

北京医学,2008,30(7):442-443.

[3] 冯菊萍.人格特征对冠心病患者情绪状况的影响[J].中国实用医药,2012,7(6):28-29.

[4] 游雪梅,杨连招,莫新少,等.肝癌患者焦虑与人格特征的相关性研究[J].中华现代护理杂志,2008,14(30):3144-3146.

[5] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会.突发性聋的诊断和治疗指南(2005年,济南)[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(8):569-569.

[6] 龚耀先.修订艾森克人格特征问卷手册[M].长沙:湖南医学院出版社,1993:31-31.

[7] 李心天.医学心理学[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1998:342-342.

[8] NEUSER J,KNOOP T. Sudden idiopathic hearing loss: psychopathology and antecedent stressful life-events[J]. Br J Med Psychol,1986,59(Pt3):245-251.

[9] 马建琴,李晓静,张平.中青年冠心病病人慢性压力与人格特征的相关性研究[J].护理研究,2012,26(7):1837-1838.

[10] 王渭玲,汪勇.276名医科大学生应对方式、人格与心理健康调查[J].中国心理卫生杂志,2003,17(2):118-119.

[11] 蔡太生,肖琳琳,向延娥,等.医科大学生人格特征与心理健康的相关研究[J].中国行为医学科学,2003,12(1):91-92.

[12] 吴奎玲,金伟,郭莹.突发性聋患者的焦虑抑郁调查及护理[J].现代护理,2007,13(19):1814-1815.

[13] 贾月芝,江波,李勇.心理因素与突发性聋的相关性研究[J].中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2006,14(5):339-340.

[14] 莫福琴,刘桂梅,黄晓琳.焦虑情绪与突发性聋预后的相关性分析[J].中华现代护理杂志,2010,16(24):2873-2875.

[15] 冯文静,刘博,彭晓霞,等.突发性聋发病危险因素的相关研究[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2008,15(6):343-345.

(收稿日期:2012-10-09)

## 鼻咽癌中 Rad52 的表达及其临床意义

韦黎黎<sup>1</sup> 杨小丽<sup>2</sup> 明慧馨<sup>1</sup> 李萍<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究同源重组修复相关基因 Rad52 在鼻咽癌组织中的表达并探讨其临床意义。方法:采用免疫组织化学三步法检测 38 例鼻咽癌患者癌组织及其相应存在的癌旁组织的 Rad52 蛋白的表达,并比较其表达结果,分析癌组织中 Rad52 的表达与患者的临床资料(如性别、年龄、临床分期等)的关系。结果:鼻咽癌组织与癌旁黏膜的 Rad52 蛋白表达相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Spearman 等级相关分析显示,癌组织中 Rad52 蛋白表达情况与患者的临床分期呈负相关性( $P < 0.05$ ),而与患者的性别、年龄、复发率、淋巴结转移率等无显著相关性( $P > 0.05$ );生存分析显示,Rad52 蛋白的高表达对患者的生存时间有显著影响( $P < 0.05$ )。结论:Rad52 蛋白对鼻咽癌患者的治疗效果及预后评估有重要意义。

**[关键词]** 鼻咽肿瘤;蛋白表达;修复相关基因 Rad52;免疫组织化学

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2014.07.016

**[中图分类号]** R739.63 **[文献标志码]** A

### Expression and significance of gene Rad52 in nasopharyngeal carcinoma

WEI Lili<sup>1</sup> YANG Xiaoli<sup>2</sup> MING Hui.xin<sup>1</sup> LI Ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nan-ning, 530021, China; <sup>2</sup> Scientific Laboratory Center, Guangxi Medical University)

Corresponding author: LI Ping, ping998li@aliyun.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinical significance of Rad52, a homologous recombination repair gene, in tissues of nasopharyngeal carcinoma (NPC). **Method:** The expression of Rad52 was detected with three-step immunohistochemistry technique in tissues of 38 NPC patients and which have the corresponding paracancerous tissues. All of the Rad52 expression and clinical data (gender, age, clinical stage) were compared and analyzed to conclude the relationship between them. **Result:** The Rad52 expressions were significantly different

