

论著 · 临床研究

LASS2 表达对鼻咽癌患者术后复发监测意义研究*

殷亚磊¹, 徐理骅²

(1. 深圳市宝安区沙井人民医院, 广东深圳 518104; 2. 广州医科大学第一附属医院, 广东广州 510000)

摘要:目的 探讨人源性长寿保障基因 2(LASS2)对鼻咽癌患者术后复发的影响。方法 收集 2012 年 1 月 1 日至 2013 年 12 月 31 日该院收治的 154 例鼻咽癌患者的活检标本和 154 例慢性鼻咽炎患者的活检标本。采用免疫组织化学法检测 LASS2 蛋白在鼻咽活检组织中的表达。并收集 154 例鼻咽癌标本患者的人口学资料和临床信息和复发情况,分析 LASS2 表达对鼻咽癌患者术后复发的影响。结果 鼻咽癌组患者 LASS2 蛋白表达阳性率显著低于慢性鼻咽炎组,差异有统计学意义($\chi^2=39.487, P=0.001$)。复发鼻咽癌患者的临床分期、病理分期、LASS2 表达、治疗方式和术后残留与不复发鼻咽癌患者比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。LASS2 阴性是鼻咽癌术后复发的独立危险因素($\chi^2=36.472$, 优势比=0.233, 95%可信区间:0.166~0.363, $P=0.001$)。结论 LASS2 阴性鼻咽癌患者术后复发率明显高于 LASS2 阳性者, LASS2 表达可成为鼻咽癌术后复发预测的生物学指标。

关键词:鼻咽肿瘤; 复发; 危险因素; 人源性长寿保障基因 2

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.012

中图法分类号:R739.6

文章编号:1673-4130(2018)23-2893-04

文献标识码:A

Effect of LASS2 expression on postoperative recurrence of nasopharyngeal carcinoma*

YIN Yalei¹, XU Lihua²

(1. Shajing People's Hospital of Baoan District, Shenzhen, Guangdong, 518104, China; 2. the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of homo sapiens longevity assurance homologue2 (LASS2) on the recurrence of nasopharyngeal carcinoma (NPC) after operation. **Methods** Biopsy specimens of 154 patients with nasopharyngeal carcinoma and 154 patients with chronic nasopharyngitis were collected from January 1, 2012 to December 31, 2013. The expression of LASS2 protein in nasopharyngeal biopsy tissues was detected by immunohistochemistry. The demographic data, clinical information and recurrence of 154 nasopharyngeal carcinoma patients were collected, and the effect of LASS2 expression on recurrence of nasopharyngeal carcinoma patients after operation was analyzed. **Results** The positive rate of LASS2 protein expression in nasopharyngeal carcinoma group was significantly lower than that in chronic nasopharyngitis group, and the difference was statistically significant ($\chi^2=39.487, P=0.001$). There were significant differences in clinical stage, pathological stage, LASS2 expression, treatment methods and residual NPC patients compared with non-recurrent NPC patients ($P<0.05$). Negative LASS2 was an independent risk factor for recurrence of nasopharyngeal carcinoma ($\chi^2=36.472, OR=0.233, 95\%CI:0.166-0.363, P=0.001$). **Conclusion** The recurrence rate of patients with LASS2 negative nasopharyngeal carcinoma was significantly higher than that of patients with LASS2 positive. The expression of LASS2 can be a biological index for predicting the recurrence of nasopharyngeal carcinoma after operation.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; recurrence; risk factors; homo sapiens longevity assurance homologue2

目前,鼻咽癌的治疗方式首选放疗^[1-3],但术后复发率达 8.2%~22.0%^[4],预后较差,对患者长期预后威胁大。有研究表明,鼻咽癌的发生、发展与相关基因变异密切相关^[5-8],选择合适的分子标记物有益于

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2015A030310126);广州医科大学博士启动项目(2013C24)。

作者简介:殷亚磊,男,硕士研究生,主治医师,主要从事耳鼻喉科疾病治疗方向的研究。

本文引用格式:殷亚磊,徐理骅. LASS2 表达对鼻咽癌患者术后复发监测意义研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2893-2896.

