

胃癌细胞nm23H1基因表达与体内外侵袭力的关系

孙秀菊,孙开来,付浩,王舒宝,陈峻青

孙秀菊,孙开来,付浩,中国医科大学分子遗传教研室 辽宁省沈阳市 110001
王舒宝,陈峻青,中国医科大学第一临床学院 肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001
孙秀菊,女,1965-09-19生,辽宁省大连市人,汉族,1999年于中国医科大学获
博士学位.现为副教授,主要从事胃癌分子机制的研究.
国家“973”项目(国家重点基础研究发展规划项目)“恶性肿瘤发生与
发展的基础性研究”子项目课题, No.G1998051203
项目负责人:孙开来,110001,辽宁省沈阳市,沈阳中国医科大学分子遗传教
研室. klsun@vip.sina.com
电话:024-23265842 传真:024-23265842
收稿日期:2002-06-01 接受日期:2002-07-26

Relationship between expression of nm23H1 gene and *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cells

Xiu -Ju Sun,Kai -Lai Sun,Hao Fu,Shu -Bao Wang,Jun- Qing Chen

Xiu -Ju Sun , Kai -Lai Sun, HaoFu,Department of Molecular Genetics,
China Medical University ,Shenyang 110001,Liaoning Province ,China
Shu -Bao Wang, Jun- Qing Chen,Oncology Department,The first Clinical
College, China Medical University ,Shenyang 110001,Liaoning Province ,China
Supported by the National “973” Project (National key program on
basic research)No.G19980501203
Correspondence to: Kai -Lai Sun,Department of Molecular Genetics,
China Medical University ,Shenyang 110001,Liaoning Province,China.
klsun@vip.sina.com
Received:2002-06-01 Accepted:2002-07-26

Abstract

AIM:To explore the relationship between the expression of nm23H1 gene and the *in vivo* and *in vitro*.invasive capacity of gastric cancer cells

METHODS:The invasive capacity of gastric cancer cell *in vitro* was determined by Boyden chamber method. And the expressions of nm23H1 in gene and protein level were measured by Northern Blot, RT-PCR and immunohistochemical method in gastric cancer cell lines, respectively.

RESULTS:The order of the invasive capacity of gastric cancer cell lines were: MKN45, being the highest (33.1 ± 5.23 , $P < 0.01$); BGC823 (15.8 ± 2.7) and MKN1 (14.1 ± 4.5), the moderate (there was no significant difference between them, $P > 0.05$), and GT3TKB(6.3 ± 2.5), the lowest ($P < 0.01$). The expression of nm23H1 gene was negatively correlated with the *in vivo* invasive capacity of gastric cancer cell lines, and also negatively correlated with the *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cell lines of MKN45, BGC823 and GT3TKB. But there was no relationship between the expression of nm23H1 gene and the invasive capacity of MKN1 *in vitro*.

CONCLUSION: The expression of nm23H1 gene is of great significance in evaluating the *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cell lines.

Sun XJ,Sun KL,Fu H,Wang SB,Chen JQ. Relationship between expression of nm23H1 gene and *in vivo* and *in vitro* invasive capacity of gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(1):10-13

摘要

目的:探讨 nm23H1 基因与胃癌细胞体内外侵袭力的关系.

方法:采用 Boyden 小室法测定四种胃癌细胞系 MKN1、MKN45、GT3TKB、BGC823 的体外侵袭力, Northern 印记杂交,RT-PCR 及免疫组化技术检测胃癌组织、四种胃癌细胞系的 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平.

结果:胃癌细胞体外侵袭力高低的顺序依次为MKN45最高 (33.1 ± 5.2 ,与其他三种细胞系相比 $P < 0.01$); BGC823 (15.8 ± 2.7), MKN1 (14.1 ± 4.5) 次之(二者无显著差异, $P > 0.05$), GT3TKB 最低(6.3 ± 2.5 ,与其他三种细胞系相比 $P < 0.01$).nm23H1 基因表达与胃癌细胞体内侵袭能力呈反比关系;nm23H1 基因表达与 MKN45 ,BGC823, GT3TKB 细胞体外侵袭力也呈反比关系,但与 MKN1 细胞体外侵袭力无明显关系.

