

DNA 聚合酶 Iota(Pol ι)与食管鳞癌淋巴结转移的相关性研究

孙昊尧¹, 邹士涛¹, 周俊东¹, 朱孝中², 刘 标¹, 孟星君¹, 李晓庆¹, 虞 健¹, 吴锦昌^{1*}

(¹南京医科大学附属苏州医院放疗科, 江苏 苏州 215001; ²江苏大学附属江滨医院胸外科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] **目的:**探讨 DNA 聚合酶 Iota(Pol ι)与食管鳞癌淋巴结转移的关系。**方法:**采用实时荧光定量 PCR 方法检测 Pol ι 基因在食管鳞癌组织中的表达,并使用 Mann-Whitney U 检验方法分析 Pol ι 与食管鳞癌淋巴结转移之间的关系;利用免疫组织化学染色法检测 Pol ι 及 Nm23 蛋白在食管鳞癌组织中的表达,并使用 Spearman 相关分析研究食管鳞癌中 Pol ι 与 Nm23 表达的相关性。向食管癌细胞 TE-1 和 ECA-109 转染 Pol ι 表达载体,上调细胞中 Pol ι 的表达,Realtime-PCR 检测 Pol ι 和 Nm23 mRNA 的表达水平,并通过 Transwell 侵袭实验分析细胞的侵袭能力。**结果:**在食管鳞癌临床组织标本中,Pol ι 表达与淋巴结转移相关($P < 0.01$),与 Nm23 蛋白表达呈负相关($R = -0.481, P < 0.05$)。上调 Pol ι 的表达增强了 TE-1 和 ECA-109 细胞的侵袭能力,差异有统计学意义(P 均 < 0.05),同时抑制了细胞中 Nm23 mRNA 的表达,差异有统计学意义($P < 0.001$)。**结论:**Pol ι 的表达与食管鳞癌的转移密切相关,其可能通过下调 Nm23 的表达来促进肿瘤转移。

[关键词] Pol ι ;Nm23;肿瘤转移;食管鳞癌

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)03-304-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150302

Correlation analysis between DNA polymerase Iota(Pol ι) and lymph node metastasis in human esophageal squamous carcinoma

Sun Haoyao¹, Zou Shitao¹, Zhou Jundong¹, Zhu Xiaozhong², Liu Biao¹, Meng Xingjun¹, Li Xiaoqing¹, Yu Jian¹, Wu Jinchang^{1*}

(*Department of Radiotherapy, Suzhou Hospital Affiliated to NJMU, Suzhou 215001; ²Department of Cardiothoracic Surgery, Jiangbin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China*)

[Abstract] **Objective:**To investigate relationship between DNA polymerase Iota (Pol ι) and lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:**Pol ι expression in esophageal squamous cell carcinoma tissues was detected by Real-time PCR. Mann-Whitney U test was performed to analyze the relationship between Pol ι and lymph node metastasis. Pol ι and Nm23 expression in esophageal squamous cell carcinoma tissues was detected by immunohistochemical staining. Spearman correlation analysis was performed to analyze the relationship between Pol ι and Nm23. The Pol ι expression vector was transfected into esophageal cancer cells TE-1 and ECA-109 to up-regulate Pol ι expression. Pol ι and Nm23 mRNA expression was detected by Realtime-PCR. Transwell chamber assay was performed to analyze cell invasional ability. **Results:**In clinical tissue samples,Pol ι expression was positively correlated with the lymph node metastasis of human esophageal squamous cell carcinoma($P < 0.01$),and negatively correlated with Nm23 in protein level($R = -0.481, P < 0.05$). In vitro study,overexpression of Pol ι enhanced cell invasion($P < 0.05$) and significantly inhibited Nm23 mRNA expression in TE-1 and ECA-109 cells ($P < 0.001$). **Conclusion:**Pol ι is closely related with the invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma,the possible mechanism of the regulation is through down regulating the expression of Nm23.

