

鼻咽癌中 nm23-H1 mRNA 及蛋白的表达^①

曾木圣¹ 郭翔² 汪慧民¹ 李满枝¹ 宋立兵¹ 云经平² 郭辉玉³

(中山医科大学 1 肿瘤研究所病室; 广州, 510060 2 附属肿瘤医院 3 微生物教研室)

摘要 目的: 探讨鼻咽癌中 nm23-H1 mRNA 和蛋白的表达及临床意义。方法: 收集 78 例低分化鼻咽癌初治患者新鲜鼻咽部活检标本, 用原位杂交检测 nm23-H1 的 mRNA 表达并用免疫组化检测其蛋白质表达。结果: 伴有淋巴结转移的 53 例标本中, nm23-H1 mRNA 和蛋白的表达率分别为 40% 和 36%; 而 25 例无淋巴结转移的两者表达率均为 96%。nm23-H1 阴性表达组的淋巴结转移率显著高于阳性表达组 ($P < 0.001$)。结论: ① nm23-H1 基因 mRNA 和蛋白质的表达与鼻咽癌淋巴结转移潜能呈负相关。② 鼻咽癌中 nm23-H1 在 mRNA 及蛋白层次的表达基本一致。结果提示 nm23-H1 基因的表达在抑制鼻咽癌转移过程中起着一定的作用。

关键词 鼻咽肿瘤; 基因; 抑制; 肿瘤; 基因表达调控; 肿瘤; nm23-H1(自由词)

中图分类号 R 739.63

THE EXPRESSION OF mRNA AND PROTEIN OF nm23-H1 GENE IN NASOPHARYNGEAL CARCINOMAS

Zeng Musheng Guo Xiang Wang Huimin Li Manzhi Song Libing Yun Jingping Guo Huiyu

(1 Cancer Institute, 2 Tumor Hospital 3 Department of Microbiology,
Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510060)

Abstract Objective: Investigate the expression and clinic significance of nm23-H1 in nasopharyngeal carcinomas (NPC). **Methods:** The expression of nm23-H1 mRNA and its protein were detected in 78 NPC biopsies by means of in situ hybridization and immunohistochemistry. **Results:** 53 cases with metastases to lymph nodes of the 78 NPC biopsies showed only 40% positive ratio of nm23-H1 gene expression at the level of mRNA and 36% for its protein. However, 96% of the other 25 cases without clinic lymph nodes metastases showed positive of nm23-H1 gene expression by both of the detecting methods. By statistical analysis, nm23-H1 negative expression group showed higher incidence of lymph nodes metastases than nm23-H1 positive expression group ($P < 0.001$). **Conclusions:** ① Expression of nm23-H1 gene was negatively related with metastatic potential of NPC. ② The expression of nm23-H1 gene was parallel in the level of mRNA and protein. It was suggested that expression of nm23-H1 gene may play a role in inhibiting metastasis of NPC.

Subject headings Nasopharyngeal neoplasms; genes, suppressor, tumor; gene expression regulation, neoplastic; nm23-H1

肿瘤转移是恶性肿瘤主要生物学特性, 也是患者死亡的主要原因。转移是多步骤复杂而连续的过程, 参与的基因众多, 而肿瘤转移相关基因的激活及转移抑制基因的失活可能起重要的作用。目前在肿瘤转移的分子机理研究中, 研究的较多而又较有前途的是转移抑制基因 nm23。nm23 基因是

Steeg, PS 等利用差别克隆杂交法从具有不同转移潜能的 K-1735 鼠黑色素瘤细胞株分离出来的^[1]。人类的 nm23 基因有两个亚型 nm23-H1 和 nm23-H2^[2], 它们均定位于 17 号染色体长臂。研究表明主要是 nm23-H1 与肿瘤转移相关, 即 nm23-H1 基因的等位缺失、点突变及低表达与人类多种肿瘤的

① 国家自然科学基金资助课题(39500170)

转移潜能正相关。对此,我们用原位杂交以及免疫组化检测了鼻咽癌活检组织中 nm23-H1 基因的 mRNA 及蛋白表达,从 mRNA 及蛋白两个层次探讨 nm23-H1 基因与鼻咽癌转移的关系。

1 材料和方法

1.1 鼻咽癌活检组织来源

78例活检标本为1996年1月至1996年8月中山医科大学肿瘤医院住院治疗的初治病人,经病理诊断为低分化鼻咽癌,临床分期采用92分期,活检标本取后立即置于液氮中冷冻,保存于-80℃冰箱备用,原位杂交及免疫组化前取出并冰冻切片。

