DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0108

文章编号 1671-8852(2025)05-0625-05

RNF149在原发性肝细胞肝癌中的表达及其临床意义

徐 旭 袁建辉 董可帅 余 佳

武汉大学人民医院肝胆外科 湖北 武汉 430060

摘要 目的：研究RNF149在原发性肝癌组织和癌旁组织中的表达差异以及其临床意义。方法：利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)技术来分析RNF149在肝癌组织和癌旁组织的mRNA含量差异。采用免疫组织化学芯片染色来检测肝癌组织和癌旁组织的RNF149蛋白表达差异。同时利用X-tile软件和组织芯片85例肝癌数据得到RNF149的最佳截断值0.128，并将组织芯片的肝癌患者分成RNF149高表达组（n=53）和RNF149低表达组（n=32），然后分析其对临床预后的影响以及与临床病理特征的关系。结果：RNF149在肝癌组织的mRNA和蛋白表达水平均低于癌旁组织（P<0.05和P<0.01）；相比于RNF149低表达的肝癌患者，RNF149高表达的患者有更长的总生存期（P=0.045）和无病生存期（P=0.001）。RNF149的高或低表达与患者血清甲胎蛋白（AFP）水平相关（P=0.035），与其他临床病理特征无关（P>0.05）。结论：RNF149在肝细胞肝癌中低表达，高表达的RNF149对肝癌预后具有保护意义。

关键词 RNF149；原发性肝癌；临床预后

中图分类号 R735.7

文献标识码 A

开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

Expression of RNF149 in the primary hepatocellular carcinoma and its clinical significance

XU Xu, YUAN Jianhui, DONG Keshuai, YU Jia

Dept. of Hepatobiliary Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To study the expression difference of RNF149 in primary liver cancer tissues and paracancerous tissues and its clinical significance. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to analyze the difference in mRNA content between hepatocellular carcinoma tissues and paracancerous tissues of RNF149. Immunohistochemical microarray staining was used to detect the difference in RNF149 protein expression between hepatocellular carcinoma and paracancerous tissues. Meanwhile, X-tile software and tissue microarray data of 85 cases of hepatocellular carcinoma were used to obtain the optimal cutoff value of 0.128 for RNF149, and the hepatocellular carcinoma patients with tissue microarray were divided into the RNF149 high-expression group (n=53) and the RNF149 low-expression group (n=32). Finally, the effect of RNF149 expression on clinical prognosis and its relationship with clinicopathological features were analyzed. **Results:** The mRNA and protein expression levels of RNF149 in hepatocellular carcinoma tissues were lower than that in paracarcinoma tissues (P<0.05 and P<0.01); compared with hepatocellular carcinoma

课题来源：国家自然科学基金青年基金资助项目（编号：82003063）；

作者简介：徐旭，男，1997—，医学硕士生，主要从事消化系统肿瘤机制研究，E-mail:xuxu2622@163.com

通信作者：余佳，男，1982—，医学博士，主任医师，副教授，主要从事消化系统肿瘤机制研究，E-mail：yogaqq116@whu.edu.cn

patients with low expression of RNF149, patients with high expression of RNF149 had longer overall survival (P=0.045) and disease-free survival (P=0.001). High and low expression of RNF149 was correlated with the patient's serum α-fetoprotein (AFP) levels (P=0.035), but was not statistically correlated with other clinicopathologic features (P>0.05). **Conclusion:** The low expression of RNF149 in hepatocellular carcinoma has a protective significance for the prognosis of hepatocellular carcinoma.

Key Words RNF149; Primary Hepatocellular Carcinoma; Clinical Prognosis

原发性肝癌是2020年全球第六大最常见癌症和第三大癌症死亡原因,约有906 000例新发病例和830 000例肝细胞癌死亡病例[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)占原发性肝癌的90%,其发病率和死亡率在全球范围内不断增加[2]。采用一线全身治疗的晚期HCC患者的中位总生存期不到20个月[3]。因此,研究HCC进展的分子机制对识别新的治疗靶点具有重要意义。

