

TNFAIP3、Mn-SOD 在放射治疗鼻咽癌中的意义

邓香群^{1*}, 贺印旒²

(¹ 湖南邵阳医学高等专科学校组织学与胚胎学教研室, ² 预防医学教研室, 湖南 邵阳 422000)

[摘要] 目的: 研究肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3(tumor necrosis factor alpha induced protein 3, TNFAIP3)、锰超氧化物歧化酶(Manganese superoxide dismutase, Mn-SOD) mRNA 在放射治疗后鼻咽癌中的表达, 探讨其在鼻咽癌放射治疗中的意义。方法: 运用原位杂交方法检测放射治疗后鼻咽癌中 TNFAIP3 及 Mn-SOD mRNA 的表达。结果: TNFAIP3 mRNA 中度及强阳性表达率在放疗敏感鼻咽癌中为 15.00%, 在放疗抗拒鼻咽癌中为 45.00%; Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率在放疗敏感鼻咽癌中为 55.00%, 在放疗抗拒鼻咽癌中为 40.00%, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。在放疗抗拒鼻咽癌中, TNFAIP3 mRNA 中度及强阳性表达率与 TNM 分期呈正相关, III~IV 期表达率为 48.28%, I~II 期表达率为 36.36%, Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率与 T 分期呈正相关, T₃~T₄ 期中表达率为 63.16%, T₁~T₂ 期中表达率为 19.05%; TNFAIP3 mRNA 中度及强阳性表达率在有远处转移的放疗抗拒鼻咽癌中为 81.81%, 在无远处转移的放疗抗拒鼻咽癌中为 31.03%, Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率在有远处转移的放疗抗拒鼻咽癌中为 81.82%, 在无远处转移的放疗抗拒鼻咽癌中为 24.14%, 差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。结论: TNFAIP3 参与了放疗抗拒鼻咽癌的发生、发展; Mn-SOD 能增加鼻咽癌的放射敏感性, 增强放疗鼻咽癌的抗氧化作用。

[关键词] TNFAIP3 基因; Mn-SOD 基因; 放射治疗; 鼻咽癌

[中图分类号] R739.63

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1550-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141119

Significance of TNFAIP3 and Mn-SOD in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma

Deng Xiangqun^{1*}, He Yinni²

(¹Department of Histology and Embryology, ²Department of Phylaxiology, Shaoyang Medical College, Shaoyang 422000, China)

[Abstract] Objective: To study the expressions of tumor necrosis factor alpha induced protein 3 (TNFAIP3) and manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) mRNA in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma, as well as their significances. **Methods:** In situ hybridization detections were performed to detect the expressions of TNFAIP3 and Mn-SOD in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma. **Results:** In radiosensitive and radioresistant nasopharyngeal carcinoma, the moderately and strongly positive TNFAIP3 mRNA expression rates were 15.00% and 45.00%, respectively; the moderately and strongly positive Mn-SOD mRNA expression rates were 55.00% and 40.00%, respectively, and there were statistical significances (both $P < 0.05$). In radioresistant nasopharyngeal carcinoma, the moderately and strongly positive TNFAIP3 mRNA expression was positively correlated with TNM stage. In III-IV stage and I~II stage, the moderately and strongly positive expression rates were 48.28% and 36.36%, respectively. The moderately and strongly positive Mn-SOD mRNA expression was positively correlated with T stage. In stage of T₃~T₄ and T₁~T₂, the moderately and strongly positive expression rates were 63.16% and 19.05%, respectively. In distant metastasis and no distant metastasis, the moderately and strongly positive TNFAIP3 mRNA expression rates were 81.81% and 31.03%, respectively; the moderately and strongly positive Mn-SOD mRNA expression rates were 81.82% and 24.14%, respectively, and the differences had statistical significance (both $P < 0.05$). **Conclusion:** TNFAIP3 gene is correlated with the occurrence and development of radioresistant nasopharyngeal carcinoma. Mn-SOD gene can increase the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma and the anti-oxidative effect of radioresistant nasopharyngeal carcinoma.