1.2 nm23-H1 cDNA 探针的合成

采用 Chomczynski 法^[3]提取部分鼻咽活检标本的总 RNA,行常规逆转录 PCR。所用的引物根据 Rosengard 等^[4]以及 Stahl 等^[3]报道的 nm23-H1 cDNA 序列设计,引物 1: TGCTGCGAAC-CACGTGGGT,引物 2: ATGTGGTCTGCCCTCCTGT,扩增片段为 561 bp。PCR 参数为:97℃变性 5 min,继而 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1.5 min,最后 1 个循环延长 10 min,共 35 个循环。扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳,溴乙锭染色,紫外灯下观察并摄影。以 RT-PCR 的阳性产物 2 μL 为模板进行第 2 次扩增制备探针,在扩增体系中加入 DigdUTP,与 dTTP 比例为 1:2。探针经点杂交定量。

1.3 Southern Blotting 检测 nm23-H1 cDNA 探针的特异性

常规提取正常人血标本 DNA。取 10 μg DNA 经限制性内切酶 *Bgl* II 酶切,常规电泳及转印。杂交和结果检测参见 dig luminescent detection kit (Boehringer Mannheim)说明书。

1.4 原位杂交检测

1.4.1 组织的预处理 切片经干烤后梯度酒精回水,PBS 洗 2×3 min,4%多聚甲醛固定 30 min (0.1 mol/L PB 配制),PBS 洗 2×5 min,0.3% Triton X-100(PBS 配制)15 min,PBS 洗 5 min,蛋白酶 K (10 mg/L)室温消化 5 min,0.1 mol/L 甘氨酸(PBS 配制)中止反应,PBS 洗 5 min,4%多聚甲醛后固定 3 min,PBS 2×5 min,最后乙酰化(0.25%乙酸酐,0.1 mol/L 三乙醇胺)10 min,DEPC 处理水洗,置于超净工作台中凉干。

1.4.2 预杂交及杂交 加 50 μL 预杂交液(50%去离子甲酰胺,10%硫酸葡聚糖,4×SSC,1×Denhardt's 液,10 mmol/L DTT,150 mg/L 鲑精 DNA,250 mg/L 酵母 tRNA,0.25% SDS)42℃预杂交 1 h。吸去预杂交液,加入含变性的 Dig-nm23-H1 cDNA 探针(0.5 mg/L)杂交液 10 μL,盖上盖玻片,胶泥封片,42℃置于湿盒杂交 16 h,每一标本均设不加探针的阴性对照。结果检测参见 Dig DNA labelling and detection kit (Boehringer Mannheim)说明书。

1.5 免疫组化检测

免疫组化采用 LSAB 法,方法按说明进行(DAKO)。Anti-nm23/NDP Kinase A (Anti-nm23-H1)多克隆抗体为 Boehringer Mannheim 公司产品,稀释度为 1:10。阴性对照以 TBS 取代一抗。

1.6 原位杂交及免疫组化的结果判断

由两位实验者在不知任何临床和病理资料的情况下进行评估。原位杂交阳性信号为细胞浆中出现棕褐色颗粒,而免疫组化阳性信号则为细胞呈棕黄色颗粒。阴性(-):阳性细胞数<5%;阳性(+):阳性细胞数≥5%。结果经 SPSS 6.0 统计软件分析,采用卡方检验及相关分析。

2 结果

2.1 nm23-H1 mRNA 表达

逆转录 PCR 扩增 nm23-H1 cDNA,得到 561 bp 的特异性片段,见图 1,与文献报道相符,说明引物的特异性高,PCR 扩增体系可靠。Southern Blotting 显示 nm23-H1 基因 *Bgl* II 限制性片段有 21 kb,7.6 kb 及 2.3 kb 3 条杂交带,与文献报道相符^[5],说明探针的特异性强,见图 2。

