

网络出版时间: 2021-3-18 16:19 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1521.020.html>

◇临床医学研究◇

直肠癌中 HuR 表达水平及其对新辅助放化疗所致 DNA 损伤效应的影响

方昌义¹, 杨明威², 李韵松¹, 杨阳¹, 何佳慧³, 余昌俊¹

摘要 目的 探讨 RNA 结合蛋白人类抗原 R (HuR) 在直肠癌组织中的表达水平及其对新辅助放化疗所致 DNA 损伤效应的影响。方法 收集并检测 56 例中低位(定义为经硬结/直肠镜测量肿瘤下缘距肛缘 ≤ 12 cm)直肠癌组织标本对中的 HuR 表达水平,并分析 HuR 相对表达水平与患者术后临床病理参数之间的联系。采集并运用免疫组化检测 33 例初始评估无法根治性切除且行新辅助放化疗的中低位直肠癌患者的肠镜活检石蜡包埋组织标本中的 HuR 蛋白表达水平,分析其相对表达水平是否影响中低位直肠癌新辅助放化疗的临床客观缓解率。同时在细胞水平(直肠癌细胞株 DLD-1)检测 HuR 水平对电离辐射及化学药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)所致 DNA 损伤效应的影响。结果 中低位直肠癌组织中 HuR 蛋白阳性表达率增高,且 HuR 阳性表达的中低位直肠癌患者的新辅助放化疗临床客观缓解率差于 HuR 低表达者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞水平彗星实验(Comet assay)显示在直肠癌细胞中敲减 HuR 表达水平,可增加电离辐射及化疗药物引起的 DNA 双链断裂(DSBs)的累积。结论 HuR 高表达的中低位直肠癌患者的新辅助放化疗临床客观缓解率较低,可能与 DNA 损伤效应机制有关, HuR 高表达是导致直肠癌患者放化疗抵抗的关键因素。

关键词 人类抗原 R (HuR); 直肠癌; DNA 损伤; 放化疗抵抗

中图分类号 R 735.34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0613-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.021

结直肠癌是世界范围内频发的消化道恶性肿瘤,发病率及病死率长期居高不下^[1-2]。虽然近年来中国结直肠癌的多学科综合诊疗逐渐规范化、常态化,临床疗效提高,但总体生存率仍然不高,5 年

标准化生存率比欧美等发达国家低 10% 左右^[3]。尤其在为中低位直肠癌患者个体化制定最佳的治疗方案时不仅要兼顾手术根治性及功能的保护,还要取得最大肿瘤根治与最小生活质量影响的平衡,对于临床医师来说颇具挑战性^[4]。而且相对于结肠癌来说,中低位直肠癌的盆腔局部复发风险明显升高、预后较差^[5]。因此,对于中低位直肠癌,多数指南推荐实施放化疗和手术联合的序贯多学科综合治疗^[6]。然而,与单纯手术相比,虽然以术前新辅助放化疗为主的多学科综合治疗降低了中低位直肠癌患者的盆腔局部复发风险,但同时也带来了治疗副损伤^[7]。因此,筛选出可能从术前新辅助放化疗中获益的中低位直肠癌患者亚群进行精准施策,将是提高直肠癌尤其是中低位直肠癌患者临床疗效的良好策略,也是结直肠癌精准治疗及个体化治疗的重要环节。有文献^[8-9]报道, HuR 参与调控细胞 DNA 损伤,与肿瘤的放化疗抵抗有关。该研究拟通过实验检测直肠癌组织中的 HuR 表达水平并验证其表达水平可影响直肠癌细胞对放化疗导致的 DNA 双链断裂的累积效应进而影响患者对新辅助放化疗的反应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 共收集 2018 年 9 月—2019 年 10 月间 56 例在安徽医科大学第一附属医院高新胃肠外一病区行根治性直肠癌切除术的中低位直肠癌组织标本,入选病例的直肠癌诊断为明确的病理组织学所证实并具有完整的术后病理报告资料;入选病例术前未行化疗、放疗、靶向及免疫治疗等抗癌治疗。标本取材及保存与近年研究^[10]相同。同时收集分析 33 例 2019 年 1 月—2020 年 2 月期间入住安徽医科大学第一附属医院高新胃肠外一病区初次评估无法根治性切除且行术前新辅助放化疗的中低位直肠癌患者的肠镜活检石蜡包埋组织标本,所选标

