

TRIM59 在非小细胞肺癌中的表达、临床意义及与 c-myc、CDC25A 蛋白的相关性研究

李琛 杨晓光 钱海红 陈丽萍 苏菁 冯萍 侯海军 张志华

摘要 目的 探讨非小细胞肺癌(NSCLC)组织中三结构域蛋白59(TRIM59)的表达、临床意义及与细胞周期相关蛋白c-myc、CDC25A的相关性。方法 选取NSCLC组织40例(NSCLC组)、正常肺组织40例(正常组),应用RT-PCR法检测2组TRIM59 mRNA的表达,应用免疫组织化学染色法检测两组TRIM59、c-myc、CDC25A的表达,同时收集患者的临床资料,分析TRIM59、c-myc和CDC25A蛋白的表达与临床病理特征间的关系;应用Spearman检验分析三种因子间的相关性,并绘制生存曲线,分析TRIM59与NSCLC患者预后之间的相关性,建立Cox回归模型分析NSCLC患者预后的因素。结果 RT-PCR法结果显示: NSCLC组中TRIM59 mRNA的表达水平明显高于正常组,差异有统计学意义($t = 2.901, P = 0.002$);免疫组织化学染色法结果显示: NSCLC组TRIM59、c-myc、CDC25A的表达水平明显高于正常组,差异有统计学意义($P = 0.000$); NSCLC组中TRIM59、c-myc、CDC25A蛋白的表达水平均与病变分化程度、TNM分期、脉管浸润、淋巴结转移及肝转移相关($P < 0.05$),而与年龄、性别无关($P > 0.05$); Spearman相关分析显示: NSCLC组中TRIM59与c-myc、CDC25A均呈明显相关性($r = 0.451, P = 0.000; r = 0.421, P = 0.002$);生存分析显示: TRIM59表达阳性的NSCLC患者生存期明显低于阴性患者($P < 0.05$); Cox回归模型证实TRIM59表达是NSCLC患者预后的独立影响因素。结论 TRIM59的高表达在NSCLC的发生、发展中发挥重要作用,考虑与诱导细胞周期相关蛋白c-myc、CDC25A上调有关,TRIM59可作为NSCLC早期诊断和预后监测的潜在生物学指标。

关键词 TRIM59; c-myc; CDC25A; 非小细胞肺癌; 临床意义; 预后

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0287-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.026

据最新流行病学调查显示 2014 年我国居民肺

2019-11-06 接收

基金项目: 河北省省级科技计划(编号: 182777206); 河北省张家口市科技局指导性计划(编号: 1521065D)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院呼吸内科 张家口 075000

作者简介: 李琛,女,主治医师,硕士;

张志华,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zzh19641229@163.com

癌发病和死亡例数均位居第一位,严重威胁国民健康^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占肺癌总数的85%以上,其生长分裂增殖较慢,转移扩散较晚。近年来,尽管NSCLC诊疗手段不断提高,但其五年生存率仍较低。从分子生物学水平,寻找敏感度高、特异性强的标志物已成为NSCLC早期诊断、治疗评估和预后监测的研究热点,同时为肿瘤的放化疗、靶向治疗提供新的技术支撑^[2-3]。

三结构域蛋白59(tripartite motif-59, TRIM59)系TRIM蛋白超家族的重要成员之一,于2011年由Valiyeva et al^[4]首次在小鼠前列腺癌模型中证实其是致癌基因,在随后的研究中逐渐证实TRIM59在乳腺癌、胃癌、卵巢癌等恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移等过程中发挥重要作用^[5-7]。但TRIM59在NSCLC组织中的研究较少,且相关致癌机制不明确。该研究通过RT-PCR法和免疫组化法检测TRIM59基因和蛋白在NSCLC组织中的表达,分析TRIM59蛋白与NSCLC临床病理特征和细胞周期相关蛋白c-myc、CDC25A的相关性,初步探讨TRIM59的致癌机制,并结合生存时间的随访,为NSCLC的早期诊断、治疗和预后监测提供准确、可靠的生物学指标。

1 材料与方法

1.1 病例资料 本研究共纳入2012年2月~2014年2月于河北北方学院附属第一医院病理确诊的NSCLC组织和正常肺组织标本各40例,同时收集患者完整的临床资料,本研究经该院伦理委员会鉴定批准。