[Key words] TNFAIP3 gene; Mn-SOD gene; radiotherapy; nasopharyngeal carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1550-1554]

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究项目(11C1162)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: hnsydxq@126.com

鼻咽癌为区域性高发、以低分化鳞癌为主的头颈部恶性肿瘤,在我国多发生于南方,其病死率居我国恶性肿瘤的第 8 位^[1]。据估计,2008 年世界范围内鼻咽癌新发病 84 400 例,死亡 51 600 例^[2]。由于解剖位置的关系,鼻咽癌的治疗以放射治疗为主。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 3 (tumor necrosis factor alpha induced protein 3, TNFAIP3) 于 1990 年由美国病理学家 Dixit 等发现,其可读框编码 1 种新型锌指蛋白,又命名为锌指蛋白 A20。TNFAIP3 与 TNFAIP3 相互作用蛋白质 1(TNFAIP3 interacting protein 1, TNIP1) 调控 NF- κ B 信号通路^[3],它们所编码的蛋白彼此结合,抑制 TNF 介导的细胞凋亡和 NF- κ B 活化^[4]。锰超氧化物歧化酶(Manganese superoxide dismutase, Mn-SOD) 主要存在于线粒体基质内,是线粒体内唯一能将超氧阴离子(O²⁻)转化为 H₂O₂ 的酶。Mn-SOD 作为线粒体重要的抗氧化酶,可完全抑制蛋白激酶 C 及 NF- κ B 的激活^[5]。

1 对象和方法

1.1 对象

收集湖南省肿瘤医院 2006 年第 1 次入院的鼻咽癌患者 60 例,放疗联合化疗,所有病例都有 3 年或 3 年以上随访记录,其中放疗抗拒鼻咽癌 40 例,放疗敏感鼻咽癌 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;②1 年内出现鼻咽新事物和(或)新发淋巴结;③13~24 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;②1 年内未出现鼻咽新事物和(或)新发淋巴结;③13~24 个月未出现复发或转移;④随访 3 年或 3 年以上,无复发转移者。诊断依据:①临床症状+体征;②鼻咽+颈部 MRI 或 CT(平扫+增强)。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交检测

采用 TNFAIP3 多点标记的地高辛(digoxin, DIG) 探针原位杂交法及 Mn-SOD 多点标记的 DIG 探针原位杂交法。探针及试剂盒均购自天津灏洋生物公司, TNFAIP3 探针合成序列:①5'-ATTGCCGT-CACCGTTTCGTTTTTCAGCG-3'; ②5'-AGTTGCGTGT-GTCTGTTTCCTTGAGCG-3'; ③5'-TGTCCATTCAT-CATTCCAGTTCCGAG-3'。Mn-SOD 探针合成序列:①5'-TAGTCGTAGGGCAGGTCGGGGAGGCT-3'; ②

5'-AACGCCTCCTGGTACTTCTCCTCGGTG-3'; ③5'-TGAAACCAAGCCAACCCCAACCTGAGC-3'。

1.2.2 结果判定

显微镜下观察,胞浆显黄棕色为 TNFAIP3 mRNA 或 Mn-SOD mRNA 阳性反应。按阳性细胞所占比例记录:着色细胞比例 25% 以下为 1 分, 25%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 75% 以上为 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(+++)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 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, $P \leq 0.05$ 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、Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率与 T 分期之间相关性采用 Φ 系数, Φ 值越接近 0, 两者间关联强度越小, 越接近于 1, 关系越密切。

2 结果

2.1 TNFAIP3 mRNA 在放疗后鼻咽癌中的表达

放疗抗拒及放疗敏感鼻咽癌中, TNFAIP3 mRNA 中度及强阳性表达率分别为 45.00% 和 15.00% ($\chi^2 = 5.274, P = 0.021 6$, 表 1)。

2.2 Mn-SOD mRNA 在放疗后鼻咽癌中的表达

放疗抗拒及放疗敏感鼻咽癌中, Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率分别为 40.00% 和 55.00% ($\chi^2 = 22.727, P < 0.005$, 表 2)。

表 1 TNFAIP3 在放射治疗鼻咽癌中的表达

Table 1 TNFAIP3 expression in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma

治疗效果	TNFAIP3 mRNA				中度及强阳性表达率(%)
	-	+	++	+++	
放疗抗拒(n=40)	12	10	14	4	45.00
放疗敏感(n=20)	5	12	3	0	15.00

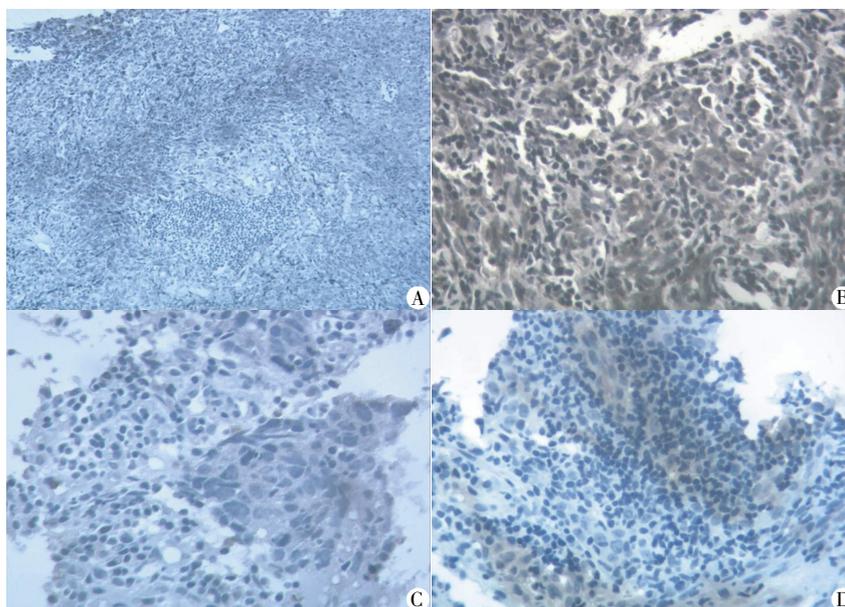
表 2 Mn-SOD 在放射治疗鼻咽癌中的表达

Table 2 Mn-SOD expression in radiotherapeutic nasopharyngeal carcinoma

治疗效果	Mn-SOD mRNA				中度及强阳性表达率(%)
	-	+	++	+++	
放疗抗拒(n=40)	5	19	11	5	40.00
放疗敏感(n=20)	2	7	8	3	55.00

2.3 TNFAIP3 mRNA 在放疗抗拒鼻咽癌中的表达
阳性表达定位于细胞浆，呈黄棕色（图 1A、1B）。随 TNM 分期不同，TNFAIP3 mRNA 中度及强

阳性表达率有差异($\chi^2 = 33.240, P < 0.005$)；有远处转移与无远处转移中的中度及强阳性表达率差异也有统计学意义($\chi^2 = 6.385, P = 0.012$, 表 3)。



A: T₂N₁M₀ II 低分化鳞癌 TNFAIP3 中度阳性(×100) ; B: T₂N₂M₀ III 低分化鳞癌 TNFAIP3 强阳性(×400); C: T₂N₁M₀ II 低分化鳞癌 Mn-SOD 弱阳性(×400); D: T₃N₁M₀ III 低分化鳞癌 Mn-SOD 中度阳性(×400)。

图 1 低分化鼻咽癌 TNFAIP3 及 Mn-SOD mRNA 表达情况(原位杂交)

Figure 1 TNFAIP3 and Mn-SOD expressions in poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (in situ hybridization)

表 3 TNFAIP3 与放疗抗拒鼻咽癌临床病理参数的关系

Table 3 The relationship between TNFAIP3 and radiative resistant clinicopathological parameters of nasopharyngeal carcinoma

病理参数	例数	TNFAIP3 mRNA				中度及强阳性表达率(%)	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++			
TNM 分期							33.240	< 0.005
I~II	11	2	5	3	1	36.36		
III~IV	29	10	5	11	3	48.28		
T 分期							2.431	0.119
T ₁ ~T ₂	21	7	7	5	2	33.33		
T ₃ ~T ₄	19	5	3	9	2	57.89		
远处转移							6.385	0.012
有	11	2	0	7	2	81.81		
无	29	10	10	7	2	31.03		

