

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.03.11

人肺癌组织中 nm23-H₁ 基因突变研究

刘伦旭 周清华 孙芝琳 覃扬 石应康 孙泽芳

【摘要】 目的 探讨癌转移抑制基因 nm23-H₁ 在人肺癌中的突变情况,及其与肺癌发生、发展及转移的关系。方法 采用聚合酶链反应—单链构象多态性技术(PCR-SSCP)对手术切除的 45 例肺癌组织和 7 例正常肺组织的 nm23-H₁ 基因的 5 个外显子进行突变分析。结果 在所检测的肺组织中,未发现 nm23-H₁ 基因纯合缺失。SSCP 分析发现一例肺癌组织 nm23-H₁ 基因外显子 1 单链 DNA 迁移率发生改变。此例患者为晚期肺鳞癌,伴有纵隔淋巴结转移和恶性胸水。结论 本实验所检测的 nm23-H₁ 基因外显子部分的基因突变在肺癌中发生率低,nm23-H₁ 基因突变可能与肺癌进展及转移有关。

【关键词】 肺肿瘤 nm23 基因 基因突变 单链构象多态性分析 转移抑制

Mutational analysis of nm23-H1 gene in human lung cancer by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism LIU Lunxu, ZHOU Qinghua, SUN Zhilin, QIN Yang, SHI Yingkang, SUN Zefang. Department of Thoracocardiac Surgery, The First University Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the mutation of nm23 gene and its correlation with development, progression and metastasis of human lung cancer. **Methods** Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) was employed for mutational analysis of the five exons of nm23-H1 gene in 45 surgically resected lung cancer and 7 normal pulmonary tissues. **Results** In the examined DNA samples of pulmonary tissues, no homozygous loss of allele of nm23-H1 gene was observed. SSCP analysis revealed altered mobility of single stranded DNA of nm23-H1 exon 1 in one case of stage B squamous cell pulmonary carcinoma with mediastinal lymphnode metastasis and malignant pleural effusion. **Conclusion** The frequency of nm23-H1 gene mutation in its coding region is rare in lung cancer. Mutation of nm23-H1 gene might play a role in the progression and metastasis of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms nm23 gene Gene mutation Single strand conformation polymorphism Metastasis suppression

This study was supported by a grant from the National Sciences Foundation of China (to Zhou Qinghua) (No. 39470687)

nm23 基因被认为是一种癌转移抑制基因,由美国国立癌症研究所的 Patricia S. Steeg 等于 1988 年在鼠 K-1735 黑色素瘤细胞系中发现^[1]。在人类已发现四种 nm23 基因,其中研究较多的是 nm23-H₁ 和 nm23-H₂^[2]。二者都定位于染色体 17q21.3,长约 9 kb,呈串联排列,中间隔有 4 kb,每个基因含有 5 个外显子^[3]。目前对 nm23 基因抑制癌转移的机理尚不清楚。有研究显示 nm23-H₁ 等位基因缺失与结肠癌的远处转移有关,也有在部分肿瘤中未检测到 nm23 基因改变的报道。我

们已经研究了 nm23 基因在人肺癌中的 mRNA 转录、蛋白表达以及等位基因缺失^[4-9],为探讨 nm23-H₁ 基因在肺癌中的突变情况,及其与肺癌发生、发展及转移的关系,本研究采用聚合酶链反应—单链构象多态性技术(PCR-SSCP)在 DNA 水平对 nm23-H₁ 基因的 5 个外显子进行了突变分析。

1 材料与方法

1.1 组织标本 45 例肺癌组织和 7 例正常肺组织来源于外科手术患者。包括鳞癌 21 例,腺癌 20 例,小细胞肺癌 4 例,其中 25 例伴有淋巴结转移,20 例不伴有淋巴结转移。肺组织离体后放入液氮保存。患者诊断均有病理学证据,采用国际抗癌联盟(UICC)1997 年修订的分期标准。