[Key words] Pol ι ;Nm23;metastasis;esophageal squamous cell carcinoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 304-308, 319]

[基金项目] 国家自然科学基金 (81372433); 江苏省自然科学基金 (BK20131149); 苏州市科技局应用基础研究计划 (SYS201360)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wjinchang@sina.com

跨损伤DNA合成(translesion DNA synthesis, TLS),又名损伤旁路,属于复制后修复(postreplication DNA repair, PRR),是生物体长期进化过程中形成的一套应急机制,在真核生物中都普遍存在。DNA聚合酶Iota是TLS聚合酶的一种,属于DNA聚合酶Y家族成员,由Pol ι 基因(hRAD30B基因)编码。相对于其他高保真性DNA聚合酶而言,Pol ι 复制保真度极低;故Pol ι 在正常食管上皮中的表达和活性受到严格限制。

Nm23是一种肿瘤转移抑制基因,其编码的蛋白质是核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase, NDPK)。由于该蛋白在多种高转移表型肿瘤中的表达明显减少,所以Nm23基因被认为是一种肿瘤转移抑制基因。NDPK能与G蛋白结合,影响G蛋白的信号传递,Nm23还能与其他蛋白结合参与多种信号通路调控,对肿瘤细胞的增殖发挥负性调节作用^[1]。

前期研究中发现Pol ι mRNA在食管鳞癌组织中表达显著上升,是正常食管上皮的7.2倍^[2],且Pol ι 的高表达与食管癌放疗抵抗相关^[3]。那么,Pol ι 表达是否与食管鳞癌的侵袭转移相关呢?本研究将进一步探讨Pol ι 表达与食管鳞癌淋巴结转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

本院手术中切取人食管鳞癌组织68例,癌旁组织48例,其中男50例,女18例。低分化9例,中分化33例,高分化26例。临床分期I~IIa期26例,IIb~III期42例。本研究经所在单位伦理委员会批准通过。所用试剂如下:Pol ι 引物(上海生工技术有限公司),RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),反转录试剂盒(赛默飞公司,美国),PCR试剂(ABI公司,美国),琼脂糖(Invitrogen公司,美国),Pol ι 、Nm23一抗抗体(Proteintech公司,美国),二抗抗体(江苏碧云天公司),食管癌细胞TE-1、ECA-109(中科院上海细胞所),DMEM培养基(Hyclone公司,美国),胎牛血清(Gibco公司,美国),Matrigel胶(BD公司,美国),Transwell小室(Corning公司,美国),Lipofect转染试剂(北京天根公司),Pol ι 过表达质粒(苏州大学张舒羽博士赠送)。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和实时荧光定量PCR

按照RNA提取试剂盒说明书提取组织中总RNA,按照逆转录试剂盒说明书逆转为cDNA,Pol ι

引物:正义链5'-ACAAACCGGGATTTCCTACC-3',反义链5'-TCACACTTCCTTTCCCTTGAA-3';Nm23引物:正义链5'-GAGGACCAGGCTGTAGGAAATC-3',反义链5'-GCAATGCAACAATATGAAGTAACCA-3';GAPDH引物:正义链5'-GAAGGTGAAGGTCG-GAGTC-3',反义链5'-GAAGATGGTATGGGATTTTC-3'。

以cDNA为模板,分别扩增目的基因Pol ι 、Nm23和内参GAPDH。扩增条件为:95℃预变性10s;95℃5s,60℃退火和延伸各20s,40个循环。结果以2^{- $\Delta\Delta$ CT}法统计结果。以TAE缓冲液配制2%琼脂糖溶液,加入少量溴化乙锭,上样电泳后在紫外成像仪中曝光显影。

1.2.2 免疫组织化学染色

Pol ι 、Nm23一抗稀释比例为1:100,二抗为1:100稀释的羊抗兔FITC-IgG抗体。术中切取食管鳞癌组织后,制成组织蜡块,常规病理切片,HE染色,由病理医师进行诊断核实。切取40 μ m厚的切片,经过脱蜡、水化、制成单细胞悬液,离心、免疫荧光染色等步骤后上机检测,并在免疫荧光显微镜下观察。

