

论 著
(临床研究)

环指蛋白 8 在鼻咽癌组织中的表达及其与预后的关系

王茂鑫, 陈贤明, 张 贤, 陈 辉, 龚宏勋, 陈十燕, 杨 帆

【摘要】 目的 探讨环指蛋白 8(RNF8)在放疗前和放疗期间鼻咽癌组织中的表达情况及其与预后的关系。方法 选择 2008 年 2 月至 2013 年 2 月解放军联勤保障部队第九〇〇医院(原南京军区福州总医院)鼻咽癌初发患者 68 例,检测鼻咽癌患者肿瘤组织中 RNF8 及共济失调毛细血管扩张突变蛋白(ATM)、DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位(DNA-PKcs)在放疗前和放疗期间的表达,并分析其与预后的关系。结果 接受放疗后,22 例 RNF8 表达阳性,24 例 ATM 表达阳性,26 例 DNA-PKcs 表达阳性,均较放疗前明显升高($P<0.01$)。68 例患者有 20 例残留和复发,总 5 年生存率 62.5%。放疗期间 RNF8 表达与 ATM 表达有较好的一致性,Logistic 回归分析结果显示放疗期间 RNF8 的表达及临床分期与残留和复发密切相关($P<0.05$),COX 回归分析显示放疗期间 RNF8 表达及临床分期对生存时间有显著影响($P<0.01$),放疗期间 RNF8 阳性者 5 年生存率 45.5%,阴性者 5 年生存率为 77.1%。结论 RNF8 是鼻咽癌产生放疗抵抗的一个重要因素,可致放疗后的残留和复发,故可作为判断鼻咽癌预后的指标。

【关键词】 鼻咽癌;环指蛋白 8;残留;复发;预后;放射治疗

【中图分类号】 R739.63 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)02-0147-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.02.007

Expression of RNF8 in nasopharyngeal carcinoma and its relationship with prognosis

WANG Mao-xin, CHEN Xian-ming, ZHANG Xian, CHEN Hui, GONG Hong-xun, CHEN Shi-yan, YANG Fan

(Department of Otorhinolaryngology, the 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the expression of RNF8 in nasopharyngeal cancer during radiotherapy and the relationship to residue, recurrence and prognosis. **Methods** Expression of RNF8, ATM and DNA-PKcs was detected in 68 patients with nasopharyngeal cancer before and during radiotherapy, and the relationship of expression to residue, recurrence and prognosis was analysed. **Results** The expression of RNF8 was positive in 22 patients, ATM in 24 patients, DNA-PKcs in 26 patients after receiving 20 Gy's radiation. The number of positive expression patients increased after radiation ($P<0.01$). There were 20 patients suffering from residue and recurrence. Total five-year survival rate was 62.5%. There was a good consistency between the expression of RNF8 and that of ATM after 20 Gy's radiation. According to Logistic Analysis, clinical stage and the expression of RNF8 after 20 Gy's radiation was closely related to residue and recurrence ($P<0.05$). Cox Analysis showed that clinical stage and the expression of RNF8 after 20 Gy's radiation affected the survival time ($P<0.01$). The five-year survival rate of patients whose expression of RNF8 after 20 Gy's radiation

is positive was 45.5%, while negative patients' five-year survival rate was 77.1%. **Conclusion** RNF8, which can result in residue and recurrence, plays an important role in radioresistance of nasopharyngeal cancer. It can be one of the markers for prognosis.

基金项目:福建省自然科学基金(2015J01485)

作者单位:350025 福州,解放军联勤保障部队第九〇〇医院耳鼻咽喉头颈外科(王茂鑫、陈贤明、张 贤、陈 辉、龚宏勋、陈十燕、杨 帆)

[Key words] nasopharyngeal cancer; RNF8; residue; recurrence; prognosis; radiotherapy

