

# nm23-H1 基因在口腔鳞癌颈淋巴结转移不同阶段的调控作用

杨 湛 温玉明 普 苹 付红梅 汤 炆 李继梅

**【摘要】** 目的 探讨 nm23-H1 基因在口腔鳞癌区域淋巴结转移不同阶段的调控作用及影响。方法 利用免疫组化和 Western Blot 技术,结合淋巴结转移和原发灶浸润分型的资料,分组对照研究 nm23-H1 基因在 200 例口腔鳞癌颈淋巴结转移不同阶段的表达情况。结果 淋巴结转移组 nm23-H1 基因阴性表达率明显高于无淋巴结转移组 ( $P < 0.01$ )。N1 期、转移仅累及 1 个淋巴结、c 型浸润,以及低分化肿瘤的患者,均有比其它患者明显增高的 nm23-H1 基因的阴性表达率 ( $P < 0.01$ );转移至颌下或颌下一颈深上淋巴结平面者的阴性表达率,也高于转移到其它平面者 ( $P < 0.05$ )。结论 nm23-H1 基因主要是通过干扰肿瘤实体内高转移细胞亚群的形成和初始转移的发生来调控口腔鳞癌患者的颈淋巴结转移。

**【关键词】** nm23-H1 基因; 口腔鳞癌; 淋巴结转移

## The Regulation of nm23-H1/NDPK A in Different Processes of Regional Lymph Node Metastases of Oral Squamous Cell Carcinomas

YANG Zhan<sup>\*</sup>, WEN Yuming, PU Ping, et al. (<sup>\*</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the regulation and effect of the expression of nm23-H1 gene in different processes of regional lymph node metastases of oral squamous cell carcinomas(OSCC). **Methods** By immunohistochemical analysis in 200 paraffin-embedded tissues of OSCC and Western Blot in 9 fresh tissues of OSCC using a monoclonal antibody, the expression of nm23-H1/NDPK A were detected in dividing groups accompanied with the clinical and pathological data of cervical lymph node metastases and modes of invasion. **Results** The rates of negative expression of nm23-H1/NDPK A had significant differences between metastatic cases(34/81) and non-metastatic cases(15/119). The nm23-H1/NDPK A negative group showed higher frequency of lymph node metastases ( $P < 0.01$ ). In the different metastatic processes, There were significantly differential expressions of nm23-H1/NDPK A among stage N0, N1 and N2 ( $P < 0.01$ ), distinct involved quantities of lymph nodes ( $P < 0.01$ ), dissimilar metastatic involved levels ( $P < 0.05$ ), definite modes of invasion ( $P < 0.01$ ) and different cell differentiations ( $P < 0.01$ ). There were much higher negative expressions in those cases of N1 stage(23/38), only one lymph node to be involved(23/39), metastasized to submandibular nodes or/and superior deep cervical nodes(17/28 and 12/29, respectively), c types of invasion(33/54) and poor differentiations(9/19). **Conclusion** The results indicated that nm23-H1/NDPK A played an more important role in switching the initial metastases formation than in influencing the later metastases spread because the negative expressions of nm23-H1/NDPK A in solid tumors of OSCC would induce the formation of high metastatic cellular subpopulations. It was also confirmed that nm23-H1 gene might be a metastatic suppressor and may be useful in predicting the initial lymph node metastases in OSCC.

**【Key words】** nm23-H1/NDPK A; lymph node; metastases; oral squamous cell carcinomas

淋巴结转移是影响口腔鳞癌患者预后的一个主要因素。nm23-H1 基因是 nm23 基因家族中与多种类

型肿瘤转移关系最为密切的转移抑制基因,编码相对分子质量为 17 000 的蛋白质——NDPK A。既往研究<sup>1</sup>提示, nm23-H1 基因极少出现编码区的突变,调控肿瘤细胞的转移主要依赖于其蛋白和 mRNA 的表达水平。在对恶性黑色素瘤、口腔癌<sup>2,3</sup>等的研究中发现 NDPK A 和 mRNA 表达水平的降低,与肿瘤淋巴结转移、较差的临床预后和短生存率等密切相关。

本课题为云南省自然科学基金资助项目(编号 96C137Q, 2000C0012R)