结论: nm23H1表达在评价胃癌细胞体内外侵袭力方面具有重要价值.

孙秀菊,孙开来,付浩,王舒宝,陈峻青.胃癌细胞 nm23H1 基因表达与体内外侵袭力的关系.世界华人消化杂志 2003;11(1):10-13
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/10.htm>

0 引言

肿瘤侵袭、转移是目前研究的一个热点问题^[1-6].由于胃癌严重威胁人类健康,近年来对胃癌侵袭、转移分子机制的研究日趋深入^[7-13],作为一种重要的肿瘤转移抑制基因,nm23 基因与胃癌关系的研究报道较多,但目前关于 nm23H1 基因与胃癌细胞体内外侵袭力关系的研究,国内外报道甚少.nm23H1 基因是 nm23 基因家族的重要成员,将该基因转染肝癌细胞可使其转移能力明显降低^[14,15].他影响细胞的运动、黏附等特性,调节肿瘤细胞侵袭转移能力.我们采用 Boyden 小室法测定不同胃癌细胞的体外侵袭力,分析 nm23H1 表达与胃癌细胞体内外侵袭力的关系,为认识胃癌侵袭转移的分子机制提供有价值的实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集中国医科大学第一临床学院肿瘤科 1997-01/1998-04 胃癌手术切除标本,其中新鲜组织标本 24 例,术中取材,置液氮中速冻 10 min,然后 -70 冰箱中保存,用于 mRNA 检测;石蜡标本(胃癌组织 62 例)连续 5 μ m 切片每例 3 张,分别进行 HE 染色及免疫组化

染色. 切除标本均进行病理学系统检查. 胃癌细胞系 MKN1, MKN45, GT3TKB 由日本理化研究所横山和尚教授惠赠, BGC823 细胞由中国医科大学肿瘤所提供; NIH3T3 细胞由中国医科大学细胞生物实验室提供. MKN45 及 BGC823 细胞均来源于低分化腺癌, GT3TKB 来自黏液细胞癌, MKN1 具有向腺瘤和鳞状上皮细胞双向分化的潜能. 微孔滤膜(8 μm)、基底膜胶和 Boyden Chamber 均由中国医学科学院肿瘤所免疫室罗利群老师惠赠.

1.2 方法 MKN1, MKN45, BGC823 细胞培养基为 RPMI1640, GT3TKB 及 NIH3T3 细胞培养基为 DMEM, 二者均含青链霉素及 100 ml/L 小牛血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温密闭式 CO_2 培养箱培养. 侵袭实验参照 Albin et al (Cancer Res, 1987; 47:3239) 方法, 计数侵入滤膜的细胞数. 共计数中央和四周各 5 个视野, 每种细胞重复三次实验, 取平均值 ($n=30$). 将生长旺盛的胃癌细胞用胰酶消化, 制成密度为 $1 \times 10^6/\text{L}$ 的悬液, 接种于直径 10 cm 培养皿中, 皿内预置盖玻片, 常规培养 72 h, 吸去培养液, $1 \times \text{PBS}$ 清洗细胞, 加 40 g/L 甲醛固定, 待免疫组化染色.

1.2.1 Northern- 印记杂交 根据 GenBank nm23H1 基因序列, 在 nm23H1 基因 3' 非翻译区 (与 nm23H2 非同源区) 设计引物, 采用 PCR 方法合成探针. 引物序列为 F: 5' G C A G A C C A C A T T G C T T T T C A 3'; R: 5' C A G G G A G A A C T C A C A G C T C C 3'; 片段长度为 134 bp. 采用 GIBCOBRL 公司总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 提取总 RNA, 在含有甲醛的琼脂糖凝胶上进行 RNA 电泳, 然后将 RNA 转移到尼龙膜上. 采用 Promega 公司随机引物试剂盒进行探针标记. 杂交条件参照《分子克隆》. 采用 Luzex-F 半自动图像分析仪定量分析杂交信号强度, nm23H1 灰度值指数 = nm23H1 灰度值 / β -actin 灰度值, nm23H1 mRNA 含量与其灰度值指数呈反比关系.

