

· 临床研究 ·

MTA1基因在非小细胞肺癌中的表达及其意义

李定彪 钱锦贤 洪志鹏

【摘要】背景与目的 转移相关基因 (metastasis-associated gene 1, *MTA1*) 是近年来研究较深入的肿瘤浸润转移基因, 在多种肿瘤细胞系中表达, 与肿瘤的侵袭和转移密切相关。本研究目的是探讨*MTA1*基因的表达与非小细胞肺癌的浸润、转移关系。方法 建立测定*MTA1* mRNA表达的巢式逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 最适条件, 在半定量水平测定42例非小细胞肺癌标本癌组织、癌旁组织、正常组织和淋巴结及20例肺良性疾病组织*MTA1* mRNA表达的相对水平, 分析其与临床和组织病理学特征的关系。结果 *MTA1* mRNA在非小细胞肺癌组织 (1.50 ± 0.26) 及转移淋巴结 (1.88 ± 0.35) 中的平均表达水平高于正常组织 (1.02 ± 0.17) 和良性疾病组织 (0.90 ± 0.15) ($P < 0.01$), 癌组织中*MTA1*的表达 (1.50 ± 0.26) 高于癌旁组织 (1.09 ± 0.16) ($P < 0.01$), 淋巴结转移组*MTA1*的表达 (1.88 ± 0.35) 高于无淋巴结转移组 (1.40 ± 0.36) ($P < 0.01$), 非小细胞肺癌组织中*MTA1* mRNA高表达率与临床分期、T分期和N分期呈正相关关系。42例非小细胞肺癌组织中, 19例*MTA1* mRNA高表达, 占45.2%; 19例有转移的淋巴结中, 16例高表达占84.2%。*MTA1*在癌组织中的表达与患者年龄、性别、肿瘤类型无关 ($P > 0.05$)。结论 *MTA1* mRNA过度表达与非小细胞肺癌浸润和转移密切相关。*MTA1* mRNA的过度表达可能是评价非小细胞肺癌的恶性程度、转移的潜在指标。

【关键词】*MTA1*基因 肺肿瘤 肿瘤转移

【中图分类号】R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.06.04

Expression and clinical significance of *MTA1* in non-small cell lung cancer

LI Dingbiao, QIAN Jinxian, HONG Zhipeng

Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China

Corresponding author: QIAN Jinxian, E-mail: qianjx2000@163.com

【Abstract】Background and objective Metastasis-associated gene 1 (*MTA1*) has been studied deeply recently as a tumor infiltration and metastasis gene. It was expressed in many tumor cell line and was correlated with tumor infiltration and metastasis. The aim of this study is to investigate the relationship between the expression of *MTA1* and invasion and metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC). Methods Optimal conditions of nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were found out; then the expression of *MTA1* mRNA in 42 samples of primary carcinoma tissues, paracancerous tissues, normal tissues and corresponding lymph nodes were compared with 20 lung innocence tissues at semi-quantitative level and the results were compared with clinical pathologic data. Results Average expression of the *MTA1* gene in NSCLC primary carcinoma tissue (1.50 ± 0.26) and lymph nodes with metastasis (1.88 ± 0.35) was remarkably higher than that in normal tissue (1.02 ± 0.17) and lung innocence tissue (0.90 ± 0.15) ($P < 0.01$). Average expression of the *MTA1* gene in NSCLC primary carcinoma tissue (1.50 ± 0.26) was significantly higher than that in paracancerous tissue (1.09 ± 0.16). Average expression of the *MTA1* gene in lymph nodes with metastasis (1.88 ± 0.35) was significantly higher than that in those without metastasis (1.40 ± 0.36) ($P < 0.01$). The frequency of *MTA1* overexpression in NSCLC tissue was closely correlated with clinical staging, T staging and N staging; the frequency of *MTA1* overexpression was 45.2% (19/42) in NSCLC tissue. The frequency of *MTA1* overexpression was 84.2% (16/19) in lymph nodes with metastasis. The expression level of *MTA1* gene in cancer tissues was not related to age, gender of the patients and type of tumor. Conclusion Our data suggests that the overexpression of the *MTA1* gene correlates with invasion and metastasis of NSCLC. A high expression of *MTA1* mRNA may be a potential indicator for assessing the malignancy and metastasis of NSCLC.

