

DNA-PKcs、Ku70 和 Ku80 表达与食管鳞癌放射敏感性研究

The Relationship of DNA-PKcs, Ku70 and Ku80 Expressions with Radiosensitivity in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma

ZHANG Li-zhen, BI Liang-wen, ZHANG Ping, et al.

张丽珍, 毕良文, 张平, 赵滑峰, 田继红, 魏娟
(南京医科大学第二附属医院, 江苏 南京 210011)

摘要: [目的] 研究 DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位 (DNA-PKcs)、Ku70、Ku80 表达与食管鳞癌放射敏感性的关系。[方法] 应用组织芯片技术和免疫组织化学方法检测行放射治疗的 60 例食管鳞癌患者病理组织学标本中 DNA-PKcs、Ku70、Ku80 的表达情况, 分析三者表达与患者临床病理特征、放射治疗后生存率的相关性。[结果] DNA-PKcs 的表达与食管癌区域淋巴结转移情况呈负相关 ($P=0.035$), DNA-PKcs 高表达的患者进行放射治疗后生存期较低表达组长 ($P<0.001$)。Ku70、Ku80 表达与食管鳞癌患者临床病理特征及生存期无关 ($P>0.05$)。[结论] DNA-PKcs 高表达与食管鳞癌患者放射治疗后生存期呈正相关。

主题词: DNA-PKcs; 食管肿瘤; 鳞癌; 放射疗法; 免疫组织化学

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)02-0086-04

放射治疗是局部进展期食管癌的有效治疗手段, 能够缩小肿瘤体积、改善患者症状、提高生活质量并延长生存期。但并非所有的食管癌患者对放疗均敏感, 如果能够预测患者的放射敏感性, 就可以避免不必要的治疗和毒副作用, 从而选择性地治疗放疗敏感的食管癌患者。

Ku 蛋白作为 DNA 修复蛋白, 在 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs) 的修复途径中发挥重要作用。Ku 蛋白是一个 DNA 结合蛋白, 是由 Ku70 和 Ku80 两个亚单位组成的异源二聚体, 它与 DNA 依赖蛋白激酶的催化亚单位 (DNA-protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) 共同组成 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-protein kinase, DNA-PK)。许多学者对其基因结构和功能进行了深入研究并取得了新的进展, 特别在有关 DSBs 的修复和对电离辐射敏感性作用机制和应用前景的研究引起了极大的关注。由于 Ku 蛋白在辐射诱导的 DSBs 的修复中起到核心作用, 其功能的变化必然影响细胞的损伤修复能力, 从而影响肿瘤细胞的放射敏感性。本研究通过对进行放射治疗的 60 例食管鳞癌患者癌组织中

DNA-PKcs、Ku70、Ku80 表达情况进行检测, 分析 DNA-PKcs、Ku70、Ku80 表达与食管鳞癌放射敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集南京医科大学第二附属医院 2005 年 6 月 26 日至 2009 年 6 月 17 日收治进行放射治疗的食管鳞癌患者病例资料及病理标本 (均由南京医科大学第二附属医院病理科提供) 共计 60 例, 其中男性 39 例, 女性 21 例; 年龄 28~80 岁, 中位年龄 49 岁。所有病例临床资料完整, 标本均经 4% 中性甲醛固定, 常规处理后石蜡包埋。

1.2 方法

1.2.1 临床治疗方法

60 例均经消化道内窥镜检查取得病理组织学诊断, 经胸部 CT 检查确定区域淋巴结转移情况: 淋巴结直径 $\geq 1\text{cm}$ 判断为阳性; 全部病例均采用 CT 扫描定位, TPS 制定三维适形放射治疗计划, 6~15 MV X 射线照射; 总量 60~64 Gy/30~32 次, 42~44 d。

基金项目: 江苏省卫生厅立项课题 (H200868)

收回日期: 2011-08-04; **修回日期:** 2011-10-17

全部病例均顺利完成治疗。

1.2.2 主要试剂和方法

一抗 DNA-PKcs、Ku70、Ku80 均购自北京中杉公司。二步法试剂盒：BROHD SPECTRUN POLY HRP CONJUGATE 为美国 Eymad 公司产品。切片常规脱蜡脱水，柠檬酸抗原修复液修复（5min×2 次），PBS 反复冲洗 3 次，每次 2min，滴入相应的一抗（孵育 60min），PBS 反复冲洗 3 次，每次 2min，DAB 显色（约 3min），苏木素复染，透明，封片。

