

[文章编号] 1000-4718(2007)09-1732-05

肝细胞癌 *nm23H1* 基因遗传不稳定性与 临床病理特征的相关性研究

卢海英¹, 李继承^{2△}, 梁晓岳³, 张 伶²(¹浙江海洋学院医学院, 浙江 定海 316004; ²浙江大学细胞生物学研究所, 浙江 杭州 310031; ³宁波市肝病医院, 浙江 宁波 315010)

[摘要] 目的: 研究人类 17 号染色体 D17S396 位点微卫星不稳定性和杂合性缺失, 对肝细胞癌 *nm23H1* 蛋白表达的影响, 阐明 *nm23H1* 基因遗传不稳定性与肝细胞癌及临床病理特征的关系, 为揭示 *nm23H1* 基因作用机制和肿瘤发生、转移机理提供实验依据。方法: 采用石蜡包埋组织抽提 DNA, PCR-单链构象多态性(PCR-SSCP), 常规银染, Envision 免疫组织化学和 Leica-Qwin 计算机图像分析等方法进行 *nm23H1* 基因遗传不稳定性研究。结果: ① 48 例肝细胞癌 D17S396 位点遗传不稳定性发生率为 35.42%。LOH 的发生率在有无淋巴结或远处转移和有无肝内转移或门静脉栓的癌组织中有显著差异($P < 0.01$), 临床 TNM 分期 III 期 LOH 的发生率显著高于 I、II 期($P < 0.01$)。此外, 在侵袭转移高危组 LOH 的发生率显著高于侵袭转移低危组($P < 0.01$)。MSI 检出率与肝细胞癌临床病理参数均无关。② *nm23H1* 蛋白阳性率为 56.25%, *nm23H1* 蛋白阳性率在 Edmondson 分级 III + IV 组低于 I + II 组($P < 0.01$), 在有淋巴或远处转移组显著低于无淋巴或远处转移组($P < 0.01$), TNM 分期 III 期显著低于 I + II 期($P < 0.01$); 在侵袭转移高危组中 *nm23H1* 蛋白阳性率显著低于侵袭转移低危组($P < 0.01$)。此外, 计算机图像定量分析显示, 在各临床病理参数影响下, *nm23H1* 蛋白的表达强度没有差异。③ LOH 阳性组中 *nm23H1* 蛋白阳性率为 27.27%, 显著低于 LOH 阴性组 64.86%, 两者差异显著($P < 0.05$)。结论: *nm23H1* 基因的 MSI 和 LOH 通过相互独立的途径调控肝细胞癌的发生和转移, 后者可抑制肝细胞癌局部 *nm23H1* 蛋白的表达, 并赋予肝细胞癌高转移、预后差的特性。提高肝细胞癌局部 *nm23H1* 蛋白的表达, 可减缓肿瘤的侵袭转移倾向, 并改善预后。

[关键词] 肝肿瘤; 基因, *nm23H1*; 微卫星不稳定性; 杂合性缺失

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Relationship between genetic instability of *nm23H1* gene and clinical pathological characteristic in hepatocellular carcinoma

LU Hai-ying¹, LI Ji-cheng², LIANG Xiao-yue³, ZHANG Ling²(¹ Zhejiang Ocean University School of Medicine, Dinghai 316004, China; ² Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; ³ Ningbo Liver Hospital, Ningbo 315010, China. E-mail: Lijichen@zju.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** The aim of this study was to examine the microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) of locus D17S396 on chromosome 17 and their influence on the expression of *nm23H1* in hepatocellular carcinoma (HCC), which may provide experimental evidence for the mechanism of *nm23H1* gene and tumor metastasis. **METHODS:** Techniques such as DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues, PCR-SSCP, ordinary silver stain were used to study MSI and LOH of locus D17S396. Envision immunohistochemistry and Leica-Qwin computer imaging techniques were used to assess the expression of *nm23H1*. **RESULTS:** ① The frequency of heredity instability of HCCs was 35.42%. The frequency of LOH in the cases with lymph node or distant organs metastasis or not and with intrahepatic metastasis or embolus of portal vein or not was significantly different ($P < 0.01$), it was higher in stage TNM III than that in stage I and II. Moreover, it was higher in high tendency to invasion or metastasis cases than that in the low tendency cases ($P < 0.01$). ② The expression of *nm23H1* was 56.25%. It was significantly different in Edmondson grade, TNM stage and in lymph node or distant organ metastasis cases ($P < 0.01$). The cases with high tendency of invasion or metastasis exhibited lower *nm23H1* expression compared with low tendency cases ($P < 0.01$). ③ The positive rate