2.4 Mn-SOD mRNA 在放疗抗拒鼻咽癌中的表达
阳性表达定位于细胞浆，呈黄棕色（图 1C、1D）。Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率与 T 分期有关联性($\chi^2 = 8.087, P = 0.005$)，关联强度为 0.449 6；有远处转移与无远处转移中的中度及强阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2 = 8.783, P = 0.003$, 表 4)。

3 讨论

TNFAIP3 抑制 TNF 介导的细胞凋亡并不存在于所有细胞系中，对某些肿瘤而言，TNFAIP3 的过表达使得肿瘤细胞凋亡抑制，可能导致肿瘤的发生发展；TNFAIP3 的这种作用与氧自由基产生减少及磷脂酶 A2、磷脂酶 C 和磷脂酶 D 活性消失有关。以

表 4 Mn-SOD 与放疗抗拒鼻咽癌临床病理参数的关系

Table 4 The relationship between Mn-SOD and radiative resistant clinicopathological parameters of nasopharyngeal carcinoma

病理参数	例数	Mn-SOD mRNA				中度及强阳性表达率(%)	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++			
TNM 分期							0.423	0.515
I~II	11	1	7	2	1	27.27		
III~IV	29	4	12	9	4	44.83		
T 分期							8.087	0.005
T ₁ ~T ₂	21	4	13	4	0	19.05		
T ₃ ~T ₄	19	1	6	7	5	63.16		
远处转移							8.783	0.003
有	11	0	2	7	2	81.82		
无	29	5	17	4	3	24.14		

往研究表明,Mn-SOD 是潜在的肿瘤抑制基因。也有研究表明,Mn-SOD 高表达可能与肿瘤(原发灶和转移灶)进展有关,降低鼻咽癌放射敏感性,Mn-SOD 表达使鼻咽癌生存率下降。颈淋巴结转移是较原发灶对鼻咽癌预后影响更大的因素,研究发现 N 分期是影响 III、IV 期鼻咽癌预后的独立因素^[6]。由于 Mn-SOD 只存在于线粒体内,参与抗氧化损伤的代谢活动,因此其表达量的多少在一定程度上反映了细胞内线粒体的代谢活跃程度^[7]。人类 Mn-SOD 是由位于 6 号染色体长臂 2 区 5 带(6q25)的核基编码的抗氧化酶,在转录起始部位的上游及 3' 端集中分布着相关转录因子结合序列^[8]。

TNFAIP3 具有抗炎、抗细胞凋亡、免疫调节等多重功能^[9],在神经胶质瘤中检测到 63.9%的瘤组织样本存在 TNFAIP3 高表达,与临床分期相关,体外实验抑制其表达能减缓肿瘤细胞的生长^[10],在 OVCAR3 卵巢癌细胞内经 RNA 干扰技术阻断 TNFAIP3 表达后能促进癌细胞凋亡^[11]。在本研究中,放疗抗拒与放疗敏感鼻咽癌中,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($P < 0.05$)。TNFAIP3 能导致鼻咽癌放疗抗拒性的产生,这种效应可能主要通过抑制 TNF 介导的肿瘤细胞凋亡实现。放疗抗拒与放疗敏感鼻咽癌中,Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率分别为 40.00%和 55.00%,差异有统计学意义($P < 0.005$)。进一步说明 Mn-SOD 是一种潜在的抑癌基因,它的过表达能够减弱肿瘤细胞的侵袭与转移,提高患者生存率。

放疗抗拒鼻咽癌中,TNFAIP3 mRNA 中度及强阳性表达率在 TNM 分期中有差异($P < 0.005$);有远处转移的放疗抗拒鼻咽癌中 TNFAIP3 mRNA 中度

及强阳性表达高于无远处转移者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。本文认为 TNFAIP3 参与了放疗抗拒鼻咽癌的发生、发展、侵袭及转移。TNFAIP3 抑制 TNF 介导的细胞凋亡,抑制 NF- κ B 活化,同时减少放疗过程中产生的氧自由基,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。

