

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.007

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.007>

## Rad6 在肺腺癌中的表达及临床意义

钱静, 石宇

(南通大学附属医院肿瘤放疗科, 江苏 南通 226001)

**[摘要]** 目的: 研究Rad6在肺腺癌组织中的表达情况, 探讨其与肺腺癌预后的相关性。方法: 选择92例有完整随访资料的肺腺癌患者的新鲜癌组织及相应的癌旁正常肺组织标本(距肿瘤边缘>5 cm), 应用免疫组织化学EnVision两步法, 分别检测癌组织及癌旁正常肺组织中Rad6蛋白的表达水平。结果: 肺腺癌组织中Rad6的蛋白表达水平明显高于癌旁正常肺组织(61.96% vs 38.04%,  $P<0.05$ )。其蛋白高表达与肿瘤的病理分期、分化程度和淋巴结转移相关( $P<0.05$ ), 且肺腺癌患者中Rad6高表达者总生存率明显下降( $P<0.05$ )。结论: Rad6在肺腺癌组织中的表达水平高于相应癌旁正常肺组织, 且肿瘤分化程度越低, Rad6蛋白的表达水平越高, 生存时间越短, 提示Rad6过表达与肺腺癌的发生发展及预后有关。

**[关键词]** Rad6; 靶基因; 肺腺癌

## Expression of Rad6 in lung adenocarcinoma and its clinical significance

QIAN Jing, SHI Yu

(Department of Radiation Oncology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong Jiangsu 226001, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the expression of Rad6 in lung adenocarcinoma and analyze the clinical significance. **Methods:** Carcinoma and corresponding para-carcinoma (more than 5 cm from the edge of the tumor) tissue specimens were collected from 92 lung adenocarcinoma patients with complete follow-up data. Immunohistochemical method was used to detect the expression of Rad6 in lung adenocarcinoma tissues and sectional para-carcinoma tissues. **Results:** The expression of Rad6 was higher in lung adenocarcinoma than that in para-carcinoma tissues (61.96% vs 38.04%,  $P<0.05$ ). Rad6 expression was associated with the pathological stage, differentiation degree, and lymphnode metastasis of tumors. **Conclusion:** The expression of Rad6 is higher in lung adenocarcinoma with low-differentiated, and it has lower overall survival, suggesting that Rad6 overexpression is related to the occurrence, development and prognosis of lung adenocarcinoma.

**Keywords** Rad6; target gene; lung adenocarcinoma

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-10

通信作者 (Corresponding author): 钱静, Email: 15162767256@163.com

基金项目 (Foundation item): 南通市自然科学基金 (MS12017017-5; MS12017021-4)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Nantong, Jiangsu Province, China (MS12017017-5; MS12017021-4).

靶向治疗作为晚期肺腺癌的一线方案, 疗效肯定, 但是耐药现象越来越普遍, 需要积极寻找新的靶向治疗基因<sup>[1-2]</sup>。泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)主要负责细胞内蛋白质降解。该系统包括泛素、泛素活化酶E1、泛素结合酶E2s、泛素-蛋白连接酶E3s等, 主要通过泛素结合酶作用, 参与细胞的生长、分化, DNA复制与修复, 细胞代谢、免疫反应等重要生理生化过程<sup>[3]</sup>。Rad6是典型的泛素结合酶E2, 它可协同c-myc癌基因参与细胞增殖, 引起肿瘤形成, 在多种肿瘤中表达升高<sup>[4]</sup>。但是少有关于Rad6蛋白在肺腺癌中表达的相关文献。本研究以92例肺腺癌患者的手术标本及癌旁正常肺组织为研究对象, 应用免疫组织化学法检测Rad6蛋白表达情况, 探讨其与肺腺癌是否相关及与预后的关系, 为寻找肺腺癌潜在的生物治疗靶点提供前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织标本

