

RSF-1 在胶质瘤组织中的表达及其与病人预后的关系

陈云照 张瑞剑 张义松 韩志桐 王 忠

【摘要】目的 探讨染色质重塑因子 1(RSF-1)在人脑胶质瘤中的表达及其与病人预后的关系。方法 采用免疫组织化学染色法和免疫印迹法检测 2010 年 1 月~2013 年 4 月手术切除的 121 例胶质瘤组织和 2017 年 6 月~2018 年 9 月颅脑损伤内减压术中切取的 50 例正常脑组织 RSF-1 的表达水平。胶质瘤病人随访时间截止至 2019 年 4 月。多因素 Cox 比例回归风险模型分析影响胶质瘤病人生存预后的因素。结果 免疫组化染色结果显示胶质瘤组织 RSF-1 高表达率(66.12%, 80/121)明显高于正常脑组织(0%;  $P<0.001$ )。免疫印迹法检测结果显示,胶质瘤组织 RSF-1 蛋白表达水平明显高于正常脑组织( $P<0.05$ ),而且,随胶质瘤级别增高,RSF-1 蛋白表达水平明显增高( $P<0.05$ )。多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,术前 KPS 评分<80 分、WHO 分级为Ⅲ~Ⅳ级、术后未化疗和 RSF-1 高表达是胶质瘤病人总生存期和无进展生存期缩短的独立影响因素( $P<0.05$ )。RSF-1 高表达病人总体生存期[中位数(M):13 个月;四分位间距(IQR):11~26 个月]较低表达者(M:26 个月;IQR:20~36 个月)明显缩短( $P<0.05$ )。RSF-1 高表达病人无进展生存期(M:11 个月;IQR:7~23 个月)较低表达者(M:21 个月;IQR:16~28 个月)明显缩短( $P<0.05$ )。结论 RSF-1 高表达可能预示着胶质瘤病人的不良生存预后。

【关键词】胶质瘤;染色质重塑因子 1;基因表达;生存预后

【文章编号】1009-153X(2020)09-0603-04 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41; Q 786

Expression of RSF-1 in glioma tissues and its relationship with prognosis of patients with glioma

CHEN Yun-zhao, ZHANG Rui-jian, ZHANG Yi-song, HAN Zhi-tong, WANG Zhong. Department of Neurosurgery, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China

【Abstract】Objective To investigate the expression of chromatin remodeling factor 1 (remodeling and spacing factor 1) in glioma tissues and its relationship with the prognosis of patients with glioma. Methods The expression levels of RSF-1 in 121 glioma tissues which were obtained from glioma patients underwent micorsurgery from January 2010 to April 2013 and in 50 normal brain tissues which were obtained from patients with traumatic brain injury underwent decompression from June 2017 to September 2018 were detected by immunohistochemical staining and western blotting. The follow-up time of glioma patients was up to April 2019. Cox proportional hazard model analysis was used to analyze the risk factors for the survival prognosis of glioma patients. Results The high expression rate of RSF-1 in glioma tissues (66.12%, 80/121) was significantly higher than that (0%) in normal brain tissues ( $P<0.001$ ) according to the results of immunohistochemical staining. The results of western blotting showed that the expression level of RSF-1 protein in glioma tissues was significantly higher than that in normal brain tissues ( $P<0.05$ ), and the expression level of RSF-1 protein increased significantly as the grade of glioma increased ( $P<0.05$ ). The multivariate Cox proportional regression risk model analysis showed that the preoperative KPS score <80 points, WHO grade Ⅲ~Ⅳ, no postoperative chemotherapy and high RSF-1 expression were the risk factors for the shortening of overall survival time and progression-free survival time of glioma patients ( $P<0.05$ ). The median overall survival time and progression-free survival time were significantly shorter in patients with high RSF-1 expression than those with low RSF-1 expression ( $P<0.05$ ). Conclusion The high expression of RSF-1 may predict the poor survival prognosis of glioma patients.