放疗抗拒鼻咽癌中,TNM 分期 III~IV 期及 I~II 期中 Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率分别为 44.83%和 27.27%,差异无统计学意义;40 例放疗抗拒鼻咽癌患者均有颈淋巴结转移,颈淋巴结转移可能在鼻咽癌预后中占主导因素。有研究发现,前列腺癌细胞表达 Mn-SOD,参与前列腺放疗抵抗性的产生^[12]。辐射可以作用于机体和细胞中的水分子,引发水分子的活化和氧自由基的生成^[13],失衡、高浓度的活性氧产生可以对细胞产生一系列损伤^[14],Mn-SOD 是重要的抗氧化酶,能清除放疗产生的氧自由基,保护肿瘤细胞。本研究中,放疗抗拒鼻咽癌 T 分期 T₃~T₄ 期中 Mn-SOD mRNA 中度及强阳性表达率高于 T₁~T₂ 期($P < 0.05$);有远处转移中 Mn-SOD mRNA 的表达率高于无远处转移者($P < 0.05$)。这说明 Mn-SOD 基因提高了放疗抗拒鼻咽癌线粒体的代谢活动,增强了其抗氧化能力。

本研究认为,TNFAIP3 和 Mn-SOD 都参与了放疗抗拒鼻咽癌的发展,两者具有协同作用,应该与两者都具有抑制 NF- κ B 活化及使氧自由基减少的作用有关。作为一种普遍存在的转录因子,NF- κ B 是多条信号通路的汇聚点^[15]。氧自由基的减少,可以抵御放疗抗拒鼻咽癌细胞的氧化损伤作用。因此,在放疗抗拒鼻咽癌的治疗中,降低 TNFAIP3 和 Mn-SOD 基因的表达,有望减缓患者病情,提高患者的生存质量。

[参考文献]

- [1] 宋亚顺. 多西他赛单药同步放化疗治疗局部晚期鼻咽癌疗效研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2014, 34(3):343-345
- [2] 罗金红, 林 昀, 周 俊, 等. 多西他赛联合奈达铂诱导化疗及奈达铂单药同期放化疗治疗晚期鼻咽癌的临床观察[J]. 肿瘤, 2011, 31(6):532-537
- [3] Nair RP, Duffin KC, Helms C, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways[J]. Nat Genet, 2009, 41(2):199-204
- [4] Elder JT, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Molecular dissection of psoriasis: integrating genetics and biology[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(5):1213-1226
- [5] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. Nature, 2001, 414 (6865): 813-820
- [6] 袁 君, 魏 瑞, 章 正, 等. 135例鼻咽癌患者放疗后影响远期预后的因素分析[J]. 中国医师杂志, 2003, 9, 15(9):1208-1209
- [7] Ying YL, Balaban CD. Regional distribution of manganese superoxide dismutase 2 (Mn SOD2) expression in rodent and primate spiral ganglion cells[J]. Hear Res, 2009, 253 (1-2):116-124
- [8] Lortz S, Tiedge M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 34(6):683-688
- [9] Maelfait J, Roose K, Bogaert P, et al. A20 (Tnfrsf3) deficiency in myeloid cells protects against influenza A virus infection[J]. PLoS Pathog, 2012, 8:e1002570
- [10] Guo Q, Dong H, Liu X, et al. A20 is overexpressed in glioma cells and may serve as a potential therapeutic target[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(7):733-741
- [11] 索玉平. 锌指蛋白 A20 表达沉默促进 OVCAR3 卵巢癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(12):1356-1358
- [12] Holley AK, Xu Y, St Clair DK, et al. RelB regulates manganese superoxide dismutase gene and resistance to ionizing radiation of prostate cancer cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1201(7):129-136
- [13] 张佳更, 范雪云, 金玉兰, 等. Mn-SOD 基因多态性与放射人员染色体损伤易感性研究[J]. 工业卫生与职业病, 2012, 38(2):95-98
- [14] 孔彦平, 张 静, 肖睿娟, 等. AFP 调控的携带 Mn-SOD 基因的腺病毒对肝癌细胞的杀伤作用[J]. 浙江理工大学学报, 2011, 25(5):804-808
- [15] 杨 皎, 夏 雷, 汤 郁, 等. 肿瘤坏死因子预处理促进骨髓间充质干细胞成骨分化潜能[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2014, 34(3):275-280

[收稿日期] 2014-02-25

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑: 接雅俐)