

nm23-H1 与大肠癌淋巴结转移的相关性研究^①

李升平¹ 朱振宇² 王辉云³ 王吉甫¹ 朱全胜⁴ 刘锦怀⁵

(中山医科大学 1 附属第一医院外科 广州; 510080 2 生化教研室

3 肿瘤研究所 4 病理教研室 5 广州市第一人民医院)

摘要 目的: 探讨 *nm23-H1* 与大肠癌淋巴结转移的关系。方法: 利用限制性片段长度多态性、Southern blot 和免疫组织化学染色技术(LSAB 法), 检测 80 例大肠癌及正常粘膜 DNA 中 *nm23-H1* 杂合性缺失(*nm23-H1* LOH)和石蜡组织切片中 *nm23-H1* 蛋白表达。结果: 80 例中 45 例为杂合子, 其中 LOH 14 例, 9 例有淋巴结转移, 31 例无 LOH 者, 仅 6 例有淋巴结转移($P < 0.01$); *nm23-H1* 蛋白表达阴性 20 例中 11 例有淋巴结的转移, 表达阳性 25 例中 4 例有淋巴结转移($P < 0.01$)。 *nm23-H1* LOH 和 *nm23-H1* 蛋白表达阴性者在 Dukes C/D 期较 A、B 期多见($P < 0.05$)。 LOH 和蛋白表达与年龄、性别、肿瘤大小、部位、组织类型无关。结论: *nm23-H1* LOH 与大肠癌淋巴结转移呈正相关, 蛋白表达与大肠癌淋巴结转移呈负相关; 检测大肠癌组织 DNA 中 *nm23-H1* LOH 和组织切片中 *nm23-H1* 蛋白表达 可能成为预测大肠癌淋巴结转移的生物学指标之一。

关键词 基因, 抑制, 肿瘤; 基因表达; 结肠直肠肿瘤/诊断; 淋巴转移

中图分类号 R 735.34

CORRELATIVE STUDY OF *nm23-H1* GENE AND LYMPH NODE METASTASIS IN COLORECTAL CARCINOMA

Li Shengping¹ Zhu Zhengyu² Wang Huiyun³ Wang Jifu¹ Zhu Quansheng⁴ Liu Jinhui⁵

(1 Department of Surgery, First Affiliated Hospital 2 Department of Biochemistry 3 Cancer Institute 4 Department of Pathology of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080 5 First Municipal People's Hospital of Guangzhou)

Abstract Objective: To evaluate the relationship of *nm23-H1* gene and lymph node metastasis in colorectal carcinoma. **Methods:** Loss of heterozygosity (LOH) of *nm23-H1* gene including the samples of tumors and normal mucosa from 80 patients with colorectal carcinoma were tested by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and Southern blot. Expression of *nm23-H1* protein were also examined on formalin-fixed, paraffin-embedded sections from tumor samples of these patients by labelled streptavidin-biotin (LSAB) immunohistochemical technique. **Results:** 45 out of 80 patients were identified as heterozygosity, 14 out of 45 patients showed LOH of *nm23-H1* gene. The lymph node metastasis were found in 9 out of 14 patients with LOH and 6 out of 31 patients without LOH ($P < 0.01$). Positive staining of *nm23-H1* protein was observed in 25 patients and negative staining in 20 patients. 4 out of 25 patients with positive staining and 11 out of 20 patients with negative staining showed lymph node metastasis ($P < 0.01$). LOH and negative staining of *nm23-H1* protein were more frequently seen in Dukes C/D stage than in Dukes A, B stage ($P < 0.05$). LOH and expression of *nm23-H1* protein had no significant relation with age, sex, tumor size, location and histological type. **Conclusions:** LOH of *nm23-H1* gene were positively related to lymph node metastasis and expression of *nm23-H1* protein were negatively related to lymph node metastasis in colorectal carcinoma. Examining LOH of *nm23-H1* gene of tumor DNA and expression of *nm23-H1* protein on tumor sections may serve as one of the biological indicator for predict-

① 广州市卫生局科研基金(96002)和广东省青年科学基金(950355)资助项目

ing lymph node metastasis in colorectal carcinoma.

