



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.16

文章编号: 2095-1264(2022)06-0785-06

RAD51 基因在结直肠癌中的表达及与预后的关系

薛金菊, 张艳姣, 邢梦芸

(中南大学湘雅医学院附属海口医院 老年病科, 海南 海口, 570208)

摘要: **目的** 探讨 RAD51 基因在结直肠癌(CRC)中的表达及其与临床病理特征和预后的关系。**方法** 收集 72 例 CRC 患者的病理标本(CRC 组, $n=72$), 以及经病理证实无癌细胞存在、距肿瘤边缘 >3 cm 的肠黏膜组织(癌旁对照组, $n=72$)。采用 qRT-PCR 和 Western blotting 技术对 CRC 与癌旁组织的 RAD51 mRNA 和蛋白表达水平进行检测。影响 CRC 患者预后的因素采用 Cox 比例风险模型分析。预后分析采用 Kaplan-Meier 和 Log-rank 法。**结果** CRC 组 RAD51 mRNA 和蛋白相对表达量均高于癌旁对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。CRC 组织中 RAD51 表达水平与 TNM 分期有关($P<0.05$)。RAD51 高表达是影响 CRC 患者 5 年无瘤生存率和 5 年总体生存率的危险因素($P<0.05$)。RAD51 低表达的 CRC 患者 5 年总体生存率和 5 年无瘤生存率均高于 RAD51 高表达患者($P<0.05$)。**结论** RAD51 在 CRC 组织中高表达, 与 TNM 分期有关。RAD51 高表达的 CRC 患者预后差, RAD51 可能是临床上预测 CRC 患者预后的一个潜在指标。

关键词: 结直肠癌; RAD51; 预后; 生存曲线

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A

Expression of RAD51 gene in colorectal cancer and its relationship with prognosis

XUE Jinju, ZHANG Yanjiao, XING Mengyun

(Geriatrics Department, Haikou Affiliated Hospital of Central South University Xiangya School of Medicine, Haikou, 570208, Hainan, China)

Abstract: Objective To explore the expression of RAD51 gene in colorectal cancer (CRC) and its relationship with clinicopathological features and prognosis. **Methods** The pathological specimens of 72 CRC patients were collected (CRC group, $n=72$), as well as the normal intestinal mucosa which was pathologically conformed with no tumor cells and was >3 cm away from the edge of the tumor (control group, $n=72$). The expression levels of RAD51 mRNA and protein in CRC and adjacent tissues were detected by qRT-PCR and Western blotting. The prognostic factors of CRC patients were analyzed by Cox proportional hazards model. The prognosis was analyzed by Kaplan-Meier and Log-rank methods. **Results** The relative expression levels of RAD51 mRNA and protein were higher in CRC group than in control group ($P<0.05$). The expression level of RAD51 in CRC was correlated with TNM stage ($P<0.05$). The high expression of RAD51 was an independent factor affecting 5-year overall survival rate and 5-year tumor-free survival rate of CRC patients ($P<0.05$). The 5-year overall survival rate and 5-year tumor-free survival rate of patients with low expression of RAD51 in CRC tissues were higher than those in patients with high expression of RAD51 ($P<0.05$). **Conclusion** RAD51 was highly expressed in CRC tissues, and it was related with TNM staging. CRC patients with high expression of RAD51 in tissues had poor prognosis. RAD51 may be a potential prognostic indicator for CRC patients.

