

NGX6 基因在多种常见癌组织中的原位表达及其临床意义的研究*

范松青^{1, 2)**} 张文玲^{1)**} 周 鸣¹⁾ 彭淑平¹⁾ 李桂源^{1)***}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; (²⁾中南大学湘雅二医院病理科, 长沙 410011)

摘要 研究新的候选抑瘤基因 NGX6 在多种常见癌组织中的 mRNA 原位表达谱, 分析 NGX6 mRNA 阳性率与肿瘤临床病理特征的关系并评估其作为肿瘤转移、预后预测分子标志物的有效性. 利用已制作的多肿瘤组织和鼻咽癌组织微阵列, 原位杂交检测 NGX6 mRNA 在多种常见癌组织中的阳性率. 结果显示, NGX6 mRNA 在鼻咽癌、肺癌、胃癌和结、直肠癌中的阳性率低于其对应的正常组织($P < 0.05$, $P < 0.01$). 淋巴结转移性鼻咽癌、肺癌、结、直肠癌和喉癌组织中的 NGX6 mRNA 阳性率显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$). NGX6 mRNA 阳性率与鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌临床分期有关, 临床 II 期、III 期或 IV 期癌组织 NGX6 mRNA 阳性率明显低于其相应的临床 I 期癌($P < 0.05$, $P < 0.01$). 研究表明, 鼻咽癌、肺癌、胃癌和结、直肠癌中存在低水平的 NGX6 mRNA, NGX6 mRNA 可作为鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌侵袭、转移和临床进展预测的分子标志.

关键词 组织微阵列, 原位杂交, NGX6 基因

学科分类号 R730.2

随着新发现的肿瘤相关基因日益增多, 迫切需要新技术能大规模、高通量地研究这些新基因在肿瘤不同发展阶段, 不同分化程度和其相应正常组织中的生物学功能, 从中筛选肿瘤新的分子标志物. 组织微阵列解决了在大标本量中研究基因表型这一难题^[1~4]. NGX6 是中南大学肿瘤研究所克隆的候选抑瘤基因(GenBank 登录号: AF188239), 前期研究证实 NGX6 基因在结、直肠癌及鼻咽癌中表达降低并具有抑瘤功能^[5~8]. 本研究利用组织微阵列结合原位杂交技术检测 NGX6 mRNA 在多种常

见癌组织中的原位表达水平, 并分析其表达与肿瘤临床病理特征的关系, 评估其是否可作为新的肿瘤侵袭、转移分子标志.

1 材料与方法

1.1 组织标本和临床资料

所有标本均来源于中南大学湘雅医院和湘雅二医院. 标本经 4% 多聚甲醛(0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 配制) 4℃ 固定过夜(16~18 h), 常规脱水、透明和石蜡包埋切片. 共收集组织标本 661 例(表 1),

Table 1 The specimens contained in the tissue microarray sections

	Nasopharynx	Lung	Larynx	Stomach	Colon and Recta	Breast
Cancer tissue(<i>n</i>)	148	89	27	30	61	31
No-cancer tissues(<i>n</i>)	164	35	20	11	32	13
Total(<i>n</i>)	312	124	47	41	93	44

* 国家重大科学研究计划(2006CB910502, 2006CB910504), 国家自然科学基金重大资助项目(30770825)和湖南省自然科学基金资助项目(06JJ2013, 08JJ3051).

** 共同第一作者. *** 通讯联系人. Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2008-02-19, 接受日期: 2008-05-19

同时收集各种癌组织的临床病理资料. 按 WHO TNM 分期标准进行 386 例癌的临床分期, 其中临床 I 期 111 例、临床 II 期 146 例、临床 III 期或 IV 期 129 例. 经 CT 扫描或淋巴清扫标本的病理诊断, 证实有无淋巴结转移的病例中, 228 例肿瘤有淋巴结转移, 无淋巴结转移肿瘤共 158 例.

1.2 组织微阵列切片

利用自制的组织微阵列工具和相关技术(专利号: ZL200410022818.X)制作包含人类各种常见癌和鼻咽癌两种类型组织微阵列受体蜡块和切片^[9], 每一标本至少含 2 个组织点. 661 例标本共制作 4 个组织微阵列受体蜡块, 其中 2 个是各含 448 个组织点阵的多肿瘤组织微阵列, 另 2 个鼻咽癌组织微阵列受体蜡块各含 390 个组织点阵. 组织微阵列受体蜡块切片, H&E 染色, 光镜下质量检测证实每一标本均无所有组织点缺失现象.

