

DNA 依赖蛋白激酶在鼻咽癌病变中的表达及意义

孙建松,熊世珍

(贵州省人民医院,贵州 贵阳 550002)

摘要: [目的] 研究 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PKcs)在鼻咽部正常黏膜、鼻咽炎、鼻咽非典型增生及鼻咽癌中的表达,并探讨 DNA-PKcs 表达与鼻咽癌临床病理参数间的关系。[方法] 应用免疫组化 EnVision 法检测 10 例鼻咽部正常黏膜、10 例鼻咽炎、21 例鼻咽非典型增生和 53 例鼻咽癌组织中 DNA-PKcs 蛋白的表达水平,并结合临床病理特征进行分析。[结果] DNA-PKcs 蛋白在正常鼻咽黏膜及鼻咽炎组织中呈低表达,在鼻咽非典型增生及鼻咽癌组织中呈高表达,阳性表达率分别为 0、20.00%、71.42% 和 64.15%;其表达与鼻咽癌组织分化类型相关($P=0.023$),与性别、年龄、临床分期及淋巴结转移无明显相关性(P 均 >0.05)。[结论] DNA-PKcs 在鼻咽癌病变过程中可能发挥一定的作用。

关键词: 鼻咽肿瘤;DNA 依赖蛋白激酶;免疫组化

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2017)08-0656-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.08.A013

Expression and Clinical Significance of DNA-dependent Protein Kinase in Nasopharyngeal Carcinoma

SUN Jian-song, XIONG Shi-zhen

(The People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of DNA-dependent protein kinase(DNA-PKcs) in normal nasopharyngeal mucosa, nasopharyngitis, nasopharyngeal atypical hyperplasia and nasopharyngeal carcinoma(NPC), and to analysis the relationship between DNA-PKcs protein and the clinicopathologic parameters of NPC. [Methods] The expression of DNA-PKcs protein in tissue samples of nasopharyngeal mucosa ($n=10$), nasopharyngitis ($n=10$), nasopharyngeal atypical hyperplasia($n=21$) and NPC($n=53$) was detected by immunohistochemical technique(Envision). The relationship between DNA-PKcs expression and clinicopathological features of NPC was analyzed. [Results] The positive rates of DNA-PKcs in normal nasopharyngeal mucosa, nasopharyngitis, nasopharyngeal atypical hyperplasia and NPC were 0, 20.00%, 71.42% and 64.15%, respectively. DNA-PKcs expression was correlated with tumor differentiation ($P<0.05$), but not correlated with clinical stages or neck lymph node metastasis of NPC ($P>0.05$). [Conclusion] DNA-PKcs may be involved in the carcinogenesis of nasopharyngeal neoplasms.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; DNA-dependent protein kinase(DNA-PKcs); immunohistochemistry

DNA 依赖蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PKcs)是一种细胞核酶,参与 DNA 双链断裂的非同源末端链接(nonhomologous end joining, NHEJ)修复反应^[1,2]。鼻咽癌癌变过程涉及多种分子病理变化,其中 DNA 损伤修复起着重要作用,DNA 损伤修复低下的患者易患癌症。DNA-PKcs 在鼻咽

癌病变过程中表达情况及与临床病理特征的关系仍不清楚,本文对鼻咽癌病变过程中 DNA-PKcs 的表达规律进行研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2006 年 11 月至 2008 年 11 月贵州省人民

收稿日期:2016-06-20;修回日期:2016-08-17

基金项目:贵阳市科技计划项目(筑科合同[2011103]40)

通讯作者:熊世珍, E-mail: 2993198068@qq.com

医院经鼻咽活检确定的标本共 94 例,以性别及年龄作为均衡选择病例的条件,年龄要求在 26~64 岁。鼻咽黏膜正常标本 10 例,男性 5 例,女性 5 例,平均年龄 35.9 岁。鼻咽炎标本 10 例,男性 6 例,女性 4 例,平均年龄 37.8 岁。鼻咽癌前病变标本 21 例,平均年龄 36.3 岁,包括轻度(Ⅰ级)7 例,中度(Ⅱ级)7 例,重度(Ⅲ级)7 例。鼻咽癌患者 53 例,均未行放、化疗,男性 33 例,女性 20 例,平均年龄 39.1 岁;包括分化型角化癌 6 例、分化型非角化癌 14 例、未分化癌 33 例;临床分期Ⅰ期 11 例,Ⅱ期 13 例,Ⅲ期 16 例,ⅣB 13 例;伴颈淋巴结转移 28 例。鼻咽正常黏膜、鼻咽炎、鼻咽癌前病变、鼻咽癌 4 组病例性别、年龄等差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 主要试剂