本课题受国家自然科学基金(39470687)资助

作者单位:610041 成都,华西医科大学附属第一医院胸心外科(刘伦旭、周清华、石应康);华西医科大学基础医学院生化教研室(孙芝琳、覃扬、孙泽芳)

1.2 PCR 引物 根据 GenBank Database (ACCESSION X75598) 提供的 nm23-H₁ 基因全序列,参考 Bafico 等^[10] 的方案,设计扩增 nm23-H₁ 基因 5 个外显子的引物(表 1)。

1.3 组织 DNA 的提取 根据常规的方法并有所改进。

1.4 PCR 扩增 PCR 反应系统组成为:5 μl 10 × 反应缓冲液,5 μl 2 mmol/L 4 × dNTP (Sigma 产品),2 μl 2 mmol/L 上游及下游引物,100 ng 模板 DNA,2.5 U Taq 酶(华美生物工程公司产品),加超纯水至 50 μl。循环条件为:94 变性 1 min,60 ~ 64 退火 1 min,72 延伸 1 min,循环 30 次。

表 1 扩增 nm23-H₁ 基因外显子的 PCR 引物

Tab 1 PCR primers of nm23-H₁ exons

Exon	Primer (5' -3')	Expected size of PCR product	Annealing temperature
1	GTCTGAAAAACGTACGCCCGG	217 bp	60
	CTTAGGTTTGAACCTCCGCTG		
2	GCTTGAGACGGATGACCGTGTA	265 bp	64
	CAGGTTAATCACAGTGTTCTCC		
3	ATGICCTTAGATGGTTGGGGGT	252 bp	64
	TTTGGTCTATTCATGGCTGIAT		
4	GCCACATTTTCTGCTGFGATT	234 bp	60
	CCCAAATCCTTGTGGCAACT		
5	GICTAATGICCATGGA GCTTC	400 bp	62
	CAGATGGTTCGGGATGGTAAAC		

1.5 PCR 产物的 SSCP 分析 根据 Peng 等^[11] 设计的高分辨率、低背景银染方法并有所改进。取 PCR 产物 8 μl,加 3 倍体积的 SSCP 变性液(98% 甲酰胺,10 mmol/L NaOH,20 mmol/L EDTA,0.05% 溴酚兰,0.05% 二甲苯青)混匀后 98 变性 5 min,冰上骤冷,立即上样于 6% ~ 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶,根据 PCR 产物 DNA 片段大小及凝胶浓度选择适当的电压及电泳时间,4 恒压电泳。电泳结束后将凝胶在固定液(12% 乙酸,50% 甲醇,0.02% 甲醛)中固定 3 ~ 16 h。用 50% 乙醇漂洗 20 min,2 次。用新配制的 0.02% 硫代硫酸钠处理凝胶 1 min,然后用蒸馏水漂洗 3 次,每次 1 min。银染液(0.2% AgNO₃,0.03% 甲醛)中染色 35 min(避光)。蒸馏水漂洗 2 次后,用新配制的显色液(6% Na₂CO₃,0.02% 甲醛,0.0005% 硫代硫酸钠)显色 3 ~ 5 min,在 50% 甲醇、16% 乙酸中终止显色。照像记录结果。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物 以肺癌组织 DNA 为模板,分别对 nm23-H₁ 基因的 5 个外显子进行扩增,扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 1)。每个外显子的扩增产物