1.2.2 RT-PCR 方法 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA (按试剂盒说明书进行), 然后进行 PCR 扩增. PCR 反应体积为 25 μL . nm23H1 引物序列: F: 5' G T G A A A G C A A T G T G G T 3' R: 5' T T G C C A T G G T C T G G G A G 3' 产物长度 267 bp. β -actin 引物序列: F: 5' G T G G G C G C C C C A G G C A C C A 3' R: 5' C T C C T T A A T G T C A C G C A C G A T T T C 3' 产物长度 513 bp. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后, 以 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s 的顺序循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. PCR 产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 1 h, 凝胶置 GDS 8 000 凝胶自动成像仪中, 采用 Gels Work-ID 软件检测各条带强度, nm23H1 指数 = nm23H1 值 / β -actin 值. nm23H1 指数与其 mRNA 表达呈正比关系.

1.2.3 免疫组化染色法 鼠抗人 nm23H1 单克隆抗体 NM301 (Santa cruz 产品). 过氧化酶标记的链霉卵白素 (streptavidin peroxidase, SP) 免疫组化染色试剂盒 (北京

中山生物技术公司产品). nm23H1 蛋白采用 SP 法染色 (AEC 显色), 染色步骤按试剂盒说明书进行, 以 PBS 代替一抗作阴性对照. 免疫组化结果判定: 细胞内出现桔红色颗粒为 nm23H1 阳性细胞. 组织标本中 nm23H1 蛋白表达参照 Shimizu et al (Hum Pathol, 1990; 21:607) 方法进行评定和积分, 2 分及 2 分以下为阴性, 3 分及 3 分以上为阳性. 胃癌细胞 nm23H1 蛋白表达水平采用 Luzex-F 半自动图像分析仪定量分析, 每种细胞取 2 张切片, 每张切片各测 5 个相同单位面积的灰度值, nm23H1 蛋白含量与其灰度值呈反比关系.

统计学处理 采用 t 检验、 χ^2 检验. $P < 0.05$ 具有统计学意义.

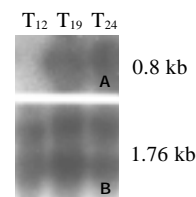
2 结果

2.1 nm23H1 基因表达与胃癌浸润深度的关系 RT-PCR 及免疫组织化学分析结果显示, 浸透浆膜的胃癌组织中 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平显著低于未透浆膜者, 表明 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平与胃癌浸润深度有关 (表 1). 为进一步验证 RT-PCR 研究结果, 我们又采用 Northern- 印记杂交检测了 8 例胃癌中 nm23H1 mRNA 表达水平, 结果表明, 浸透浆膜的胃癌中 nm23H1 mRNA 杂交信号灰度值指数 (1.74 ± 0.22) 显著高于未透浆膜者 (0.84 ± 0.19 , $P < 0.05$), 与 RT-PCR 结果一致 (图 1).

表 1 nm23H1 mRNA 及蛋白表达与胃癌浸润深度的关系

浸润深度	<i>n</i>	nm23H1 mRNA 指数 ($\bar{x} \pm s$)	<i>n</i>	<i>n</i>	nm23H1 蛋白 阳性率 (%)
未透浆膜	7	0.49 ± 0.16^a	28	21	75.0 ^b
浸透浆膜	17	0.27 ± 0.23	34	7	20.6

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 浸透浆膜.



a: nm23H1 mRNA; b: β -actin mRNA

T1: 浸透浆膜; T2, T3: 未浸透浆膜

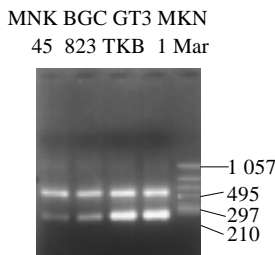
图 1 Northern- 印记杂交检测胃癌组织中 nm23H1 mRNA 表达.