<sup>1</sup>广西医科大学第一附属医院病理科(南宁,530021)

<sup>2</sup>广西医科大学科学实验中心

通信作者:李萍, E-mail: ping998li@aliyun.com

from NPC tissues to peri-NPC tissues ( $P < 0.05$ ). It was found by Spearman analysis method that the Rad52 expression decreased with patients' clinical stages ( $P < 0.05$ ), but has no significant relationship with gender, age, recurrence, and lymphonode metastasis ( $P > 0.05$ ). The expression of Rad52 influenced the survival time of NPC patients significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The Rad52 expression can be a useful prognostic and treatment factor for NPC patients.

**Key words** nasopharyngeal carcinoma; protein expression; homologous recombination repair gene Rad52; immunohistochemistry

鼻咽癌是一种来源于鼻咽部的常见恶性肿瘤,在我国尤以广西、广东、福建等省发病率最高,发病年龄多在 40~50 岁,最常见的组织学类型是低分化鳞状细胞癌。目前,鼻咽癌发生、发展的机制尚未完全明了。DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSB)是 DNA 发生较为严重且常见的损伤,DSB 修复对维持哺乳动物的细胞基因组完整性有着至关重要的作用。Rad52 是一个主要的 DSB 修复基因,参与的 DSB 修复属同源重组(homologous recombination repair, HRR)。大量的研究提示,DNA 损伤修复失败是癌症发生的一个重要原因。Rad52 作为参与同源重组修复的主要基因,其对肿瘤形成、发展和防治的影响已受到关注。目前,国内外对该基因的研究多基于分子水平,与肿瘤的关系的研究甚少,而 Rad52 蛋白与鼻咽癌之间关系的文献笔者尚未见报道。因此,采用免疫组织化学三步法检测 38 例鼻咽癌患者癌组织及其相应存在的癌旁组织中的 Rad52 蛋白的表达,观察其在鼻咽癌、癌旁黏膜组织中的表达情况,以探讨其与鼻咽癌发生、发展及治疗的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集广西医科大学第一附属医院 2000-01—2003-06 有随访资料的鼻咽癌患者共 38 例,其中男 24 例,女 14 例;年龄 22~60 岁,中位 45 岁;所有标本均经常规甲醛固定,石蜡包埋,并且经病理切片证实为低分化鳞状细胞癌;其中 29 例有癌旁黏膜。按 1992 年福州会议鼻咽癌 TNM 分期标准:Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 13 例,Ⅲ期 17 例,Ⅳ期 5 例;其中 23 例无复发,15 例复发;随访截止时间为 2007 年 5 月,中位随访时间为 59.5 个月,随访期间 13 例死亡。所有患者病理活检前均未行任何治疗。

### 1.2 试剂与方法

一抗 Rad52 及其免疫组织化学染色试剂盒购自上海安研商贸有限公司。免疫组织化学染色采用三步法,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作,每次实验均以阳性切片作为阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

### 1.3 结果判定

染色结果的判断标准:阳性信号为棕黄色,位于细胞膜核。按癌细胞阳性细胞率和着色强度分

别记分<sup>[1]</sup>:①按着色强度记分:无着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。②按阳性细胞百分率记分:<5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。两者积分之和:0~1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),4~7 分为强阳性(+++)。

### 1.4 统计学方法

所有资料均用 SPSS 17.0 统计学软件包处理,采用非参数秩和检验、Spearman 秩相关、生存分析等统计学方法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Rad52 在鼻咽癌组织、癌旁黏膜中的表达情况

