

# RT-PCR 分析 nm23 基因在乳腺肿瘤中的转录表达

易基群<sup>1</sup>, 方 燕<sup>1</sup>, 杨晓明<sup>2</sup>, 曾波航<sup>3</sup>

(1. 中山医科大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060; 2. 中山大学生物医药中心, 广东 广州 510275;  
3. 广州医学院第二附属医院肿瘤科, 广东 广州 510260)

**摘要:**【目的】探讨 nm23 基因 mRNA 在乳腺癌组织、乳腺良性肿瘤组织、癌旁组织中的表达及其与临床的关系。【方法】采用半定量 RT-PCR 方法, 检测 30 例乳腺癌组织、8 例配对癌旁组织、9 例慢性纤维囊性乳腺病和 6 例乳腺纤维腺瘤组织 nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 的表达。【结果】①淋巴结阳性的原发灶组织 nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达明显低于淋巴结阴性的原发灶组织, III 期乳腺癌组织 nm23H<sub>1</sub> mRNA 水平较 I、II 期明显低。②多因素分析发现淋巴结转移与 nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达有显著性相关。③nm23H<sub>2</sub> mRNA 与乳腺癌患者肿瘤大小、淋巴结状况、绝经状况、激素受体状况、TNM 分期之间无显著性相关。④ nm23 基因的两个亚型 H<sub>1</sub> 和 H<sub>2</sub> 的 mRNA 在 4 种不同乳腺组织中均有表达。【结论】nm23H<sub>1</sub> 基因 mRNA 表达强度与淋巴结转移呈负相关。在乳腺癌转移过程中, nm23H<sub>1</sub> mRNA 较 nm23H<sub>2</sub> mRNA 起更重要的作用。nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> 基因 mRNA 在乳腺纤维腺瘤、慢性纤维囊性乳腺病和癌旁组织均有表达。

**关键词:** 乳腺肿瘤; nm23H 基因; 基因表达

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)05-0345-03

## The Transcriptive Expression and Clinical Significance of nm23H Gene in Human Breast Carcinoma with RT-PCR Method

YI Ji-qun<sup>1</sup>, FANG Yan<sup>1</sup>, YANG Xiao-ming<sup>2</sup>, ZENG Bo-hang<sup>3</sup>. (1. Cancer Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China; 2. Biological and Medical Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China; 3. Oncology Department, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the expression and clinical significance of nm23H gene in human breast carcinoma, breast benign tumor and para-carcinoma tissue.【Methods】A semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was performed to detect the expressions of nm23H<sub>1</sub> and nm23H<sub>2</sub> mRNA in thirty specimens from human breast carcinoma, eight from para-carcinoma tissues, eight from chronic fibroadenosis and six from fibroadenomas.【Results】①The nm23 mRNA gene expression in primary breast cancer tissue with lymph node metastasis was lower than that without lymph node metastasis. The nm23H<sub>1</sub> mRNA level in stage I and II breast cancer was higher than that in stage III. ②Multivariate analysis showed a significant relationship between nm23H<sub>1</sub> mRNA expression and lymph node metastasis. ③There was no significant relation between nm23H<sub>2</sub> mRNA and tumor size, lymph node status, TNM stage, hormone receptor and menopausal status. ④Various degree of expressions for nm23H<sub>1</sub> and nm23H<sub>2</sub> mRNA could be found in fibroadenoma, para-carcinoma tissue and chronic fibroadenosis.【Conclusion】There is a significantly inverse correlation between nm23H<sub>1</sub> mRNA and lymph node metastasis. nm23H<sub>1</sub> appears to play a more important role than nm23H<sub>2</sub> in breast cancer metastasis.

**Key words:** breast neoplasms; nm23H; gene expression

nm23 基因是 Steeg 等<sup>[1]</sup>用差异克隆杂交技术, 在具有不同转移潜力的 7 种鼠 K-1735 黑色素瘤细胞系 cDNA 文库中克隆出来的一种转移抑制基因。人类 nm23 基因有 5 种亚型, 最早报道为 nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub><sup>[2]</sup> 两个亚型。nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达与多种肿瘤转移有关, nm23H<sub>2</sub> mRNA 与肿瘤的关系研究较少。这些研究多采用 Northern 杂交、原位杂交和免疫组织化学的方法, 而用 RT-PCR 方法检测乳腺癌 nm23 基因的报道较少。本

研究采用半定量 RT-PCR 方法, 检测 nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 在乳腺癌组织、乳腺良性肿瘤组织、癌旁组织中的表达, 比较不同患者其基因型表达的差异, 分析两个亚型表达与肿瘤的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象

标本取自中山医科大学附属肿瘤医院、广州医学院第二附属医院、广州医学院第一附属医院

收稿日期: 2001-08-31

基金项目: 广州市科委科研基金资助项目(96-2-70-2)

