

·放射生物学·

Ku 蛋白与 DNA 修复

杨青山 樊飞跃

【摘要】 电离辐射易引起 DNA 双链断裂(DSB), Ku 蛋白作为异二聚体, 主要参与非同源末端联接修复 DSB。Ku 蛋白在维持端粒结构发挥至关重要的作用。在人的不同肿瘤中, Ku 蛋白有着异常表达, 且 Ku 蛋白的表达和功能与肿瘤放疗抵抗有关。通过抑制 Ku 蛋白可增强放疗敏感性。因此, Ku 蛋白可作为放疗增敏的靶点。

【关键词】 DNA 修复; 辐射耐受性; 肿瘤

【中图分类号】 Q691

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-4114(2008)01-0040-04

Ku protein and DNA repair

YANG Qing-shan, FAN Fei-yue

(Department of Biochemical Emergency, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

【Abstract】 Ionizing radiation can cause double strand break (DSB), Ku protein as a heterologous dimer; mainly join in non-homologous end-joining repair pathway. Ku protein plays a crucial role in maintaining telomere structure. There is an abnormal expression of Ku protein in human different tumors. The expression and function of Ku protein is relate to resistance of tumor radiotherapy and chemotherapy. Inhibition of Ku protein can enhance the sensitivity of radiotherapy and chemotherapy. Therefore, Ku protein can be used as target of enhancement of radiotherapy and chemotherapy.

【Key words】 DNA repair; Radiation tolerance; Neoplasm

电离辐射与日常生活密切相关, 常引起 DNA 损伤, 其中 DNA 双链断裂(double strand break, DSB)是最致命的。机体有两种主要的 DSB 修复途径, 即同源重组(homology recombination, HR)修复和非同源末端联接(non-homologous end-joining, NHEJ)修复, 而后者更为重要。Ku 蛋白作为 NHEJ 的重要成员之一, 在 DNA 损伤修复中起着重要作用。

1 Ku 蛋白的结构与定位

Ku 蛋白是异二聚体, 由 Ku70 和 Ku80 两个亚单位构成, 广泛存在于哺乳动物细胞内。最初作为一种自身抗原在硬皮病患者中被发现, 它的命名来自于第一位患者名字的前两个字母^[1]。通过原子力显微镜和晶体衍射显示, 二者虽然仅有 22% 序列相同、38% 序列相似, 但来源于同一个祖先, 每个亚单位结构都由三个结构域构成, 即 N 末端的 α/β 结构域、中央的 β 筒状结构域和 C 末端的螺旋结

构域。N 末端结构域可招募其他蛋白质形成 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)复合体; 中央结构域是 DNA 结合部分, 可以非特异性结合 DNA 的糖链-磷酸骨架; 而 C 末端结构域则更为重要, 150 个氨基酸残基形成 Ku70/Ku80 二聚体和具有结合及调控 DNA-PK 催化亚基(DNA-PK catalytic subunit, DNA-PKcs)的功能。

Ku 蛋白主要分布在细胞核内, 参与并调控细胞内的多种功能。同时, 也存在于胞质中。近年来发现, Ku 蛋白可存在于许多肿瘤细胞的表面, 并证实了细胞表面的 Ku 蛋白可以作为一种细胞间黏附分子参与细胞间的相互作用。

2 Ku 蛋白的功能

2.1 Ku 蛋白在 NHEJ 修复中的作用

由于生物体本身基因的完整性极易遭受外界环境因素的影响, 如辐射的伤害或是一些化学试剂的破坏, 都会造成 DSB。在哺乳细胞中 NHEJ 修复 DSB 是更为重要的。目前认为: NHEJ 修复途径至少有六种核心因子参与, 即 Ku 蛋白异二聚体

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所生化应急室

通讯作者: 杨青山 (E-mail: yqsl11@yahoo.com.cn)

(Ku70 和 Ku80)、DNA-PKcs、DNA-PK、X 射线修复交叉互补基因4和连接酶IV。此外,最近还发现 Artemis 也参与 NHEJ 修复过程^[2]。具体过程是:首先 2 个 Ku 蛋白分子(Ku70 和 Ku80)分别识别并结合到 DSB 末端,然后此复合物招集DNA-PKcs 到损伤部位与之结合并激活其激酶活性,同时也招集其他蛋白质参与 DNA 修复,最后 DNA 断裂末端通过相互独立的结合位点或相互作用由 X 射线修复交叉互补基因 4-连接酶IV 复合体完成连接。在连接之前,DNA-PK 发生自身磷酸化,使 DNA-PKcs 和 Ku 蛋白异二聚体从 DNA 链解离下来,进行下一个 NHEJ 修复过程。一些 DSB 可以直接相连,而有些 DSB 不能直接相连,它可以通过 Artemis 修饰加工而间接相连。