1.3 寡核苷酸探针的设计与标记

<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi/> 网址 Primer3 软件的探针设计功能区, 以目的基因 mRNA 互补序列为模板, 在其阅读框架内设计寡核苷酸探针. 这些探针参数设定基本一致, GC 含量为 40%~60%, t_m 为 65~70℃. 根据基因序列长度, 以 200 或 300 个碱基的间隔, 在同一条件下设计 5~6 条 30 个碱基长度的寡核苷酸探针. 网上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) 对所设计的探针与其相应的互补链进行精确匹配, 筛选出杂交参数最佳, 特异性高的 3 条寡核苷酸探针(表 2). 由上海博亚生物技术公司(<http://www.bioasia.org>)采用化学合成方法合成这些寡核苷酸探针, 所有合成的探针 5'端为磷酸基团, 3'端为羟基. 利用 3-tailing Dig Oligonucleotide (2nd Generation) 试剂盒(Roche 公司)进行寡核苷酸探针标记、纯化及质量检测.

Table 2 The Oligonucleotide probes of NGX6 and GAPDH gene

Gene	Sequence of probe	GC/%	t_m /℃	Site	GenBank number
NGX6-1	gaccggaatacacagtcacactttggtct	46.7	62.4	380~409	AF188239
NGX6-2	gtacagataattgtgtgtgcgcagcagctt	46.7	62.4	1 644~1 673	
NGX6-3	agggttagactgcagcttcagcacataac	50	63.7	1 825~1 854	
GAPDH-1	ccactttaccagagttaaaagcagccctgg	50.00	71.13	108~137	BC004109
GAPDH-2	cagtagaggcaggatgatgttctggagag	53.33	71.30	657~686	
GAPDH-3	gtcagaggagaccacctggctcagtgtta	56.67	72.85	878~907	

1.4 原位杂交检测 NGX6 基因在组织微阵列中的 mRNA 表达

预杂交液及抗地高辛-辣根过氧化物酶复合物检测试剂盒(Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments)购于 Roche 公司, 增强原位表达信号的 TSA 放大系统(TSA™ Biotin System, NEL700 Kit)为 Perkin Elmer 公司产品, AEC 染色试剂盒由北京中杉金桥公司提供.

实验方法参照试剂盒说明书并稍做修改: 组织微阵列切片脱蜡, PBS/DEPC 水洗后, 经 10 mg/L 胃蛋白酶 K 37℃ 消化 20 min, PBS(0.1 mol/L PBS+ 2 g/L 谷氨酸)洗涤 1 min 中止反应, 0.2 mol/L HCl 于 37℃ 反应 20~30 min 增加组织通透性, 4%多聚甲醛 (0.1 mol/L PBS 溶解) 室温条件下固定 10 min, 0.1 mol/L TEA 缓冲液 I (0.1 mol/L 三乙醇胺与乙酸酐混合液, 浓度 0.25%(体积比))和 TEA 缓冲液 II (0.1 mol/L 三乙醇胺与乙酸酐混合液, 浓

度 0.5%(体积比))增加组织阳性杂交强度的杂交前处理. 37℃ 湿盒中预杂交 2 h(预杂交液成分: 2×SSC, 10% Dextran sulphate, 1×Denhardt's 溶液, 50 mmol/L Phosphate 缓冲液(pH 7.0), 50 mmol/L DTT 250 μl, 100 mg/L poly A, 5 mg/L poly dA, 250 mg/L yeast t-RNA, 500 mg/L ssDNA, 47% Deionized formamide), 杂交反应: 每一切片加入 250 μl 杂交液(即预杂交液中加入相应的探针, 每一探针 500 μg/L 浓度配制成探针杂交液)并用石蜡膜覆盖, 于 37℃ 杂交过夜(18 h 以上). 杂交后用 2×SSC、1×SSC、0.25×SSC 洗脱, 杂交后采用 Anti-Digoxigenin-POD 检测地高辛探针与 mRNA 结合复合物, TSA 放大系统增强原位杂交反应的阳性信号, AEC 显色, 显微镜下控制显色反应, 苏木素复染, 水性封片剂盖片.