1.3 结果判定

DNA-PKcs、Ku70、Ku80 蛋白阳性部位在细胞核，以出现黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色的肿瘤细胞为阳性细胞。根据染色强度和阳性细胞数：按染色强度分为 0 分（浅黄色）、1 分（棕黄色）、2 分（棕褐色）；按阳性细胞百分比分为：0 分（<25%）、1 分（25%~50%）、2 分（50%~75%）、3 分（>75%）；总得分=染色强度计分+阳性细胞数计分，阴性<3 分，阳性≥3 分。采用双盲法评分，2 位医师读片。全部病例均进行随访，生存时间按死亡时间或末次随访时间计算。

1.4 统计学处理

数据应用 SPSS 16.0 统计软件处理。计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法，相关分析采用 Spearman 秩相关分析，采用 Kaplan-Meier 法计算生存率并行 Log-Rank 法检验差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DNA-PKcs、Ku70 和 Ku80 表达

DNA-PKcs 蛋白阳性部位在细胞核，以出现黄色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色的肿瘤细胞为阳性细胞（图 1、2）。DNA-PKcs 阳性表达 30 例，阳性率 50.0%（30/60）；Ku70 阳性表达 32 例，阳性率 53.3%（32/60）；Ku80 阳性

表达 30 例，阳性率 50.0%（30/60）。

2.2 DNA-PKcs、Ku70、Ku80 表达与食管癌临床病理特征的关系

DNA-PKcs 表达与食管鳞癌患者年龄、性别及

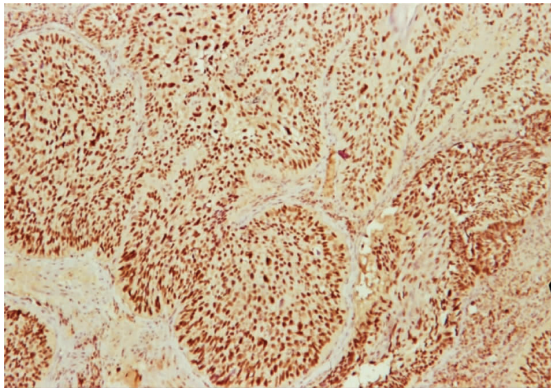


图 1 DNA-PKcs 在食管癌细胞核的阳性表达(SP×200)

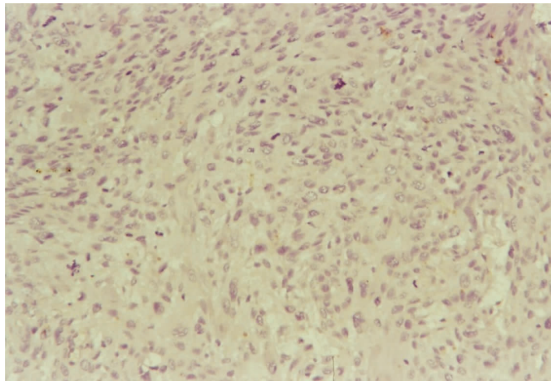


图 2 DNA-PKcs 在食管癌细胞核的阴性表达(SP×200)

表 1 DNA-PKcs、Ku70、Ku80 表达与食管癌患者临床病理特征的关系

临床病理因素	DNA-PKcs 表达				Ku70 表达				Ku80 表达			
	阴性	阳性	χ^2	P 值	阴性	阳性	χ^2	P 值	阴性	阳性	χ^2	P 值
年龄(岁)			0.438	0.601			0.630	0.427			1.669	0.196
< 65	16	13			12	17			12	17		
≥65	14	17			16	15			18	13		
性别			1.934	0.065			2.308	0.129			0.073	0.787
男性	15	24			21	18			19	20		
女性	15	6			7	14			11	10		
病灶长度(cm)			1.105	0.576			1.014	0.602			1.905	0.386
≤3	7	5			5	7			5	7		
3~	11	9			8	12			10	10		
5~	12	16			15	13			16	12		
淋巴结转移			4.444	0.035			1.350	0.245			2.500	0.114
-	14	22			19	17			21	15		
+	16	8			9	15			9	15		

病灶长度无关,与食管癌区域淋巴结转移情况呈负相关($P=0.035$);Ku70、Ku80 表达与食管鳞癌患者年龄、性别、病灶长度及区域淋巴结转移均无关($P>0.05$)。见表 1。

2.3 DNA-PKcs、Ku70、Ku80 表达与食管癌放疗后生存率的关系

Kaplan-Meier 生存分析显示:DNA-PKcs 表达阴性患者中位生存期 9 个月,DNA-PKcs 表达阳性者中位生存期 16 个月;DNA-PKcs 阳性表达患者的生存期明显较 DNA-PKcs 阴性表达者长($P<0.001$)(图 3)。Ku70 表达阴性者中位生存期 15 个月,Ku70 表达阳性者中位生存期 9 个月($P=0.089$)(图 4)。Ku80 表达阴性者中位生存期 10 个月,Ku80 表达阳性者中位生存期 12 个月;Ku80 的表达水平与食管癌放疗后生存率无相关性($P=0.523$)(图 5)。