Keywords: Colorectal cancer; RAD51; Prognosis; Survival curve

前言

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种恶性肿瘤,其发病率和死亡率呈逐年升高的趋势^[1]。在我国,CRC的发病率(死亡率)在男性和女性中分别排在第四位(第五位)和第三位(第四位)^[2]。近年来,随着人类对CRC早发现重视程度的提高以及相关治疗技术的发展,患者短期预后改善幅度增大,但长期预后仍然较差。据报道,CRC患者5年总生存率低于20%^[3]。因此,更好地了解CRC相关分子调控机制,对改善CRC患者预后具有重要意义。目前,CRC的具体发病机制仍不明确。缺氧、辐射等因素均可造成DNA损伤,DNA修复过程中的同源重组(homologous recombination, HR)对维持基因组的稳定和正常的生命功能起着重要作用^[4]。许多研究表明,CRC的发生、发展过程与HR相关分子缺陷或过表达密切相关^[4-5]。RAD51在HR过程中主要参与DNA损伤应答和细胞周期等信号通路,发挥引导重组交换的关键作用^[6]。研究发现,RAD51在肺癌、乳腺癌和卵巢癌等恶性肿瘤中过表达,与肿瘤细胞的侵袭、转移和化疗抵抗密切相关^[7-9]。有研究指出,RAD51在CRC组织中高表达,其表达异常可能与CRC的发生发展有关^[10]。然而,RAD51与CRC患者临床病理特征和预后关系的研究报道缺乏。本研究通过探讨RAD51基因在CRC中的表达及与预后的关系,为CRC患者RAD51基因相关临床研究提供循证医学证据。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集中南大学湘雅医学院附属海口医院老年病科和病理科2014年1月至2017年12月收集的72例CRC患者病理标本(CRC组, $n=72$)以及经病理证实无癌细胞存在、距肿瘤边缘 >3 cm的肠黏膜组织(癌旁对照组, $n=72$)。纳入标准:参照国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)标准定义TNM分期^[11];病理组织分型参照Lauren's分型;年龄18~75岁;术前均未接受放、化疗和靶向药物治疗;无其他器官恶性肿瘤;术后存活时间 ≥ 30 d;既往无肠道手术史及CRC家族史。

1.2 RAD51 mRNA表达水平测定 总RNA提取采用离心柱法,按照提取试剂盒(DP419, TIANGEN, 北京)说明书要求进行。将完整性良好的RNA按照反转录试剂盒(FP314, TIANGEN, 北京)说明书要求

逆转录为cDNA。以 β -actin作为内参,设计RAD51引物序列为:上游5'-TCTCTGGCAGTGATGTCCTG-GA-3',下游5'-TAAAGGGCGGTGGCACTGTCTA-3'。按照试剂盒(RR820A, TaKaRa, 大连)说明书要求进行荧光定量PCR扩增反应, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算结果。实验独立重复3次。

1.3 RAD51蛋白表达水平测定 组织蛋白提取采用蛋白裂解法。加样,垂直电泳,转膜,TBS漂洗,封闭液封闭2 h。加入兔抗人RAD51(ab133534, Abcam, 美国)和GAPDH单克隆抗体(ab8245, Abcam, 美国),4℃孵育过夜,TBST洗涤后加入二抗,室温下作用30 min,重复TBST洗涤。暗室内发光显影。

1.4 RAD51免疫组织化学染色(immunohistochemical staining, IHC)方法及分组 制备组织标本常规石蜡切片。按照试剂盒说明书要求滴加一抗,作用后滴加辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG二抗。RAD51表达量判定以染色强度评分和染色阳性率评分的乘积为总评分,参照前人方法^[12], <2 分为RAD51低表达, ≥ 2 分为RAD51高表达。

1.5 随访 采用电话、微信和入院就诊的方式进行随访,随访截止时间为2020年11月30日,随访时间4~72个月,平均 (50.28 ± 14.37) 个月。

1.6 统计学方法 应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。影响CRC患者预后的因素采用Cox比例风险模型分析。CRC患者生存曲线绘制采用Kaplan-Meier法,差异性检验采用Log-rank法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAD51在CRC和癌旁组织中表达水平比较 CRC组RAD51 mRNA相对表达量高于癌旁对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);CRC组中RAD51蛋白相对表达量高于癌旁对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 CRC组织中RAD51表达水平与临床病理特征的关系 CRC组织中RAD51表达水平与性别、年龄、BMI、分化程度、组织类型、肿瘤直径、肿瘤位置、淋巴结转移、血管浸润无关($P > 0.05$),与TNM分期有关($P < 0.05$)(表2)。

