

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.07.0369

·论著·

## Nucleophosmin1 胞浆表达的结肠癌组织中不存在其第 12 外显子突变

杨宇峰, 张锡迎, 杨梅, 谢树瑞, 张宝庭

(东莞市石龙人民医院病理科, 广东 东莞 523326)

**【摘要】目的** 观察 Nucleophosmin1(NPM1)在结肠癌组织中是否存在 NPM1 基因第 12 外显子突变。**方法** 免疫组化检测 115 例结肠癌组织及相应癌旁组织、10 例结肠绒毛状腺瘤、10 例管状腺瘤和 10 例正常结肠黏膜组织 NPM1 表达; 检查 NPM1 胞浆表达的结肠癌组织中是否存在 NPM1 基因第 12 外显子突变。**结果** 在 115 例结肠癌样本中有 92.1%(106/115) 的病例 NPM1 表达定位于胞核, 7.0%(8/115) 的病例存在胞浆 NPM1 表达, 0.9%(1/115) 的病例胞核与胞浆 NPM1 阴性表达; NPM1 在结肠癌组织中呈高表达, 并且明显高于在相应癌旁组织、绒毛状腺瘤、管状腺瘤和正常结肠黏膜组织的表达( $P$  均 <0.05)。结肠癌组织中 NPM1 第 12 外显子结构与正常黏膜野生型 NPM1 第 12 外显子结构的相似。**结论** NPM1 在结肠癌组织中呈高表达, 表明 NPM1 在结肠癌发生发展中的潜在作用; NPM1 胞浆表达的结肠癌组织中不存在 NPM1 基因第 12 外显子突变, 说明 NPM1 以未知方式而不是基因突变方式参与结肠癌发生发展。

【关键词】 Nucleophosmin1; 结肠癌; 基因突变

【中图分类号】 R735.3<sup>5</sup> 【文献标识码】 A 【文章编号】 1003—6350(2014)07—0950—04

**Non-presence of mutations in exon 12 of nucleophosmin1 (NPM1) gene in colorectal carcinomas with NPM1 expression in cytoplasm.** YANG Yu-feng, ZHANG Xi-ying, YANG Mei, XIE Shu-rui, ZHANG Bao-ting. Department of Pathology, Dongguan Shilong People's Hospital, Dongguan 523326, Guangdong, CHINA

**[Abstract]** **Objective** To investigate whether there is a presence of mutations in exon 12 of nucleophosmin1 (NPM1) gene in colorectal carcinomas (CRC). **Methods** We investigated NPM expression by immunohistochemistry in histologically normal to malignant colorectal tissues and also investigate whether exon 12 of the NPM1 gene is mutated in CRC with NPM expression located in cytoplasm. **Results** Among the 115 samples of colorectal carcinomas, 92.1% (106/115) of the tumors showed NPM1-positive expression only in the nucleus, 7.0% (8/115) showed NPM1-positive expression in cytoplasm, and 0.9% (1/115) showed NPM1-negative expression in cytoplasm and nucleus. NPM expression was found significantly up-regulated in CRC compared to adjacent colorectal tissue, villous adenoma, tubular adenoma and normal colorectal tissues, respectively ( $P$  < 0.05 for all). Sequencing of exon 12 of NPM1 gene in CRC was the same as those in normal colorectal tissue. **Conclusion** NPM expression is found significantly up-regulated in CRC, suggesting that NPM contributes to oncogenesis of CRC. However, NPM1 exon 12 is not mutated in CRC, which suggests that NPM1 play a role in the tumorigenesis of CRC through unclear mechanisms rather than NPM1 mutation.

【Key words】 Nucleophosmin1; Colon carcinomas; Gene mutation

Nucleophosmin1 (NPM1) 是多功能的核仁磷酸蛋白。NPM1 基因的第 12 外显子突变发生在 35%~40% 的急性髓样白血病(AML)病例中, NPM1 突变蛋白在 AML 特征性胞浆定位<sup>[1]</sup>与 NPM1 蛋白在其他恶性肿瘤细胞的胞核定位显著不同, 临床统计分析表明, NPM1 的胞浆表达型/突变型 AML 病例对化疗敏感且预后良好, 因此, NPM1 突变及其表达蛋白检测对于 AML 的诊断治疗具有重要的临床意义。然而, 在实体肿瘤中尚未发现 NPM1 基因突变和相应的突变蛋白胞浆定位。Karhemo 等<sup>[2]</sup>在检测 1113 例乳腺癌组织样本发现分别有 42 例和 36 例样本存在胞浆 NPM1 低表达及高表达。我们在前期研究中也观察到在结肠癌组织中有

