

nm23 mRNA 表达与肺癌的分化转移 及病理之间的相关性研究*

王海峰 陈晓峰 高文 丁嘉安 易祥华 史德刚

(上海市肺科医院胸外科, 上海 200433)

摘要 目的:研究肺癌中 nm23 mRNA 表达水平与肺癌病理分级和临床分期之间的关系。方法:53 例肺癌标本,46 例(癌旁)正常肺组织,5 例肺部良性结节性病变组织,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)正常肺组织中的阳性率分别为 43.4%(23/53)和 39.1%(18/46), $P>0.05$;低分化、晚期、肺门纵隔淋巴结转移的非小细胞肺癌,其 nm23 mRNA 的表达量显著降低($P<0.05$)。结论:nm23 mRNA 与肺癌的分化、转移及病理分期有关,检测 nm23 mRNA 水平有可能推测肺癌的预后。

关键词 肺肿瘤 nm23 基因 mRNA 表达

The Relationship Between nm23 mRNA Expression and the Differentiation, Metastasis and Pathology of Lung Cancer.

Wang Haifeng Chen Xiaofeng Gao Wen, et al. (Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pneumology Hospital, Shanghai 200433)

Abstract Objective: To investigate the relationship between the level of nm23 mRNA expression and pathological grades and clinical stages of lung cancer. **Methods:** We collected 53 specimens of lung cancer, 46 of (para-cancer) normal lung tissues, 5 of benign nodal lung diseases. We used RT-PCR to measure the level of nm23 mRNA expression in the specimens, and determine the stages of disease according to the results of surgery, pathology and imaging diagnoses. Then analyses were carried out between the level of nm23 mRNA expression and the clinical variables. **Results:** 43.4%(23/53) and 39.1%(18/46) specimens of lung cancer and (para-cancer) normal lung tissue were positive for nm23 mRNA expression, $P>0.05$; non-small cell lung cancer with low differentiation, advanced stages and nodal metastases showed a magnificently lower expression of nm23 mRNA ($P<0.05$). **Conclusion:** nm23 mRNA expression is related to the differentiation, metastases and pathological staging of lung cancer, hence, might affect its prognosis.

Key Words Lung neoplasm nm23 gene mRNA expression

近年来,分子生物学的研究发现,nm23 基因与非小细胞肺癌的分化、转移及预后等有一定的关系。本文采用 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 资料与方法

1.1 一般资料 共测定 59 例患者、105 个肺部手术标本的 nm23 mRNA 表达量,男性 44 例(74.6%),女性 15 例(25.4%);肺癌患者 54 例,肺部良性病变患者 5 例。取其中 53 个肺癌组织标本,(癌旁)正常肺组织 46 例(其中 44 例取自上述 53 例肺癌组织旁的正常肺组织,1 例取自上述 5 例良性病变标本之中,

* 本课题由上海市卫生局科技发展基金(99424)资助

另有1例肺癌患者标本未测肺癌组织而仅测定病灶周围正常肺组织的 nm23 mRNA 表达量)。

53例肺癌中:男性40例(75.5%),女性13例(24.5%);年龄 58.28 ± 9.38 岁;肿瘤直径: 3.85 ± 1.63 cm;病理类型:腺癌24例(45.3%),鳞癌18例(34.0%),腺鳞混合癌9例(17.0%),细支气管肺泡细胞癌2例(3.8%);分化程度:以病理1级和1~2级为高分化,24例(45.3%);2~3级和3级为低分化,29例(54.7%);病理分期:I期14例(26.4%),II期13例(24.5%),III期23例(43.4%),IV期3例(5.7%)。所有患者手术前均未行放化疗。

1.2 RT-PCR方法检测 nm23 mRNA 肺癌手术后,切除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, -70°C 保存待用。用紫外分光光度计测260nm/280nm处OD值,测其总RNA浓度。用M-MLV RT合成第一链cDNA。

1.3 统计分析方法 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。以 $P < 0.05$ 为有显著差异。

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);46例正常肺组织阳性率为39.1%(18/46);肺癌与癌旁正常肺组织之间的阳性率比较无显著差异($P > 0.05$)。5例肺部良性病变的阳性率为20%(1/5),与肺癌相比亦无显著差异($P > 0.05$)(见图1)。

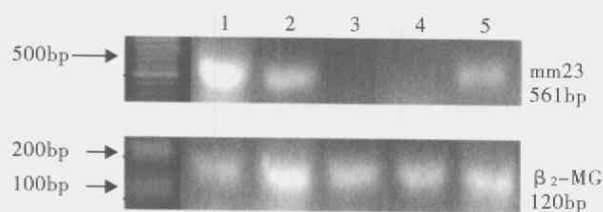


图1 非小细胞肺癌 nm23 mRNA 的表达

1. 良性,强表达(No. 35);2,3. 高分化鳞癌、癌旁,分别为中度表达、不表达(No. 18);4,5. 低分化的腺鳞混合癌、癌旁,分别为不表达、中度表达(No. 20)。