1.2.3 细胞培养及质粒转染

食管癌细胞TE-1及ECA-109用血清浓度10%的DMEM培养基培养于37℃、5%CO₂培养箱中。分别用250 μ l无血清培养基稀释4 μ g DNA和10 μ l转染试剂,混合后室温放置20min,将500 μ l混合物加入每孔中,并加入1.5ml无血清培养基混匀。转染6h后换含血清培养基,继续培养24~48h。

1.2.4 Transwell侵袭实验

50mg/L Matrigel胶1:4稀释,每孔加30 μ l包被基底膜,室温风干1h。用10g/L牛血清白蛋白(BSA)50 μ l水化基底膜。消化细胞,用含BSA的无血清培养基重悬,每孔1 \times 10⁶个细胞加入小室,下室加入500 μ l含10%胎牛血清的培养基培养48h,取出小室,用棉签擦去内层细胞,95%酒精固定5min,4g/L结晶紫溶液染色,200倍镜下随机选取10个视野拍照,计数。

1.3 统计学方法

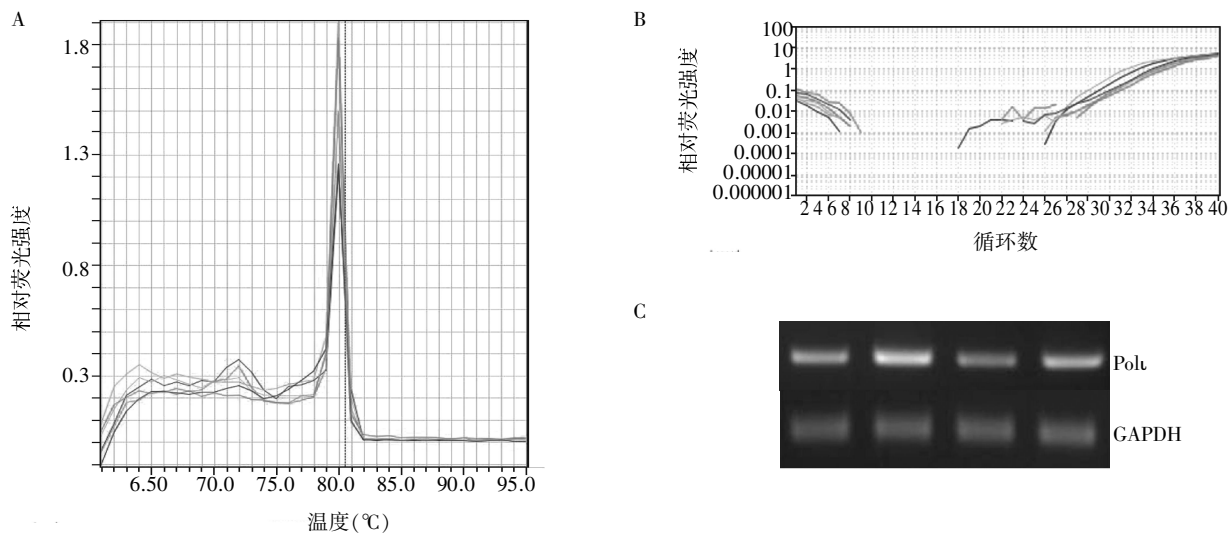
采用SPSS13.0分析,临床资料比较采用Mann-Whitney U检验方法,两组间比较采用t检验,多组间比较采用方差分析,免疫组化相关性比较采用Spearman相关分析。检验为双侧,以P \leq 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量PCR检测

以食管鳞癌组织 cDNA 为模板检测 Polt 的扩增曲线及熔解曲线。可见熔解曲线单峰明显,无杂峰, T_m 在 75℃~80℃之间,说明扩增产物特异性好。扩增曲线的 CT 值均在 20~30 之间,说明底物浓度