1.2 主要试剂与实验方法

1.2.1 主要试剂和仪器 RNA逆转录试剂盒购自日本Takara公司; SYBR Green实时定量PCR试剂盒购自日本Takara公司; TRIM59和GAPDH引物由生物工程(北京)有限公司设计合成;全自动电化学发光免疫分析仪购自瑞士罗氏公司; E2010、DEPC水购自美国Sigma公司; RNA逆转录试剂盒购自加拿

大 Fermentas 公司; 兔抗人 TRIM59 单克隆抗体、兔抗人 c-myc、CDC25A 多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2.2 RT-PCR 法检测 TRIM59 mRNA 表达 提取总 RNA 并定量, 反转录为 cDNA。TRIM59 引物, 上游 5'-CCTGTGTTT GAGATAGATTTAAGAGC-3', 下游 5'-GCAACAAGGTGAGACCCAGT-3'; GAPDH 引物, 上游 5'-AAATCCCATCACCATCTTCC-3', 下游 5'-TCACACCCATGACGAACA-3'。

PCR 反应试剂: SYBR Premix Ex Taq 5 ml, PCR forward primer 0.2 μl, PCR reverse primer 0.2 μl, ROX Reference Dye 0.2 μl, cDNA 模板 100 ng, DEPC 水共 10 μl。轻柔混匀, 离心。PCR 反应体系 95 °C 孵育 30 s; 95 °C 孵育 5 s, 60 °C 孵育 20 s, 反应共进行 40 个循环; 然后 72 °C 孵育 20 s, 95 °C 孵育 15 s 终止反应。荧光定量 PCR 实验数据处理使用² ΔΔCt 法, 计算各样本 Ct 平均值 (Ct = Ct_{net1} - Ct_{3actin})。其中, 中位数以上为高表达, 以下则考虑低表达。

1.2.3 免疫组化法检测 TRIM59 的表达及判定 10% 的甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 切片厚度 4 μm, 苏木精 - 伊红染色, 病理诊断。80 °C 烤箱烘烤 30 min, 脱水, 内源性过氧化物酶灭活, 高温高压水化修复; 加入一抗 (1 : 400) 50 μl 4 °C 冰箱中孵育过夜; 加入二抗 50 μl, DAB 显色, 苏木精轻度复染, 盐酸乙醇分化, 各级乙醇 (70%、75%、85%、90%、95%、100%) 逐次脱水, 松节油透明和树脂封片处理, 磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照, 光镜下观察。

应用半定量积分法, 包括阳性细胞数占视野百分比与阳性强度, TRIM59、c-myc 蛋白以细胞质中出现黄色、棕黄色为阳性表达, 而 CDC25A 染色主要定位于细胞核, 其中阳性细胞计分: ≤5% 计 0 分, 6% ~ 25% 计 1 分, 26% ~ 50% 计 2 分, 51% ~ 75% 计 3 分, >75% 计 4 分。阳性强度: 浅黄色计 1 分, 黄色计 2 分, 红褐色计 3 分。二者相乘计为总分, 0 分计为 -, 1 ~ 4 分计为 +, 5 ~ 8 分计为 ++, 9 ~ 12 分计为 +++, - 为阴性, + 为弱阳性, ++ ~ +++ 为强阳性。

1.3 随访 通过门诊复查、电话随访, 时间为 2018 年 11 月 30 日。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件分析, 计数资料以百分率表示, 两组比较运用 χ² 检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用 t 检验, 应用 Spearman 法进行相关性分析; 应用 Kaplan-Meier 法

绘制生存曲线, 通过 Cox 回归模型分析预后的影响因素, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 法检测 TRIM59 mRNA 表达 以 TRIM59/GAPDH 比值作为 RT-PCR 定量分析, 与 TRIM59 mRNA 在正常组中的表达相比, NSCLC 组中 TRIM59 mRNA 的表达水平明显升高, 差异有统计学意义 (t = 2.901, P = 0.002)。见图 1。