2.2 胃癌细胞系体外侵袭力的测定 体外侵袭力以侵入滤膜的细胞数来判定, 在所检测的四种胃癌细胞系中, MKN45 侵袭力最高, MKN1 和 BGC823 的侵袭力 (侵入滤膜细胞数) 均低于 MKN45 (MKN1 14.1 ± 4.5 vs MKN45 33.1 ± 5.2 ; BGC823 15.8 ± 2.7 vs MKN 33.1 ± 5.2 , $P < 0.01$), 但 MKN1 和 BGC823 的侵袭力无显著差异 ($P > 0.05$), GT3TKB (6.3 ± 2.5) 侵袭力又低于 MKN1 和 BGC823 ($P < 0.01$), 其侵袭力最低.

2.3 nm23H1 mRNA 和蛋白表达与胃癌细胞体外侵袭力的关系 四种胃癌细胞系 nm23H1mRNA 及蛋白质水平检测的结果一致表明, MKN45 显著低于 BGC823 ($P < 0.02$), BGC823 又低于 GT3TKB ($P < 0.005$), 而 MKN1 与 GT3TKB 的 nm23H1 mRNA 及蛋白质表达无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2 及图 2-4); 侵袭力高低的顺序为: MKN45 最高, BGC823、MKN1 次之, GT3TKB 最低. 可见 MKN45、BGC823、GT3TKB nm23H1 基因表达与其体外侵袭力呈反比关系, 但相比之下 MKN1 nm23H1 基因表达与其体外侵袭力无明显关系.

表 2 胃癌细胞 nm23H1 mRNA ($n = 5$) 及蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

细胞系	nm23H1 指数	nm23H1 灰度值
MKN45	0.28 ± 0.05	143.9 ± 3.5
BGC823	0.49 ± 0.07	104.4 ± 1.2
GT3TKB	1.06 ± 0.10	91.8 ± 3.3
MKN1	1.16 ± 0.15	91.4 ± 3.1



nm23H1 :267bp; 内对照 β -actin:513 bp M: DNA Marker
图 2 胃癌细胞 nm23H1 mRNA RT-PCR 检测结果.

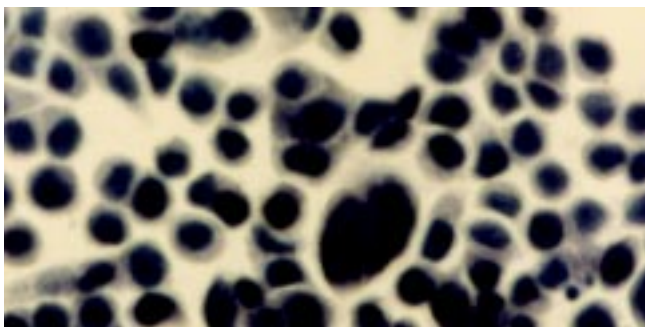


图 3 胃癌细胞 MKN45 nm23H1 蛋白表达 (S-P × 400)

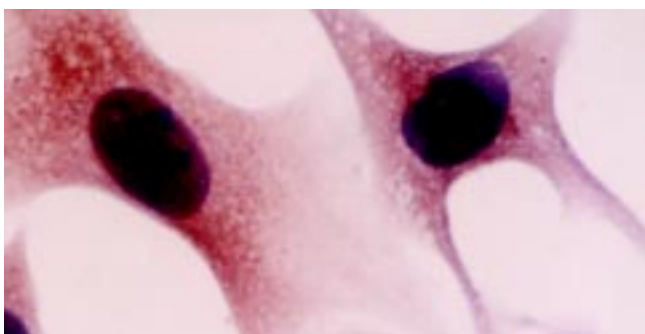


图 4 胃癌细胞 GT3TKB nm23H1 蛋白表达 (S-P × 400)

