连接蛋白 (*SNX6*) 相互作用, 从而增强 *BRMS1* 的转录调节活性^[58]。*SNX6* 可以调节 *TGF- β* 及 *EGF* 信号通路, 参与细胞内膜受体的运输。*SNX6* 与 *BRMS1* 在细胞质和细胞核内都可以发生直接相互作用, 复合物在内源 *HDAC1* 处聚集, 进而抑制依赖于 *BRMS1* 的下游基因的转录^[58]。但是, *SNX6* 是否是 *BRMS1*·*HDAC* 复合体的新成员, 或者是单独调节 *BRMS1* 转录抑制活性的互作蛋白, 这些问题尚需要进一步研究发现。

Hurst 等^[29] 利用酵母双杂交和免疫亲和层析技术筛选出了 *BRMS1* 的其他一些互作蛋白, 包括分子伴侣 *MRJ*、*Hsp90*、*Hsp70*, 转录因子 *CCG1* (*TAFII250*), *HDAC* 复合体组分 *BAF57*、*HDAC6* 等。

4.5 *BRMS1* 的其他表达相关蛋白

研究者利用基因芯片、质谱等高通量仪器筛选出大量与 *BRMS1* 基因表达存在相关的蛋白。Champine 等^[59] 通过芯片分析发现在 *MDA-MB-435* 细胞中过量表达 *BRMS1* 后, 与蛋白质折叠、运输和定位、信号转导、高尔基体结构和功能有关的基因的表达显著改变。Rivera 等^[60] 利用 2D-DIGE-MS (two-dimensional difference gel electrophoresis/mass spectrometry) 技术分析发现, *BRMS1* 与骨架蛋白丝切蛋白 1 (*cofilin1*, *COF1*) 的磷酸化、14-3-3 蛋白、骨形成蛋白受体 (bone morphogenetic protein receptor, *BMPR*) 和组织蛋白酶 D (*cathepsin D*, *CATD*) 的表达有关。在过表达 *BRMS1* 的细胞中, *COF1* 的磷酸化水平上升, 14-3-3- β 蛋白表达下调, F-肌动蛋白的稳定性显著上调。*BMPR* 是跨膜的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 *TGF- β* 家族成员, *BRMS1* 可能通过调节 *BMP* 途径影响细胞对生长因子信号的应答。而 *CATD* 可通过多种途径促进肿瘤增殖、浸润和转移, 在 *BRMS1* 高表达细胞株中 *CATD* 被显著抑制^[61-62]。

Cicek 等^[62] 利用 LC-tandem MS 和 MALDI-TOF 技术分析发现膜联蛋白 1、 $\alpha\beta$ 晶体蛋白等与 *BRMS1* 基因表达水平呈负相关。膜联蛋白 1 参与细胞生长、细胞凋亡、炎症反应、附着、膜运输和膜融合等生

物学过程。 $\alpha\beta$ 晶体蛋白基因可在乳腺癌中作为肿瘤转移抑制基因^[2]。此外, Rivera等^[60]还发现膜联蛋白2和膜联蛋白5与BRMS1呈负相关。

5 BRMS1基因表达在肿瘤预后中的作用

BRMS1基因在多种恶性肿瘤中的表达抑制现象提示BRMS1具有开发成为转移标记的可能性, 多项研究工作详细分析了该基因的表达水平与乳腺癌、卵巢癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌等肿瘤的预后、无病存活率、总体存活率及无瘤期的相关性。Zhang等^[21]对161个乳腺癌患者的初级浸润乳腺组织进行RT-PCR分析, 发现具有高的BRMS1 mRNA水平的乳腺癌患者的预后显著优于BRMS1低水平表达的患者, BRMS1的mRNA表达水平可能是一个独立的乳腺癌预后因子。Hicks等^[63]对238个乳腺癌患者的乳腺组织进行组织芯片和免疫组织化学分析, 发现在雌激素受体(estrogen receptor, ER)阴性、PR阴性、HER2过量表达的乳腺癌细胞中, BRMS1蛋白表达丢失的患者的无病存活率较差。