2020-09-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81902451)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 普外科、² 放疗科、³ 病理科, 合肥 230022

作者简介: 方昌义,男,主治医师,博士;

余昌俊,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yuchangjun321@163.com

本均具有明确的病理组织学证据,其中伴有肝、肺转移者 5 例,前列腺、精囊腺、膀胱及附件侵犯者 21 例,髂血管旁淋巴结转移者 7 例。

1.1.2 试剂与仪器 兔抗人 HuR 单抗(艾博抗贸易有限公司,上海); GENMED 细胞 DNA 损伤完全荧光检测试剂盒(GENMED scientifics 公司,美国); 激光共聚焦显微镜(Leica 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 加样及操作的具体步骤同前^[10]。设计 HuR 引物序列信息(5'-3'),上游引物: 5'-ATGAAGACCACATGGCCGAAGACT-3' (forward); 下游引物 5'-AGTTCACAAAGCCATAGCCCAAGC-3' (reverse); 内参为 GAPDH, 上游引物: 5'-AGC-CTCAAGATCAGCAATGCC-3' (forward); 下游引物: 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3' (reverse)。

1.2.2 免疫组化 免疫组化的步骤与评分标准与近年研究^[10]一致。

1.2.3 彗星实验 常规培养直肠癌细胞株 DLD-1 于直径约 35 mm 的细胞培养皿中 24 h,然后将细胞暴露于 5-Fu(5 μ mol/L,单皿)中 2 h,然后在室温下单次照射 20 Gy,剂量率为 0.81 Gy/min,照射后立即孵育细胞 4 h 后获取细胞,裂解并融于琼脂糖中,用 70% 乙醇固定,在黑暗中用 SYBR 绿色染色 30 min。荧光显微镜拍摄彗星图像,并使用 Casplab 彗星分析软件测量每个样本至少 50 颗彗星的橄榄尾矩。

1.3 统计学处理 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法半定量 HuR 的表达水平,student's t 检验、 χ^2 检验分别用于比较中低位直肠癌组织标本对中的 HuR 表达水平差异及 HuR 的相对表达水平与术后临床病理特征之间的关系。绘制不同 HuR 表达水平直肠癌患者的 Kaplan-Meier 生存曲线并使用 Log-rank 检验比较两组患者术后总生存期差异。数据使用 SPSS 22.0 软件包进行统计学处理, $P < 0.05$ 定义为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 直肠癌组织中 HuR 表达上调其相对表达水平与肿瘤恶性临床病理特征 Real-time PCR 结果显示 HuR 在大部分中低位直肠癌组织中表达水平高于相应的癌旁正常组织(36/56, 64.28%)。见图 1。该研究根据临床病理特征分组进行比较,检验方法为卡方检验,结果显示 HuR 高表达组患者病

理特征恶性程度高,临床分期较晚(Ⅲ期及Ⅳ期患者 $n = 18$, $P = 0.003$),微血管易受肿瘤累及($n = 15$, $P = 0.013$),淋巴结转移较多($n = 12$, $P = 0.019$), $P < 0.05$,差异有统计学意义。见表 1。随后分析了癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)公共数据库中一总数为 159 例直肠癌患者的样本的总生存数据,Kaplan-Meier 生存曲线显示 HuR 表达增高的直肠癌患者术后中位生存期为 4.5 年,术后 5 年总生存率低于 50%,与 HuR 低表达患者组差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

表 1 56 例中低位直肠癌组织中 HuR 表达水平与不同临床病理指标之间的关系($n = 56$)