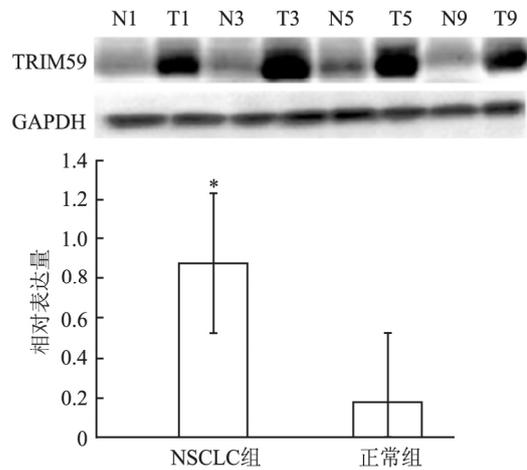


图 1 RT-PCR 检测 NSCLC 组和正常组中的 TRIM59 mRNA 表达情况 与正常组比较: * P < 0.05

2.2 免疫组化检测 TRIM59、c-myc、CDC25A 蛋白的表达 与 TRIM59、c-myc、CDC25A 在正常组中阳性表达水平 [15.00% (6/40)、10.00% (4/40)、17.50% (7/40)] 相比, 三者在 NSCLC 组阳性表达 [72.50% (29/40)、67.50% (27/40)、60% (24/40)] 明显升高, 差异有统计学意义 (χ² = 31.775, χ² = 35.419, χ² = 28.916, P = 0.000)。见图 2。

2.3 NSCLC 组织中 TRIM59 的表达与临床病理参数之间的关系 NSCLC 组中 TRIM59、c-myc、CDC25A 蛋白的表达水平均与病变分化程度、TNM 分期、脉管浸润、淋巴结转移及肝转移相关 (P < 0.05), 而与年龄、性别无关 (P > 0.05)。见表 1。

2.4 NSCLC 组织中 TRIM59 的表达与 c-myc、CDC25A 蛋白表达的相关性 NSCLC 组中 TRIM59 蛋白的表达与 c-myc 蛋白表达呈明显正相关 (r = 0.451, P = 0.000), 而与 CDC25A 蛋白的表达亦呈明显相关性 (r = 0.421, P = 0.002)。

2.5 TRIM59 蛋白的表达情况与 NSCLC 患者生存的相关性分析 TRIM59 阳性组患者 5 年死亡率

表1 NSCLC 组织中 TRIM59、c-myc、CDC25A 的表达与临床病理参数的关系

病理参数	n	TRIM59		χ^2 值	P 值	c-myc		χ^2 值	P 值	CDC25A		χ^2 值	P 值
		阳性 [n(%)]				阳性 [n(%)]				阳性 [n(%)]			
性别				0.175	0.672			0.365	0.433			0.311	0.447
男	22	16(72.73)				16(72.73)				14(63.63)			
女	18	13(72.22)				11(61.11)				10(55.56)			
年龄(岁)				0.461	0.420			0.770	0.341			0.759	0.350
≥60	24	18(75.00)				15(62.50)				13(54.17)			
<60	16	11(68.75)				12(75.00)				11(68.75)			
分化程度				6.018	0.022			8.697	0.006			8.991	0.003
高	6	3(50.00)				2(33.33)				2(33.33)			
中	18	12(66.67)				10(55.55)				9(50.00)			
低	16	14(87.50)				15(93.75)				13(81.25)			
TNM 分期				7.022	0.011			10.233	0.000			9.466	0.001
I + II	8	4(50.00)				3(37.50)				3(37.50)			
III + IV	32	25(78.13)				24(75.00)				21(65.63)			
淋巴结转移				8.557	0.005			11.258	0.000			11.415	0.000
有	27	23(85.19)				22(81.48)				20(74.07)			
无	13	6(46.15)				5(38.46)				4(30.77)			
肝转移				9.139	0.002			11.201	0.000			11.638	0.000
有	10	9(90.00)				10(100.00)				9(90.00)			
无	30	20(66.67)				17(56.67)				15(50.00)			
脉管浸润				8.477	0.007			5.750	0.028			7.275	0.0010
有	11	10(90.91)				9(81.82)				9(81.82)			
无	29	19(65.52)				18(62.07)				15(51.72)			