Li等^[54]采用组织芯片技术和免疫组织化学技术对41个异常色素痣、90个原位黑素瘤、47个转移性黑素瘤患者进行分析, 发现在晚期的原位黑素瘤和高转移性黑素瘤患者中, 具有较高BRMS1蛋白表达水平的患者的5年存活率显著高于低表达的患者。Cui等^[14]对鼻咽癌细胞进行BRMS1蛋白印迹分析, 发现BRMS1蛋白表达水平是远距离转移存活率和总体存活率的独立性预后因子, 且BRMS1基因的表达检测与TNM分期(tumor node metastasis stage)联用可以更好地用于鼻咽癌的预后。

Smith等^[19]对非小细胞肺癌患者的肺癌组织中的BRMS1的mRNA和蛋白水平检测, 发现BRMS1蛋白表达水平均与非小细胞肺癌患者的存活率有关。2014年, Balgkouranidou等^[64]检测了57个非小细胞肺癌组织及邻近的癌旁正常组织、74个非小细胞肺癌患者和健康人的癌组织质膜上游离DNA (cell-free DNA, cfDNA) 及邻近肺癌组织质膜上cfDNA的BRMS1启动子的甲基化水平, 并统计分析BRMS1启动子甲基化水平和预后性的关系, 发现在肺癌组织质膜上cfDNA的BRMS1启动子甲基化水平为非小细胞肺癌提供了重要的预后信息。

但是, 也有一些表达相关性研究工作认为BRMS1基因的表达水平与转移潜能无关。如Lombardi等^[65]对47例原发性乳腺癌的47个肿瘤组织、14个癌旁组织及15个转移性癌组织的BRMS1的mRNA水

平进行RT-PCR分析, 发现BRMS1的mRNA表达水平不仅和其他标准的乳腺癌预后因子之间没有相关性, 而且具有BRMS1高表达水平的患者的存活期反而较短。造成这些研究数据差异的原因可能与样本的遗传背景差异有关, 但也可能是由于BRMS1基因的蛋白和mRNA表达水平之间存在差异, 或者是不同组织器官的BRMS1的表达、功能及机制均有不同。总体上, BRMS1基因的表达水平在多数肿瘤中与预后、无病存活率、总体存活率有关, 但是这种相关性在不同样本中的程度不同。将BRMS1与其他肿瘤预后因子相互补充或许可以更好地预测肿瘤患者的存活率、存活时间等, 相应的研究工作也还有待进一步深入。

6 总结及展望

BRMS1的研究成果揭示BRMS1参与了肿瘤转移相关的多个环节, 在肿瘤转移调控中扮演了非常重要的角色。但是BRMS1实现肿瘤转移抑制的生化途径和分子机制还有待更加深入和全面的研究, 如位于细胞内不同位置的BRMS1的表达谱变化不同, 在肿瘤发生发展过程中, BRMS1蛋白在细胞质中和细胞核内的作用与机制还需要进一步研究。此外, 近年来新发现的BRMS1的E3连接酶活性是p300特异性的, 还是可以作用于其他肿瘤转移有关蛋白, 这一问题也值得进一步地研究发现。最后, 了解BRMS1的调控和转移抑制机制还可以提供控制恶性肿瘤的新思路, 如如何利用BRMS1表达分布变化对转移性肿瘤进行预测、诊断和预后, 能否通过恢复癌细胞内BRMS1的表达、干扰BRMS1的CC1低聚化或BRMS1·HDAC复合体活性的方式进行转移性肿瘤的治疗等。

[参 考 文 献]

