

TNFAIP3基因在放射治疗鼻咽癌中的表达及意义

邓香群¹ 叶旭²

1. 湖南邵阳医学高等专科学校组织学与胚胎学教研室, 湖南 邵阳 422000 ;
2. 湖南省肿瘤医院核医学科, 湖南 长沙 410013

[摘要] **背景与目的:** 鼻咽癌多对放射治疗敏感, 研究鼻咽癌放疗抗拒具有重要意义。本研究旨在探讨肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(tumor necrosis factor alpha induced protein 3, TNFAIP3)在经放射治疗的鼻咽癌中的表达, 分析其在放疗敏感及放疗抗拒的鼻咽癌中表达的差异, 与放疗抗拒发生、发展的关系。**方法:** 采用TNFAIP3多点标记的地高辛探针原位杂交方法检测TNFAIP3 mRNA在放疗敏感及放疗抗拒的鼻咽癌中的表达。**结果:** TNFAIP3 mRNA中度及强阳性表达率在放疗敏感及放疗抗拒的鼻咽癌中的表达率分别为15.00%和45.00%, 差异有统计学意义($\chi^2=5.274, P=0.0216$)。在放疗抗拒的鼻咽癌中, TNFAIP3 mRNA中度及强阳性表达率与TNM分期呈正相关, III~IV期TNFAIP3 mRNA中度及强阳性表达率为48.28%, I~II期表达率为36.36%, 差异有统计学意义($\chi^2=33.240, P<0.005$); 在有、无远处转移中的表达率分别为81.81%和31.03%, 差异有统计学意义($\chi^2=6.385, P=0.0115$)。**结论:** TNFAIP3虽具有抗肿瘤效应, 但参与了放疗抗拒的鼻咽癌的发生、发展。

[关键词] TNFAIP3基因; 放疗敏感; 放疗抗拒; 鼻咽癌

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.11.004

中图分类号: R739.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)11-0820-04

Expression of TNFAIP3 gene in radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma DENG Xiang-qun¹, YE Xu² (1.Department of Histology and Embryology, Shaoyang Medical College, Shaoyang Hunan 422000, China; 2.Department of Nuclear Medicine, Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha Hunan 410013, China)

Correspondence to: DENG Xiang-qun E-mail: hnsydxq@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Nasopharyngeal carcinoma is sensitive with radiotherapy, and it is of great significance to study the resistance mechanism. This study aimed to analyze the expression of TNFAIP3 in the radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma, the difference between radiosensitivity and radioresistance, the relationship with the occurrence and development of radioresistance. **Methods:** Detection of TNFAIP3 mRNA expression was carried out by TNFAIP3 multi-point labeled DIG probe *in situ* hybridization. **Results:** In radiosensitivity and radioresistance of nasopharyngeal carcinoma, the moderately and strongly positive TNFAIP3 mRNA expression rates were 15% and 45%, ($\chi^2=5.274, P=0.0216$), there were statistical significance. In the radioresistant nasopharyngeal carcinoma, TNFAIP3 mRNA moderately and strongly positive expression was positively correlated with TNM stage. In the degree of III-IV tumor, it had moderately and strongly positive expression rate of 48.28%. In the degree of I-II tumor, it had moderately and strongly positive expression rate of 36.36% ($\chi^2=33.240, P<0.005$); The expression rates in distant metastasis and no distant metastasis were 81.81% and 31.03% ($\chi^2=6.385, P=0.0115$), the difference had statistical significance. **Conclusion:** TNFAIP3 has antitumor effect, and it is correlated with the occurrence and development of radioresistant in nasopharyngeal carcinoma.

[Key words] TNFAIP3 gene; Radiosensitivity; Radioresistance; Nasopharyngeal carcinoma

鼻咽癌的治疗以放疗为主, 且对放疗相对敏感。因此, 研究放疗抗拒的鼻咽癌非常必要。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(tumor necrosis factor

alpha induced protein 3, TNFAIP3), 即锌指蛋白A20, 是一种具有抗细胞凋亡及抑制核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)活化双重功能的蛋白^[1]。A20有两个功能结构域: 具