作者单位:650032 昆明医学院第一附属医院口腔颌面外科(杨湛,普苹,汤炆,李继梅),四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(温玉明,付红梅)

nm23-H1 基因已成为继 p53 基因后的研究热点。本研究旨在利用免疫组织化学和 Western Blot 技术,通过了解 nm23-H1 基因蛋白(NDPK-A)在口腔鳞癌颈淋巴结转移不同阶段的表达情况,探讨其在口腔鳞癌区域淋巴结转移不同阶段中的调控作用及影响。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 组织来源 病理标本来源于四川大学华西口腔医院和昆明医学院第一附属医院 1994 年 1 月~2000 年 4 月住院的 200 例口腔鳞癌患者。纳入要求:初次接受治疗并行联合根治手术、临床资料完整、病理诊断和淋巴结转移情况明确,未发现远处器官转移的口腔鳞癌患者。

200 例患者中,有 10 例同时采集到新鲜原发灶肿瘤标本,离体 30 min 内迅速投入液氮中冻存,随后保存于-60℃ 冰箱中待用。

1.1.2 主要试剂 nm23-H1 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz Bio, Inc), 超敏 SP(鼠和兔)试剂盒(福建迈新公司), HRP 标记羊多抗 IgG(北京中山公司), Hybond-P: PDVF 杂交膜(Amersham Pharmabiotech, Inc)。

#### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 所有病例按照 UICC 制定的相关标准进行 TNM 临床分期和病理分级。200 例免疫组化研究病例,根据有无颈淋巴结转移,分为淋巴结转移组(81 例)与无淋巴结转移组(119 例),根据 N 分期分为 N0 组(119 例)、N1 组(38 例)和 N2 组(43 例)分组进行对照实验。同时,淋巴结转移组又根据淋巴结转移数量和平面行分组对照研究。

10 例作 Western Blot 分析患者中,5 例病理诊断有颈淋巴结转移,5 例无转移。

1.2.2 免疫组化实验 所有患者的原发灶标本作 5 μm 厚连续切片,0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液中高压修复抗原后,按试剂盒规定步骤检测。nm23-H1 抗体浓度为 1:70。阴性对照用 PBS 代替一抗。结果判断:染色胞浆出现棕黄色颗粒,且着色细胞数量多于 25%时为阳性。

1.2.3 Western Blot 实验 按切取肿瘤组织的重量每克加入 3 ml 标准 RIPA Buffer,提取原发灶肿瘤组织的蛋白质,-20℃ 冻存。样品经室温解冻后按常规方法进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。在 30 V、300 mA 条件下电转 20 h。根据 Marker 位置,剪下相对分子质量为 36 000 以下条带并标记 Marker 位置。

将含有目标基因蛋白条带的杂交膜置于平皿中,加入 1:70 的 nm23-H1 抗体孵育液 5 ml,封口,37℃ 摇动温育 1 h。TBST Buffer 漂洗后,加入 1:40 的 HRP 标记羊多抗 IgG,37℃ 摇床温育 1 h。新鲜配制的 DAB/NiCl<sub>2</sub>-30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色液室温显色,PBS 漂洗终止显色反应。结果判断:以在相应分子量区域,出现棕黄色着色条带为阳性。

1.2.4 浸润方式分型 根据 Yamamoto 的口腔鳞癌浸润方式 5 型分类标准<sup>4</sup>,取组织学切片行 HE 染色。光镜下观察肿瘤—宿主边缘的肿瘤细胞浸润方式,确定浸润类型。

#### 1.3 统计分析

本研究采用 SPSS 10.0 统计分析软件根据数据特性进行统计分析。

### 2 结果

200 例口腔鳞癌患者 nm23-H1 基因的表达与颈淋巴结转移、临床 N 分期等的关系,见表 1。

表 1 200 例口腔鳞癌患者 nm23-H1 基因表达与颈淋巴结转移、N 分期、淋巴结转移数量、转移平面、浸润方式和病理分级的关系

Tab 1 Relationship between nm23-H1 protein and cervical lymph node metastasis, N categories, the numbers of metastatic nodes in each case, locations of lymph node metastasis, mode of invasion, histological grading in 200 oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients

研究项目	阴性	阳性	合计
与淋巴结转移的关系			
淋巴结转移组	34(42.0%)	47(58.0%)	81(40.5%)
淋巴结无转移组	15(12.6%)	104(87.4%)	119(59.5%)
与 N 分期的关系			
N0	15(12.6%)	104(87.4%)	119(59.5%)
N1	23(60.5%)	15(39.5%)	38(19.0%)
N2	11(25.6%)	32(74.4%)	43(21.5%)
与淋巴结转移数量的关系			
1	23(59.0%)	16(41.0%)	39(48.2%)
2	4(17.4%)	19(82.6%)	23(28.4%)
3	5(41.7%)	7(58.3%)	12(14.8%)
>3	2(28.6%)	5(71.4%)	7(8.6%)
与淋巴结转移平面的关系			
颌下平面	17(60.7%)	11(29.3%)	28(34.6%)
颈深上平面	12(41.4%)	17(58.6%)	29(35.8%)
颈深中平面	2(18.2%)	9(81.8%)	11(13.6%)
颈深下平面	3(23.1%)	10(76.9%)	13(16.0%)
与浸润方式的关系			
0		4(100.0%)	4(2.0%)
1	1(5.9%)	16(94.1%)	17(8.5%)
2	8(9.5%)	76(90.5%)	84(42.0%)
c	33(61.1%)	21(38.9%)	54(27.0%)
d	7(17.1%)	34(82.9%)	41(20.5%)
与病理分级的关系			
高分化	30(19.9%)	121(80.1%)	151(75.5%)
中分化	10(33.3%)	20(66.7%)	30(15.0%)
低分化	9(47.4%)	10(52.6%)	19(9.5%)

从表 1 可见: 200 例口腔鳞癌患者中,nm23-H1 基因的阳性表达率在淋巴结转移组和无淋巴结转移组间存在显著性差异(P < 0.01)。N1 期患者 nm23-H1 基因的阴性表达率明显高于 N0 和 N2 期患

者 ( $P < 0.01$ ), N0 和 N2 期患者间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在 N2a、N2b、N2c 患者 nm23-H1 基因的阴性表达率分别为 0/1、10/38 和 1/4, 各期间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在 81 例有淋巴结转移的患者中, 淋巴结转移数量与 nm23-H1 基因的表达间有明显关系。转移仅累及 1 个淋巴结时, 其阴性表达率明显高于累及 2 个及 2 个以上淋巴结时 ( $P < 0.01$ ), 其余各组间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。肿瘤仅转移到颌下淋巴结或颌下一颈深上淋巴结的患者, 其 nm23-H1 基因的阴性表达率明显高于肿瘤有颈深中或颈深下淋巴结转移的患者 ( $P < 0.05$ )。而其余各转移平面上未发现明显差异 ( $P > 0.05$ )。肿瘤浸润方式为 c 型的患者, 其 nm23-H1 基因的阴性表达率明显高于其他各型浸润方式的患者 ( $P < 0.01$ ), 而除 c 型外的各型浸润方式患者间 nm23-H1 基因的阴性表达率则无显著差异 ( $P > 0.05$ )。高分化肿瘤患者的 nm23-H1 基因的阴性表达率显著高于低分化肿瘤患者 ( $P < 0.01$ )。

Western Blot 实验中, 1 例淋巴结转移的患者因标本量过小, 剔除实验外, 余 3 例 N1 期、1 例 N2 的患者 nm23-H1 基因的表达强度均明显低于 5 例无淋巴结转移的患者。

nm23-H1 基因呈阳性表达的 c 型浸润患者中, 阳性细胞多集中在分化程度较好的肿瘤团块中心区, 周围分化程度较差的条索状细胞呈阴性表达 (图 1)。

d 型浸润中, 弥散的肿瘤细胞表现为 nm23-H1 阳性染色 (图 2)。型浸润的无转移患者, 肿瘤细胞呈明显的 nm23-H1 阳性染色 (图 3)。

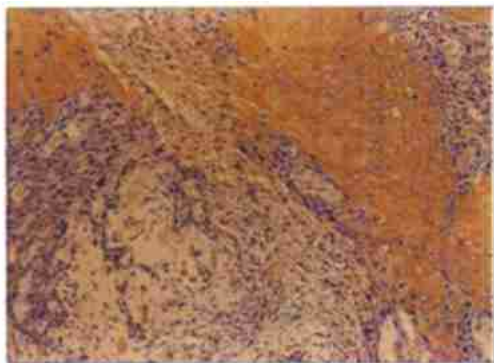


图 1 nm23-H1 呈阳性表达的 c 型浸润患者中, 阳性细胞多集中在分化程度较好的肿瘤团块中心区, 周围分化程度较差的条索状细胞呈阴性表达 ABC 法  $\times 100$