研究[4]表明,泛素化修饰作为蛋白质翻译后修饰的一种,其相关蛋白的异常表达已被证明与各种人类肿瘤密切相关。E3泛素连接酶环指蛋白149(RNF149)属于RNF蛋白家族,其基因位于人类2号染色体上。RNF家族蛋白,占据了E3连接酶的绝大部分[5],可调节关键的细胞活动,包括细胞周期、DNA修复、细胞信号传导和缺氧反应[6-7]。然而,RNF149作为一种全新的蛋白分子,其在肿瘤中的作用研究很少,尤其是肝癌。因此,本文主要研究RNF149在肝癌组织和癌旁组织的表达差异以及其临床意义,为肝癌治疗提供可能的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 进行免疫组织化学检测的人类肝癌组织标本来自华中科技大学同济医学院附属同济医院2012至2016年期间的105例肝癌患者,其中85例临床信息完整的组织纳入本研究。临床信息和病理特征等数据分析经华中科技大学伦理委员会批准。进行qPCR的23对肝癌组织的cDNA来自武汉大学人民医院2016年至2018年行肝癌手术治疗的肝癌患者,组织标本采集均经过患者家属签署知情同意书并经医院伦理委员会审核通过。qPCR引物设计来自北京擎科生物科技有限公司,逆转录试剂盒购于武汉Servicebio公司。RNF149抗体购于武汉Abclonal公司,免疫组织化学染色DAB显色剂购于武汉Servicebio公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实时荧光定量PCR 提取肝癌组织RNA,用RNA逆转录试剂盒将提取的RNA逆转录成cDNA,再进行实时荧光定量PCR检测。RNF149上游引物序列为GCTACGGGAACATCACCTTG,下游引物序列为CCCTATGGTCATCGTTACTGG;内参β-actin上游引物序列为CCTTCCTGGGCATGGAGTC,下游引物序列为TGATCT TCATTGTGCTGGGTG。

1.2.2 免疫组织化学 使用抗RNF149抗体进行免疫组织化学(Immunohistochemistry,IHC)检测。用二甲苯和乙醇对切片进行脱蜡,并通过微波炉加热Tris/EDTA缓冲液(pH 9.0)至略低于沸点温度。使用3D HIESTECH扫描系统和软件获取组织切片图像。使用Image-Pro Plus 6.0软件分析每个肝癌组织样本中RNF149的平均光密度值(IOD)。使用X-tile软件将样本分为高表达组和低表达组并进行进一步分析。

1.3 统计学分析 运用GraphPad Prism 9.0软件对实验数据进行统计分析,并制作统计图和生存曲线图。符合正态分布的定量数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,用t检验分析两组间均数的差异;计数资料采用频数(例)和构成比(%)表示,采用卡方检验。当P<0.05时认为差异具有统计学意义,检验水准α=0.05(双侧)。

2 结果

2.1 RNF149在原发性肝细胞肝癌组织的表达及其对临床预后的影响 qPCR结果显示,在23对来源于人的肝癌与癌旁组织的RNA样本中,癌旁组织中的RNF149 mRNA含量是肝癌组织的2.5倍(图1A),差异存在统计学意义(P<0.05)。IHC检测显示,85对肝癌与癌旁组织中,肝癌组织的平均光密度值低于癌旁组织(图1B、图1C),两者间的差异有统计学意义(P<0.01)。通过X-tile软件得到平均光密度的最佳截断值0.128,并绘制RNF149

高表达和低表达两组患者的总生存期和无病生存期曲线图（图 1D、图 1E）。相比于 RNF149 低表达组，RNF149 高表达组预后较好，有着更长的总生存期（P=0.045）和无病生存期（P=0.001）。