阳性对照和阴性对照: 看家基因 GAPDH 的寡核苷酸探针作为每次杂交的阳性对照, 不加探针的

预杂交液作每次实验阴性对照。

1.5 结果判断

光学显微镜下对 NGX6 mRNA 在组织微阵列切片中每一组织点阵进行综合观察判断。判断标准参考文献并略做修改^[10]：a. 根据阳性染色强度判断，细胞无染色为 0 分，细胞呈浅红色记 1 分，细胞染成红色并无背景染色，或深红色、背景呈浅红色，为中等阳性，记 2 分，细胞呈深红色，无背景着色，为强阳性，记 3 分。b. 根据阳性细胞数计分，无阳性细胞计 0 分；阳性细胞 $\leq 25\%$ 计 1 分， $25\% < \text{阳性细胞数} < 50\%$ 计 2 分，阳性细胞数 50% 以上，为强阳性，计 3 分。两者最终计分结果的乘积，0 分为阴性，1, 2, 3, 4, 6, 9 分为阳性。

1.6 统计学分析

SPSS12.0 软件采用 χ^2 检验中的 Fisher's exact test(Fisher 精确概率检验)分析 NGX6 基因在肿瘤组织、非肿瘤性正常组织的 NGX6 mRNA 阳性率，NGX6 mRNA 与肿瘤转移状况和临床分期的相关性。

2 结 果

2.1 NGX6 mRNA 在常见癌组织中的原位表达

NGX6 mRNA 阳性信号主要位于癌细胞或上皮细胞细胞浆，少数病例的细胞核和浆均有阳性表达(图 1)。NGX6 mRNA 在鼻咽癌、肺癌、胃癌、结、直肠癌和乳腺癌及其相应正常组织中的阳性结果见表 3。分析比较 NGX6 mRNA 在鼻咽癌、异型增生鼻咽上皮和正常鼻咽上皮中的阳性率，结果发现，NGX6 mRNA 在鼻咽癌中的阳性率均显著低于异型增生鼻咽上皮和正常鼻咽上皮($P < 0.01$)，异型增生鼻咽上皮中 NGX6 mRNA 与正常鼻咽上皮相比无

显著性差异($P > 0.05$)。NGX6 mRNA 在肺癌、胃癌和结、直肠癌中的阳性率均显著低于其相应正常组织($P < 0.01$)。喉癌和乳腺癌的 NGX6 mRNA 阳性率与其正常组织比较均无显著性差异($P < 0.05$)。

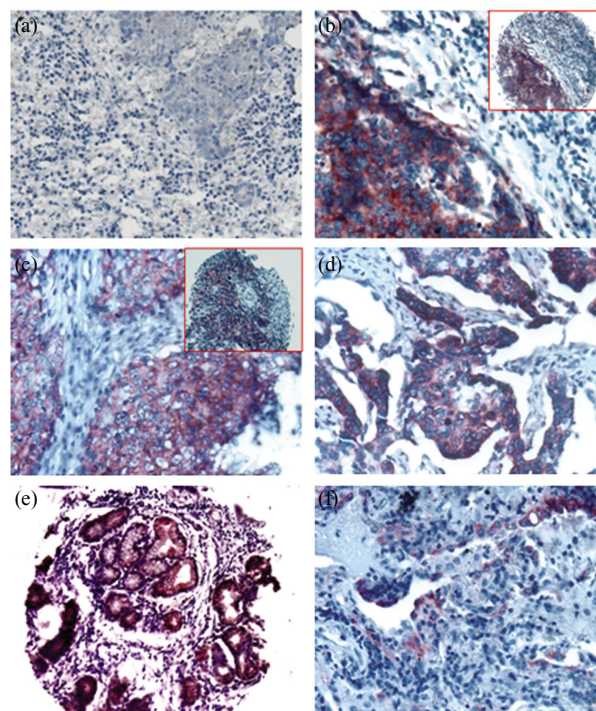


Fig. 1 Expression of NGX6 mRNA in the several common types of cancer and its normal tissues

(a) NGX6 mRNA is negative staining in the nasopharyngeal cancer (*in situ* hybridization, AEC staining, $\times 200$). (b) NGX6 mRNA is positive expression in the low differentiation lung squamous cell cancer (*in situ* hybridization, AEC staining, $\times 200$). (c) NGX6 mRNA is positive expression in the nasopharyngeal cancer (*in situ* hybridization, AEC staining, $\times 200$). (d) NGX6 mRNA is positive expression in the moderate differentiation colonic adenocarcinoma (*in situ* hybridization, AEC staining, $\times 200$). (e) NGX6 mRNA is positive expression in the normal stomach epithelium (*in situ* hybridization, AEC staining, $\times 40$). (f) NGX6 mRNA is positive expression in the non-cancer alveolar epithelium.