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(No: 11C1162)。

通信作者: 邓香群 E-mail:hnsydxq@126.com

有锌指结构的C末端和具有特征性结构的N端,其锌指区主要抑制NF- κ B的功能。TNFAIP3与TNFAIP3相互作用蛋白质1(TNFAIP3 interacting protein-1, TNIP1)编码的蛋白彼此结合,阻止NF- κ B活化和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)介导的细胞凋亡^[2]。在炎症反应因子或病原体作用下,细胞膜通过Toll样受体(Toll like receptors, TLRs)和TNF受体传递活化NF- κ B信号,A20与NF- κ B抑制蛋白(A20 binding inhibitor of NF- κ B, ABIN)-1结合,阻止NF- κ B活化^[3],通过阻断NF- κ B信号通路,获得抗炎和抗肿瘤效应^[4-5]。

1 材料和方法

1.1 临床资料

收集湖南省肿瘤医院2006年首次入院的鼻咽癌患者60例,所有患者都有3年或以上随访记录,其中放疗抗拒40例,放疗敏感20例,放疗抗拒者均伴有颈淋巴结转移。放疗抗拒标准:①根治性放疗后3个月复查原发灶和(或)淋巴结残留;②根治性放疗后1年内出现鼻咽新事物和(或)新发淋巴结;③放疗后13~24个月出现复发。诊断依据:①临床症状+体征;②鼻咽+颈部MRI或CT(平扫+增强);③复发病理诊断。放疗敏感标准:①根治性放疗后3个月复查原发灶和(或)淋巴结无残留;②根治性放疗后1年内未出现鼻咽新事物和(或)新发淋巴结;③放疗后13~24个月未出现复发或转移;④随访3年或以上无复发转移。

1.2 主要试剂

探针及试剂盒均购自天津灏洋生物公司,TNFAIP3探针合成序列:5'-ATTGCCGTCA CCGTTCGTTTTTCAGCG-3';5'-AGTTC CGTGTGTCTGTTTCCTTGAGCG-3';5'-TG T C C C A T T C A T C A T T C C A G T T C C G A G-3'。试剂:寡核苷酸探针预杂交液;寡核苷酸探针杂交液TNFAIP3;寡核苷酸阴性探针杂交液TNFAIP3;复合消化液(P/E)PH为6.4;生物素标记的小鼠抗地高辛;高敏过氧化物酶链亲和素复合物;2xssc干粉。

1.3 原位杂交检测

TNFAIP3多点标记的地高辛探针原位杂交法:石蜡切片脱蜡至水,置打孔液中室温10 min,置过氧化氢封闭液室温20 min,封闭内源性过氧化物酶;滴加复合消化工作液,覆盖组织表面,室温10~30 min;滴加预杂交工作液覆盖组织37℃湿盒温育2 h;预杂交后的洗涤。滴加杂交工作液覆盖组织37℃湿盒温育8 h,杂交后的洗涤。滴加小鼠抗地高辛生物素标记的抗体工作液,覆盖组织37℃湿盒温育45 min,滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液,覆盖组织37℃湿盒温育45 min。DAB显色,细胞质显棕黄色颗粒为阳性反应。苏木素复染,细胞核为蓝色。脱水,封片。

1.4 结果判定

显微镜下观察,TNFAIP3 mRNA细胞质显棕黄色为阳性反应。按阳性细胞所占比率记录:着色细胞<25%为1分,25%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。着色深度:无着色0分,浅黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。根据两者相乘的积综合判断,0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为中度阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。

1.5 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件,各组间中度及强阳性表达率的比较运用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义;分析TNFAIP3 mRNA中度及强阳性表达率与TNM分期之间相关性采用 Φ 系数。

2 结 果

2.1 TNFAIP3 mRNA在放射治疗鼻咽癌中的表达

在放疗抗拒及放疗敏感的鼻咽癌患者中,TNFAIP3 mRNA中度及强阳性表达率分别为45.00%和15.00%,差异有统计学意义($\chi^2=5.274$, $P<0.05$,表1)。

2.2 TNFAIP3 mRNA在放疗抗拒的鼻咽癌患者中的表达

阳性表达定位于细胞质,呈黄、棕色(图1~4)。随TNM分期不同,TNFAIP3 mRNA中度

及强阳性表达率呈递增趋势, 并与TNM分期呈正相关($\chi^2=33.240$, $P<0.005$), 两者关联强度为0.000 2; 有远处转移与无远处转移中的表达率差异有统计学意义($\chi^2=6.385$, $P<0.05$, 表2)。

表 1 TNFAIP3在放射治疗鼻咽癌中的表达

Tab. 1 TNFAIP3 expression in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma

Effect of radiotherapy	n	TNFAIP3 mRNA				Percentage/%*
		-	+	++	+++	
Radioresistance	40	12	10	14	4	45.00
Radiosensitivity	20	5	12	3	0	15.00

*:Percentage of ++ and +++. $\chi^2=5.274$, $P=0.0216$, a statistical significance.

