

吉西他滨联合顺铂新辅助化疗对非小细胞肺癌 TXNIP 基因表达的影响

刘桂军, 胡名松*

(南华大学附属第二医院胸心外科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 研究吉西他滨联合顺铂新辅助化疗对非小细胞肺癌硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)基因表达的影响。**方法** 获取非小细胞肺癌(NSCLC)患者化疗前的肿瘤标本及采用吉西他滨联合顺铂(GP)方案新辅助化疗2个周期后的肿瘤标本,通过实时定量PCR法、免疫组化及Western blot分析标本中TXNIP表达的变化。并取一部分正常肺组织做为对照。**结果** 正常人肺组织中TXNIP呈一定水平表达,相比之下,NSCLC患者癌标本中TXNIP信使RNA(mRNA)显著降低。当患者经2周期GP方案化疗后,癌标本中TXNIP mRNA表达水平明显增高;再次免疫组化及Western blot法检测结果显示,正常人群肺组织中TXNIP呈一定量的表达,而NSCLC患者癌标本中TXNIP表达量极低。但经GP方案治疗后,癌标本中TXNIP的含量增高。**结论** 吉西他滨联合顺铂化疗能上调非小细胞肺癌TXNIP基因和蛋白的表达。

关键词: 吉西他滨; 顺铂; 硫氧还蛋白结合蛋白; 非小细胞肺癌

中图分类号:R734.2 文献标识码:A

Effect of the neo-adjuvant chemotherapy of the combination of gemcitabine and cisplatin on txnip expression in non-small cell lung cancer cells

LIU Guijun, HU Mingsong

(Department of Cardiothoracic surgery, The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of gemcitabine and cisplatin therapy on TXNIP expression in non-small cell lung cancer cells. **Methods** The healthy populations were collected, and non-small cell lung cancer patients were administrated with two course of gemcitabine and cisplatin, then the clinical specimens were collected before and after the treatment. The Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) was detected by real time PCR, the protein were measured by immunohistochemistry and western blot. **Result** The mRNA of TXNIP in the healthy populations expressed to a certain level. In contrast, the TXNIP mRNA in NSCLC patients was lower than that in healthy control. After two courses of gemcitabine and cisplatin treatment, the TXNIP mRNA was gradually increased; Immunohistochemistry demonstrated that in the lung of the healthy population, TXNIP was expressed to a certain level, while it decreased in NSCLC patients. Gemcitabine and cisplatin administration could increase its expression level. **Conclusion** The combination of gemcitabine and cisplatin can upregulate TXNIP gene and protein expression in non small cell lung cancer patients.

Key words: Gemcitabine; Cisplatin; Thioredoxin-interacting protein; non-small cell lung cancer

肺癌我国最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率和发病率均占有所有恶性肿瘤的第一位,其中约80%患者为

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。目前治疗NSCLC以手术切除方法疗效最好,但约80%的患者在就诊时就已为中晚期,错过了手术机会。为了提高ⅢA/ⅢB期患者手术切除率,近年来提倡新辅助化疗(neoadjuvant or primary chemotherapy)^[1]。有研究表明吉西他滨联合顺铂新辅助化疗方

收稿日期:2016-07-23;修回日期:2016-12-21

基金项目:湖南省卫生计生厅科研课题资助(编号:B2014-057)。

* 通讯作者, E-mail: nanhua2h@126.com.

案可明显提高非小细胞肺癌患者的疗效,而且没有出现与化疗相关的死亡病例,被认为是目前应用最广泛、疗效最显著的晚期联合化疗方案之一^[2]。治疗以 2 周期为宜^[3]。研究表明,人体多种肿瘤的发生与 TXNIP 的低表达有关,在胃癌、肝细胞癌、黑色素瘤等不同的癌细胞中, TXNIP 表达低于正常人群^[4]。TXNIP 基因可通过不同的机制发挥作用,最终直接影响肿瘤细胞的进展和愈后^[5]。TXNIP 基因在应用吉西他滨联合顺铂方案新辅助化疗的非小细胞肺癌组织中的表达情况如何,尚未见文献报道。本文拟通过观察非小细胞肺癌应用吉西他滨联合顺铂方案新辅助化疗 2 个周期后 TXNIP 基因的变化,探讨吉西他滨联合顺铂方案新辅助化疗在非小细胞肺癌综合治疗过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 40 例非小细胞肺癌患者均通过病理学确诊,按照国际 TNM 分期,其中 IIIA 期 28 例,IIIB 期 12 例。其中女性 18 人,男性 22 人,年龄 43~64 岁,中位年龄 52 岁;其中鳞癌 15 例,腺癌 19 例,其他类型非小细胞肺癌 6 例;其中不吸烟者 19 例,吸烟者 21 例。选择经询问病史及相关检查证实无其他器官基础疾病的人体肺组织,作为正常对照(经过医院伦理协会通过批准,患者及家属知情同意情况下,取外伤病人,行肺组织切除治疗的,保留小部分正常肺组织)。