3 讨论

作为一种转移抑制基因, nm23 倍受关注. 许多研究表明, nm23 基因表达水平与乳腺癌、结肠直肠癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、喉鳞状细胞癌、鼻咽癌、甲状腺癌等肿瘤侵袭转移呈显著负相关^[16-24], 且 nm23 基因低表达患者的生存期短、预后不良. nm23 基因与胃癌的研究报道不一, 有的研究表明胃癌中 nm23 低表达与胃癌肝转移、淋巴结转移及胃癌的浸润深度呈负相关^[25,26]; 另一些学者报道认为胃癌组织 nm23 基因表达与胃癌侵袭、淋巴结转移及血行转移呈正相关^[27-31]. Lee et al^[32,33] 报道胃癌组织 nm23 基因表达与胃癌预后无明显关系, 可见 nm23 与胃癌关系的研究结果不一. 产生这些差异的一个重要原因, 就是其检测方法不能有效区分 nm23H1 与 nm23H2. 有的研究采用 nm23 多克隆抗体, 他与 nm23H1、nm23H2 蛋白均可结合, 有的研究则采用 nm23H1 单克隆抗体, 只与 nm23H1 反应, 因此他们检测的分子有所不同; 由于 nm23H1、nm23H2 mRNA 具有很高的同源性, 因此如应用 nm23H1 全长 cDNA 探针进行 Northern blot 检测 mRNA 表达, 则很难特异检测 nm23H1 mRNA 表达水平. 因此有必要采用针对 nm23H1、nm23H2 特异的抗体或探针分别研究他们的表达与胃癌的关系, 将会对 nm23 基因与胃癌的关系有更准确的认识. 我们采用 nm23H1 特异的方法, 系统的研究 nm23H1 表达与胃癌细胞体内外侵袭力的关系, 而这方面的研究目前尚未见报道.

本研究中 Northern blot 所用探针位于 nm23H1 的 3' 非翻译区内, 此序列与 nm23H2 同源性很低, 可与 nm23H1 特异性结合; RT-PCR 引物亦可特异扩增 nm23H1, 免疫组化采用的抗体为 nm23H1 特异性单克隆抗体, 与 nm23H2 无交叉反应, 可特异性检测 nm23H1 基因的表达. 我们同时从 mRNA 和蛋白质二个水平检测胃癌有关组织标本 nm23H1 的表达, 结合临床资料进行分析表明, 胃癌 nm23H1 mRNA 及蛋白水平与胃癌浸润深度呈负相关.

肿瘤细胞侵袭基底膜是发生转移的关键步骤, 测定肿瘤细胞侵袭人工基底膜的能力, 可以间接反映肿瘤细胞体内侵袭转移能力, 具有重要意义. 在了解 nm23H1 表达与胃癌细胞体内侵袭力关系的基础上, 采用 Boyden 小室法测定了四种胃癌细胞系的体外侵袭力, 并观察了 nm23H1 表达与胃癌细胞体外侵袭力的关系. 本研究采用 RT-PCR 及免疫组化技术分别检测了四种胃癌细胞系 nm23H1 mRNA 及蛋白表达水平, 结果表明 MKN45、BGC823、GT3TKB nm23H1 基因表达与体外侵袭力呈明显负相关. 可见 nm23H1 基因可抑制胃癌细胞体内外侵袭能力. 关于 nm23H1 基因抑制肿瘤细胞侵袭转移的机制, 已为其他学者证实. 将 nm23H1 基因转染口腔鳞状细胞癌细胞系后, 细胞运动能力显著降低, 但转染前后其基质金属蛋白水解酶水平无明显