2.2 定量分析肺癌 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)(见表1,2)。

表1 配对比较肺癌与癌旁肺组织 nm23 的表达量(以吸光度表示)

	n	吸光度($\bar{x} \pm s$)	P
肺癌组织	44	0.39 ± 0.57	0.886
癌旁肺组织	44	0.39 ± 0.71	

表2 成组比较 nm23 的表达量(以吸光度表示)与肺癌各临床病理参数间的关系

	n	吸光度($\bar{x} \pm s$)	P
病灶性质			0.964
肺癌	53	0.38 ± 0.65	
良性病变	5	0.46 ± 1.03	
病理类型			$P_{1,2,3,4} : 0.098$
0. 癌旁肺组织	46	0.37 ± 0.69	$P_{1-2} : 0.471$
1. 鳞癌	18	0.33 ± 0.61	$P_{0-1} : 1.000$
2. 腺癌	24	0.49 ± 0.56	$P_{0-2} : 0.558$
3. 腺鳞混合癌	9	0.02 ± 0.05	
4. 细支气管肺泡癌	2	0.00 ± 0.00	
分化程度			0.024
高分化	24	0.53 ± 0.65	
低分化	29	0.18 ± 0.37	
病理分期			0.002
I期	14	0.75 ± 0.70	$P_{0-1} : 0.041$
II期	13	0.35 ± 0.43	$P_{1-2} : 0.435$
III期	23	0.12 ± 0.36	$P_{2-3} : 0.068$
IV期	3	0.00 ± 0.00	$P_{3-4} : 1.000$
			$P_{1,2-3,4} : 0.001$
T分期			0.064
T1	6	0.90 ± 0.57	$P_{1-2} : 0.047$
T2	35	0.29 ± 0.53	$P_{2-3} : 0.995$
T3	7	0.15 ± 0.33	$P_{3-4} : 1.000$
T4	5	0.24 ± 0.54	$P_{1,2-3,4} : 0.670$
N分期			0.006
N0	18	0.64 ± 0.67	$P_{0-1} : 0.168$
N1	15	0.23 ± 0.40	$P_{1-2} : 0.739$
N2	20	0.14 ± 0.38	$P_{1-2} : 0.004$
			$P_{1-2} : 0.006$

2.3 其他病理类型

良性病变 5 例,包括肺硬化性血管瘤 1 例、肺结核 3 例、肺软骨样错构瘤 1 例,其中 1 例结核球的 nm23 mRNA 表达量为 2.30。

3 讨 论

Steeg 等^[1]最早描述了 nm23 基因 - NonMetastatic 23 gene。在两个实验体系(鼠 K-1735 黑色素细胞瘤和大鼠乳腺癌)中,低转移倾向的细胞和肿瘤 nm23 mRNA 水平最高。他们同时又证明 nm23 mRNA 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。nm23 基因的产物为核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK),nm23 基因包括 nm23-H1 和 H2,其产物分别对应于 NDPK 的 A 链和 B 链。nm23 基因的功能正是通过其产物核苷二磷酸激酶来起作用的。nm23 蛋白的功能涉及多种生物过程,包括植物的光敏色素反应、转移抑制作用和调节分化作用。nm23 基因的转录在多种动物的胚胎发生过程中均可见到。原始组织中 nm23 蛋白低表达,当原始组织功能开始分化后,nm23 mRNA 的表达显著增高,nm23 蛋白的堆积对应于多种上皮组织的分化。多数组织成年后仍然保留了 nm23 mRNA 的高水平表达,而肺、小肠仅在胚胎发育时期有短暂升高,成年后维持在低水平,乳腺组织在怀孕和授乳期有 nm23 mRNA 表达的周期性升高^[2]。

肿瘤细胞的侵袭和转移涉及到正常细胞在发育分化过程中的许多步骤。肿瘤细胞的特征之一就是去分化,因此,可以设想 nm23 基因及其表达产物的变化可能引起肿瘤细胞的侵袭力和转移倾向的改变。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,他又用基因转染的方法直接证明了,通过引入外源性基因增进 nm23 基因的表达,可产生抑制转移的效果。

本组数据提示,nm23 mRNA 的表达量在鳞型(0.33 ± 0.61)与腺型(0.49 ± 0.56)肺癌之间无显著差异($P > 0.05$)。这与多数文献报道一致,提示

nm23 mRNA 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。nm23 mRNA 在高分化和低分化非小细胞肺癌中的表达量分别为 0.53 ± 0.65 和 0.18 ± 0.37 , $P < 0.05$ 。Huwert 等^[3]测定 30 例鳞癌组织 nm23 mRNA 表达水平,发现进展期和低分化的鳞癌 nm23 mRNA 表达明显增高。陈军等^[4]应用 Southern 印迹杂交研究也表明 nm23 基因可能参与调控肺癌的细胞分化和转移过程。