入选标准:①病理学上符合非小细胞肺癌;②病理分期为 IIIA、IIIB 期;③采用 GP 方案新辅助化疗 2 周;④患者所有资料保持完整(含联系方式)。

剔除标准:①患者伴有其他恶性肿瘤;②化疗 2 周期后未实施肺癌根治术;③术前使用其他抗肿瘤治疗方法;④曾经使用过其他化疗方案治疗者。

1.2 治疗方法 40 例患者均为初治患者,予以吉西他滨联合顺铂(GP)化疗方案化疗;按每平方体表面积确定用药剂量,即吉西他滨 1 000 mg/m²,化疗第 1 天与第 8 天,静脉滴注;顺铂 25 mg/m²,化疗第 1、2、3 天,静脉滴注,21 天为 1 个周期。所有患者接受 2 个周期的治疗,通过 CT 评估其疗效。将手术后切除的肺癌标本送检。

1.3 指标检测方法 获取非小细胞肺癌(NSCLC)患者化疗前的肿瘤标本及采用吉西他滨联合顺铂(GP)方案新辅助化疗 2 个周期后的肿瘤

标本,通过实时定量 PCR 法、免疫组化及 Western blot 分析标本中 TXNIP 表达的变化。并取一部分正常肺组织做为对照。

1.4 统计学方法 所有数据结果重复 3 次。计量资料采用 SPSS 18.0 软件分析数据。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 GP 治疗方案对 TXNIP mRNA 表达的影响

正常人肺组织中 TXNIP mRNA 呈一定水平表达,相比之下, NSCLC 患者体内 TXNIP mRNA 显著降低。当患者经 2 周期 GP 方案治疗后, TXNIP mRNA 表达水平明显增高(图 1)。

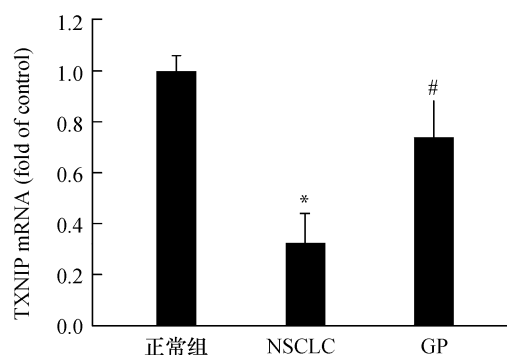


图 1 GP 治疗方案对 NSCLC 患者 TXNIP mRNA 表达的影响

与正常组比较, *: $P < 0.05$; 与治疗前 NSCLC 比较, #: $P < 0.05$

2.2 GP 治疗方案对组织中 TXNIP 表达的影响 免疫组化结果显示,正常人群肺组织中 TXNIP 呈一定量的表达,而 NSCLC 患者肺组织中 TXNIP 表达量极低。而经 GP 治疗后, TXNIP 的含量有所增高(图 2)。

2.3 GP 治疗方案对细胞 TXNIP 表达的影响

Western blot 显示,正常组中 TXNIP 表达较高,而 NSCLC 患者中呈低表达。而 GP 治疗 2 周期后,与 NSCLC 组相比,表达水平有所增高(图 3)。