[收稿日期] 2005-12-16 [修回日期] 2006-02-22

△ 通讯作者 Tel: 0571-87217451; E-mail: Lijichen@zju.edu.cn

of nm23H1 protein in LOH positive group was lower than that in LOH negative group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The results indicate that both MSI and LOH of *nm23H1* gene control the development of HCC independently in different pathways. LOH inhibits the expression of nm23H1, which endows it with high aggressive and poor prognosis. Increase in the amount of nm23H1 protein expression effectively restrains the tendency to invasion or metastasis of HCCs and improves prognosis of patients.

[**KEY WORDS**] Liver neoplasms; Genes, *nm23H1*; Microsatellite instability; Loss of heterozygosity

现代肿瘤学认为,肿瘤的发生发展与原癌基因的激活和抑癌基因的失活有密切关系,并且以后者更为重要^[1]。大量研究表明基因的遗传不稳定性,如基因的微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)和杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)可能是产生基因突变,导致抑癌基因功能失调,引起肿瘤发生的重要因素。在调节控制肿瘤转移表型的众多转移抑制基因中,*nm23H1* 基因最引人注目,而该基因的遗传不稳定性在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中研究尚鲜见报道。本实验采用 PCR-SSCP 与免疫组织化学染色技术,对 HCC 的 *nm23H1* 基因 D17S396 位点的 MSI 和 LOH,以及 nm23H1 蛋白表达进行检测,分析 D17S396 位点的遗传不稳定性,对 HCC 中 *nm23H1* 基因表达和肿瘤进展、预后的影响,并探讨其发生与 HCC 的肿瘤大小、分化程度、临床分期、门静脉癌栓及转移等相关临床病理特征之间的关系,为揭示 *nm23H1* 基因作用机制、肿瘤侵袭转移机制及预后判断提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 材料

石蜡包埋 HCC 组织 48 例,每例均包括肿瘤组织和周围正常组织。患者年龄 33-80 岁,术前均未接受任何放疗或化疗。D17S396 位点引物序列来自相关文献^[2]:5'-TTG ACC GGG GTA GAG AAC TC-3' 和 5'-TCT CAG TAC TTC CCG TGA CC-3',由上海生工公司合成。小鼠抗人 nm23H1 蛋白单克隆抗体(Gene Tech),羊抗鼠 Envision 复合物(DAKO 公司)。

2 方法

①基因组 DNA 的抽提:石蜡包埋组织 10 μm 切片,切片脱蜡后,用苯酚-氯仿抽提法,提取肿瘤组织基因组 DNA。同时,应用上述方法,抽提患者肿瘤周围正常组织基因组 DNA 作为对照。② D17S396 位点的 PCR 扩增:反应体系为 50 μL ,包含 1.0 mmol/L MgCl_2 、10 \times buffer 5 μL 、200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP、Taq DNA 聚合酶 2 U,引物各 50 pmol/L;94 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min,进入循环 94 $^\circ\text{C}$ 50 s、62 $^\circ\text{C}$ 50 s、72 $^\circ\text{C}$ 1 min,循环 35 次,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖电泳、溴化乙锭染色,经紫外灯下观察,证实 PCR 扩

