

DNA 聚合酶 β 表达对食管癌放疗敏感性及预后的影响

宁召锋,李 梁,刘 霞,丁继强

(泰安市肿瘤防治院,山东 泰安 276002)

摘 要:[目的] 探讨 DNA 聚合酶 β 表达对食管癌放疗敏感性的影响及预后评估。[方法] 收集 85 例食管癌患者,根据 DNA 聚合酶 β (DNA pol β)的表达水平随机分为高表达常规分割组、高表达超分割组、低表达常规分割组和低表达超分割四组。常规分割:2Gy/f,总量 56~64Gy/28~32 次,超分割:1.3 Gy/f,2f/d,总量 56~62Gy/43~48 次。治疗中及治疗后随访,观察急性反应、晚期反应以及近期疗效、局控率及 1、3 年生存率。[结果] 四组之间放疗晚期反应肺纤维化及食管狭窄差别无统计学意义($P=0.887,0.711$);近期疗效差异无统计学意义($P=0.862$);急性反应放射性气管炎、放射性食管炎差异有意义($P=0.049,0.031$),超分割两组显著高于常规分割组;1、3 年局部控制率及生存率两组差异明显($P=0.028,0.036,0.040,0.014$)。[结论] 超分割放疗加重急性反应,DNA pol β 表达不同对放疗敏感性有影响,低表达组超分割放疗预后相对较好。

关键词:食管肿瘤;DNA 聚合酶 β ;放射疗法

中图分类号:R730.55;R735.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2016)04-0305-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2016.04.B011

The Influence of DNA Polymerase Beta Expression on the Susceptibility to Esophageal Cancer Radiation Therapy and Prognosis

NING Zhao-feng, LI Liang, LIU Xia, et al.

(Tai'an Tumor Hospital, Tai'an 276002, China)

Abstract: [Objective] To explore the influence of DNA polymerase beta expression on the susceptibility to esophageal cancer radiotherapy and prognostic. [Methods] A total of 85 patients were divided into four groups according to the expression of pol β : high expression of conventional segmentation group, high expression of hyperfractionation groups, lower expression of conventional segmentation group and lower expression of hyperfractionation group. Conventional fractionation group: 2Gy/f, D_T 56~64Gy/28~32f. Hyperfractionated group: 1.3Gy/f, 2f/d, D_T 56~62Gy/43~48f. The acute reaction, late effects, short-term effects, local control rate and 1-, 3-year survival rate were observed. [Results] Late radiation pulmonary fibrosis and esophageal stenosis had no significant difference in the 4 groups ($P=0.887, 0.711$). The recent curative effect had no significant difference ($P=0.862$). Acute radioactive reaction tracheitis, radioactive esophagitis had significant difference ($P=0.049, 0.031$). 1-, 3-year local control and survival rate had obvious difference ($P=0.028, 0.036, 0.040, 0.036$). [Conclusion] Super segmentation radiation might increase acute reaction. Different expression of DNA pol beta may affect sensitivity to radiotherapy. Ultra low expression group divided radiotherapy has a better prognosis.

Subject words: esophageal neoplasms; DNA pol β ; radiotherapy

DNA 聚合酶 β (DNA pol β)是人的 5 种主要 DNA 聚合酶之一,其分子量最小(39kD),是碱基切除修复

(base excision repair, BER)系统中的核心成分,广泛存在于动物细胞的核内,参与 DNA 氧化损伤的修复^[1],在抵御紫外辐射、烷化剂和氧化应激等导致的 DNA 损伤中起着重要的作用^[2],而广泛应用于各种恶性肿瘤的放射治疗,其机理可能是射线诱导细胞产生活性氧,进而导致肿瘤细胞 DNA 氧化损伤,DNA 分

基金项目:山东省泰安市科技发展专项计划(201440774-43B)

通讯作者:丁继强,科主任,副主任医师,学士;泰安市肿瘤防治院放疗四科,山东省泰安市泰东路 262 号(276002);E-mail: taishandjq@163.com

