

参考文献

- [1] Kalagara HK, Uppal V, McKinlay S, et al. Effect of body mass index on angle of needle insertion during ultrasound-guided lateral sagittal infraclavicular brachial plexus block [J]. J Clin Anesth, 2015, 27(5):375-379.
- [2] 夏雷, 王美美, 陈伟楚, 等. 超声引导在肱骨骨折患者锁骨上臂丛神经阻滞的临床应用及其效果分析 [J]. 浙江创伤外科, 2014, 19(1):144-146.
- [3] 李金玉, 葛东建, 祁宾, 等. 不同剂量右美托咪定混合罗哌卡因用于臂丛神经阻滞的效果 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(6):711-713.
- [4] 王绍林, 张进, 张鹏, 等. 超声联合神经刺激仪引导后入路臂丛神经阻滞的效果 [J]. 中华麻醉学杂志, 2011, 31(6):764-765.
- [5] 郭勇. 超声引导臂丛神经阻滞在晚期帕金森病患者上肢骨科手术中的应用 [J]. 中国临床研究, 2014, 27(4):470-471.
- [6] 祁富军, 任鹏程, 张旭东, 等. 地佐辛复合左旋布比卡因应用于臂丛神经阻滞的临床研究 [J]. 中华全科医学, 2013, 11(1):23-25.
- [7] 安卫平, 徐炳欣, 张亚飞, 等. 地佐辛联合丙泊酚在老年患者无痛胃镜检查中的临床观察 [J]. 中国临床研究, 2015, 28(5):611-613.
- [8] 侯铁柱, 徐炳欣, 王晓慧, 等. 脑电双频指数监测地佐辛联合依托咪酯与丙泊酚静脉麻醉在老年胃镜检查中的应用 [J]. 中国临床研究, 2015, 28(1):4-6.
- [9] 马靖华. 罗哌卡因腰硬联合麻醉在老年髋关节置换术中的麻醉效果及安全性观察 [J]. 中国临床研究, 2015, 28(4):483-485.
- [10] 孙承毅, 王华, 卢波. 不同剂量地佐辛复合罗哌卡因用于臂丛神经阻滞的临床效果观察 [J]. 中国现代药物应用, 2014, 8(21):130-131.

收稿日期:2016-03-02 修回日期:2016-03-30 编辑:王国品

· 临床研究 ·

Noxa 表达水平与胃癌患者临床特征及预后的关系

张新元, 连仲山, 陈金宏

定西市渭源县人民医院普通外科, 甘肃 定西 748200

摘要: **目的** 探讨 Noxa 表达水平与胃癌患者临床特征及预后的关系。**方法** 研究纳入 2013 年 1 月至 2015 年 5 月确诊并接受治疗的胃癌患者 60 例, 其中男 32 例, 女 28 例; 中位年龄 65 岁 (38~76 岁)。收集术中胃癌组织标本和对应的癌周正常组织标本。实时荧光定量 PCR 检测胃癌组织和癌周组织中 Noxa mRNA 的水平, 免疫组织化学检测胃癌组织和癌周组织中 Noxa 的蛋白表达水平。分析胃癌组织中 Noxa 表达与患者性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤大小、浸润深度、转移情况等临床病理特征的关系。同时探讨 Noxa 表达与患者预后的关系。**结果** 实时荧光定量 PCR 结果显示胃癌组织中的 Noxa mRNA 低于癌周正常组织, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。免疫组化结果显示胃癌组织 Noxa 阳性表达率为 43.3%, 癌周正常组织的 Noxa 阳性表达率 88.3%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。肿瘤直径不同、浸润深度不同、淋巴结和远隔器官转移情况不同的患者, 其 Noxa 表达水平具有统计学差异 ($P < 0.01, P < 0.05$)。Noxa 表达阳性患者 2 年生存率为 60.1%, Noxa 表达阴性患者的 2 年生存率为 42.9%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** Noxa 具有成为胃癌临床诊断或评估分子标志物的潜能, Noxa 的低表达预示着胃癌患者的不良预后。

关键词: 胃癌; Noxa; 分期; 肿瘤直径; 浸润深度; 转移; 预后

中图分类号: R 735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1095-04

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 位居世界范围内癌症相关死亡原因的第二位^[1-2]。诊断时机的延误和肿瘤耐药现象的发生使得目前胃癌的治疗效果并不理想, 如何实现胃癌的早期诊断, 准确评估患者预后, 找到精确治疗的分子靶点从而提高诊断治疗效果是临床上亟待解决的问题^[3-4]。肿瘤的发生与细胞的凋亡异常密切相关, 因此凋亡调控相关的分

