

Clinical Research · 临床研究

转移抑制基因 nm23 mRNA 表达水平与非小细胞肺癌临床病理特征及预后的关系

王海峰,陈晓峰*,丁嘉安,高文,周逸鸣,陈乾坤

(上海市肺科医院胸外科,上海 200433)

[摘要] **目的:**研究非小细胞肺癌中 nm23 mRNA 表达水平与肺癌临床病理特征及预后之间的关系。**方法:**53 例肺癌标本,44 例(癌旁)正常肺组织,用 RT-PCR 方法检测标本中 nm23 mRNA 的表达水平,根据手术、病理和影像学结果判断有无转移并确定分期,就 nm23 mRNA 表达水平与临床变量之间进行分析。**结果:**nm23 mRNA 在肺癌和(癌旁)正常肺组织中的表达阳性率分别为 43.4%(23/53)和 40.9%(18/44), $P>0.05$;在低分化、晚期、肺门纵隔淋巴结转移的非小细胞肺癌中,其 nm23 mRNA 的表达量显著降低($P<0.05$),nm23 mRNA 表达阳性和阴性的患者中位生存期分别为 43 个月和 46 个月,其表达量与患者的预后之间未发现显著相关性($P>0.05$)。**结论:**nm23 mRNA 的表达与肺癌的分化、转移及病理分期有关,但尚无足够证据显示其与肺癌的预后有相关关系。

[关键词] 肺肿瘤;癌,非小细胞肺;基因表达;基因,nm23

[中图分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-7431(2006)10-0920-04

Relationship between mRNA expression of metastasis suppressor gene nm23 and clinicopathological features and prognosis of non small cell lung carcinoma

WANG Hai-feng, CHEN Xiao-feng*, DING Jia-an, GAO Wen, ZHOU Yi-ming, CHEN Qian-kun (Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the relationship between the expression level of nm23 mRNA and the pathoclinical characteristics and the prognosis of patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC). **Methods:** We collected 53 specimens of NSCLC, 44 specimens of para-cancer normal lung tissues. The expression level of nm23 mRNA was measured by RT-PCR. The tumor stage was determined according to the results of surgery, pathological examination, and imaging diagnosis. Then analyses were carried out between the level of nm23 mRNA expression and the clinical variables. **Results:** The positive-rate of nm23 mRNA expression were 43.4% (23/53) and 40.9% (18/44) in specimens of lung cancer and para-cancer normal lung tissues, respectively ($P>0.05$). The expression level of nm23 mRNA was significantly decreased in low-differentiated, advanced, and mediastinal lymph node-metastatic NSCLC tissues ($P<0.05$). The median survival times were 43 months and 46 months for nm23-positive and nm23-negative patients, respectively. But expression level of nm23 had no significant correlation with the prognosis of patients ($P>0.05$). **Conclusion:** The expression level of nm23 mRNA is related to the differentiation, metastasis, and pathological stage of lung cancer. There were no enough evidence demonstrating that nm23 expression correlated with the prognosis of patients.

[KEY WORDS] Lung neoplasms; Carcinoma, non-small-cell lung; Gene expression; Genes, nm23

[Tumor, 2006, 26(10): 920-923]

nm23 基因即转移抑制基因 (metastasis-suppressor gene), 最初是通过筛选鼠 K1753 黑素瘤细胞系的 cDNA 库而发现的^[1]。通过基因序列分析, 人类 nm23 基因家族已知有 8 种不同的基因。目前研究得最多的 nm23 基因是 nm23-H1 和 nm23-H2, 两者均位于人染色体 17q21.3, 相距 4 kb, 分别编码核苷二磷酸激酶 (nucleoside diphosphate kinase, NDPK) 的 A 链和 B 链^[2]。关于 nm23 基因与

肺癌的关系, 也有一些相关研究, 但至今仍无一致的结论。

本研究采用 RT-PCR 的方法, 通过检测肺癌组织及其周围正常肺组织 nm23 mRNA 的表达量, 探讨 nm23 基因表达与非小细胞肺癌的分化、转移及病理间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 病例为 2000 年 5 月~2000 年 12 月于本院胸外科行手术切除治疗的 53 例非小细胞肺癌患者。53 例肺癌中, 男性 40 例 (75.5%), 女性 13 例 (24.5%); 年龄 (58.28±9.38) 岁; 肿瘤长径为

[基金项目] 上海市卫生局科技发展基金 (编号: 99424)