2.3 影响CRC患者预后的单因素、多因素Cox回归分析 单因素、多因素Cox回归分析结果显示,高

表1 CRC和癌旁组织中RAD51的mRNA和蛋白相对
表达量比较

Tab. 1 Comparison of RAD51 mRNA and protein relative
expressions in CRC and adjacent tissues

组别	例数	RAD51 mRNA 相对表达量	RAD51 蛋白 相对表达量
CRC 组	72	2.15±0.44	1.56±0.39
癌旁对照组	72	1.80±0.37	1.28±0.31
<i>t</i>		5.166	4.769
<i>P</i>		<0.001	<0.001

分化、TNM IV期、RAD51 高表达是影响 CRC 患者 5 年无瘤生存率和 5 年总体生存率的危险因素 ($P <$

0.05)(表3、表4)。

2.4 CRC 组织中 RAD51 表达水平与预后的关系

Kaplan–Meier 生存分析结果显示, RAD51 低表达的 CRC 患者 5 年总体生存率和 5 年无瘤生存率均显著高于 RAD51 高表达患者 ($P < 0.05$)(图 1)。

3 讨论

DNA 双链断裂在 DNA 损伤过程中最为严重, 可导致染色体断裂, 造成基因组稳定性降低, 促使细胞死亡, 因此, DNA 双链断裂修复缺陷是肿瘤发生的主要因素^[13]。人源 RAD51 基因是大肠杆菌中 RecA 的同源基因, 与 DNA 修复和重组有关^[6]。DNA 依

表2 CRC 组织中 RAD51 表达水平与临床病理特征的关系

Tab. 2 Relationship between expression level of RAD51 and clinicopathological characteristics in CRC

因素	RAD51 低表达(<i>n</i> =25)	RAD51 高表达(<i>n</i> =47)	χ^2	<i>P</i>
性别(男/女)	10/15	23/24	0.797	0.372
年龄/岁(>60/≤60)	12/13	25/22	0.267	0.605
BMI/(kg·m ⁻²)(>25/≤25)	14/11	26/21	0.005	0.946
分化程度(高分化/中分化/低分化)	5/15/5	9/24/14	0.018	0.904
TNM 分期(I / II / III / IV)	5/8/7/5	5/15/17/10	3.018	0.034
组织类型(鳞癌/腺癌/其他)	12/12/1	24/20/3	0.445	0.484
肿瘤直径/cm(>5/≤5)	15/10	27/20	0.066	0.797
肿瘤位置(结肠/直肠)	14/11	28/19	0.130	0.718
淋巴结转移(是/否)	11/14	22/25	0.079	0.779
血管浸润(是/否)	10/15	23/24	0.797	0.372

表3 影响 CRC 患者预后的单因素 Cox 回归分析

Tab. 3 Univariate Cox regression analysis of prognosis in patients with CRC

因素		5 年无瘤生存率			5 年总体生存率		
		HR	95% CI	<i>P</i>	HR	95% CI	<i>P</i>
性别	女性	1.000			1.000		
	男性	0.795	0.434~1.142	0.362	0.750	0.416~1.115	0.332
年龄/岁	>60	1.000			1.000		
	≤60	1.128	0.819~1.572	0.421	1.205	0.836~1.647	0.554
BMI/(kg·m ⁻²)	>25	1.000			1.000		
	≤25	1.133	0.821~1.581	0.405	1.215	0.839~1.655	0.538
分化程度	低分化	1.000			1.000		
	中分化	1.626	1.226~2.946	<0.001	1.649	0.812~3.115	0.182
	高分化	1.859	1.286~3.255	<0.001	1.553	1.191~2.846	<0.001
TNM 分期	I	1.000			1.000		
	II	1.118	0.759~1.722	0.352	1.216	0.788~1.995	0.449
	III	2.115	1.476~4.446	<0.001	1.333	0.812~3.813	0.339
	IV	2.246	1.622~6.113	<0.001	2.457	1.663~7.131	<0.001
组织类型	鳞癌	1.000			1.000		
	腺癌	1.665	0.993~2.148	0.142	1.586	0.945~2.019	0.184
	其他	1.218	0.839~1.796	0.478	1.228	0.846~1.812	0.319

