文章编号:1000-5404(2014)10-0983-04

论著

Nm23-H1在小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系

熊艳丽,杨雪琴,张诗珩,杨宇馨,冯 燕,黄 环,王 东 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 探讨肿瘤转移抑制因子Nm23-H1在小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)中的表达及其与预后的关系。**方法** 通过免疫组化S-P法检测71例SCLC组织和22例正常肺组织中Nm23-H1蛋白表达情况,根据染色强度和阳性肿瘤细胞数目所占百分比,将其分为高、低表达两组,使用SPSS 19.0软件统计分析Nm23-H1的表达与临床病理及预后的关系。**结果** 正常肺组织中Nm23-H1蛋白表达显著高于SCLC组织(90.9% *vs* 57.7%, $P<0.01$);局限期患者Nm23-H1蛋白表达显著高于广泛期患者(66.7% *vs* 39.1%, $P<0.05$)。多因素Logistic回归分析显示,Nm23-H1蛋白可作为SCLC是否转移的独立保护因素($OR=0.32$, 95% $CI=0.12\sim0.90$, $P<0.05$)。亚细胞定位在正常肺组织与肺癌组织中没有差异,在不同分期之间也没有差异。多因素COX风险回归分析表明只有临床分期为广泛期和年龄≥60岁是SCLC患者总生存的劣势预后因素(年龄:$HR=1.03$, 95% $CI=1.00\sim1.05$, $P<0.05$;临床分期:$HR=1.85$, 95% $CI=1.03\sim3.33$, $P<0.05$)。Nm23-H1蛋白表达及亚细胞定位与SCLC患者生存期都没有显著相关性。**结论** Nm23-H1在SCLC组织中以细胞质表达为主的低表达,低表达与SCLC的远处转移密切相关,可能是SCLC预后不良的指标之一。

[关键词] 小细胞肺癌;转移;Nm23-H1;预后
[中图法分类号] R341;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Expression of Nm23-H1 and its relationship with prognosis in patients with small cell lung cancer

Xiong Yanli, Yang Xueqin, Zhang Shiheng, Yang Yuxin, Feng Yan, Huang Huan, Wang Dong (Cancer Center, Institution of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of Nm23-H1 and its relationship with prognosis in patients with small cell lung cancer. **Methods** The expression of Nm23-H1 was detected by immunohistochemistry in 71 small cell lung cancer tissue samples and 22 normal lung tissue samples. According to their positive percentage and staining intensity, they were divided into 2 groups: high expression group and low expression group. The correlation of Nm23-H1 expression with clinicopathology and prognosis was performed by SPSS 19.0. **Results** The positive rate of Nm23-H1 was higher in normal tissue samples than in small cell lung cancer(90.9% *vs* 57.7%, $P<0.05$); It was higher in limited stage than in extensive stage small cell lung cancer(66.7% *vs* 39.1%, $P<0.05$). Multivariate logistic regression showed the Nm23-H1 expression was an independent protect factor for the metastasis of small cell lung cancer ($OR=0.32$, 95% $CI=0.12-0.90$, $P<0.05$). The subcellular location of the Nm23-H1 showed no difference between normal lung tissues and cancer tissues, neither between different stages. In the survival analysis, Nm23-H1 positive expression was found to be related with decreased median overall survival than negative expression patients ($P<0.05$). The stage was also associated with mOS that the patients with limited foci stayed longer than those with metastastic diesease (HR = 1.85, 95% $CI=1.03-3.63$, $P<0.05$). **Conclusion** Nm23-H1 is midly expressed in SCLC cancer

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272599)
[通信作者] 王 东,电话:(023)68757151,E-mail: dongwang64@hotmail.com.
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0954.010.html(2014-3-28)

tissues, and mainly in the cytoplasma. The expression plays an important role in the metastasis of SCLC, and may be a predictive factor for the poor outcome of SCLC.

[**Key words**] small cell lung cancer; metastasis; Nm23-H1; prognosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272599). Corresponding author: Wang Dong, Tel: 86-23-68757151, E-mail: dongwang64@hotmail.com.

