

·放射生物学·

Ku 蛋白在肿瘤发生中的作用及其靶向抑制策略

任振义 金一尊

【摘要】 Ku 蛋白参与辐射诱导的 DNA 损伤修复, 严重影响着肿瘤细胞的辐射敏感性。细胞内 Ku 蛋白异常表达与肿瘤发生和发展存在密切关系。目前, 研究者试图抑制 Ku 蛋白表达来增强肿瘤细胞的辐射敏感性, 为进一步靶向治疗奠定基础。

【关键词】 DNA 双链断裂; DNA 修复; 肿瘤; 辐射耐受性

The role of Ku protein in the development of carcinogenesis and potential strategy for silencing itREN Zhen-yi¹, JIN Yi-zun²

(1. Department of Respiratory Medicine, First Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China; 2. Research Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 The vital role of Ku protein is implement for DNA double strand break repair. Abnormal expression of Ku protein contributes to the development of carcinogenesis. The scientist are trying to enhance radiation-induced tumor control by inhibiting the Ku protein and have shown promising results.

【Key words】 DNA double strand break; DNA repair; Neoplasms; Radiation tolerance

Ku 蛋白在真核细胞内以异源二聚体复合物形式存在, 由分子质量分别为 70×10^3 和 80×10^3 的蛋白质亚基组成, 故分别称为 Ku70 和 Ku80。Ku 蛋白与 DNA 依赖蛋白激酶催化亚基 (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) 共同组成 DNA 依赖蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK), 在 DNA 双链断裂 (double strand break, DSB) 修复中起着重要作用。研究表明, 细胞 Ku 蛋白的存在对维持基因组稳定、提高细胞及机体的活力、维持端粒稳定、抗原受体基因组合 (即 V(D)J 重组)、调整特定基因转录和凋亡、调节热休克诱导反应及细胞周期具有重要作用。现就 Ku 蛋白的 DNA 损伤修复功能、在肿瘤发生中的作用及如何抑制 Ku 基因表达暨靶向治疗的研究进行综述。

1 Ku 蛋白对 DNA DSB 的修复功能

Ku70-Ku80 异源二聚体化是稳定每一个 Ku 蛋白亚基及调节 Ku 蛋白功能 (包括 DNA-PK 活化) 所必需的。缺乏异源二聚体化导致其他稳定状态的

Ku 蛋白亚基的数量显著减少^[1]。这提示至少需要二个步骤调节 Ku 蛋白的稳定性: ① 形成异源二聚体, 且免于被降解; ② Ku 蛋白同源二聚体和单体的降解。虽然目前已经观察到 Ku70 和 Ku80 单体在某些细胞内蓄积, 但其具体机制尚不明确^[2]。

真核细胞对 DNA 的 DSB 修复有两条途径——同源重组 (homologous recombination, HR) 修复和非同源末端连接 (non-homologous end-joining, NHEJ) 修复。早期研究表明, Ku 蛋白是这两条修复途径的主要蛋白质。如果细胞对 DNA 修复失败, 则会导致基因组不稳定、对 DNA 损伤敏感性增加、免疫缺陷和肿瘤易感性增加。Ku80 缺失细胞提取物 NHEJ 修复活性明显下降, 碱基对相互作用的精确性下降。由于在所有多细胞真核细胞的 DSB 的修复中 NHEJ 修复起主导作用, Ku 蛋白对于维持这些细胞基因组稳定及肿瘤细胞的增殖是必需的^[3-4]。

在 DNA 修复过程中, Ku70-Ku80 异源二聚体的各亚单位分子间桥梁产生的孔道使 DNA 形成螺旋状。Ku70-Ku80 异源二聚体本身不能进行 DNA 修复, 但可以调整 DNA-PKcs 的活性来完成这一功能。这样, DNA-PKcs 和 Ku70-Ku80 异源二聚体组成了 DNA 修复同功酶复合体, 称为 DNA-PK^[5]。Ku 蛋白可以使 DNA-PKcs 与 DNA 末端的亲和力增

基金项目: 1. 卫生部科研基金(wkj2005-2-051); 2. 杭州市科技局资助项目(20080333B10)

作者单位: 1. 310006, 杭州市第一人民医院呼吸内科(任振义); 2. 200032 上海, 复旦大学放射医学研究所(金一尊)

通信作者: 任振义(E-mail: huxike123@yahoo.com.cn)

加 100 倍, 促进 DNA-PKcs 高效结合, 进而进行 DNA 修复。在 DNA 修复过程中 Ku 蛋白就像一把钳子, 使 DNA 末端紧紧挟住靠在一起, 还以同样的方式促进 DNA 连接物和 X 射线修复交叉互补基因 4 的修复功能。