子具有应用于肿瘤诊断、评估及治疗的潜能^[5]。Noxa 是 Bcl-2 家族的成员之一, 具有促凋亡作用。近期研究发现 Noxa 的表达异常、其促细胞凋亡作用被抑制, 与肿瘤的发生有关^[6]。有研究发现, 非小细胞肺癌中存在 Noxa 的低表达^[7]。但是 Noxa 在胃癌中的表达及其与胃癌患者临床特征及预后的关系还少有研究。本研究比较胃癌组织和正常癌旁组织中 Noxa 的表达差异, 分析 Noxa 表达水平和患者胃癌分期、淋巴结转移等临床特征的关系, 评估 Noxa 表达和患者预后的关系, 现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 研究纳入 2013 年 1 月至 2015 年 5 月于我院确诊并接受治疗的胃癌患者 60 例,其中男性 32 例,女性 28 例;中位年龄 65 岁(38 ~ 76 岁)。所有纳入患者经胃镜活检结合影像学检查确诊且临床资料完整。提取患者病史、家族史、肿瘤位置、治疗方式(手术,化疗,放疗)、组织类型、分化程度、浸润深度、淋巴结转移及 Lauren 分型等临床病理资料,所有患者或患者家属对数据使用知情同意。研究对象排除标准:急诊手术;胃腺癌伴神经内分泌分化;术前已经接受过化疗或放疗。采用电话随访和网络随访,随访起始于术后,随访截止时间为 2015 年 11 月。

1.2 实时荧光定量 PCR 技术检测 Noxa mRNA 表达

TrozoL 试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)提取胃癌组织和癌周正常组织的总 RNA。使用 Prime-Script® RT reagent Kit 反转录试剂盒(大连宝生物有限公司)将提取的总 RNA 反转录为 cDNA,反应条件和体系按照厂商说明书进行。使用 Taqman Universal PCR master Mix 试剂盒(美国 ABI 公司)对 cDNA 进行扩增定量,反应体系和条件按照厂商提供的说明书进行。Noxa 引物和内参 β -actin 引物由大连宝生物公司设计并合成,其中 Noxa 上游引物为 5'-GCA AGA ATG GAA GAC CCT TG-3',下游引物为 5'-GTG CTG AGT TGG CAC TGA AA。内参 β -actin 上游引物序列为 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3',下游为序列为 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算组织中 Noxa mRNA 的相对表达量。

1.3 免疫组化检测 Noxa 蛋白的表达 收集患者胃癌组织及对应的癌周正常组织,甲醛固定。常规石蜡包埋并连续切片。免疫组织化学 SP 试剂盒检测(北京中杉金桥生物技术有限公司)组织标本中 Noxa 蛋白的表达。方法如下:切片脱蜡后过氧化氢灭活,内源性过氧化物酶,抗原修复后加入 1:2 000 稀释的鼠抗人 Noxa 一抗(Santa cruz 公司)孵育过夜。加入生物素标记的二抗孵育 1 h 后,流水冲洗,加入 DAB 显色,苏木素复染后进行结果判断。每张切片计数 10 个视野,共计数 1 000 个细胞。阳性反应为棕黄色颗粒,计算阳性细胞率,未见阳性反应或阳性反应细胞 <20% 标记为 -, 阳性细胞率为 20% ~ 50% 标记为 +, 51% ~ 70% 为 ++, >70% 标记为 +++。

1.4 统计学分析 统计学分析采用 SPSS 17.0 软件。胃癌组织和癌周正常组织的 Noxa 表达强度的比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。Noxa 表达和其他临

床病理学参数的关系分析采用 χ^2 检验。生存分析采用 Kaplan-Meier 曲线法结合 log-rank 分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Noxa mRNA 在胃癌组织中存在低表达 实时定量 PCR 检测结果显示(图 1),胃癌组织中的 Noxa mRNA 水平明显低于癌周正常组织,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。免疫组化结果显示, Noxa 蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒样,于胞质中呈强弱不等的表达,细胞核亦可见部分表达。胃癌组织 Noxa 阳性表达为 43.3% (26/60),癌周正常组织的 Noxa 阳性表达为 88.3% (53/60),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。癌周正常组织的 Noxa 表达强度高于胃癌组织($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 Noxa 表达与患者临床特征的关系 本研究纳入的胃癌患者,其胃癌组织的 Noxa 蛋白表达情况与患者是否具有家族史、饮酒史、吸烟史及手术方式无关。其他临床病理学特征如表 2 所示。分析可知,胃癌患者的 Noxa 表达与患者的年龄、性别无关(P 均 > 0.05);肿瘤发病不同位置、不同分化程度和不同 Lauren 分型的患者其 Noxa 的表达均无统计学差异(P 均 > 0.05);但是,肿瘤不同直径、不同浸润深度、淋巴结和远隔器官有无转移情况的患者,其 Noxa 表达具有统计学差异($P < 0.01, P < 0.05$)。进一步的 Spearman 等级相关分析可知,肿瘤直径越大、浸润程度越深、累及淋巴结越多、远隔器官转移越严重的患者,其 Noxa 表达越低($r = -0.741, -0.739, -0.552$ 及 $-0.622, P$ 均 < 0.05)。