【Key words】Glioma; Remodeling and spacing factor 1; Gene expression; Prognosis

胶质瘤是颅内常见原发性肿瘤之一,复发率和病死率较高,预后差。寻找胶质瘤的分子生物学标志物对其早期诊治有重要临床意义。染色质重塑因

子 1(remodeling and spacing factor 1, RSF-1)又被称为肝炎 BX-抗原相关蛋白,最初被发现与乙肝病毒复制周期的调控有关。近年来,研究显示,RSF-1 与 DNA 修复、细胞凋亡和细胞周期密切相关,参与肿瘤的发生和发展<sup>[1,2]</sup>。既往研究发现,RSF-1 在胶质瘤细胞和组织中高表达,并与化疗抵抗有关<sup>[3]</sup>。本文采用免疫组织化学染色法和蛋白质印迹法检测胶质瘤组织 RSF-1 的表达水平,探讨其与病人预后的关系。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.09.009  
基金项目:内蒙古自治区自然科学基金(2015MS0840)  
作者单位:010017 呼和浩特,内蒙古自治区人民医院神经外科(陈云照、张瑞剑、张义松、韩志桐、王 忠)  
通讯作者:张瑞剑, E-mail: hfdghr123@126.com

## 1 资料与方法

1.1 标本来源 选取 2010 年 1 月~2013 年 4 月手术切除的胶质瘤组织 121 例,术前均未接受过放化疗或免疫治疗,其中男 69 例,女 52 例;年龄 23~77 岁,平均( $54.09 \pm 10.89$ )岁;WHO 分级 I 级 12 例,II 级 32 例,III 级 40 例,IV 级 37 例;星型胶质瘤 43 例,少突胶质瘤 35 例,室管膜瘤 17 例,混合胶质瘤 26 例;术后化疗 63 例。另选取 2017 年 6 月~2018 年 9 月颅脑损伤内减压术中切取的正常脑组织 50 例为对照,其中男 28 例,女 22 例;年龄 33~65 岁,平均( $53.41 \pm 7.14$ )岁。两组性别、年龄无统计学差异( $P > 0.05$ )。所有标本均冻存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

1.2 免疫组织化学染色法检测 RSF-1 的表达 石蜡切片均由本院病理科制备,厚度为  $4\text{ }\mu\text{m}$ 。在  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  下烤片 30 min,随后进行脱蜡处理。抗原修复后用羊血清封闭 30 min,加入鼠抗人 RSF-1 单克隆抗体(1:500,上海群己生物科技有限公司)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。然后,加入生物素标记山羊抗小鼠 IgG、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。随后用辣根标记的链霉素卵白素工作液和 DAB 显色液(北京梅科万德生物科技有限公司)处理,苏木紫复染。经过脱水、透明、封片处理后在显微镜下观察。

每张切片随机取 10 个视野,每个视野计数 100 个肿瘤细胞,根据细胞的染色强度及阳性细胞比例判断 RSF-1 表达情况。染色强度评分为:0 分,阴性;1 分,弱阳性,染色为浅黄色;2 分,中度阳性,染色为棕黄色;3 分,强阳性,染色为棕褐色。阳性细胞比例评分: $<10\%$  为 1 分,  $11\% \sim 50\%$  为 2 分,  $51\% \sim 80\%$  为 3 分,  $81\% \sim 100\%$  为 4 分。两个得分相乘得出最终结果:0 分为阴性,1~3 分为弱阳性,4~8 分为中等阳性,9~12 分为强阳性;0~3 分为低表达,4~12 分为高表达<sup>[4]</sup>。

1.3 免疫印迹法检测组织 RSF-1 的表达 将冻存的脑组织解冻,加入放射免疫沉淀法裂解缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司),冰上研磨,制备组织匀浆,  $3\text{ }000\text{ 转/min}$  离心 5 min,取上清液。用 BCA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)测定蛋白浓度,加入 5 倍蛋白上样缓冲液后煮沸 10 min,使蛋白变性。经凝胶电泳后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(鼠抗人 RSF-1 单克隆抗体, 1:500)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜 3 次。随后室温孵育二抗 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min。以  $\beta$ -actin 作为内参,用 ECL 发光仪对蛋