临床病理特征参数	n	HuR 相对表达水平		χ^2/P 值
		低	高	
年龄(岁)				1.198/0.274
≤65	22	9	13	
>65	34	19	15	
性别				0.292/0.589
男	32	15	17	
女	24	13	11	
肿瘤最大直径(cm)				0.080/0.778
≤3	37	19	18	
>3	19	9	10	
TNM 分期				8.743/0.003
I + II	31	21	10	
III + IV	25	7	18	
组织分化				0.664/0.451
良好 + 中等	33	18	15	
差	23	10	13	
微血管侵犯				6.171/0.013
是	21	6	15	
否	35	22	13	
淋巴结转移				5.500/0.019
阳性	16	4	12	
阴性	40	24	16	

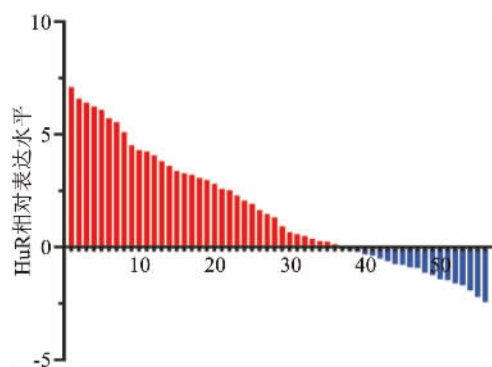


图 1 HuR 在直肠癌组织中表达的水平

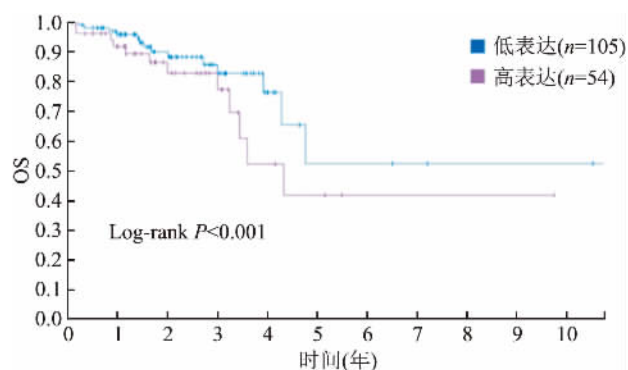


图2 Kaplan-Meier 生存曲线
与低表达患者组比较: log-rank $P < 0.001$

2.2 中低位直肠癌组织中 HuR 蛋白阳性表达水平与新辅助放化疗临床客观缓解率 免疫组化结果显示 HuR 在中低位直肠癌组织中阳性表达 (棕褐色颗粒阳性信号主要表达于细胞核), 而在配对的癌旁正常上皮组织中不表达或弱表达。见图 3。随后该研究根据 HuR 蛋白阳性表达情况将 33 例中低位直肠癌患者分为两组, 采用卡方检验分析 HuR 蛋白表达水平与患者对新辅助放化疗的临床反应的关系。分析结果表明 HuR 阳性表达的中低位直肠癌患者对新辅助放化疗反应较差, 临床客观缓解率较低 ($P < 0.05$)。见表 2; 新辅助放化疗前后影像学资料对比结果显示 HuR 阳性表达患者新辅助放化疗前后病灶变化不大或无明显变化。见图 4; 部分行新辅助治疗后序贯手术的患者术后标本 HE 染色图片结果也显示 HuR 阳性表达患者肿瘤退缩较差。见图 5。

表 2 不同 HuR 表达水平对新辅助放化疗临床客观缓解的比较 [n(%)]

组别	n	CR (完全缓解)	PR (部分缓解)	SD (疾病稳定)	PD (疾病进展)	CR + PR
阳性	21	0 (0.00)	2 (9.52)	16 (76.19)	3 (14.29)	2 (9.52)
阴性	12	2 (16.67)	6 (50.00)	3 (25.00)	1 (8.33)	8 (66.67)
χ^2/P 值						11.448 / 0.001

2.3 HuR 水平变化可影响直肠癌细胞受放化疗引起的 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs) 的累积 HuR 导致放化疗抵抗可能与其影响肿瘤细胞 DNA 双链断裂的累积效应有关。该研究在直肠癌细胞株 DLD-1 中敲减 HuR 的表达, 并通过彗星实验观察 HuR 表达抑制后 DNA 损伤效应是否发生改变, 结果显示在细胞水平抑制 HuR 的表达后, 与对照组比较, 经过同等剂量化学药物及放射照

