

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2002.03.03

PCR-SSCP 法检测非小细胞肺癌中 nm23 基因突变的研究

王海峰 陈晓峰 高文 丁嘉安 易祥华

【摘要】 目的 探讨 nm23 基因突变在人非小细胞肺癌中的作用。方法 采用 PCR-SSCP 方法检测了 53 例非小细胞肺癌原发灶组织和 5 例肺部其他良恶性病变组织的 nm23 基因突变情况。结果 所有病例均未发生 nm23 基因的突变。结论 nm23 基因的突变不一定能有效地预测非小细胞肺癌的侵袭力和转移倾向。

【关键词】 非小细胞肺癌 nm23 基因 突变 PCR-SSCP

【中图分类号】 R734.2

PCR-SSCP analysis of nm23 gene mutation in non-small cell lung cancer WANG Haifeng, CHEN Xiaofeng, GAO Wen, DING Jiaan, YI Xianghua. Department of Thoracic Surgery, Shanghai Pneumology Hospital, Shanghai 200433, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the role of nm23 gene mutation in human non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** The mutation of nm23 gene was detected in 53 primary NSCLC tissues and 5 cases of other pulmonary benign or malignant disease tissues by PCR-SSCP. **Results** No mutation of nm23 gene was found in all 58 specimens. **Conclusion** The mutation of the nm23 gene may not effectively forebode the aggressiveness and metastatic potential of NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer nm23 gene Mutation PCR-SSCP

This work was supported by a grant from Shanghai Science and Technology Development Foundation (to CHEN Xiaofeng) (No. 99424).

恶性肿瘤的特征包括去分化、侵袭性和转移性等。自从“转移抑制基因”nm23 被发现以来,许多研究证实其与恶性肿瘤的转移和侵袭性有一定的关系,但它在非小细胞肺癌(NSCLC)中突变的研究国内外报道比较少。本研究应用 PCR-SSCP 法检测了 53 例 NSCLC 患者原发灶中 nm23 基因突变的情况,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本 58 例本院胸外科手术切除的肺组织标本。男性 47 例,女性 11 例,平均年龄 57.74 岁。

1.2 引物 此基因的引物设计参照 Lizuka 等^[1]的方法,其序列见表 1。

1.3 抽提 DNA 抽提肺组织 DNA,具体方法可参见分子克隆酚-氯仿抽提法。

1.4 PCR 扩增 设计引物,分别对 nm23 基因的 5 个外显子进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(50 μl):模板

表 1 nm23 基因引物

Tab 1 Primers of nm23 gene

Exon	Sequence of primer (F)	Sequence of primer (R)
1	TGCTGCGAACCACGTGGTCCCGG	ACACTCCTTTCTTTTTCTCTC
2	GGGATAATCCGCTTGAGAC	GAAGACGGGGAGAAAACA
3	GGTGGATGAGGGGAAATTAATG	GAGAGCCTAGCACAGATGAC
4	CTGCTGTGATTGCTTTCTCTTTG	GTATCATGCTACTCCAGCCTC
5	TGGCAATGGCGCCATATTA	TGGGAAGGAGGGGAAATGG

(基因组 DNA) 200 ~ 300 ng, 10 × Buffer 5 μl, dNTP (含有 dATP, dGTP, dTTP, dCTP 各 2 mmol/L) 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 ~ 6 μl, 正、反向引物(25 pmol/μl) 各 0.5 μl, ddH₂O, Taq 酶(5 U/μl) 0.5 μl。条件:于 95℃ 加热 45 s, 使获得的 DNA 变性, 58 ~ 64℃ 下放置 30 s, 使其退火, ssDNA 与引物配对, 在 72℃ 下保持 30 s, 使引物延伸, 如此反复共 35 个循环。

1.5 SSCP 首先将 PCR 产物于 95℃ 加热 10 min, 使其变性, 然后进行 SSCP 分析。将上述变性产物置于 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 功率为 15 W, 时间 8 h, 温度 4℃, 1 × TBE Buffer。SSCP 结束后, 将凝胶放入含

有 0.25 $\mu\text{g/ml}$ EB 染色液中染色 15 min, 然后放入凝胶成像系统中, 在紫外灯下观察并拍摄结果。整个 SSCP 过程参阅 Bio-Rad 公司所提供的方法进行。

1.6 SSCP 的 PCR 产物测序方法 把 SSCP 分析中电泳异常行为者再次行 PCR, 用 QIA quick 割胶纯化试剂盒 (Qiagen) 将 PCR 产物进行纯化, 然后用 BigDye Terminator Cycle 测序法反应试剂盒 (PE Applied Biosystems) 对其进行测序反应, 最后在 ABI 377 自动测序仪进行测序 (PE Applied Biosystems)。