少量病例免疫组化检测到 NPM1 的胞浆阳性, 这与之前研究的 NPM1 胞核表达有显著不同。我们收集结肠癌组织样本观察 NPM1 蛋白的表达和定位, 检测 NPM1 表达蛋白与结肠癌临床病理参数之间的关系, 分析 NPM1 基因在结肠癌中的突变情况, 探讨 NPM1 在结肠癌发生发展中的作用。

### 1 材料与方法

1.1 组织标本及病例 收集东莞市石龙人民医院 2005~2010 年有完整临床和病理档案资料的结肠良恶性组织样本共 145 例, 包括 115 例结肠癌及相应癌旁组织、10 例绒毛状腺瘤、10 例管状腺瘤和 10 例正常结肠黏膜组织, 均用于免疫组化检测。结肠病变的

基金项目: 东莞市科技计划医疗卫生类科研一般项目(编号: 20131051010064)

通讯作者: 杨宇峰。E-mail:y313yang260@163.com

诊断根据最新的 WHO 病理诊断标准。

**1.2 免疫组织化学检测** 结肠癌组织及相应的癌旁组织、绒毛状腺瘤、管状腺瘤和正常结肠黏膜组织的石蜡标本连续切片, 经脱蜡、微波修复抗原, 孵育鼠单克隆一抗 NPM1 (克隆号 NA24, Santa Cruz Biotechnology, 美国), DAB 显色, 苏木素对比染色, 观察 NPM1 阳性染色的部位及强度。每批染色均设置阳性、阴性对照。分别用预实验中已知 NPM1 阳性结肠癌组织切片为阳性对照; 用 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。采用半定量积分法判断结果, 阳性细胞计分标准为: ≤5% 为 0 分; 6%~25% 为 1 分; 26%~50% 为 2 分; 51%~75% 为 3 分; > 75% 为 4 分。染色强度分级计分标准为: 淡黄色为 1 分; 黄或深黄色为 2 分; 褐或棕褐色为 3 分。两者计分相乘综合判断表达强度, 0 分为阴性(-), 1~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为阳性(++) , 9~12 分为强阳性(+++ )。

**1.3 抽提 NPM1 胞浆阳性表达的结肠癌组织 DNA** DNA 抽提采用以前文献所述 DNA 抽提方法<sup>[3]</sup>, 除极少数病例外, NPM1 基因在第 12 外显子常存在突变。因此我们分析了 NPM1 第 12 外显子编码区域。首先扩增 NPM1 胞浆阳性表达的结肠癌和正常黏膜细胞的第 12 外显子。引物序列如下: 上游引物 5'-tctat-gaagtgttggttc-3' 和下游引物 5'-ctgcattataaaaaggacag-3'。PCR 产物的大小是 179 个碱基对。PCR 过程参照相关文献描述<sup>[4]</sup>。PCR 产物的测序使用测序试剂盒 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 测序方法遵循试剂说明书的建议。重复实验三次, 包括 PCR 和测序分析, 以确保结果的准确性。

**1.4 统计学方法** 采用 SPSS16.0 统计软件分析。 $\chi^2$  检验检测 NPM1 在结肠癌组织及相应的癌旁组织、绒毛状腺瘤、管状腺瘤和正常结肠黏膜组织中的表达差异, 也检测 NPM1 在结肠癌组织中表达与临床病理参数的关系,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 NPM1 在结肠癌组织中的表达** 免疫组化结果显示在 115 例结肠癌样本中有 92.1% (106/115) 的病例 NPM1 表达定位于胞核, 7.0% (8/115) 的病例存在胞浆 NPM1 表达, 0.9% (1/115) 的病例胞核与胞浆 NPM1 阴性表达(图 1)。在 107 例 NPM1 非胞浆表达的结肠癌组织中强阳性 28 例(26.2%), 阳性 34 例(31.8%), 弱阳性 44 例(41.1%), 阴性 1 例(0.9%)。结肠癌组织中的间质及癌旁上皮组织中也表达。在 10 例结肠绒毛状腺瘤、10 例管状腺瘤和 10 例正常结肠黏膜组织中, NPM1 表达阳性率分别为 40% (4/10)、30% (3/10)、0 (0/10)。统计显示 NPM1 在结肠癌组织中表达与在相

应癌旁组织、绒毛状腺瘤、管状腺瘤和正常结肠黏膜组织的表达差异均有统计学意义, 在结肠癌组织的表达明显高于在相应癌旁组织、绒毛状腺瘤、管状腺瘤和正常结肠黏膜组织的表达( $P < 0.05$ ), 见表 1。