白成像,用 Image J 软件分析灰度值。

1.4 随访 术后以电话和门诊方式进行随访,每 3 个月随访 1 次,随访时进行 CT 或 MRI 检查。总生存期定义为术后第一天至死亡或最后一次随访。无进展生存期指术后至第一次发生疾病进展或任何原因死亡的时间。随访时间截止至 2019 年 4 月。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析;正态分布计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验和单因素方差分析;非正态分布资料以中位数(medium, M)和四分位间距(interquartile range, IQR)描述;计数资料采用  $\chi^2$  检验;用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用 log-rank 检验;采用多因素 Cox 比例风险回归模型分析生存期的影响因素; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胶质瘤组织 RSF-1 表达变化 免疫组织化学染色结果显示,RSF-1 主要表达于细胞膜上(图 1),胶质瘤组织 RSF-1 高表达率(66.12%, 80/121)明显高于正常脑组织(0%;  $P < 0.001$ )。免疫印迹法检测结果显示,胶质瘤组织 RSF-1 蛋白表达水平明显高于正常脑组织( $P < 0.05$ ),而且,随胶质瘤级别增高,RSF-1 蛋白表达水平明显增高( $P < 0.05$ )。见图 2。

2.2 胶质瘤病人生存预后的影响因素 多因素 Cox 比例回归风险模型分析结果显示,术前 KPS 评分  $< 80$  分、WHO 分级为 III~IV 级、术后未化疗和 RSF-1 高表达是胶质瘤病人总生存期和无进展生存期短的独立影响因素( $P < 0.05$ )。见表 2、3。

2.3 胶质瘤组织 RSF-1 表达水平与生存预后的关系 RSF-1 高表达病人总体生存期(M: 13 个月; IQR: 11~26 个月)较低表达者(M: 26 个月; IQR: 20~36 个月)明显缩短( $P < 0.05$ )。RSF-1 高表达病人无进展生存期(M: 11 个月; IQR: 7~23 个月)较低表达者(M: 21 个月; IQR: 16~28 个月)明显缩短( $P < 0.05$ )。见图 3。

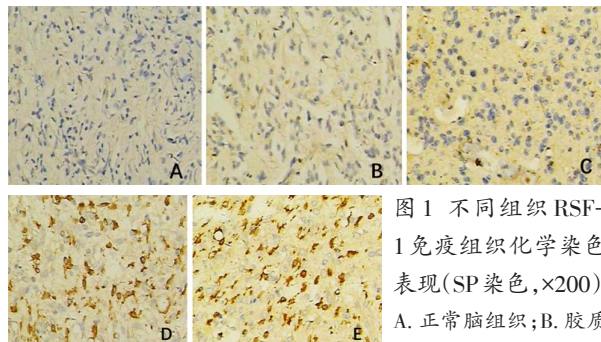


图 1 不同组织 RSF-1 免疫组织化学染色表现(SP 染色,  $\times 200$ )

A. 正常脑组织; B. 胶质瘤组织阴性表达; C. 胶质瘤组织弱阳性表达; D. 胶质瘤组织中等阳性表达; E. 胶质瘤组织强阳性表达

表 1 121 例胶质瘤病人总生存期影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析结果

影响因素	单因素			多因素		
	风险比	95%置信区间	P 值	风险比	95%置信区间	P 值
年龄(≥60 岁/<60 岁)	1.005	0.673~1.341	0.139	—	—	—
性别(男/女)	1.332	0.897~1.500	0.268	—	—	—
肿瘤最大径(≥5 cm/<5 cm)	1.421	0.977~1.807	0.098	—	—	—
肿瘤部位(额叶/其它)	0.795	0.452~1.009	0.119	—	—	—
术前 KPS 评分(<80 分/≥80 分)	3.001	2.121~4.675	<0.001	3.104	2.619~7.043	<0.001
WHO 分级(Ⅲ~Ⅳ级/Ⅰ~Ⅱ级)	2.298	1.330~5.607	<0.001	3.316	2.003~6.325	<0.001
切除范围(未全切除/全切除)	1.413	0.953~2.417	0.067	—	—	—
术后化疗(否/是)	2.634	2.102~4.685	<0.001	2.110	1.786~3.896	0.001
RSF-1(高表达/低表达)	4.090	2.103~7.009	<0.001	3.786	2.089~6.785	<0.001