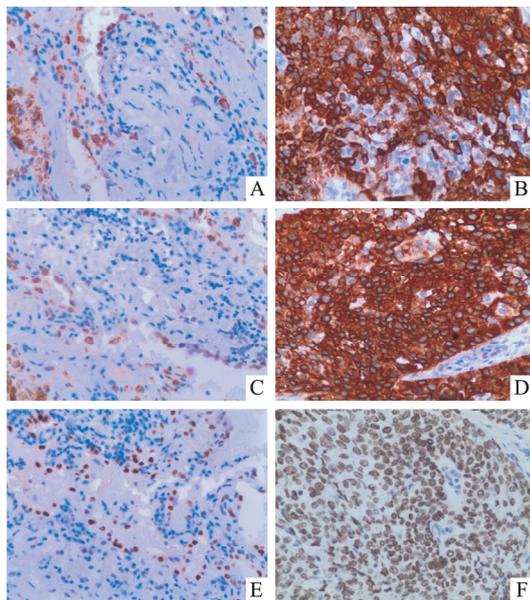


图2 免疫组化检测正常组和 NSCLC 中

TRIM59、c-myc、CDC25A 的阳性表达 SP × 200

A: TRIM59 在正常组中的阳性表达; B: TRIM59 在 NSCLC 中的阳性表达; C: c-myc 在正常组中的阳性表达; D: c-myc 在 NSCLC 中的阳性表达; E: CDC25A 在正常组中的阳性表达; F: CDC25A 在 NSCLC 中的阳性表达

为 65.52% (19/29), 而阴性组患者为 36.36% (4/11), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 15.275, P = 0.000$); 生存曲线结果显示, TRIM59 阳性组中位生存期为

29 个月, 而 TRIM59 阴性组为 56 个月, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 10.275, P = 0.003$)。见图 3。

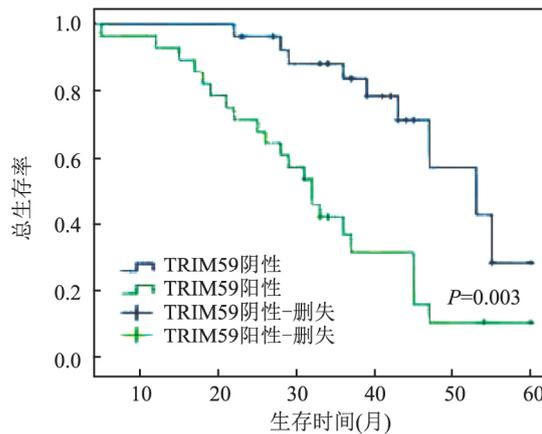


图3 TRIM59 蛋白表达与 NSCLC 患者生存期的相关性

2.6 Cox 回归分析 Cox 回归模型分析显示, TRIM59 表达水平 ($P = 0.002$)、脉管浸润 ($P = 0.001$)、淋巴结转移 ($P < 0.001$)、肝转移和 TNM 分期 ($P < 0.001$) 均是影响 NSCLC 患者预后的独立因素。见表 2、3。

3 讨论

三结构域蛋白家族(tripartite motif, TRIM) 是一

表 2 NSCLC 组织中 TRIM59 与 c-myc 蛋白表达的相关性

TRIM59	c-myc		合计	r 值	P 值
	阳性	阴性			
阴性	23	6	29	0.451	0.000
阳性	4	7	11		
总计	27	13	40		

表 3 NSCLC 组织中 TRIM59 与 CDC25A 蛋白表达的相关性

TRIM59	CDC25A		合计	r 值	P 值
	阳性	阴性			
阴性	21	8	29	0.421	0.002
阳性	3	8	11		
总计	24	16	40		

个在进化中高度保守的基因家族,由 70 多个成员组成,参与了多种细胞的生长、分化、发育的过程,同时在细胞凋亡、炎症和免疫应答过程中亦发挥重要作用^[8]。TRIM 家族蛋白最显著的结构特征是包括一个环状结构域(really interesting new gene, RING)、一个或两个 B-box 结构域(B-box domain) 和一个盘绕区域(coiled-coil domain)。RING 结构域是半胱氨酸富集的锌离子结合域,具有广泛的泛素化酶活性; B-box 结构域参与蛋白之间的相互连接; 盘绕区域能够介导成员自身发生同源寡聚,参与蛋白链接^[9]。