0 引言

鼻咽癌是人体头颈部常见的恶性肿瘤之一,我国东南沿海发病率高,具有发病隐袭、侵袭性强、治疗后容易残留和复发的特点。放射治疗是鼻咽癌的首选治疗方法。但临床观察发现,某些鼻咽癌对放疗的抵抗力强,放疗抵抗和复发一直是鼻咽癌治疗的一个难点和尚未彻底解决的问题^[1-3],因此研究鼻咽癌放疗抵抗的机制,进一步提高鼻咽癌的放疗敏感性具有重要的意义。环指蛋白8(ring finger protein 8, RNF8)是近年来发现的可以进行DNA损伤修复的关键酶,当细胞被放射线损伤时,它可以激活下游一系列与DNA修复有关的因子进行DNA修复,从而使细胞恢复活性^[4]。本研究就放疗前和放疗中RNF8及其下游蛋白的表达变化,分析其与鼻咽癌预后的关系,进行探索RNF8在鼻咽癌放疗抵抗中的作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择2008年2月至2013年2月解放军联勤保障部队第九〇〇医院(原南京军区福州总医院)符合纳入和排除标准的鼻咽癌初发患者共68例,所有病例资料完整。纳入标准:①病理确诊的初发鼻咽癌患者,病理类型为非角化性未分化癌或非角化性分化型癌;②所有患者均曾接受放射治疗;③初次治疗前未发生远处转移。排除标准:①全身情况差,伴有心、肺、脑、肝、肾等重要脏器功能严重障碍者;②不能坚持完成治疗者,或者中断治疗3个月以上者。68例患者中男57例,女11例;年龄18~73岁,平均44.7岁。放疗前病理为非角化型未分化癌47例,非角化型已分化癌21例,根据国际抗癌协会(UICC)2008标准,Ⅰ期10例,Ⅱ期26例,Ⅲ期30例,Ⅳ期2例。对此68例患者进行三维适形放疗,放疗剂量60~70 Gy。放疗后随访2~5年。本研究经医院伦理委员会批准(批准号:2015008),所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法 放疗前及放疗20 Gy后(即放疗期间)均行鼻咽部活检,留取标本,经4%中性甲醛固定,常规石蜡切片,切片厚度4 μm,HE染色请病理科医师确定病变性质。用免疫组化SP法检测组织中

RNF8、ATM及DNA-PKcs的表达。免疫组化SP试剂盒购自中山生物技术公司,RNF8、DNA依赖激酶催化亚单位(DNA-dependent kinase catalytic subunit, DNA-PKcs),单克隆一抗购自Abcam公司(美国),工作浓度1:200,ATM(ataxia telangiectasia-mutated,毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白)单克隆一抗购自Santa Cruz公司(美国),工作浓度1:200,另设以PBS代替一抗的阴性对照。

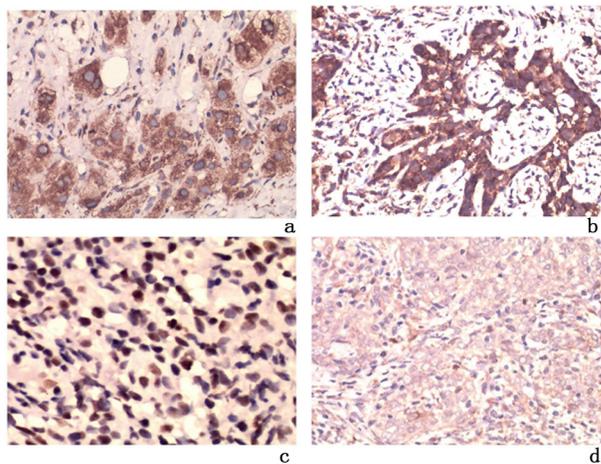
1.3 结果判定 RNF8和ATM以在细胞核和细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞,DNA-PKcs以在细胞核中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。染色结果判定:400倍光镜下随意选取10个视野,计数每个视野中100个肿瘤细胞中阳性细胞数,依据阳性细胞在肿瘤细胞中所占比例分为:阴性,阳性细胞百分比<5%,弱阳性,阳性细胞百分比5%~25%;中阳性,阳性细胞百分比25%~50%;强阳性,阳性细胞百分比>50%^[5]。弱阳性、中阳性和强阳性合为阳性。