在癌组织中,阳性信号绝大部分分布于细胞核,阳性率较高(图 1);癌旁黏膜组织中,阳性信号分布在基底部细胞及黏膜下腺体上皮细胞的细胞核上(图 2);鳞状上皮化生者,阳性信号多分布于基底层细胞核上,且着色强度普遍很弱。鼻咽癌组织与癌旁黏膜组织相比,Rad52 的表达差异有统计学意义( $\chi^2 = -2.141, P < 0.05$ )。38 例鼻咽癌组织中,强阳性(+++)12 例,阳性(+)19 例,阴性(-)7 例;29 例癌旁组织中,强阳性(+++)7 例,阳性(+)7 例,阴性(-)15 例。

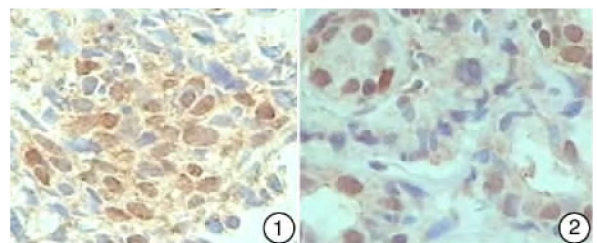


图 1 癌组织中阳性信号绝大部分分布于细胞核 免疫组织化学染色×400 图 2 癌旁黏膜组织中阳性信号位于黏膜下腺上皮细胞核上 免疫组织化学染色×400

### 2.2 Rad52 与临床参数的相关关系

Rad52 的蛋白表达与患者的临床分期有相关性( $P < 0.05$ ),表现为 Rad52 的阳性表达随着临床分期的递增而减弱,而与患者的性别、年龄、复发率、淋巴结转移等无显著相关性( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 Rad52 表达与临床参数的关系

临床病理参数	例数	Rad52	
		阳性数	阳性率
性别			
男	24	19	79.2
女	14	12	86.7
临床分期			
I ~ II 期	16	16	100.0
III ~ IV 期	22	15	68.1 <sup>1)</sup>
年龄			
≤39 岁	11	8	72.7
40~49 岁	17	13	76.5
≥50 岁	10	10	100.0
复发			
无	23	19	82.6
有	15	12	80.0
淋巴结转移			
无	13	12	92.3
有	25	19	76.0

与 I ~ II 期比较, <sup>1)</sup>P < 0.05。

### 2.3 Rad52 的表达与生存时间的关系

随访期间死亡 13 例。Kaplan-Meier 法生存分析显示, Rad52 强阳性表达患者与 Rad52 阴性表达患者的生存曲线差异有统计学意义, Rad52 强阳性表达的患者生存率显著低于阴性表达的患者 ( $\chi^2 = 3.95, P < 0.05$ ), 见图 3。

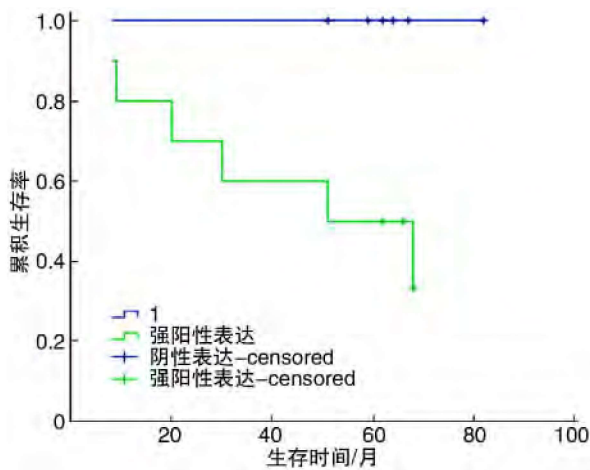


图 3 生存分析 log-rank 曲线图

### 3 讨论

DSB 是最严重的 DNA 损伤形式之一, 是与癌症、遗传性疾病相关联的过程。为了对抗 DSB 的损伤, 细胞形成了 2 条独立而又互补的 DSB 重组修复途径, 即同源重组 (homologous recombination, HR) 和非同源末端连接 (non-homology end joining, NHEJ)。HR 是由 RAD52 上位基因簇基