收集2006年1月至2009年12月于南通大学附属医院胸外科手术切除, 具有完整随访资料, 术后病理证实的肺腺癌以及相应癌旁正常肺组织标本(距肿瘤边缘>5 cm) 92例, 其中男47例, 女45例, 中位年龄60.05岁; 吸烟者54例, 不吸烟者38例; 按照UICC第7版肺癌分期标准, I期23例, II期45例, III期24例; 高、中分化65例, 低分化27例; 淋巴结转移71例, 无淋巴结转移21例。所有患者术前均未接受放射治疗、化学治疗及免疫治疗。本研究经南通大学附属医院伦理委员会批准, 患者或其家属均签署知情同意。

### 1.2 试剂

兔抗人Rad6抗体购自英国Abcam公司, 山羊抗兔HRP二抗购自联科生物技术有限公司。EnVision试剂盒, 对二甲氨基偶氮苯(DAB)酶底物显示试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 免疫组织化学方法及判定标准

术后肺腺癌及癌旁组织经固定包埋, 蜡块组织连续切片, 厚为4  $\mu\text{m}$ , 按EnVision两步法进行染色, 结果判定在双盲下进行。在高倍镜( $\times 400$ 或 $\times 200$ )下随机观察至少5个视野, 根据阳性细

胞比例和着色深浅进行半定量分析。阳性细胞百分数0为0分, 1%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, 76%~100%为4分; 着色强度: 未染色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。两项计分的乘积为最后结果, 总分12分,  $\geq 5$ 分为阳性。

### 1.4 随访方法和生存时间计算

入选患者通过电话进行随访, 随访截止日期是2014年12月31日。随访时间3~60个月, 手术后出院即开始随访。术后第1年每3个月随访1次, 术后第2年每6个月随访1次, 以后每年1次。将手术当日作为生存时间的起点, 患者死亡之日作为生存终点。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行数据分析。免疫组织化学结果分析采用四格表资料的 $\chi^2$ 检验; 生存分析采用Kaplan-Meier法;  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Rad6 在肺腺癌组织及癌旁组织中的表达

图1分别代表Rad6高表达、低表达及阴性组。Rad6蛋白主要定位于细胞核, 为棕黄色、棕褐色颗粒状, 呈弥漫性分布。在肺腺癌组织中Rad6阳性表达率为61.96%; 而癌旁正常肺组织中阳性表达率为38.04%。肺腺癌及相应正常肺组织中Rad6阳性表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 肺腺癌组织中 Rad6 与临床病理特征的关系

免疫组织化学法分析Rad6表达高低与肺腺癌临床病理特征的相关性, 结果显示: Rad6与肿瘤的分化程度, 病理分期及淋巴结转移显著相关( $P < 0.05$ ), 而与患者的性别, 年龄, 是否吸烟以及肿瘤T分期无相关性( $P > 0.05$ , 表1)。

### 2.3 Rad6 表达与患者预后的关系

由Kaplan-Meier生存函数曲线可以看出: Rad6高表达组肺腺癌患者总生存期(overall survival, OS)明显缩短( $P < 0.05$ ), 且Rad6阳性表达组中位生存时间为31个月, 而阴性表达组中位生存时间为49个月(图2)。

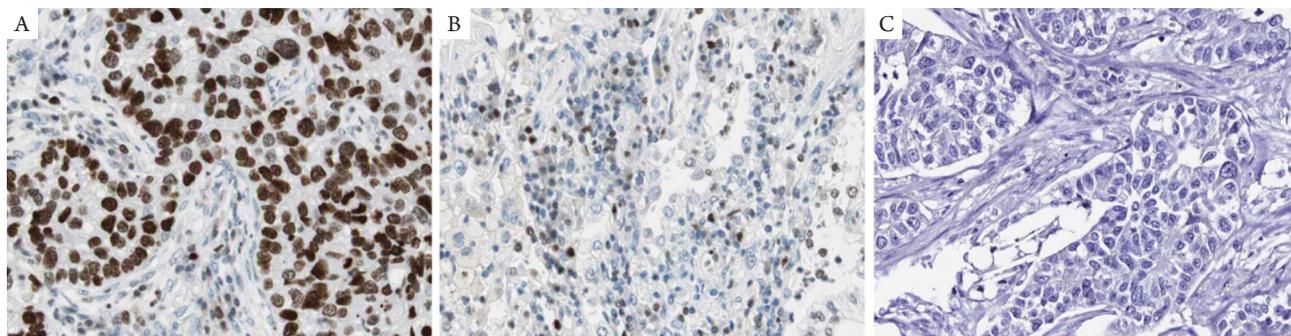


图1 Rad6在肺腺癌组织及癌旁正常组织中的表达(EnVision,  $\times 400$ )