1.4 统计学分析 利用SPSS 18.0软件对资料进行统计分析。计数资料用百分率表示。放疗期间与放疗前RNF8、ATM、DNA-PKcs的表达人数差异用单因素计数资料的 χ^2 检验。放疗期间RNF8表达与ATM、DNA-PKcs的相关性进行单因素计数资料双向有序R×C表数据分析,放疗期间RNF8、ATM、DNA-PKcs的表达及肿瘤病理分型和临床分期与残留或复发的相关性进行Logistic回归分析,并进行COX回归分析。用Kaplan-Meier法进行生存分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNF8、ATM、DNA-PKcs的阳性表达 RNF8主要表达于细胞质和细胞膜,ATM主要表达于细胞质;DNA-PKcs主要表达于细胞核;见图1。放疗前有5例患者癌组织中RNF8表达阳性,8例ATM表达阳性,6例DNA-PKcs表达阳性。接受放疗20 Gy后,22例患者RNF8表达阳性,24例ATM表达阳性,26例DNA-PKcs表达阳性,且放疗前表达阳性者均在其中。RNF8、ATM、DNA-PKcs的阳性表达数在放疗后

均较放疗前明显升高($P<0.01$)。



a: RNF8 阳性表达; b: ATM 阳性表达; c: DNA-PKcs 阳性表达; d: RNF8 阴性表达

图1 RNF8、ATM、DNA-PKcs 在鼻咽癌组织中的表达(免疫组化 SP 法 $\times 200$)

2.2 RNF8 与 ATM、DNA-PKcs 表达的相关性 单因素分析表明,放疗期间 RNF8 与 ATM 表达高度相关($r=0.6054, P<0.01$),而与 DNA-PKcs 相关无统计学意义($r=0.3130, P>0.05$),见表 1。

表 1 放疗 20 Gy 后 RNF8 表达与 ATM、DNA-PKcs 表达的相关性分析[n(%)]

指标	RNF8				合计
	阴性	弱阳性	中阳性	强阳性	
ATM					
阴性	40(90.9)	1(2.3)	2(4.5)	1(2.3)	44
弱阳性	3(33.3)	2(22.2)	2(22.2)	2(22.2)	9
中阳性	1(14.3)	1(14.3)	3(42.8)	2(28.6)	7
强阳性	2(25.0)	1(12.5)	2(25.0)	3(37.5)	8
DNA-PKcs					
阴性	33(78.6)	2(4.8)	3(7.1)	4(9.5)	42
弱阳性	8(61.5)	1(7.7)	3(23.1)	1(7.7)	13
中阳性	4(44.4)	1(11.1)	2(22.2)	2(22.2)	9
强阳性	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	1(25.0)	4

2.3 残留和复发及生存时间与 RNF8、ATM、DNA-PKcs 的表达及肿瘤病理分型和分期的相关性 68 例患者有 20 例残留和复发,总 5 年生存率 62.5%。单因素分析表明,残留和复发与放疗前 RNF8、ATM、DNA-PKcs 的表达无明显相关($P>0.05$)。根据

Logistic 回归分析,肿瘤的临床分期和放疗期间 RNF8 表达与残留和复发明显相关($P<0.05$),而 ATM、DNA-PKcs、肿瘤的病理类型与残留和复发无明显相关($P>0.05$),见表 2。COX 回归分析显示肿瘤的临床分期和放疗期间 RNF8 表达情况对生存时间有显著影响($P<0.01$),而 ATM、DNA-PKcs、肿瘤的病理类型未能进入模型,见表 3。Kaplan-Meier 生存曲线表明,放疗期间 RNF8 阴性者 5 年生存率为 77.1%,明显高于阳性者的 45.5%,见图 2。

