

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170053

肺癌组织环指蛋白 RNF38 的表达及其临床意义

李继军^{1,2}, 金 淳¹, 熊 点³, 蒋家好¹, 丁建勇^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院胸外科, 上海 200032

2. 新疆维吾尔自治区喀什第二人民医院心胸外科, 喀什 844000

3. 南昌大学第二附属医院心胸外科, 南昌 330006

[摘要] **目的:**探讨肺癌组织环指蛋白 RNF38 的表达及其与肺癌临床病理特征及预后的关系。**方法:**采用组织芯片检测 208 例肺癌组织中 RNF38 蛋白表达, 分析其与肺癌患者临床病理特征及预后的关系。**结果:**肺癌组织 RNF38 表达高于癌旁正常肺组织。不同肿瘤大小 ($P=0.0002$)、不同肿瘤分期 ($P=0.011$)、有无淋巴结转移 ($P=0.0004$) 及不同肿瘤类型 ($P=0.030$) 患者肺癌组织 RNF38 蛋白表达差异有统计学意义。RNF38 高表达预示肺癌患者总生存率低。单因素分析显示 RNF38 表达与肺癌患者预后相关。**结论:**RNF38 高表达与肺癌的恶性表型及不良预后相关。

[关键词] RNF38; 肺癌; 预后**[中图分类号]** R 734.2 **[文献标志码]** A

Expression of RNF38 in lung cancer and its clinical significance

LI Ji-jun^{1,2}, JIN Chun¹, XIONG Dian³, JIANG Jia-hao¹, DING Jian-yong^{1*}

1. Department of Chest Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Cardiothoracic Surgery, Second People's Hospital of Kashgar, Kashgar 844000, the Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

3. Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of RNF38 in lung cancer, and its correlation with clinicopathologic feature and prognosis. **Methods:** Tissue microarray was used to detect the level of RNF38 in 208 lung cancer patients, then its correlation with clinicopathologic feature and prognosis was analyzed. **Results:** RNF38 expression was higher in lung cancer tissues compared with the corresponding adjacent normal lung tissues. High level of RNF38 was related significantly to tumor size ($P=0.0002$), tumor stage ($P=0.011$), lymph node metastasis ($P=0.0004$) and histological type ($P=0.030$). High level of RNF38 indicates low overall survival rate. Single factor analysis showed that RNF38 expression was related to lung cancer patients' prognosis. **Conclusions:** The high level of RNF38 could be a new marker in predicting the prognosis of lung cancer.

[Key Words] RNF38; lung cancer; prognosis

我国肺癌的发病率和死亡率均呈上升态势^[1-2]。因其起病隐匿, 症状和其他呼吸道疾病类似, 且大部分患者无自觉症状者, 一般确诊已是晚期^[3-4]。肺癌的侵袭转移与复发是患者死亡的主要原因。因此, 寻求有效的抗肺癌转移与复发治疗措施, 对改善肺癌患者的预后具有重要意义^[5]。

研究证实泛素化系统的异常与肿瘤发生、神经退行性疾病、免疫及炎症反应等紧密相关^[6]。作为

E3-泛素连接酶, RNF38 通过蛋白-蛋白、蛋白-DNA 相互作用, 参与调节多种生理功能^[7]。其功能异常与肿瘤的发生、细胞信号转导及凋亡等相关^[7]。既往研究^[8]表明, 抑癌基因 p53 是 RNF38 的泛素化底物, RNF38 参与了 p53 的亚细胞定位。因此, 本研究拟在肺癌组织中检测 RNF38 表达, 明确其与肺癌患者临床病理特征以及预后的相关性, 为肺癌的临床诊治提供参考。

[收稿日期] 2017-01-19**[接受日期]** 2017-02-15**[基金项目]** 国家自然科学基金(81201834, 81502502). Supported by National Natural Science Foundation of China (81201834, 81502502).**[作者简介]** 李继军, 硕士, 副主任医师. E-mail: 1256239505@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: ding.jianyong@zs-hospital.sh.cn

1 材料与方法

1.1 组织标本的获取 选取2005年1月至2005年12月,在复旦大学附属中山医院胸外科行肺癌切除术的208例患者的肺癌组织石蜡标本。组织芯片的制作由上海芯超生物科技有限公司完成。肺癌的诊断标准按照世界卫生组织(WHO)标准,所有病例均有完整随访资料。随访截止至2010年3月。本研究通过医院伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂 兔抗人RNF38多克隆抗体购自Proteintech公司;SP试剂盒、DAB试剂、二甲苯、3%过氧化氢、中性树胶、苏木精溶液、无水乙醇与1%盐酸乙醇购自上海翊圣生物科技有限公司。