[作者简介] 王海峰 (1974-), 男 (汉族), 医学硕士, 主治医师

* Corresponding author. Tel: 021-65115006-2083

E-mail: cxf2299@hotmail.com

(3.85±1.63)cm;病理类型为腺癌 26 例(49.0%),鳞癌 18 例(34.0%),腺鳞混合癌 9 例(17.0%);分化程度以病理 I 级和 II 级为高分化,24 例(45.3%),III 级为低分化,29 例(54.7%);病理分期为 I 期 14 例(26.4%),II 期 13 例(24.5%),III 期 23 例(43.4%),IV 期 3 例(5.7%)。其中 3 例 IV 期患者均为术中探查见非同一叶内的转移性小结节而确诊,此 3 例行姑息性肺叶切除术,其余均行根治性肺叶或全肺切除术,淋巴结清扫均达到或超过系统淋巴结采样(lymph node sampling)的标准,即:除清扫所有可疑淋巴结外,至少清扫 4 个 N2 站淋巴结,总数达 6 枚以上。所有患者术前均未行放疗,27 例行术后化疗,1 例行术后放疗。测定手术切除标本中肿瘤病灶的 nm23 mRNA 表达量,其中 44 例于距离病灶边缘 5 cm 以上处切取癌旁肺组织作为正常对照。

1.2 RT-PCR 方法检测 nm23 mRNA 肺癌手术后,切取部分肿瘤和周边肺组织标本并立即投入液氮中保存。常规方法抽取细胞的总 RNA,最后使 RNA 沉淀干燥后,加 15 μ L 双蒸水溶解,-70 $^{\circ}$ C 保存待用。取 3 μ L 总 RNA 稀释 46 倍用紫外分光光度计测 D_{260} 和 D_{280} ,测其总 RNA 浓度和纯度。另取少部分作总 RNA 福尔马林变性电泳,观察 mRNA 模板的完整性。用于 PCR 扩增的第一链 cDNA 合成试剂包括总 RNA 3~5 μ g(10.5 μ L),随机 6 聚体引物(0.2 μ g/ μ L) 2.5 μ L,5 \times M-MLV RT 反应缓冲液 5 μ L,10 mmol/L dNTP 混合物 5 μ L,RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)1 μ L(40 U),M-MLV RT 1 μ L(200 U),最终容积 25 μ L。nm23 的上游引物序列为 5'-TGCTGCGAACCCACGTGGGT-3',下游引物序列为 5'-ATGTGGTCTGCCCTCCTGT-3',扩增产物长度 561 bp;内参对照 β_2 -MG 的上游引物序列为 5'-TTCACCCCACTGAAAAAGATGA-3',下游引物序列为 5'-GGCATCTTCAAACCTCCATGATG-3',扩增产物长度 120 bp。PCR 加样步骤为冰上操作,先配不含 cDNA 模板的标准液,13 μ L 的标准液包括无核酸酶的水 5.95 μ L,10 \times 反应缓冲液 1.5 μ L,dNTP 混合物(dNTP10 mmol/L)每种 0.75 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.15 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.8 μ L,内参对照 β_2 -MG 上、下游引物 50 pmol/L 各 0.3 μ L,或 nm23 引物上、下游 50 pmol/L 各 0.3 μ L,每个 0.5 mL 薄壁 PCR 管中加 13 μ L 的标准液,再往每管中依次加入 2 μ L 的 cDNA 模板,PCR 总量 15 μ L,每管加 40 μ L 矿物油,

开始 PCR 反应。(PCR 仪型号为 PTO-100TM,Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.) nm23 与 β_2 -MG 单独 PCR 扩增,PCR 条件为:第 1 步,95 $^{\circ}$ C 5 min;第 2~4 步,95 $^{\circ}$ C 50 s,57 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 60 s;第 5 步,重复第 2~4 步,循环 35 次;第 6 步,72 $^{\circ}$ C 10 min;第 7 步,4 $^{\circ}$ C 结束反应。用含 0.5 μ g/mL EB 的 2%琼脂糖凝胶在 1 \times TAE 电泳液中电泳,每孔加 15 μ L PCR 产物和 1 μ L 的上样染液。nm23 与 β_2 -MG 同时扩增,扩增产物行电泳,并用 DNA Ladder Marker 标记电泳后的 PCR 产物的长度。用 UVP imagestore 7500 紫外扫描仪扫描凝胶图像,分析 nm23 条带与内参对照 β_2 -MG 条带的吸光度之比(Dr),半定量测定 nm23 mRNA 的表达量。