小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)占肺癌的15%~18%,2/3以上的患者在诊断时已有远处转移(T0-4N0-3M1),诊断后如果不积极治疗控制病情,患者疾病进展迅速,中位生存期仅2~4个月[1-2]。远处转移是SCLC重要的恶性标志和特征,也是治疗失败和复发的主要因素之一。因此,确定与SCLC转移相关的基因,早期对SCLC患者预后进行合理判定,对进行个体化治疗和更为密切的随访具有重要意义。近年来随着分子生物学的研究,发现了一类与肿瘤转移相关的基因,目前已经证实Nm23基因家族对肿瘤的发生、发展及转移具有明确的相关性,其中该家族成员Nm23-H1被认为具有抑制肿瘤细胞侵蚀和转移的作用[3-4]。不同病理类型的恶性肿瘤中的Nm23-H1表达水平有差异,在大多数实体瘤中Nm23-H1低表达表现出更易于远处转移,为预后不良的标志;而在神经母细胞瘤中和淋巴瘤中却相反,Nm23-H1高表达者促进肿瘤增殖、浸润和远处转移,表现出较差的预后[5-6]。而对SCLC中Nm23-H1的表达情况及其与预后的关系目前尚不清楚,缺乏相关定论。本实验通过免疫组化方法检测Nm23-H1在SCLC中的表达情况,探讨Nm23-H1的表达与SCLC患者预后的关系,为今后进一步研究SCLC,制定合理的个体化治疗方案提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2003年2月至2008年10月我院经活检或手术切除病理确诊、临床随访资料完整的初诊SCLC患者共71例,其中男性63例(88.7%),女性8例,年龄23~85岁,中位年龄58岁。随访2~7年。根据1973年美国退伍军人医院制定的分期标准,局限期48例(67.6%),广泛期23例,其中30例患者进行单纯化疗(化疗周期2~8个周期,平均4周期),41例患者行放化疗综合治疗[7]。收集71例患者放化疗前癌组织石蜡标本,22例正常肺组织石蜡标本(与癌组织距离至少5 cm)作为对照。

1.2 免疫组化染色

所有病理组织石蜡标本连续切片,采用S-P法进行免疫组化检测评估其蛋白表达。兔抗人Nm23-H1多克隆抗体购自Santa Cruz公司,为原液,使用时按1∶750比例稀释。二抗购自北京西雅金桥生物技术有限公司,PO-7000通用型一步超敏检测试剂盒(适用于检测兔/鼠来源的一抗)。所有标本切片后60 ℃烘烤4 h,经脱蜡、水合后以10%过氧化氢封闭,按照所需修复要求以枸橼酸钠(pH=6.0)修复抗原,一抗4 ℃孵育过夜,二抗37 ℃孵育25 min,DAB显色,苏木精复染,盐酸酒精脱色,饱和碳酸锂镧化后脱水、中性树胶封片。用PBS液代替一抗作阴性对照,用已知人胰腺组织的切片作阳性对照。

1.3 结果判定

蛋白表达水平的评估以细胞染色程度与内部对照细胞(淋巴细胞及间质细胞)进行比较,分为少量表达、弱到中等强度表达及强表达,再根据阳性肿瘤细胞数目所占百分比,将其表达水平分为4个等级,在肿瘤细胞中没有表达为0;在少于10%的肿瘤细胞中有少量表达为+;在超过10%肿瘤细胞中有弱到中等强度表达为++;在超过10%肿瘤细胞中强表达则为+++。++~+++定义为阳性,即高表达组;0~+定义为阴性,即低表达组。

1.4 统计学处理

采用SPSS 19.0统计软件进行分析。Nm23-H1在SCLC与正常肺组织中的表达和亚细胞定位采用χ^2检验,Nm23-H1表达及亚细胞定位与临床分期的关系采用χ^2检验及多因素向前逐步Logistic回归计算;采用单变量Kaplan-Meier生存分析及多因素COX风险比例回归分析Nm23-H1蛋白表达及亚细胞定位与SCLC患者预后的关系。所有检验为双侧检验。