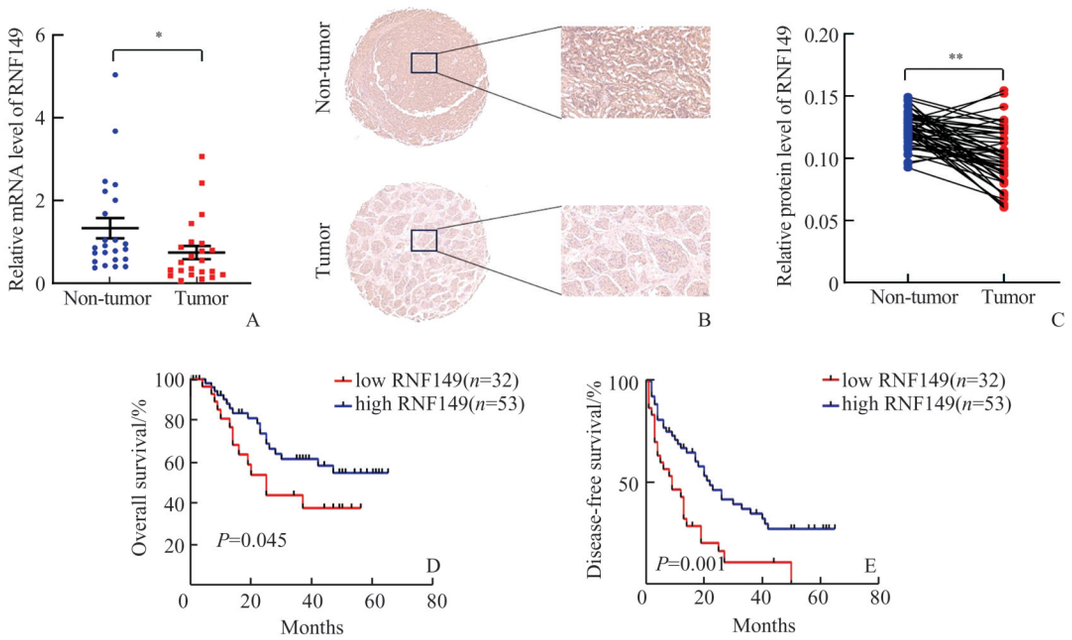


图 1　RNF149 在原发性肝细胞肝癌组织的表达及其对临床预后的影响

A. 肝癌与癌旁组织的 RNF149 mRNA 表达水平的比较（n=23）；B、C. 分别为免疫组织化学方法比较肝癌与癌旁组织的 RNF149 蛋白表达及其结果（n=85）；D、E. 分别为 RNF149 高表达和低表达两组患者的总生存期和无病生存曲线的比较；$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01

2.2　肝癌患者中 RNF149 表达与临床病理参数间关系　结果表明，肝癌患者 RNF149 表达程度与其血清 AFP 水平相关（表 1）。RNF149 低表达组肝癌患者的血清甲胎蛋白（AFP）水平比高表达组更高，差异有统计学意义（P=0.035）。另外，RNF149 的表达水平与肝癌患者的年龄、性别、乙型肝炎表面抗原、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、肝功能分级、肝硬化、肿瘤大小、肿瘤数量、肿瘤包膜、血管浸润以及 TNM 分期均无显著相关性（P>0.05）。

3　讨论

蛋白质的翻译后修饰（posttranslational modification，PTM）是蛋白质功能调节的主要机制，在细胞的各种生理和病理过程中起着重要的调节作用，并且与癌症的发生发展密不可分[8]，而泛素化修饰一直是其中研究的热点。研究表明，泛素化修饰参与了多种肿瘤相关信号通路，其中包括 Wnt/β-Catenin[9] 和 PI3K/Akt[10] 等。这些信号通路是由受到精确调控的蛋白质分子完成的，而肿瘤的发生发展就是由于相应蛋白质受到异常翻译后修饰导致的（如泛素化修饰所致相关信号通路发生抑制或激活），所以研究泛素化相关蛋白对恶性肿瘤的治疗及预后均具有重要意义。

泛素-蛋白酶体系统（ubiquitin-proteasomes system，UPS）是一种常见的蛋白翻译后泛素化修饰途径，负责正常和病理状态下大约 80% 以上的细胞内蛋白质的降解[11]，主要由酶 1（泛素激活酶）、酶 2（泛素结合酶）、酶 3（泛素连接酶）和泛素以及 26 S 蛋白酶体组成[12]。到目前为止，已经发现了 600 多种 E3 连接酶，每个 E3 连接酶都结合其特定的底物蛋白，这对于阐明肿瘤发展的分子机制有着重要作用。

目前许多研究表明 E3 泛素连接酶与肝癌的发生、发展和转移密切相关。E3 泛素连接酶 RNF 蛋白家族主要通过受到上游因子的调控或者泛素化降解下游蛋白，从而促进肝癌发生上皮-间质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）或者细胞周期发生改变，进而影响肝癌的发生发展。RNF187 通过诱导肝癌细胞 EMT，从而促进肝癌转移。同时，RNF187 是 Notch1 的直接转录靶点，Notch1 可以激活 RNF187 的启动子。缺失 RNF187 可以逆转 Notch1 驱动的肝癌进展，而过表达 RNF187 则抵消了 Notch1 基因敲除所介导的抑制肿瘤进展的作用[13]。RNF38 在肝细胞癌中高表达，通过泛素化降解 AHNAK 促进转化生长因子-β 信号转导，使肝癌细胞具有 EMT 表型[14]。RNF6 促进

表1 RNF149表达水平与HCC临床病理学特征的相关性

[例(%)]