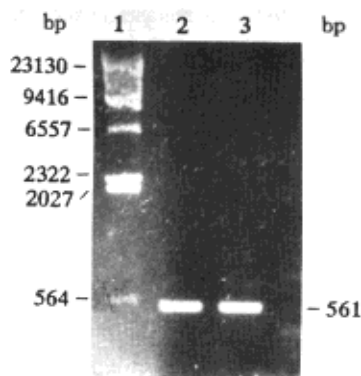


图 1 RT-PCR 扩增 nm23-H1 cDNA

Fig. 1 RT-PCR amplification of nm23-H1 cDNA

1. λ-DNA, 2, 3 nm23-H1 cDNA

原位杂交检测鼻咽癌中 nm23-H1 mRNA 阳性率为 58% (45/78) 阳性杂交信号位于胞浆内, 呈棕褐色颗粒或团块状, 见图 3。

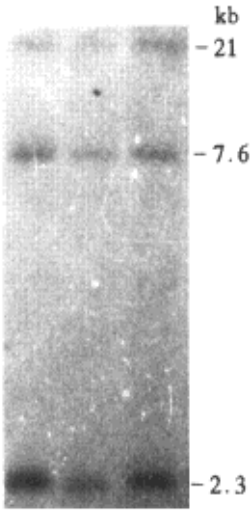


图 2 Southern Blotting 检测 nm23-H1 cDNA 探针的特异性
Fig. 2 Detecting the specificity of nm23-H1 cDNA probe by Southern Blotting hybridization

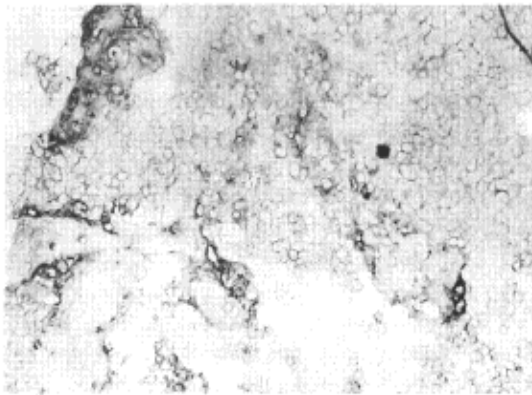


图 3 鼻咽癌中 nm23-H1 mRNA 阳性表达 (原位杂交×200)
Fig. 3 nm23-H1 mRNA positive expression in nasopharyngeal carcinoma (ISH×200)

nm23-H1 mRNA 的表达与鼻咽癌临床病理指标的关系总结见表 1, 从表中可看出, nm23-H1 mRNA 的表达与鼻咽癌患者的年龄、性别及鼻咽癌原发灶的侵犯范围和临床分期无关 ($P > 0.05$), 但与鼻咽癌淋巴结转移呈负相关 ($\chi^2 = 22.12, P < 0.001$)。在 nm23-H1 mRNA 表达阴性组中, 淋巴结转移占 97%, 而表达阳性组中, 淋巴结转移 40%, 有显著性意义。

2.2 nm23-H1 蛋白表达

性率为 55% (43/78), 阳性信号在癌细胞中分布较广泛, 胞浆及胞核皆有, 呈棕黄色颗粒, 见图 4。

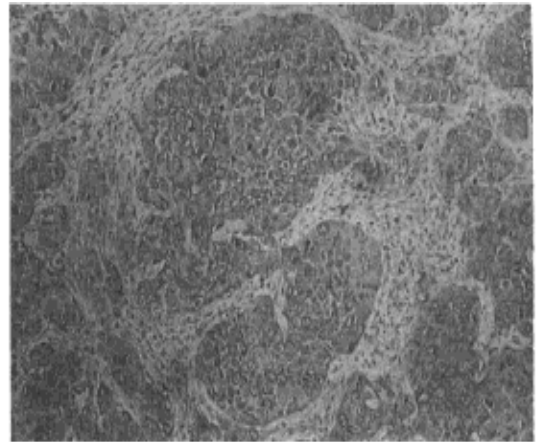


图 4 鼻咽癌中 nm23-H1 蛋白阳性表达 (LSAB×200)
Fig. 4 nm23-H1 protein positive staining in nasopharyngeal carcinoma (LSAB×200)

nm23-H1 蛋白表达与鼻咽癌病人的年龄、性别、鼻咽癌原发灶的侵犯范围、临床分期无关, 而与鼻咽癌的淋巴结转移呈负相关, 见表 1, nm23-H1 蛋白表达阴性组中, 淋巴结转移占 97%, 而阳性组中, 淋巴结转移只占 44%, 有显著性意义 ($\chi^2 = 24.85, P < 0.001$)。

表 1 nm23-H1 在鼻咽癌中的表达及临床意义

Table 1 The expression and clinic significance of nm23-H1 in nasopharyngeal carcinoma

characteristic	ISH		P	LSAB		P
	-	+		-	+	
age(yr)			> 0.05			> 0.05
< 50	23	29		26	26	
≥ 50	10	16		9	17	
sex			> 0.05			> 0.05
male	24	33		26	31	
female	9	12		9	12	
primary tumor size(T)			> 0.05			> 0.05
T ₁ , T ₂	10	14		12	12	
T ₃ , T ₄	23	31		23	31	
metastases to lymph node			< 0.001			< 0.001
negative	1	24		1	24	
positive	32	21		34	19	
clinic stage			> 0.05			> 0.05
I ~ II	10	21		12	19	
III ~ IV	23	24		23	24	