TRIM59 亦称为 MRF1,位于人类第 3 号染色体上,属于 C-XI 亚家族成员,除了继承高度保守的三段结构域外,在其 C 端还有一个涉及蛋白跨膜定位的 TM 结构域,参与 TRIM59 的定位。TRIM59 蛋白位于细胞内质网膜上,内含 403 个氨基酸残基,通过介导蛋白之间的相互作用,泛素化调控蛋白的稳定性,促进肿瘤细胞的无序化增殖^[10]。研究^[11]证实, TRIM59 通过参与 NF- κ B 和 IRF3/IRF7 介导的信号通路的活化,发挥免疫信号的负性调节作用。TRIM59 参与 SV40 Tag/p53/pRB 和 Ras/ERK/PI3K/AKT 两种致癌信号通路,调控细胞周期 S 期的 DNA 合成,促进细胞分裂增殖,同时能上调细胞周期相关蛋白的表达,最终诱导肿瘤形成^[12]。

c-myc 是 myc 家族中的重要成员,能诱导细胞增殖,促进其永生、去分化和功能转化,在多种肿瘤形成过程中发挥重要作用。CDC25A 是 CDC25 家族中重要成员,能加速细胞由 G₁ 期进入 S 期,从而增加细胞 DNA 的合成,使癌细胞获得高增殖活性;同时能消除 ATP 锚定模序上 Thr-14 和 Thr-15 的磷酸化抑制,在细胞周期运转中发挥正性调控作用。

本研究从基因水平证实了在 NSCLC 组织中 TRIM59 mRNA 表达水平明显高于正常组织,免疫组

化结果证实 TRIM59、c-myc、CDC25A 蛋白表达水平均明显高于正常组织,同时 TRIM59、c-myc、CDC25A 蛋白表达水平均与病变分化程度、TNM 分期、脉管浸润、淋巴结转移及肝转移情况密切相关,进一步相关分析表明 TRIM59 表达与 c-myc、CDC25A 均呈明显正相关,提示 TRIM59 表达的异常在 NSCLC 发生过程中发挥重要作用,且与肿瘤的恶性生物学行为密切相关,其致癌机制考虑与诱导 c-myc、CDC25A 蛋白上调有关。Hao et al^[13] 研究证实 TRIM59 mRNA 在 NSCLC 组织中的表达水平显著高于正常肺组织,且与吸烟、病变分期相关; Zhan et al^[14] 报道了 TRIM59 蛋白在各种非小细胞肺癌细胞系中的表达显著上升,而 siRNA 诱导 TRIM59 的下降在 G₂ 期抑制细胞周期中显著抑制 NSCLC 细胞系的增殖和迁移,此外,TRIM59 能影响许多细胞周期的蛋白质,包括 CDC25C 和 CDK1 的表达; 国内薛栋等^[15] 通过免疫组化证实肝癌组织中 TRIM59 的表达明显高于正常肝组织,TRIM59 异常表达与肝癌的发生及分化程度、分期相关,其致癌机制考虑与诱导 Twist 表达上调和 E-cadherin 表达下调有关,以上研究均支持本研究结果。

本研究进一步通过随访证实,TRIM59 阳性患者死亡率明显高于阴性患者,且 TRIM59 阳性表达患者生存期明显短于阴性表达者,表明 TRIM59 的表达水平可作为 NSCLC 患者的重要预后监测指标,同时 Cox 回归模型分析亦证实 TRIM59 表达水平是影响 NSCLC 患者预后的独立因素。

参考文献

- [1] 陈万青,孙可欣,郝荣寿,等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2018, 27(1): 1-14.
- [2] 王会中,任成山,金发光. 肿瘤生物标志物在肺癌患者检测中的临床意义及研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2016, 9(3): 329-33.
- [3] 张坦,王艺瞳,方翼. 非细胞肺癌靶向治疗药物的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(11): 1054-7.
- [4] Valiyeva F, Jiang F, Elmaadawi A, et al. Characterization of the oncogenic activity of the novel TRIM59 gene in mouse cancer models[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(7): 1229-40.
- [5] Wang Y, Zhou Z C, Wang X R, et al. TRIM59 is a novel marker of poor prognosis and promotes malignant progression of ovarian cancer by inducing annexin A2 expression[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(14): 2073-82.
- [6] Liu Y X, Dong Y Y, Zhao L P, et al. TRIM59 overexpression correlates with poor prognosis and contributes to breast cancer progression through AKT signaling pathway[J]. Mol Carcinog, 2018, 57(12): 1792-802.