Figure 1 Expression of Rad6 in lung adenocarcinoma and para-carcinoma tissues (EnVision,  $\times 400$ )

(A)Rad6高表达; (B)Rad6低表达; (C)Rad6阴性表达。

(A) High-expression of Rad6; (B) Low-expression of Rad6; (C) Negative expression of Rad6.

表1 肺腺癌组织中Rad6与临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between Rad6 and clinicopathological features in lung adenocarcinoma

临床病理特征	<i>n</i>	阳性/例	阴性/例	$\chi^2$	<i>P</i>
年龄/岁				0.01	0.96
$\geq 60$	47	29	18		
$< 60$	45	28	17		
性别				0.14	0.71
男	47	30	17		
女	45	27	18		
吸烟				0.40	0.53
有	54	32	22		
无	38	25	13		
分化程度				7.32	0.03
高	25	10	15		
中	40	27	13		
低	27	20	7		
病理分期				8.06	0.02
I期	23	10	13		
II期	45	27	18		
III期	24	20	4		
肿瘤大小分期(T分期)				2.56	0.47
T1	38	26	12		
T2	33	21	12		
T3	17	8	9		
T4	4	2	2		
淋巴结转移				6.57	0.01
有	71	49	22		
无	21	8	13		

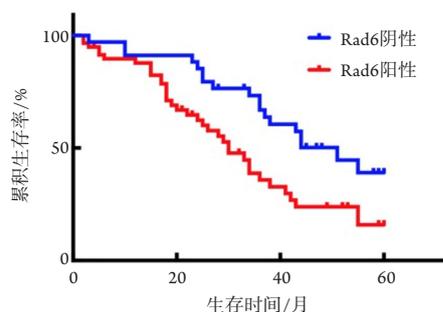


图2 Rad6表达与患者预后的关系

Figure 2 Relationship between Rad6 expression and prognosis of patients

### 3 讨论

腺癌是常见的肺癌病理类型, 其发病是一个多步骤的过程, 涉及大量相关基因结构和表达调控的改变, 这些基因为其治疗提供了丰富的靶点。目前靶向治疗在肺腺癌中获得了巨大成功, 越来越多的研究聚焦于寻找新靶点。

泛素-蛋白酶体途径参与细胞内80%以上蛋白质的降解。泛素-蛋白酶体途径通过蛋白的泛素化或去泛素化正向或反向调节某些转录因子、抑癌基因和细胞周期相关基因等的表达以及改变主要组织相容性复合体I(major histocompatibility complex, MHC)限制性抗原肽的生成, 从而参与恶性肿瘤的发生和发展, 也是某些恶性肿瘤调节的潜在靶点<sup>[5]</sup>。Rad6是典型的泛素结合酶E2(ubiquitin-conjugating enzyme 2, E2), 可与另一种泛素连接酶18(E3)结合成二聚体, 该二聚体参与了DNA损伤修复, 蛋白质泛素化, RNA聚合酶II启动子转录及泛素依赖性蛋白质降解等<sup>[6-7]</sup>。据文献<sup>[8]</sup>报道: Rad6蛋白上调与卵巢癌侵袭进展相关, 它通过促进DNA损伤通路激活和干细胞表达使卵巢癌对铂类化疗药物耐药<sup>[9]</sup>。另有文献<sup>[10]</sup>报道: Rad6小分子抑制剂可通过抑制多种DNA修复过程使卵巢癌细胞对铂类药物敏感。Rad6在卵巢癌中促进DNA修复及细胞信号转导, 有望成为治疗卵巢癌获得性化疗耐药的合适靶标<sup>[10-11]</sup>。在三阴性乳腺癌中Rad6蛋白高表达, 靶向其小分子抑制剂可协同顺铂抗肿瘤治疗<sup>[12]</sup>。另外, Rad6蛋白的高表达与胶质母细胞瘤的预后不良显著相关<sup>[13]</sup>。