差异; 甲基化抑制剂抑制 nm23H1 基因启动子 CpG 岛甲基化, 使乳腺癌细胞中 nm23H1 表达增高, 细胞运动能力显著降低, 可见 nm23H1 通过抑制细胞运动能力而降低其侵袭转移能力^[34,35]。近期对 nm23 基因的研究不断深入, 研究表明 nm23H1 负向调控转移相关基因 Tiam1, 抑制体内 Rac1 的激活而发挥抑制侵袭转移的作用^[36]; EB 病毒核蛋白 EBNA-3C 逆转 nm23H1 蛋白抑制淋巴瘤细胞和乳腺癌细胞运动的能力^[37]; 雌激素与其受体相互作用后可激活 nm23H1 基因转录而抑制肿瘤转移^[38]。可见 nm23H1 基因与其他基因之间相互作用而发挥其抑制转移的功能。

本实验还发现胃癌细胞 MKN1 中 nm23H1 基因表达与其体外侵袭力不呈明显相关。分析原因我们认为与其细胞本身的生物学特性有关, 因为他具有向腺瘤和鳞状上皮细胞双向分化的潜能, 因而其侵袭转移的调控机制更为复杂。另外肿瘤细胞侵袭转移本身受到多种基因的调控, 如与其他转移相关基因结合分析, 将会更客观地评价肿瘤细胞的侵袭转移能力。总之, 我们的研究证明 nm23H1 基因表达在评价胃癌细胞体内外侵袭力方面具有重要价值。

4 参考文献

- 1 郑建勇, 李开宗, 窦科峰, 李江. 肝细胞癌 p53 及 nm23H1 mRNA 表达的意义. 世界华人消化杂志 1999;7:40-42
- 2 Xiong B, Yuan HY, Hu MB, Zhang F, Wei ZZ, Gong LL, Yang GL. Transforming growth factor- α 1 in invasion and metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:674-678
- 3 Xie Q, Liu KD, Hu MY, Zhou K. SF/HGF-c-Met autocrine and paracrine promote metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:816-820
- 4 Hou L, Li Y, Jia YH, Wang B, Xin Y, Ling MY, Lü S. Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:532-536
- 5 Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
- 6 Jiang YF, Yang ZH, Hu JQ. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol* 2000;6:61-65
- 7 夏传生, 赵行远, 吴建平, 刘运芳, 毛永荣. nm23-H1 基因与 P53 蛋白在结肠肿瘤中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):22
- 8 于吉人, 郑树森, 沈岩, 沈倩云. 胃癌淋巴结微转移的临床意义. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):2
- 9 辛彦, 赵凤凯, 张素敏, 吴东瑛, 王艳萍, 徐蕾. CD44v6 基因编码蛋白表达与胃癌转移和预后的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:210-214
- 10 Xu L, Zhang SM, Wang YP, Zhao FK, Wu DY, Xin Y. Relationship between DNA ploidy, expression of ki-67 antigen and gastric cancer metastasis. *World J Gastroenterol* 1999;5:10-11
- 11 张林, 付红梅, 金树珍, 黄润, 周成刚. P53 过度表达及细胞外基质与胃癌分化、浸润和转移的关系. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):74
- 12 夏加增, 朱正纲, 刘炳亚, 燕敏, 尹浩然. 免疫组化检测胃癌淋巴结微转移的意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1113-1116
- 13 王承党, 陈玉丽, 吴婷, 刘豫瑞. 胃癌组织中生长抑素型受体基因低表达与淋巴结转移. 世界华人消化杂志 1999;7:864-866
- 14 Liu F, Zhang Y, Zhang XY, Chen HL. Transfection of the nm23-H1 gene into human hepatocarcinoma cell line inhibits the expression of sialyl Lewis X, alpha1,3 fucosyltransferase VII, and metastatic potential. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:189-196
- 15 Jin S, Pan X, Wang Y. Effect of nm23H1 on proliferation, tumor formation and metastasis of hepatocarcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:381-384
- 16 Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Prognostic significance of CD44v6 and nm23 protein immunorexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol* 2002;53:17-24