3 讨 论

近几十年来,肺癌已成为最常见的恶性肿瘤。病理学上以非小细胞肺癌(NSCLC)最多。大部分患者确诊时已丧失手术治疗的机会。为了提高ⅢA/

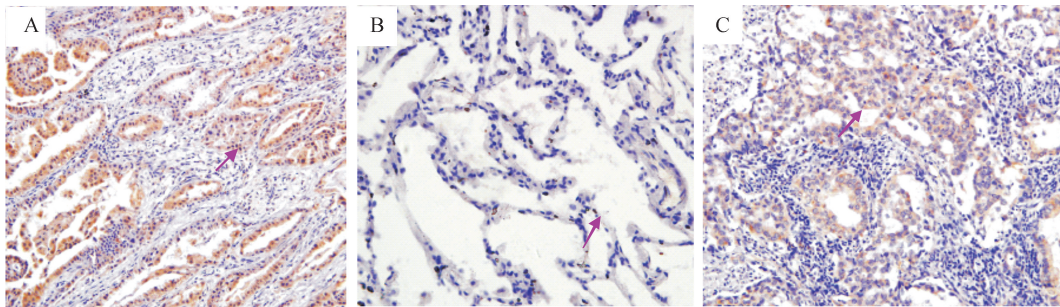


图2 免疫组化检测 TXNIP 蛋白表达(100×) A:正常组; B:NSCLC; C:GP

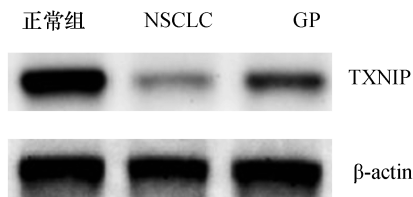


图3 Western blot 检测 NSCLC 中 TXNIP 表达

ⅢB 期患者手术率,近年来提倡新辅助化疗,即对恶性肿瘤进行手术或放疗等局部治疗前进行的化疗,又称原发化疗、诱导化疗或术前化疗。新辅助化疗结合手术治疗非小细胞肺癌是目前医学界研究的热点,其作用主要包括以下几方面:(1)缩小肺癌原发灶,增加手术切除率和提高中晚期的生存率;(2)减少肺癌的分期(T和N);(3)清除可能已发生转移的肺癌;(4)可评估药物的敏感性。

TXNIP 基因最初是通过用 1,25 二羟基维生素 D-3(1,25-(OH)₂D₃) 作用人类白血病(Human leukemia)细胞系 HL-60 中而发现的^[6],亦称维生素 D₃ 上调蛋白 1(vitamin D₃ up-regulating protein 1, VDUP1),是 α-视紫红质抑制蛋白家族中可与硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)发生结合的唯一蛋白。TXNIP 作为一种新的抑癌基因,已经发现在肝癌、胃肠癌等恶性肿瘤组织中表达水平下调,然而在肺癌中的报道非常少。TXNIP 可与 Trx 半胱氨酸残基结合从而负调控其抗氧化功能。此外, TXNIP 还具有调节代谢平衡和调节生长信号的作用。

吉西他滨属于抗代谢类抗癌药,是目前对治疗 NSCLC 最有效的化疗药之一,主要作用于细胞周期 S 期细胞的特异性药物,可使 DNA 合成减少,且能使抑制细胞从 G₁ 期到达 S 期。吉西他滨常在临床中同其他药物联用尤其是铂类药物联合治疗方法效果均较理想^[7-8]。顺铂(DDP)在抗癌药物中是被应用最广泛之一,属细胞周期非特异性抗肿瘤药,主要

作用是和 DNA 链上碱基发生作用,从而抑制 DNA 复制,减少了肿瘤细胞的分裂。顺铂在抗癌中的作用有较高的抗癌活性,且和其他抗癌药物发生无交叉耐药,故通常采用和其他抗肿瘤药物联合使用^[9]。

目前非小细胞肺癌患者新辅助化疗常采用“吉西他滨+顺铂”(GP)方案。大量研究表明,吉西他滨联合顺铂的新辅助化疗方案可明显提高非小细胞肺癌的临床效果,而且患者对化疗过程中出现的不良反应均能耐受,没有出现化疗相关死亡病例,被认为是目前应用最广泛、疗效最显著的晚期联合化疗方案之一。

为了明确吉西他滨联合顺铂治疗能否影响 TXNIP 的表达,本文通过体内实验进行了观察。结果显示,正常人肺组织中 TXNIP mRNA 呈一定水平表达,相比之下, NSCLC 患者体内 TXNIP mRNA 显著降低。当患者经 2 周期 GP 方案治疗后, TXNIP mRNA 表达水平明显增高。免疫组化和 Western blot 也证实 NSCLC 患者体内 TXNIP 蛋白水平明显低于正常人群。由此可见,吉西他滨联合顺铂治疗可上调 NSCLC 患者 TXNIP 的表达水平。Knoll 等^[10]研究表明 miR-224/452 介导的 TXNIP 低表达可能是上皮间质转化以及肿瘤侵袭的重要机制。Farrell^[11]证实 TXNIP 能调节 HIF 介导的基因转录活性,从而改变 VEGF 的表达而发挥多肿瘤的抑制作用。因此,在吉西他滨联合顺铂新辅助化疗非小细胞肺癌中,高表达的 TXNIP 可能是一种理想的标志物,可能对预测转移和预后具有一定的意义。

