

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.003

NOTUM 基因在骨肉瘤中的表达及临床意义

解克非, 金 铎, 李大鹏, 黄海生

辽宁电力中心医院骨科, 辽宁沈阳 110004

摘 要:目的 探究 NOTUM 基因在骨肉瘤中的表达及临床意义。方法 选取 2011 年 3 月至 2014 年 4 月来该院就诊的 68 例骨肉瘤患者,术中取其癌组织作为试验组,取其正常骨骼肌组织作为对照组。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 NOTUM mRNA 表达情况,采用免疫组织化学法检测 NOTUM 蛋白表达情况,采用 Cox 回归分析影响骨肉瘤的预后因素。分析 NOTUM 表达与骨肉瘤病理特征的关系,以及 NOTUM 表达对骨肉瘤患者生存情况的影响。结果 试验组 NOTUM mRNA 和 NOTUM 蛋白表达均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$);骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 蛋白阳性率与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径和病理类型无关($P>0.05$),与 Enneking 分期和远处转移有关($P<0.05$);NOTUM 蛋白阴性患者 5 年生存率明显高于阳性患者,差异有统计学意义($P<0.05$);Cox 回归分析显示,NOTUM 表达、Enneking 分期和远处转移均是影响骨肉瘤患者预后的危险因素($P<0.05$),其中 NOTUM 表达和远处转移均是影响骨肉瘤患者预后的独立危险因素。结论 骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 呈高表达,其表达与 Enneking 分期和远处转移有关,是影响骨肉瘤患者预后的独立危险因素,且与患者预后密切相关,有望成为骨肉瘤的潜在治疗靶点。

关键词:NOTUM 基因; 骨肉瘤; 表达; 预后; 危险因素

中图法分类号:R738.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)12-1640-04

Expression and clinical significance of NOTUM gene in osteosarcoma

XIE Kefei, JIN Duo, LI Dapeng, HUANG Haisheng

Department of Orthopedics, Liaoning Electric Power Center Hospital, Shenyang, Liaoning 110004, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of NOTUM gene in osteosarcoma and its clinical significance. **Methods** Totally 68 patients with osteosarcoma in our hospital from March 2011 to April 2014 were selected, and the cancer tissue was taken as experimental group during operation, and the normal skeletal muscle tissue was taken as the control group. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and immunohistochemistry was used to detected the mRNA level and protein expression level of NOTUM. Cox regression analysis was used to analyze the prognostic factors of osteosarcoma. The relationship between NOTUM expression and pathological features of osteosarcoma and the influence of NOTUM expression on the survival of osteosarcoma patients were analyzed. **Results** The mRNA and protein expressions level of NOTUM in the experimental group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The positive rate of NOTUM protein in osteosarcoma tissue was not related to age, sex, location, diameter and pathological type ($P>0.05$), but was related to Enneking stage and distant metastasis ($P<0.05$). The 5-year survival rate of NOTUM protein-negative patients was significantly higher than that of NOTUM protein-positive patients ($P<0.05$). Cox regression analysis showed that the expression of NOTUM, Enneking stage and distant metastasis were risk factors for the prognosis of osteosarcoma patients ($P<0.05$), and the expression of NOTUM and distant metastasis were independent risk factors for the prognosis of osteosarcoma patients. **Conclusion** NOTUM is high expression in osteosarcoma tissue, which is related to Enneking stage and distant metastasis. Meanwhile, it is an independent risk factor affecting the prognosis of osteosarcoma patients and is closely related to the prognosis of patients, so it is expected to become a potential therapeutic target for osteosarcoma.

Key words: NOTUM gene; osteosarcoma; expression; prognosis; risk factor

骨肉瘤多发于儿童和青少年,是常见的原发性骨恶性肿瘤,易发生转移。骨肉瘤常见于股骨远端(43%)、胫骨近端(23%)或肱骨(10%),患者会产生剧烈疼痛或病理性骨折等现象,15%~20%的患者伴

有病灶转移^[1]。近年来,随着新型辅助化疗的应用,骨肉瘤 5 年生存率从 20% 提高至目前的 50%~70%,但仍有部分患者会面临截肢或死亡危险^[2]。因此,探讨骨肉瘤发病机制,寻找影响骨肉瘤发展、预后