都有一特异性带,片段大小与设计理论值完全相同。在所检测的 45 例肺癌组织中,扩增都获成功,并未检测到等位基因纯合缺失。

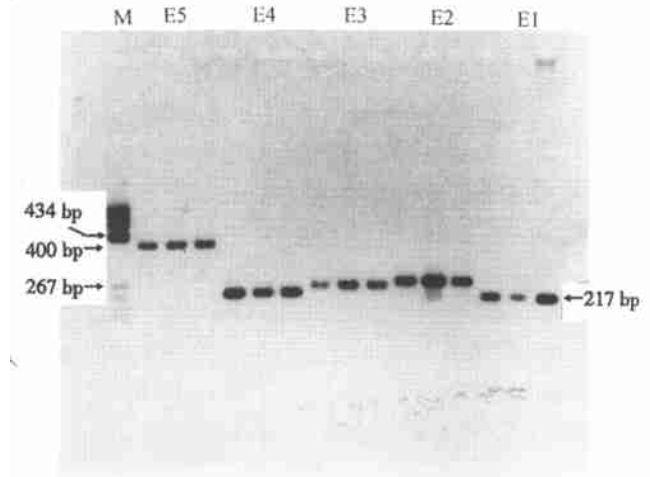


图 1 nm23-H₁ 基因外显子 1 ~ 5 的 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图
M: PBR322/ Hae 分子量参照物; E1 ~ E5: 外显子 1 ~ 5

Fig 1 Agarose electrophoresis of PCR products of nm23-H1 exon 1-5
M: PBR 322/ Hae molecular marker; E1 ~ E5: exon 1-5

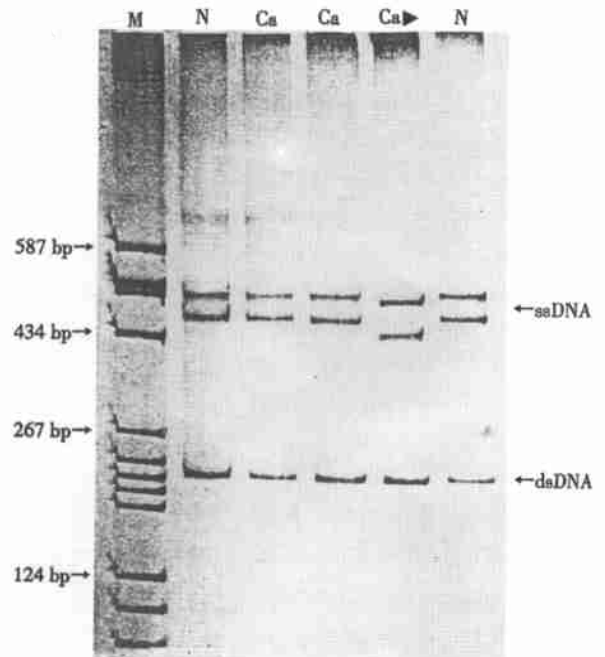


图 2 nm23-H₁ 基因外显子 1 SSCP 分析

8% 聚丙烯酰胺凝胶,250 V 电泳 5 h。箭头所指为单链 DNA 迁移率发生改变。M: PBR322/ Hae 分子量参照物; Ca: 癌组织; N: 正常组织; ssDNA: 单链 DNA; dsDNA: 双链 DNA

Fig 2 SSCP analysis of nm23-H1 gene exon 1

Electrophoresis on 8% polyacrylamide gel under voltage of 250 V for 5 hours. Arrow indicated altered mobility of single strand DNA. M: PBR 322/ Hae marker; Ca: Cancerous tissue; N: Normal tissue; ssDNA: single strand DNA; dsDNA: double strand DNA

2.2 SSCP 银染分析 对 nm23-H₁ 外显子 1 ~ 5 的 PCR

扩增产物进行 SSCP 电泳及银染(图 2~6),在 15 号肺癌标本的 nm23-H₁ 基因 PCR-SSCP 分析中,观察到外显子 1 PCR 扩增产物的单链 DNA 迁移率与正常对照相比发生改变(图 2 中箭头所示)。此例患者临床特征为:男性,57 岁,左肺中心型中分化鳞癌, B 期,肿块大小为 8 cm × 6 cm × 6 cm³,伴有纵隔淋巴结转移和 300 ml 恶性胸水。其余 4 个外显子的 PCR-SSCP 分析均未发现迁移率改变。