本组结果还提示不同分期的肺癌,nm23 mRNA 的表达量也有显著差异(I, II, III, IV 期表达量分别为 0.75 ± 0.70 , 0.35 ± 0.43 , 0.12 ± 0.36 和 0.00 ± 0.00 , $P < 0.01$),而早期(I, II 期)与中晚期(III, IV 期)间的差异更为显著($P = 0.001$)。其中 N0, N1, N2 期分别为 0.64 ± 0.67 , 0.23 ± 0.40 和 0.14 ± 0.38 , $P < 0.01$;淋巴结无转移(N0)与淋巴结有转移者(N1, 2)之间 $P < 0.01$;N0 与 N2 之间也是 $P < 0.01$;T1, T2, T3, T4 期分别为 0.90 ± 0.57 , 0.29 ± 0.53 , 0.15 ± 0.33 和 0.24 ± 0.54 , $P > 0.05$ 。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尤其是纵隔淋巴结转移的关系。Ohta 等^[5]总结了 122 例 I 期原发性肺癌,肿瘤及肺门和纵隔淋巴结共 2030 枚,nm23 mRNA 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 年生存率分别为 57% 和 54%,明显低于没有转移者。Kawakubo 等^[6]也认为,乳腺癌细胞中 nm23 蛋白表达减低与淋巴结转移和预后差相关。Lai 等^[7]甚至认为用 nm23 蛋白来预测远处转移比肺癌的 T 分期或组织分型更实用。高表达者远处转移发生少,局部复发晚。通过测定 nm23 mRNA 的表达可检出早期肺癌中有高转移风险从而也更可能从术后辅助化疗中受益的患者。国内有人^[8]研究得出 nm23、nm23-H1 在肺癌中起转移抑制基因的作用,它们的表达水平降低可能是肺癌转移的重要原因之一。

根据本组数据,肺癌与癌旁正常肺组织之间 nm23 mRNA 的表达量无显著差异。也有持相反观点的研究者,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,非肿瘤组织 H2/H1 = 1.9~14.1 (中位值 5.2),而肿瘤组织为 1.0~5.9 (中位值 2.5)。分析本组特点,以手术切除的肺癌标本的癌旁组织作为癌旁正常肺组织,可能是导致肺癌与癌旁正常肺组织间 nm23 mRNA 表达量无显著差异的原因。这也从另一侧面提示癌基因或抑癌基因的突变或表达异常是由内外环境的刺激诱发的,在支气管肺泡上皮中存在多源性。在出现病理学可见的异常之前,受到内外环境刺激的呼吸上皮细胞已经出现了基因或其表达水平上的改变。这一点可通过取良性病变的正常肺组织与之进行比较,加以证实。本组结果显示,肺癌与良性病变之间 nm23 mRNA 的表达量也无显著差异,综合分析后推测可能是由于所选用的良性病例太少,不能导出可靠的统计结果,这在今后的工作中应加以改进,进一步研究。

综观文献,用 RT-PCR 方法测定 nm23 mRNA 表达水平的报道仍较少见。本组所采用的 mRNA 分析方法比常规的 DNA 基因组分析有优越之处。首先,DNA 水平的扩增并不一定导致表达的增加,但大量相应的 mRNA 的存在则使表达增加,而 RT-PCR 方法则是直接检测特定的 mRNA 的表达量。其次,由于 mRNA 中没有内含子序列的干扰,因此仅用 1 组引物就能够扩增由多个外显子翻译剪接后形成的 mRNA,而在 DNA 水平则需分别检测各个外显子。最后,引物序列可以根据氨基酸的序列而定,因此当只知道很少的蛋白质序列时,就有可能扩增特异的 mRNA 分子。此外,本组通过采用定量分析的方法,最大限度地利用了 RT-PCR 结果所提供的信息。

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、去分化等。本组病例尚在随访中,待随访得出初步结果后,应进一步分析 nm23 基因的表达与非小细胞肺癌的预后的关系。

参考文献

- 1 Steeg PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, et al. Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res*, 1988, 48(22): 6550~6554.
- 2 Quenby SM, Gazvani MR, Brazeau C, et al. Oncogenes and tumour suppressor genes in first trimester human fetal gonadal development. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(8): 737~741.
- 3 Huwer H, Engel M, Welter C, et al. Squamous cell carcinoma of the lung: does the nm23 gene expression correlate to the tumor stage? *Thorac Cardiovasc Surg*, 1994, 42(5): 298~301.
- 4 陈军,周清华,覃扬,等. 人肺癌中 nm23 等位基因缺失的研究. *中国肺癌杂志*, 2000, 3(1): 8~13.
- 5 Ohta Y, Nozawa H, Tanaka Y, 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 Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119(4 Pt 1): 804~813.
- 6 Kawakubo Y, Sato Y, Koh T, et al. Expression of nm23 protein in pulmonary adenocarcinomas; inverse correlation to tumor progression. *Lung Cancer*, 1997, 17(1): 103~113.
- 7 Lai WW, Wu MH, Yan JJ, et al. Immunohistochemical analysis of nm23 - H1 in stage I non - small cell lung cancer; a useful marker in prediction of metastases. *Ann Thorac Surg*, 1996, 62(5): 1500~1504.
- 8 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. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(1): 40~41.
- 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. *Pathol Int*, 2000, 50(3): 200~205.