续表 3

因素		5 年无瘤生存率			5 年总体生存率		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
肿瘤直径/cm	≤5	1.000			1.000		
	>5	1.255	0.813~1.666	0.312	1.049	0.662~1.457	0.181
肿瘤位置	结肠	1.000			1.000		
	直肠	1.013	0.715~1.565	0.291	1.116	0.749~1.612	0.181
淋巴结转移	是	1.000			1.000		
	否	0.899	0.646~0.995	0.019	0.878	0.603~0.989	<0.001
血管浸润	是	1.000			1.000		
	否	0.913	0.748~0.998	<0.001	0.899	0.722~0.995	<0.001
RAD51 表达水平	低表达	1.000			1.000		
	高表达	2.119	1.481~4.455	<0.001	2.463	1.667~7.149	<0.001

表 4 影响 CRC 患者预后的多因素 Cox 回归分析

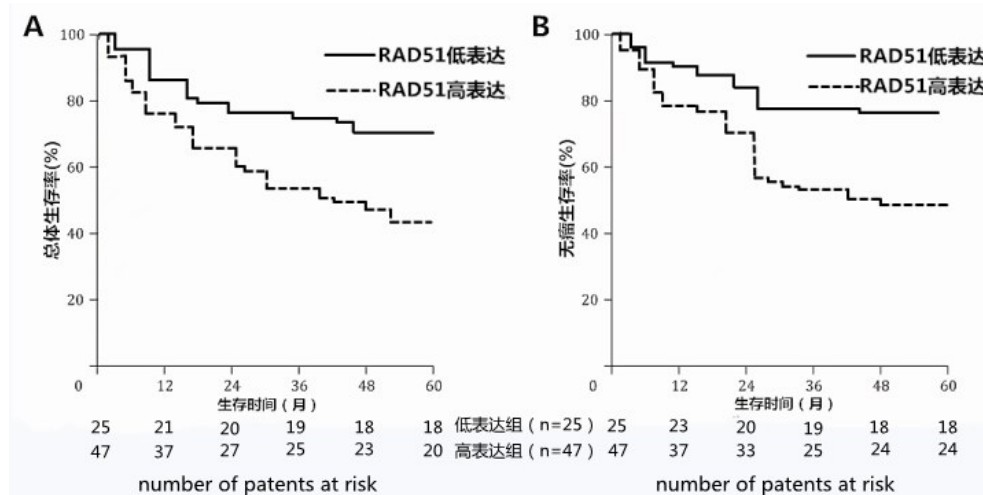
Tab. 4 Multivariate Cox regression analysis of prognosis in patients with CRC

因素		5 年无瘤生存率			5 年总体生存率		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
分化程度	低分化	1.000			1.000		
	中分化	1.634	0.880~2.957	0.089	1.650	0.819~3.121	0.181
	高分化	1.863	1.291~3.263	<0.001	1.562	1.191~2.856	<0.001
TNM 分期	I	1.000			1.000		
	II	1.120	0.760~1.729	0.341	1.219	0.789~2.001	0.402
	III	1.286	0.790~1.888	0.262	1.339	0.818~1.843	0.303
	IV	2.013	1.413~4.116	<0.001	1.899	1.331~3.431	<0.001
淋巴结转移	是	1.000			1.000		
	否	0.900	0.666~1.213	0.091	0.879	0.609~1.019	0.131
血管浸润	是	1.000			1.000		
	否	0.929	0.751~1.117	0.112	0.946	0.741~1.122	0.212
RAD51 表达水平	低表达	1.000			1.000		
	高表达	1.872	1.293~3.271	<0.001	1.574	1.198~2.869	<0.001