增成功。扩增产物片段长为 96-104 bp。③变性聚丙烯酰胺凝胶电泳:4 μL PCR 扩增产物与等体积变性上样缓冲液(含 98% 去离子甲酰胺)混合,98 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min,冰浴骤冷后,加样于含 8 mol/L 尿素的 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶,140 V 电泳 2 h。④变性聚丙烯酰胺凝胶染色:银染观察凝胶经 10% 乙醇固定 5 min,1% 硝酸溶液 5 min,0.1% 硝酸银溶液 15 min,每步结束后均以双蒸水漂洗 5 min,最后入 0.28 mol/L 的碳酸钠显色至条带清晰,10% 冰乙酸终止,玻璃纸包胶,自然干燥后保存。⑤免疫组织化学染色:石蜡包埋组织 5 μm 切片,脱蜡后行 nm23H1 蛋白 Envision 免疫组织化学染色,DAB 显色,苏木素复染、常规脱水、透明、中性树脂封片。⑥判断标准:HCC 周围正常组织基因组 DNA,D17S396 位点的 PCR-SSCP 电泳凝胶图中,只出现 1 条主带代表 1 个等位基因片段,为纯合子;如出现 2 条主带则为杂合子,可用于 LOH 分析。肿瘤组织条带较正常组织相应等位基因条带减少或密度降低 50% 以上,为 LOH;肿瘤组织条带较正常组织等位基因条带增多或移位,为 MSI。对 48 例 HCC 制定观察侵袭转移倾向条件^[3]:肝门淋巴结转移;肝内肿瘤数目 ≥ 2 个;门静脉癌栓形成;癌周多个卫星结节形成;癌组织浸润破坏肿瘤包膜。凡符合上述条件中的 2 项或 2 项以上者定为侵袭转移倾向高危组,仅有其中某一或无者定为侵袭转移倾向低危组。⑦图像分析:每例标本连续选取不重叠的 20 个高倍视野,由 Leica-Qwin 计算机图像分析系统,在相同灰度设定条件下测出 G_A (整个背景视野灰度值)、 G_a (视野内 nm23H1 蛋白免疫组化阳性染色颗粒的灰度值)、 A_{Aa} (nm23H1 阳性细胞占视野面积的面积密度)。⑧数据处理:用 Excel 函数算出 PU 值(positive unit 阳性单位),代表 nm23H1 蛋白在肝脏肿瘤细胞的表达强度。255 为 Leica-Qwin 的最大灰度分级。

$$PU = \frac{|G_a - G_A|}{(1 - A_{Aa}) \times 255} \times 100$$

3 统计学处理

所有数据均使用 SPSS 12.0 软件,行单因素方差分析(One-way ANOVA)和 t 检验。

结 果

1 MSI 和 LOH 检出结果

实验组和对照组 D17S396 位点微卫星片段均扩增成功(图 1)。经 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,其等位基因均为杂合子,可用于 MSI 和 LOH 分析。与正常组织比较,MSI 表现为肿瘤组织等位基因条带增加(图 2 - M);LOH 则是肿瘤组织等位基因条带减少(图 2 - L)。

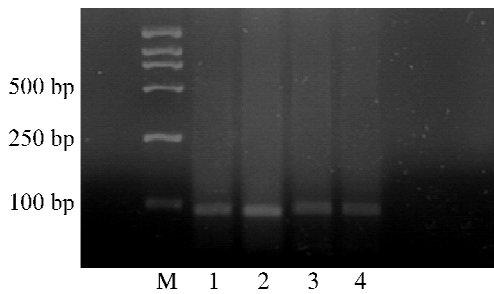


Fig 1 PCR product in 2% agarose gel. M: DNA marker; 1-4: PCR amplification band of D17S396 point of HCC tissues.

图 1 PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳图

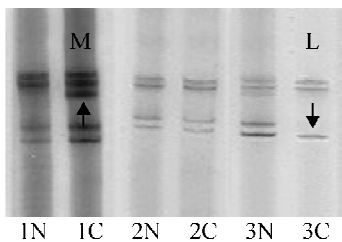


Fig 2 10% polyacrylamide gel electrophoresis. MSI (↑) was positive as added an allele band (1C) as compared with normal tissue(1N). LOH (↓) was positive as lacked an allele band (3C) as compared with normal tissue (3N).

图 2 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图

实验结果表明,HCC 组织中 D17S396 位点遗传不稳定发生率为 35.42%,遗传不稳定性的发生与患者性别、有无肝硬化史和肿瘤直径大小均无关。LOH 的检出率为 22.92%,与肿瘤的淋巴结或远处转移、肝内转移或门静脉栓和临床 TNM 分期密切相关;在有淋巴结或远处转移的癌组织中发生率为 45.00%,显著高于未发生淋巴结或远处转移的 7.14% ($P < 0.01$);在有肝内转移或门静脉栓的癌组织中发生率为 53.33%,显著高于未发生肝内转移或门静脉栓的 9.09% ($P < 0.01$)。此外,在 TNM 分期 III 期,LOH 的发生率为 52.63%,显著高于 I + II 期的 6.67% ($P < 0.01$)。然而,肝细胞癌 Edmondson 分级的不同,LOH 的检出率并未表现出明显的差异 ($P > 0.05$)。MSI 检出率为 12.50%,与肿瘤 Edmondson 分