- 17 Liu H, Mao H, Fu X. Expression of nm23 in breast cancer: correlation with distant metastasis and prognosis. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:224-227
- 18 Huang G, Song Y, He G. mRNA expression and mutation of MTA1 and nm23H1 genes in ovarian carcinoma in relation to lymph node metastasis. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:31-34
- 19 Terasaki-Fukuzawa Y, Kijima H, Suto A, Takeshita T, Iezumi K, Sato S, Yoshida H, Sato T, Shimbori M, Shiina Y. Decreased nm23 expression, but not Ki-67 labeling index, is significantly correlated with lymph node metastasis of breast invasive ductal carcinoma. *Int J Mol Med* 2002;9:25-29
- 20 Huang GW, Mo WN, Kuang GQ, Nong HT, Wei MY, Sunagawa M, Kosugi T. Expression of p16, nm23-H1, E-cadherin, and CD44 gene products and their significance in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2001;111:1465-1471
- 21 Guo C, Wei L, Fu Q. The expression of nm23-H1 genes with clinical prognosis in endometrial carcinoma. *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 1999;34:423-425
- 22 Ohta Y, Nozaki Z, Nozawa H, Kamesui T, Tsunozuka Y, Oda M, Watanabe G. The predictive value of vascular endothelial growth factor and nm23 for the diagnosis of occult metastasis in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:361-366
- 23 Dome B, Somlai B, Timar J. The loss of Nm23 protein in malignant melanoma predicts lymphatic spread without affecting survival. *Anticancer Res* 2000;20:3971-3974
- 24 Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Tallada N, Galofre P, Gemar E, Mesa J, Simo R. nm23-H1 immunoreactivity as a prognostic factor in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3975-3980
- 25 Hsu NY, Chow KC, Chen WJ, Lin CC, Chou FF, Chen CL. Expression of nm23 in the primary tumor and the metastatic regional lymph nodes of patients with gastric cardiac cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1752-1757
- 26 倪灿荣. 胃癌 GST- α , P-gp, Topo II 和 nm23H1 表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:897-901
- 27 Kumar Dhar D, Kubota H, Tabara H, Kotoh T, Monden N, Igarashi M, Kohno H, Nagasue N. nm23 in the primary and metastatic sites of gastric carcinoma. Relation to AFP-producing carcinoma. *Oncology* 1999;56:122-128
- 28 Nesi G, Palli D, Pernice LM, Saieva C, Paglierani M, Kroning KC, Catarzi S, Rubio CA, Amorosi A. Expression of nm23 gene in gastric cancer is associated with a poor 5-year survival. *Anticancer Res* 2001;21:3643-3649
- 29 Wang CS, Lin KH, Hsu YC. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* 2002;175:121-127
- 30 Iizuka N, Tangoku A, Hazama S, Yoshino S, Mori N, Oka M. Nm23-H1 gene as a molecular switch between the free-floating and adherent states of gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2001;174:65-71
- 31 Wang XL, Wu GX, Zhang MD, Guo M, Zhang H, Sun XF. A favorable impact of preoperative FPLC chemotherapy on patients with gastric cardiac cancer. *Oncol Rep* 2000;7:241-244
- 32 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- 33 Yoo CH, Noh SH, Kim H, Lee HY, Min JS. Prognostic significance of CD44 and nm23 expression in patients with stage II and stage IIIA gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 1999;71:22-28
- 34 Khan MH, Yasuda M, Higashino F, Haque S, Kohgo T, Nakamura M, Shindoh M. nm23-H1 suppresses invasion of oral squamous cell carcinoma-derived cell lines without modifying matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression. *Am J Pathol* 2001;158:1785-1791
- 35 Hartsough MT, Clare SE, Mair M, Elkahoun AG, Sgroi D, Osborne CK, Clark G, Steeg PS. Elevation of breast carcinoma Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition. *Cancer Res* 2001;61:2320-2327
- 36 Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S. Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:4385-4390
- 37 Subramanian C, Cotter MA 2nd, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:350-355
- 38 Lin KH, Wang WJ, Wu YH, Cheng SY. Activation of antimetastatic Nm23-H1 gene expression by estrogen and its alpha-receptor. *Endocrinology* 2002;143:467-475