赖性 ATP 激酶作为 DNA 同源重组的关键酶,主要作用是维持基因组稳定,而 RAD51 与 DNA 结合后具有上述酶活性^[14]。RAD51 可产生螺旋状的核蛋白丝,诱导 DNA 分子之间的同源配对和链交换^[14]。RAD51 基因突变可导致 DNA 重组减少,DNA 双链损伤修复能力降低^[15]。以前的研究表明,RAD51 在 DNA 损伤应答和细胞周期等信号通路中发挥重要作用^[6]。

有研究认为,由于 RAD51 有助于基因组的维持,且其与肿瘤易感基因如 BRCA1、BRCA2 和 p53 等存在相互作用,因此推测 RAD51 可能参与了肿瘤抑制^[15]。RAD51 与肿瘤侵袭、转移密切相关。Woditschka 等^[16]通过对基因表达谱芯片进行分析发

现,RAD51 基因在脑转移组织中高表达,通过动物模型实验发现 RAD51 表达水平与乳腺癌细胞发生脑转移呈正相关。RAD51 过表达还与许多恶性肿瘤患者的预后呈负相关。Alshareeda 等^[17]的研究指出,乳腺癌患者的 RAD51 表达水平与肿瘤大小、淋巴结转移等病理特征呈正相关,且 RAD51 高表达的乳腺癌患者预后差。Zhang 等^[18]针对胰腺癌的研究指出,RAD51 水平越高,患者生存率越差,其原因可能与 RAD51 调节有氧糖酵解的机制有关。本研究选择与肿瘤细胞 DNA 损伤修复有关的 RAD51 基因,从 mRNA、蛋白相对表达量方面入手,发现 CRC 组织中 RAD51 mRNA 和蛋白相对表达量均显著高于癌旁组织,提示 RAD51 表达水平与 CRC 进展存在



注:(A) CRC 组织中 RAD51 表达水平与 5 年总体生存率的关系;(B) CRC 组织中 RAD51 表达水平与 5 年无瘤生存率的关系

Note: (A) Relationship between RAD51 expression and 5 years overall survival rate in CRC; (B) Relationship between RAD51 expression and 5 years tumor-free survival rate in CRC.

图 1 CRC 组织中 RAD51 表达水平与 5 年总体生存率和无瘤生存率的关系

Fig. 1 Relationship between RAD51 expression and 5 years overall survival rate and tumor-free survival rate of CRC patients

关联。本研究还发现,CRC 组织中 RAD51 表达水平与 TNM 分期有关,这或许提示 RAD51 高表达对 CRC 细胞侵袭、转移等一系列生物学行为有影响^[19]。本研究经进一步单因素、多因素 Cox 回归分析以及 Kaplan-Meier 生存分析,发现 RAD51 高表达是影响 CRC 患者 5 年无瘤生存率和 5 年总体生存率的危险因素,且 RAD51 低表达的 CRC 患者 5 年总体生存率、5 年无瘤生存率均高于 RAD51 高表达组。其原因可能为:RAD51 高表达导致 DNA 损伤修复能力增强,引起 CRC 细胞对放化疗耐受、侵袭和转移能力增强,导致抗肿瘤治疗效果不佳,影响患者预后。另外,本研究结果还提示,RAD51 可能是临床上预测 CRC 患者预后的一个潜在指标,为 CRC 靶向治疗提供了新的循证医学证据。然而,由于 RAD51 在 CRC 中作用的相关研究和权威报告较少,其作用机制仍需研究。

总之,RAD51 在 CRC 组织中高表达,与 TNM 分期有关,RAD51 高表达的 CRC 患者预后差。后续研究还应建立过表达及沉默 RAD51 的 CRC 细胞株模型,深入探讨 RAD51 与 CRC 发生、发展的关系。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30. DOI: 10.3322/caac.21590.
[2] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.005.