2.3 Noxa 表达与患者预后的关系 本研究 60 例患者均获得随访,中位随访时间 13 个月(3 ~ 30 个月)。随访 30 个月 60 例胃癌患者的总体生存率见图 2。截止随访结束时,共死亡 22 例,2 年总体生存率为 50.5%。Noxa 阳性和阴性胃癌患者的生存率比较见图 3。26 例 Noxa 表达阳性患者中死亡 7 例,中位生

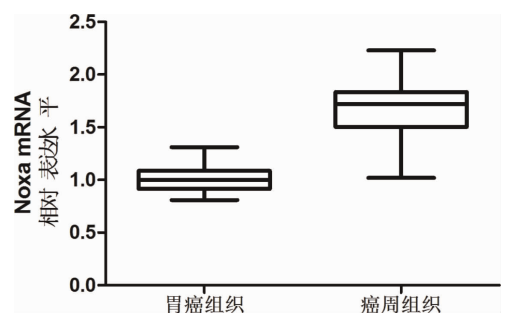


图 1 胃癌组织和癌周组织的 Noxa mRNA 水平比较

表 1 Noxa 蛋白在胃癌组织和癌周组织中的表达差异

(n = 60, 例)

组别	Noxa 表达			
	-	+	++	+++
胃癌组织	34	12	8	6
癌周组织	7	15	10	28
P 值	< 0.05			

表 2 Noxa 表达和胃癌患者临床特征的关系 (例)

临床特征	Noxa 表达阳性 (n = 26)	Noxa 表达阴性 (n = 34)	χ^2 值	P 值
年龄				
≤60 岁	10	16	0.443	0.505
>60 岁	16	18		
性别			0.350	0.554
男	15	17		
女	11	17		
肿瘤位置			0.615	0.433
贲门	3	2		
胃体	7	8		
胃窦	12	21		
全胃	4	3		
肿瘤直径			16.355	0.000
≤3 cm	18	6		
>3 cm	8	28		
分化程度			0.950	0.330
低分化	12	20		
高分化	14	14		
浸润深度			5.342	0.021
T1 ~ T2	17	12		
T3 ~ T4	9	22		
淋巴结转移			4.659	0.031
无	18	14		
有	8	20		
远隔器官转移			13.030	0.000
无	20	10		
有	6	24		
Lauren 分型			3.204	0.073
肠型	16	13		
弥漫型	10	21		

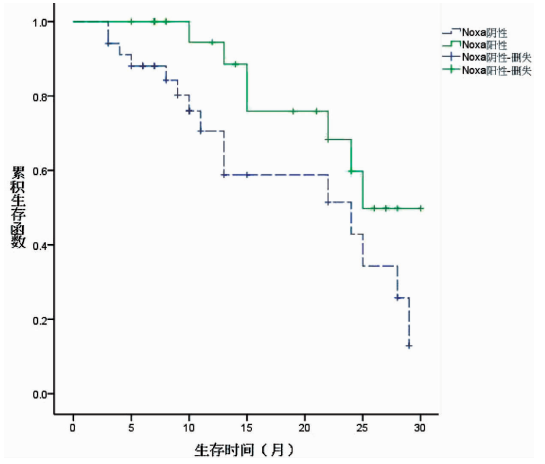


图 3 Noxa 阳性和阴性胃癌患者的生存率比较

存期为 15 个月, 2 年生存率为 60.1%; 34 例 Noxa 表达阴性患者中死亡 15 例, 中位生存期为 10 个月, 2 年生存率为 42.9%, 二者比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 该结果提示 Noxa 表达较低的患者预后较差。