鼻咽癌的早期诊断与治疗。人源性长寿保障基因 2 (LASS2) 是一种抑癌基因,是由上海市肿瘤研究所首次发现并报道的新人类基因,广泛存在于人体多种组织中^[9]。有研究证实,LASS2 与多种肿瘤的发生具有一定联系,可能成为一种肿瘤标记物^[10]。本研究通过检测鼻咽癌患者 LASS2 蛋白的表达,比较了复发患者和不复发患者 LASS2 蛋白的表达,校正其他因素后分析 LASS2 表达对鼻咽癌患者术后复发的影响,旨在为寻找新的评价鼻咽癌复发的分子标记物提供科学理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月 1 日至 2013 年 12 月 31 日本院收治的 154 例鼻咽癌患者的活检标本。纳入标准:(1)病理学确诊为鼻咽癌;(2)复发前均进行规范化治疗,并随访至 2017 年 12 月 31 日;(3)患者知情同意。排除标准:(1)严重心、肝、肾、脑等器质性疾病;(2)孕妇或高热者;(3)失访者。154 例患者中男 98 例,女 56 例;年龄 37~70 岁,平均(45.66±5.12)岁。另收集 154 例慢性鼻炎患者的活检标本作为对照组。排除标准:(1)严重心、肝、肾、脑等器质性疾病;(2)孕妇或高热者;(3)失访者。154 例患者中男 100 例,女 54 例,年龄 38~69 岁,平均(44.12±5.69)岁。两组患者年龄、性别等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 鼻咽癌病理诊断和临床分期标准

1.2.1 鼻咽癌诊断标准^[11] 鼻咽部有肿物,经鼻咽肿物活检证实为癌者。

1.2.2 临床分期标准^[12] 按鼻咽癌临床 TNM 分期法进行分期,I、II 为早期,分别为 28、34 例,III、IV 期为晚期,分别为 60、32 例。

1.3 试剂 采用美国 Santa cmz 公司生产的羊抗人 LASS2 多克隆抗体,按 1:100 进行稀释。采用美国 Merck Millipore 公司生产的兔抗羊 IgG,按 1:1 000 进行稀释。采用福州迈新科技有限责任公司生产的免疫组织化学(免疫组化)试剂盒及 DBA 染色剂。

1.4 方法 标本经常规脱水、包埋、切片、脱蜡后采用免疫组化 SP 法检测 LASS2 蛋白表达。操作步骤:(1)组织石蜡切片脱蜡、水化;(2)用自来水清洗后以柠檬酸在 40℃微波下修复 15 min;(3)用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,3%双氧水室温下孵育 10 min;(4)用 PBS 冲洗,滴加一抗,室温孵育 60 min 或 4℃过夜;(5)用 PBS 冲洗后滴入 DBA 显色,用自来水冲洗以终止显色剂作用;(6)苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,用倒置相差显微镜(200×,258 mm²/视野)观察切片并计数阳性细胞数,取 5 个视野,计算平均值。所有切片的免疫组化染色结果均由 2 名副高级专业技术职务的病理医生进行

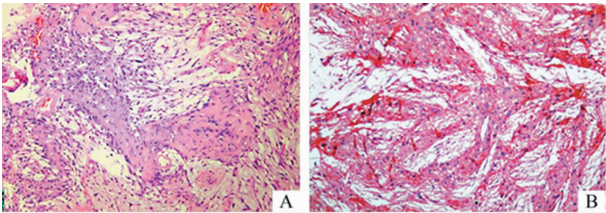
独立双盲评分,结果判断标准:LASS2 主要表达于细胞膜和细胞质,基于肿瘤细胞膜和细胞质染色度和染色细胞百分率进行评分,阳性结果未呈淡黄或棕黄色颗粒。评分标准:0 分为无色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;着色细胞率=阳性细胞数/视野内细胞总数×100%,0 分为着色细胞率≤5%,2 分为着色细胞率>10%~25%,3 分为着色细胞率>50%~75%;4 分为着色细胞率>75%。染色度和着色细胞率相加结果:0~1 分为阴性(-),2 分为弱阳性(+),3~4 分为中度阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.5 随访 两组患者均随访 3~48 个月,随访方式为上门随访或电话随访。