较为合适,线性关系较好,结果可信度高。PCR 电泳产物条带明显,无杂带,无明显引物二聚体,产物大小约为 200 bp,与设计相吻合,说明引物设计成功,且提取的 RNA 浓度及纯度较高,符合实验要求(图 1)。



A: Polt 熔解曲线; B: Polt 扩增曲线 C: Polt PCR 凝胶电泳图。

图 1 Polt 在实时荧光定量 PCR 中的扩增曲线、熔解曲线及凝胶电泳图片

Figure 1 Real-time PCR amplification curve, melt curve and agarose gel electrophoresis analysis of Polt

2.2 Polt 与淋巴结转移分析

Mann-Whitney U 检验显示 Polt 表达在不同年龄、性别、病理分级间无统计学差异,在有淋巴结转移阳性病例中 Polt 表达明显增高,与无淋巴结转移组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

表 1 Polt 与临床病理资料分析

Table 1 Analysis of Polt expression and clinicopathological parameters

临床病理资料	Polt 表达		P 值
	病例数	中位数(Q3-Q1)	
年龄			0.636
< 60 岁	28	1.587(19.557)	
≥60 岁	40	1.206(4.264)	
性别			0.675
男	50	1.293(5.613)	
女	18	1.495(7.805)	
病理分级			0.938
低分化	9	0.941(60.491)	
中分化	33	1.315(9.435)	
高分化	26	1.587(8.747)	
淋巴结转移			0.006
无	28	1.133(1.016)	
有	40	2.361(19.337)	

2.3 转染 Polt 过表达载体后细胞侵袭能力检测

TE-1 及 ECA-109 细胞转染 Polt 过表达载体

24 h 后,以每孔 1×10^6 个细胞加入 Transwell 小室,继续培养 48 h 后固定计数。结果显示 TE-1 及 ECA-109 转染组细胞穿过 Matrigel 胶的数量明显多于对照组($t=3.351, P < 0.05, n = 3; t=7.158, P < 0.01, n=3$,图 2)。

2.4 Polt 与 Nm23 蛋白免疫组化分析

Nm23 蛋白表达主要在胞浆,阳性染色呈棕色。Polt 蛋白表达主要定位于细胞核,阳性染色呈棕褐色。实验结果表明肿瘤组织中 Polt 与 Nm23 表达呈负相关($R=-0.481, P < 0.05$,表 2,图 3)。