综上所述,吉西他滨联合顺铂处理肺癌细胞后,可能通过诱导 TXNIP 基因 mRNA 的表达,从而上调 TXNIP 蛋白的表达水平。随着 TXNIP 基因表达的增强,其对 TrxR 的抑制作用加强,从而抑制了硫氧还蛋白清除活性氧的功能,最终抑制肿瘤的生长。

参考文献:

- [1] Li DP, Li W, Feng J, et al. Adjuvant chemotherapy with sequential cytokine-induced killer (CIK) cells in stage I non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Res*, 2015, 22(2):67-74.
- [2] Fang H, Lin RY, Sun MX, et al. Efficacy and survival-associated factors with gefitinib combined with cisplatin and gemcitabine for advanced non-small cell lung cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(24):10967-10970.
- [3] Wang Y, Chen J, Wu S, et al. Clinical effectiveness and clinical toxicity associated with platinum-based doublets in the first-line setting for advanced non-squamous non-small cell lung cancer in Chinese patients: a retrospective cohort study [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:940.
- [4] Song J, Li J, Hou F, et al. Mangiferin inhibits endoplasmic reticulum stress-associated thioredoxin-interacting protein/NLRP3 inflammasome activation with regulation of AMPK in endothelial cells [J]. *Metabolism*, 2015, 64(3):428-437.
- [5] Woolston CM, Madhusudan S, Soomro IN, et al. Thioredoxin interacting protein and its association with clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinoma [J]. *Redox Biol*, 2013, 1:285-291.
- [6] Hirata Y, Saito M, Tsukamoto I, et al. Analysis of the inhibitory mechanism of D-allose on MOLT-4F leukemia cell proliferation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 107(5):562-568.
- [7] Hayashi H, Kurata T, Nakagawa K. Gemcitabine; efficacy in the treatment of advanced stage nonsquamous non-small cell lung cancer [J]. *Clin Med Insights Oncol*, 2011, 5:177-184.
- [8] Tournoux-Facon C, Senellart H, Lemarie E, et al. Phase I and pharmacokinetic study of IV vinflunine in combination with gemcitabine for treatment of advanced non-small cell lung cancer in Chemonaive patients [J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(7):1247-1253.
- [9] Davidov MI, Polotzky BE, Marenich AF, et al. Gemcitabine combined with cisplatin as neoadjuvant chemotherapy in stage IB-IIIA non-small cell lung cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(6):569-575.
- [10] Knoll S, Furst K, Kowtharapu B, et al. E2F1 induces miR-224/452 expression to drive EMT through TXNIP down-regulation [J]. *EMBO Rep*, 2014, 15(12):1315-1329.
- [11] Farrell MR, Rogers LK, Liu Y, et al. Thioredoxin-interacting protein inhibits hypoxia-inducible factor transcriptional activity [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(9):1361-1367.

(本文编辑:蒋湘莲)

(上接第 56 页)

- [6] Boone S, Gelberman RH, Calfee RP, et al. The management of cubital tunnel syndrome [J]. *J Hand Surg Am*, 2015, 40(9):1897-1904.
- [7] Harder K, Lukschu S, Dunda SE, et al. Results after simple decompression of the ulnar nerve in cubital tunnel syndrome [J]. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW*. 2015, 4:Doc19.
- [8] 施田宝, 仇如来, 张飞, 等. 保留皮神经和尺神经伴行血管的尺神经松解术治疗肘管综合征 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2016, 19(5):95-96.
- [9] He JQ, Ma XL, Zhang X, et al. Three-dimensional Computer-assisted Modeling of Talus Morphology in Chinese Patients [J]. *Orthop Surg*, 2016, 8(3):383-392.
- [10] 李琛, 穆志纯, 张锋, 等. 基于三维人耳形变模型的三维人耳重建 [J]. *北京科技大学学报*, 2013, 5(35):694-702.
- [11] 胡忠林, 王莉, 廖勇, 等. 带血供尺神经前置术的解剖学研究 [J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(5):511-513.

(本文编辑:蒋湘莲)