Subject headings gene, suppressor, tumor; gene expression; colorectal neoplasm/ diagnosis; lymphatic metastasis

肿瘤转移抑制基因 *nm23-H1* 是美国国立癌症研究院的 Steeg 等利用差式筛选方法于 1988 年首次从小鼠黑色素瘤 K-1735 细胞株中分离得到的。其表达产物为一分子质量 17 ku 的蛋白—核苷二磷酸激酶(NDPK)^[1]。该基因可能通过影响细胞内微管的聚合/解聚和 G 蛋白介导的信号传导,而参与肿瘤发生和发展^[2]。人类 *nm23* 目前已克隆出 3 个亚型^[3], 研究表明主要是 *nm23-H1* 与肿瘤的转移相关。*nm23-H1* 与大肠癌转移的关系目前尚未定论。我们利用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、Southern blot 和免疫组织化学染色技术(LSAB 法)对 80 例大肠癌中 *nm23-H1* 的杂合性缺失(*nm23-H1* LOH)和 *nm23-H1* 蛋白表达进行研究,探讨 *nm23-H1* 与大肠癌淋巴结转移的关系。

1 材料和方法

1.1 病例资料及标本收集

80 例大肠癌系中山医科大学附属第一医院 1995 年 6 月至 1997 年 3 月胃肠外科住院手术病人,男 56 例,女 24 例,年龄 20~83 岁,平均 58.5 岁,均经病理确诊。术中切下标本后立即取癌组织(分装于 4~5 支 EP 管中)及距肿瘤 8~10 cm 处的正常粘膜,置于液氮中,然后于 -85℃ 冰箱保存备用。其余标本进行解剖,每份标本取 8~10 个,部分取 12~15 个淋巴结送检,根据病理诊断确定有无淋巴结的转移。本组 26 例有淋巴结的转移。

1.2 RFLP、Southern blot 检测 *nm23-H1* LOH

分别取约 1 g 癌及正常粘膜组织标本,用酚抽提法提取 DNA。取 10 μg DNA 经限制性内切酶 *Bgl* II 30 U 酶切 37℃、5 h, 0.85% 琼脂糖凝胶电泳 14 h (1 V/cm), 片段长度标准参照物为 λ-DNA/*Hind* III (Promega 公司), 溴乙锭染色, 紫外灯下观察并摄影。用毛细管转印法转印至尼龙膜上。*nm23-H1* cDNA 探针由中山医科大学肿瘤研究所曾木圣博士惠赠, 片段长度为 561 bp。随机引物标记试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品, α⁻³²

P-dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司, 按试剂盒说明将 α⁻³² P-dCTP 标记到 *nm23-H1* cDNA 探针上, 过 G-50 柱纯化探针。测探针的比放射性活度计算探针标记掺合率为 81%。42℃ 预杂交 3 h, 预杂交液成份为: 6× SSPE, 5× Denhard, SDS 5g/L, 变性鲑精 DNA 及消毒双蒸水。每张膜加入变性的 α⁻³² P-dCTP 标记探针 25 ng, 42℃ 摇床振荡杂交 24 h, 杂交液成份除不含 5× Denhard 外, 其余与预杂交液相同。用 2× SSC/SDS 1g/L 室温下摇床振荡洗膜 15 min×2, 改用 0.2× SSC/SDS 1g/L 65℃ 摇床振荡洗膜 30 min×2, 最后用 0.1× SSC 室温下稍洗后保鲜膜封膜, 在暗室中与 X 光胶片一同装入暗盒, 放置于 -70℃ 1 周后显影、定影、读片。将 X 光胶片用 BECKMAN DU-600 分光光度仪, 在波长为 560 nm 下扫描, 测定各杂交带 DNA 含量。

1.3 免疫组化染色检测 *nm23-H1* 蛋白表达

将肿瘤组织及正常粘膜经 10% 中性福尔马林处理, 石蜡包埋, 制备 4 μm 厚切片, 每个蜡块连续切片 5~8 张, 常规 HE 染色镜检。切片经脱蜡、梯度酒精水化, 750 W 乐声微波炉高档 5 min 然后转低档 5 min 修复抗原, 室温下冷却 20 min, 加 *nm23-H1* 鼠单克隆抗体(NM301, Santa Cruz 公司产品) 4℃ 过夜, 抗体稀释倍数为 1:50, 其它步骤按 LSAB 试剂盒(K0681, DAKO 公司产品)操作说明常规进行。DAB 显色、苏木素复染, 常规脱水、透明、封片, 观察结果。采用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 统计分析