Table 3 Expression of the NGX6 mRNA in the several common types of cancer and its normal tissues

Histological origin	Histological features	NGX6 mRNA		P value
		Positive / %	Negative / %	
Nasopharynx	Nasopharyngeal cancer (148)	76(51.4)	72(48.6)	0.000
	Atypically hyperplasia nasopharyngeal epithelium (67)	53(79.1)	14(20.9)	0.409
	Normal nasopharyngeal epithelium (97)	82(84.5)	15(15.5)	0.000
Lung	Lung cancer (89)	53(59.6)	36(40.4)	0.006
	Normal lung tissue (35)	30(85.7)	5(14.3)	
Larynx	Laryngeal cancer (27)	18(66.7)	9(33.3)	1.000
	Normal laryngeal epithelium (20)	13(65.0)	7(35.0)	
Stomach	Stomach cancer(30)	11(36.7)	19(63.3)	0.015
	Normal stomach epithelium (11)	9(81.8)	2(19.2)	
Colon and Recta	Colon and Rectal cancer (61)	25(41.0)	36(59.0)	0.030
	Normal intestine epithelium (32)	21(65.6)	11(34.4)	
Breast	Breast cancer (31)	13(42.0)	18(58.0)	1.000
	Normal breast tissue (13)	5(38.5)	8(61.5)	

2.2 NGX6 mRNA 与各种常见癌的临床病理特征关系

NGX6 mRNA 与鼻咽癌、肺癌、喉癌、胃癌、结、直肠癌和乳腺癌组织的主要临床病理特征如肿瘤临床分期、肿瘤的转移状况的相关性分析结果见表 4。结果显示: NGX6 mRNA 与鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌的临床分期存在显著相关性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。临床 I 期鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌组

织中 NGX6 mRNA 明显高于临床 II 期、III 和 IV 期($P < 0.01$), 但临床 II 期鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌与临床 III 和 IV 期相比, 差异无显著性($P > 0.05$)。NGX6 mRNA 与鼻咽癌、喉癌、肺癌和结、直肠癌的淋巴结转移存在显著性负相关性($P < 0.05$)。NGX6 mRNA 与胃癌和乳腺癌的临床分期和淋巴结转移均无显著性相关($P > 0.05$)。

Table 4 Analysis of the correlation between expression of NGX6 mRNA in the several common types of cancer and its clinicopathological characteristics

Histological types	Clinical characteristics	NGX6 mRNA		P value
		Positive/%	Negative/%	
Nasopharyngeal cancer	Stage I (44)	31(70.5)	13(29.5)	0.039 ¹⁾
	Stage II (51)	25(49.0)	26(51.0)	0.322 ²⁾
	Stage III and IV (53)	20(37.7)	33(62.3)	0.002 ³⁾
	Lymph node metastasis (100)	43(43.0)	57(57.0)	0.005
	No lymph node metastasis (48)	33(68.8)	15(31.2)	
Lung cancer	Stage I (36)	27(75.0)	9(25.0)	0.087 ¹⁾
	Stage II (22)	11(50.0)	11(50.0)	1.000 ²⁾
	Stage III and IV (31)	15(48.4)	16(51.6)	0.042 ³⁾
	Lymph node metastasis (47)	21(44.7)	26(55.3)	0.003
	No lymph node metastasis (42)	32(76.2)	10(23.8)	
Laryngeal cancer	Stage I (4)	2(50.0)	2(50.0)	0.533 ¹⁾
	Stage II (14)	11(78.6)	3(21.4)	0.363 ²⁾
	Stage III and IV (9)	5(55.6)	4(44.4)	1.000 ³⁾
	Lymph node metastasis (14)	6(42.9)	8(57.1)	0.013
	No lymph node metastasis (13)	12(92.3)	1(7.7)	
Stomach cancer	Stage I (6)	4(66.7)	2(33.3)	0.627 ¹⁾
	Stage II (8)	3(37.5)	5(62.5)	0.673 ²⁾
	Stage III and IV (16)	4(25.0)	12(75.0)	0.343 ³⁾
	Lymph node metastasis (23)	8(34.8)	15(65.2)	1.000
	No lymph node metastasis (7)	3(42.9)	4(57.1)	
Colon and Rectal cancer	Stage I (14)	12(85.8)	2(14.2)	0.001 ¹⁾
	Stage II (34)	11(32.4)	23(67.6)	0.301 ²⁾
	Stage III and IV (13)	2(15.4)	11(84.6)	0.000 ³⁾
	Lymph node metastasis (31)	7(22.6)	24(77.4)	0.004
	No lymph node metastasis (30)	18(60.0)	12(40.0)	
Breast cancer	Stage I (7)	4(57.1)	3(42.9)	1.000 ¹⁾
	Stage II (17)	8(47.1)	9(52.9)	0.191 ²⁾
	Stage III and IV (7)	1(14.3)	6(85.7)	0.266 ³⁾
	Lymph node metastasis (19)	7(36.9)	12(63.1)	0.710
	No lymph node metastasis (12)	6(50.0)	6(50.0)	