等关键基因,有可能为骨肉瘤的治疗带来新思路。NOTUM 基因最初在果蝇体内发现,参与脊椎动物胚胎时期动物神经和头部生长^[3]。NOTUM 基因在人体内作为磷脂酰聚糖磷脂酶存在,能够抑制 Wnt 信号通路,从而影响细胞增殖、分化和凋亡等生理学活动^[4]。有报道指出,NOTUM 基因在多种肿瘤中呈高表达。胡翀等^[5]研究显示,NOTUM 基因在胃癌组织中呈高表达,阳性表达患者的生存时间明显低于阴性表达者,可能成为胃癌预后的潜在标志物。目前鲜见关于 NOTUM 基因在骨肉瘤中的作用的报道,因此,本研究将探讨 NOTUM 基因在骨肉瘤中的表达及临床意义,以期为骨肉瘤的治疗提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 3 月至 2014 年 4 月来本院就诊的 68 例骨肉瘤患者,取其癌组织作为试验组,取其正常骨骼肌组织作为对照组。68 例骨肉瘤患者中男 43 例,女 25 例;年龄 8~47 岁,平均(21.54±8.32)岁。按肿瘤部位分为胫骨/股骨 55 例,其他部位 13 例;按 Enneking 分期^[6]分为Ⅰ~ⅡA 期 27 例,ⅡB~Ⅲ期 41 例;按有无远处转移分为有远处转移 24 例,无远处转移 44 例;按病理类型分为骨母细胞型 27 例,软骨母细胞型 12 例,纤维母细胞型 22 例,其他类型 7 例。纳入标准:(1)病理切片确诊为骨肉瘤者;(2)术前未进行放、化疗及药物治疗者;(3)临床资料、随访资料完整者;(4)患者及其家属知情同意,并签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他恶性肿瘤者;(2)合并心脏、肝、肾等疾病者;(3)自身免疫性疾病者。对骨肉瘤患者进行随访,为期 5 年,从术后第 1 天起,定期记录患者的生存状况,随访日期截至 2019 年 5 月 1 日,存活 45 例,死亡 23 例,无失访病例。本研究经本院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 TRIzol Reagent(货号:15596018)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,One Step RT-PCR Kit(货号:210212)购自德国 Qiagen 公司,Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(货号:K1622)购自北京百诺威生物科技有限公司,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)仪(T100 型)购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司,兔抗人 NOTUM 多克隆抗体(货号:NBP2-33670)购自美国 Novus Biologicals 公司,免疫组化试剂盒(通用型,货号:AAPR389-A100)购自广州沛瑜生物制品有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 取骨肉瘤患者术中癌组织作为试验组,取其正常骨骼肌组织作为对照组。将所有的组织样本分为 2 份,一份用于制作石蜡切片;另一份用于 RNA 抽提,存于-80℃冰箱。

1.3.2 qRT-PCR 测定骨肉瘤组织中 NOTUM mRNA 的表达 于-80℃冰箱取出组织样本,将样本剪碎装入试管中,加入 1 mL TRIzol 破碎匀浆,按照

TRIzol RNA 提取说明书提取组织中总 RNA,将所得 RNA 溶于 RNase Free H₂O,检测其纯度及浓度。按照 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录,所得 cDNA 置于-20℃保存。qRT-PCR 反应体系 20 μL: 2×SYBR Green PCR Master Mix 10 μL,上、下游引物各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,H₂O 6 μL。每个样品做 3 个复孔。根据目的基因设计对应的引物,以 β-actin 为内参,引物序列见表 1。反应条件:94℃ 60 s,95℃ 15 s,60℃ 15 s,共 40 个循环。根据各样本的平均 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 NOTUM mRNA 相对表达量。

表 1 NOTUM 及内参基因 β-actin 引物序列	
引物	序列
NOTUM	F:5'-ACTCGCACAGGCACAGGGA-3'
	R:5'-GCCCCGCTCCAAACATCACT-3'
β-actin	F:5'-AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC-3'
	R:5'-CTGGGCCTCGTCGCCACATA-3'