本组资料用 SAS 统计软件分析, *nm23-H1* LOH 和 *nm23-H1* 蛋白表达与大肠癌临床病理指标之间的关系用 χ² 检验。两组均数之间的比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 *nm23-H1* LOH、*nm23-H1* 蛋白表达与大肠癌临床病理指标之间关系

大肠癌与正常粘膜基因组 DNA 经限制性内切酶 *Bgl* II 酶切及 *nm23-H1* cDNA 探针杂交后, 在

杂合子显示 2.3 kb 及 7.6 kb 两条等位基因杂交带,而在纯合子只显示单 2.3 kb 或 7.6 kb 一条等位基因杂交带。另外,在杂合子和纯合子中,均出现一条恒定的 21 kb 的非等位基因杂交带^[4]。癌组织任一条等位基因杂交带完全缺失或吸光度扫描比正常减弱 50%以上^[5],则为等位基因的 LOH

(图1)。选择信息个体,即正常基因组 DNA Southern blot 表现为杂合子的病例作为研究对象。本组 45 例为杂合子(56%),35 例为纯合子(非信息个体)。45 例杂合子中 14 例为 LOH(31%),其中 9 例有淋巴结转移,31 例无 LOH 者,仅 6 例有淋巴结转移,两者差别具有统计学意义($P < 0.01$)。

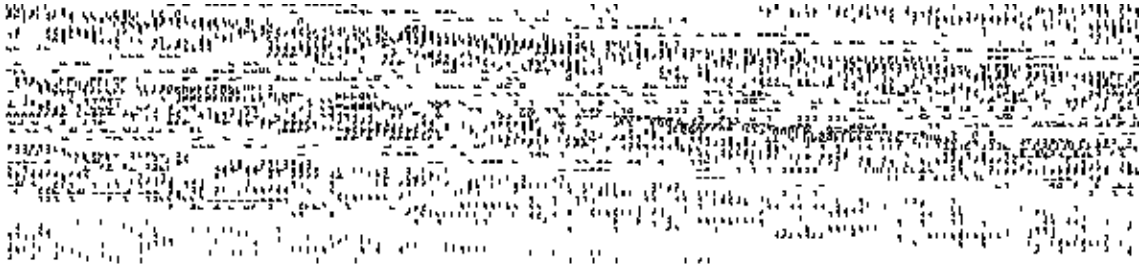


图1 Southern 杂交结果

Fig 1 Results of Southern hybridization

Genomic DNA of colorectal tumor(T) and normal mucosa(N) from the same patient digested with *Bgl* II and blotted with a *nm23-H1* cDNA probe. The *Bgl* II identifies two allelic bands at 7.6 and 2.3-kilobases(kb) and a nonallelic 21-kilobase constant band. cases 5, 7 show homozygosity, case 2 heterozygosity. Deletion of allelic band at 2.3 kb include cases 15, 29, 37, 62, 77, and 46 detected by densitometric analysis. Deletion of allelic band at 7.6 kb include cases 19, 35, 38, 41, 54, 58, 63 and 75

免疫组化染色结果判断:染色阳性信号为胞浆呈棕黄色颗粒,参照 Tannapfel^[6]标准,根据阳性细胞所占比例分为阴性(-):阳性细胞数 $< 30\%$;阳性(+):阳性细胞数 $\geq 30\%$ (图2)。

nm23-H1 蛋白阳性表达率 61.3%(49/80)。在 45 例杂合子中,*nm23-H1* 蛋白阳性表达 25 例,4 例有淋巴结转移,阴性表达 20 例中 11 例有淋巴结转移,两者差别有统计学意义($P < 0.01$)。*nm23-H1* LOH,及其蛋白表达与大肠癌临床病理指标之间的关系见表 1。

2.2 *nm23-H1* LOH 与 *nm23-H1* 蛋白表达间关系

14 例 LOH 者其蛋白表达均为阴性,31 例无 LOH 者,仅 6 例为阴性表达,两者差别有统计学意义($P < 0.01$)。



图2 *nm23-H1* 蛋白在大肠癌中的表达

Fig 2 Expression of *nm23-H1* protein in colorectal carcinoma
Immunohistochemical staining(LSAB $\times 100$) showed positive granules in cytoplasm(arrows)

