

## · 实验研究 ·

## DNA 损伤修复相关因子在宫颈癌组织中表达的研究

吴 郁 姚 颖 李文静 金一枚 杨 沫 郭红燕\*

(北京大学第三医院妇产科, 北京 100191)

**【摘要】 目的** 探讨 DNA 损伤修复相关因子组蛋白 H2AX 和毛细血管扩张性共济失调突变因子 (ataxia telangiectasia mutation, ATM) 在宫颈癌组织中的表达水平及诊断意义。 **方法** 选取 2016 年 1 月 ~ 2017 年 7 月我科宫颈癌 30 例 (宫颈癌组), 同时选取非宫颈癌 18 例为对照组, 对宫颈癌组和对对照组宫颈组织进行 HE 染色和免疫组化染色, 在 mRNA 水平检测 H2AX 和 ATM 的表达情况, 以磷酸化抗体检测磷酸化 H2AX ( $\gamma$ H2AX) 与磷酸化 ATM (phospho-ataxia telangiectasia mutation, pATM) 水平。 **结果** 荧光定量 PCR 分析宫颈癌组 ATM mRNA 为  $2.8546 \pm 0.8881$ , 明显高于对照组  $1.0018 \pm 0.4980$  ( $t = 9.256, P = 0.000$ ); 宫颈癌组 H2AX mRNA 为  $2.4312 \pm 0.8224$ , 显著高于对照组  $0.7896 \pm 0.4791$  ( $t = 8.738, P = 0.000$ )。  $\gamma$ H2AX 和 pATM 主要在细胞核中表达,  $\gamma$ H2AX 阳性率 80.0% (24/30), 显著高于对照组 11.1% (2/18) ( $Z = -3.381, P = 0.000$ ); 宫颈癌组 pATM 阳性率 83.3% (25/30), 显著高于对照组 16.7% (3/18) ( $Z = -4.031, P = 0.000$ )。 **结论**  $\gamma$ H2AX 和 pATM 在宫颈癌中高表达, 作为 DNA 损伤修复因子对宫颈癌的早期诊断有一定的临床意义。

**【关键词】** DNA 损伤标记物; 宫颈癌; 磷酸化 H2AX; 磷酸化毛细血管扩张性共济失调突变因子

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2018)03-0256-04

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2018.03.017

**The Study on Expression of DNA Damage Repair Factors in Cervical Tissues From Patients With Cervical Cancer** Wu Yu, Yao Ying, Li Wenjing, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China  
Corresponding author: Guo Hongyan, E-mail: bysyghy@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression, activation, and significance on diagnosis of DNA damage repair factors H2AX and ataxia telangiectasia mutation (ATM) in cervical tissues from patients with cervical cancer. **Methods** Thirty patients with cervical cancer from January 2016 to July 2017 in our hospital were enrolled as study subjects (cervical cancer group). At the same time, 18 patients with non-cervical cancer were selected as the control group. Both groups were given HE staining as well as immunohistochemical staining of the cervical tissues. The expressions of H2AX and ATM were detected at the mRNA level, and phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX) and phospho-ataxia telangiectasia mutation (pATM) were detected with phosphorylated antibody assays. **Results** The real-time quantitative PCR showed the mRNA expression of ATM of ( $2.8546 \pm 0.8881$ ) in the cervical cancer group, which was significantly higher than that in the control group ( $1.0018 \pm 0.4980, t = 9.256, P = 0.000$ ). The mRNA expression of H2AX was ( $2.4312 \pm 0.8224$ ) in the cervical cancer group, which was significantly higher than that in the control group ( $0.7896 \pm 0.4791, t = 8.738, P = 0.000$ ). The  $\gamma$ H2AX and pATM were mainly expressed in the nucleus of cancer cells. The positive rate of  $\gamma$ H2AX in the cervical cancer group was 80.0% (24/30), significantly higher than that in the control group [11.1% (2/18),  $Z = -3.381, P = 0.000$ ]. And the positive rate of pATM in the cervical cancer group was 83.3% (25/30), significantly higher than that in the control group [16.7% (3/18),  $Z = -4.031, P = 0.000$ ]. **Conclusions** The  $\gamma$ H2AX and pATM are highly expressed in cervical tissues from patients with cervical cancer. As the DNA damage repair factors, the  $\gamma$ H2AX and pATM might have certain clinical significance in early diagnosis of cervical cancer.