1.3 免疫组化染色及结果判定 组织芯片60℃高温烤片2 h;二甲苯脱蜡,梯度乙醇后水化及磷酸缓冲液洗片3次;芯片完全浸入pH 6.0的柠檬酸液中,放入高压锅抗原修复,磷酸缓冲液洗片3次;3%过氧化氢室温孵育除去内源性过氧化物酶活性,磷酸缓冲液洗片;室温BSA封闭30 min;甩去血清,滴加抗RNF38抗体(1:200),4℃冰箱孵育24 h;磷酸缓冲液浸洗,滴加辣根过氧化物酶二抗,室温孵育60 min,磷酸缓冲液浸洗;滴加新鲜配制的DAB显色液,显微镜观察,控制显色时间,自来水浸洗中止显色,苏木精复染30 s,水洗返蓝20 min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明;中性树胶封片。结果判定标准:RNF38的判定以胞质与核中出现棕黄色颗粒为显色,使用IPP检验来判断RNF38的高低表达。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0统计软件,组间差异比较采用方差检验。绘制Kaplan-Meier总体生存曲线,Cox模型分析预后因素。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 肺癌组织中RNF38的表达 结果(图1)表明:RNF38蛋白阳性染色主要定位于癌细胞胞质与核;肺癌组织RNF38表达高于相应癌旁正常肺组织;208例肺癌组织中RNF38阳性表达占48.8%(102/208)。

2.2 RNF38蛋白表达与肺癌患者临床病理特征的关系 结果(表1)表明:不同病理类型($P=0.030$)、不同肿瘤分级($P=0.011$)、有无淋巴结转移($P=0.000\ 04$)、不同肿瘤大小($P=0.000\ 2$)的肺癌组织RNF38蛋白表达水平差异有统计学意

义。不同年龄($P=0.553$)、不同性别($P=0.278$)、不同吸烟情况($P=1.000$)、不同肿瘤分化($P=0.403$)情况下肺癌组织RNF38蛋白表达水平差异无统计学意义。

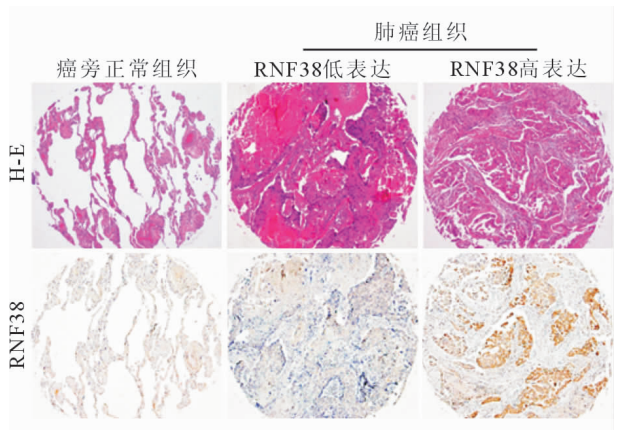


图1 H-E及免疫组化染色测定肺癌组织RNF38的表达
Original magnification: $\times 50$

表1 RNF38与肺癌临床特征的关系

变量	病例数	RNF38 表达		P
		低表达	高表达	
年龄				0.553
<60岁	102	52	50	
≥60岁	106	54	52	
性别				0.278
男	148	73	75	
女	60	33	27	
吸烟情况				1.000
有	84	43	41	
无	124	63	61	
病理类型				0.030
鳞状细胞癌	85	34	51	
腺癌	110	65	45	
其他	13	7	6	
肿瘤分级				0.011
I-II	144	82	62	
III-IV	64	24	40	
淋巴结转移				0.000 04
有	90	31	59	
无	118	75	43	
肿瘤直径				0.000 2
<3 cm	69	48	21	
≥3 cm	139	58	81	
分化				0.403
高中分化	115	62	53	
低分化	93	44	49	

2.3 RNF38水平与肺癌患者预后的关系 208例患者随访过程中共有109例死于肺癌的转移与复发,总体5年生存率为47.6%,RNF38高表达患者

($n=102$)相比 RNF38 低表达患者($n=106$)总生存率较低($P=0.012$,图 2)。

2.4 Cox 模型分析 单因素分析(表 2)表明影响肺癌生存预后的因素包括:肿瘤大小($P=9.76\times 10^{-6}$)、淋巴结转移($P=3.47\times 10^{-9}$)、肿瘤分期($P=4.65\times 10^{-8}$)、肿瘤分化($P=0.050$)、RNF38 表达($P=0.013$)。