收稿日期:2015-10-27; **修回日期:**2015-11-27

子出现碱基修饰或 DNA 单/双链断裂^[3],最终引起肿瘤细胞的死亡^[4,5]。polβ 的过高表达在引起细胞自身突变率增加、遗传不稳定性的发生,还可能参与了肿瘤细胞的损伤修复、增殖并同时导致某些肿瘤对放/化疗耐受性提高,复发几率增加^[1-3]。因此本研究拟通过配对比较,分析探讨 DNA polβ 高低不同表达是否影响食管癌放疗敏感性,为食管癌放疗敏感性预测提供新的依据。

1 资料与方法

1.1 纳入标准

①所有患者均经病理证实,在泰安市肿瘤防治院接受首程治疗,拒绝手术要求根治放疗;②有全面影像学检查资料,确定病变分期为 I ~ III 期;③不合并第二原发肿瘤及放疗禁忌证(出血、穿孔、严重心肺功能障碍),KPS≥70 分。

1.2 一般资料

从 2009 年 1 月至 2011 年 9 月新收治确诊食管癌患者 85 例,分期标准参见 1997 年 UICC 食管癌国际 TNM 分期标准,其中男性 48 例,女性 37 例,年龄 48~67 岁,中位年龄 58.6 岁,均经病理学证实为食管鳞癌;均为初治患者;无严重放疗禁忌证。胃镜新鲜病理组织行 polβ 基因 PCR 扩增,定性分析,其后分为高表达、低表达两组,患者再随机分行常规分割 (2Gy/f) 和超分割 (1.3Gy/f,2f/d),即高表达常规分割、高表达超分割、低表达常规分割和低表达超分割,均为单纯放疗。4 组一般临资料比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)(Table 1)。

1.3 polβ 基因检测方法、分组标准及主要试剂

食管癌组织 polβ 表达检测方法 & 表达高低定性参见文献^[6,7],主要器材:Trizol 试剂 (QI-AGEN 公司);AMV、Taq 酶、dNTP (美国 Promega 公司);PCR 仪 (德国 Peqlab 公司);PCR Marker(DL2000)(上海凯斯泰尔生物科技有限公司)、凝胶自动成像仪、水浴式电转印槽、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);高速台式离心机、高速冷冻离心机 (湖南湘立科学仪器厂家);隔水式恒温培养箱(上海精宏有限公司);稳压恒流电泳仪(北京市六一仪器厂);β-actin 引物(上

海宝莱生物科技技术有限公司),polβ 引物上游:5'-TGGGTGTTTGCCAGCTTCCC-3',下游:5'-CTCC-CAAGGGACGGATGCTG-3'。β-actin 引物上游:5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游:5'-CTCCT-TAATGTCACGCACGATTTC-3'(Figure 1)。