Fig 1 Immunohistochemical localization of nm23-H1 in mode of invasion in grade c (cord-like type) with lymph node metastasis, well differentiated cells in the center of invasive tumor present strong cytoplasmic staining, but the poor differentiated cell in the margin of the cord-like tumor stained negatively ABC  $\times 100$

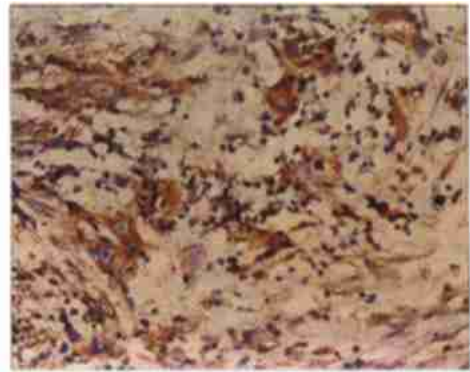


图 2 d 型浸润的患者中, 弥散的肿瘤细胞表现为 nm23-H1 阳性染色 ABC 法  $\times 100$

Fig 2 Those diffuse tumor cells stained positively for nm23-H1 protein expression in the mode of invasion in grade d ABC  $\times 100$



图 3 型浸润的无转移患者, 肿瘤细胞呈明显的 nm23-H1 阳性染色 ABC 法  $\times 100$

Fig 3 Tumor cells present strong cytoplasmic staining in the mode of invasion in grade without lymph node metastasis ABC  $\times 100$

### 3 讨 论

随着研究的深入, 不少学者发现 nm23-H1 基因并非对所有类型肿瘤的转移有调控作用, 即使对同一类型肿瘤, 其转移抑制作用也有不同。有学者认为 nm23-H1 基因仅与肿瘤细胞的增殖和肿瘤的发展有关<sup>1,5,6</sup>。Otsuki 等<sup>3</sup> 在口腔鳞癌小批量标本的免疫组化研究中发现, nm23-H1 基因阳性表达的患者有更低的淋巴结转移率。但一些学者<sup>5</sup> 则对这种关系的存在提出质疑。

本研究中, 笔者证实转移患者有更高的 nm23-H1 基因阴性表达率或更低的表达强度。这提示 nm23-H1 基因表达的抑制, 可促进口腔鳞癌的区域性淋巴结转移。同时发现, 在转移患者中也仍有 58.0% 表现为阳性染色。笔者经过对 N 分期、淋巴结转移数量和转移平面与 nm23-H1 基因表达关系的分析, 发现在转移患者中, nm23-H1 基因的阴性表达往往特征性地集中于 N1 期、1 个淋巴结受累和转移平面局限在颌下淋巴结平面和颈深上淋巴结平面的患

者。随着受累淋巴结数量的增加和转移平面的扩散,这种阴性表达与转移间的相关性就显著削弱( $P > 0.05$ )。这一结果提示,nm23-H1基因对口腔鳞癌颈淋巴结转移的影响可能主要是抑制初始转移的发生。

为寻找支持这一假说的依据,笔者对口腔鳞癌浸润方式与nm23-H1基因表达的关系进行了研究。结果发现,随着浸润方式由c型向d型发展,口腔鳞癌患者的颈淋巴结转移率出现不断增加的趋势。在具有迅速增高的淋巴结转移率(由c型浸润的14.3%猛增到63.0%),并表现出相同初始转移特点的条索状(c型)浸润方式中,nm23-H1有与之相匹配的阴性表达率(61.1%);而在转移特性同样表现为受累淋巴结数量增多,转移平面扩散的弥散性(d型)浸润方式中,其淋巴结转移率(34/41)和nm23-H1阳性表达率(82.9%)高度一致。这些结果,进一步支持了本研究关于nm23-H1基因蛋白仅对口腔鳞癌颈淋巴结转移的初始启动产生影响的推断。