本研究以免疫组织化学法分析人肺腺癌组织中Rad6的表达情况及其与预后的相关性。肺腺癌组织中Rad6阳性表达率明显高于癌旁组织, 并且与肿瘤的分化程度, 病理分期及淋巴结转移有

关。Rad6高表达组肺腺癌患者OS明显缩短。Rad6阳性表达组患者的中位生存时间为31个月, 而阴性表达组中位生存时间可达49个月, 表明Rad6与肺腺癌的发生发展密切相关, 有望成为肺腺癌诊断、预后和治疗的新靶标。

本研究揭示: Rad6的高表达与肺腺癌的不良预后有关, 但是本研究样本量较少, 要进一步了解Rad6基因蛋白表达与肺腺癌的关系, 需要在后续工作中加大样本容量, 延长随访时间, 并且设立放射治疗和化学治疗相关的对照组, 继续深入研究Rad6基因在肺腺癌中表达上调的具体机制, 为寻找肺腺癌潜在的生物治疗靶点提供一定的实验基础。

### 参考文献

- Gallant JN, Lovly CM. Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer[J]. *J Pathol*, 2018, 244(5): 565-577.
- 王志海, 彭宗玉, 杜国威, 等. EGFR突变型转移性非小细胞肺癌的靶向治疗疗效及安全性[J]. *癌症进展*, 2017, 15(7): 771-773. WANG Zhihai, PENG Zongyu, DU Guowei, et al. Efficacy and safety of targeted therapy in the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with EGFR mutation[J]. *Oncology Progress*, 2017, 15(7): 771-773.
- Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system[L]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(1): 182-196.
- Cai F, Chen P, Chen L, et al. Human RAD6 promotes G1-S transition and cell proliferation through upregulation of cyclin D1 expression[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113727.
- Wang C, Chang JF, Yan H, et al. A conserved RAD6-MDM2 ubiquitin ligase machinery targets histone chaperone ASF1A in tumorigenesis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29599-29613.
- Hedglin M, Benkovic SJ. Regulation of Rad6/Rad18 activity during DNA damage tolerance[J]. *Annu Rev Biophys*, 2015, 44: 207-228.
- Wu Z, Liu J, Zhang QD, et al. Rad6-Bre1-mediated H2B ubiquitination regulates telomere replication by promoting telomere-end resection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(6): 3308-3322.
- Clark DW, Mani C, Palle K. RAD6 promotes chemoresistance in ovarian cancer[J]. *Mol Cell Oncol*, 2018, 5(1): e1392403.
- Somasagara RR, Tripathi K, Spencer SM, et al. Rad6 upregulation promotes stem cell-like characteristics and platinum resistance in ovarian cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 469(3): 449-455.

10. Sanders MA, Haynes B, Nangia-Makker P, et al. Pharmacological targeting of RAD6 enzyme-mediated translesion synthesis overcomes resistance to platinum-based drugs[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(25): 10347-10363.
11. Sanders MA, Brahehi G, Nangia-Makker P, et al. Novel inhibitors of Rad6 ubiquitin conjugating enzyme: design, synthesis, identification, and functional characterization[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(4):373-383.
12. Haynes B, Zhang Y, Liu F, et al. Gold nanoparticle conjugated Rad6 inhibitor induces cell death in triple negative breast cancer cells by inducing mitochondrial dysfunction and PARP-1 hyperactivation: Synthesis and characterization[J]. *Nanomedicine*, 2016, 12(3): 745-757.
13. 包元飞, 田薇, 熊云云. Rad6在脑胶质母细胞瘤中的表达及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(8): 1140-1143.  
BAO Yuanfei, TIAN Wei, XIONG Yunyun. Expression and clinical significance of Rad6 in glioblastoma development and progression[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2016, 36(8): 1140-1143.

本文引用: 钱静, 石宇. Rad6在肺腺癌中的表达及临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(12): 2680-2684. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.007

**Cite this article as:** QIAN Jing, SHI Yu. Expression of Rad6 in lung adenocarcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(12): 2680-2684. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.12.007