1.6 统计学处理 应用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验;计数资料以率表示,采用 χ^2 检验;采用二元多因素 logistic 回归模型进行多因素分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LASS2 蛋白免疫组化染色结果 慢性鼻炎患者鼻黏膜呈现大量棕黄色(++)或褐色(+++)颗粒,见图 1A;鼻咽癌肿瘤细胞内 LASS2 蛋白主要表达于细胞质和细胞核,呈少量阳性细胞,阳性染色结果均呈少量淡黄(+)、棕黄色(++)或无染色(-)颗粒状,见图 1B。



注:A 为慢性鼻炎组;B 为鼻咽癌组
图 1 病理组织免疫组化染色结果(SP,200×)

2.2 两组患者 LASS2 蛋白表达阳性率比较 鼻咽癌组患者 LASS2 蛋白表达阳性率显著低于慢性鼻炎组,差异有统计学意义($\chi^2=39.487, P=0.001$)。见表 1。

表 1 两组患者 LASS2 蛋白表达阳性率比较[n(%)]						
组别	n	染色结果				阳性
		-	+	++	+++	
慢性鼻炎组	154	0(0.0)	44(28.5)	52(33.8)	58(37.7)	154(100.0)
鼻咽癌组	154	35(22.7)	58(37.7)	34(22.1)	27(17.5)	119(77.3) ^a

注:与慢性鼻炎组比较, $\chi^2=39.487, ^aP=0.001$

2.3 术后复发与不复发鼻咽癌患者临床因素比较 154 例鼻咽癌患者中复发 98 例(复发组),未复发 56 例(不复发组)。两组患者的临床分期、病理分期、LASS2 蛋白表达、治疗方式和术后残留比较,差异均

有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 术后复发与不复发鼻咽癌患者临床因素比较[$n(\%)$]

项目	复发组 ($n=98$)	不复发组 ($n=56$)	χ^2	P
年龄(岁)				
<50	60(61.2)	38(67.9)	0.677	0.410
≥50	38(38.8)	18(32.1)		
性别				
男	65(60.7)	33(70.2)	1.264	0.261
女	42(39.3)	14(29.8)		
临床分期				
I、II期	33(33.7)	29(51.8)	4.861	0.027
III、IV期	65(66.3)	27(48.2)		
病理分期				
未分化型非角化性癌	32(32.7)	18(32.1)	8.577	0.014
分化型非角化性癌	19(19.4)	22(39.3)		
鳞状细胞癌	47(48.0)	16(28.6)		
LASS2 表达				
阳性	60(61.2)	52(92.9)	17.978	<0.001
阴性	38(38.8)	4(7.1)		
治疗方式				
手术联合放、化疗	72(73.5)	50(89.3)	5.415	0.020
放、化疗	26(26.5)	6(10.7)		
术后残留				
是	14(14.3)	2(3.7)	4.139	0.042
否	84(85.7)	52(96.3)		

2.4 鼻咽癌患者术后复发与不复发影响因素 logistic 回归模型分析 将单因素分析中有差异的临床分期、病理分期、LASS2 蛋白表达、治疗方式和术后残留纳入多因素 logistic 回归模型进行分析。赋值见表 3。校正临床分期、病理分期、治疗方式和术后残留, LASS2 蛋白表达和术后残留是鼻咽癌患者术后复发的独立危险因素($\chi^2=36.472$, 优势比=0.233, 95% 可信区间:0.166~0.363, $P<0.001$), LASS2 蛋白阳性鼻咽癌患者术后复发风险度是 LASS2 蛋白阴性性的鼻咽癌患者术后复发风险度的 0.233 倍, 即 LASS2 蛋白阴性的鼻咽癌患者术后复发风险更大。见表 4。

表 3 多因素分析赋值

指标	变量	赋值
临床分期	X1	“I、II”=1, “III、IV”=2
病理分期	X2	“未分化型非角化性癌”=1, “分化型非角化性癌”=2, “鳞状细胞癌”=3
LASS2 蛋白表达	X3	“阴性”=1, “阳性”=2
治疗方式	X4	“手术联合放、化疗”=1, “放、化疗”=2
术后残留	X5	“不残留”=0, “残留”=1
复发	Y	“不复发”=1, “复发”=2

表 4 影响鼻咽癌术后复发的多因素分析

影响因素	偏回归 系数	标准误	P	优势比	95%可信区间
临床分期	0.203	2.559	0.110	1.225	0.941~1.577
病理分期	0.363	2.673	0.102	1.437	0.920~2.330
LASS2 蛋白表达	0.831	36.472	<0.001	0.233	0.166~0.363
治疗方式	0.151	1.663	0.197	1.163	0.924~1.464
术后残留	0.801	12.996	<0.001	2.286	1.753~4.007