级、有无淋巴结或远处转移、有无肝内转移或门静脉栓及临床 TNM 分期均无关,见表 1。

在实验中,参考临床资料及 HCC 的生物学特性,根据制定的观察 HCC 侵袭转移倾向条件将 HCC 分为侵袭转移高危组和低危组,高危组 LOH 的检出率为 45.00%,显著高于低危组 (7.14%) ($P < 0.01$)。而 MSI 的发生率组间差异不明显 ($P > 0.05$),见表 2。

2 nm23H1 蛋白免疫组织化学结果

nm23H1 蛋白免疫组织化学染色为棕黄色颗粒,主要位于细胞浆,细胞膜和细胞核也可有阳性反应结果(图 3)。而以 PBS 代替 I 抗的阴性对照染色结果为阴性(图 4)。

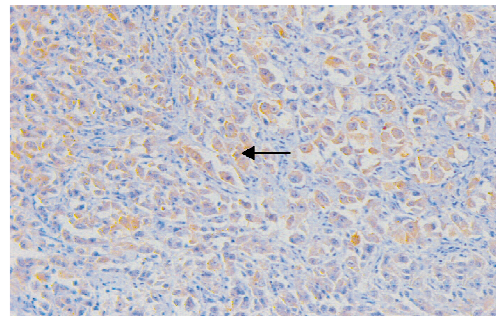


Fig 3 The expression of nm23H1 protein in HCC. The positive brown - yellow granule for nm23H1 protein mostly located in cytoplasm, and membrane was also stained (←) (×200).

图 3 nm23H1 蛋白免疫组化阳性染色图

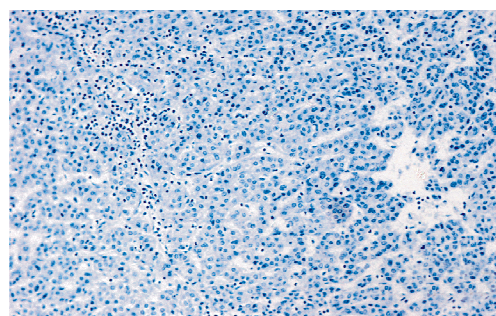


Fig 4 Negative contrast of nm23H1 protein. PBS replaced anti - nm23H1 protein as the first antibody (×200).

图 4 nm23H1 蛋白免疫组化染色阴性对照图

在 48 例 HCC 组织中,nm23H1 蛋白阳性率为 56.25%。nm23H1 蛋白的阳性率与肿瘤 Edmondson 分级、淋巴结或远处转移及临床 TNM 分期密切相关。肿瘤 Edmondson 分级 I + II 组 nm23H1 蛋白阳性率为 76.00%,明显高于 III + IV 组的 34.78% ($P < 0.01$),无淋巴或远处转移组的 nm23H1 蛋白阳性率为 82.14%,明显高于有淋巴或远处转移组的 20.00% ($P < 0.01$)。在 TNM 分期中,I、II 期的癌组织 nm23H1 蛋白阳性率分别为 85.71%、66.67%,

显著高于Ⅲ期的 26.32% ($P < 0.01$), nm23H1 蛋白阳性率与 HCC 的有无肝内转移或门静脉栓无关(表 1)。

同时, 实验结果显示, HCC 侵袭转移低危组

nm23H1 蛋白阳性率为 78.57%, 显著高于高危组 25.00% ($P < 0.01$), 见表 2。此外, 经 Leica - Qwin 计算机图象分析显示, 在各临床病理参数的影响下, nm23H1 蛋白的表达强度无差异 ($P > 0.05$)。

表 1 HCC 组织中 nm23H1 基因遗传不稳定性与临床病理特征的关系

Tab 1 The relation of clinical pathological characteristics between nm23H1 genetic instability in HCC