【Key words】*MTA1* gene Lung neoplasms Neoplasm metastasis

作者单位: 650031 昆明, 昆明医学院第一附属医院胸外科 (通讯作者: 钱锦贤, E-mail: qianjx2000@163.com)

在肿瘤细胞的生物学特征中,以侵袭性和转移性最为关键,也是恶性肿瘤的重要标志。目前,对肿瘤转移机制的研究仍不理想。肿瘤的复发转移是我们目前面对所有癌症的共同难题,因此,对肿瘤转移机制及治疗方法的研究显得十分迫切。转移相关基因(metastasis-associated gene 1, *MTA1*)是近年来研究较深入的肿瘤浸润转移基因,在多种肿瘤细胞系中表达,与肿瘤的侵袭和转移密切相关。本研究应用半定量巢式RT-PCR方法,对非小细胞肺癌组织、癌旁组织、正常组织、淋巴结及肺良性疾病组织各组中*MTA1*基因表达进行对比,研究其与肺癌侵袭转移的相关关系。

1 材料与方法

1.1 材料 标本取自昆明医学院第一附属医院胸外科2006年11月-2007年5月的新鲜手术标本。42例肺癌手术标本按癌组织、癌旁组织(距癌组织边缘 ≤ 3 cm)、正常组织(距癌组织 >10 cm)及淋巴结切取后立即放置于液氮中保存备用,其余部分常规送病理检查。癌组织42例,男性29例,女性13例,年龄35岁-72岁,平均年龄55.28岁。按照WHO肺癌分型标准及UICC1997年新的国际肺癌分期标准进行分型、分期,腺癌27例;鳞癌11例;腺鳞癌4例。I期20例;II期8例;III期14例。肺良性疾病组织20例(结核5例,支气管扩张3例,肺大泡9例,肺囊肿3例)作为对照。男性13例,女性7例,年龄23岁-65岁,平均年龄52.35岁。62例标本均经病理检查证实。

1.2 总RNA的提取、鉴定 取50 mg冰冻标本组织复温后加入Trizol试剂(Generay产品)0.5 mL,在冰浴中匀浆,按说明操作提取总RNA。用双光束分光光度计测 A_{260} 值检测总RNA浓度,测 $A_{260/280}$ 值检测其纯度。1.8%变性凝胶电泳分析总RNA完整性。

1.3 cDNA制备 应用逆转录试剂盒(RevertAidTM Fermentas产品)。合成cDNA第一链的终体积为20 μ L,具体方法按说明操作。取1.0 μ g总RNA,加入随机引物1 μ L,加纯水至12 μ L,再加5 \times RT buffer 4 μ L, RNA酶抑制剂1 μ L, 2 mM dNTP(三磷酸脱氧核糖核苷)2 μ L, 25 $^{\circ}$ C水浴5 min,加逆转录酶1 μ L,水浴25 $^{\circ}$ C、10 min, 42 $^{\circ}$ C、60 min,再水浴70 $^{\circ}$ C、10 min停止反应。冰浴后备用。

1.4 巢式PCR反应条件 引物系列人*MTA1*基因扩增内侧引物:上游5'-GCAGCTGAAGCTGAGAGC-AAGTTA-3';下游5'-CCTTGACGTTGTTGACGCTGA-3'。人*MTA1*基因扩增外侧引物:上游5'-GTGGAAGACCACCGACAGAT-3';下游5'-CCTG-GTCTTCATGGCAAAC-3';内参照