2 结果

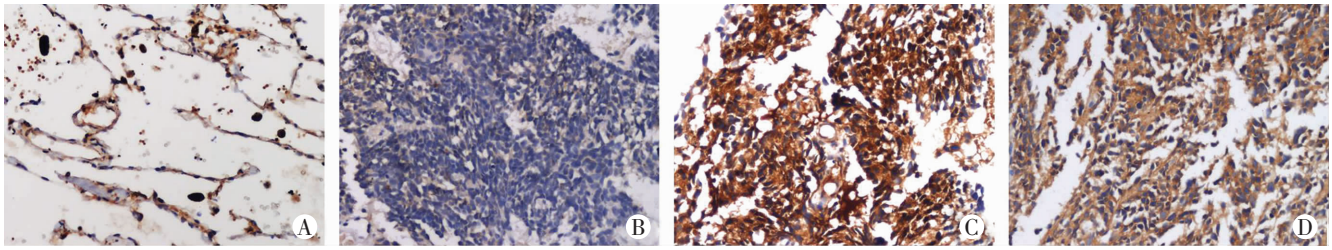
2.1 Nm23-H1蛋白表达

Nm23-H1蛋白表达见图1,57.7%的患者Nm23-H1表达阳性,且多为细胞质表达,仅5.6%的患者为细胞核、质共表达,没有观察到单独核表达。Nm23-H1蛋白的表达在正常肺组织中显著高于SCLC组织($P<0.01$)。在正常肺组织及SCLC组织中的亚细胞定位基本一致,均多为细胞质表达,二者之间没有统计学差异($P>0.05$)。见表1。

表1 Nm23-H1在SCLC与正常肺组织中的表达[例(%)]

标本	n	蛋白表达		蛋白定位		
		阴性	阳性	无表达	细胞质表达	细胞核、质共表达
正常肺组织	22	2(9.1)	20(90.9)	2(9.1)	18(81.8)	2(9.1)
SCLC组织	71	30(42.3)	41(57.7)[a]	16(22.5)	51(71.8)	4(5.6)

a: $P<0.01$,与正常肺组织比较



A:正常肺组织中细胞质表达;B:小细胞肺癌阴性表达;C:小细胞肺癌细胞质表达;D:小细胞肺癌细胞核、质共表达

图 1　正常组织和小细胞肺癌组织 Nm23-H1 的表达　(MaxVision™ ×100)

2.2　Nm23-H1 表达与临床病理的关系

Nm23-H1 表达在局限期明显高于广泛期($P<0.05$)。亚细胞定位在不同分期之间没有统计学差异。多因素 Logistic 回归分析发现,Nm23-H1 蛋白表达可作为 SCLC 是否转移的独立保护因素,低表达 Nm23-H1 蛋白的患者更容易发生转移($OR=0.32$,95% $CI=0.12\sim0.90$,$P<0.05$)。见表 2。

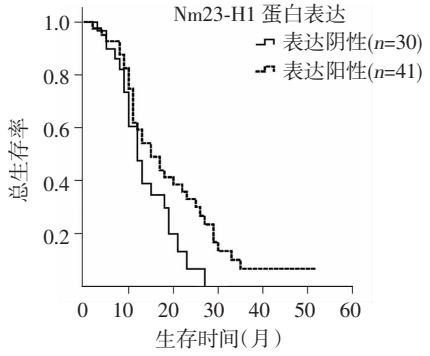
表 2　SCLC 中 Nm23-H1 表达与临床病理的关系[例(%)]