鼠抗人 DNA-PKcs 单抗(英国 Abcam 公司);免疫组化试剂盒(EnVisionYM 二抗试剂 Poly-HRP 羊抗鼠兔通用型,英国 Abcam 公司)。

1.3 诊断及病理分级标准

鼻咽部组织石蜡包埋切片进行常规病理诊断,鼻咽癌的分类参照 1991 年 WHO 制定的分类标准,即未分化癌、分化型角化性癌、分化型非角化性癌。鼻咽癌前病变诊断标准按国家抗癌协会(广州中山大学肿瘤防治研究所等)制定的标准^[3,4]。

1.4 DNA-PKcs 检测方法及分级

鼻咽病理组织进行常规石蜡包埋,4 μ m 厚连续切片 2 张,1 张进行 HE 染色,按 WHO 诊断标准进行病理诊断,另 1 张采用 EnVision 法进行免疫组织化学染色:经二甲苯脱蜡和水化后,PBS 冲洗;柠檬酸缓冲液高温高压进行抗原修复,加入鼠抗人 DNA-PKcs 单抗,37℃ 孵育过夜;PBS 冲洗;加入 EnVisionYM 二抗试剂 Poly-HRP 羊抗鼠兔通用型,水浴箱内 37℃ 孵育 30 min;PBS 冲洗后 DAB 染色,自来水冲洗,苏木精复染,经梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固保存。显微镜下观察,并用 Mias2000 病理工作站进行图像定量分析,记录结果。用低倍和高倍镜观察全片,DNA-PKcs 定位于细胞核,其阳性表达主要表现为细胞核内呈现棕黄色或者棕褐色颗粒,也有少量胞浆内呈现棕黄色颗粒。参考许良中等^[5]的判断标准。根据着色的强弱程度评分:无着色 0 分,淡黄色 1 分,黄色 2 分,棕褐色 3 分;同时,按阳性细胞所占

的百分比计分:阴性为 0 分,阳性细胞率 $\leq 10\%$ 为 1 分,10%~50%为 2 分,50%~75%为 3 分, $>75\%$ 为 4 分;将每张切片着色程度得分与着色百分率得分相乘,为其最后得分。0~1 分为阴性(-);2~3 分为(+);4~6 分为(++);6 分以上为(+++)。2~12 分记为阳性表达。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计数资料两组间的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行统计学处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同鼻咽组织中 DNA-PKcs 的表达水平

DNA-PKcs 蛋白的表达部位为细胞核,出现棕黄色或者棕褐色颗粒为阳性细胞。DNA-PKcs 在鼻咽部正常黏膜中未见阳性表达,鼻咽炎患者仅 2 例 DNA-PKcs 有弱阳性表达,阳性率为 20.00%,而鼻咽非典型增生患者 DNA-PKcs 表达例数及阳性率明显提高,表达率为 71.42%,多为弱阳性及阳性表达,NPC 患者 DNA-PKcs 阳性表达率为 73.58%,多为阳性或强阳性表达。鼻咽炎患者与鼻咽非典型增生患者比较,差异具有统计学意义($\chi^2=7.237$, $P=0.003$);但鼻咽部非典型增生患者与 NPC 患者比较差异无统计学意义($\chi^2=0.806$, $P=0.065$)(Table 1, Figure 1、2)。