临床变量	患者数量	RNF149表达水平		P
	(n=85)	低(n=32)	高(n=53)	
年龄/岁				0.670
＜60	67(78.8)	26(81.3)	41(77.4)	
≥60	18(21.2)	6(18.8)	12(22.6)	
性别				0.578
男性	72(84.7)	28(87.5)	44(83.0)	
女性	13(15.3)	4(12.5)	9(17.0)	
乙型肝炎表面抗原				0.297
阳性	71(83.5)	25(78.1)	46(86.8)	
阴性	14(16.5)	7(21.9)	7(13.2)	
ALT/U•L^{-1}				0.890
≤40	55(64.7)	21(65.6)	34(64.2)	
＞40	30(35.3)	11(34.4)	19(35.8)	
AST/U•L^{-1}				0.702
≤40	59(69.4)	23(71.9)	36(67.9)	
＞40	26(30.6)	9(28.1)	17(32.1)	
AFP/ng•mL^{-1}				0.035
＜400	47(55.3)	13(40.6)	34(64.2)	
≥400	38(44.7)	19(59.4)	19(35.8)	
Child-Pugh分类				0.605
A	78(91.8)	30(93.8)	48(90.6)	
B	7(8.2)	2(6.3)	5(9.4)	
肝硬化				0.863
否	23(27.1)	9(28.1)	14(26.4)	
是	62(72.9)	23(71.9)	39(73.6)	
肿瘤大小/cm				0.078
≤5	25(29.4)	12(37.5)	13(24.5)	
＞5	60(70.6)	19(59.4)	41(77.4)	
肿瘤数量				0.870
一个	71(83.5)	27(84.4)	44(83.0)	
多个	14(16.5)	5(15.6)	9(17.0)	
肿瘤包膜				0.755
是	54(63.5)	21(65.6)	33(62.3)	
否	31(36.5)	11(34.4)	20(37.7)	
血管浸润				0.836
是	15(17.6)	6(18.8)	9(17.0)	
否	70(82.4)	26(81.3)	44(83.0)	
TNM分期				0.714
Ⅰ～Ⅱ	63(74.1)	23(71.9)	40(75.5)	
Ⅲ～Ⅳ	22(25.9)	9(28.1)	13(24.5)	

肝癌细胞中EMT抑制因子FoxA1的泛素化和降解,从而促进肝癌细胞上皮间质转化和增强其放射耐受性[15]。RNF4沉默诱导p62的核转移,促进细胞周期G_2/M期停滞和细胞凋亡的抗肿瘤作用,以及肝癌对DNA损伤剂的敏感性[16]。因此,作为RNF蛋白家族的成员之一,RNF149在肝癌发生发展中可能也存在一定的调控机制。

环指蛋白149(RNF149)属于E3泛素蛋白连接酶。目前已有研究[17]表明,RNF149通过激活PI3K/AKT信号通路使食管鳞状细胞癌获得顺铂耐药性。另外在鼻咽癌中,MFSD4A通过RNF149介导EPHA2的泛素化降解从而抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移和侵袭[18]。然而,RNF149在其他肿瘤的研究很少,其表达差异也不清楚,可能是肿瘤治疗一个全新的潜在靶点。因此,本文通过实时荧光定量PCR和免疫组织化学实验技术分析RNF149在肝癌及癌旁组织的表达差异及其临床意义,表明了其临床价值。

综上所述,相较于癌旁组织,RNF149在肝细胞肝癌组织中表达下调,RNF149高表达对肝癌预后具有保护意义,是未来肝癌临床治疗的一个潜在靶点。后期关于RNF149在肝癌中的具体作用仍需要通过基础实验来证实,进一步阐明肝癌发生发展的分子机制。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] WANG J, LIU C Y, HU R H, et al. Statin therapy: A potential adjuvant to immunotherapies in hepatocellular carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1324140.

[3] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1):6.

[4] MOSESSON Y, MILLS G B, YARDEN Y. Derailed endocytosis: An emerging feature of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(11): 835-850.

[5] CAI C M, TANG Y D, ZHAI J B, et al. The RING finger protein family in health and disease[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 300.

[6] LIPKOWITZ S, WEISSMAN A M. RINGs of good and evil: Ring finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(9): 629-643.

[7] QIU X B, GOLDBERG A L. Nrdp1/FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member, ErbB3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(23): 14843-14848.