1.3 统计分析方法 用 SPSS 11.0 软件,计量资料中配对资料采用符号秩和检验(Wilcoxon 配对法),成组两样本资料采用 Kolmogorov-Smirnov 两样本秩和检验,成组多样本资料采用 Kruskal-Wallis 秩和检验;计数资料采用 χ^2 检验;生存率统计采用 log-rank 检验,并做 Kaplan-Meier 生存曲线图。以 $P < 0.05$ 为有显著统计学差异。

2 结果

2.1 nm23 mRNA 在肺癌和癌旁正常肺组织中表达阳性率的比较 53 例肺癌 nm23 mRNA 表达的阳性率为 43.4% (23/53);44 例正常肺组织阳性率为 40.9% (18/44);肺癌与癌旁正常肺组织之间的阳性率无显著差异($P > 0.05$),见图 1。

2.2 肺癌 nm23 mRNA 表达量与病理特征之间的关系 从标本性质、肺癌的病理类型、分化程度、病理分期以及肺癌的淋巴结转移情况等方面比较 nm23 mRNA 的表达量,发现肺癌与癌旁正常肺组织之间 nm23 mRNA 的表达量无显著差异($P > 0.05$),而高分化、早期及淋巴结未转移的肺癌组织中 nm23 mRNA 的表达量显著高于低分化、晚期及淋巴结已有转移的肺癌组织($P < 0.05$ 或 0.01)。(表 1、2,图 1)

表 1 肺癌与癌旁肺组织中 nm23 mRNA 的表达
Table 1 The expressions of nm23 mRNA in cancer and para-cancer lung tissues

Tissue	n	Dr($\bar{x} \pm s$)	Z	P
Lung cancer	44	0.39±0.57	-0.143	0.886
Para-cancer	44	0.39±0.71		

Dr: Dnm23 mRNA/D β_2 -MG mRNA

表2 nm23 mRNA 的表达量与肺癌各临床病理参数间的关系
Table 2 The relationship between the expression level of nm23 mRNA and the patho-clinical parameters of lung cancer

	n	Dr($\bar{x} \pm s$)	Z	P
Pathology			3.949 ^d	0.139(sq, ad, ad-sq)
Sq ^a	18	0.33 ± 0.61		
Ad ^b	26	0.45 ± 0.55	0.725	0.670(sq vs ad)
Ad-Sq ^c	9	0.02 ± 0.05		
Differentiation			1.489	0.024(hi vs lo)
High	24	0.53 ± 0.65		
Low	29	0.18 ± 0.37		
Pathological stages			15.294 ^d	0.002(I, II, III, IV)
I	14	0.75 ± 0.70	1.394	0.041(para-cancer vs I)
II	13	0.35 ± 0.43	0.870	0.435(I vs II)
III	23	0.12 ± 0.36	1.301	0.068(II vs III)
IV	3	0.00 ± 0.00	0.345	1.000(III vs IV)
			2.012	0.001(I, II vs III, IV)
T stages			7.275 ^d	0.064(T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄)
T ₁	6	0.90 ± 0.57	1.369	0.047(T ₁ vs T ₂)
T ₂	35	0.29 ± 0.53	0.414	0.995(T ₂ vs T ₃)
T ₃	7	0.15 ± 0.33	0.342	1.000(T ₃ vs T ₄)
T ₄	5	0.24 ± 0.54	0.725	0.670(T _{1,2} vs T _{3,4})
N stages			10.275 ^d	0.006(N ₀ , N ₁ , N ₂)
N ₀	18	0.64 ± 0.67	1.112	0.168(N ₀ vs N ₁)
N ₁	15	0.23 ± 0.40	0.683	0.739(N ₁ vs N ₂)
N ₂	20	0.14 ± 0.38	1.761	0.004(N ₀ vs N ₁)
			1.702	0.006(N ₀ vs N _{1,2})

a: Squamous cell carcinoma; b: Adenocarcinoma; c: Adeno-squamous carcinoma; d: χ^2 ; Dr: Dnm23mRNA/D β_2 -MG mRNA

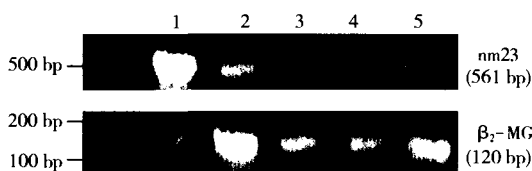


图1 非小细胞肺癌 nm23 mRNA 的表达

Fig. 1 The expression of nm23 mRNA in NSCLC

1: Benign(control); high expression; 2,3: Highly differentiated squamous cell lung cancer and para-cancer lung tissue; median expression and negative expression respectively(patient No. 18); 4,5: Poorly differentiated adeno-squamous cell lung cancer and para-cancer lung tissue; negative expression and median expression respectively (patient No. 20)