¹⁾ Compare the expression of NGX6 mRNA between the stage I and the Stage II cancer; ²⁾ Compare the expression of NGX6 mRNA between the Stage II and the stage III and IV cancer; ³⁾ Compare the expression of NGX6 mRNA between the stage I and the stage III and IV cancer.

2.3 NGX6 mRNA 作为肿瘤转移分子标志物的有效性评估

本研究进一步评估 NGX6 mRNA 作为鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌淋巴结转移分子标志物的灵敏度、特异度、符合率、阳性预测值和阴性预测值。灵敏度评估 NGX6 mRNA 正确诊断肿瘤淋巴结转

移的能力, 特异度为正确判断无淋巴结转移的能力, 符合率表示 NGX6 mRNA 用于肿瘤淋巴结转移的真实性, 数值越大, 真实性愈大。阳性预测值表示 NGX6 mRNA 阳性时, 肿瘤淋巴结转移诊断的可能性。阴性预测值表示 NGX6 mRNA 阴性时, 无淋巴结转移诊断的可能性。具体分析结果见

表 5. 其中 NGX6 mRNA 作为鼻咽癌分子标志物的阳性预测值最好, 肺癌的特异度最高, 结、直肠

癌的灵敏度最优, NGX6 mRNA 用于评估这 3 种癌的淋巴结转移的符合率均大于 60%.

Table 5 The test validity of NGX6 mRNA act as the metastasis molecular marker for nasopharyngeal cancer, lung cancer and colon and rectal cancer

	Nasopharyngeal cancer	Lung cancer	Colon and rectal cancer
Sensitivity/%	57.0	55.3	77.4
Specificity/%	68.8	76.2	60.0
Positive predictive value/%	79.2	72.2	66.7
Negative predictive value/%	43.4	60.4	72.0
Agreement rate/%	60.8	65.2	68.9

3 讨 论

前期研究发现, NGX6 基因能延缓多种肿瘤细胞的增殖, 转染 NGX6 基因的 HNE1 细胞能延长裸鼠成瘤时间, NGX6 基因在鼻咽癌细胞和结、直肠癌组织中表达明显下调^[5~8]. 评估新基因在肿瘤临床诊治和预后预测中的作用并证明其能否作为肿瘤诊断标志和治疗靶点的有效性, 阐明新基因的生物学功能, 获取新的肿瘤分子靶标, 常需检测新基因在成百上千例临床资料完整且病理形态特征明显的原发性肿瘤的不同发展阶段、不同分化程度和其相应正常组织中的表达^[1~4, 10~12]. 组织微阵列能大规模、高通量、快速地在原位组织中对新的差异表达基因从 DNA 扩增、mRNA 表达丰度和蛋白质表达水平等多个方面进行研究. 组织微阵列真正地为疾病的分子诊断、预后指标的确定、治疗靶点的定位、治疗效果的预测、抗体和药物的筛选以及基因治疗的研究等方面提供了一种高通量的新工具^[1~4].

研究证明, 常规福尔马林固定、石蜡包埋的组织能检测中等量和高丰度的 mRNA 表达, 从石蜡组织标本中仍能抽高质量 mRNA^[1, 12]. 我们成功地制作两种类型的组织微阵列^[9], 一种为 448 个组织点阵的多种常见肿瘤组织微阵列, 另一种为 390 个点阵的鼻咽癌组织微阵列, 其中包括鼻咽癌发生、发展过程的组织标本. 原位杂交探针有 3 种类型, 即 DNA 探针、RNA 探针和寡核苷酸探针. 双链 DNA 探针敏感性差, 单链 RNA 探针易于降解, 这两种探针在组织中的通透性差, 用于检测石蜡组织中基因 mRNA 的表达时其敏感性均不如寡核苷酸探针. 虽然含 20~30 个碱基的寡核苷酸探针的特异性稍逊于 DNA 探针和 RNA 探针, 但随着寡核苷酸设计软件的完善、这一问题已得到解决^[10, 11, 13, 14].