3 讨论

尽管近年来胃癌诊治技术取得了一定的发展, 胃癌的早期确诊率越来越高, 但是大部分患者仍在进入晚期后或出现远处转移时才被确诊。胃癌的 5 年生存率仍然较低。因此发现新的分子诊断指标和治疗靶点对改善患者生存率尤为重要^[8-9]。本研究中, 我们关注了胃癌组织中 Noxa 的表达和胃癌患者临床特征及预后的关系。Noxa 的表达产物为 Bcl-2 家族的成员之一, 该家族成员的特征为含有 Bcl-2 同源结构域, 但 Noxa 仅具有一种 Bcl-2 同源结构域, 即 BH-3 结构域, 因此又被称为 BH3-only 蛋白^[10-11], 与其同类的蛋白包括 Bid、Bad、Puma 及 Bmf 蛋白等。Noxa 及其同类蛋白已被证实具有促细胞凋亡的作用, 但此促凋亡过程是较为复杂的, 涉及 Noxa 和 Bcl-2 家族其他成员的相互作用, 具体机制尚不完全明了^[12-13]。一些研究指出 Noxa 是 p53 的下游靶点, 其促凋亡机制依赖 p53 的表达。p53 结合 Noxa 的上游启动序列后, 可以增加 Noxa 的表达, 大量的 Noxa 可增加线粒体膜的通透性, 促进细胞色素 C 的释放, 激活 Caspase 家族, 进而促进凋亡^[14-15]。

一些研究已经指出肿瘤组织中存在 Noxa 的表达异常, 提示 Noxa 可能参与肿瘤的发生及发展。如有研究发现大肠癌组织中的 Noxa 蛋白阳性表达率明显低于对应的癌旁组织, 且不同 Noxa 蛋白阳性表达的患者, 其大肠癌组织分化程度、淋巴结转移差异存在统计学意义^[16]。在非小细胞肺癌的研究中, 有学者发现 Noxa 的 mRNA 及蛋白水平在肺癌组织均存在

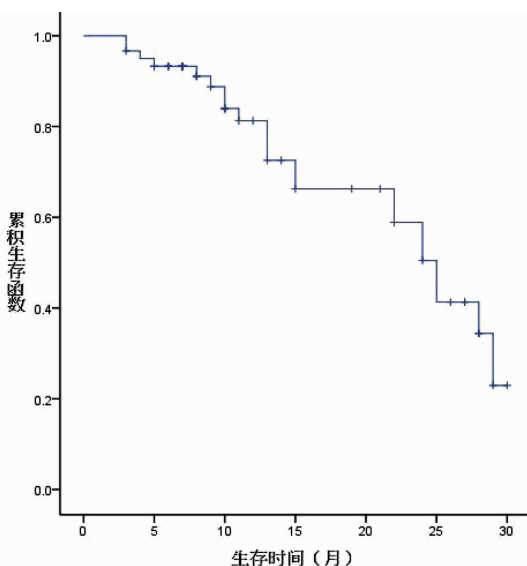


图 2 60 例胃癌患者的总体生存率

低表达,但这种低表达与非小细胞肺癌的组织类型及病理类型无明显关系^[7]。在胃癌相关的研究中,董伟等^[17]发现胃癌组织的 Noxa 蛋白阳性表达率明显低于癌旁组织。王家钰^[18]发现胃腺癌细胞对内质网应激诱导的凋亡相对耐受,这可能与 Noxa 的促凋亡作用被抑制有关。还有研究指出, Noxa 的表达与肿瘤的化疗效果存在一定的关系,如在使用硼替佐米治疗慢性淋巴细胞白血病的过程中,慢性淋巴细胞白血病细胞的 Noxa 水平显著增加^[19]。胃腺癌的 Noxa 低表达可能与顺铂耐药相关。这些结果提示 Noxa 可能具有成为肿瘤化疗治疗靶点的潜力^[20]。

基于上述 Noxa 功能的既往研究,所以我们假设 Noxa 的低表达与胃癌的发生有关,并假设较低的 Noxa 表达可能提示较差的临床表现及较差的胃癌预后。最终,研究结果与假设一致。我们发现相比癌周正常胃组织,胃癌组织的 Noxa mRNA 和蛋白表达均较低,同时, Noxa 低表达与患者的肿瘤直径、肿瘤浸润深度及淋巴结转移及远隔器官的转移情况有关, Noxa 表达越低,上述临床病理特征越差。但 Noxa 的表达与患者的肿瘤分化及 Lauren 分型无关,这提示 Noxa 的表达可能决定胃癌的发展和生长,但和胃癌的起源或发生关系不大。预后方面, Noxa 表达较低是预后较差的独立危险因素, Noxa 表达较低的患者,其 2 年生存率较低。关于 Noxa 在胃癌中的表达水平,本研究的结果和既往大部分的研究结果一致,同时提示 Noxa 低表达是胃癌患者预后较差的危险因素。因此, Noxa 或可作为胃癌诊断、预后评估的生物分子指标,甚至治疗靶点。当然,本研究也有一定的局限性,如样本量较少,中位随访时间仅有 13 个月(3~30 个月),这些问题有待在未来研究中得到解决。

参考文献

[1] 王永川,魏丽娟,刘俊田,等. 发达与发展中国家癌症发病率与死亡率的比较与分析[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(10):679-682.