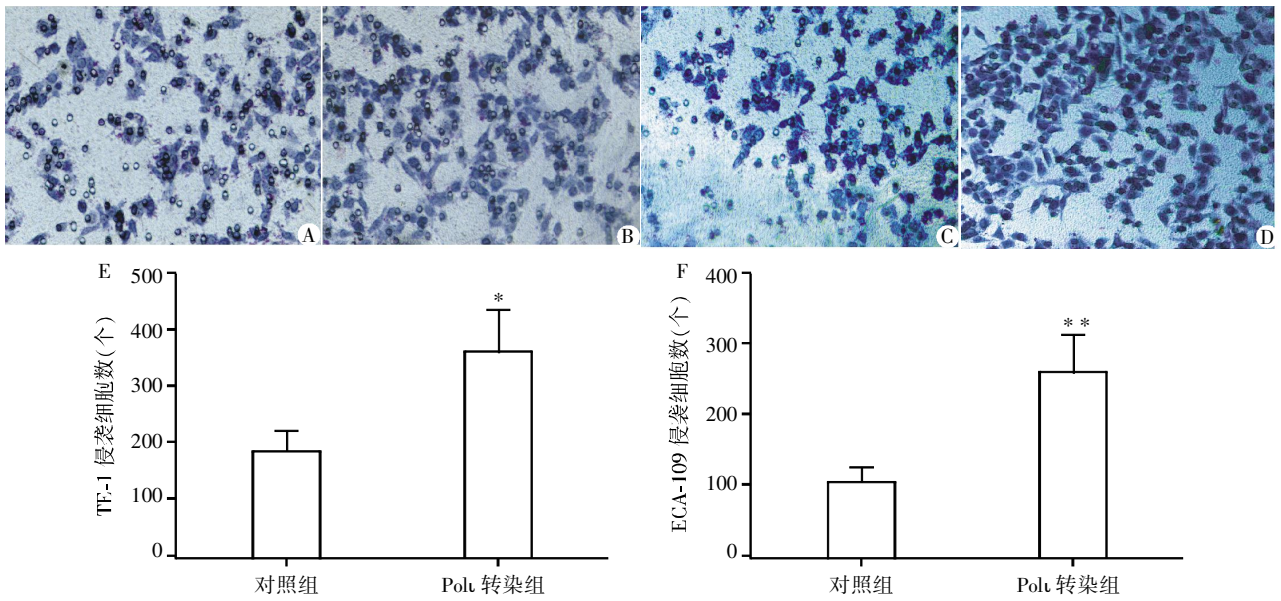
表 2 Spearman 相关分析 Polt 与 Nm23 的相关性

Table 2 Spearman correlation analysis between Polt and Nm23 (n)

Polt	Nm23		R 值	P 值
	阴性	阳性		
阴性	2	10	-0.481	0.020
阳性	7	4		

2.5 转染 Polt 过表达载体后 Polt 与 Nm23 mRNA 表达

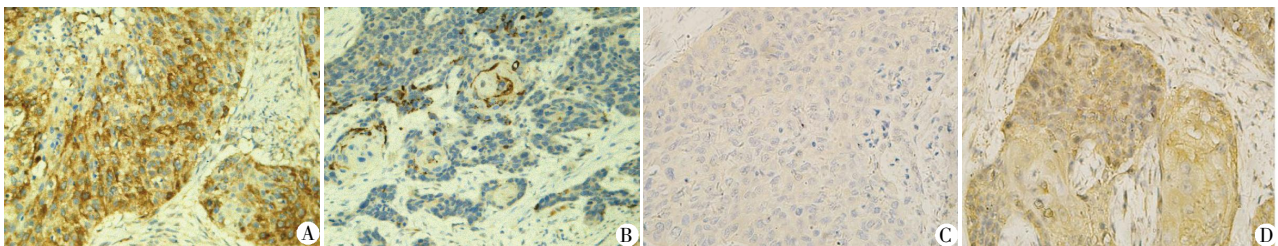
转染 Polt 过表达载体 48 h 后,通过荧光定量 PCR 检测 TE-1 和 ECA-109 细胞株 Polt 及 Nm23 基因 mRNA 表达情况,GAPDH 作为内参对照。结果表明 TE-1 及 ECA-109 细胞转染 Polt 过表达载体后,Nm23 mRNA 表达均降低($P < 0.001$,图 4)。



A: TE-1 对照组($\times 200$); B: TE-1 转染组($\times 200$); C: ECA-109 对照组($\times 200$); D: ECA-109 转染组($\times 200$); E: TE-1 穿过 Matrigel 胶数目; F: ECA-109 穿过 Matrigel 胶数目。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 转染 Pol θ 表达载体后细胞侵袭实验

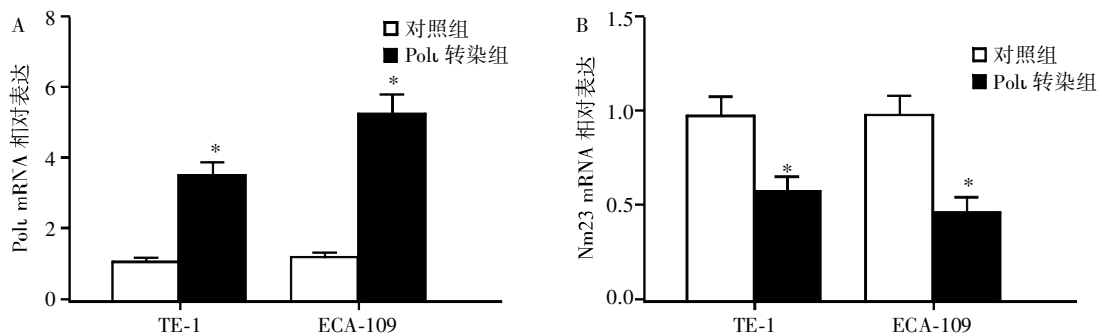
Figure 2 Transwell chamber assay after transfecting with Pol θ expression vector