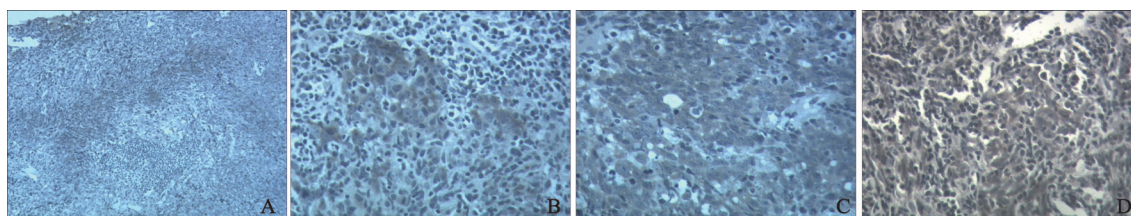


图 1 TNFAIP3在放射治疗鼻咽癌中的表达

Fig. 1 TNFAIP3 expression in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma

A: T₂N₁M₀II poorly differentiated squamous carcinoma moderate positive(DAB,×100); B: T₂N₁M₀II poorly differentiated squamous carcinoma moderate positive (DAB, ×400); C: T₂N₁M₀II poorly differentiated squamous carcinoma strong positive (DAB,×400); D: T₂N₂M₀III poorly differentiated squamous carcinoma strong positive (DAB,×400).

表 2 TNFAIP3与放疗抗拒的鼻咽癌患者临床病理参数的关系

Tab. 2 The relationship between TNFAIP3 and clinicopathological parameters of radioresistant nasopharyngeal carcinoma

Parameter	n	TNFAIP3 mRNA				Percentage/%*
		-	+	++	+++	
TNM stage						
I - II	11	2	5	3	1	36.36
III - IV	29	10	5	11	3	48.28
T stage						
T ₁ -T ₂	21	7	7	5	2	33.33
T ₃ -T ₄	19	5	3	9	2	57.89
Distant metastasis						
Yes	11	2	0	7	2	81.81
No	29	10	10	7	2	31.03

*: Percentage of ++ and +++. TNM stage, $\chi^2=33.240$, $P<0.005$, a statistical significance; T stage, $\chi^2=2.431$, $P=0.1190$, no statistical significance; Distant metastasis, $\chi^2=6.385$, $P=0.0115$, a statistical significance.

3 讨 论

*TNFAIP3*基因位于6q23, 全长约15.9 kbp, 含9个外显子, 与人类多种疾病相关, 有望成为抗炎、抗肿瘤和免疫调节的新靶点^[6], 其5'上游具有多个保守的核转录因子结合位点, -54和-66 bp处各有一个NF- κ B结合区。在眼附属器的淋巴瘤, *TNFAIP3*所在的6q23位点发生纯合子缺失, *TNFAIP3*的功能缺损可能是肿瘤发病机制之一^[7]。亦有研究表明, *TNFAIP3*抗炎活性的增加可能减弱TNF诱导的细胞凋亡^[8]。干

扰*TNFAIP3*在树突状细胞的表达, 可抑制调节性T细胞而增强细胞毒T细胞和T辅助细胞的活化能力, 降低调节性T细胞介导的肿瘤免疫抑制作用^[9]; *TNFAIP3*还可能通过去泛素化对T细胞受体(T-cell receptor, TCR)信号转导进行负调控^[10-11]。B细胞功能异常及变异与NF- κ B经典及非经典信号通路激活相关, *TNFAIP3*在调节B细胞活动中的作用包括限制NF- κ B活化信号以及保持自身反应性B细胞稳态及预防自身免疫^[12]。研究显示, 乳腺癌的发病进展中增强的*TNFAIP3*表达发挥其抗凋亡作用, 促进了癌