2 Ku 蛋白与肿瘤发生的关系

由于染色体 DNA 的损伤, 哺乳类基因组经常存在突变的风险。DSB 是其中的一种 DNA 损伤, 如果得不到修复则导致细胞死亡或染色体异常。缺乏 DSB 修复的细胞容易发生 DNA 易位, DSB 也可以启动基因扩增, 使得维持细胞自稳态的重要因子失去平衡, 容易使癌基因活化, 后者是发生癌症的主要机制。哺乳类细胞 DNA 修复依靠 HR 和 NHEJ, 如果修复失败则可引起严重的基因组不稳定、免疫缺陷或肿瘤易感性增加^[6]。

肿瘤易感性基因可以分成两类, 即看管基因 (caretaker) 和守门基因 (gatekeeper)。看管基因负责 DNA 修复, 全部灭活可以导致基因组不稳定, 而守门基因控制细胞凋亡和增殖。上述两种基因功能缺失则肿瘤易感性增加^[7]。Ku80 基因和 p53 基因是一对典型的看管基因和守门基因, 其功能密切相关。Ku80 基因是一个防御基因, 通过抑制染色体重组维持基因组的稳定性。缺失 Ku80 基因小鼠, 断裂、易位、非整倍性等染色体异常显著增加, 表现出迟发肿瘤反应^[8]。同时缺失 p53 基因和 Ku80 基因则可促进肿瘤发生, 早期就可以发生肿瘤如 B 细胞淋巴瘤。Ramiro 等^[9] 对 p53 和 X 射线修复交叉互补基因 4 双剔除小鼠研究发现, Ku80 基因参与 NHEJ 对维持正常基因组稳定性和抑制肿瘤非常重要。在 p53 阴性时如果存在 X 射线修复交叉互补基因 4 或 Ku80 基因缺失, 则引起免疫球蛋白重链位点和 c-myc 基因易位, 最终发生 B 细胞淋巴瘤, 这也说明当 DNA 修复功能异常时, V(D)J 重组过程对淋巴细胞发育和淋巴瘤的发生具有重要作用。

Ku 蛋白表达增多也可引起肿瘤发生。胃癌细胞过度增生可伴有 Ku70、Ku80 基因高表达及核内高活性, 这种高表达依赖环氧化酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 机制。COX-2 及其产物前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 减少细胞死亡, 因而可以对肿瘤细胞增殖具有正性调节作用。另

外, PGE2 可诱导人肠癌细胞 Bcl-2 表达。慢性淋巴细胞白血病 B 细胞内抗凋亡基因 Bcl-2 和 Ku80 表达水平呈正相关, 浸润性乳腺癌细胞内 Ku70、Ku80 较正常组织表达增多。这些研究表明, COX-2 产生的 PGE2、Bcl-2、Ku 蛋白与肿瘤细胞增殖之间存在密切关系^[10]。

Gullo 等^[11] 研究还发现, 调节 Ku 蛋白表达水平可以影响热休克蛋白 70 和热休克蛋白 75 的表达。这两种蛋白通过干扰应急诱导的凋亡程序而发挥保护作用, 并通过 JNK/SAPK 信号转导途径引起对抗癌药物诱导凋亡的易感性改变。另外, CD40 配体处理的多发性骨髓瘤细胞诱导 Ku80 从细胞质到细胞膜移位。细胞膜 Ku 蛋白可介导与纤维黏连素结合, 后者对电离辐射和阿霉素诱导凋亡产生保护作用, 提示细胞膜上的 Ku 蛋白可以介导肿瘤转移。细胞膜 Ku 蛋白可存在于多种肿瘤细胞, 包括白血病和实体瘤细胞及某些细胞系, 但缺氧状态下的正常细胞不存在^[12]。

3 抑制 Ku 蛋白表达及增强肿瘤细胞辐射敏感性的研究

由于 DNA-PK 在 DSB 修复中起关键作用, DNA-PK 活性很可能作为肿瘤细胞对抗肿瘤治疗抵抗的标志物。在人慢性淋巴细胞性白血病、骨髓瘤细胞鼠白血病模型中, Ku80 表达、Ku 蛋白与 DNA 末端连接活性及 DNA-PK 活性增加了这些肿瘤细胞对放、化疗的耐受性。曾经设想肿瘤细胞较正常细胞在更高的程度上依赖 DNA 修复机制, 如果 DNA 修复途径被阻断, 肿瘤细胞对某一特定 DNA 损伤的治疗会更加敏感。认识到 DNA-PK 复合物是影响辐射敏感性的重要因素后, 学者们试图抑制其中某一组份的功能来增强哺乳类细胞的辐射敏感性^[13-14]。

Li 等^[15] 以热休克蛋白 70 为启动子, 构建含有反义 Ku70 的腺病毒载体, 体外转染细胞后反义 Ku70 RNA 能够降低 Ku70 水平, 显著增加细胞的辐射敏感性; 小鼠 FSa-II 实体瘤转染反义 Ku70 RNA 后抑制实体瘤细胞 Ku70 蛋白表达, FSa-II 细胞辐射敏感性增强。