本研究采用寡核苷酸探针检测石蜡组织中的 NGX6 mRNA 表达丰度. 利用组织中无内源性的地高辛标记探针, 抗地高辛抗体检测探针与 mRNA 结合复合物, 这样能最大限度地消除检测反应中的假阳性. 从以下方面改进原位杂交检测系统来增加原位杂交检测的敏感性, 保证能检测组织中低丰度的 mRNA^[13, 14]. 杂交前用胃蛋白酶 K 消化组织, 消除蛋白质的屏障作用, 用 0.2 mol/L HCl 增加组织通透性, 采用多条寡核苷酸混合探针进行杂交, 利用地高辛加尾标记试剂盒标记寡核苷酸探针, 所有寡核苷酸探针均能同时在 3'-OH 端标记 4~5 个 DIG-dUTP, 利用增强原位表达信号的 TSA 放大系统.

本研究利用组织微阵列技术平台, 原位杂交检测 NGX6 mRNA 在多种人类常见癌组织和其相应正常组织中的原位表达丰度, 建立了 NGX6 mRNA 在这些癌组织和其正常组织中的原位表达谱, 同时分析 NGX6 mRNA 与各种癌的临床分期和淋巴结转移的相关性. 探讨 NGX6 mRNA 在肿瘤发生、发展中的作用, 评估 NGX6 mRNA 作为肿瘤分子标志物的有效性. 检测结果显示, NGX6 mRNA 在鼻咽癌、肺癌、胃癌和结、直肠癌中的表达丰度普遍降低, 但 NGX6 mRNA 在喉癌和乳腺癌中的阳性率与其相应非肿瘤性病变组织相比均无显著性差异. NGX6 mRNA 阳性率与鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌的临床分期、有无淋巴结转移存在显著相关性. 临床 I 期鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌组织中 NGX6 mRNA 的阳性率明显高于临床 II 期、III 和 IV 期. NGX6 mRNA 的阳性率也与喉癌淋巴结转移存在显著相关性, 但其标本量偏少, 需下一步加大样本量进一步证实. 本研究未发现 NGX6 mRNA 的阳性率与乳腺癌的临床分期和淋巴结转移存在显著性相关. 前期研究表明, NGX6 基因可能是一种细

胞黏附分子, 参与了肿瘤转移, NGX6 在淋巴结转移的结、直肠癌组织中表达明显下调^[7, 8]。本研究综合评估 NGX6 mRNA 作为常见癌的淋巴结转移分子标志物的结果显示, NGX6 mRNA 能作为鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌淋巴结转移较为可靠的分子标志物。本研究组织微阵列大规模地检测 NGX6 mRNA 的原位表达结果, 进一步验证前期实验对 NGX6 基因的一系列体内外生物学功能研究的结果^[6~14]。因为基因最终行使功能的是其蛋白质, 目前正在制备 NGX6 基因的单克隆抗体, 同时制作其他各种常见肿瘤的大样本数的组织芯片。下一步的研究重点是从蛋白质水平证实 NGX6 基因是否可作为肿瘤侵袭、转移分子标志物。

本研究结果提示: NGX6 mRNA 表达丰度降低促进肿瘤的发生、发展和有助于肿瘤的侵袭、转移, NGX6 mRNA 可作为预测鼻咽癌、肺癌和结、直肠癌淋巴结转移的分子标志物。