表1 *nm23-H1* 基因 LOH 及其蛋白表达与大肠癌临床病理指标之间的关系
Table 1 Correlation of LOH of *nm23-H1* and expression of its protein with clinicopathological factors in colorectal carcinoma

Clinicopathological factors	LOH ¹⁾		<i>P</i>	Immunoreactivity		<i>P</i>
	Yes (<i>n</i> = 14)	No (<i>n</i> = 31)		Positive (<i>n</i> = 25)	Negative (<i>n</i> = 20)	
Sex			0.621			0.944
male	9	20		16	13	
female	5	11		9	7	
Age($\bar{x} \pm s$)	58.8 ± 13.8	59.1 ± 10.6	0.843	59.6 ± 9.8	58.3 ± 12.7	0.952
Tumor size (cm, $\bar{x} \pm s$)	5.0 ± 1.3	5.3 ± 1.5	0.774	5.2 ± 1.2	5.1 ± 1.1	0.681
Tumor location			0.980			0.972
left side colon	4	9		7	6	
right side colon	4	8		7	5	
rectum	6	14		11	9	
Histological type ²⁾			0.694			0.413
well	6	14		12	8	
moderately	4	10		8	6	
poorly	2	4		3	3	
mucoid	2	3		2	3	
Dukes stage			0.015			0.039
A	1	7		6	2	
B	3	15		13	5	
C/D	10	9		6	13	
Lymph node metastasis			0.004			0.006
yes	9	6		4	11	
no	5	25		21	9	

1) LOH: loss of heterozygosity; 2) Well, well differentiated adenocarcinoma; moderately: moderately differentiated adenocarcinoma; poorly: poorly differentiated adenocarcinoma; mucoid: mucoid adenocarcinoma

3 讨论

3.1 *nm23-H1* LOH 与 *nm23-H1* 蛋白表达

本组在研究 *nm23-H1* 基因 LOH 的同时, 采用免疫组化对其蛋白表达进行检测, 两者结合起来较单一方法的结果更为全面、准确。14 例 LOH 者, 其蛋白表达均为阴性, 进一步证实 Southern blot 的结果, 同时也说明 LOH 是导致蛋白不表达的原因之一。由于本组只使用了单一的限制性内切酶, 在此酶切位点表现为纯合子的个体, 在其它多态性位点则可能为杂合子, 亦有可能发生该位点的 LOH。另据报道, *nm23-H1* 亦存在突变^[7], 本组 *nm23-H1* 蛋白表达阴性 20 例中 6 例未发现 LOH 者, 可能与此有关。

3.2 *nm23-H1* LOH、*nm23-H1* 蛋白表达与大肠癌淋巴结转移

大肠癌有无淋巴结转移是制定术后辅助治疗方案的重要依据之一, 也是影响患者预后的主要原因之一。目前临床上尚缺乏有效预测大肠癌淋巴结转移的生物学指标。*nm23* 是近年发现的较有前途的肿瘤转移抑制基因, *nm23* 与大肠癌转移的关系目前仍有争论。Cohn 等对 104 例大肠癌进行前瞻性研究, 术后随访 4 ~ 8.5 年, *nm23-H1* 等位基因缺失者发生远处转移的危险性是无缺失者的 3 倍^[8]。Tanapfel 等^[6]运用免疫组化技术对 100 例结直肠癌手术切除标本中 *nm23-H1* 蛋白表达进行检测, 结果发现 *nm23-H1* 蛋白低或弱表达者淋巴结转移率较中或强表达者高 ($P < 0.001$), 检测肿瘤组织中 *nm23-H1* 蛋白表达对预测结直肠癌淋巴

结转移的敏感性为93%,特异性58%。然而, Campo等^[9]报告 *nm23-H1* 等位基因缺失,肿瘤具有更大的侵袭性,患者的无病生存期及存活期短,但与肿瘤淋巴结转移无关。