β -actin引物:上游5'-CTTCCTGGG-CATGGAGTC-3',下游5'-GCCGATCCACACGGAGTA-3'(大连宝生物公司产品)。*MTA1*基因第一轮PCR反应体系:应用PCR扩增试剂盒(大连宝生物产品),于50 μ L反应体系中加入ddH₂O 35 μ L, 10 \times PCR缓冲液5 μ L, 25 mmol/L氯化镁3 μ L, 10 mM dNTP 1 μ L, TaqDNA聚合酶1 μ L, 模板cDNA 3 μ L, 外侧引物(上游)10 μ mol/L, 1 μ L, 外侧引物(下游)10 μ mol/L, 1 μ L。PCR反应参数:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s, 54 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 20个循环;最后一个周期72 $^{\circ}$ C延伸5 min。*MTA1*基因第二轮PCR反应体系:于50 μ L反应体系中加入ddH₂O, 37 μ L, 10 \times PCR缓冲液5 μ L, 25 mmol/L氯化镁3 μ L, TaqDNA聚合酶1 μ L, 10 mM dNTP, 1 μ L, 第一次扩增产物1 μ L, 内侧引物(上游)10 μ mol/L, 1 μ L, 内侧引物(下游)10 μ mol/L, 1 μ L。PCR反应参数:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s, 54 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 30个循环;最后一个周期72 $^{\circ}$ C延伸5 min。内参照 β -actin PCR反应体系于50 μ L反应体系中加入ddH₂O, 35 μ L, 10 \times PCR缓冲液5 μ L, 25 mmol/L氯化镁3 μ L, TaqDNA聚合酶1 μ L, 10 mM dNTP, 1 μ L, 模板cDNA 3 μ L, 引物(上游)10 μ mol/L, 1 μ L, 引物(下游)10 μ mol/L, 1 μ L。内参照 β -actin与*MTA1*基因第二轮PCR一起进行扩增。半定量PCR:取PCR产物5 μ L, 6 \times loading上样缓冲液1 μ L, 混匀后上样于2.0%琼脂糖凝胶80 V恒压电泳35 min。电泳结束后在Tanon 350紫外凝胶自动成像仪分析系统下测量各区带的吸光度值(A值)。*MTA1*及 β -actin的扩增片段分别为91 bp、237 bp。*MTA1*与 β -actin A值的比值为每例标本的相对A值。每例标本的相对A值重复测3次,取其均值减小误差。以每例标本的相对A值作为其*MTA1*的表达。

1.5 统计学方法 应用SPSS11.5软件, RT-PCR的计量数据采用Mean \pm SD表示,方差齐时行t检验、方差不齐时行秩和检验统计学分析,计数资料行卡方检验、四格表精确概率计算, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *MTA1* mRNA在非小细胞肺癌及肺良性疾病组织中的表达 *MTA1* mRNA在肺良性疾病组织、非小细胞肺癌的正常肺组织、癌旁组织、癌组织和淋巴结组织中均有不同程度的表达。内参照 β -actin在所有组织中均见扩增产物。所有肺良性疾病组织*MTA1* mRNA为相对低水平表达,非小细胞肺癌组织、肺良性疾病组织两组之间性别、年龄差异无统计学意义($P > 0.05$), *MTA1* mRNA在癌组织中的平均

表 1 MTA1 mRNA在癌组织、肺良性疾、淋巴结组织、癌旁组织、正常组织、无转移淋巴结、有转移淋巴结组织中的表达 (Mean±SD) 及各组中表达的两两比较

Tab 1 Expression of MTA1 mRNA in cancer tissues, lung innocence tissues, lymph nodes, paracancerous tissue, normal tissue, lymph nodes without metastasis and lymph nodes with metastasis tissues and compare to each other in groups

Tissues	n	MTA1 RT-PCR production relative A value	P value
①cancer tissues	42	1.50±0.26	<0.001 [#]
②lung innocence tissues	20	0.90±0.15	0.850 [△]
③lymph nodes	42	1.61±0.43	0.136 [▲]
④paracancerous tissue	42	1.09±0.16	<0.001 [*]
⑤normal tissue	42	1.02±0.17	0.411 [*]
⑥lymph nodes without metastasis	23	1.40±0.36	<0.001 [◇]
⑦lymph nodes with metastasis	19	1.88±0.35	<0.001 [◆]