3 讨 论

鼻咽癌的发生、发展是一个多因素、多阶段、多途径和多机制过程。而体内基因表达失调能改变调控细胞增长和凋亡过程, 导致鼻咽癌的发生。目前, 对鼻咽癌主要通过合理的放疗和规范的综合治疗, 但仍有部分患者出现鼻咽局部或颈部淋巴结引流区域的肿瘤复发。据文献报道, 经首程治疗后 10%~36% 的鼻咽癌患者会出现复发, 复发患者中 65%~85% 的患者发生在治疗后的前 3 年^[13]。但目前对鼻咽癌的复发机制尚未明确, 因此, 缺乏对鼻咽癌术后患者随访中指示鼻咽癌早期复发的分子生物学标志物。

LASS2 基因是近年来新发现的肿瘤相关基因, 目前, 在肝癌^[14]、前列腺癌^[15]、乳腺癌^[16]和膀胱癌^[17] 等均具有不同程度的表达。有研究表明, LASS2 蛋白能抑制肿瘤细胞生长与浸润。LASS2 在鼻咽癌中的相关研究较少见, 特别是在术后复发中几乎没有相关研究。本研究比较了鼻咽癌患者和慢性鼻咽炎患者 LASS2 的表达, 结果显示, 鼻咽癌患者 LASS2 阳性率显著低于慢性鼻咽炎患者, 与王见璋等^[18] 研究结果一致, 鼻咽癌患者缺乏 LASS2 蛋白, 可能更易感染 EB 病毒, 提示 LASS2 具有抑癌基因的作用。

本研究将 154 例鼻咽癌患者按复发与否分为复发组和非复发组进行了分析比较, 结果显示, 两组患者的临床分期、病理分期、LASS2 蛋白表达、治疗方式和术后残留比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。将以上 5 个变量纳入多因素 logistics 回归分析模型, 校正临床分期、病理分期、治疗方式和术后残留后发现, LASS2 表达是影响鼻咽癌患者术后复发的独立影响因素, LASS2 阳性者鼻咽癌术后复发风险是 LASS2 阴性者的 0.233 倍, 即 LASS2 阴性者鼻咽癌术后复发风险更大。有研究发现, LASS2 基因编码的蛋白可通过结合 V-ATPase 质子泵的亚基, 发挥抑制 V-ATPase 质子泵转运 H^+ 的功能, 从而提高细胞内部的 H^+ 的浓度, 激活线粒体中的凋亡信号通路, 诱导细胞凋亡的发生, 进而达到抑制肿瘤细胞无限生长的作用^[19]。同时, 细胞内 H^+ 浓度提高, 细胞外 H^+ 浓度降低, 使得对 H^+ 敏感的蛋白水解酶类活性被抑制, 细胞外基质降解减少, 肿瘤细胞侵袭和转系的风险降低。本研究结果显示, LASS2 阴性鼻咽癌患者术后复

发风险度高于 LASS2 阳性者,提示鼻咽癌患者失去 LASS2 蛋白对肿瘤细胞的抑制与调控,LASS2 表达阴性则易导致肿瘤细胞的侵袭和浸润,发生肿瘤复发,导致不良预后。

4 结 论

LASS2 蛋白表达与鼻咽癌复发负相关,LASS2 阴性鼻咽癌患者术后复发风险更大,提示 LASS2 蛋白可能作为抑癌基因参与鼻咽癌的发生、发展。随访期间常规检测 LASS2 蛋白可能有助于提高肿瘤复发的早期诊断水平,能为临床预测鼻咽癌复发和治疗鼻咽癌提供科学理论依据。

参考文献

[1] 秦雷,杨林.鼻咽癌放射治疗的进展[J].安徽医科大学学报,2012,47(6):720-724.

[2] 邱元正,刘超,李果.鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J].中国耳鼻喉颅底外科杂志,2015,21(6):435-438.

[3] 徐国镇,唐平章,罗京伟.加强以放射治疗为主的鼻咽癌综合治疗研究[J].中华耳鼻喉头颈外科杂志,2012,47(3):177-179.