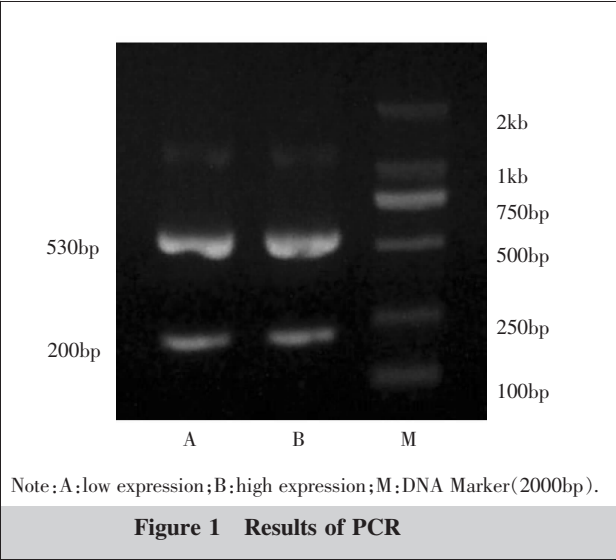


Table 1 The clinical data of 4 groups

Factors	HECS group (22)	HEH group (18)	LECS group (24)	LEH group (21)
Sex				
Male	13	10	13	12
Female	9	8	11	9
Age(years)				
<50	2	1	2	2
50~60	8	10	12	1
>60	12	7	10	9
Disease region				
Upper thoracic	5	6	9	7
Middle thoracic	10	9	11	9
Lower thoracic	7	3	4	5
Lesion length (cm)				
≤3	7	9	7	5
3~7	12	6	10	9
≥7	3	3	7	7
Parting				
Medullary type	14	10	13	11
Fungating type	3	6	5	8
Ulcerative type	5	2	6	2
Clinical stages				
I	3	4	5	2
II	9	8	10	9
III	10	6	9	9
Total	22	18	24	21

1.4 治疗方法

行强化 CT 模拟定位,在 TPS 工作站行靶区勾画。肿瘤靶区(GTV):食管壁厚度>0.5cm 或不含气腔的管壁直径>1.0cm,及肿大淋巴结,纵隔淋巴结阳性标准为短径 ≥ 1.0 cm,特殊部位如食管旁、气管食管沟等淋巴结标准为短径 ≥ 0.5 cm,并参考食管钡剂造影;临床靶区(CTV):GTV 头脚方向各外扩 2cm,前后左右方向各扩 0.8cm,解剖屏障适当修正;计划靶区(PTV):CTV 头脚方向外扩 1cm,前后左右扩 0.5cm。具体给量如下:常规放疗组:从治疗开始 D_T 2.0Gy/f,5f/w,照射 25f,D_T 50Gy;缩野后继行原方案照射,总量 56~64Gy/28~32 次,中位剂量 60Gy,6~7 周完成;超分割放疗组:从治疗开始 1.3Gy/f,2f/d,10f/W,照射 30 次 D_T 39Gy 后缩野继续上述分割方式治疗,总量 56~62Gy/43~48 次,中位剂量 60Gy,4~5 周完成。要求 PTV95%体积接受>100%的处方剂量照射,全肺 V₂₀ $\leq 27\%$,V₅ $\leq 70\%$,肺平均剂量<17Gy,心脏平均剂量 ≤ 30 Gy,脊髓最大剂量<44Gy。

1.5 评价指标

疗效评价:治疗期间每周记录急性反应和肿瘤的消退情况。放射治疗过程中以及放射治疗后每 2~3 个月,进行全身一般情况、主客观症状以及原发灶影像学改变的评估。对放射性反应进行动态观察,包括:①近期疗效(<3 个月):肿瘤消退、症状改善、食管腔狭窄改善情况;②急性放射毒副反应(<3 个月):急性反应及并发症;③远期疗效(>6 个月):长期局部控制率和生存率,晚期放射损伤。治疗中及结束后以钡餐检查和 CT 评价治疗中评价及近期疗效。以 1980 年郑州会议讨论的四级分类法作为钡餐评价标准;近期疗效参照实体瘤治疗疗效评价标准 RECIST1.1 版进行评价;正常组织急性反应按 RTOG 急性放射损伤分级标准评价;晚期反应按 RTOG/EORTG 晚期放射损伤分级方案客观评价。随访时间自放疗结束日开始计算,随访截止 2014 年 10 月 20 日,中位随访期 27 个月(6~40 个月),随访率为 100%。

1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件包,生存率计算用 Kaplan-Meier 法,差异显著性采用 Log-rank 检验,各组之间生存率及年龄比较采用 χ^2 检验及 Fisher 确切概率法,以 P<0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放疗不良反应

通过治疗中及治疗后观察对比,急性放射性反应(气管炎及食管炎)4 组差异明显,低表达超分割>高表达超分割>低表达常规分割>高表达常规分割(Table 2)。晚期反应(肺纤维化及食管狭窄)无显著差异(Table 3)。

Table 2 Acute radiation injury in 4 groups

Groups	N	Radiation bronchitis			Radiation esophagitis		
		I	II	III	I	II	III
HECS group	22	10	8	4	10	8	4
HEH group	18	2	8	8	2	5	11
LECS group	24	11	10	3	4	9	11
LEH group	21	4	8	9	2	8	11
χ^2			12.634			13.869	
P			0.049			0.031	

Note:Acute radiation reaction (radioactive bronchitis,radioactive esophagitis) had statistically significant difference between the four groups.