作者简介: 易基群(1966-), 女, 湖南武冈人, 硕士, 主治医师, 现在广州医学院第二附属医院肿瘤科工作。

1998年8月至1999年10月经病理确诊为乳腺浸润性导管癌的组织共30例。患者年龄35~80岁,中位年龄45.5岁,均为女性,其中I期10例,II期15例,III期12例,伴淋巴结转移20例,不伴淋巴结转移10例,配对癌旁组织8例,慢性纤维囊性乳腺病9例,乳腺纤维腺瘤6例。术中切取新鲜组织立即放入液氮中,然后转放-70℃冰箱储存备用。

### 1.2 方法

引物由上海生物化学研究所合成。nm23H<sub>1</sub>: 5' GCAGCCGCAGTTCAAACCTAA 3', 5' GCTGGG-AGGAAGCATTTTAATCA 3', nm23H<sub>2</sub>: 5' CAC-CTTCA TCACCATCAAGCCG 3', 5' CCACCTCT-TATTCATAGACCCA 3', β-actin: 5' CTTCTG-GGCATGGAGTCC 3', 5' CGCTCAGGAGGAGCA-ATGAT 3'。

用Trizol试剂提取100 mg组织中的总RNA。2 μg的总RNA用于RT-PCR反应。循环条件:变性94℃30 s,退火55℃35 s,延伸72℃1 min,共循环40次,最后1次循环增加延伸时间5 min。PCR扩增产物电泳结果直接置于凝胶分析仪中分析,测定每条带的粒子密度,以β-actin作内参照,nm23H<sub>1</sub>, nm23H<sub>2</sub>与β-actin的比值即为nm23H<sub>1</sub>, nm23H<sub>2</sub>的相对量。

### 1.3 统计学分析

资料以t检验和LSD多重比较等方法统计。全部分析在SPSS统计软件包上进行。

## 2 结果

### 2.1 nm23H<sub>1</sub> mRNA在乳腺癌浸润性导管癌中的表达

检测了30例乳腺浸润性导管癌原发灶nm23H<sub>1</sub> mRNA表达水平,发现nm23H<sub>1</sub> mRNA的表达强度

范围在0~1.76(0.65±0.49),其中2例经重复实验,仍未见表达。经t检验,提示淋巴结阳性组与阴性组之间表达有显著性差异(P=0.045),在TNM分期方面,II期组nm23H<sub>1</sub> mRNA表达低于I、II期组(P=0.01),肿瘤大小、激素受体、绝经状况因素nm23H<sub>1</sub> mRNA表达均无显著性差异(表1)。多因素分析用于评价nm23H<sub>1</sub> mRNA与淋巴结转移、激素受体(ER、PR)状况、肿瘤大小、绝经状况之间的关系,发现淋巴结转移与nm23H<sub>1</sub> mRNA表达有显著性相关(表2)。

表1 nm23H<sub>1</sub>和nm23H<sub>2</sub> mRNA表达强度与5种临床参数  
Table 1 The relation between mRNA expression of nm23H<sub>1</sub> and nm23H<sub>2</sub> and five clinicopathological factors

Clinicopathological	n	nm23H <sub>1</sub>	nm23H <sub>2</sub>
Lymph node			
+	20	0.51±0.49 <sup>1)</sup>	1.31±0.55 <sup>2)</sup>
-	10	0.92±0.38	1.62±0.73
Hormone receptor			
Estrogen receptor+	17	0.56±0.43 <sup>2)</sup>	1.38±0.56 <sup>2)</sup>
Estrogen receptor-	9	0.75±0.57	1.62±0.79
Progesterin receptor+	16	0.66±0.54 <sup>2)</sup>	1.53±0.55 <sup>2)</sup>
Progesterin receptor-	10	0.57±0.38	1.35±0.79
Menopausal status			
No	18	0.69±0.49 <sup>2)</sup>	1.45±0.52 <sup>2)</sup>
Yes	12	0.58±0.50	1.36±0.77
TNM stage			
I, II	18	0.87±0.48 <sup>1)</sup>	1.42±0.66 <sup>2)</sup>
III	12	0.32±0.28	1.41±0.59
Tumor size			
≤2 cm	6	0.76±0.46 <sup>2)</sup>	1.35±0.63 <sup>2)</sup>
>2 cm	24	0.59±0.51	1.41±0.71

1) P<0.05, 2) P>0.05

表2 多因素分析nm23H<sub>1</sub>和nm23H<sub>2</sub> mRNA与临床参数的关系

Table 2 Relationship between nm23H<sub>1</sub> and nm23H<sub>2</sub> and clinicopathological factors determined by multivariate analysis

Clinicopathological factor	nm23H <sub>1</sub>					nm23H <sub>2</sub>				
	B	SE	St. B	t	P	B	SE	St. B	t	P
Constant	1.22	0.36		3.37	0.01	1.61	0.56		2.87	0.01
Lymph node	-0.45	0.18	-0.46	-2.47	0.02	-0.26	0.28	-0.20	-0.94	0.36
ER	-0.42	0.24	-0.42	-1.78	0.09	-0.49	0.37	-0.37	-1.32	0.20
PR	0.38	0.25	0.38	1.53	0.14	0.41	0.39	0.31	1.07	0.30
Tumor size	-0.16	0.16	-0.19	-1.03	0.32	0.09	0.25	0.08	0.35	0.73
Menopausal	0.04	0.19	0.04	0.21	0.83	-0.20	0.29	-0.16	-0.68	0.50