[#]: ① vs ②; [△]: ② vs ④; [▲]: ① vs ③; ^{*}: ① vs ④; ^{*}: ② vs ⑤; [◇]: ⑥ vs ⑦; [◆]: ① vs ⑦

表达明显高于肺良性疾组织中的表达 ($P<0.01$)。MTA1 mRNA在癌组织的平均表达明显高于癌旁组织中的表达 ($P<0.01$)。MTA1 mRNA在正常组织的平均表达与肺良性疾组织的表达及癌旁组织中表达的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。有转移的淋巴结中的表达明显高于无转移的淋巴结中的表达 ($P<0.01$) (表1, 图1)。基因测序结果证实RT-PCR产物为MTA1基因, 其碱基配对正确率为98% (图2)。

2.2 非小细胞肺癌MTA1 mRNA的表达与临床病理的关系
用癌组织的相对A值>1.50作为MTA1 mRNA高表达的评价标准。根据MTA1 mRNA在非小细胞肺癌中的表达水平, 将样本分为高、低表达两组: 相对A值>1.50组和相对A值

≤1.50组 (表2)。42例非小细胞肺癌组织中, 19例MTA1 mRNA高表达 (45.2%), 其中有转移的19例原发灶中高表达的13例 (68.4%), 23例无转移的原发灶中有6例高表达 (26.1%)。42例配对的淋巴结中有22例高表达 (52.4%), 有转移的19例淋巴结组织中16例高表达 (84.2%), 无转移的23例淋巴结组织6例高表达 (26.1%)。癌组织中MTA1 mRNA高表达和低表达两组之间性别、年龄及病理类型差异无统计学意义 ($P>0.05$); 各临床分期I期MTA1 mRNA高表达率为20%, II期为50%, III期为78.6%, 各临床分期之间有差异 ($P<0.05$); T分期MTA1 mRNA高表达率T1为30%, T2为44.0%, T3为100%, T4为83.3%, T分期之间差异有统计学意义 ($P<0.05$); N分期MTA1 mRNA高表达率N0为26.1%, N1为50.0%, N2为81.8%, N分期之间差异也有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

目前肺癌在多数发达国家中, 在男性常见恶性肿瘤中占首位, 在女性常见恶性肿瘤中占第二、三位。同时, 高发病率和低存活率使得肺癌成为肿瘤的主要死因。因此, 对肺癌浸润转移的分子机理的研究就显得尤其重要。MTA1基因是近年来发现的一个与肿瘤浸润转移密切相关的基因, 因而受到国内外学者广泛关注。目前认为MTA1的高表达与乳腺癌^[1,2]、胃肠癌^[3]、食道癌^[4]、肝癌^[5]、卵巢癌^[6]、鼻咽癌^[7]、胰腺癌^[8]、膀胱癌^[9]、肺癌^[10]、前列腺癌^[11]等的侵袭转移密切相关。

MTA1促进癌转移的分子机制可能与组蛋白去乙酰化转录调节有关。在转移的多步骤过程中, 细胞间黏附力的下降与细胞表面黏附分子、细胞骨架蛋白的表达水平有关; 新生血管的形成甚至转移部位的选择也都受到复杂网状转录系统调控。MTA1有可能正是通过对这些细胞转录

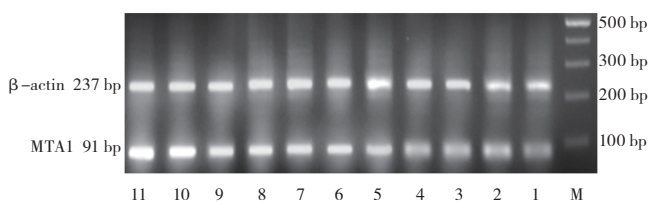


图 1 MTA1 mRNA RT-PCR 电泳图谱

Fig 1 Electrophoregram of MTA1 mRNA RT-PCR

M: 100 bp Ladder marker; 1: lung innocence tissues; 2: normal tissue; 3,4: paracancerous tissue; 5: lymph nodes without metastasis; 6,7: cancer tissues without metastasis; 8,9: cancer tissues with metastasis; 10,11: lymph nodes with metastasis