[4] 钟毓,黎静,赖日权.鼻咽癌相关分子标志物研究进展[J].实用医学杂志,2010,26(21):4029-4031.

[5] 郭俊英.EB 病毒感染与 XRCC1-Arg399Gln 基因多态性在鼻咽癌中的交互作用[D].福州:福建医科大学,2016.

[6] WANG S,FANG W. Increased expression of hepatoma-derived growth factor correlates with poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Histopathology, 2011,58(2):217-224.

[7] FOUNTZILAS G,PSYRRI A,GIANNOULATOU E,et al. Prevalent somatic BRCA1 mutations shape clinically relevant genomic patterns of nasopharyngeal carcinoma in Southeast Europe[J]. Int J Cancer,2018,142(1):66-80.

[8] 张飞,尹述成. Testin 基因在鼻咽癌组织中的表达及其临

床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,30(12):982-985.

[9] PAN H,QIN WX,HUO KK,et al. Cloning,mapping,and characterization of a human homologue of the yeast longevity assurance gene LAG1 [J]. Genomics, 2001, 77(1/2):58-64.

[10] 熊涛,王海峰,王剑松. LASS2 作为一种新的肿瘤标记物的前景展望[J]. 国际泌尿系统杂志,2013,33(6):825-828.

[11] 李玉林. 病理学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2013:95-103.

[12] EDGE S,BYRD D,COMPTON C,et al. AJCC cancer staging handbook [M]. 7th ed. New York,NY:Springer, 2010.

[13] 卢泰祥,韩非,李嘉欣. 复发鼻咽癌临床研究进展[J]. 中国癌症杂志,2008,18(9):661-666.

[14] GU D,JIN H,JIN G,et al. The asialoglycoprotein receptor suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma via LASS2-mediated inhibition of V-ATPase activity[J]. Cancer Lett,2016,379(1):107-116.

[15] 徐晓艳,由江峰,裴斐. RNA 沉默 LASS2/TMSG1 基因促进人前列腺癌细胞侵袭和转移的分子机制[J]. 中华病理学杂志,2014,43(3):177-183.

[16] 夏冰心,韩涛. LASS2 在乳腺癌中的表达及其与患者预后的关系[J]. 医学临床研究,2013,30(9):1671-1674.

[17] 卫伟,王海峰,王剑松. LASS2 的研究现状及其在膀胱肿瘤的应用前景[J]. 医学信息,2014,27(4 下):609-610.

[18] 王见璋,黄金凤,李炜霞,等. LASS2 在鼻咽癌中的表达及其意义[J]. 临床与病理杂志,2017,37(3):564-569.

[19] 唐宁,金洁,邓云. 人源性长寿保障基因 2 通过与 V-ATPase 作用抑制肝癌细胞的生长[J]. 生理学报,2010,62(3):196-202.

(收稿日期:2018-05-26 修回日期:2018-08-20)

(上接第 2892 页)

[10] LIU Y,LI X,MA C,et al. Serum anti-PLA2R antibody as a diagnostic biomarker of idiopathic membranous nephropathy:the optimal cut-off value for Chinese patients [J]. Clin Chim Acta,2018,476:9-14.

[11] DEBIEC H,RONCO P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy [J]. N Engl J Med,2011,364(7):689-690.

[12] KANIGICHERLA D,GUMMADOVA J,MCKENZIE EA,et al. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy [J]. Kidney Int,2013,83(5):940-948.

[13] 张晓婷,刘东伟,刘章锁. 特发性膜性肾病发病机制的研究进展[J]. 实用医学杂志,2016,32(4):670-672.

[14] DE VRIESE A S,GLASSOCK R J,NATH K A,et al. A proposal for a serology-based approach to membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(2): 421-

430.

[15] BEHNERT A,SCHIFFER M,MÜLLER-DEILE J,et al. Antiphospholipase A2 receptor autoantibodies:a comparison of three different immunoassays for the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy[J]. J Immunol Res, 2014,2014:143274.

[16] SVOBODOVA B,HONSOVA E,RONCO P,et al. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant,2013,28(7):1839-1844.

[17] HOXHA E,KNEI? LER U,STEGE G,et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy[J]. Kidney Int,2012,82(7):797-804.

(收稿日期:2018-05-20 修回日期:2018-08-23)