Table 3 Late response distribution in 4 groups

Groups	N	Pulmonary fibrosis		Esophageal stenosis	
		I	II	II	III
HECS group	22	3	2	1	0
HEH group	18	6	8	5	1
LECS group	24	2	1	2	1
LEH group	21	7	4	6	2
χ^2		0.643		1.376	
P		0.887		0.711	

Note:Late response (pulmonary fibrosis,esophageal fibrosis) had no significant differences between the four groups.

2.2 各组近期疗效与生存率

近期疗效差异无统计学意义,依据比例显示低表达超分割组略高于其他 3 组(Table 4);1、3 年局部控制及生存率差异明显,低表达超分割组>低表达常规分割组>高表达超分割组>高表达常规分割组(Table 5)。

3 讨论

我国是食管癌高发国家,全世界约 50%的病例发生在中国。在我国,食管癌死亡占全部恶性肿瘤死亡的 16.05%,高居第 4 位,且发病率逐年上升,处于第 5 位^[7]。其发生发展呈多因素多阶段过程,肿瘤易

Table 4 Evaluation of curative effect in the 4 groups

Groups	N	CR	PR	SD	PD	CR+PR(%)
HECS group	22	3	12	5	2	68.2
HEH group	18	4	9	4	1	72.2
LECS group	24	3	15	5	1	75.0
LEH group	21	7	11	2	1	85.7
χ^2						1.048
P						0.862

Table 5 Survival analysis of the 4 groups

Groups	N	Local tumor control rate(%)		Survival rate (%)	
		1-year	3-year	1-year	3-year
HECS group	22	65.6	52.2	54.2	37.5
HEH group	18	66.2	57.6	57.6	38.4
LECS group	24	68.2	57.6	63.6	45.4
LEH group	21	85.3	69.2	69.2	53.8
χ^2		12.713	6.981	7.435	15.691
P		0.028	0.036	0.040	0.014

感性多涉及基因位点和单倍体变异，与细胞周期调控、DNA 损伤修复等因素有关^[8]。根治性放疗是现阶段非手术食管癌的主要治疗手段之一。施学辉等^[9]开展后期加速超分割放疗(CAHF)技术应用在食管癌，将食管癌的 5 年生存率从常规分割的 4%~17% 提高到 30% 左右，并经多家医院的重复验证^[9-11]，但放射治疗失败的主要原因仍多为局部复发或未控，占全部失败的 60%~80%^[12,13]，这就意味着局控率的提高才能带来生存获益。相同的治疗方法得到的局控率并不相同，提示治疗存在个体化差异。

DNA pol β 是哺乳动物细胞内主要的碱基切除修复酶，参与 DNA 损伤的修复，正常情况下在体内呈低表达，而高表达或结构异常可引起修复功能障碍，造成突变基因的积累，导致肿瘤的发生。有研究报道在胃癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤中存在 pol 基因异常^[14-17]。其中赵四敏等^[16]报道食管癌组织中 DNA pol β 的突变率达 36%。

本实验结果显示，不良反应方面 2 个超分割组的急性放射治疗副反应明显高于常规分割组。其主要表现为急性放射性食管炎（尤其是Ⅲ度严重的急性食管炎明显增多），反应高峰时间提前至放射治疗开始后第 3 周。4 组放射治疗晚期损伤主要表现为放射性肺纤维化、放射性食管狭窄，差异均无明显统计学意义。本研究资料初步提示超分割组的晚期放