1.3.3 免疫组化检测骨肉瘤组织中 NOTUM 蛋白的表达情况 石蜡切片脱蜡水化:将切片置于柠檬酸缓冲液中,96℃加热 10 min,加 3% H₂O₂ 常温孵育 15 min,加 EDTA 修复液,抗原热修复完成,自然冷却后采用 PBS 冲洗 5 min,重复 3 次,滴加一抗工作液于湿盒中孵育过夜,PBS 冲洗 5 min,重复 3 次,加入二抗孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min,重复 3 次,用二氨基联苯胺(DAB)显色,显色成功后,蒸馏水冲洗,经复染、脱水、透明处理后,封片镜检。结果判定:细胞核或细胞质中存在棕色或棕黄色颗粒即为阳性细胞,在镜下观察切片,随机选取 5 个视野计数阳性细胞数,1 分为阳性细胞数<10%,2 分为 10%~<50%,3 分为 50%~<80%,4 分为≥80%。根据染色强度:1 分为轻度染色,2 分为中度染色,3 分为强染色。每例样本的总分=阳性细胞率×染色强度,总分 1~3 分记为阴性,4~12 分记为阳性。

1.4 统计学处理 采用统计学软件 SPSS22.0 对数据进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料用率或构成比表示,采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 曲线绘制骨肉瘤患者的生存曲线,采用 Cox 回归分析影响骨肉瘤的因素。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 qRT-PCR 测定组织中 NOTUM mRNA 表达量 试验组 NOTUM mRNA 的相对表达量(2.62±0.95)明显高于对照组(0.76±0.28),差异有统计学意义(*t*=15.487,*P*<0.001)。

2.2 两组 NOTUM 蛋白表达情况 试验组 NOTUM 蛋白的阳性表达率为 61.76%(42/68),明显高于对照组的 8.82%(6/68),差异有统计学意义($\chi^2 =$

39.441, $P<0.001$).

表 2 骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 表达与临床病理特征的关系[$n(\%)$]					
临床病理参数	n	NOTUM		χ^2	P
		阳性($n=42$)	阴性($n=26$)		
年龄(岁)				0.017	0.896
<18	49	31	18		
≥ 18	19	11	8		
性别				1.009	0.315
男	43	29	14		
女	25	13	12		
肿瘤部位				0.942	0.332
胫骨/股骨	55	36	19		
其他	13	6	7		
肿瘤直径(cm)				1.282	0.258
<8	36	25	11		
≥ 8	32	17	15		
Enneking 分期				4.537	0.033
I ~ II A	27	12	15		
II B~ III	41	30	11		
远处转移				12.154	<0.001
有	24	22	2		
无	44	20	24		
病理类型				0.464	0.927
骨母细胞型	27	18	9		
软骨母细胞型	12	7	5		
纤维母细胞型	22	13	9		
其他类型	7	4	3		

2.3 骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 表达与临床病理特征的关系 骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 蛋白阳性率与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径和病理类型无关($P>0.05$),与 Enneking 分期和远处转移有

关($P<0.05$)。见表 2。

2.4 骨肉瘤癌组织中 NOTUM 表达与患者预后的关系 对骨肉瘤患者随访 60 个月,生存 45 例,死亡 23 例。绘制骨肉瘤患者术后 1~60 个月 NOTUM 阳性、阴性患者的生存曲线。NOTUM 阳性患者及阴性患者 5 年的总生存率分别为 57.14%(24/42)、80.77%(21/26),二者比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

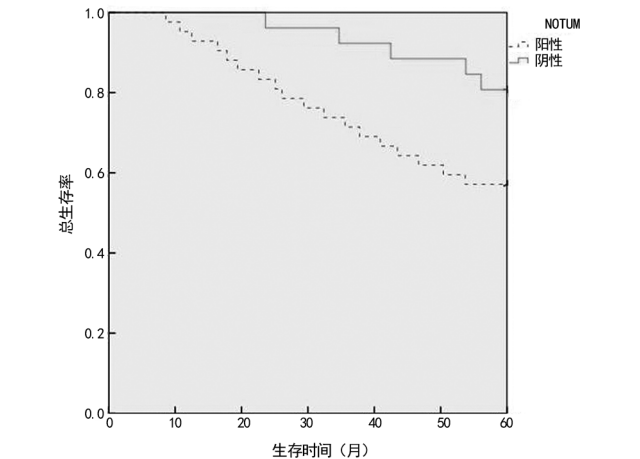


图 1 骨肉瘤癌组织中 NOTUM 表达阴性、阳性患者 5 年生存曲线

2.5 影响骨肉瘤患者预后的因素分析 单因素分析显示,NOTUM 表达、Enneking 分期和远处转移均是影响骨肉瘤患者预后的危险因素。多因素分析显示,NOTUM 表达和远处转移均是影响骨肉瘤患者预后的独立危险因素。见表 3。