2.2 Ku 蛋白与端粒

与 NHEJ 作用不同,Ku 蛋白在保护端粒末端不受核酸酶的攻击的同时,也避免了两个端粒末端的错误融合,这对维持染色体的稳定性发挥着重要作用;另外,Ku 蛋白异二聚体结合在端粒的末端是非依赖于 DNA-PKcs 的,因此认为 Ku 蛋白调控端粒长度与参与 NHEJ 修复是两个独立的过程。Ku 蛋白具有维持端粒长度的作用最初是在酵母中发现的,当有 Ku 蛋白亚单位缺陷时显示出端粒缩短(60%端粒的重复序列丢失)。在真核细胞中,缺失 Ku70 的鼠细胞和缺失 Ku80 的人细胞都显示出端粒的缩短。另外,在酵母细胞中端粒还可以抑制临近基因的表达,被称为端粒沉默或端粒位置效应。近来研究又显示一些相反结果,当小鼠缺失 Ku80 时不表现为端粒缩短,且有人认为 Ku80 是端粒酶介导端粒延长的负调节因子^[3]。这一矛盾有待于进一步研究。

除此之外,Ku 蛋白也参与其他生命活动,如抗凋亡作用、调控特定基因转录、调控热休克诱导反应及参与细胞周期 G₂/M 期的阻滞等;另外,分布在细胞膜上的 Ku 蛋白介导肿瘤细胞与纤维结合蛋白的结合以及细胞与细胞间的相互作用。

3 Ku 蛋白与肿瘤的发生和治疗

现代医学认为,肿瘤是一种基因病,癌变组织存在基因表达或 DNA 结构的缺陷或变异。当 DNA 受到有害损伤造成 DSB 时,如未修复或修复不完全,则可引起细胞死亡或诱导染色体异常。DSB

修复缺陷的细胞有很高的基因转座的倾向性,而且也能引起基因扩增,这些因素均可导致细胞自稳态紊乱。基因转座和扩增能引起原癌基因激活,也是细胞转化和肿瘤形成的主要机制。近年来,Ku 蛋白在肿瘤的发生、发展、治疗和预后等方面的研究正受到广泛的重视。

3.1 Ku 蛋白在肿瘤组织内的异常表达

Rigas 等^[4]用免疫组化的方法检测正常结肠组织、结肠腺瘤及结肠癌组织发现,结肠腺瘤中 Ku70 和 Ku80 水平只有结肠癌的 1/3~1/2 水平,但两者均较正常结肠组织低。Korabiowska 等^[5]也报道,结肠肿瘤中 Ku70/Ku80 表达下调,且与病理分期有关,并在遗传性结肠肿瘤中更多见。然而 Hosoi 等^[6]观察了 12 例结肠癌患者,结果显示肿瘤组织内的 DNA-PK 活性和 Ku 蛋白的 mRNA 表达都明显高于周围的正常组织,且与转录因子 Sp1 启动子区域的识别因子有高度的一致性,因此考虑 DNA-PK 活性和 Ku 蛋白的 mRNA 表达的增高与肿瘤组织内转录因子 Sp1 蛋白升高有关。Tonotsuka 等^[7]研究 13 例食管癌患者发现,肿瘤组织较正常黏膜组织有高水平 Ku70、Ku80 蛋白表达和 DNA-PK 活性增强。Chen 等^[8]通过竞争性逆转录-聚合酶链反应研究发现,成人、儿童的急性和慢性恶性淋巴瘤细胞中 Ku80 平均表达水平都比对照组增高。Lim 等^[9]报道,胃肠道肿瘤患者有 Ku70、Ku80 水平高表达。Gaymes 等^[10]发现,Ku 蛋白活性异常可引起 NHEJ 系统过度活跃,是导致人类髓细胞性白血病染色体不稳定的原因。Korabiowska 等^[11]研究 29 例口腔恶性黑色素瘤患者发现,Ku 蛋白表达水平降低及 Ku70/Ku80 相关性缺失与口腔恶性黑色素瘤的发生及病程进展有关。Tai 等^[12]发现,多发性骨髓瘤的发生可能与细胞内 Ku 蛋白表达的改变有关,其 Ku80 异常蛋白 Ku86v 表达增多,降低了 Ku 与 DNA 末端结合能力,从而导致基因组不稳定及肿瘤的发生。

3.2 Ku 蛋白与放化疗抵抗

目前,放射治疗已成为恶性肿瘤治疗的主要手段之一,但在放疗过程中,肿瘤细胞对射线产生抵抗是导致治疗失败的原因。通过对 DNA 修复基因的研究表明,Ku 蛋白可能是肿瘤细胞对射线产生抵抗的普遍原因,肿瘤患者 Ku 蛋白表达水平和功能与肿瘤的抵抗性呈正相关。因此,Ku 蛋白极有