射损伤略高于常规组，但病例数较少，有无临床意义值得进一步观察比较。

疗效方面显示，第一，DNA pol β 高表达组与低表达组对比 1、3 年局控率及生存率，显示高表达组不论采用何种分割模式其局控率和生存率均低于低表达组($P<0.05$)。董子明、李玉林、蔡建明及刘瑾等多次提及关于 DNA pol β 高表达与辐射抗拒性相关报道^[18-21]，考虑可能与此相关。第二，DNA pol β 高表达常规组和高表达超分割组相比较，1、3 年局控率、生存率差异亦有统计学意义，对比发现 DNA pol β 高表达采用超分割放疗可部分提高局控率，有研究表明，当细胞受到 γ 射线照射或大剂量甲基硝基亚硝基肌(MNNG)等物质的诱导时，pol β 会出现暂时性表达增强^[22]，肿瘤细胞能加快修复及补偿性的加速再增殖，使控制率降低。而加速超分割可一定范围内抑制肿瘤加速增殖。对比两者的远处转移，未见明显差异，可能与其他原因相关。第三，DNA pol β 低表达常规组和低表达超分割组与文献比较，后组远地转移率增加，这可能由于：①局部控制率的改善，生存期的延长，有可能发现更多的肿瘤远地转移病灶；②超分割组治疗强度较大有可能加重破坏患者免疫功能，导致肿瘤远地转移率增加。这提示在运用超分割放射治疗提高局部控制率、改善生存率的同时，适当应用化疗有可能减少远地转移，进一步提高生存率。

本研究结果显示，DNA pol β 高表达患者疗效明显降低，当高表达患者采用超分割放疗时可部分提高局控率及生存率，但总体仍低于低表达组，可能高表达组需要进一步联合其他方式。通过本研究结果对比认为应对肿瘤中该酶的生物学特性作进一步研究，或可尝试通过选择性抑制肿瘤细胞内该酶的 DNA 修复作用，提高肿瘤的放/化疗效果。

参考文献：

[1] Dunne AL,Price ME,Mothersill C,et al. Relationship between clonogenic radiosensitivity,radiation-inducedapoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells[J]. Br J Cancer,2003,89(12):227-228.

[2] Preston RJ. Rediation biology:concepts for radiationprotection[J]. Health Physics,2004,87(1):3-14.

[3] Valko M,Izakovic M,Mazur M,et al. Role of oxygen radicalsin DNA damage and cancer incidence[J]. Mol Cell Biol Chem,2004,266(2):37-56.