表 2 121 例胶质瘤病人无进展生存期影响因素的 Cox 比例回归风险模型分析结果

影响因素	单因素			多因素		
	风险比	95%置信区间	P 值	风险比	95%置信区间	P 值
年龄(≥60 岁/<60 岁)	1.220	0.879~1.573	0.206	—	—	—
性别(男/女)	1.214	0.901~1.444	0.429	—	—	—
肿瘤最大径(≥5 cm/<5 cm)	1.267	0.784~1.501	0.432	—	—	—
肿瘤部位(额叶/其它)	1.005	0.814~1.204	0.226	—	—	—
术前 KPS 评分(<80 分/≥80 分)	3.261	2.111~4.465	<0.001	3.009	2.218~5.512	<0.001
WHO 分级(Ⅲ~Ⅳ级/Ⅰ~Ⅱ级)	3.301	1.425~5.216	<0.001	2.675	1.109~4.116	<0.001
切除范围(未全切除/全全切)	1.596	0.905~2.765	0.054	—	—	—
术后化疗(否/是)	1.256	1.034~1.598	0.037	1.374	1.152~1.652	0.042
RSF-1(高表达/低表达)	3.897	2.150~8.634	<0.001	3.543	1.653~6.999	<0.001

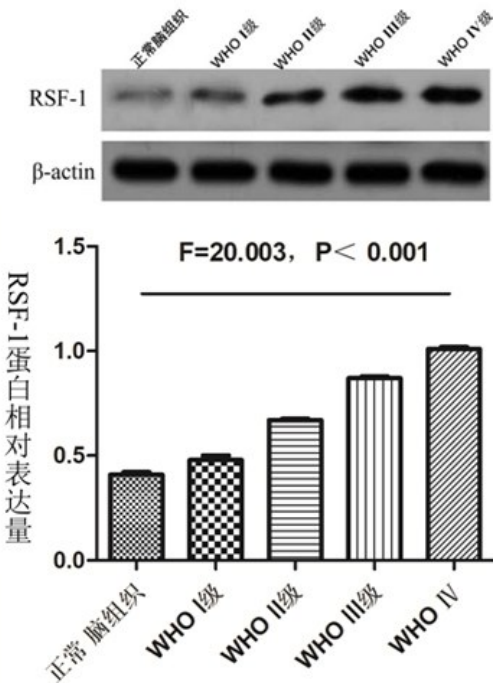


图 2 免疫印迹法检测不同组织 RSF-1 表达

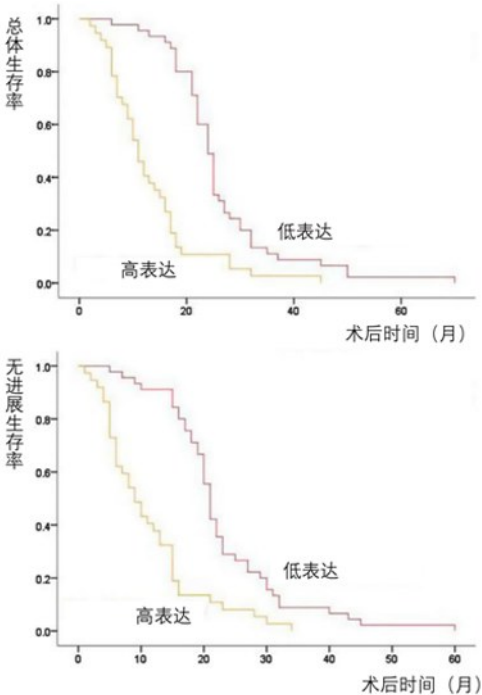


图 3 RSF-1 表达水平与胶质瘤生存期关系的生存曲线图



### 3 讨论

胶质瘤是颅内常见肿瘤,预后较差。既往报道显示,WHO 分级 I~II 级胶质瘤病人的 5 年生存率在 30%~70%,而 IV 级病人的 5 年存活时间仅 9~12 个月<sup>[5]</sup>。因此,寻找对胶质瘤早期诊治及预后判断有重要价值的生物学指标,有重要临床意义。RSF-1 位于染色体 11q13.5 处,是人类核心组蛋白及染色质组装相关因子家族一员。既往研究显示,RSF-1 在肾细胞癌、乳腺癌和前列腺癌等组织中高表达<sup>[6-8]</sup>,可能通过影响肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、分化和异常染色体修复等参与肿瘤的发生和发展<sup>[2]</sup>。RSF-1 的促癌作用可能通过转录因子- $\kappa$ B、细胞外信号调节激酶和 Ras-丝裂原活化蛋白激酶信号通路等实现<sup>[9-11]</sup>。本文采用免疫组织化学染色法和免疫印迹法检测胶质瘤组织 RSF-1 的表达情况,结果显示胶质瘤组织 RSF-1 表达水平明显高于正常脑组织,并且 WHO 分级越高,RSF-1 表达水平越高。提示 RSF-1 可能参与胶质瘤的发生和发展。

胶质瘤预后的影响因素较多。本文发现术前 KPS 评分、WHO 分级和术后化疗是影响胶质瘤病人生存预后的独立影响因素。这与既往报道一致<sup>[12,13]</sup>。本文还显示 RSF-1 与胶质瘤病人预后有关,RSF-1 高表达病人总体生存期和无进展生存期均低于低表达病人。原因可能为:RSF-1 促进肿瘤细胞的增殖和侵袭;通过修复异常染色体增强肿瘤细胞的生存能力;可能与化疗药物耐药性有关<sup>[14]</sup>。

综上所述,胶质瘤组织 RSF-1 表达水平明显提高,并且胶质瘤 WHO 分级越高,RSF-1 表达水平越高,RSF-1 高表达预示胶质瘤病人的不良生存预后。

#### 【参考文献】

- [1] Helfricht A, van Attikum H. Remodeling and spacing factor 1 (RSF1): a rising star in DNA repair [J]. *Epigenomics*, 2014, 6(3): 261-265.
- [2] Tian J, Kong E, Wang X, *et al.* RSF-1 siRNA enhances tumor radiosensitivity in cervical cancer via enhanced DNA damage, cell cycle redistribution, and promotion of apoptosis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 3061-3071.