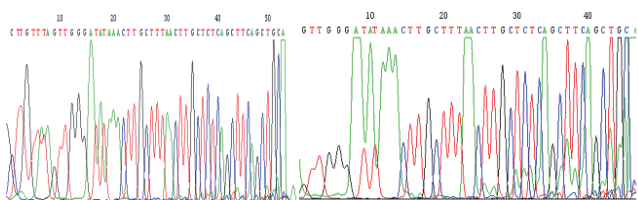


图 2 测序图

Fig 2 Equencing figure

表2 非小细胞肺癌中MTA1 mRNA的表达与临床病理的关系

Tab 2 Relationship between the expression of MTA1 mRNA in NSCLC patients and clinicopathologic significance

Characteristics	n	RT-PCR production relative A value		P value
		High	Low	
Age (years)	42	54.31 ± 9.75	56.08 ± 9.89	0.558
Gender				0.160
Man	29	11	18	
Woman	13	8	5	
Clinical stage				0.001
I	20	4	16	
II	8	4	4	
III	14	11	3	
T-stage				0.030
T1	10	3	7	
T2	25	11	14	
T3	1	1	0	
T4	6	5	1	
N-stage				0.002
N0	23	6	17	
N1	8	4	4	
N2	11	9	2	
Pathology type				0.656
Adenocarcinoma	27	13	14	
Squamous carcinoma	11	5	6	
Adenocarcinoma and Squamous carcinoma	4	1	3	

水平的调控来调节与肿瘤转移相关蛋白的水平,从而参与肿瘤细胞侵袭转移的许多细节过程。

我们应用半定量巢式RT-PCR方法,对非小细胞肺癌组织、癌旁组织、正常组织、淋巴结及肺良性病变组织各组中MTA1基因表达进行对比,研究其与肺癌侵袭转移的相关关系。本实验中,MTA1 mRNA表达水平其相对A值由低到高为:肺良性病变组织,正常组织,癌旁组织,无癌转移淋巴结,无转移癌组织,有转移癌原发灶,有癌转移淋巴结。在有转移的非小细胞肺癌原发灶中有68.4%MTA1基因高表达,而无转移的原发灶中,高表达率为26.1%,有无转移的原发灶之间差异有统计学意义($P<0.05$);而MTA1 mRNA的高表达率在淋巴结中,有癌转移(84.2%)与无癌转移(26.1%)之间差异有统计学意义($P<0.01$)。淋巴结转移组MTA1的高表达率显著高于无淋巴结转移组,说明MTA1的高表达能促进癌的淋巴结转移,这与Toh^[4]等对食管癌的研究结果一致。因而,MTA1 mRNA高表达与非小细胞肺癌的浸润及淋巴结转移密切相关。MTA1的高表达已显示与多种恶性肿瘤的侵袭力密切相关。国内外多项研究结果证实MTA1基因的表达强度与淋巴结转移的关系十分

密切,可能是一个预测肿瘤转移潜能的有价值的指标,应用于临床可能有助于早期预测非小细胞肺癌的淋巴结转移。本试验结果也证实MTA1基因在非小细胞肺癌淋巴结转移中扮演重要角色,是参与癌转移的重要因子,为进一步阐明非小细胞肺癌转移的分子机理提供了实验依据。同时,基因MTA1检测可能成为预测非小细胞肺癌淋巴结转移的生物学指标,判断患者预后,从而对非小细胞肺癌的临床诊断治疗有重要指导意义。

参 考 文 献

- Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses. *J Biol Chem*, 1994, 269(37): 22958-22963.
- Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, mta1, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines. *Gene*, 1995, 159(1): 97-104.
- Wu Q, Chen CJ, Liu LM, et al. Correlation between overexpression of the MTA1 gene and the invasion and metastasis in gastric carcinomas. *J Bengbu Med Coll*, 2002, 27(4): 289-291. [吴穷, 陈昌杰, 刘黎明. MTA1

基因过度表达与胃癌浸润和转移的关系. 蚌埠医学院学报, 2002, 27(4): 289-291.]