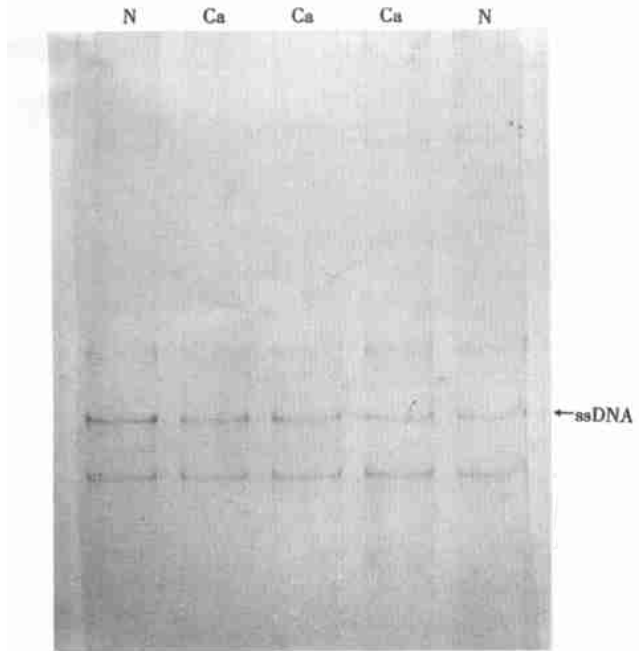


图 3 nm23-H₁ 基因外显子 2 SSCP 分析
8%聚丙烯酰胺凝胶,200 V 电泳 15 h

Fig 3 SSCP analysis of nm23-H1 gene exon 2

Electrophoresis on 8% polyacrylamide gel under voltage of 200 V for 15 hours

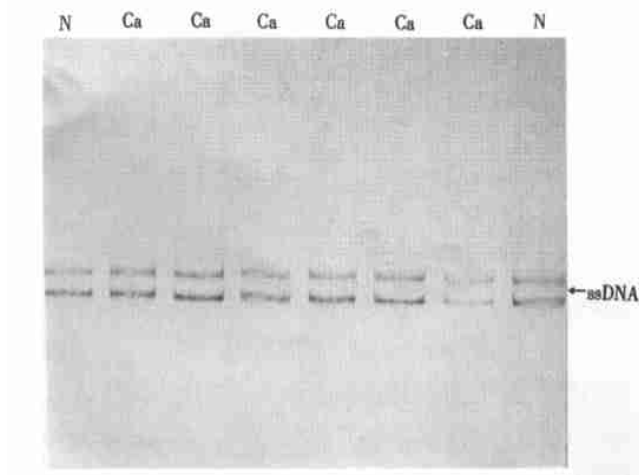


图 4 nm23-H₁ 基因外显子 3 SSCP 分析
8%聚丙烯酰胺凝胶,250 V 电泳 7 h

Fig 4 SSCP analysis of nm23-H1 gene exon 3

Electrophoresis on 8% polyacrylamide gel under voltage of 250 V for 7 hours

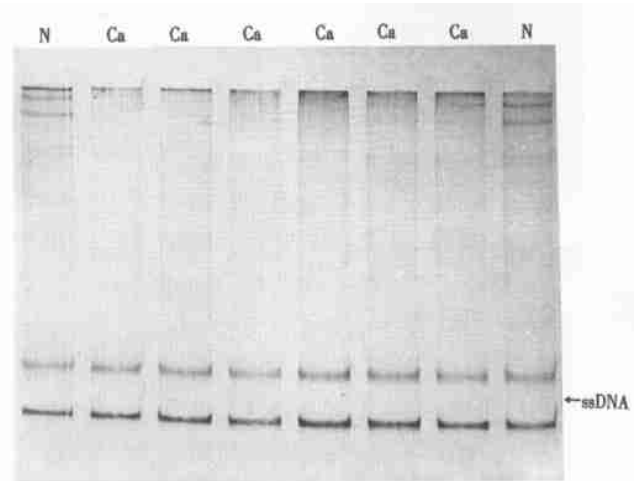


图 5 nm23-H₁ 基因外显子 4 SSCP 分析
8%聚丙烯酰胺凝胶,250 V 电泳 7 h

Fig 5 SSCP analysis of nm23-H1 gene exon 4

Electrophoresis on 8% polyacrylamide gel under voltage of 250 V for 7 hours

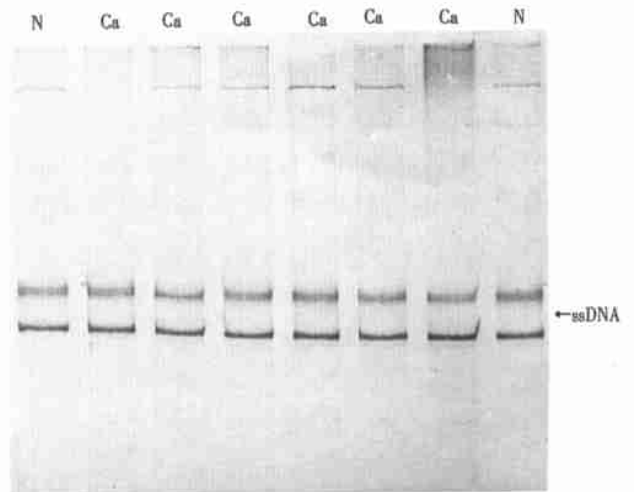


图 6 nm23-H₁ 基因外显子 5 SSCP 分析
6%聚丙烯酰胺凝胶,220 V 电泳 5 h

Fig 6 SSCP analysis of nm23-H1 gene exon 5

Electrophoresis on 6% polyacrylamide gel under voltage of 220 V for 5 hours

3 讨论