- [3] Zhao XC, An P, Wu XY, *et al.* Overexpression of hSNF2H

in glioma promotes cell proliferation, invasion, and chemoresistance through its interaction with Rsf-1 [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7203-7212.

- [4] 葛盛徐,盛莉莉,徐善水,等. 12-LOX 在神经胶质瘤中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(19): 953-956.
- [5] Gussyatiner O, Hegi ME. Glioma epigenetics: from subclassification to novel treatment options [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51: 50-58.
- [6] Zhang X, Xue D, Hao F, *et al.* Remodeling and spacing factor 1 overexpression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3852-3857.
- [7] Liu Y, Gai J, Fu L, *et al.* Effects of RSF-1 on proliferation and apoptosis of breast cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 4279-4284.
- [8] Hoflmayer D, Hamuda M, Schroeder C, *et al.* High RSF1 protein expression is an independent prognostic feature in prostate cancer [J]. *Acta Oncol*, 2020, 59(3): 268-273.
- [9] Chen X, Sun X, Guan J, *et al.* Rsf-1 influences the sensitivity of non-small cell lung cancer to paclitaxel by regulating NF- $\kappa$ B pathway and its downstream proteins [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2322-2336.
- [10] Li Q, Dong Q, Wang E. Rsf-1 is overexpressed in non-small cell lung cancers and regulates cyclinD1 expression and ERK activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(1): 6-10.
- [11] Liu F, Tai Y, Ma J. LncRNA NEAT1/let-7a-5p axis regulates the cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma by targeting Rsf-1 and modulating the Ras-MAPK pathway [J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(6): 534-542.
- [12] 周建华,胡涛,陈宇,等. lncRNA NEAT1 在人脑胶质瘤的表达变化及其与病人预后的关系[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(3): 148-150, 161.
- [13] 白庆岭,胡长伟,彭营影,等. 脑胶质瘤预后影响因素分析[J]. *临床误诊误治*, 2018, 36(7): 97-100.
- [14] 沈帅,杨连赫,于承仟,等. RSF-1 与肿瘤关系的研究进展及相关作用机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2016, 24(16): 2660-2663.

(2020-07-02 收稿, 2020-07-23 修回)