表 2 残留和复发与放疗 20 Gy 后 RNF8、ATM、DNA-PKcs 表达及临床分期、病理类型的关系的 Logistic 回归分析

参数	估计值	S_x	u 值	OR	95%CI	P 值
常数项	-16.469	6.266	2.628	—	—	0.0086
ATM	2.571	1.204	2.135	13.08	1.235~138.613	0.1027
RNF8	4.213	1.785	2.360	67.58	2.042~2236.921	0.0183
DNA-PKcs	-2.374	2.078	1.143	0.09	0.002~5.462	0.2531
病理分型	2.959	2.264	1.307	19.27	0.228~1631.090	0.1913
临床分期	3.274	1.996	1.640	26.43	0.528~1321.902	0.0309

表 3 生存时间与放疗 20 Gy 后 RNF8、ATM、DNA-PKcs 表达及临床分期、病理类型的关系的 COX 回归分析

参数	估计值	S_x	u 值	RR	95%CI	P 值
ATM	1.021	0.296	3.443	1.89	1.552~4.96	0.0538
RNF8	0.636	0.281	2.260	2.77	1.088~3.278	0.0006
DNA-PKcs	0.240	0.198	1.213	1.27	0.862~1.875	0.2251
病理类型	0.421	0.303	1.387	1.52	0.841~2.760	0.1653
临床分期	0.549	0.215	2.557	1.73	1.137~2.638	0.0106

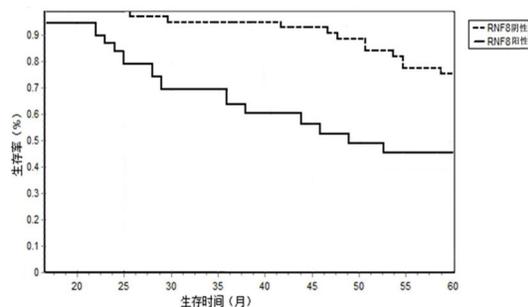


图 2 放疗 20 Gy 后 RNF8 阴性与阳性鼻咽癌患者的生存率比较

3 讨论

鼻咽癌放疗后残留或复发与多种因素有关,

其中肿瘤细胞的放疗抵抗是重要因素。放疗抵抗是由于肿瘤细胞对受到放射线损伤的自身DNA进行修复所导致的,修复后的肿瘤细胞存活了下来,放疗停止后,可以再次分裂增殖,从而导致复发。而DNA的修复是一个复杂的过程,研究发现,人类细胞主要通过两种修复方式来修复损伤的DNA:以DNA依赖蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)为主的非同源性末端连接(DNA nonhomologous end-joining, NHEJ)和以ATM或ATR为主的同源重组(homologous recombination, HR)修复^[6-9]。前者修复的DNA链可来自不同的DNA链,末端连接时仅部分碱基结合即可,而后者来自相同的DNA链,且末端每个碱基完全按照互补配对原则进行连接。

E3泛素连接酶RNF8是近年来发现的一个包含环指结构的核因子家族成员,在DNA损伤应答中扮演关键性的角色^[10-12]。Lu等^[13]发现RNF8介导的多种蛋白的泛素化使Nbs1等分子聚集在损伤位点,通过同源重组启动DNA修复。Wu等^[14]发现RNF8还与Chfr共同参与调控ATM的活性,调节ATM依赖的DNA损伤应答。我们之前的研究发现体外培养的沉默和未沉默RNF8的鼻咽癌细胞接受放射线后,RNF8沉默的细胞凋亡率明显升高,肿瘤生长抑制率也升高,证明RNF8有放疗抵抗作用,并且通过检测ATM的表达揭示了RNF8是激活了ATM为主的HR途径来修复DNA^[15]。本研究发现,鼻咽癌患者接受放疗20 Gy后,RNF8阳性表达人数较放疗前明显升高,说明放射线激活了这部分患者的RNF8。这部分患者放疗后残留或复发率明显高于放疗期间RNF8表达阴性者,表明RNF8导致肿瘤产生了放疗抵抗。而是否残留和复发,与放疗前RNF8的表达情况无明显相关。Logistic回归分析显示只有放疗期间RNF8的表达和临床分期这两个独立因素与复发和残留有关,而与其他因素无关,这说明放疗期间RNF8的表达是影响放疗后残留和复发的关键因素,RNF8表达增高,残留和复发率也升高。同样,临床分期也是关键因素,与陈贤明的研究结果