2.3 nm23 表达与肺癌患者预后之间的关系 出院后每3个月以信件或电话方式随访1次,考虑到实际,本组将失访者也定为死亡,并以失去联系的时间定为死亡时间。术后随访期为1~52个月,平均30.78个月,随访截止到2004年9月时53例肺癌患者中29人存活至今,8人在随访期内死亡,另有16人失访,也被认为死亡,即共有24人死亡。nm23 mRNA 表达阳性和阴性的患者中位生存期分别为43个月和46个月,平均生存期为28.65个月

和32.53个月,Kaplan-Meier 生存曲线分析显示两区间无统计学差异($P > 0.05$)。(图2)

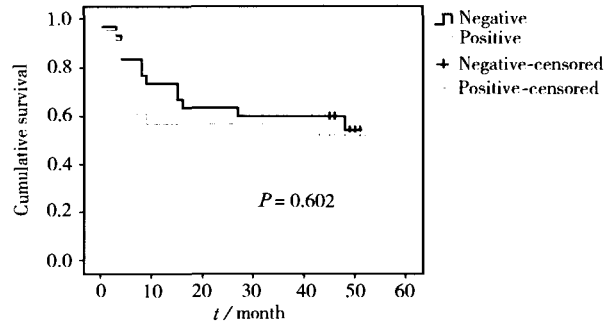


图2 nm23 mRNA 的表达与非小细胞肺癌患者生存期的关系

Fig. 2 The relationship between nm23 mRNA expression in NSCLC and patient survival

3 讨论

Steeg 等^[1]最早描述了 nm23 基因。在两个实验体系(鼠 K-1735 黑素细胞瘤和大鼠乳腺癌)中,低转移倾向的细胞和肿瘤 nm23 RNA 水平最高。他们同时又证明 nm23 RNA 水平与肿瘤细胞对宿主免疫反应的敏感性无关,因此推断该基因反映了肿瘤本身的侵袭力和转移倾向。

nm23 是第17对染色体上的“迟反应抑制基因”(late-acting suppressor gene),与 p53 和 HER2/neu 基因在同一染色体上,关系密切。Steeg 等^[1]最早发现,nm23 基因表达水平的升高降低了肿瘤细胞的转移倾向。此后,他们又提出,nm23 基因抑制肿瘤转移,可能是干扰了对远处微转移灶形成初期 DNA 的表达过程^[3]。

本组数据显示,nm23 的表达量在鳞型(0.33 ± 0.61)与腺型(0.45 ± 0.55)肺癌之间无显著性差异($P > 0.05$)。这与多数文献报道一致,提示 nm23 的表达与非小细胞肺癌的病理类型可能无直接的相关关系。

而低分化、晚期,肺门纵隔淋巴结已有转移的非小细胞肺癌,其 nm23 mRNA 的表达量显著降低。有关 nm23 基因与肿瘤的关系已有许多研究,多数认为 nm23 基因表达的降低与肿瘤的高侵袭性、高转移性、低生存期等有关^[4],但也有部分相反的意见。

本组结果显示不同分期的肺癌,nm23 mRNA 的表达量也有显著性差异($P < 0.01$),而早期(I, II期)与晚期(III, IV期)间的差异更为显著($P = 0.001$)。淋巴结无转移(N₀)与淋巴结有转移者(N₁, N₂)之间 $P < 0.01$;而在 T₁、T₂、T₃、T₄ 期间无显

著差异($P>0.05$)。可见 nm23 mRNA 表达量与肺癌分期的相关性主要取决于其与淋巴结转移的关系及有无远处转移。Ohta 等^[5]总结了 122 例 I 期原发性肺癌的肿瘤及肺门和纵隔淋巴结共 2 030 枚。nm23 表达与淋巴结微转移呈负相关。而有淋巴结微转移的患者的 3 年和 5 年生存率明显低于没有转移者。Ayabe 等^[6]通过 RT-PCR 的方法检测非小细胞肺癌淋巴结也发现, nm23 mRNA 的表达与淋巴结的微转移负相关, 但与基于常规病理切片的淋巴结分期无关。国内陈晓峰等^[7]的研究也发现 nm23 mRNA 表达降低与非小细胞肺癌的低分化和淋巴结转移等相关。