A: Pol θ 阳性染色; B: Pol θ 阴性染色; C: Nm23 阴性染色; D: Nm23 阳性染色。

图 3 免疫组化染色检测 Pol θ 与 Nm23 表达情况

Figure 3 The immunohistochemistry results of Pol θ and Nm23 expression



A: 转染 Pol θ 过表达载体后 Pol θ mRNA 相对表达; B: 转染 Pol θ 过表达载体后 Nm23 mRNA 相对表达。与对照组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 4 转染 Pol θ 过表达载体后 Pol θ 及 Nm23 相对表达

Figure 4 Relative expression of Pol θ and Nm23 after transfecting with Pol θ expression vector

3 讨论

食管鳞癌发病除与环境及遗传因素相关外,还与吸烟、饮酒、营养缺乏以及环境致癌物暴露等相关。这些危险因素的存在会不断造成食管上皮细胞

内 DNA 损伤,为了维持 DNA 的稳定性,细胞通过一些 DNA 修复机制及时修复这些 DNA 损伤,保证基因组的稳定性,减少癌症发生的可能。

TLS 是生物体长期进化过程中形成的一套应急机制,在真核生物中普遍存在。当 DNA 链在复制

过程中遇到损伤时,高保真性的聚合酶复合物遇到损伤部位就会停止复制启动凋亡程序。为了避免这种机制造成的能量及物质浪费,机体会通过 TLS 途径耐受损伤的存在,让复制继续进行,即以损伤的核苷酸为模板掺入碱基到复制终止处,从而通过损伤;延伸一段长度后,TLS 聚合酶会被其他高保真性聚合酶代替,继续进行 DNA 合成^[4]。因此,跨损伤 DNA 合成在修复 DNA 损伤过程中有独特的作用。然而由于缺乏 3'→5'外切酶的校对功能,这类聚合酶的复制保真度较低,在维持细胞存活的同时,也会积累一些原本应该被清除的 DNA 突变,累积起来的 DNA 突变可能导致癌基因激活,以及抑癌基因失活,从而导致肿瘤发生发展^[5-8]。

DNA 聚合酶 Iota 属于 DNA 聚合酶 Y 家族成员,位于人染色体 18q21.1,由 715 个氨基酸残基组成,分子量为 80 000。由于也是一种 TLS 聚合酶,Pol ι 的错配率也较高。故在正常食管上皮内,Pol ι 表达和活性受到严格控制,失调的 Pol ι 表达可能与肿瘤发生相关。Gening 等^[9]发现在人眼葡萄膜恶性黑色素瘤中的 Pol ι 活性较正常明显增高。Yang 等^[10]发现乳腺癌细胞株中的 Pol ι 在蛋白水平和 mRNA 水平表达明显高于正常乳腺细胞。当通过免疫耗竭 Pol ι 后乳腺癌细胞的突变频率明显下降,表明 Pol ι 在肿瘤的高突变率中起到作用。有研究发现 Pol ι 在膀胱肿瘤的表达较正常膀胱组织明显增高,且膀胱肿瘤细胞株中的 mRNA 表达也高于正常组织。此外发现不同病理分级的 Pol ι 表达有差异,Ⅲ级移行细胞癌组织 Pol ι 表达较 I 级和 II 级移行细胞癌组明显增高^[11]。在人肺癌的研究中也发现了类似的结论:肺癌、癌旁和正常组织中 Pol ι 表达率分别为 54.8%、33.3%和 10.0%,且 Pol ι 与肺癌分化程度呈负相关。晚期肺癌(Ⅲ、Ⅳ)组织中 Pol ι 表达明显高于早期(I、II 期);Pol ι 表达高低还与生存时间相关,生存期 3 年以下患者 Pol ι 表达明显高于 3 年以上者。另外吸烟者 Pol ι 表达高于非吸烟者^[12]。