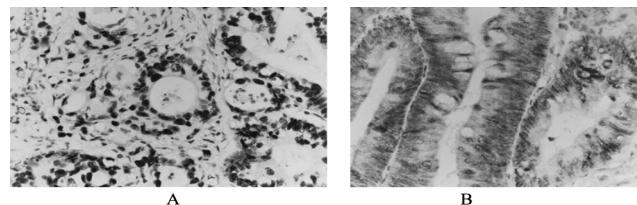


图 1 NPM1 在结肠癌组织中的表达

注: A, NPM1 在结肠癌组织中胞核的阳性表达。B, NPM1 在结肠癌组织中胞浆的阳性表达 ( $\times 400$ )

表 1 NPM1 蛋白在五组结肠组织中的表达(例)

表达强度	结肠癌	癌旁组织	绒毛状腺瘤	管状腺瘤	正常结肠黏膜
强阳性	28	5	0	0	0
阳性	34	11	1	0	0
弱阳性	44	34	3	3	0
阴性	1	57	6	7	10

注: 结肠癌样本来自 107 例 NPM1 非胞浆表达的结肠癌患者。

**2.2 NPM1 在结肠癌组织中表达与临床病理参数的关系** 我们根据不同临床病理参数分组比较 NPM1 表达差异。在 107 例 NPM1 非胞浆表达的结肠癌病例中, NPM1 表达强度与结肠癌患者 TNM 分期和肿瘤组织学分级显著相关, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。NPM1 阳性表达结肠癌患者可能有更高的 TNM 分期或更低的组织学分级。NPM1 表达与患者年龄、性别及肿瘤组织学类型无明显相关性, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 2。

表 2 NPM1 在结肠癌的表达与临床病理参数的关系(例)

项目	NPM1 表达		$P$ 值
	(+)	(-)	
年龄(岁)			0.121
<50	38	34	
≥50	24	11	
性别			0.991
男	33	24	
女	29	21	
TMN 分期			0.008
I ~ II	20	26	
III ~ IV	42	19	
分化程度			0.012
高-中分化	22	27	
低分化	40	18	
组织学类型			0.09
非黏液/印戒细胞癌	53	43	
黏液/印戒细胞癌	9	2	

注: 结肠癌样本来自 107 例 NPM1 非胞浆表达的结肠癌患者。

**2.3 NPM1 胞浆表达结肠癌组织第 12 外显子突变情况** 我们分析了 7 例 NPM1 胞浆阳性表达的结肠癌组织和 7 例正常黏膜组织 NPM1 基因第 12 外显子突变情况。结肠癌组织中 NPM1 第 12 外显子结构与正常黏膜野生型 NPM1 第 12 外显子结构相似。因此没有证据表明在 NPM1 胞浆阳性表达的结肠癌组织存在 NPM1 第 12 外显子突变, 我们重复了这个实验两次以确保结果的准确性, 并且两次结果是一致的。

### 3 讨 论

在这项研究中我们的数据表明 NPM1 在结肠癌组织中的表达明显高于在相应癌旁组织、绒毛状腺瘤、管状腺瘤和正常肠黏膜组织中的表达。这些结果表明 NPM1 的高表达在结肠癌的发生发展过程中发挥着重要作用。

NPM1 是一种多功能的细胞磷酸化的穿梭蛋白, 它参与核糖体的生物合成、调控中心体复制、参与细胞凋亡调控、并具有分子伴侣功能<sup>[5]</sup>。NPM1 在肿瘤形成过程中的作用是有争议的。一方面, 以往的研究报道 NPM1 在许多实体肿瘤高表达<sup>[6]</sup>, 如肝癌、胃癌、结肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌和甲状腺癌。这些结果包括我们的结果表明 NPM1 在恶性肿瘤形成过程中的起癌基因的作用。NPM1 基因突变或重排也见于血液肿瘤<sup>[7]</sup>, 这也表明 NPM1 起癌基因的作用。但是, 在实体肿瘤中没有发现 NPM1 基因突变<sup>[8]</sup>。此外, 删除 NPM1 基因可降低细胞生存能力, 导致细胞衰老和细胞周期阻滞, 这也在功能上支持它作为一个癌基因参与肿瘤的发生发展<sup>[9]</sup>。