造成上述差别的原因尚不清楚,可能与部分研究组的样本数较少和实验技术不当有关^[6]。RFLP结合 Southern blot 研究肿瘤中等位基因 LOH,是近年分子生物学使用的重要方法之一。但如果肿瘤组织中混有较多的正常组织,常掩盖肿瘤组织中存在的等位基因的缺失^[9]。我们发现取材时如果肿瘤体积小,特别是未侵出肠壁者难以掌握取材深度,容易混有较多的正常组织,受正常组织细胞DNA的影响,易造成实验结果不准确。为此,我们在取材时注意将标本分装于4~5支管中,再从各管取部分组织进行HE染色,了解所含正常组织的情况,尽量选择肿瘤间质少,不含正常大肠粘膜的肿瘤标本用于研究。另外,对杂交带进行吸光度扫描定量,使结果更为准确、可靠。本组 LOH 率31%(14/45),较 Campo等^[9]报道的24%高,但比 Cohn等^[10]报道的52%低。本研究发现 *nm23-H1* 基因 LOH 与淋巴结转移呈正相关,其蛋白表达与淋巴结转移呈负相关。肿瘤转移是一个多基因参与的极其复杂的过程,任何参与这一过程的癌基因和抑癌基因都不可能是决定肿瘤转移的唯一因素^[8]。本组45例 Southern 杂交表现为杂合子的病例中,31例无 LOH 者6例发现有淋巴结转移, *nm23-H1* 阳性表达的25例中,4例亦有淋巴结的转移,其原因可能与此有关。本研究结果表明: *nm23-H1* 在大肠癌淋巴结转移中具有重要的作用。因此,检测肿瘤组织中 *nm23-H1* LOH 和 *nm23-H1* 蛋白表达,可能为临床预测大肠癌的淋巴结转移开辟一条新的途径。

3.3 检测 *nm23-H1* LOH、*nm23-H1* 蛋白表达对 Dukes 分期的可能影响

结直肠癌的 Dukes 分期被广泛应用于临床,对指导临床治疗和评估患者预后具有重要意义。然而,准确的分期仍需要依靠对手术切除标本,包括肿瘤及其引流区域淋巴结的病理诊断。手术探查通常是依据淋巴结肿大与否来判断有无淋巴结的转移,有时会对肿瘤体积小、淋巴结无明显肿大但肿瘤已有淋巴结转移的病例漏诊,造成 Dukes 分期

的不准确而影响术后的辅助治疗和对预后的评估。另外, Dukes 分期亦难以在术前对肿瘤的淋巴结转移进行预测。本研究发现 *nm23-H1* LOH、*nm23-H1* 蛋白表达阴性者在 Dukes C/D 期较 Dukes A、B 期多见 ($P < 0.05$)。因此,我们认为对大肠癌组织中 *nm23-H1* LOH、*nm23-H1* 蛋白表达进行检测,结合临床病理结果,可能会使 Dukes 分期更准确、更全面。其临床应用价值尚在研究之中。

参 考 文 献

- 1 Steeg P S, Bevilacqua G, Copper L, *et al*. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Nat Cancer Inst*, 1988, 80: 200
- 2 Liotta L A, Steeg P S, Stetler-Stevenson W G, *et al*. Cancer metastasis and angiogenesis; an imbalance of positive and negative regulation. *Cell*, 1991, 64: 327
- 3 江贤鹏, 刘康达, 周信达, 等. 与肿瘤转移抑制基因 *nm23* 高度同源的 *nm23-H3b* 的克隆和序列分析. *中华医学杂志*, 1994, 75(11): 670
- 4 Leone A, McBrid W, Weston A, *et al*. Somatic allelic deletion of *nm23* in human cancer. *Cancer Res* 1991, 51: 2490
- 5 Wagata J, Ishizaki K, Imamura M, *et al*. Deletion of 17p and the *int-2* gene in esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1991, 51: 2113
- 6 Tannapful A, Kocherling F, katalinic A, *et al*. Expression of *nm23-H1* predicts lymph node involvement in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*, 1995, 38: 651
- 7 Wang L, Patel U, Ghosh L, *et al*. Mutation in the *nm23* gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 1993, 53: 717
- 8 Cohn K H, Ornstein D L, Wang F S, *et al*. The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma; Results of a 5-year follow-up study. *Cancer*, 1997; 79: 233
- 9 Campo E, Miquel R, Jares P, *et al*. Prognostic significance of the loss of heterozygosity of *nm23-H1* and *p53* genes in human colorectal carcinomas. *Cancer*, 1994, 73: 2913
- 10 Cohn K H, Wang F S, Desoto-Lapaix F, *et al*. Association of *nm23-H1* allelic deletions with distant metastasis in colorectal carcinoma. *Lancet*, 1991, 338: 722

(1997-09-15 收稿 1997-12-23 修回)