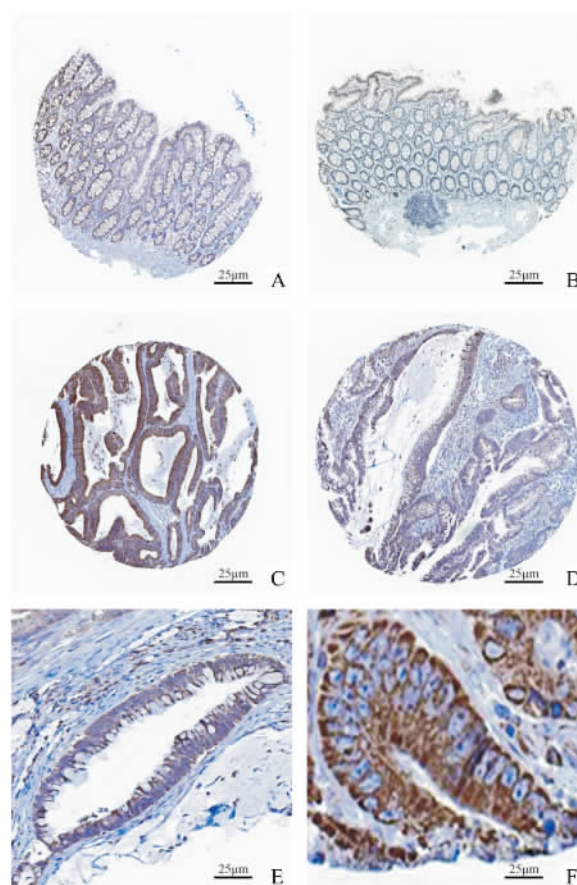


图3 HuR 在直肠癌组织及相应的癌旁正常上皮表达水平
A、B: 正常直肠黏膜上皮; C、D: 直肠癌组织 $\times 100$; E、F: 直肠癌组织 $\times 400$

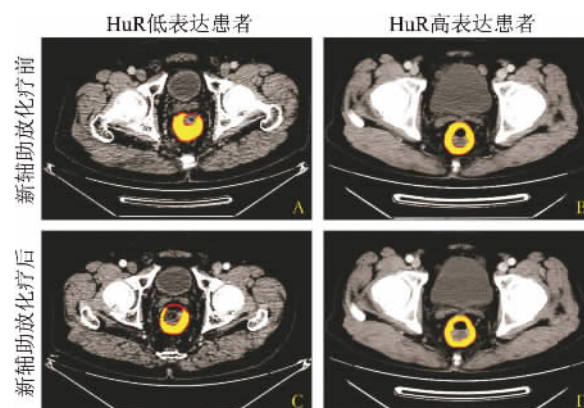


图4 不同 HuR 水平的中低位直肠癌患者新辅助放化疗前后原发病灶影像学表现

A、B: 为新辅助治疗前的原发病灶增强 CT 图像; C、D: 为新辅助治疗后同一层面的增强 CT 图像

射下抑制组细胞呈现彗星尾矩延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 6。提示 DNA 双链断裂的累积效应增加。由此表明 HuR 过表达影响 DNA 双链断裂的累积可能是导致肿瘤细胞放化疗抵抗的关键