另一方面, 以剔除 NPM1 基因的细胞和携带一个 NPM1 失活位点等位基因的老鼠为实验对象的研究则显示出 NPM1 的肿瘤抑制功能<sup>[10]</sup>。此外, 在乳腺癌中也报道 NPM1 的肿瘤抑制功能<sup>[2]</sup>。尽管 NPM1 似乎通过许多机制参与肿瘤的发生发展, 但是它的具体作用机制尚不清楚。NPM1 可能作为癌基因和抑制基因参与肿瘤的发生发展。

新英格兰医学杂志发表研究报告: NPM1 突变及其突变蛋白特征性胞浆定位检测在 AML 的临床诊治及预测预后中具有重要价值<sup>[1]</sup>; Nature Review Cancer<sup>[5]</sup> 和 Blood<sup>[11]</sup> 杂志先后发表综述文章重点介绍 NPM1 的结构特点及其在肿瘤发生发展中的作用和意义。(1) 人 NPM1/B23 基因定位于 5q35, 含有 12 个外显子, 编码蛋白可分为 B23.1、B23.2 和 B23.3 等 3 种亚型, NPM1(B23.1) 蛋白是功能较为广泛且被研究较多的亚型, 由 294 个氨基酸构成, 含有多种功能结构域<sup>[12]</sup>, 其主要定位于核仁, 当细胞受到外部刺激或进入细胞周期循环的时候, NPM1 蛋白可穿梭于核仁-核浆-胞浆, 在核糖体合成及运输、与其他蛋白相互作用、维持

染色体组稳定和调节中心体复制中发挥重要作用, 因此, NPM1 是细胞增殖和细胞周期调控的重要因子。(2) 恶性肿瘤中存在 NPM1 基因遗传学改变, 几种淋巴造血系统肿瘤中检测到 NPM1 基因突变和移位<sup>[13-15]</sup>: 35%~40% 的 AML 病例发现 NPM1 基因的 12 外显子突变, 突变的 NPM1 基因编码异常蛋白质, 其 C-末端包含突变的色氨酸位点<sup>[1]</sup>, 从而获得一个核输出信号<sup>[16]</sup>。其突变蛋白特征性定位在肿瘤细胞胞浆; 免疫组化检测到 NPM1 的胞浆阳性表达可以用于预测 NPM1 的基因突变; 进而发现 NPM1 胞浆型 AML 对化疗敏感及预后良好。大约 85% 的 CD30 阳性间变大细胞性淋巴瘤中发现基因移位 t(2;5)(p23;q35), NPM1 基因与 ALK 基因“融合”形成 NPM1-ALK 融合基因和编码融合蛋白, 并发现此融合蛋白具有致瘤作用<sup>[17]</sup>。然而, 有趣的是, 在非淋巴造血系统肿瘤或者是实体瘤中尚未检测到 NPM1 基因突变和移位。

我们免疫组化检测发现少量结肠癌样本存在 NPM1 胞浆表达, 因此进一步检测 NPM1 胞浆表达的结肠癌组织中是否存在 NPM1 基因第 12 外显子突变。结果显示在这些免疫组化检测发现的 NPM1 胞浆阳性结肠癌组织中不存在 NPM1 基因第 12 外显子突变。这可能表明 NPM1 基因第 12 外显子突变很少发生在结肠癌, 并且 NPM1 基因第 12 外显子突变可能在结肠癌发生发展过程中不发挥重要作用。

总之, NPM1 在结肠癌组织中的高表达说明 NPM1 在结肠癌的发生发展过程中发挥着重要作用。NPM1 胞浆阳性结肠癌组织中不存在 NPM1 基因第 12 外显子突变。这可能表明 NPM1 基因以未知方式而不是基因突变方式参与结肠癌发生发展。当然, 我们需要进一步研究 NPM1 基因致结肠癌发生的机制。

(感谢华南肿瘤生物学国家重点实验室, 中山大学肿瘤防治中心张志义博士技术指导。)

### 参 考 文 献

- [1] Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype [J]. The New England Journal of Medicine, 2005, 352(3): 254-266.
- [2] Karhemo PR, Rivinoja A, Lundin J, et al. An Extensive Tumor Array Analysis Supports Tumor Suppressive Role for Nucleophosmin in Breast Cancer [J]. Am J Pathol, 2011, 179(2): 1004-1014.
- [3] Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. CASPASE-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas [J]. Cancer Res, 2005, 65: 815-821.
- [4] Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) [J]. Blood, 2006, 107(10): 4011-4020.
- [5] Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(7): 493-505.
- [6] Yun JP, Miao J, Chen GG, et al. Increased expression of nucleophosmin/B23 in hepatocellular carcinoma and correlation with clinic-

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2014.07.0370

·论著·

## 肝癌衍生生长因子在胃腺癌组织中的表达及意义

李惠芬, 马桂芳, 宋祥和

(盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224001)