- [1] Fidler IJ, Radinsky R. Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(3): 166-8
- [2] Bohl CR, Harihar S, Denning WL, et al. Metastasis suppressors in breast cancers: mechanistic insights and clinical potential. *J Mol Med: Berl*, 2014, 92(1): 13-30
- [3] Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, et al. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 2764-9
- [4] Samant RS, Debies MT, Shevde LA, et al. Identification and characterization of the murine ortholog (*brms1*) of breast-cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1). *Int J Cancer*, 2002, 97(1): 15-20
- [5] Song S, Yuan Y, Lu J, et al. The *Drosophila* ortholog of

- breast cancer metastasis suppressor gene, *dBrms1*, is critical for developmental timing through regulating ecdysone signaling. *Dev Biol*, 2013, 380(2): 344-50
- [6] Hurst DR, Xie Y, Edmonds MD, et al. Multiple forms of BRMS1 are differentially expressed in the MCF10 isogenic breast cancer progression model. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(2): 89-96
- [7] Wu J, Wang Y, Qiao X, et al. Cloning and characterization of a novel human BRMS1 transcript variant in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, 2013, 337(2): 266-75
- [8] Spinola-Amilibia M, Rivera J, Ortiz-Lombardia M, et al. The structure of BRMS1 nuclear export signal and SNX6 interacting region reveals a hexamer formed by antiparallel coiled coils. *J Mol Biol*, 2011, 411(5): 1114-27
- [9] Spinola-Amilibia M, Rivera J, Ortiz-Lombardia M, et al. BRMS151-98 and BRMS151-84 are crystal oligomeric coiled coils with different oligomerization states, which behave as disordered protein fragments in solution. *J Mol Biol*, 2013, 425(12): 2147-63
- [10] Rivera J, Megias D, Navas C, et al. Identification of essential sequences for cellular localization in BRMS1 metastasis suppressor. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6433
- [11] Hurst DR, Xie Y, Thomas JW, et al. The C-terminal putative nuclear localization sequence of breast cancer metastasis suppressor 1, *BRMS1*, is necessary for metastasis suppression. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55966
- [12] Meehan WJ, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1: update. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(1): 45-50
- [13] Liu Y, Smith PW, Jones DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 functions as a corepressor by enhancing histone deacetylase 1-mediated deacetylation of RelA/p65 and promoting apoptosis. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(23): 8683-96
- [14] Cui RX, Liu N, He QM, et al. Low BRMS1 expression promotes nasopharyngeal carcinoma metastasis *in vitro* and *in vivo* and is associated with poor patient survival. *BMC Cancer*, 2012, 12: 376
- [15] Zhang S, Lin QD, Di W. Suppression of human ovarian carcinoma metastasis by the metastasis-suppressor gene, *BRMS1*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2): 522-31
- [16] Wu Y, Jiang W, Wang Y, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 regulates hepatocellular carcinoma cell apoptosis via suppressing osteopontin expression. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42976
- [17] Shevde LA, Samant RS, Goldberg SF, et al. Suppression of human melanoma metastasis by the metastasis suppressor gene, *BRMS1*. *Exp Cell Res*, 2002, 273(2): 229-39