- [4] Yoshimura M, Kohzaki M, Nakamura J, et al. Vertebrate POL Q and POL beta cooperate in base excision repair of oxidative DNA damage[J]. *Mol Cell*, 2006, 24(1): 115–125.
- [5] Fang YZ, Zheng RL. The theory and application of free radical biology[M]. 1st ed. Beijing: Beijing Science Press, 2002. 710–720. [方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 第1版. 北京: 北京科学出版社, 2002. 710–720.]
- [6] Dong ZM, Zheng NG, Wu JL, et al. Difference in expression level and localization of DNA polymerase β among human esophageal cancer focus, adjacent and corresponding normal tissues[J]. *Dis Esophagus*, 2006, 19(3): 172–176.
- [7] Dai M, Ren JS, Li N, et al. Estimation and prediction on cancer related incidence and mortality in China, 2008[J]. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*, 2012, 33: 57–61.
- [8] Wang T. DNA polymerase gene expression in esophageal cancer and β [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2004. [王涛. DNA 聚合酶 β 基因在食管癌中的表达及意义[D]. 郑州: 郑州大学, 2004.]
- [9] Shi XH, Wu GD, Liu XW, et al. Long term results of late course accelerated fractionation radiotherapy for esophageal carcinoma[J]. *Chinese Journal of Radiation Oncology*, 1997, 6(1): 12–15. [施学辉, 吴招娣, 刘新伟, 等. 后期加速超分割放射治疗食管癌的长期疗效[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 1997, 6(1): 12–15.]
- [10] Zhao P. Chinese cancer registration report 2011[M]. Beijing: Military Medical Sciences, 2012. [赵平. 中国肿瘤登记年报 2011[M]. 北京: 军事医学出版社, 2012.]
- [11] Huang BT, Zhou XM, Long JP. Toll-like receptor gene polymorphism and the research progress of tumor susceptibility [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2014, 26(3): 231–233, 238. [黄标通, 周新民, 龙建平. Toll 样受体基因多态与肿瘤易感性的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2014, 26(3): 231–233, 238.]
- [12] Wang Y, Shi XH, He SQ, et al. Long-term result and prognostic analysis of accelerated hyperfractionated radiotherapy for esophageal carcinoma[J]. *Chinese Journal of Radiation Oncology*, 2003, 12(1): 4–9. [汪洋, 施学辉, 何少琴, 等. 超分割放射治疗食管癌的远期疗效和预后分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2003, 12(1): 4–9.]
- [13] Tang ZQ. Modern oncology[M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 2000. 684. [汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000. 684.]
- [14] Kato H, Nakajima M, Sasaki K. Esophageal cancer[J]. *Kyobu Geka*, 2011, 64: 776–781.
- [15] Lu W, Fu JY. The research progress of DNA polymerase beta relation with tumor [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2006, 33(12): 2344–2346. [鹿伟, 傅剑云. DNA 聚合酶 β 与肿瘤关系的研究进展[J]. 现代预防医学, 2006, 33(12): 2344–2346.]
- [16] Zhao SM, Chen XD, Zhang CJ, et al. DNA repair function of DNA polymerase β in human esophageal cancer[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2010, 18(23): 2460–2463. [赵四敏, 陈旭东, 张成娟, 等. DNA 聚合酶 β 在食管癌组织中的修复功能 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(23): 2460–2463.]
- [17] Wang L, Li W, Wang X, et al. Genetic alterations on chromosomes 3 and 9 of esophageal cancer tissues from China [J]. *Oncogene*, 1996, 12: 699.
- [18] Dong ZM, Zhao GQ, Zhao Q, et al. A study of DNA polymerase β mutation in human esophageal cancer [J]. *National Medical Journal of China*, 2002, 82: 899. [董子明, 赵国强, 赵勤, 等. 人食管癌组织中 DNA 聚合酶 β 基因突变的研究[J]. 中华医学杂志, 2002, 82: 899.]
- [19] Li YL, Wen JF, Tang JW, et al. Pathology[M]. 7nd ed. Beijing: PMPH, 2010. 89–91. [李玉林, 文继舫, 唐建武, 等. 病理学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2010. 89–91.]
- [20] Cai JM, Zheng XL, Gao JG, et al. Polymerase beta role in liver cancer cell DNA radiation damage repair[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 1996, 14(2): 96–99. [蔡建明, 郑秀龙, 高建国, 等. 聚合酶 β 在肝癌细胞 DNA 辐射损伤修复中的作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1996, 14(2): 96–99.]
- [21] Liu J, Wu JC, Zhou JD. Effects of POL I on radiosensitivity of human esophageal cancer cell line and its sensitivity to cisplatin [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing*, 2013, 33(1): 6–10. [刘瑾, 吴锦昌, 周俊东. Pol β 基因对人食管癌细胞放疗敏感性的影响 [J]. 南京医科大学学报, 2013, 33(1): 6–10.]
- [22] Cui J, Xu X, Yang M, et al. Expoloration of relationship between the expession level of DNA Polymerase β and 60 γ -ray radionsensitivity [J]. *Journal of Sichuan University*, 2011, 42(6): 745–750. [崔杰, 徐昕, 杨沫, 等. DNA 聚合酶 β 表达水平与 60Co γ 射线放射敏感性的研究[J]. 四川大学学报, 2011, 42(6): 745–750.]