原因。

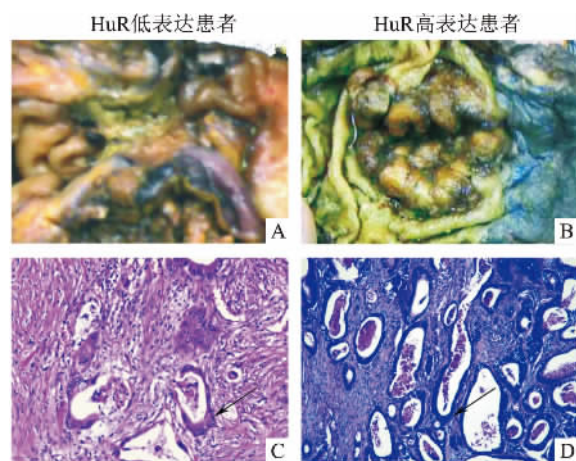


图5 不同 HuR 水平的中低位直肠癌患者新辅助化疗后的大体标本及 HE 染色图

A、B: 为福尔马林固定后的直肠大体标本; C、D: 为对应的 HE 染色图片; 箭头所示处显示新辅助治疗后肿瘤的退缩情况

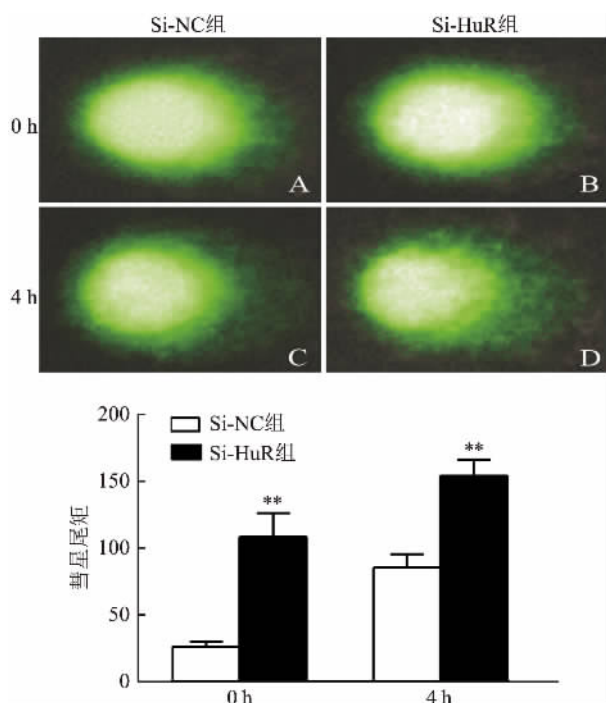


图6 彗星实验

A、B: 照射前的对照组及 HuR 抑制组细胞; C、D: 照射后的对照组及 HuR 抑制组细胞; 与 Si-NC 组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

近年来随着多学科协作(multi-disciplinary treatment, MDT)的加速建设和推广,结直肠癌的综合诊疗逐渐规范化、常态化,临床疗效得到大幅提升,但结直肠癌患者的总体预后仍不尽如人意,尤其是中

低位直肠癌患者面临较高的盆腔局部复发风险。对于 T3 和(或) N+ 的中低位局部进展期直肠癌,新辅助放化疗序贯全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)已成为国内外多部指南推荐的标准治疗模式,这种模式的实施能够显著降低肿瘤分期、提高保肛机会和根治性手术切除率,并且可改善患者的 5 年总体生存率(overall survival, OS) 及无病生存率(disease free survival, DFS)^[11]。但也有许多研究^[12]表明,新辅助放化疗后序贯手术患者的手术并发症如:吻合口瘘、吻合口狭窄、会阴部切口感染、术后切口延迟愈合等发生率明显高于单纯手术的患者;同时放化疗还会导致部分患者骨髓抑制、肝功能损害、机体免疫力下降、性功能受损、难治性盆腔炎、肛门节制功能下降、肠壁放射性水肿、肠管顺应性下降等不良后果。因此,在无法预估患者对新辅助放化疗的敏感性和不良反应之前,结直肠外科医师对于中低位直肠癌患者的治疗方案制定应持更加谨慎的态度。由此,筛选出适合术前新辅助放化疗的中低位直肠癌患者,将是提高临床客观缓解率和患者预后生存的良好策略,也是复杂直肠癌患者综合治疗个体化和精准化的内涵要求。

HuR (也称 ELAVL1) 是胚胎致死性异常视觉(embryonic lethal abnormal vision, ELAVL) 家族蛋白的成员之一,是一种 RNA 结合蛋白,优先与富含 Au 或 U 序列的 3'-UTR 区域结合,其主要位于细胞核,但受到特定刺激后可转移到细胞质中进而影响特定 mRNAs 亚群的稳定性和(或)翻译过程^[13]。与此相对应的是, HuR 的高表达水平与包括散发型结直肠癌及家族性腺瘤息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP)在内的多种恶性肿瘤的肿瘤分级和恶性程度密切相关,也与患者的治疗抵抗和预后不良紧密关联^[14]。其可能的机制是影响 DNA 双链断裂的修复,涉及抗凋亡作用以及 Caspase-2 分子的抑制等^[9,14]。由此, HuR 具有评估包括新辅助放化疗在内的多种辅助治疗临床反应以及患者预后的潜能。