1.7 仪器 SSCP 美国 Bio-Rad 公司的突变检测系统。PCR: PE 公司 9600、2400 温度扩增仪。TECHNE 公司的 Touchgene 梯度 PCR 仪。上海市离心机械研究所的 7L-16R 台式高速冷冻离心机。复旦科技 FR-200 紫外与可见分析装置。

1.8 统计方法 采用 χ^2 检验进行统计学处理。

2 结果

术后病理检查显示: 本组 58 例患者中, 53 例为 NSCLC, 5 例为其他肺部良恶性病变。NSCLC 中鳞癌 22 例 (41.51%), 腺癌 18 例 (33.96%), 细支气管肺泡癌 5 例 (9.43%), 腺鳞混合癌 8 例 (15.09%)。I A 期 5 例 (9.43%), I B 期 8 例 (15.09%), II A 期 4 例 (7.55%), II B 期 17 例 (32.08%), III A 期 14 例 (26.42%), III B 期 4 例 (7.55%), IV 期 1 例 (1.89%)。T₁ 者 10 例 (18.87%), T₂ 者 35 例 (66.04%), T₃ 者 4 例 (7.55%), T₄ 者 4 例 (7.55%)。17 例 (32.08%) 未见淋巴结转移 (N₀), 21 例 (39.62%) 有同侧肺门淋巴结转移 (N₁), 14 例 (26.42%) 有同侧纵隔淋巴结转移 (N₂), 并有 1 例 (1.89%) 发生对侧纵隔淋巴结转移 (N₃) (此例为 CT 诊断)。余下 5 例其他肺部良恶性病变分别为: 错构瘤 1 例, 炎性假瘤 1 例, 神经肉瘤 1 例, 类癌 2 例。

经过 SSCP 方法的检测, 发现仅有 1 例有异常反应条带, 患者编号为 13, 其“突变”位点在外显子 3。但进一步的基因测序显示此例为假阳性。该患者为男性, 63 岁, 鳞癌, T₂N₂M₀。

3 讨论

nm23 基因定位于染色体 17q21.3, 编码 17 ku (kD) 蛋白质核苷二磷酸激酶。Steeg 等最早描述了 nm23 基因。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 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^[2]。

nm23 基因的产物为核苷二磷酸激酶 (nucleoside diphosphate kinase, NDPK)。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 蛋白呈低表达, 当原始组织功能开始分化后, nm23 的表达显著增高, nm23 蛋白的堆积对应于多种上皮组织的功能分化。多数组织成年后仍然保留了 nm23 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 表达的周期性升高^[3,4]。

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, 通过引入外源性基因增进 nm23 基因的表达, 可产生抑制肿瘤转移的效果^[5]。继 Steeg 之后, 人们开始研究 nm23 基因与肿瘤临床病理特征之间的关系, 但用 SSCP 方法研究其与人类 NSCLC 关系的文献仍然少见, 多数是采用免疫组化的方法。多数报告认为 nm23 基因具有一定的转移抑制作用。

Ohta 等^[6]总结了 122 例 I 期原发性肺癌, 肿瘤及肺门和纵隔淋巴结共 2 030 枚。nm23 基因表达的高低与淋巴结微转移呈负相关。他们的研究结果同时显示有淋巴结微转移的患者 3 年和 5 年生存率明显低于没有转移者。从而推断, nm23 基因的表达与早期原发性肺癌的预后相关。Kawakubo 等^[7]也认为, 肺腺癌细胞中 nm23 基因蛋白表达降低与淋巴结转移和预后差相关。Lai 等^[8]甚至认为用 nm23 蛋白来预测远处转移比肺癌的 TNM 分期或组织分型更有效。nm23 蛋白高表达者远处转移发生少, 局部复发晚, 通过检测 nm23 的表达水平可检出早期 NSCLC 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。陈军等^[9]应用 Southern 印迹杂交研究表明 nm23 基因可能参与调控肺癌的细胞分化和转移过程。

也有作者持反对的意见。Sato 等^[10]比较了肺腺癌和邻近非肿瘤组织标本, 测定其 nm23 蛋白总量和 nm23-H1、H2 基因相对表达水平后发现, H1、H2 的表达在肿瘤组织中较相应的非肿瘤组织高, 分化好的肿瘤组织 H1、H2 水平显著低于低分化的肿瘤组织, 但

nm23 基因表达与肿瘤大小、淋巴结或远处转移等无明显关系。Bosnar 等^[11]分别用 DNA 分析和免疫组化法研究人肺鳞癌和正常对照组织,结果发现基因变异及其产物表达的改变与肿瘤的 TNM 分期、分级、大小和患者的生存率均无关。