因编码的蛋白质 (目前发现主要有 Rad50、Rad51、Rad52、Rad54、XRCC2、XRCC3 和 XRCC9 等) 以及 ATM、MRE11、NBS1、BRCA1 蛋白等成分完成。Rad52 位于细胞核内 12 号染色体上的 p12.2-13 区域, 全基因组长约 37.6 kb, 编码的 Rad52 蛋白含有 417 个氨基酸, 其参与 HR 修复 DSB 的主要过程是<sup>[2]</sup>: DSB 形成并被 Rad50-Mre11-NBS1 复合物切割成 ssDNA 末端后, 复制蛋白 A (Replication protein A, RPA) 结合到 ssDNA 上, 修复时, RPA 磷酸化 (pRPA) 并与 Rad52 单体结合形成 ssDNA-pRPA 复合物, 该复合体的中间结构包含衔接到 ssDNA-pRPA 上的 Rad52 的各种多聚体, 当 Rad52 与 ssDNA 的亲和力形成时, ssDNA-pRPA-Rad52 复合物上的最主要的单体形成, 进而 ssDNA-Rad52 复合物才形成, 绑定 Rad52 单体和 pRPA 的 ssDNA 末端为进一步的反应做好准备。HR 在细胞减数分裂、有丝分裂 S/G2 期以及胚胎细胞修复中发挥重要作用, 表达 Rad52 的细胞表现出生存能力的提高。Rad52 减少或缺乏会导致大范围的染色体变异, 进而导致基因组不稳定<sup>[3]</sup>。

本研究发现 Rad52 在鼻咽癌组织中呈高强度及高阳性率表达, 且阳性信号多位于癌细胞核上; 癌旁黏膜组织中, 阳性信号分布在基底细胞及腺上皮细胞的细胞核上。癌组织中 Rad52 的阳性表达率及表达强度明显高于癌旁黏膜组织。癌旁黏膜组织中, 阳性信号的表达状况与黏膜上皮细胞本身的特性有关, 因其属持续分裂细胞, 而分裂增殖又以基底细胞最为典型。鼻咽癌组织中 Rad52 高表达, 推测癌细胞处于高度增殖状态, 发生 DSB 的概率明显增加, 而 DSB 的癌细胞也处于高修复水平, 导致 Rad52 阳性信号的普遍高表达。另外, 这一结果也提示, Rad52 蛋白的高表达在肿瘤的发展过程中可能起着重要的作用。

本研究同时发现, Rad52 蛋白表达与临床分期呈较弱的负相关, 即临床分期序数越大, 阳性表达程度越低, 推测可能因为鼻咽癌的临床分期与转移有关, 但有转移并不一定意味着细胞处于更高水平的增殖状态, 且癌组织在发展过程中可能存在亚克隆因素, 即并不表现为 Rad52 的高表达; 亦或是与细胞老化有关, 随着分期序数的增加, 癌组织发生发展的时间可能更长一些, 再加上存在 DSB 异常修复的可能, 导致癌细胞趋向于老化。因为 DSB 的异常修复会导致基因突变和重组, 突变和重组的累积可促进细胞老化, 参与 HR 的蛋白表达会随着细胞老化而减少<sup>[4]</sup>。

本研究还发现 Rad52 强阳性表达患者的生存

率明显低于阴性表达者,推测与强阳性表达患者的癌细胞增殖程度更活跃且损伤细胞得到快速修复有关,表达率越高,增殖及损伤修复能力越强,同时也提高癌细胞的生存能力、减缓老化进程及延长癌细胞的生存期,从而导致患者的生存时间相应减少;再者, Rad52 强阳性患者对放疗的敏感性较阴性表达者低<sup>[5-6]</sup>,因此,放疗后强阳性表达者癌细胞有残存的可能,以致患者生存时间也会受到一定的影响,表现为生存期相对缩短。