- [18] Seraj MJ, Harding MA, Gildea JJ, et al. The relationship of *BRMS1* and *RhoGDI2* gene expression to metastatic potential in lineage related human bladder cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis*, 2000, 18(6): 519-25
- [19] Smith PW, Liu Y, Siefert SA, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) suppresses metastasis and correlates with improved patient survival in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*, 2009, 276(2): 196-203
- [20] Frolova N, Edmonds MD, Bodenstein TM, et al. A shift from nuclear to cytoplasmic breast cancer metastasis suppressor 1 expression is associated with highly proliferative estrogen receptor-negative breast cancers. *Tumour Biol*, 2009, 30(3): 148-59
- [21] Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, et al. Reduced expression of the breast cancer metastasis suppressor 1 mRNA is correlated with poor progress in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6410-4
- [22] Slipicevic A, Holm R, Emilsen E, et al. Cytoplasmic BRMS1 expression in malignant melanoma is associated with increased disease-free survival. *BMC Cancer*, 2012, 12: 73
- [23] Hurst DR. Metastasis suppression by BRMS1 associated with SIN3 chromatin remodeling complexes. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(3-4): 641-51
- [24] Nagji AS, Liu Y, Stelow EB, et al. BRMS1 transcriptional repression correlates with CpG island methylation and advanced pathological stage in non-small cell lung cancer. *J Pathol*, 2010, 221(2): 229-37
- [25] Yang J, Shen Y, Liu B, et al. Promoter methylation of BRMS1 correlates with smoking history and poor survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2011, 74(2): 305-9
- [26] Metge BJ, Frost AR, King JA, et al. Epigenetic silencing contributes to the loss of BRMS1 expression in breast cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(7): 753-63
- [27] Metge BJ, Liu S, Riker AI, et al. Elevated osteopontin levels in metastatic melanoma correlate with epigenetic silencing of breast cancer metastasis suppressor 1. *Oncology*, 2010, 78(1): 75-86
- [28] Kim B, Nam HJ, Pyo KE, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is destabilized by the Cul3-SPOP E3 ubiquitin ligase complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(4): 720-6
- [29] Hurst DR, Mehta A, Moore BP, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is stabilized by the Hsp90 chaperone. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(4): 1429-35
- [30] Saunders MM, Seraj MJ, Li Z, et al. Breast cancer metastatic potential correlates with a breakdown in homospecific and heterospecific gap junctional intercellular communication. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1765-7
- [31] Kapoor P, Saunders MM, Li Z, et al. Breast cancer metastatic potential: correlation with increased heterotypic gap junctional intercellular communication between breast cancer cells and osteoblastic cells. *Int J Cancer*, 2004, 111(5): 693-7
- [32] Wu Y, McEwen GD, Harihar S, et al. BRMS1 expression alters the ultrastructural, biomechanical and biochemical properties of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells: an AFM and Raman microspectroscopy study. *Cancer Lett*, 2010, 293(1): 82-91
- [33] McEwen GD, Wu Y, Tang M, et al. Subcellular spectroscopic markers, topography and nanomechanics of human lung cancer and breast cancer cells examined by combined confocal Raman microspectroscopy and atomic force microscopy. *Analyst*, 2013, 138(3): 787-97
- [34] Phadke PA, Vaidya KS, Nash KT, et al. BRMS1