表 3 影响骨肉瘤患者预后的因素分析						
变量	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
NOTUM 表达(阳性/阴性)	2.71	1.59~4.62	<0.001	2.28	1.34~3.87	0.005
Enneking 分期(I ~ II A/ II B ~ III)	2.28	1.48~3.51	<0.001	1.62	0.84~3.12	0.128
远处转移(有/无)	2.62	1.65~4.17	<0.001	1.82	1.29~2.58	0.021

注:HR 为风险比。

3 讨 论

骨肉瘤是最常见的骨癌,在儿童和青年中发病率较高,恶性程度高,复发率、转移率高,其特征是肿瘤细胞直接形成未成熟骨或类骨质组织^[7]。常见临床症状包括骨骼疼痛及肿胀,严重影响患者生活质量。骨肉瘤的发生、发展受多因子、多基因调控,染色体异常、转录因子调控异常和抑癌基因失活等都可能诱发骨肉瘤^[8]。骨肉瘤的新辅助化疗已取得长足进步,但仍有不少患者会出现化疗耐药性或肺转移,造成患者死亡^[9]。骨肉瘤的发病机制还未完全明确,目前仍缺乏有效的临床预后指标。

人 NOTUM 基因最早的名称为 LOC147111,是

一种 α 水解酶,位于人染色体 17q25.3 处,含有 11 个外显子^[10]。NOTUM 基因表达可影响 Wnt 信号通路的传导,从而在肿瘤和其他疾病中发挥作用。Wnt 信号通路在指导胚胎发育过程中的细胞生理活动中至关重要,在调节成年组织稳态中同样起重要作用,且 Wnt 信号的异常激活能够启动编码癌蛋白和细胞周期调节因子基因,从而影响细胞增殖^[11]。Wnt 信号转导的异常激活与许多癌症有关,Wnt 信号转导活性下降,可导致伤口愈合和结构形成不良^[12]。已有研究证明,Wnt 信号传导异常涉及多种不同类型的癌症。研究表明,NOTUM 基因具有一个特殊的结构,状似一个疏水口袋,能够容纳不饱和脂肪酸及其酶活性的

性质,此特点可保证 NOTUM 基因优先作用于 Wnt 蛋白,从而影响 Wnt 信号通路^[13]。TORISU 等^[14]研究发现,NOTUM 基因在肝癌中呈高表达,其高表达与细胞内 β -catenin 蛋白的积累显著相关,证明 NOTUM 基因在 Wnt/ β -catenin 信号激活的肝癌组织中表达上调。DE ROBERTIS 等^[15]研究表明,NOTUM 基因在小鼠结直肠癌组织中呈高表达,其表达与 β -catenin 蛋白表达呈正相关,但其具体作用部位还未明确。

本研究检测 NOTUM 基因在骨肉瘤组织中的表达,结果显示,试验组 NOTUM mRNA 和蛋白表达均明显高于对照组,提示高 NOTUM 基因和蛋白表达可能在骨肉瘤的发生、发展中发挥作用;骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 蛋白阳性率与患者年龄、性别、肿瘤部位、肿瘤直径和病理类型无关,与 Enneking 分期和远处转移有关,提示 NOTUM 表达可能会影响骨肉瘤患者部分病程进展;绘制骨肉瘤患者术后 1~60 个月生存曲线,结果表明,NOTUM 蛋白阴性患者 5 年生存率明显高于阳性患者,提示 NOTUM 阳性表达对骨肉瘤患者起预后不良效果;Cox 回归分析显示,NOTUM 表达、Enneking 分期和远处转移均是影响骨肉瘤患者预后的危险因素,其中 NOTUM 表达和远处转移均是影响骨肉瘤患者预后的独立危险因素,提示抑制 NOTUM 表达可能会改善骨肉瘤患者的预后状况。

综上所述,骨肉瘤患者癌组织中 NOTUM 呈高表达,其表达与 Enneking 分期和远处转移有关,是影响骨肉瘤患者预后的独立危险因素,与患者预后密切相关,有望成为骨肉瘤的潜在治疗靶点。但本研究纳入样本量较少,可能存在一定的局限性,日后将不断扩大样本量,继续深入研究,进一步明确 NOTUM 基因成为骨肉瘤治疗靶点的可行性。

参考文献

[1] ISAKOFF M S, BIELACK S S, MELTZER P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. J Clin Oncol, 2015, 33 (27): 3029-3035.