该研究表明,直肠癌组织中 HuR 表达增高,与之相一致的是免疫组化也显示直肠癌组织中 HuR 蛋白阳性表达率高于正常黏膜上皮组织。HuR 的高表达水平与肿瘤 pTNM 分期及淋巴结阳性率、微血管浸润密切相关,该研究结果与 Lang et al^[15] 研究结果相一致。该研究 TCGA 公共数据库中 159 例直肠癌患者的生存数据来验证 HuR 表达水平也可影响患者的预后,结果表明 HuR 高表达直肠癌患者组 5 年 OS 仅有 44%,而 HuR 低表达患者组达到

53%, 差异有统计学意义。以上结果提示 HuR 高表达预示着肿瘤侵袭性强; HuR 高表达是影响患者预后的因素之一。为了验证 HuR 表达水平对患者新辅助放化疗反应的影响, 该研究首先运用免疫组化方法检测了 33 例行新辅助放化疗的中低位直肠癌患者的肠镜活检石蜡标本, 并依据 HuR 蛋白阳性表达水平将患者分为两个亚组; 随后通过卡方检验比较亚组患者对新辅助放化疗的临床反应, 结果显示 HuR 阳性表达组患者的临床客观缓解率明显低于 HuR 阴性表达组患者两组间差异有统计学意义 (χ^2/P 值: 11.448/0.001)。与此相一致的是, 通过对比新辅助治疗前后的影像学资料, 结果显示 HuR 阳性表达的患者新辅助放化疗前后肿瘤大小变化不明显, 部分序贯手术患者的术后大体标本及 HE 染色也显示肿瘤退缩较差, 临床疗效不佳。而在细胞水平, 通过抑制 HuR 的表达, 可增加电离辐射及化学药物 5-FU 所致 DNA 双链断裂的累积效应。以上结果进一步表明 HuR 参与中低位直肠癌患者的放化疗抵抗, 影响患者预后。调控 HuR 水平可能是干预中低位直肠癌患者对新辅助治疗敏感性的有效途径之一。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394–424.
- [2] Fang J Y, Shi Y Q, Chen Y X, et al. Chinese consensus on prevention of colorectal cancer (2016, Shanghai) [J]. *J Dig Dis*, 2017, 18(2): 63–83.
- [3] Allemani C, Weir H K, Carreira H, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25, 676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9972): 977–1010.
- [4] Baxter N N, Garcia-Aguilar J. Organ preservation for rectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(8): 1014–20.
- [5] Rajput A, Bullard Dunn K. Surgical management of rectal cancer [J]. *Semin Oncol*, 2007, 34(3): 241–9.
- [6] Morino M, Risio M, Bach S, et al. Early rectal cancer: the European association for endoscopic surgery (EAES) clinical consensus conference [J]. *Surg Endosc*, 2015, 29(4): 755–73.
- [7] Rahbari N N, Elbers H, Askoxylakis V, et al. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer: meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(13): 4169–82.
- [8] Zhou Y, Chang R, Ji W, et al. Loss of scribble promotes snail translation through translocation of HuR and enhances cancer drug resistance [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(1): 291–302.
- [9] Andrade D, Mehta M, Griffith J, et al. HuR reduces radiation-induced DNA damage by enhancing expression of ARID1A [J]. *Cancers*, 2019, 11(12): 2014.
- [10] 方昌义, 管建宝, 苗祥, 等. 结直肠癌中 RAC3 表达水平及其对 FOLFOX 方案疗效的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54 (5): 805–9.
- [11] Yeo S G, Kim D Y, Kim T H, et al. Pathologic complete response of primary tumor following preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: long-term outcomes and prognostic significance of pathologic nodal status (KROG09–01) [J]. *Ann Surg*, 2010, 252(6): 998–1004.
- [12] Lin J Z, Peng J H, Qdaisat A, et al. Preoperative chemoradiotherapy creates an opportunity to perform sphincter preserving resection for low-lying locally advanced rectal cancer based on an oncologic outcome study [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(35): 57317–26.
- [13] Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2010, 1 (2): 214–29.
- [14] Eberhardt W, Nasrullah U, Haeussler K. Inhibition of caspase-2 translation by the mRNA binding protein HuR: a novel path of therapy resistance in colon carcinoma cells [J]. *Cells*, 2019, 8 (8): 797.
- [15] Lang M, Berry D, Passecker K, et al. HuR small-molecule inhibitor elicits differential effects in adenomatous polyposis and colorectal carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2424–38.