有趣的是,分化较差的肿瘤细胞不仅有更高的nm23-H1阴性表达率,而且在c型浸润中,nm23-H1阴性表达的那部分条索状浸润细胞,在笔者同时进行的与肿瘤细胞增殖活性和基质破坏能力相关的Ki-67、CD44v6免疫组化检测中(另文报道),却恰恰呈阳性表达;而nm23-H1阳性表达的中央细胞群,则呈阴性表达。结合在目标基因反义抑制实验中发现的,降低nm23-H1基因表达,可导致明显的细胞内微管、微丝解聚,细胞间桥粒连接丧失和细胞分化抑制、增值活性增高这一系列现象;以及其他学者在nm23-H1基因调节功能领域的研究成果<sup>1,7</sup>和转移灶肿瘤细胞往往呈阴性染色的实验结果<sup>8-10</sup>,笔者认为,部分细胞nm23-H1基因蛋白表达水平的降低,可能通过一系列的基因反馈调节环路,促使这些肿瘤细胞自身的生物学特性发生改变,细胞恶性程度增加,细胞间粘附力下降,侵袭能力增强,形成具有高转移倾向的细胞

亚群,从而奠定了产生初始转移的细胞学基础。而随后转移的扩散,则更多地依赖于机体淋巴循环、微环境的选择作用和免疫机制的防御效能。

### 参考文献

- 1 Hartsough MT, Steeg PS. Nm23-H1: Genetic alterations and expression patterns in tumor metastasis. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(1): 6-10
- 2 Lo Muzio L, Mignogna MD, Pannone G, et al. The NM23 gene and its expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 1999, 6(4): 747-751
- 3 Otsuki K, Alcalde RE, Matsumura T, et al. Immunohistochemical analysis of nucleoside diphosphate kinases in oral squamous cell carcinomas. *Oncology*, 1997, 54(1): 63-68
- 4 Yamamoto E. Clinical and experimental studies of mode of invasion in oral cancer. *Oral Oncol*, 1995, 4(1): 33-36
- 5 Miyazaki H, Fukuda M, Ishijima Y, et al. Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in a human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastasis, differentiated phenotype in the metastatic site, and growth factor-independent proliferative activity in culture. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(12): 4301-4307
- 6 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
- 7 杨 湛,温玉明,王昌美. Nm23 基因调控机理的研究进展. *国外医学口腔医学分册*, 1998, 25(6): 323-326
- 8 卢 勇,李昌隆,周志瑜,等. 颊癌中转移抑制基因 nm23RNA 的表达. *Northern 斑点杂交分析*. *华西口腔医学杂志*, 1997, 15(2): 143-145
- 9 Arai T, Yamashita T, Urano T, et al. Preferential reduction of nm23-H1 gene product in metastatic tissues from papillary and follicular carcinomas of the thyroid. *Mod Pathol*, 1995, 8(3): 252-256
- 10 Caligo MA, Cipollini G, Berti A, et al. NM23 gene expression in human breast carcinomas: Loss of correlation with cell proliferation in the advanced phase of tumor progression. *Int J Cancer*, 1997, 74(1): 102-110

(2002-06-18 收稿, 2003-02-23 修回)

(本文编辑 邓本姿)

## 全国第三届口腔颌面部创伤及修复重建外科学术研讨会紧急通知

由中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会口腔颌面创伤学组主办,四川大学华西口腔医学院承办的“全国第三届口腔颌面部创伤及修复重建外科学术研讨会”将在2003年9月26~29日如期举行。未投稿的国内同行也欢迎参会。本次会议论文经审定稿后可选择录入《华西口腔医学杂志》增刊,参会时请带论文全文或800字以内四段结构式详细中文摘要(包括目的、材料和方法、结果、结论四项)打印稿一份并附软盘(Word格式)。为便于会议安排和接待,未收到会议通知的代表请尽快联系。

联系地址:四川省成都市人民南路三段14号四川大学华西口腔医院颌面外科,联系人:夏朝红,邮编:610041。

电话:028-85501440,传真:028-85582167, E-mail:mydtw@vip.sina.com。

中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会口腔颌面创伤学组

四川大学华西口腔医学院