本实验在 DNA 水平,通过 PCR-SSCP 研究了肺癌中 nm23-H₁ 基因突变情况。PCR-SSCP 分析技术是 80 年代末期才建立的突变检测技术,此技术具有操作简便、快速、可靠等优点,对于小于 200 bp 片段突变检出率达 90%,400 bp 片段检出率约为 70%~80%^[12]。本研究采用了近年国外改进方法,其突出特点为高分辨率、低银染背景^[11]。对小于 250 bp 片段突变检出率达 100%,大于 300 bp 片段检出率为 95%。在原方法中,聚丙烯酰胺凝胶含有琼脂糖成份,在本实验过程中,经摸索去掉了琼脂糖,使单链 DNA 迁移间距变化较原方法更明显,取得了很好的效果。

在所分析的 45 例肺癌中,发现一例 B 期肺鳞癌的 nm23-H₁ 基因外显子 1 发生了突变。关于 nm23 基因改变,Leone 等^[13]首先在 109 例不同肿瘤组织中发现 64 % 的乳腺癌,42 % 的非小细胞肺癌,20 % 肾癌及 22 % 结肠癌有 nm23-H₁ 等位基因缺失。Cohn 等^[14]前瞻性研究了 21 例结肠癌,发现 nm23-H₁ 等位基因缺失者远处转移发生率高,第一次显示了 nm23-H₁ 基因位点上的改变在肿瘤中具有预后意义。Wang 等^[15]在结肠癌的实验中也发现 nm23 基因改变主要发生在有肿瘤转移表型者。但也有在结肠癌、子宫内膜癌、甲状腺癌等肿瘤中未发现 nm23 基因突变证据的报道。在肺癌方面,周清华、陈军等^[8,9]通过 Southern 印迹杂交观察到伴有淋巴结和/或远处转移的肺癌中 nm23-H₁ 等位基因缺失率显著高于不伴有转移的肺癌,低分化和未分化癌的 nm23-H₁ 等位基因缺失率亦显著高于中、高分化癌,显示 nm23-H₁ 等位基因缺失与肺癌转移有密切关系。本实验在研究等位基因缺失基础上通过 PCR-SSCP 研究 nm23-H₁ 基因外显子序列部分的基因突变,在 45 例肺癌中仅发现一例 nm23-H₁ 外显子 1 的基因突变,这说明本实验所检测的 nm23-H₁ 外显子部位序列基因突变在肺癌中发生率很低。此病例为肺癌晚期,伴有淋巴结转移和恶性胸水,这提示 nm23-H₁ 基因突变可能与肺癌进展及转移有关。此例突变可进一步用测序方法证实。