Marangoni 等^[16] 构建含有中国仓鼠 Ku80 C-末端 cDNA 片段 (925 bp) pcDNA3.1 真核细胞表达载体并成功转染到对辐射耐受的中国仓鼠卵巢 K1 细

胞内,表达出含有 Ku80 蛋白 C-末端 283 个氨基酸的多肽片段,干扰了正常 Ku80 蛋白功能,使得 Ku 蛋白的 DNA 末端结合活性下降,细胞对 γ 射线的敏感性增强。

Tai 等^[12] 研究发现, CD40 活化的多发性骨髓瘤细胞能够促使 Ku80 和 Ku70 蛋白从细胞质到细胞膜移位,保护这些细胞在受到放射线和阿霉素攻击后黏附到纤维粘连素上,并且免于凋亡。Ku 蛋白抗体能够抑制上述细胞黏附过程,恢复细胞对放射线和阿霉素的敏感性。

小干扰 RNA 能够有效沉默哺乳类细胞的基因表达,这为阻滞辐射损伤修复提供了一条新思路。Ayene 等^[17] 化学合成针对 Ku70 的双链小干扰 RNA 抑制肿瘤细胞 Ku70 蛋白表达,可以使 HeLa 细胞 Ku70 蛋白表达下降 70%,射线照射后细胞存活率下降,辐射敏感性增强。使用 RNA 干扰技术同样对 HCT116 细胞研究表明,抑制 Ku70 蛋白表达可以增加细胞辐射敏感性和化疗敏感性。Negroni 等^[18] 通过小干扰 RNA 机制使 RT112 细胞系 Ku80 蛋白表达减少 75%,DNA 结合活性也有相应的下降,经过射线照射后克隆存活率减少 65%,提示 Ku80 蛋白表达下降后辐射敏感性增强。

目前,众多研究均发现抑制 Ku 蛋白活性具有辐射增敏作用,多数还只是停留在实验研究阶段,临床应用还面临着一系列挑战。例如基因导入系统缺乏靶向性、导入效率较低、载体容量有限以及生物安全性问题等。相信随着人们对基因治疗以及对 Ku 蛋白功能及其作用机制研究的不断深入,更有效地抑制肿瘤细胞中 Ku 蛋白活性方法将会不断出现,使 Ku 基因作为一个治疗靶点成为可能,最终对肿瘤进行有效控制。

参 考 文 献

- [1] Xing J, Wu X, Vaporiyan AA, et al. Prognostic significance of staxia-telangiectasia mutated, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, and Ku heterodimeric regulatory complex 86-kD subunit expression in patients with nonsmall cell lung cancer[J]. *Cancer*, 2008, 112(12): 2756-2764.
- [2] Koike M, Koike A. Accumulation of Ku80 proteins at DNA double-strand breaks in living cells [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(5): 1061-1070.
- [3] Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice [J]. *Cell Res*, 2008, 18 (1): 134-147.
- [4] Cui X, Meek K. Linking double-stranded DNA breaks to the recombination activating gene complex directs repair to the nonhomologous end-joining pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(43): 17046-17051.
- [5] Willmore E, Elliott SL, Mainou-Fowler T, et al. DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(12): 3984-3992.
- [6] Soutoglou E, Dorn JF, Sengupta K, et al. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (6): 675-682.
- [7] Van Heemst D, den Reijer PM, Westendorp RG. Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers [J]. *Eur J Cancer*, 2007, 43(15): 2144-2152.
- [8] Gao Y, Ferguson DO, Xie W, et al. Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development [J]. *Nature*, 2000, 404 (6780): 897-900.
- [9] Ramiro AR, Jankovic M, Callen E, et al. Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocation [J]. *Nature*, 2006, 440(7080): 105-109.
- [10] 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 cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (48): 46093-46100.
- [11] Gullo C, Au M, Feng G, et al. The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1765(2): 223-234.
- [12] Tai YT, Podar K, Kraeft SK, et al. Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: functional implications [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(3): 212-220.
- [13] Jiao Y, Ge CM, Meng QH, et al. Adenovirus-mediated expression of Tob1 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(10): 1628-1636.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Marangoni E, Foray N, O'Driscoll M, et al. A Ku80 fragment with dominant negative activity imparts a radiosensitive phenotype to CHO-K1 cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(23): 4778-4782.
- [17] Ayene IS, Ford LP, Koch CJ. Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhance human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and γ radiation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(4): 529-536.
- [18] Negroni A, Stronati L, Crollino MC, et al. Radioresistance in a tumour cell line correlates with radiation inducible Ku 70/80 end-binding activity [J]. *Int J Radiat Biol*, 2008, 84(4): 265-276.