变量	n	蛋白表达		蛋白定位		
		阴性	阳性	无表达	细胞质表达	细胞核、质共表达
年龄(岁)						
<60	41	12(29.3)	29(70.7)	9(22.0)	29(70.7)	3(7.3)
≥60	30	18(60.0)	12(40.0)	7(23.3)	22(73.3)	1(3.3)
性别						
男	63	27(42.9)	36(57.1)	16(25.4)	45(71.4)	2(3.2)
女	8	3(37.5)	5(62.5)	0	6(75.0)	2(25.0)
国际分期						
局限期	48	16(33.3)	32(66.7)[a]	9(18.8)	35(72.9)	4(8.3)
广泛期	23	14(60.9)	9(39.1)	7(30.4)	16(69.6)	0
吸烟指数						
≤400	28	11(39.3)	17(60.7)	5(17.9)	21(75.0)	2(7.1)
>400	43	19(44.2)	24(55.8)	11(25.6)	30(69.8)	2(4.6)

a:$P<0.05$,与广泛期比较

2.3　Nm23-H1 表达与 SCLC 患者预后的关系

本组 71 例 SCLC 患者,总体中位生存期为 13.0 个月。Nm23-H1 阴性的患者中位生存期 12.00 个月,阳性的患者中位生存期 15.00 个月,表达阴性的患者中位生存期显著短于表达阳性的患者($P<0.05$,图 2)。临床分期为局限期的患者中位生存期比广泛期的患者长(17.00 个月 *vs* 12.00 个月,$P<0.05$)。但在多因素 COX 风险回归分析中,只有临床分期和年龄与 SCLC 患者生存期有相关性(年龄:$HR=1.03$,95% $CI=1.00\sim1.05$,$P<0.05$;临床分期:$HR=1.85$,95% $CI=1.03\sim3.33$,$P<0.05$);Nm23-H1 表达及亚细胞定位与 SCLC 患者生存期都没有关联性。



kaplan-Meier 生存分析结果:$P<0.05$

图 2　Nm23-H1 蛋白低表达和高表达生存曲线

3　讨论

SCLC 是一种高度恶性的肿瘤,其生长速度快,侵袭性强,早期就可以出现广泛的远处转移,预后极差。由于 SCLC 具有快速播散的生物学特性,多数患者诊断时已有其他脏器转移,而失去手术治疗的机会。虽然 SCLC 对放化疗均非常敏感,但是对治疗的反应率和治愈率不相符,大多数患者在初始治疗后仍会出现复发或远处转移,生存时间短[8]。

肿瘤转移是其恶性标志和重要特征,也是导致肿瘤患者不良预后的重要原因之一。肿瘤转移并非随机过程,而是由多因素决定的阶梯式步骤,主要表现为:细胞间黏附下降;突破由细胞外基质和血管壁的基底膜组成的屏障;免疫逃逸;形成新生血管等[9]。它受到多种因素的调控,可能涉及肿瘤细胞黏附、迁移和侵袭能力的增强,基质金属蛋白酶分泌的增多,血管和淋巴管的形成,上皮间质转化等一系列的改变[10]。肿瘤转移抑制基因是可以抑制肿瘤转移而不影响原发肿瘤生长的基因,其在恶性肿瘤发生、发展和转移中的作用受到广泛重视。Nm23-H1 作为首个被发现的肿瘤转移抑制基因,在抑制肿瘤细胞黏附、趋化和侵袭性、限制肿瘤细胞在转移处集落形成等方面发挥重要作

用[11]。定点突变 Nm23-H1 基因 P96S、S120G 表明，Nm23-H1 抑制肿瘤转移功能，可能与其组氨酸激酶活性有关，而目前关于该酶的底物确切底物及通过的信号通路仍不明确[12-14]。目前已有大量临床资料表明，Nm23-H1 基因在乳腺癌、肝癌、胃癌、恶性黑色素瘤等恶性肿瘤中的表达，与抑制肿瘤转移和良好预后相关[15-17]。

本研究应用免疫组织化学检测了 Nm23-H1 蛋白在 71 例 SCLC 标本和 22 例正常肺组织标本中的表达情况，结果显示 Nm23-H1 在 SCLC 组织中呈现 2 种表现形式：细胞质表达和核、质共表达，且表达程度强弱不等，但以细胞质表达为主；在正常肺组织中也以细胞质表达为主，但表达水平显著高于 SCLC 组织。同时 Nm23-H1 在局限期的表达显著高于广泛期，这与 Nm23-H1 作为细胞质肿瘤转移抑制基因的特性相一致，同时也提示 Nm23-H1 低表达在 SCLC 的远处转移中发挥着重要的作用。