Clinical pathological characteristics	n	MSI positive	LOH positive	nm23H1 protein	nm23H1 expression
		rate(%)	rate(%)	positive rate(%)	intensity (PU. $\bar{x} \pm s$)
Sex	48	6(12.50)	11(22.92)	27(56.25)	25.96 ± 2.53
Female	11	2(18.18)	5(45.45)	6(54.55)	26.67 ± 2.57
Man	37	4(10.81)	6(16.22)	21(56.76)	25.67 ± 2.36
Hepatocirrhosis					
(+)	20	2(10.00)	5(25.00)	11(55.00)	26.38 ± 2.65
(-)	28	4(14.29)	6(21.43)	16(57.14)	25.87 ± 2.43
Tumor size					
≤5 cm	22	3(13.64)	4(18.18)	14(63.64)	26.15 ± 2.49
>5 cm	26	3(11.54)	7(26.92)	13(50.00)	23.67 ± 2.93
Edmondson grade					
I + II	25	5(20.00)	3(12.00)	19(76.00)**	27.87 ± 2.83
III + IV	23	1(4.35)	8(34.78)	8(34.78)	22.37 ± 2.35
Lymph node or distant organs metastasis					
LN(+) or DM(+)	20	1(5.00)	9(45.00)	4(20.00) ^{△△}	21.67 ± 2.56
LN(-) and DM(-)	28	5(17.86)	2(7.14)**	23(82.14)	28.56 ± 2.01
Intrahepatic metastasis or embolus of portal vein					
IM(+) or PV(+)	15	0(00.00)	8(53.33)**	6(40.00)	23.84 ± 2.43
IM(-) and PV(-)	33	6(18.18)	3(9.09)	21(63.64)	25.63 ± 2.63
TNM stage					
I	14	3(21.43)	0(00.00)	12(85.71)	28.73 ± 2.40
II	15	2(13.33)	1(6.67) ^{△△}	10(66.67) ^{△△}	26.03 ± 2.46
III	19	1(5.26)	10(52.63)	5(26.32)	22.15 ± 2.08

** $P < 0.01$ vs III + IV; ^{△△} $P < 0.01$ vs LN(-) and DM(-); ** $P < 0.01$ vs IM(-) and PV(-); ^{△△} $P < 0.01$ vs TNM III.

表 2 HCC 浸润转移性与 nm23H1 基因遗传不稳定性关系

Tab 2 The relation of invasion or metastasis between nm23H1 genetic instability in HCC

Invasion or metastasis tendency	n	The frequency of heredity instability		nm23H1 protein	nm23H1 expression
		MSI	LOH	positive rate(%)	intensity (PU. $\bar{x} \pm s$)
High tendency	20	1(5.00%)	9(45.00%)	5(25.00)	25.56 ± 1.97
Low tendency	28	5(17.86%)	2(7.14%)**	22(78.57)**	27.96 ± 2.73

** $P < 0.01$ vs high tendency.

3 HCC nm23H1 基因 D17S396 位点 MSI 和 LOH 与 nm23H1 蛋白表达的关系

本实验结果显示, 48 例 HCC 中 LOH 阳性组 nm23H1 蛋白阳性率为 27.27%, 明显低于 LOH 阴性组的 64.86% ($P < 0.05$)。但 MSI 对 nm23H1 蛋白的表达无影响, 见表 3。

讨 论

肿瘤研究表明, DNA 错配修复基因的缺陷或突变, 导致 DNA 修复错误, 从而引起的 DNA 的 MSI 和

表 3 HCC 的 MSI 和 LOH 与 nm23H1 蛋白表达之间的关系

Tab 3 The relation between LOH, MSI and nm23H1 protein expression in HCC

Teams	n	nm23H1 protein expression	nm23H1 expression intensity
MSI(+)	6	83.33%(5/6)	29.34 ± 2.07
MSI(-)	42	52.38%(22/42)	24.78 ± 2.04
LOH(+)	11	27.27%(3/11)*	22.64 ± 2.38
LOH(-)	37	64.86%(24/37)	26.88 ± 2.52

* $P < 0.05$ vs LOH(-).