[2] Quéro L,Guillerm S,Hennequin C. Neoadjuvant or adjuvant therapy for gastric cancer[J]. World J Gastrointest Oncol,2015,7(8):102-110.

[3] 田洪鹏,王继见. 新辅助化疗对胃癌 5 年生生存率影响的 Meta 分析[J]. 重庆医学,2012,41(2):142-144,147.

[4] Woo J, Cohen SA, Grim JE. Targeted therapy in gastroesophageal cancers: past, present and future [J]. Gastroenterol Rep (Oxf), 2015,3(4):316-329.

[5] 马西强,刘庆彤,谢江柳,等. 光辉霉素 A 对人胃癌 BGC823 细胞增殖、凋亡、迁移的影响及其机制[J]. 中国临床研究,2014,27(9):1049-1052.

[6] Wensveen FM,Geest CR,Libregts SF, et al. BH3-only protein Noxa contributes to apoptotic control of stress-erythropoiesis [J]. Apoptosis,2013,18(11):1306-1318.

[7] 王玉明,马薇,陈韵如,等. noxa mRNA 及其编码蛋白表达与非小细胞肺癌的相关性研究[C]//中国工程科技论坛—临床分子诊断暨第二届中国分子诊断技术大会论文集,重庆:重庆科协,2011:292-293.

[8] 詹友庆,李威,孙晓卫,等. 胃癌外科治疗的远期疗效研究[J]. 中华外科杂志,2005,43(17):1109-1113.

[9] 张莉霞. 晚期胃癌分子靶向治疗进展[J]. 中国临床研究,2014,27(3):359-361.

[10] Karim CB, Michel Espinoza-Fonseca L, James ZM, et al. Erratum: Structural Mechanism for Regulation of Bcl-2 protein Noxa by phosphorylation [J]. Sci Rep,2015,5:15872.

[11] Karpel-Massler G, Ba M, Shu C, et al. TIC10/ONC201 synergizes with Bcl-2/Bcl-xL inhibition in glioblastoma by suppression of Mcl-1 and its binding partners in vitro and in vivo [J]. Oncotarget,2015,6(34):36456-36471.

[12] Aouacheria A, Combet C, Tompa P, et al. Redefining the BH3 Death Domain as a 'Short Linear Motif' [J]. Trends Biochem Sci,2015,40(12):736-748.

[13] Senft D, Weber A, Saathoff F, et al. In non-transformed cells Bak activates upon loss of anti-apoptotic Bcl-XL and Mcl-1 but in the absence of active BH3-only proteins [J]. Cell Death Dis, 2015, 6:e1996.

[14] Karim CB, Espinoza-Fonseca LM, James ZM, et al. Structural Mechanism for Regulation of Bcl-2 protein Noxa by phosphorylation [J]. Sci Rep,2015,5:14557.

[15] Moncunill-Massaguer C, Saura-Esteller J, Pérez-Perarnau A, et al. A novel prohibitin-binding compound induces the mitochondrial apoptotic pathway through NOXA and BIM upregulation [J]. Oncotarget, 2015,6(39):41750-41765.

[16] 董伟,田淑君,魏志,等. PP2A 的肿瘤抑制功能及与凋亡因子 Noxa 的关系[J]. 哈尔滨医科大学学报,2015,49(2):127-130.

[17] 董伟,魏志,孙自勤,等. 凋亡蛋白 Bad 与 Noxa 在胃癌中表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(7):636-637,640.

[18] 王家钰. Noxa 在内质网应激诱导的胃腺癌细胞凋亡中的作用 [D]. 合肥:安徽医科大学,2013.

[19] Baou M, Kohlhaas SL, Butterworth M, et al. Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells [J]. Haematologica,2010,95(9):1510-1518.

[20] Zhang LJ, Hao YZ, Hu CS, et al. Inhibition of apoptosis facilitates necrosis induced by cisplatin in gastric cancer cells [J]. Anticancer Drugs,2008,19(2):159-166.