Table 1 DNA-PKcs expression in different nasopharyngeal tissues

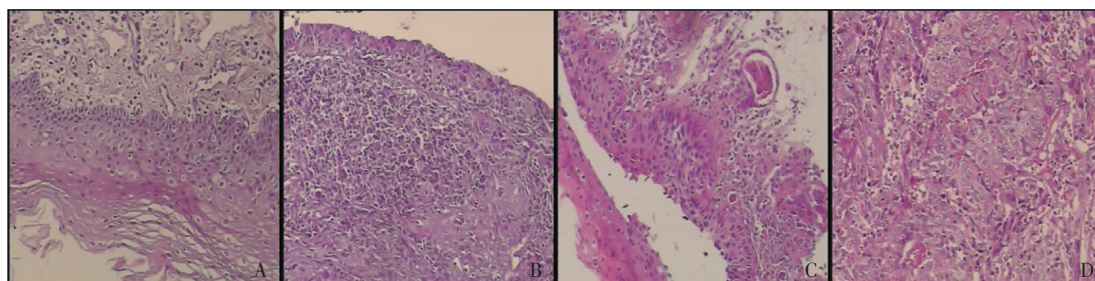
Tissue types	N	DNA-PKcs expression	
		Positive(%)	Negative(%)
Nasopharyngeal mucosa	10	0	10(100.00)
Nasopharyngitis	10	2(20.00)	8(80.00)
Nasopharyngeal atypical hyperplasia	21	15(71.42)	6(28.58)
Nasopharyngeal carcinoma	53	34(64.15)	19(35.85)

2.2 DNA-PKcs 在鼻咽非典型增生组织中的表达

DNA-PKcs 在鼻咽非典型增生组织Ⅰ~Ⅲ级患者的阳性表达率分别为 42.86%(3/7)、71.43%(5/7)和 100.00%(7/7),差异有统计学意义($\chi^2=3.336$, $P<0.05$)(Table 2),说明随着鼻咽上皮非典型增生程度的加重,DNA-PKcs 表达有增加趋势。

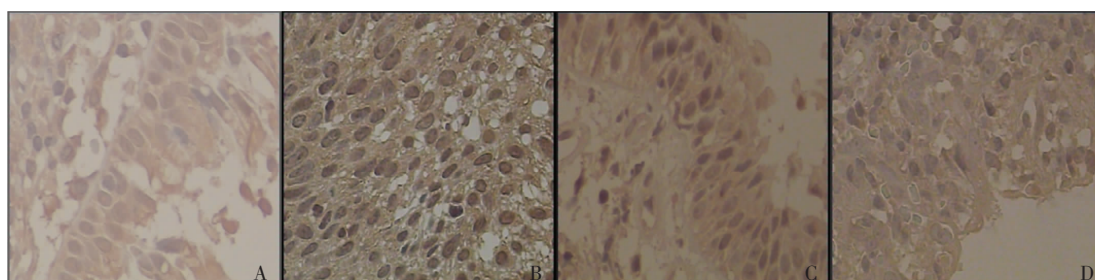
2.3 DNA-PKcs 表达与 NPC 临床病理特征的关系

通过对 53 例 NPC 标本分析显示,DNA-PKcs 表达在性别和年龄组间差异无统计学意义($P>0.05$)。鼻



Note: A: nasopharyngeal mucos; B: nasopharyngiti; C: nasopharyngeal atypical hyperplasia; D: nasopharyngeal carcinoma.

Figure 1 Different nasopharyngeal tissues in HE staining (×50 or ×200)



Note: A: nasopharyngeal mucos; B: nasopharyngiti; C: nasopharyngeal atypical hyperplasia; D: nasopharyngeal carcinoma.

Figure 2 DNA-PKcs expressions in Vision, Magnification (×50 or ×200)

咽分化型角化癌、分化型非角化癌、未分化癌的阳性表达率分别为 50.00%(3/6)、64.29%(9/14) 和 66.67%(22/33), 差异有统计学意义($\chi^2=2.779$, $P=0.023$)。临床分期为 I ~ II 期和 III ~ IV B 期组 DNA-PKcs 的阳性表达率分别为 57.14%(13/24) 和 72.41%(21/29), 差异无统计学意义($\chi^2=0.118$, $P=0.134$)。已发生颈淋巴结转移和未发生颈淋巴结转移患者 DNA-PKcs 的阳性表达率分别为 64.29%(18/28) 和 64.00%(16/25), 差异无统计学意义($\chi^2=0.028$, $P=0.077$) (Table 3)。

3 讨 论

DAN 依赖蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 是由 DNA 依赖蛋白激酶催化亚基 (DNA-dependent protein kinase catalytic subunits, DNA-PKcs) 与另外两个调节亚基 ku70 和 ku80 共同构成 DAN-PK 复合物, 参与 DNA 双链断裂的非同源末端链接 (nonhomologous end joining, NHEJ) 修复

Table 2 DNA-PKcs expression in nasopharyngeal atypical hyperplasia

Atypical hyperplasia	N	DNA-PKcs expression			P
		Positive (%)	Negative (%)	χ^2	
I	7	3(42.86)	4(57.14)	3.336	0.021
II	7	5(71.43)	2(28.58)		
III	7	7(100.00)	0		