LOH,被认为是基因组不稳定性 2 个主要表型。微卫星是具有高度多态性的短串联重复核苷酸序列。MSI 是指由于复制错误导致微卫星的增多或减少,使得 DNA 结构性等位基因的大小发生改变,目前被认为是发生肿瘤危险性的可检测指标之一。LOH 是指一个位点上 2 个多态性的等位基因中的一个出现缺失或变异,分析 LOH 已成为检测肿瘤抑制基因失活,发现和定位新的肿瘤抑制基因的一种重要手段^[4]。

Steeg 等^[5]在对小鼠黑色素瘤细胞系的研究中,发现 *nm23H1* 是 1 个具有抑制肿瘤转移作用的基因。该基因编码的蛋白产物具备二磷酸核苷酸激酶(NDPK)活性,可影响微管蛋白多聚化和细胞骨架形态,参与细胞分裂时纺锤体的形成和 GTP 介导的信号转导途径,从而影响细胞的发育、增殖、分化及运动,达到抑制肿瘤转移的目的^[6]。其抑制肿瘤转移的功能已在结肠癌、乳腺癌和胃癌等肿瘤中得到证实。因此,本研究选择位于 17 号染色体上 *nm23H1* 基因进行 LOH 和 MSI 检测,对于了解肿瘤发生过程中出现的各种分子事件具有重要意义。

Yoshida 等^[7]对胆囊癌发生机制的研究发现,MSI 多发生在预后较好的临床早期癌组织中,并认为 MSI 可作为早期分子诊断的标志。而我们对 HCC 的研究结果并没有表现出这样的关系,这种研究结果的差异,可能与肿瘤组织的不同有关。但是,随着 TNM 分期增高、淋巴结或远处转移和肝内转移或门静脉癌栓的发生,LOH 发生率增加。提示 D17S396 位点 LOH 多发生于 HCC 晚期,并有促进转移和远处浸润的作用。因此,LOH 检测可作为 HCC 恶性程度、转移和预后判断的重要指标,有助于预测转移复发的高危患者。实验中 MSI 和 LOH 对 HCC 临床病理表型作用的差异,表明 MSI 和 LOH 可能通过不同的途径调控 HCC 的发生和转移^[8]。

实验分析发现,HCC 的 *nm23H1* 蛋白表达,随着分化程度降低、淋巴结或远处转移的发生、临床 TNM 分期和侵袭转移潜能的升高而显著降低。这表明 *nm23H1* 蛋白表达降低在 HCC 的恶性程度、侵袭转移和临床进展过程中起着重要的促进作用,使其抑癌作用减弱或消失,从而促进肝癌的发生以及侵袭

性的增加。因此,我们认为,增加肿瘤局部 *nm23H1* 蛋白的表达,可减缓肿瘤的转移,延缓肿瘤进展,改善预后。

Miki 等^[8]认为,基因的遗传性突变可能是抑癌基因功能失调和编码蛋白量减少的重要机制之一。实验结果可见, D17S396 位点 LOH 可能导致了 *nm23H1* 抑癌基因的缺失或变异,从而抑制 HCC 局部 *nm23H1* 蛋白的表达,进而引起 HCC 的高转移、低预后。而 *nm23H1* 蛋白阳性率在 MSI 阳性组和 MSI 阴性组之间无明显差异,其中的机制有待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Chuabert P, Burri N, Cousin P. A novel highly informative poly A microsatellite on the telomeric side of the INK4a/ARF locus[J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(3): 183 - 185.
- [2] Berney CR, Fisher RJ, Yang J, et al. Genomic alterations (LOH, MI) on chromosome 17q21 - 23 and prognosis of sporadic colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2000, 89(1): 1 - 7.
- [3] 谷化平,周翠玲,倪灿荣. 原发性肝细胞癌中 CD44v6 和 *nm23H1* 基因的转录表达及临床意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(3): 159 - 160.
- [4] Rouba A, Kaisi N, Al CE. Patterns of allelic loss at the BRCA1 locus in Arabic women with breast cancer[J]. Int J Mol Med, 2000, 6(5): 565 - 569.
- [5] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with tumor metastatic potential[J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80(3): 200 - 204.
- [6] Bominaar AA, Molijn AC, Pestel M, et al. Activation of G - proteins by receptor - stimulated nucleoside diphosphate kinase in Dictyostelium[J]. Embo J, 1993, 12(6): 2275 - 2279.
- [7] Yoshida T, Sugai T, Habano W, et al. Microsatellite instability in gallbladder carcinoma: two independent genetic pathways of gallbladder carcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(10): 768 - 774.
- [8] Miki Y, Swensen J, Eidens DS, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. Science, 1994, 266(5182): 66 - 71.