参 考 文 献

- 1 Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst*, 1988, 80(3) 200-206.
- 2 Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, et al. Identification of a second human

- nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res*, 1991, 51(1) 445-449.
- 3 Okada K, Urano T, Gi T, et al. Isolation of human nm23 genomes and analysis of loss of heterozygosity in primary colorectal carcinomas using a specific genomic probe. *Cancer Res*, 1994, 54(15) 3979-3982.
- 4 刘伦旭,石应康,周清华. 癌转移抑制基因: nm23 的研究进展. *中国胸心血管外科临床杂志*, 1995, 2(1) 48-51.
- 5 刘伦旭,周清华,石应康,等. 癌转移抑制基因 nm23 在人肺癌中的转录表达研究. *肺癌杂志*, 1999, 2(1) 1-4.
- 6 刘伦旭,覃杨,周清华,等. Northern 印迹杂交分析 nm23 基因 mRNA 在人肺癌中的表达. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(5) 342-344.
- 7 陈晓峰,周清华,石应康,等. 转移抑制基因 nm23-H₁ 在人肺癌组织中的蛋白表达研究. *中国胸心血管外科临床杂志*, 1997, 4(2) 89-92.
- 8 周清华,陈军,孙芝琳,等. nm23-H₁ 等位基因缺失与人非小细胞肺癌转移相关性研究. *中国胸心血管外科临床杂志*, 1998, 5(3) 131-134.
- 9 陈军,周清华,覃杨,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.
- 10 Bafico A, Varesco L, De-Benedetti L, et al. Genomic PCR-SSCP analysis of the metastasis associated nm23-H1 gene: a study on colorectal cancer. *Anticancer Res*, 1993, 13(6A) 2149-2154.
- 11 Peng H, Du M, Ji J, et al. High-resolution SSCP analysis using polyacrylamide agarose composite gel and a background-free silver staining method. *Bio Techniques*, 1995, 19(3) 410-414.
- 12 Prosser J. Detecting single-base mutations. *Trends Biotechnol*, 1993, 11(6) 238-246.
- 13 Leone A, McBride OW, Weston A, et al. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res*, 1991, 51(9) 2490-2493.
- 14 Cohn KH, Wang FS, Desoto-lapaix F, et al. Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastasis in colorectal carcinoma. *Lancet*, 1991, 338(8769) 722-724.
- 15 Wang L, Patel U, Ghosh L, et al. Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res*, 1993, 53(4) 717-720.

(收稿:1999-11-16 修回:2000-01-28)
(本文编辑 张世雯)

· 期刊文摘 ·

C-myc 抑制肺癌细胞的肿瘤发生并且下调血管内皮生长因子表达[英]/Barr LF... *Cancer Res*, 2000, 60(1) 143-149

C-myc 癌基因在源自肺肿瘤的细胞中频繁地扩增并且同这些癌症的恶性有关。为支持这一点,C-myc 转染提高人类小细胞肺癌(SCLC)细胞体外增殖与软琼脂中的克隆形成。在该研究中,作者惊讶地发现 C-myc 表达抑制了 SCLC 细胞在无胸腺鼠中的肿瘤形成。C-myc 表达下调了这些 SCLC 细胞内血管内皮生长因子(VEGF)的蛋白表达与转录,以及 C-myc 表达控制的

鼠成纤维细胞和 C-myc 转基因鼠肝细胞内的 VEGF 的转录。最后,双变量和多变量分析证实肺癌细胞系瘤形成可能性与 C-myc 的相对表达呈负相关,与 VEGF 的相对表达呈正相关,而且瘤形成的潜伏期可通过 C-myc 的表达得以延长,VEGF 的表达可使之缩短。因而作者推测,在活体中 C-myc 通过下调 VEGF 而抑制肿瘤的形成,而在预后较差的肺癌细胞生长中,C-myc 的扩增是体外生长选择的人为现象。

(陈玉成 译 张世雯 校)