3 讨论

近年来,有关 DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs) 及其对基因组不稳定性、染色体易位、致癌作用和细胞凋亡的作用被广泛研究。多种内源性或外源性物理及化学因素可导致 DSBs,如电离辐射、特殊化学药物损伤、DNA 代谢以及具有氧化性质的副产物如氧自由基等。如果这些 DNA DSBs 无法及时并正确修复,就可能导致细胞的死亡。不同细胞类型有不同的修复机制,而损伤的结构越复杂,DSB 位点越多,DNA 修复的能力也就越低^[1]。DNA-PK 是 DNA 损伤修复的关键酶,DNA-PK 复合物由一个催化亚 DNA-PKcs 和两个调节亚基 Ku80 和 Ku70 组成。Ku 蛋白由 Ku70 和 Ku80 通过羧基末端的 150 个氨基酸残基组成的异源二聚体,在 DSBs 修复中起辨认、结合 DNA 末端的作用,并可以招募 DNA-PKcs 并激活其活性。DNA-PKcs 是有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化活性的催化亚基,属于 PI-3K 相关激酶家族成员。DNA-PKcs 与 Ku70/Ku80 异二聚体共同组成 DNA-PKcs/Ku70/Ku80 蛋白复合物,在 DSBs 的修复中发挥核心作用^[2]。

DNA-PKcs、Ku70、Ku80 在肿瘤组织、肿瘤旁组织及正常组织中均有表达,表明 DNA-PK 对 DNA 的损伤修复能力是一种基本的细胞功能,在良恶性组织中均可发挥作用,而肿瘤细胞同样可利用 DNA-PK 的修复功能生长增殖^[3]。研究发现,肿瘤发生与