一致^[16]。而Cox回归分析显示,放疗期间RNF8的表达及临床分期亦是影响生存时间的决定性因素。放疗期间RNF8阳性患者其生存率降低,其预后亦与RNF8表达情况明显相关,这说明放射线激活了RNF8,RNF8导致了肿瘤细胞的放疗抵抗,从而导致肿瘤的残留和复发,进而生存率下降。当然,预后与临床分期亦密切相关,这在以往的文献中也得到了证实^[16]。而放疗期间RNF8与ATM表达明显相关表明RNF8与ATM协同作用导致了肿瘤细胞的放疗抵抗,结合文献及我们之前的研究结果中关于RNF8和ATM关系的描述,可以判断可能是RNF8激活了以ATM为主的HR途径来修复DNA的损伤^[14-15]。而DNA-PKcs表达的患者其残留和复发率亦高,但无统计学意义,表明放疗也激活了NEJM途径,但是否占重要地位还需进一步较大样本的统计。

综上所述,放疗激活了RNF8,泛素化一系列底物,启动了ATM为主的HR途径来修复损伤的DNA,从而导致放疗抵抗和肿瘤的残留和复发。而RNF8亦可做为判断预后的一个指标。放疗抵抗的机制非常复杂,而放射线激活RNF8导致DNA修复可能只是其中一个方面,相信经过努力,鼻咽癌放疗抵抗的机制最终会被完全阐明,从而制定针对性的治疗措施,提高患者生存率。

[参考文献]

- [1] 周方正,陈洁,王小聪,等.鼻咽癌初治患者实施调强放疗的远期疗效及预后影响因素[J].中国临床研究,2018,31(1):81-84.
- [2] 邱元正,刘超,李果.鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2015,21(6):435-438.
- [3] 黄祥,曲超,姜新,等.鼻咽癌的治疗进展[J].中国老年学杂志,2015,35(11):3159-3161.
- [4] Huen M, Grant R, Manke I, et al. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly[J].Cell,2007,131(5):901-914.
- [5] 马大烈,白辰光.免疫组织化学阳性标记结果的观察和判断[J].临床与实验病理学杂志,2003,19(5):557-559.
- [6] Symington L, Gautier J. Double-strand break end resection and

- repair pathway choice[J]. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247-271.
- [7] Santivasi W, Xia F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(2): 251-259.
- [8] Lim Y, Roberts T, Day B, *et al.* Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells[J]. *Mol oncol*, 2014, 8(8): 1603-1615.
- [9] Daley J, Kwon Y, Niu H, *et al.* Investigations of homologous recombination pathways and their regulation[J]. *Yale J Biol Med*, 2013, 86(4): 453-461.
- [10] Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, *et al.* RNF8 ubiquitinates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 887-900.
- [11] Bartocci C, Denchi E. Put a RiNG on it: regulation and inhibition of RNF8 and RNF168 RING finger E3 ligases at DNA damage sites[J]. *Front Genet*, 2013, 4(7): 128.
- [12] Zhou H, Mu X, Chen J, *et al.* RNAi silencing targeting RNF8 enhances radiosensitivity of a non-small cell lung cancer cell line A549[J]. *Int J Radiat Biol*, 2013, 89(9): 708-715.
- [13] Lu C, Truong L, Aslanian A, *et al.* The RING finger protein RNF8 ubiquitinates Nbs1 to promote DNA double-strand break repair by homologous recombination[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(52): 43984-43994.
- [14] Wu J, Chen Y, Lu L, *et al.* Chfr and RNF8 synergistically regulate ATM activation[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(7): 761-768.
- [15] Wang M, Chen X, Chen H, *et al.* RNF8 plays an important role in the radioresistance of human nasopharyngeal cancer cells in vitro[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(1): 341-349.
- [16] 陈贤明, 黄少华, 杨帆, 等. 影响鼻咽癌预后相关因素分析[16]. *东南国防医药*, 2014, 16(6): 584-586.

(收稿日期: 2018-09-22; 修回日期: 2018-12-03)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 吕镗烽)