Expression of HuR in middle-low rectal cancer and its efficacy in neoadjuvant chemoradiation therapy response

Fang Changyi¹, Yang Mingwei², Li Yunsong¹, et al

(¹Dept of General Surgery, ²Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the expression and its efficacy in predicting neoadjuvant chemoradiation therapy sensitivity of human antigen R (HuR) in rectal cancer. **Methods** Fifty-six paired middle-low rectal cancer samples and clinicopathologic characteristics were analyzed. HuR expression in middle-low rectal cancer tissues and exploratory biopsies was detected by quantitative real-time PCR and immunohistochemistry. The capability of HuR to influence

DNA DSBs in the presence of chemo-radiation was determined by using comet assay. **Results** HuR was mostly up-regulated in middle-low rectal cancer tissues and over expression HuR was significantly associated with invasive clinicopathologic characteristics such as advanced TNM stage, positive lymph node invasion and vascular infiltration. The Kaplan-Meier plot of overall survival from TCGA database demonstrated that high HuR expression patient subgroup had a shorter median survival period compared with the low HuR expression subgroup. Moreover, patients with high HuR expression were of inferior therapeutic sensitivity to chemo-radiation therapy. **Conclusion** HuR is over expressed in rectal cancer and possessed the capabilities to resist chemo-radiation therapy. In addition, inhibition of HuR can improve chemo-radiation therapeutic response.

Key words human antigen R; rectal cancer; DNA damage; chemoradiation therapy resistance

(上接第 595 页)

Effect and mechanism of captopril on lipid metabolism disorder in diabetic retinopathy rats

Gao Xiang, Liu Kou, Gui Yanchao, et al

(Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of captopril on lipid metabolism in diabetic mellitus (DM) rats and its relationship with diabetic retinopathy (DR). **Methods** Thirty male SD rats aged 8 weeks were randomly divided into normal control group ($n = 10$) and model group ($n = 20$). The model rats were induced by high-fat diet (HFD) combined with streptozotocin (STZ) to establish the model of type 2 diabetes mellitus rats. The model rats were randomly divided into captopril group (DM + CAP) and normal saline group (DM + NS) with 10 rats in each group. Rats in DM + CAP group were gavaged with captopril 25 mg/(kg · d), and DM + NS group were gavaged with equal volume normal saline. Body weight and fasting blood glucose were measured weekly. After 8 weeks of intervention, the rats were euthanized, the whole blood was collected, serum was separated and retinal tissue was collected. The concentrations of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in serum were detected; the structure of retina was observed, including the structure changes of inner and outer nuclear layers, and the number of new blood vessels; the levels of cholesterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) and cholesterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) were detected. **Results** Captopril could not reduce fasting blood glucose in rats. Compared with DM + NS group, the concentration of TC and TG in serum of DM + CAP group decreased ($P < 0.01$); the retinal tissue structure improved: the inner and outer nuclear layer cells were tightly connected, the number of new blood vessels was less; the expression levels of SREBP1 and SREBP2 decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Captopril can reduce the blood lipid related indexes of diabetic rats, improve the retinal tissue morphology, and reduce the key enzymes of lipid synthesis in the retina of diabetic rats. The mechanism may be related to its inhibition of lipid synthesis.

Key words diabetic retinopathy; captopril; cholesterol; triglycerides; sterol regulatory element binding protein 1; sterol regulatory element binding protein 2