**【摘要】目的** 探讨肝癌衍生生长因子(HDGF)在胃腺癌发生、发展及转移中的作用。**方法** 运用免疫组织化学 S-P 方法检测 32 例正常胃上皮组织、60 例胃腺癌组织中 HDGF 的表达, 同时检测血管内皮生长因子(VEGF)在胃腺癌组织中的表达。采用 $\chi^2$ 检验比较 HGDF 在两种组织中的表达, 分析 HDGF 表达与胃腺癌临床病理学因素和 VEGF 的关系。**结果** 胃腺癌组织中 HDGF 的阳性表达率为 68.3%, 正常胃上皮组织中 HDGF 的阳性表达率为 25.0%, 两者差异有统计学意义( $\chi^2=15.752, P<0.01$ ); HDGF 表达与胃腺癌组织的浸润程度( $\chi^2=6.459, P=0.011$ )和淋巴结转移有关( $\chi^2=5.844, P=0.016$ ); HDGF 与 VEGF 表达呈正相关。**结论** HDGF 在胃腺癌组织中的表达显著高于在正常胃上皮组织中的表达, 与胃腺癌浸润程度和淋巴结转移密切相关, 与 VEGF 表达呈正相关, 提示 HDGF 在胃腺癌的发生、发展及转移中具有重要作用。

【关键词】胃腺癌; HDGF; VEGF

【中图分类号】R735 【文献标识码】A 【文章编号】1003—6350(2014)07—0953—03

**Expression and significance of hepatoma-derived growth factor in gastric adenocarcinoma.** LI Hui-fen, MA Gui-fang, SONG Xiang-he. Yancheng Institute of Health Sciences, Yancheng 224001, Jiangsu, CHINA

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of on occurrence, development, and metastasis of gastric adenocarcinoma. **Methods** Based on immunohistochemical S-P method, the expression of HDGF in gastric adenocarcinoma tissues of 60 cases and normal gastric epithelial tissues of 32 cases were detected, as with vascular endothelial growth factor(VEGF) in gastric adenocarcinoma tissues. Compared the expression of HDGF in both tissues and analyzed the relationship between HDGF and clinical pathology, VEGF. **Results** The positive rate of HDGF in gastric adenocarcinoma tissues was 68.3%, significantly higher than 25.0% in normal gastric epithelial tissues ( $\chi^2=15.752, P<0.01$ ). The expression of HDGF was significantly correlated to immersion degree ( $\chi^2=6.459, P=0.011$ ) and lymph node metastasis ( $\chi^2=5.844, P=0.016$ ). HDGF was positively correlated to VEGF. **Conclusion** HDGF in gastric adenocarcinoma tissues was greater than normal gastric epithelial tissues, as well as it was closely correlated to immersion degree, lymph

通讯作者: 李惠芬。E-mail: 437835649@qq.com

- 
- pathological parameters [J]. Br J Cancer, 2007, 96(3): 477-84.
- [7] Cilloni D, Messa F, Rosso V, et al. Increase sensitivity to chemotherapeutic agents and cytoplasmatic interaction between NPM leukemic mutant and NF-kappaB in AML carrying NPM1 mutations [J]. Leukemia, 2008, 22(6): 1234-1240.
- [8] Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ, et al. Absence of nucleophosmin 1 (NPM1) gene mutations in common solid cancers [J]. APMIS, 2007, 115(4): 341-346.
- [9] Wong JC, Hasan MR, Rahman M, et al. Nucleophosmin 1, upregulated in adenomas and cancers of the colon, inhibits p53-mediated cellular senescence [J]. Int J Cancer, 2013, 133(7): 1567-77.
- [10] Feuerstein N, Chan PK, Mond JJ. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals [J]. J Biol Chem, 1988, 263 (22): 10608-10612.
- [11] Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biological and clinical features [J]. Blood, 2007, 109(3): 874-885.
- [12] Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the Functional Domains of Nucleolar Protein B23 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(32): 24451-24457.
- [13] Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype [J]. Blood, 2005, 106(4): 1419-1422.
- [14] Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia [J]. Blood, 2006, 108(6): 1999-2005.
- [15] Quentmeier H, Martelli MP, Dirks WG, et al. Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin [J]. Leukemia, 2005, 19(10): 1760-1767.
- [16] Nakagawa M, Kameoka Y, Suzuki R. Nucleophosmin in acute myelogenous leukemia [J]. N Engl J Med, 2005, 352: 1819-1820.
- [17] Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, et al. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(26): 9964-9969.

(收稿日期: 2013-12-30)