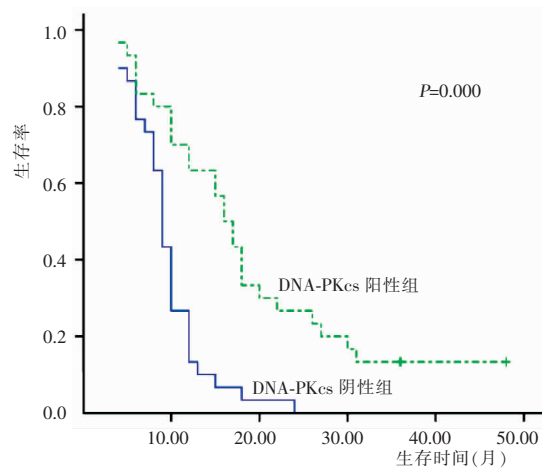


图 3 不同 DNA-PKcs 表达食管癌患者放疗后生存曲线

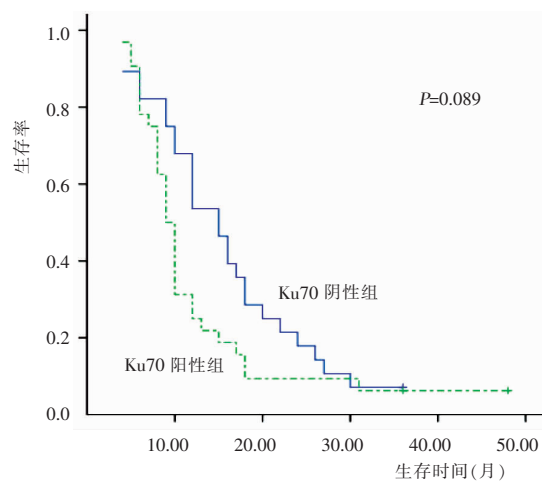


图 4 不同 Ku70 表达食管癌患者放疗后生存曲线

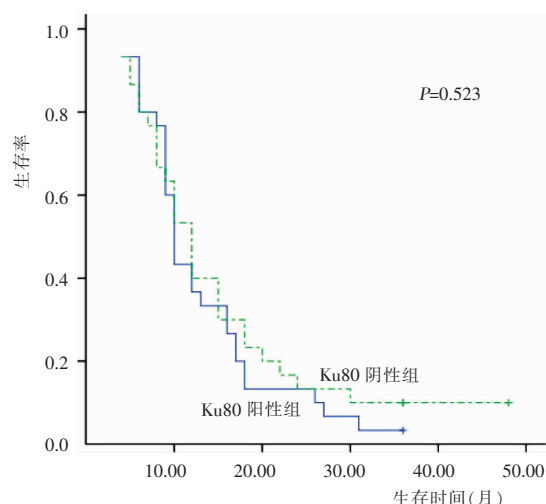


图 5 不同 Ku80 表达食管癌患者放疗后生存曲线

DNA-PK 的损伤有关,DNA-PK 受损后其活性下降,人体极易发生各种恶性肿瘤^[4]。另外,肿瘤组织中 DNA-PKcs、Ku70 和 Ku80 表达的不平衡,可能影响 DNA-PK 复合体的形成,使 DSBs 不能及时准确修复,也可能导致肿瘤形成。近年来有越来越多的研究结果显示,DNA-PK 在肿瘤组织中高表达^[5,6],推测 DNA-PK 的表达水平不但与肿瘤的发生、发展和转归有关,还与某些肿瘤的病理类型、分期及侵袭性有关。既往研究报道,DNA-PKcs 低表达与卵巢癌^[7]、大肠癌^[8]、乳腺癌^[9]等多种肿瘤的侵袭、淋巴结转移、远处转移以及更低的生存率有关。

电离辐射可引起 DNA 单链断裂、双链断裂及细胞损伤,尤其 DNA 双链断裂(DSBs)在电离辐射所致的细胞死亡中起到至关重要的作用。DNA 修复系统是机体抵御各种伤害的分子基础,对于维护基因组的稳定与完整起着至关重要的作用。有研究报道^[10,11]多种蛋白质(Ku70,Ku80,XRCC4 和 DNA-PKcs)参与 DSBs 的修复过程,在这个过程中 DNA-PKcs 与 Ku70 或 Ku80 结合形成二聚体,这个二聚体(DNA-PK)在 DSBs 的修复过程起关键性作用,促进 p53 表达,导致细胞周期停滞或凋亡。Noguchi 等^[12]发现 DNA-PKcs 高表达患者相对于低表达患者对治疗高度敏感,而临床病理学因素与 DNA-PKcs 的表达情况或放疗疗效没有关系,表明 DNA-PKcs 的表达可能是有效的预测放疗疗效的指标^[12]。

本研究结果显示 DNA-PKcs 的表达与年龄、性别及病灶长度无关,而与淋巴结转移呈负相关;Ku70 及 Ku80 的表达与年龄、性别、病灶长度及淋巴结转移无关。本组结果显示 DNA-PKcs 高表达组患者较低表达组患者生存期显著延长,可能与 DNA-PKcs 高表达的肿瘤细胞对放射治疗更敏感有关。我们认为 DNA-PKcs 的表达可能成为预测放射治疗疗效的一个有效指标。

参考文献:

- [1] Shikazono N, Noguchi M, Fujii K, et al. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation [J]. *J Radiat Res*, 2009, 50(1):27-36.
- [2] Spagnolo L, Rivera-Calzada A, Pearl LH, et al. Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair[J]. *Mol Cell*, 2006, 22(4):511-519.
- [3] Stracker TH, Williams BR, Petrini JH, et al. Artemis and nonhomologous end joining-independent influence of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit on chromosome stability[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(2):503-514.
- [4] Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, et al. Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity[J]. *Radiat Med*, 2007, 25(9):433-438.
- [5] 王万鹏, 宋德霸, 赵龙栓. DNA-PKcs 蛋白和 MGMT 蛋白在肝癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2010, 50(7):70-71.
- [6] 孙建华, 陶秀娟, 陈立群, 等. DNA-PKcs、p53 的表达与宫颈癌放疗敏感性及其预后的关系[J]. *大连医科大学学报*, 2008, 30(4):321-324.
- [7] 邵淑丽, 蔡昱, 王全红, 等. 葡萄糖转运体 p63 和 DNA 蛋白激酶在卵巢浆液性肿瘤中的表达及其意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(9):697-700.
- [8] 吕洋, 张洪林, 李亚卓, 等. 结直肠癌 DNA 依赖性蛋白激酶催化亚单位、p16 表达的病理意义[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(29):2025-2029.
- [9] 吴鸿雁, 余慧萍, 樊祥, 等. DNA-PKcs 表达与乳腺癌临床病理特征关系的研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(3):465-467.
- [10] Jeggo PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells [J]. *Radiat Res*, 1998, 150(5 Suppl):S80-S91.
- [11] Featherstone C, Jackson SP. DNA repair: the Nijmegen breakage syndrome protein [J]. *Curr Biol*, 1998, 8 (17):R622-R625.
- [12] Noguchi T, Shibata T, Fumoto S, et al. DNA-PKcs expression in esophageal cancer as a predictor for chemoradiation therapeutic sensitivity[J]. *Ann Surg Oncol*, 2002, 9(10):1017-1022.