参 考 文 献

- 1 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 1998, **4** (7): 844~847
- 2 Bubendorf L, Nocito A, Moch H, *et al.* Tissue microarray technology: miniaturized pathology archives for high throughput *in situ* studies. *J Pathol*, 2001, **195**(10): 72~79
- 3 Kallioniemi O P, Wagner U, Juha K, *et al.* Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics*, 2001, **10**(7): 657~662
- 4 Swierczynski S L, Maitra A, Abraham S C, *et al.* Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol*, 2004, **35**(3): 357~366
- 5 阳剑波, 宾亮华, 李忠花, 等. 精细定位和克隆 9q21-22 区域内鼻咽癌候选抑瘤基因. *癌症*, 2000, **19**(1): 6~9
- 6 Yang J B, Bin L H, Li Z H, *et al.* *Chin J Cancer*, 2000, **19**(1): 6~9
- 7 Zhang X M, Wang X Y, Sheng S R, *et al.* Expression of tumor related genes NGX6, NAG-7, BRD7 in gastric and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2003, **9**(8): 1729~1733
- 8 Li J, Tan C, Li G, *et al.* Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by NGX6 transfected in human nasopharyngeal carcinoma cells. *J Protein Chem*, 2001, **20**(3): 265~271
- 9 Ma J, Li J, Li G Y, *et al.* Profiling genes differentially expressed in NGX6 overexpressed nasopharyngeal carcinoma cells by cDNA array. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, **128**(12): 683~690
- 10 范松青, 张文玲, 李桂源, 等. 一种组织微阵列供体取样与受体蜡块制作的新器具和新方法. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (5): 474~479
- 11 Fan S Q, Zhang W L, Li G Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (5): 474~479
- 12 Frantz G D, Pham T Q, Peale F V Jr, *et al.* Detection of novel gene expression in paraffin-embedded tissues by isotopic *in situ* hybridization in tissue microarrays. *J Pathol*, 2001, **195**(1): 87~96
- 13 Luehrsens K R, Davidson S, Lee Y J, *et al.* High-density hapten labeling and HRP conjugation of oligonucleotides for use as *in situ* hybridization probes to detect mRNA targets in cells and tissues. *J Histochem Cytochem*, 2000, **48**(1): 133~145
- 14 Lewis F, Maughan N J, Smith V, *et al.* Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol*, 2001, **195** (1): 66~71
- 15 van de Corput M P, Dirks R W, van Gijlswijk R P, *et al.* Sensitive mRNA detection by fluorescence *in situ* hybridization using horseradish peroxidase-labeled oligodeoxynucleotides and tyramide signal amplification. *J Histochem Cytochem*, 1998, **46**(11): 1249~1259
- 16 Chevalier J, Yi J, Michel O, *et al.* Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy *in situ* hybridization probes: where do we stand?. *J Histochem Cytochem*, 1997, **45**(4): 481~491

Study of *In situ* Expression of NGX6 Gene in The Several Common Types of Cancer and Its Clinical Significance *

FAN Song-Qing^{1,2**}, ZHANG Wen-Ling^{1)**}, ZHOU Ming¹⁾, PENG Shu-Ping¹⁾, LI Gui-Yuan^{1)***}

¹⁾Cancer Research Institute of Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾Department of Pathology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract To investigate the mRNA expression profile of novel candidate of tumor suppressor gene NGX6 in the several common types of cancer, analyze the correlation between NGX6 mRNA expression and its clinicopathological and to evaluate the validity that NGX6 mRNA act as molecular marker for tumor metastasis and prognosis. Multi-tumor tissue and nasopharyngeal cancer tissue microarrays were constructed previously and tissue microarrays combined with *in situ* hybridization were used to detect the expression of NGX6 mRNA in the human several common types of cancer. Results showed that expression of NGX6 mRNA in the nasopharyngeal cancer (NPC), lung cancer, gastric cancer and colon-rectal cancer was significantly lower than that in their non-cancer normal tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Expression level of NGX6 mRNA was evidently lower in the NPC, laryngeal cancer, lung cancer and colon-rectal cancer with lymph node metastasis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Expression of NGX6 mRNA in the NPC, lung cancer and colon-rectal cancer had significant correlation with their clinical stages, which NGX6 mRNA was significantly lower in the clinical stage T2, T3 or T4 than their clinical stage T1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results suggested that the NPC, lung cancer, gastric cancer and colon-rectal cancer had evidently lower expression of NGX6 mRNA, NGX6 mRNA might be used as molecular markers for invasion, metastasis and prognosis of NPC, lung cancer and colon-rectal cancer.

Key words tissue microarray, *in situ* hybridization, NGX6 gene

*This work was supported by grants from The National Key Project of Scientific Research Program (2006CB910502, 2006CB910504), The Key Program of The National Natural Science Foundation of China (30770825), Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (06JJ2013, 08JJ3051).

**FAN Song-Qing and ZHANG Wen-Ling contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: February 19, 2008 Accepted: May 19, 2008