运用不同的检测方法得到的结果也会有差异。如 Volm 等^[12]研究 NSCLC 和邻近正常肺组织,用 SSCP 检测 nm23-H1 基因的突变,用免疫组化法测定 nm23-H1 蛋白的表达,结果无 1 例突变,但 nm23-H1 表达与淋巴结转移和肿瘤的增殖有明显关系。

1989 年问世的 PCR-SSCP 作为检测基因突变的方法,经不断地改进和完善,已经变得更为简便、快速、灵敏,并开始被应用于医学分子生物学的领域。在其它肿瘤的研究中,已有此方面的报道,而应用于 NSCLC 的报道尚不多。刘伦旭等^[13]应用 PCR-SSCP 研究发现, nm23-H1 基因突变在肺癌中发生率低,且可能与肺癌进展及转移有关。

本组采用 PCR-SSCP 研究发现, 53 例 NSCLC 均未发生 nm23 基因突变,似乎 nm23 基因的突变在肺癌中并不普遍。然而结合文献,其表达的异常或表达产物的功能异常在低分化、高侵袭性、高转移性肺癌中的报道并不少见。我们分析其中的原因,总结如下:①除了 nm23 基因的突变以外,其基因的转录、mRNA 的稳定性,以及 mRNA 的翻译过程均受到各种调控因子的作用,最终导致 nm23 表达的降低^[12]。如某些基因启动子区域的过甲基化,也可使其表达下调,这也是目前国外较为热门的研究方向。因此不能排除 nm23 基因未突变,而其功能发生显著改变的可能。②根据 SSCP 方法的特点,点突变在 DNA 中的位置对 SSCP 检测阳性率有显著的影响,这取决于该位置对维持立体构象作用的大小,而不是仅仅取决于点突变在 DNA 链上的位置,DNA 链中任何部位的突变,甚至是小段的缺失,只要对其单链立体构象没有影响,都有可能被漏检。③由于在 SSCP 分析中非变性 PAG 电泳不是根据单链 DNA 分子和带电量的大小来分离的,而是以单链 DNA 片段空间构象的立体位阻大小来实现分离的。因此,这种分离不能反映出分子量的大小,有时正常链与突变链的迁移率很接近,很难看出两者之间的差别。而影响 DNA 单链构象的环境因素发生微妙的改变也可导致假阳性的结果。④标本制取过程中杂质的影响。取材时标本受正常肺组织的污染,则不能反映该基因的突变或缺失。⑤PCR 本身也有较大的误差。鉴于以上几点,SSCP 方法辅以基因直接测序是十分必要的。⑥本组实验反映的是肺癌在手术时的分期分级情况,

并不代表术后肿瘤复发以及淋巴结和远处转移的情况,这些都将在以后的随访工作中加以研究。

鉴于以上几点,本组实验中 NSCLC 的低突变率并不能完全排除 nm23 基因对 NSCLC 的细胞分化、转移等特征的影响,还应结合免疫组化法测定其表达水平,以及综合考虑其它可影响其产物正常功能的因素。

本组研究由于样本数较少,检测结果可能有一定的偏差。而 nm23 基因突变与患者预后的关系,将在后续的研究中进行分析。

参 考 文 献

- Lizuka N, Miyamoto K, Tangoku A, et al. Downregulation of intracellular nm23-H1 prevents cisplatin-induced DNA-damage in oesophageal cancer cells: possible association with Na(+) , K(+) -ATPase. *Br J Cancer*, 2000, 83(9): 1209-1215.
- 陈晓峰,周清华,石应康,等. 转移抑制基因 nm23-H1 在肺癌中的表达及其与预后的关系. *中华实验外科杂志*, 1998, 15(6): 501-502.
- 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.
- Lakso M, Steeg PS, Westphal H. Embryonic expression of nm23 during mouse organogenesis. *Cell Growth Differ*, 1992, 3(12): 873-879.
- 陈晓峰,周清华,石应康. nm23 与肺癌转移和预后关系的研究进展. *中国胸心外科临床杂志*, 1997, 4(1): 48-50.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bosnar MH, Pavelic K, Krizanac S, et al. Squamous cell lung carcinomas: the role of nm23-H1 gene. *J Mol Med*, 1997, 75(8): 609-613.
- Volm M, Mattern J, Koomagi R. Association between nm23-H1 expression, proliferation and apoptosis in non-small cell lung carcinomas. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16(7): 595-602.
- 刘伦旭,周清华,孙芝琳,等. 人肺癌组织中 nm23-H1 基因突变研究. *中国肺癌杂志*, 2000, 3(3): 201-204.