[8] WANG H Y, YANG L Q, LIU M H, et al. Protein post-translational modifications in the regulation of cancer hallmarks[J]. Cancer Gene Ther, 2023, 30(4): 529-547.
[9] REN L, ZHOU T T, WANG Y, et al. RNF8 induces β-catenin-mediated c-Myc expression and promotes colon cancer proliferation[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(12): 2051-2062.
[10] KUANG J Y, MIN L, LIU C Y, et al. RNF8 promotes epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via stabilization of slug[J]. Mol Cancer Res, 2020, 18(11): 1638-1649.
[11] HOCHSTRASSER M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation[J]. Curr Opin Cell Biol, 1995, 7(2): 215-223.
[12] HERSHKO A. Ubiquitin: Roles in protein modification and breakdown[J]. Cell, 1983, 34(1): 11-12.
[13] ZHANG L, CHEN J, YONG J, et al. An essential role of RNF187 in Notch1 mediated metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):384.
[14] PENG R, ZHANG P F, YANG X, et al. Overexpression of RNF38 facilitates TGF-β signaling by ubiquitinating and degrading AHNAK in hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):113.
[15] CAI J, XIONG Q, JIANG X, et al. RNF6 facilitates metastasis and radioresistance in hepatocellular carcinoma through ubiquitination of FoxA1[J]. Exp Cell Res, 2019, 374(1):152-161.
[16] LV B, PAN Y, HOU D, et al. RNF4 silencing induces cell growth arrest and DNA damage by promoting nuclear targeting of p62 in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2022, 41(16):2275-2286.
[17] ZHU J R, TANG J R, WU Y Q, et al. RNF149 confers cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma via destabilization of PHLPP2 and activating PI3K/AKT signalling[J]. Med Oncol, 2023, 40 (10): 290.
[18] YANG H Y, QIN G J, LUO Z, et al. MFSD4A inhibits the malignant progression of nasopharyngeal carcinoma by targeting EPHA2[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(4): 332.

（2024-02-18 收稿）
编辑　张　峻

（上接第 624 页）

[10] CHEN Y, LU T, PETTERSSON-KYMMER U, et al. Genomic atlas of the plasma metabolome prioritizes metabolites implicated in human diseases[J]. Nat Genet, 2023, 55(1): 44-53.
[11] HARRISON P W, AMODE M R, AUSTINE-ORIMOLOYE O, et al. Ensembl 2024[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D891-D899.
[12] YANG J, NIE D, CHEN Y, et al. The role of smoking and alcohol in mediating the effect of gastroesophageal reflux disease on lung cancer: A mendelian randomization study[J]. Front Genet, 2023, 13: 1054132.
[13] SEDLAK J C, YILMAZ Ö H, ROPER J. Metabolism and colorectal cancer[J]. Annu Rev Pathol, 2023, 18: 467-492.
[14] HARAYAMA T, RIEZMAN H. Understanding the diversity of membrane lipid composition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(5): 281-296.
[15] LUO J, YANG H, SONG B L. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 225-245.
[16] WANG G, QIU M, XING X, et al. Lung cancer scRNA-seq and lipidomics reveal aberrant lipid metabolism for early-stage diagnosis[J]. Sci Transl Med, 2022, 14(630): eabk2756.
[17] FARSHIDFAR F, KOPCIUK K A, HILSDEN R, et al. A quantitative multimodal metabolomic assay for colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 26.
[18] ZELEZNIK O A, CLISH C B, KRAFT P, et al. Circulating Lysophosphatidylcholines, Phosphatidylcholines, Ceramides, and Sphingomyelins and Ovarian Cancer Risk: A 23-year prospective study[J]. J Natl Cancer Inst, 2020, 112(6): 628-636.
[19] NAUDIN S, SAMPSON J N, MOORE S C, et al. Lipidomics and pancreatic cancer risk in two prospective studies[J]. Eur J Epidemiol, 2023, 38(7): 783-793.
[20] DIEP T A, MADSEN A N, HOLST B, et al. Dietary fat decreases intestinal levels of the anorectic lipids through a fat sensor[J]. FASEB J, 2011, 25(2): 765-774.
[21] NGUYEN T, KIRSCH B J, ASAKA R, et al. Uncovering the role of N-Acetyl-Aspartyl-Glutamate as a glutamate reservoir in cancer[J]. Cell Rep, 2019, 27 (2): 491-501. e6.
[22] ZHANG C, QUINONES A, LE A. Metabolic reservoir cycles in cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86 (Pt3): 180-188.

（2024-03-27 收稿）
编辑　孙孝云