- suppresses breast cancer experimental metastasis to multiple organs by inhibiting several steps of the metastatic process. *Am J Pathol*, 2008, 172(3): 809-17
- [35] Hedley BD, Vaidya KS, Phadke P, et al. BRMS1 suppresses breast cancer metastasis in multiple experimental models of metastasis by reducing solitary cell survival and inhibiting growth initiation. *Clin Exp Metastasis*, 2008, 25(7): 727-40
- [36] Sheng XJ, Zhou YQ, Song QY, et al. Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 promotes ovarian cancer cell metastasis by increasing chemokine receptor 4 expression. *Oncol Rep*, 2012, 27(4): 1011-8
- [37] Yang J, Zhang B, Lin Y, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits SDF-1 α -induced migration of non-small cell lung cancer by decreasing CXCR4 expression. *Cancer Lett*, 2008, 269(1): 46-56
- [38] Dai J, Peng L, Fan K, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene*, 2009, 28(38): 3412-22
- [39] Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem*, 2004, 279(2): 1562-9
- [40] Cicek M, Fukuyama R, Cicek MS, et al. BRMS1 contributes to the negative regulation of uPA gene expression through recruitment of HDAC1 to the NF- κ B binding site of the uPA promoter. *Clin Exp Metastasis*, 2009, 26(3): 229-37
- [41] Laherty CD, Yang WM, Sun JM, et al. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell*, 1997, 89(3): 349-56
- [42] Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, et al. Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell*, 1997, 89(3): 341-7
- [43] Riker AI, Samant RS. Location, location, location: the BRMS1 protein and melanoma progression. *BMC Med*, 2012, 10(1): 19
- [44] Hurst DR, Xie Y, Vaidya KS, et al. Alterations of BRMS1-ARID4A interaction modify gene expression but still suppress metastasis in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, 2008, 283(12): 7438-44
- [45] Edmonds MD, Hurst DR, Vaidya KS, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 coordinately regulates metastasis-associated microRNA expression. *Int J Cancer*, 2009, 125(8): 1778-85
- [46] Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1279-83
- [47] Samant RS, Clark DW, Fillmore RA, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) inhibits osteopontin transcription by abrogating NF- κ B activation. *Mol Cancer*, 2007, 6: 6
- [48] Liu Y, Mayo MW, Nagji AS, et al. BRMS1 suppresses lung cancer metastases through an E3 ligase function on histone acetyltransferase p300. *Cancer Res*, 2013, 73(4): 1308-17
- [49] Li J, Li G. Cell cycle regulator ING4 is a suppressor of melanoma angiogenesis that is regulated by the metastasis suppressor BRMS1. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10445-53
- [50] Smith J, Naseem R, Webb M. Purification and characterization of the breast cancer metastasis suppressor, BRMS1. *Protein Expr Purif*, 2009, 67(2): 70-5
- [51] Hedley BD, Welch DR, Allan AL, et al. Downregulation of osteopontin contributes to metastasis suppression by breast cancer metastasis suppressor 1. *Int J Cancer*, 2008, 123(3): 526-34
- [52] Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, et al. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(3): 212-26
- [53] Cicek M, Fukuyama R, Welch DR, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 inhibits gene expression by targeting nuclear factor- κ B activity. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3586-95
- [54] Li J, Cheng Y, Tai D, et al. Prognostic significance of BRMS1 expression in human melanoma and its role in tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2011, 30(8): 896-906
- [55] Liu Y, Mayo MW, Nagji AS, et al. Phosphorylation of RelA/p65 promotes DNMT-1 recruitment to chromatin and represses transcription of the tumor metastasis suppressor gene *BRMS1*. *Oncogene*, 2012, 31(9): 1143-54
- [56] DeWald DB, Torabinejad J, Samant RS, et al. Metastasis suppression by breast cancer metastasis suppressor 1 involves reduction of phosphoinositide signaling in MDA-MB-435 breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 713-7
- [57] Vaidya KS, Harihar S, Phadke PA, et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 differentially modulates growth factor signaling. *J Biol Chem*, 2008, 283(42): 28354-60
- [58] Rivera J, Megias D, Bravo J. Sorting nexin 6 interacts with breast cancer metastasis suppressor-1 and promotes transcriptional repression. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6): 1464-72
- [59] Champine PJ, Michaelson J, Weimer BC, et al. Microarray analysis reveals potential mechanisms of BRMS1-mediated metastasis suppression. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24(7): 551-65
- [60] Rivera J, Megias D, Bravo J. Proteomics-based strategy to delineate the molecular mechanisms of the metastasis suppressor gene *BRMS1*. *J Proteome Res*, 2007, 6(10): 4006-18
- [61] Leto G, Tumminello FM, Crescimanno M, et al. Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: clinical and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(2): 91-106
- [62] Cicek M, Samant RS, Kinter M, et al. Identification of metastasis-associated proteins through protein analysis of metastatic MDA-MB-435 and metastasis-suppressed BRMS1 transfected-MDA-MB-435 cells. *Clin Exp Metastasis*, 2004, 21(2): 149-57

- [63] Hicks DG, Yoder BJ, Short S, et al. Loss of breast cancer metastasis suppressor 1 protein expression predicts reduced disease-free survival in subsets of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(22): 6702-8
- [64] Balgkouranidou I, Chimonidou M, Milaki G, et al. Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2014, 110(8): 2054-62
- [65] Lombardi G, Di Cristofano C, Capodanno A, et al. High level of messenger RNA for BRMS1 in primary breast carcinomas is associated with poor prognosis. *Int J Cancer*, 2007, 120(6): 1169-78