本实验结果推测, Rad52 的缺失或变异导致 DSB 的异常修复,增加癌症发生的风险,而癌细胞本身的特性也可刺激 Rad52 的聚集或反应性合成增加,并且参与 HR 修复从而提高癌细胞的生存能力,表现为癌细胞核上 Rad52 的高表达。因此,如若对癌细胞内 Rad52 实行靶向抑制或沉默,或许可以提高鼻咽癌患者放疗的敏感性<sup>[7-8]</sup>,延长患者的生存时间从而提高生存率。本研究结果提示 Rad52 对鼻咽癌患者的治疗及预后判断有重要价值。

近几年,国内外对 Rad52 的研究发现: Rad52 单核苷酸多态性分别与肺癌<sup>[9]</sup>、宫颈癌<sup>[10]</sup>、乳腺癌<sup>[11]</sup>的风险高度相关; Cdc48 分子泛素化可消除 Rad52 的活性从而增加自发重组率和变异率<sup>[12]</sup>。如今,鼻咽癌的主要治疗方法是局部放疗,通过形成 DSB 而杀伤肿瘤细胞,但放疗后患者还有一定的复发率,且他们的生存时间有较大差异,而 Rad52 的发现有助于鼻咽癌预测指标及预后因素的临床研究,以及用于治疗的放射敏感性的分子研究。

#### 参考文献

[1] 史荣亮,李建芳,瞿颖,等. 肿瘤转移相关基因 Ezrin 在胃癌中的表达及意义[J]. 中华胃肠外科杂志, 2006,9(5):2181-2191.

[2] DENG X, PRAKASH A, DHAR K, et al. Human replication protein A-Rad52-single-stranded dna complex: stoichiometry and evidence for strand transfer regulation by phosphorylation [J]. Biochemistry, 2009,48:6633-6643.

[3] MUÑOZ-GALVÁN S, JIMENO S, ROTHSTEIN R,

et al. Histone H3K56 Acetylation, Rad52, and Non-DNA Repair Factors Control Double-Strand Break Repair Choice with the Sister Chromatid[J]. PLoS Genet, 2013,9:e1003237.

[4] MAO Z, TIAN X, VAN METER M, et al. Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012,109: 11800-11805.

[5] GHOSH S, KRISHNA M. Role of Rad52 in fractionated irradiation induced signaling in A549 lung adenocarcinoma cells[J]. Mutat Res, 2012,729:61-72.

[6] KOMURO Y, WATANABE T, HOSOI Y, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma[J]. Cancer, 2002,95:1199-1205.

[7] JEWELL R, CONWAY C, MITRA A, et al. Patterns of expression of DNA repair genes and relapse from melanoma[J]. Clin Cancer Res, 2010,16: 5211-5221.

[8] TASSONE P, DI MARTINO MT, VENTURA M, et al. Loss of BRCA1 function increases the antitumor activity of cisplatin against human breast cancer xenografts in vivo[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8: 648-653.

[9] MARIA N, TIMOFEEVA I, RAYJEAN J, et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls [J]. Human Molecular Genetics, 2012, 21: 4980-4995.

[10] SHI T Y, YANG G, TU X Y, et al. RAD52 variants predict platinum resistance and prognosis of cervical cancer[J]. PLoS One, 2012,7:e50461.

[11] JIANG Y, QIN Z, HU Z, et al. Genetic variation in a hsa-let-7 binding site in RAD52 is associated with breast cancer susceptibility[J]. Carcinogenesis, 2013, 34:689-693.

[12] BERGINK S, AMMON T, KERN M, et al. Role of Cdc48/p97 as a SUMO-targeted segregase curbing Rad51-Rad52 interaction[J]. Nature Cell Biol, 2013, 15:526-532.

(收稿日期:2013-09-11)