ER: estrogen receptor PR: progesterin receptor; B: partial regression coefficient; SE: standard error; St. B: standardized coefficient

## 2.2 nm23H<sub>2</sub> mRNA 在乳腺癌浸润导管癌中的表达

乳腺浸润导管癌原发灶 nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达强度范围是 0.13~2.76(1.41±0.62)。经 *t* 检验,肿瘤大小、淋巴结状况、激素受体状况、绝经状况以及 TNM 分期在 nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达强度上无显著性差异;多因素分析, nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达与临床各参数之间无显著性相关(表 1, 2)。

## 2.3 nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 在各种组织中的表达情况

nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 在各种组织中均有不同程度的表达。经 LSD 多重比较分析,发现纤维腺瘤 nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达较乳腺癌和癌旁组织高( $P=0.01$ ,  $P=0.01$ ),慢性纤维囊性乳腺病 nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达高于癌旁组织( $P=0.02$ )(表 3)。乳腺癌与癌旁组织的 nm23 基因两个亚型 H<sub>1</sub> 和 H<sub>2</sub> mRNA 表达上,两者之间差异无显著性( $P=0.38$ ,  $P=0.21$ )。

表 3 不同组织之间 nm23H<sub>1</sub> mRNA 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 的 LSD 多重比较

Table 3 Multiple comparison of nm23H<sub>1</sub> mRNA and nm23H<sub>2</sub> mRNA in different tissues

I	J	nm23H <sub>1</sub>	nm23H <sub>2</sub>
		<i>P</i>	<i>P</i>
Breast cancer	Chronic fibroadenosis	0.49	0.07
Breast cancer	Fibroadenoma	0.01	0.72
Breast cancer	Para-carcinoma tissue	0.38	0.21
Chronic fibroadenosis	Fibroadenoma	0.08	0.10
Chronic fibroadenosis	Para-carcinoma tissue	0.21	0.02
Fibroadenoma	Para-carcinoma tissue	0.01	0.52

I, J: express two variable respectively

## 3 讨论

nm23 基因被发现以来,陆续有较多研究报道。在几种肿瘤动物模型研究中, nm23 基因具有抑制细胞活动和抑制转移灶肿瘤细胞生长作用<sup>[3]</sup>。在人类肿瘤研究中,不同的原发肿瘤有不同的结论。

郭文斌等<sup>[4]</sup>检测乳腺癌组织 nm23H<sub>1</sub> mRNA 基因表达,结果 nm23H<sub>1</sub> mRNA 高表达阳性率为

48.3%(29/60),其中淋巴结转移者(27.3%, 6/22)明显低于无转移者(60.5%, 23/38),二者间有显著性差异( $P<0.05$ )。本研究采用 RT-PCR 技术,试图明确乳腺癌原发灶组织 nm23H<sub>1</sub> mRNA 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达与临床关系。结果显示乳腺癌原发灶 nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达强度与淋巴结转移呈负相关, III 期的乳腺癌患者,肿瘤组织 nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达低于 I、II 期的患者,但与肿瘤大小、雌激素受体、孕激素受体、绝经状况无关,提示 nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达量减少可能发生在乳腺癌中晚期。本研究中, nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达则与淋巴结状况、TNM 分期、肿瘤大小、雌激素受体、孕激素受体、绝经状况无关,与文献报道相似<sup>[5]</sup>,提示 nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 在肿瘤转移中分别起着独立的生物学调节作用。与 nm23H<sub>2</sub> mRNA 相比,在乳腺癌转移过程中, nm23H<sub>1</sub> mRNA 较 nm23H<sub>2</sub> mRNA 起更重要的作用。nm23H<sub>1</sub> mRNA 表达与乳腺癌患者预后的关系,尚待进一步随访观察。

nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 在乳腺癌、癌旁组织、慢性纤维囊性乳腺病、纤维腺瘤中均有不同程度的表达。乳腺癌与癌旁组织之间, nm23H<sub>1</sub> 和 nm23H<sub>2</sub> mRNA 表达均无显著性差异。由于病例少,临床意义有待研究。

### 参考文献:

- [1] Steeg P S, Bevilacqua G, Kopper L, *et al.* Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential[J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(3): 200.
- [2] Stahl J A, Leone A, Rosengard A M, *et al.* Identification of a second human nm23 gene, nm23-H<sub>2</sub>[J]. Cancer Res, 1991, 51(1): 445.
- [3] Kantor J D, McCormick B, Steeg P S, *et al.* Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells [J]. Cancer Res, 1993, 53(9): 1971.
- [4] 郭文斌, 张嘉庆, 乔新民, 等. Nm23-H<sub>1</sub> mRNA 在人乳癌中表达与腋淋巴结转移的关系[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(5): 284.
- [5] Tokunaga Y, Umano T, Funakawa K, *et al.* Reduced expression of nm23-H<sub>1</sub>, but not of nm23-H<sub>2</sub>, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer [J]. Int J Cancer, 1993, 55(1): 66.

(编辑 黄小延)