[2] LI Y J, YAO K, LU M X, et al. Prognostic value of the C-reactive protein to albumin ratio: a novel inflammation-

(上接第 1639 页)

[17] WANG L L, LIN J, LIU K, et al. Intravoxel incoherent motion diffusion-weighted MR imaging in differentiation of lung cancer from obstructive lung consolidation: comparison and correlation with pharmacokinetic analysis from dynamic contrast-enhanced MR imaging[J]. Eur Radiol, 2014, 24(8): 1914-1922.

[18] 党珊, 师卫华, 韩冬, 等. 单、双指数模型扩散加权成像对非小细胞肺癌 Ki-67 表达的预测价值[J]. 磁共振成像,

based prognostic indicator in osteosarcoma[J]. Onco Targets Ther, 2017, 10(10): 5255-5261.

[3] ROBERTS-GALBRAITH R H, NEWMARK P A. Follistatin antagonizes activin signaling and acts with notum to direct planarian head regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(4): 1363-1368.

[4] MADAN B, KE Z, LEI Z D, et al. NOTUM is a potential pharmacodynamic biomarker of Wnt pathway inhibition[J]. Oncotarget, 2016, 7(11): 12386-12392.

[5] 胡翀, 张珂诚, 高云鹤, 等. NOTUM 基因在胃癌组织中的表达及临床病理意义[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(2): 379-385.

[6] 徐万鹏. 骨与软组织肿瘤[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 346-351.

[7] WANG Z L, HE R Z, XIA H S, et al. MicroRNA-101 has a suppressive role in osteosarcoma cells through the targeting of c-FOS[J]. Exp Ther Med, 2016, 11(4): 1293-1299.

[8] 刘军, 杨钟华, 张山锋, 等. 非肌肌球蛋白重链-9 在骨肉瘤组织中的表达及其对细胞上皮间质转换和侵袭能力的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(6): 606-610.

[9] 任可, 姚楠, 陆军, 等. 黏着斑激酶在骨肉瘤中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(10): 474-482.

[10] PHILIPPE F, PELLOUX J, RAYON C. Plant pectin acetyltransferase structure and function: new insights from bioinformatic analysis[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 456-460.

[11] 肖秀英, 张孟红. Wnt 信号通路在肿瘤调控方面的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 14-18.

[12] LEE H J, ZHANG X, ZHENG J J. Inhibiting the Wnt signaling pathway with small molecules[J]. Protein Soci, 2017, 26(4): 650-661.

[13] 胡翀, 张珂诚, 高云鹤, 等. NOTUM 基因与消化系统肿瘤的研究进展[J]. 中国研究型医院, 2017, 4(5): 14-16.

[14] TORISU Y, WATANABE A, NONAKA A, et al. Human homolog of NOTUM, overexpressed in hepatocellular carcinoma, is regulated transcriptionally by beta-catenin/TCF[J]. Cancer Sci, 2008, 99(6): 1139-1146.

[15] DE ROBERTIS M, ARIGONI M, LOIACONO L, et al. Novel insights into Notum and glypicans regulation in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6 (38): 41237-41257.

(收稿日期: 2019-10-06 修回日期: 2020-03-07)

2019, 10(1): 28-32.

[19] 张丹, 陈康, 谯智慧, 等. 表观弥散系数与非小细胞肺癌预后分子生物学指标的相关性分析[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(9): 913-918.

[20] 陈爱萍, 刘士远, 于红, 等. 表观扩散系数预测非小细胞肺癌预后的初探[J]. 医学影像学杂志, 2014, 24(9): 1499-1503.

(收稿日期: 2019-10-08 修回日期: 2020-03-31)