在 Kaplan-Meier 生存分析中，我们发现 Nm23-H1 在 SCLC 中的表达与预后明显相关，Nm23-H1 高表达组的预后显著高于低表达组。这与 Nm23-H1 在非 SCLC 等其他多种恶性肿瘤中的结果相一致，反映出转移抑制基因 Nm23-H1 对 SCLC 预后是有价值的指标[18]。但在纳入临床基线数据进行 COX 比例风险回归发现，Nm23-H1 表达及亚细胞定位不能作为 SCLC 预后的独立风险因素，仅年龄与临床分期与 SCLC 生存期独立相关。Nm23-H1 表达不能作为独立预后因素，考虑其一可能与我们样本量不足有关；其二，肿瘤的发生、发展是一个复杂的过程，受到多因素网络式调控，Nm23-H1 仅是影响 SCLC 预后的诸多因素之一。

参考文献：

[1] Planchard D, Le-Pechouxb C. Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(Suppl 3): S272-S283.

[2] Joshi M, Ayoola A, Belani C P. Small-cell lung cancer: an update on targeted therapies[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 779: 385-404.

[3] Steeg P S, Bevilacqua G, Kopper L, *et al*. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential[J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80 (3): 200-204.

[4] Lacombe M L, Milon L, Munier A, *et al*. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases[J]. J Bioenerg Biomembr, 2000, 32(3): 247-258.

[5] Marshall J C, Lee J H, Steeg P S. Clinical-translational strategies for the elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 329(1/2): 115-120.

[6] Lionello M, Blandamura S, Lovato A, *et al*. A high nuclear nm23-H1 expression is associated with a better prognosis in elderly patients with laryngeal carcinoma[J]. Acta Otolaryngol, 2013, 133(8): 874-880.

[7] 冯燕，李少林，杨宇馨，等. hOGG1 在小细胞肺癌中的表达特点及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报，2011，33(17)：1808-1811.

[8] Chan B A, Coward J I. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer[J]. J Thorac Dis, 2013, 5(Suppl 5): S565-S578.

[9] Sodeur S, Ullrich S, Gustke H, *et al*. Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice [J]. Cancer Lett, 2009, 282(2): 146-151.

[10] 管孝臣，秦文星，颜荣林. 肿瘤转移抑制基因的作用及临床意义[J]. 实用临床医药杂志，2011，15(7)：142-144.

[11] Boissan M, Lacombe M L. Learning about the functions of NME/NM23: lessons from knockout mice to silencing strategies[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2011, 384(4/5): 421-431.

[12] 杨雪琴，姚毅冰，朱文，等. 转移抑制基因 nm23-H1 参与肺癌 Ras 信号传导机理研究[J]. 中国肺癌杂志，2008，11(5)：700-703.

[13] Wagner P D, Steeg P S, Vu N D. Two-component kinase-like activity of nm23 correlates with its motility-suppressing activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(17): 9000-9005.

[14] MacDonald N J, De-la-Rosa A, Benedict M A, *et al*. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential[J]. J Biol Chem, 1993, 268(34): 25780-25789.

[15] Kapoor S. nm23H1 expression and its role in the evolution of non-gastrointestinal malignancies[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(4): 506-507.

[16] Takadate T, Onogawa T, Fujii K, *et al*. Nm23/nucleoside diphosphate kinase-A as a potent prognostic marker in invasive pancreatic ductal carcinoma identified by proteomic analysis of laser micro-dissected formalin-fixed paraffin-embedded tissue[J]. Clin Proteomics, 2012, 9(1): 8.

[17] Hartsough M T, Steeg P S. Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers[J]. J Bioenerg Biomembr, 2000, 32(3): 301-308.

[18] 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[J]. 中华实验外科杂志，1998，15(6)：501-502.

（**收稿**：2014-01-22；**修回**：2014-02-18）

（编辑　汪勤俭）