多因素分析结果(表 2)表明:肿瘤大小($P=0.002$)、淋巴结转移($P=0.002$)、肿瘤分期($P=0.046$)是影响总生存率的独立预后因素。

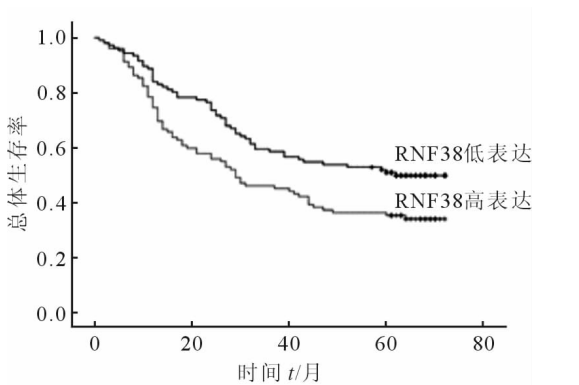


图 2 Kaplan-Meier 分析 RNF38 表达与预后关系

表 2 单因素与多因素分析结果

变 量	单因素分析			多因素分析		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
性别(男 vs 女)	0.789	0.526-1.183	0.251			
吸烟情况(无 vs 有)	0.779	0.543-1.118	0.175			
肿瘤大小(≥ 3 cm vs < 3 cm)	2.755	1.758-4.318	9.76×10^{-6}	2.113	1.322-3.377	0.002
淋巴结转移(有 vs 无)	3.042	2.103-4.399	3.47×10^{-9}	2.061	1.302-3.262	0.002
肿瘤分期(Ⅲ-Ⅳ vs Ⅰ-Ⅱ)	2.771	1.922-3.993	4.65×10^{-8}	1.562	1.009-2.418	0.046
肿瘤分化(中/高分化 vs 低分化)	1.431	1.000-2.049	0.050	1.193	0.826-1.722	0.346
RNF38 表达(低 vs 高)	1.579	1.101-2.265	0.013	1.014	0.692-1.486	0.944

3 讨 论

目前,肺癌是严重威胁人类生命健康^[4]。2014 年,我国肿瘤登记中心数据显示,全国男性肺癌的发病率在所有恶性肿瘤中占据第一位;女性肺癌的发病率在所有恶性肿瘤中也位居第二。肺癌防治仍然是目前亟待解决的重大难题^[1-2]。肺癌的转移及复发是根治性切除手术治疗失败的主要原因,然而当前对其转移及复发的分子机制尚不完全清楚^[5]。因此,进一步阐释肺癌侵袭与转移的精确分子机制,并为肺癌转移的早期诊断、患者的预后判断及有效治疗提供新的靶点对提高患者生存率及生活质量具有重要意义。

本研究通过免疫组织化学检测发现,E3-泛素连接酶 RNF38 在部分肺癌组织中高表达,且高表达 RNF38 与肺癌恶性表型正相关;重要的是其高表达患者预后较低表达患者差。尽管,影响肺癌患者预后的因素较多,但结合 RNF38 高表达与肺癌肿瘤大小、淋巴结转移与肿瘤分期相关,提示 RNF38 与肺癌侵袭转移相关,值得进一步研究。

多种环指蛋白家族参与了肿瘤的发生发展^[6,9]。本研究发现 RNF38 表达于细胞质与核,且在肿瘤中表达明显高于癌旁正常组织,提示 RNF38 是肺癌预后潜在的预测指标。

参考文献

[1] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5):488-493.

[2] 丁一波,傅忠星,王烨菁,等. 2004—2011 年上海市卢湾区社区人群肺癌的发病和死亡资料分析[J]. 中国临床医学, 2016,23(5): 602-606.

[3] 张一秋,石洪成,李蓓蕾,等. 肺癌骨转移 SPECT/CT 融合图像的影像学特点分析[J]. 中国临床医学, 2014, 21(6): 633-635.

[4] 杨拴盈. 肺癌早期诊断的现状、困惑和希望[J]. 西安交通大学学报(医学版),2011,15(1):1-5.

[5] LIAO Y F, WU Y B, LONG X, et al. High level of BRD4 promotes non-small cell lung cancer progression [J]. Oncotarget,2016,7(8):9491-9500.

[6] HOELLER D, HECKER C M, DIKIC I. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2006,6(10):776-788.

[7] EISENBERG I, HOCHNER H, LEVI T, et al. Cloning and characterization of novel human gene RNF38 encoding a conserved putative protein with a RING finger domain[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002, 294 (5):1169-1176.

[8] SHEREN J E, KASSENBRÖCK C K. RNF38 encodes a nuclear ubiquitin protein ligase that modifies p53 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 440(4):473-478.

[9] STEINHART Z, PAVLOVIC Z, CHANDRASHEKHAR M, et al. Genome-wide CRISPR screens reveal a Wnt-FZD5 signaling circuit as a druggable vulnerability of RNF43-mutant pancreatic tumors[J]. Nat Med, 2017,23(1):60-68.