- [7] Luo D K ,Wang Y M ,Huan X K ,et al. Identification of a synonymous variant in TRIM59 gene for gastric cancer risk in a Chinese population[J]. *Oncotarget* 2017 ,8(7) : 11507 - 16.
- [8] Zaman M M ,Nomura T ,Takagi T ,et al. Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis[J]. *Molecular Cellular Biol* 2013 ,33(24) : 4971 - 84.
- [9] Kimura T ,Jain A ,Choi S W ,et al. TRIM-directed selective autophagy regulates immune activation[J]. *Autophagy* 2017 ,13(5) : 989 - 90.
- [10] Geng B ,Liang M ,Qin L ,et al. An TRIM59-CDK6 axis regulates growth and metastasis of lung cancer[J]. *J Cell Mol Med* 2019 ,23(2) : 1458 - 69.
- [11] Kondo T ,Watanabe M ,Hatakeyama S. TRIM59 interacts with EC-SIT and negatively regulates NF- κ B and IRF-3/7-mediated signal pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 ,422(3) : 501 - 7.
- [12] Sun Y ,Ji B ,Feng Y ,et al. TRIM59 facilitates the proliferation of colorectal cancer and promotes metastasis *via* the PI3K/AKT pathway[J]. *Oncol Rep* 2017 ,38(1) : 43 - 52.
- [13] Hao L ,Du B Y ,Xi X Y. TRIM59 is a novel potential prognostic biomarker in patients with non-small cell lung cancer: A research based on bioinformatics analysis [J]. *Oncol Lett* ,2017 ,14(2) : 2153 - 64.
- [14] Zhan W H ,Han T Y ,Zhang C F ,et al. TRIM59 promotes the proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells by up-regulating cell cycle related proteins [J]. *PLoS One* ,2015 ,10(11) : e0142596.
- [15] 薛 栋 ,王 妮 ,徐怀勇 ,等. TRIM59、Twist 及 E-cadherin 在肝癌中的表达及临床意义[J]. *实用医学杂志* 2017 ,33(9) : 1453 - 6.

TRIM59' s expressions , clinical significance and correlation with c-myc ,CDC25A in non-small cell lung cancer

Li Chen , Yang Xiaoguang , Qian Haihong , et al

(Dept of Respiratory , The First Affiliated Hospital of Hebei North University , Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To investigate the expression , clinical significance and correlation with cell cycle related proteins c-myc and CDC25A of TRIM59 in non-small cell lung cancer (NSCLC) . **Methods** 40 cases with NSCLC tissues (NSCLC group) and 40 cases with normal lung tissues (normal group) were selected and the expression levels of TRIM59 mRNA in two groups were detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) . The expressions of TRIM59 , c-myc and CDC25A in these two groups were detected by immunohistochemistry. Meanwhile , clinical data of the patients were collected to analyze the correlation between TRIM59 , c-myc and CDC25A expression and the clinical pathologic features. The correlation among the three proteins were analyzed by spearman test. The survival curve was drawn to analyze the correlation between TRIM59 and the prognosis of NSCLC patients , and Cox regression model was established to analyze the prognostic factors of NSCLC patients. **Results** RT-PCR showed that the expression level of TRIM59 mRNA (0.87 ± 0.14) in the NSCLC group was significantly higher than that in the normal group (0.16 ± 0.05) ($t = 2.901$, $P = 0.002$) . Immunohistochemistry showed that the expression levels of TRIM59 , c-myc and CDC25A in the NSCLC group (72.50% , 67.50% , 60.00%) were significantly higher than those in the normal group (15.00% , 10.00% , 17.50%) (all $P = 0.000$) . The expression levels of TRIM59 , c-myc and CDC25A in the NSCLC group were all correlated with the degree of lesion differentiation , TNM stage , vascular invasion , lymph node metastasis and liver metastasis (all $P < 0.05$) , but not related to age and gender (all $P > 0.05$) . Spearman correlation analysis showed that TRIM59 was significantly correlated with c-myc and CDC25A in the NSCLC group ($r = 0.451$, $P = 0.000$; $r = 0.421$, $P = 0.002$) . Survival analysis showed that the survival time of NSCLC patients with TRIM59 positive expression was significantly shorter than that of NSCLC patients with TRIM59 negative expression ($P < 0.05$) . Cox regression model confirmed that TRIM59 expression was an independent prognostic factor of NSCLC patients. **Conclusion** The high expression of TRIM59 plays an important role in the occurrence and development of NSCLC , which is considered to be related to the up-regulation of cell cyclin-related proteins c-myc and CDC25A. TRIM59 can be used as a potential biological indicator for the early diagnosis and prognosis monitoring of NSCLC.

Key words TRIM59; c-myc; CDC25A; non-small cell lung cancer; clinical significance; prognosis