根据本组数据, 肺癌与癌旁正常肺组织之间 nm23 mRNA 的表达量无显著性差异。对此也有持相反观点的研究者。Liu 等^[8]检测 4 个肺癌细胞系中 12 种肿瘤相关蛋白的表达, 其中 nm23 的表达上调。Sato 等^[9]测定 27 例新鲜肺腺癌和邻近非肿瘤标本的 nm23 蛋白总量和 H1、H2 相对水平, 结果显示 H1、H2 的表达在肿瘤组织中较相应的非肿瘤组织高。本组以癌旁组织作为正常肺组织, 可能是导致肺癌与癌旁正常肺组织间 nm23 表达量无显著性差异的原因。这也从另一侧面提示在出现病理学可见的异常之前, 受到内外环境刺激的呼吸道上皮细胞已经出现了基因或其表达水平上的改变。

nm23 mRNA 的表达对肺癌患者术后生存期的影响, 文献报道不一。Tomita 等^[10]用免疫组化方法检测淋巴结阳性的肺癌患者中 nm23 蛋白的表达, 结果无论是肺癌病灶还是转移淋巴结的 nm23-H1 基因表达均与预后无显著相关性。而 Katakura 等^[11]同样用免疫组化的方法检测 117 例手术切除的 I 期非小细胞肺癌, 却得出不同的结果, nm23 mRNA 表达阴性的患者预后显著差于表达阳性的患者。本研究随访时间短, 样本不够大, 且术后治疗方案无法完全统一, 难以确切判断 nm23 表达与非小细胞肺癌与预后间的关系。

总之, 本组结果提示 nm23 基因的表达量与非小细胞肺癌的临床病理特征有一定的关系, nm23 基因表达量的降低可能影响非小细胞肺癌的生物学特性, 进而促进了肺癌的转移、分化等。虽然本组病例的预后与 nm23 mRNA 的表达无显著相关, 但如

能继续随访, 增加样本量可能会进一步揭示 nm23 mRNA 的表达与非小细胞肺癌预后的关系。

[参考文献]

- [1] STEEG P S, BEVILACQUA G, KOOPER L, *et al.* Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80(3): 200-204.
- [2] LAOCMBE M L, MILON L, MUNIER A, *et al.* The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32(3): 247-258.
- [3] STEEG P S, OUATAS T, HALVERSON D, *et al.* Metastasis suppressor genes: basic biology and potential clinical use [J]. *Clin Breast Cancer*, 2003, 4(1): 51-62.
- [4] 陈晓峰, 周清华, 张尚福, 等. 肺癌术后转移及预后与转移抑制基因 nm23 和 nm23-H1 的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(1): 40-41.
- [5] OHTA Y, NOZAWA H, OAD M, *et al.* Increased vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor-C and decreased nm23 expression associated with microdissemination in the lymph nodes in stage I non-small cell lung cancer [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119(4 Pt 1): 804-813.
- [6] AYABE T, TOMITA M, MATSUZAKI Y, *et al.* Micrometastasis and expression of nm23 messenger RNA of lymph nodes from lung cancer and the postoperative clinical outcome [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 10(3): 152-159.
- [7] CHEN X F, ZHANG H T, QI Q Y, *et al.* Expression of E-cadherin and nm23 is associated with the clinicopathological factors of human non-small cell lung cancer in China [J]. *Lung Cancer*, 2005, 48(1): 69-76.
- [8] LIU Y, CHEN Q, ZHANG J T. Tumor suppressor gene 14-3-3sigma is down-regulated whereas the proto-oncogene translation elongation factor 1delta is up-regulated in non-small cell lung cancers as identified by proteomic profiling [J]. *J Proteome Res*, 2004, 3(4): 728-735.
- [9] SATO Y, TSUCHIYA B, URAO T, *et al.* Semiquantitative immunoblot analysis of nm23-H1 and -H2 isoforms in adenocarcinomas of the lung: prognostic significance [J]. *Pathol Int*, 2000, 50(3): 200-205.
- [10] TOMITA M, AYABE T, MATSUZAKI Y, *et al.* Immunohistochemical analysis of nm23-H1 gene product in node-positive lung cancer and lymph nodes [J]. *Lung Cancer*, 1999, 24(1): 11-16.
- [11] KATAKURA H, TANAKA F, OYANAGI H, *et al.* Clinical significance of nm23 expression in resected pathologic-stage I, non-small cell lung cancer [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(4): 1060-1064.

[收稿日期] 2006-01-04

[修回日期] 2006-06-04

[本文编辑] 瞿永华