4 Toh Y, Kuwano H, Mori M, et al. Overexpression of metastasis-associated MTA1 mRNA in invasive oesophageal carcinomas. Br J Cancer, 1999, 79(11-12): 1723-1726.

5 Lin C, Chen H, Wu MC, et al. Expression of tumor metastasis gene *MTA1* in hepatocellular carcinoma. Chin J Surg, 2000, 38(12): 915-917. [林川, 陈汉, 吴孟超. 肿瘤转移基因*MTA1*在原发性肝癌中的表达及其临床意义. 中华外科杂志, 2000, 38(12): 915-917.]

6 Huang GQ, Song Y, He GL. The study of mRNA expression and mutation of *MTA1* gene in ovarian carcinoma. Sichuan Zhong Liu Fang Zhi, 2001, 14(4): 197-199. [黄光琦, 宋毅, 贺国丽. *MTA1*基因在卵巢癌中转录表达及突变的研究. 四川肿瘤防治, 2001, 14(4): 197-199.]

7 Mo LG, Wang HH, Zhao HL, et al. Expression of the *MTA1* gene in nasopharyngeal carcinomas. Mod Oncol, 13(006): 733-735. [莫立根, 王会河, 赵惠柳, 等. *MTA1*在鼻咽癌中的表达及意义. 现代肿瘤医学, 2005, 13(006): 733-735.]

8 Hofer MD, Menke A, Genze F, et al. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells. Br J Cancer, 2004, 90(2): 455-462.

9 Wang S, Peng C, Jiang XZ, et al. Expression of tumor metastasis gene *MTA1* in bladder cancer and clinical implications. Chin Med Engi, 2007, 15(7): 555-557. [汪盛, 彭程, 蒋先镇, 等. 肿瘤转移基因*MTA1*在膀胱癌中的表达及其临床意义. 中国医学工程, 2007, 15(7): 555-557.]

10 Sasaki H, Moriyama S, Nakashima Y, et al. Expression of the MTA1 mRNA in advanced lung cancer. Lung Cancer, 2002, 35(2): 149-154.

11 Hofer MD, Kuefer R, Varambally S, et al. The role of metastasis-associated protein 1 in prostate cancer progression. Cancer Res, 2004, 64(3): 825-829.

(收稿: 2008-07-07 修回: 2008-08-27)
(本文编辑 李博)

· 消息 ·

2008年肿瘤类期刊影响因子数据(部分)(扩展版)

根据中国科学技术信息研究所、万方数据股份有限公司2008年8月出版的《中国期刊高被引指数》(扩展版)统计, 2007年肿瘤学类期刊五年影响因子排序表如下(前10名):

期刊名称	五年影响因子	五年被引频次	单篇文章最高被引频次
中华肿瘤杂志	1.476	1 796	56
中华放射肿瘤学杂志	1.434	849	22
癌症	1.117	1 848	16
中国肺癌杂志	0.652	560	25
中国肿瘤临床	0.634	1 241	11
中国癌症杂志	0.586	588	12
中国肿瘤	0.554	734	27
临床肿瘤学杂志	0.537	631	10
中华肿瘤防治杂志	0.517	1 165	9
肿瘤	0.503	520	12

根据中国科学技术信息研究所、万方数据股份有限公司2008年8月出版的《中国期刊引证报告》(扩刊版)统计, 2007年肿瘤学类期刊五年影响因子排序表如下(前10名):

期刊名称	影响因子	总被引频次	他引率
中华肿瘤杂志	1.412	3 598	0.91
中华放射肿瘤学杂志	1.190	1 508	0.90
癌症	1.088	2 971	0.94
中国肺癌杂志	0.707	795	0.94
癌症进展	0.704	312	0.95
中国肿瘤临床	0.599	2 420	0.87
临床肿瘤学杂志	0.568	813	0.95
中国肿瘤	0.567	1 239	0.92
中华肿瘤防治杂志	0.544	1 509	0.81
中国癌症杂志	0.542	1 007	0.95