可能成为一个辐射增敏治疗的新靶点。Chang 等^[13]分析 Ku 蛋白在头颈部肿瘤中的表达与辐射敏感性关系中发现, Ku80 蛋白高表达与射线抵抗呈正相关, 并且可通过 Ku 蛋白的表达判断放射治疗的疗效。通过研究 77 例宫颈癌患者放疗后 Ku 蛋白的表达水平及其生存率的关系发现, Ku 蛋白低表达的肿瘤细胞存活率较低, 对射线更敏感, 且 Ku 蛋白低表达的患者生存率也明显高于 Ku 蛋白高表达者^[14]。在儿童的急性和慢性恶性淋巴瘤细胞中发现, 高水平的 Ku80 蛋白对放疗反应较对照组差^[15]。Shintani 等^[15]对口腔鳞状细胞癌患者术前放疗的研究中发现, Ku 蛋白的表达增高及增高的量与肿瘤放射抵抗相关。

近年来的研究还发现, Ku 蛋白在体内的表达水平也同样影响到抗癌药物对肿瘤细胞的敏感性。Kim 等^[16]测定了博莱霉素、阿糖胞苷和长春新碱对 Ku70^{-/-}和 Ku80^{-/-}的小鼠细胞株的杀伤作用, 与原型细胞比较呈高度敏感性, 而过度表达人 Ku70 和 Ku80 蛋白的 R7080-6 细胞株可抵抗博莱霉素引起的凋亡, 提示 Ku 蛋白表达的下降可以增强抗癌药物对肿瘤细胞的敏感性。顺铂是临床上应用最广泛的抗肿瘤药物之一, Jensen 等^[17]发现, Ku 蛋白表达下降可增强顺铂对肿瘤细胞的杀伤作用, 其可能机制是通过顺铂-DNA 加合物的生成, 因 Ku 蛋白表达减少, 不能对其修复, 这样阻断了 DNA 的转录和复制, 使肿瘤细胞走向死亡。

由于 Ku 蛋白的表达水平以及结合 DNA 活性与肿瘤的放化疗敏感性密切相关, 因此许多学者通过各种方法抑制 Ku 蛋白的活性, 以提高肿瘤的放化疗效果。Nimura 等^[18]用小干涉 RNA 技术使 Ku80 沉默, 联合放射治疗能在体内外增强辐射敏感性, 且能抑制肺癌细胞的生长。He 等^[19]用腺病毒介导表达一种负显性 Ku70 片段, 使 Ku-DNA 末端结合活性降低, 并提高肿瘤细胞在需氧和缺氧条件下对电离辐射的敏感性。Li 等^[20]用腺病毒介导热击诱导表达的反义 Ku70 RNA 使内源性 Ku70 mRNA 表达下降, 能明显地增高转染细胞的敏感性, 同时使肿瘤细胞对电离辐射敏感。Belenkov 等^[21]用 Ku80 反义链转染未缺失 DNA-PKcs 的神经胶质瘤 MO59K 细胞系, 使 Ku80 基因表达受抑, 从而抑制 DNA-PK 的活性, 发现转染后细胞对电离辐射和抗癌药物敏感性增强, 但不能增

强同源的、缺失 DNA-PKcs 的 MO59J 细胞系的敏感性。张捷等^[22]将反义 Ku70/Ku80 基因导入人肺腺癌细胞中, 封闭了肿瘤细胞的正义 Ku70/Ku80 蛋白表达, 发现人肺腺癌细胞对放射线的敏感性明显增强, 为提高肿瘤放疗的特异性和靶向基因治疗奠定了基础。