78 例新鲜鼻咽癌活检标本, nm23-H1 蛋白阳

2.3 nm23-H1 mRNA 的表达与蛋白表达的关系

从阳性率看,原位杂交似稍高于免疫组化。但经SPSS 6.0 统计软件分析, nm23-H1 mRNA 表达与蛋白表达呈正相关($\gamma=0.75, P<0.01$)。

3 讨论

nm23-H1 基因的改变可发生在 DNA, mRNA 及蛋白 3 个不同层次。对 nm23-H1 mRNA 和蛋白表达的研究表明,在多种人类肿瘤如大肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肝癌、肺癌等中, nm23-H1 mRNA 或蛋白的表达与肿瘤的转移及临床预后不良呈负相关^[6]。但在胰腺癌、部分大肠癌、神经母细胞瘤及前列腺癌中, nm23 基因并不表现为转移抑制基因,相反,其表达水平增高与癌细胞增生有关。各瘤结论不同的可能解释是①nm23-H1 的表达具有组织特异性,可在大肠癌中且出现相反的报道^[7];②检测方法的不同所致,有的报道为 mRNA 的表达水平,而另一些比较的则是蛋白表达水平, nm23-H1 mRNA 的表达是否与蛋白层次的表达相平行?③nm23-H1 基因的表达水平只是其基因缺失或突变的表现。

鼻咽癌是一种恶性程度较高的肿瘤,易发生淋巴结转移,但转移的分子机理依然不明。对 78 例新鲜鼻咽癌活检标本 nm23-H1 的表达的分析表明:①nm23-H1 的表达与鼻咽癌患者的年龄、性别以及鼻咽癌原发灶的侵犯范围和临床分期无关($P>0.05$),但与鼻咽癌的淋巴结转移呈负相关($P<0.001$)。②nm23-H1 在 mRNA 及蛋白层次的表达基本一致,提示 nm23-H1 的表达水平的调节主要是在转录或转录前进行的。这说明 nm23-H1 的表达在抑制鼻咽癌的转移过程中起一定的作用。

然而,53 例有淋巴结转移者,有 21 例 nm23-H1 mRNA 表达阳性,19 例蛋白表达阳性,似乎与 nm23-H1 基因的转移抑制功能相矛盾。这可能是因肿瘤的异质性所致,在原发肿瘤组织中,存在着不同肿瘤细胞亚群,它们在细胞形态、增殖及转移能力、细胞表面受体的表达等方面存在差异,其中

具有高转移能力的亚群是肿瘤转移的生物学基础。因此,在有淋巴结转移的原发灶中,仍有可能存在低转移能力的细胞亚群,它们的 nm23-H1 呈阳性表达。此外,肿瘤转移是受多因素影响的,多步骤而复杂的过程,除 nm23 基因外,尚可能受其它基因控制,如肿瘤转移相关基因 *mts1*、金属蛋白酶抑制因子及血管生成因子等。在鼻咽癌转移过程中,这些因素是否参与以及它们之间的关系如何,尚有待于进一步研究。此外,是否存在鼻咽癌特异性的转移相关基因,也值得进一步研究。

因本研究随诊时间较短,对 nm23-H1 与鼻咽癌远处转移及治疗后局部复发的关系有待于进一步随诊。此外,鼻咽癌原发灶与转移灶中, nm23-H1 的表达是否存在差异,也值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, *et al.* Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80(3): 200
- 2 Stahl JA, Leone A, Rosengard A M, *et al.* Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res*, 1991, 51(1): 445
- 3 Chomczynski P N, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156
- 4 Rosengard A M, Krutzsch H C, Shearn A, *et al.* Reduced nm23/Avd protein in tumor metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature*, 1989, 342(9): 177
- 5 Leone A, McBride O W, Weston A, *et al.* Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res*, 1991, 51(9): 2490
- 6 Hennessy C, Henry J A, May F E, *et al.* Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer; an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 1991, 83(4): 281
- 7 Myeroff L L, Markowitz S D. Increased nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA expression and absence of mutations in colon carcinomas of low and high metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(2): 147

(1997-06-23 收稿 1997-10-29 修回)