反应^[1,2]。DNA-PKcs 主要是从事 DNA 双链断裂修复的一种肿瘤抑癌基因^[6,7]。当机体 DNA 受损断裂时, 会自动启动 NHEJ 修复机制, DNA-PKcs 作为修复家族的一员会参与 DNA 断裂的 NHEJ 的修复, 同时, DNA-PKcs 可以维持人体正常免疫功能, 调节 DNA 修复, 防止细胞进一步恶变^[8]。此外, DNA-PKcs 在维护 V(D)J 重组, 端粒稳定性中具有重要作用^[9,10]。DNA-PKcs 是完成 DNA 非同源末端重组修复的关键成分, 在抑制人体产生肿瘤的过程中起着重要作用, 被认为具有防止肿瘤发生和发展的作用^[11]。

目前, 有关 DNA-PKcs 在 NPC 病变过程中表达规律的研究不多, 但所关注的内容是 DNA-PKcs 表达水平与肿瘤组织对放射治疗或化疗的敏感性问题的^[8,12-15]。本研究结果显示 DNA-PKcs 在正常鼻咽黏

Table 3 Association of DNA-PKcs expression and clinicopathological features in patients with NPC

Clinicopathological features	N(%)	DNA-PKcs expression		χ^2	P
		Positive (%)	Negative(%)		
Gender					
Male	33(62.26)	23(69.70)	10(30.30)	0.213	0.689
Female	20(37.74)	11(55.00)	9(45.00)		
Age(years)					
<45	31(58.49)	17(54.84)	14(45.16)	0.133	0.709
≥45	22(41.51)	12(54.55)	10(45.45)		
WHO pathology classification					
I (keratinizing)	6(11.32)	3(50.00)	3(50.00)	2.279	0.023
II (nonkeratinizing)	14(26.42)	9(64.29)	5(35.71)		
III (undifferentiated)	33(62.26)	22(66.67)	11(33.33)		
Clinical stage					
I ~ II	24(54.69)	13(57.14)	11(42.86)	0.118	0.134
III ~ IVB	29(45.31)	21(72.41)	8(27.59)		
Lymph node metastasis					
Absence	25(32.81)	16(64.00)	9(36.00)	0.028	0.077
Present	28(67.19)	18(64.29)	10(35.71)		

膜不表达,在鼻咽炎较少表达,在鼻咽非典型增生及鼻咽癌呈高表达。这提示 DNA-PKcs 对于正常组织细胞 DNA 具有修复作用,炎症组织中 DNA 断裂损伤较少,修复基因 DNA-PKcs 的含量也较少,而在鼻咽非典型增生及鼻咽癌组织中 DNA 断裂损伤较多 DNA-PKcs 的含量也较多,这表明 DNA-PKcs 可能参与了鼻咽癌病变过程。本研究还发现,DNA-PKcs 表达在鼻咽癌前病变组织中随着鼻咽非典型增生病变程度的加重上调明显,其活性主要从Ⅱ级非典型增生开始明显表达,并在Ⅲ级非典型增生患者中维持高水平表达,这与周小军等^[16]的研究结果相似。DNA-PKcs 表达上调间接说明鼻咽癌前病变患者存在 DNA 损伤修复能力低下,对于在鼻咽黏膜中发现非典型增生的患者应当定期复查,中度或重度非典型增生应尤为重视。本研究认为,随着鼻咽不典型增生病变程度的逐渐加重,非典型增生病变转化为恶性肿瘤的风险逐渐越大。因此,鼻咽非典型增生病变过程中 DNA-PKcs 表达水平与 NPC 发生的相关性值得深入系统地研究。

本研究结合临床病理参数进行分析,DNA-PKcs 表达与 NPC 组织分化类型相关,与 TNM 分期、颈淋巴结转移无明显相关性。癌组织分化程度越低,DNA-PKcs 表达率越高,表明 DNA-PKcs 参与 NPC 细胞的分化过程,提示 DNA-PKcs 的异常表达与肿

瘤的恶性程度及进展有一定关系。

本研究通过免疫组化技术检测 DNA-PKcs 表达情况,有助于判断有异型改变的鼻咽上皮细胞的恶变程度,有助于 NPC 的早期诊断和对癌前病变进行干预,以预防 NPC 的发生及发展。但 DNA-PKcs 表达或激酶活性的增加,在鼻咽上皮细胞恶性转化和 NPC 的发生、发展过程中的具体作用及机制,还有待进一步深入细致的研究。