综上所述, Ku 蛋白在放射医学领域引起了极大的关注, 随着对 Ku 蛋白的研究不断深入, 其可作为放射增敏的靶点, 在指导临床放射治疗有着光明的前景。

参 考 文 献

- [1] Mimori T, Akizuki M. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap[J]. Clin Invest, 1981, 68(3): 611-620.
- [2] Thacker J, Zdzienicka MZ. The XRCC genes: expanding roles in DNA double-strand break repair[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3 (8-9): 1081-1090.
- [3] Espejel S, Frannco S, Rodriguez-Perales S, et al. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptostis caused by critically short teloneres[J]. EMBO J, 2002(21): 2207-2219.
- [4] Rigas B, Borgo S, Elhosseiny A. Dexeased expression of DNA dependent protein kinase, a DNA repair protein, during human colon carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2001, 61(23): 8381-8384.
- [5] Korbiowska M, Cordon-Cardo C, Schinagl M, et al. Loss of Ku70/ Ku80 expression occurs more frequently in hereditary than in sporadic colorectal tumors. Tissue micro array study[J]. Hum Pathol, 2006, 37(4): 448-452.
- [6] Hosoi Y, Watanabe T. Up-regulation of DNA- dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer[J]. Int J Oncol, 2004, 25(2): 461-468.
- [7] Tonotsuka N, Hosoi Y, Miyazaki S, et al. Heterogeneous expression of DNA-dependent protein kinase in esophageal cancer and normal epithelium[J]. Int J Mol Med, 2006, 18(3): 441-447.
- [8] Chen TY, Chen JS, Su WC, et al. Expression of DNA repair gene Ku80 in lymphoid neoplasm[J]. Eur J Haematol, 2005, 74 (6): 481-488.
- [9] Lim JW, Kim H, Kim KH. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cell [J]. Biol Chem, 2002, 277(48): 46093-46100.
- [10] Gaymes TJ, Mufti GJ, Rassool FV. Myeloid leukemias have increased activity of the nonhomologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer[J]. Cancer Res, 2002, 62(10): 2791-2797.
- [11] Korabiowska M, Voltmann J, honig JF, et al. Altered expression of DNA double-strand repair genes Ku70 and Ku80 in carcinomas of the oral cavity[J]. Anticancer Res, 2006, 26(3A): 2101-2105.

- [12] Tai YT, Teoh G, Lin B, et al. Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sensitivity to DNA damage[J]. J Immunol, 2000, 165(11): 6347-6355.
- [13] Chang HW, Kim SY, Yi SL, et al. Expression of Ku80 correlates with sensitivities to radiation in cancer cell lines of the head and neck[J]. Oral Oncol, 2006, 42(10): 979-986.
- [14] Wilson CR, Davidson SE, Margison GP. Expression pattern of ku correlates with survival in carcinoma of the cervix[J]. Br J Cancer, 2000, 83(12): 1702-1706.
- [15] Shintani S, Mihara M, Li C, et al. Up-regulation of DNA-dependent protein kinase correlates with radiation resistance in oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Sci, 2003, 94(10): 894-900.
- [16] Kim SH, Kim D, Han JS. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1999, 59(16): 4012-4017.
- [17] Jensen R, Glazer PM. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/ DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(16): 6134-6139.
- [18] Nimura Y, Kawata T, Uzawa K, et al. Silencing Ku80 using small interfering RNA enhanced radiation sensitivity in vitro and in vivo. Int J Oncol, 2007, 30(6): 1477-1484.
- [19] He F, Li L, Kim D, et al. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative Ku70 fragment radiosensitizes human tumor cells under aerobic and hypoxic conditions [J]. Cancer Res, 2007, 67(2): 634-642.
- [20] Li GC, He F, Shao X, et al. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells in vitro and in vivo [J]. Cancer Res 2003, 63(12): 3268-3274.
- [21] Belenkov AI, Paiement JP, Panasci LC, et al. An antisense oligonucleotide targeted to human Ku86 messenger RNA sensitizes M059K malignant glioma cells to ionizing radiation, bleomycin, and etoposide but not DNA cross-linking agents [J]. Cancer Res, 2002, 62(20): 5888-5896.
- [22] 张捷, 杨贵贞, 大森繁成, 等. 反义 Ku80 在人肺癌细胞的表达及对放射线的敏感性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(10): 694-696.

(收稿日期:2007-09-10)

恶性肿瘤的放射治疗联合基因治疗研究进展

田玥 苏成海

【摘要】放射治疗是恶性肿瘤治疗的常规手段之一,并早已用于临床。而基因治疗是一种新型的治疗方法,但由于肿瘤的形成是多因素、多基因参与的复杂过程,单纯基因治疗的效果并不理想。因此,放射治疗联合基因治疗是目前的研究热点,也将成为肿瘤治疗研究的重要方向之一。

【关键词】放射疗法;基因疗法;肿瘤治疗方案

【中图分类号】 R730.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-4114(2008)01-0043-04

Advancement of researches on the malignant tumor radio-genetic therapy

TIAN Yue, SU Cheng-hai

(Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China)

【Abstract】 Radiotherapy is one of the routine methods of malignant tumor treatment and used in clinical many years, while gene therapy is one of the new therapy. But the formation of tumor is the complicated process effected by many factors and many genes. The effect of polygene therapy is not ideal. Therefore, radio-genetic therapy is the hot spot of the present study and will become one of the important direction of cancer therapy.

【Key words】 Radiotherapy; Gene therapy; Antineoplastic protocols

放射治疗是肿瘤治疗的常规手段之一,70%~80%的恶性肿瘤患者在治疗过程中需接受放射治疗。肿瘤对辐射不敏感或对辐射产生抗拒性,是放

射治疗难以根治恶性肿瘤的主要原因之一。近年来,随着对肿瘤发病分子机制及细胞生长调控机理研究的深入,肿瘤基因治疗已取得一些令人振奋的成果^[1],但针对单一环节的转基因治疗常常不能达到令人满意的治疗效果。Weichselbaum等^[2]于