前期研究表明,Pol ι 在食管鳞癌组织中表达明显增高^[2]。为此,本研究探讨 Pol ι 是否与食管鳞癌的侵袭转移相关。淋巴结转移率是判断肿瘤恶性程度的重要指标,有研究表明淋巴结转移是影响食管鳞癌生存率的因素之一,pN0、pN1、pN2、pN3 的 5 年生存率分别为 53.3%、28.9%、18.9%和 7.3%^[13]。本研究通过实时荧光定量 PCR,检测 Pol ι 基因在食管鳞癌组织中的表达情况,并且与临床病理资料对比,发现 Pol ι 基因表达与食管鳞癌淋巴结转移呈正相关,即

有淋巴结转移的患者 Pol ι 表达明显高于无淋巴结转移患者,由此表明 Pol ι 高表达可能引起 DNA 损伤的累积,从而导致较差预后。

Nm23 是一种肿瘤转移抑制基因,研究表明有淋巴结转移患者的 Nm23 表达低于无淋巴结转移患者,Nm23 阴性患者的食管鳞癌预后较差,且低表达的 Nm23 与化疗抵抗相关^[14-15]。这些提示了 Nm23 参与了抑制肿瘤转移的调节,Nm23 表达与肿瘤进展及高转移潜力呈明显负相关。通过研究 Pol ι 与 Nm23 表达的相关性,本研究发现蛋白水平 Pol ι 与 Nm23 表达呈负相关,且转染 Pol ι 过表达载体后 Nm23 mRNA 表达下降。由此推测 Pol ι 通过下调 Nm23 增加食管鳞癌淋巴结转移。

综上所述,Pol ι 在食管鳞癌组织的高表达增加了食管鳞癌淋巴结转移几率,使得 Pol ι 成为一个重要的与食管鳞癌预后密切相关的基因。

[参考文献]

- [1] Marino N, Nakayama J, Collins JW, et al. Insights into the biology and prevention of tumor metastasis provided by the Nm23 metastasis suppressor gene[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(3-4): 593-603
- [2] Zhou J, Zhang S, Xie L, et al. Overexpression of DNA polymerase iota(Poliota) in esophageal squamous cell carcinoma[M]. *Cancer Sci*, 2012, 103(8): 1574-1579
- [3] 刘 瑾,吴锦昌,周俊东. POL I 基因对人食管癌细胞化疗敏感性的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2013, 33(1): 6-10
- [4] Livneh Z, Ziv O, Shachar S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(4): 729-735
- [5] Klug AR, Harbut MB, Lloyd RS, et al. Replication bypass of N2-deoxyguanosine interstrand cross-links by human DNA polymerases eta and iota[J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25(3): 755-762
- [6] Maddukuri L, Eoff RL, Choi JY, et al. In vitro bypass of the major malondialdehyde-and base propenal-derived DNA adduct by human Y-family DNA polymerases kappa, iota, and Rev1[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(38): 8415-8424
- [7] Donny-Clark K, Broyde S. Influence of local sequence context on damaged base conformation in human DNA polymerase iota: molecular dynamics studies of nucleotide incorporation opposite a benzo[a]pyrene-derived adenine lesion[J]. *Nucl Acids Res*, 2009, 37(21): 7095-7109
- [8] Berger B, Stahlberg K, Lemminger A, et al. Impact of radiotherapy, chemotherapy and surgery in multimodal