[3] PENG Z Y, GU R H, YAN B. Downregulation of exosome-encapsulated miR-548c-5p is associated with poor prognosis in colorectal cancer [J]. J Cell Biochem, 2018; 2018Sep1. DOI: 10.1002/jcb.27291.
[4] 嵇昌龙,陈维艳,龙琦,等. 同源重组修复通路基因遗传变异与结直肠癌易感性的关联研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(18): 1769-1775. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201905200.
[5] 杨洁,王鑫,邹霜梅,等. MLH3 和 MSH2 遗传变异与直肠癌患者术前同步放化疗敏感性和生存的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2018, 40(6): 433-440. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2018.06.007.
[6] SOMYAJIT K, SAXENA S, BABU S, et al. Mammalian RAD51 paralogs protect nascent DNA at stalled Forks and mediate replication restart [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(20): 9835-9855. DOI: 10.1093/nar/gkv880.
[7] HU J F, ZHANG Z G, ZHAO L, et al. High expression of RAD51 promotes DNA damage repair and survival in KRAS-mutant lung cancer cells [J]. BMB Rep, 2019, 52(2): 151-156. DOI: 10.5483/BMBRep.2019.52.2.213.
[8] LIU G H, YU M X, WU B L, et al. Jab1/Cops5 contributes to chemoresistance in breast cancer by regulating Rad51 [J]. Cell Signal, 2019, 53: 39-48. DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.09.010.
[9] VUORELA M, PYLKÄS K, HARTIKAINEN J M, et al. Further evidence for the contribution of the RAD51C gene in hereditary breast and ovarian cancer susceptibility [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(3): 1003-1010. DOI: 10.1007/s10549-011-1677-x.
[10] LAURINI E, MARSON D, FERMEGLIA A, et al. Role of Rad51 and DNA repair in cancer: a molecular perspective [J]. Pharmacol Ther, 2020, 208: 107492. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107492.
[11] RICE T W, BLACKSTONE E H, RUSCH V W. 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual: esophagus and esophago-gastric junction [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(7): 1721-1724.

- DOI: 10.1245/s10434-010-1024-1.
- [12] 李林株, 郭灵敏, 杜佩铭, 等. FUCA1 基因在肝细胞肝癌中的表达及与预后的关系[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(11): 1800-1803. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2018.11.012.
- [13] 刘孝荣, 马东礼, 文飞球. DNA 修复系统与肿瘤发生和治疗关系的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(3): 469-474. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4992.2018.03.036.
- [14] 冯书云, 杜鸿志, 黄悦, 等. 靶向 Rad51 与肿瘤治疗的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(15): 2993-2995. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.049.
- [15] SINHA A, SALEH A, ENDERSBY R, et al. RAD51-mediated DNA homologous recombination is independent of PTEN mutational status [J]. *Cancers*, 2020, 12(11): 3178. DOI: 10.3390/cancers12113178.
- [16] WODITSCHKA S, EVANS L, DUCHNOWSKA R, et al. DNA double-strand break repair genes and oxidative damage in brain metastasis of breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(7): dju145. DOI: 10.1093/jnci/dju145.
- [17] ALSHAREEDA A T, NEGM O H, ALESKANDARANY M A, et al. Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: a key DNA damage response protein [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 159(1): 41-53. DOI: 10.1007/s10549-016-3915-8.
- [18] ZHANG X M, MA N Y, YAO W Q, et al. RAD51 is a potential marker for prognosis and regulates cell proliferation in pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 356. DOI: 10.1186/s12935-019-1077-6.
- [19] HUANG J, LUO H L, PAN H, et al. Interaction between RAD51 and MCM complex is essential for RAD51 foci forming in colon cancer HCT116 cells [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2018, 83(1): 69-75. DOI: 10.1134/S0006297918010091.

校稿: 李征 王娟

本文引用格式: 薛金菊, 张艳姣, 邢梦芸. RAD51 基因在结直肠癌中的表达及与预后的关系[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(6): 785-790. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.16.

Cite this article as: XUE Jinju, ZHANG Yanjiao, XING Mengyun. Expression of RAD51 gene in colorectal cancer and its relationship with prognosis [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2022, 12(6): 785-790. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.06.16.