细胞的存活^[13]。

本实验中,放疗抗拒的鼻咽癌中TNFAIP3 mRNA中度阳性及强阳性表达率为45.00%,放疗敏感的鼻咽癌中的表达率为15.00%,差异有统计学意义。放疗敏感的鼻咽癌细胞中TNFAIP3具有抗肿瘤效应,这种作用可能主要通过抑制NF- κ B活化实现,阻断肿瘤细胞DNA的转录过程,维持了自身反应性B细胞的稳态。TNFAIP3的抗肿瘤效应受细胞类型影响,放疗抗拒鼻咽癌细胞中TNFAIP3可能发生纯合子缺失,导致其抗肿瘤效应缺损,引起鼻咽癌细胞放疗抗拒性的发生。

40例放疗抗拒的鼻咽癌患者中,TNM分期III~IV期TNFAIP3 mRNA中度阳性及强阳性表达率为48.28%,I~II期为36.36%,差异有统计学意义;有远处转移者TNFAIP3 mRNA中度阳性及强阳性表达率高于无远处转移者,差异有统计学意义。我们认为TNFAIP3参与了放疗抗拒的鼻咽癌的发生、发展及侵袭、转移。炎症反应促进了肿瘤的发生和发展,在放疗抗拒的鼻咽癌的侵袭过程中,TNFAIP3过表达,TNFAIP3的抗炎活性增强,减弱了TNF诱导的细胞凋亡功能,导致其出现远处转移。放射线辐射引起细胞DNA损伤,同时TNFAIP3基因的6q23位点纯合子缺失,在富含炎症反应细胞的肿瘤微环境中,肿瘤细胞增殖能力加强,加速了放疗抗拒的鼻咽癌的发展进程。TNFAIP3的过表达,增强了细胞毒T细胞的活化能力,加强了放疗抗拒的鼻咽癌细胞的肿瘤免疫作用;同时放射线辐射产生大量的氧自由基,TNFAIP3基因参与了清除氧自由基的过程,保护肿瘤细胞免受氧化损伤。TNFAIP3可作为降低鼻咽癌放疗抗拒性的靶基因之一。

[参 考 文 献]

- [1] 郑翠芳,黄瑛. 锌指蛋白A20在炎症反应性肠病患儿肠黏膜中的表达及意义[J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(4): 261-265.
- [2] ELDER J T, BRUCE A T, GUDJONSSON J E, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology [J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(5): 1213-1226.
- [3] 张霞,张丽,张正华. TNFAIP3和TNIP1基因在寻常型银屑病中的表达及意义[J]. 广东医学院学报, 2012, 30(4): 358-363.
- [4] HAYDEN M S, GHOSH S. NF- κ B in immunobiology [J]. Cell Res, 2011, 21(2): 223-244.
- [5] HAYDEN M S, GHOSH S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions [J]. Genes Dev, 2012, 26(3): 203-234.
- [6] HARHAJ E W, DIXIT V M. Regulation of NF- κ B by deubiquitinases [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 107-124.
- [7] HONMA K, TSUZUKI S, NAKAGAWA M, et al. TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2008, 47: 1-7.
- [8] 赵媛,谢琰臣,孙亮,等. TNFAIP3基因rs2230926多态性与重症肌无力的相关性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2010, 17(1): 42-45.
- [9] DIEUDE P, GUEDEJ M, WIPFF J, et al. Association of the TNFAIP3 rs5029939 variant with systemic sclerosis in the European Caucasian population [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(5): 1958-1964.
- [10] KOUMAKIS E, GIRAUD M, DIEUDE P, et al. Brief report: candidate gene study in systemic sclerosis identifies a rare and functional variant of the TNFAIP3 locus as a risk factor for polyautoimmunity [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64: 2746-2752.
- [11] ELSBY L M, OROZCO G, DENTON J, et al. Functional evaluation of TNFAIP3(A20) in rheumatoid arthritis [J]. Clin Exp Rheumatol, 2010, 28(10): 708-714.
- [12] 王筱琛,克晓燕. MALT淋巴瘤病因及发病机制研究进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(6): 1526-1530.
- [13] 杨慧敏,段秀枝,吴秀玲,等. TNFAIP3 mRNA及其蛋白在尿路上皮乳头状癌组织中的表达与临床意义[J]. 浙江检验医学, 2012, 10(3): 24-27.

(收稿日期: 2014-01-08 修回日期: 2014-10-14)