参考文献:

- [1] Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer[J]. Nature,2001,411(6835):366-374.
- [2] Khanna KK,Jackson SP. DNA double-strand breaks:signaling,repair and the cancer connection[J]. Nature Genet,2001,27(3):247-254.
- [3] Hong MH,Guo X. Nasopharyngeal carcinoma[M]. 10th ed. Beijing:China Medical Science Press,2003.116.[洪明晃,郭翔.鼻咽癌[M].第10版.北京:中国医药科技出版社,2003.116.]
- [4] Zong YS,Wang LT. Ear,nose and throat tumor (pathological part)[M]. 5th ed. Guangzhou:Guangdong Science and Technology Press,2002.127. [宗永生,王连唐.耳鼻咽喉肿瘤(病理部分)[M].第5版.广州:广东科技出版社,2002.127.]
- [5] Xu LZ,Yang WT. The criteria for judging the results of immunohistochemical reaction[J]. Chinese Journal of Cancer,1996,6(4):229-231. [许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.]
- [6] Lieber MR,Gu J,Lu H,et al. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans [J]. Subcell Biochem,2010,50:279-296.
- [7] Cai Y,Zai JJ. Research progress of DNA-PKcs[J]. The Practical Journal of Cancer,2012,27(5):540-542. [蔡昱,翟建军. DNA-PKcs 的研究进展[J]. 实用癌症杂志,2012,27(5):540-542.]
- [8] Ren JH,Dai XF,Yan GL,et al. Acute oral mucositis in nasopharyngeal carcinoma patients treated with radiotherapy:association with genetic polymorphism in DNA DSB repair genes[J]. Int J Radiat Biol,2014,90(3):256-261.
- [9] Espejel S,Franco S,Sgura A,et al. Functional interaction

- between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance[J]. EMBO J, 2002, 21(22):6275-6287.
- [10] Gilley D, Tanaka H, Hande MP, et al. DNA-PKcs is critical for telomere capping[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(26):15084-15088.
- [11] Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis[J]. Nature, 2005, 434(7035):864-870.
- [12] Wang JH, Shi M, Hsia YS, et al. Failure patterns and survival in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with intensity modulated radiation in Northwest China: a pilot study[J]. Radiat Oncol, 2012, 7:2.
- [13] Liu SC, Tsang NM, Chiang WC, et al. Leukemia inhibitory factor promotes nasopharyngeal carcinoma progression and radioresistance[J]. J Clin Invest, 2013, 123(12):5269-5283.
- [14] Yang J, Xu X, Hao Y, et al. Expression of DNA -PKcs and BRCA1 as prognostic indicators in nasopharyngeal carcinoma following intensity-modulated radiation therapy [J]. Oncol Lett, 2013, 5(4):1199-1204.
- [15] Huang L, Xu XM, Gao YR, et al. The expression and clinical significance of DNA-PKcs in nasopharyngeal carcinoma through hierarchical analysis[J]. Chinese Medicine Guides, 2015, 12(32):4-8. [黄俐, 徐细明, 高艳蓉, 等. DNA 蛋白激酶依赖蛋白激酶催化亚基在鼻咽癌中的表达及意义 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(32):4-8.]
- [16] Zhou XJ, Wang SQ, Wang SZ, et al. Expression of DNA-dependent protein kinase in the nasopharyngeal tissue during carcinogenesis[J]. International Journal of Internal Medicine, 2007, 34(9):507-513. [周小军, 王书芹, 王士贞, 等. 鼻咽癌病变过程中 DNA 依赖蛋白激酶表达水平的相关研究[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(9):507-513.]

坚决贯彻执行《发表学术论文“五不准”》规定

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技人员在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院和自然科学基金委共同研究制定并联合下发了《发表学术论文“五不准”》的通知。

(1)不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。

(2)不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。

(3)不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。

(4)不准提供虚假同行评议人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评议人,应确保所提供的评议人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评议环节的任何弄虚作假行为。

(5)不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

希望广大科技工作者、读者和作者,以及本刊编委、审稿专家和有关工作人员都应加强学术道德自律,共同努力,捍卫学术尊严,维护良好学风。