**【Key Words】** DNA damage marker; Cervical cancer;  $\gamma$ H2AX; Phospho-ataxia telangiectasia mutation

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤, 高居妇科恶性肿瘤第 2 位<sup>[1]</sup>。随着宫颈癌筛查的普及和手术、放疗技术的发展, 尤其腹腔镜手术的发展<sup>[2]</sup>, 宫颈癌预后得到改善, 但是临床上一部分患者诊断时已经晚期, 治疗棘手, 因此, 精确的早期诊断仍然是临床面临的难点。目前, 生物标记物相关研究成为疾病早期诊断及预后的热点。DNA 损伤修复与肿瘤的发生、发展密切相关, 可能会造成 DNA 错误, 诱发肿瘤的发生。磷酸化组蛋白 H2AX ( $\gamma$ H2AX) 与磷酸化毛细血管扩张性共济失调突变因子 (phospho-ataxia telangiectasia mutation, pATM) 共同参与非同

源末端链接 (nonhomologous end joining, NHEJ) DNA 损伤修复过程, 是细胞内对于 DNA 双链断裂的一种快速敏感的反应, 因此,  $\gamma$ H2AX 可以作为 DNA 损伤的标记物分子。另外,  $\gamma$ H2AX 与宫颈癌新辅助化疗后完全缓解率显著相关<sup>[3,4]</sup>。本研究探讨 H2AX 与 ATM 2 个目标分子在宫颈癌中的表达, 旨在为宫颈癌早期精确诊断提供新的手段。

## 1 临床资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2016 年 1 月 ~ 2017 年 7 月我科就诊的 30

\* 通讯作者, E-mail: bysyghy@163.com

例宫颈癌(宫颈癌组),年龄 30 ~ 62 岁,平均 45.7 岁。FIGO 分期:ⅠB1 期 4 例,ⅠB2 期 8 例,ⅡA 期 6 例,Ⅲ期 10 例,Ⅳ期 2 例。HPV16 阳性 20 例,HPV18 阳性 7 例,HPV56 阳性 2 例,HPV 阴性 1 例。病理:鳞癌 22 例,腺癌 8 例。对照组选取我科就诊的 18 例非宫颈癌(年龄 44 ~ 57 岁),包括子宫肌瘤(13 例)、子宫内膜息肉(5 例)。

1.2 方法

1.2.1 实验试剂与耗材 逆转录试剂盒(thermo, K1622),TRIZOL,无水乙醇,氯仿,异丙醇,荧光定量 PCR 试剂盒(takara RR420A),免疫组化试剂盒 PV900,苏木素-伊红染色液,γH2AX 一抗(CST 2755S,1:100,兔来源,pATM 一抗(NOVUS NB100-306,1:200,鼠单抗)。qRT-PCR 仪[QuantStudio 3 Real-Time PCR(96-well 0.2 ml Block)],组化湿盒及相关器材,显微镜(日本 Nikon ECLIPSE 80i,Nikon corporation)等。

1.2.2 实验方法

1.2.2.1 实时定量 PCR 取宫颈癌组和对照组的宫颈组织,Trizol 法提取总 RNA。Nanodrop2000 检测 RNA 浓度。采用 thermo K1622 逆转录试剂盒,按照试剂说明书添加逆转录体系,获得 cDNA 文库。设计 H2AX 和 ATM,β-actin 引物。H2AX 上游引物 5'-GTTCCCAGTGGGCCGTGA-3',下游引物 5'-CTGGTCTTCTTGGGCAGCA-3';ATM 上游引物 5'-TCGGCATTCCAGATCCAAACA-3',下游引物 5'-TGAGAAATCTCCAAGGATCTGGT-3';β-actin 上游引物 5'-CTCTCCCTCACGCCATC-3',下游引物 5'-ACGCACGATTTCCCTCTC3'。引物由华大基因合成。按照实时定量 PCR 试剂盒添加体系反应。PCR 反应条件:90℃,30 s;95℃,5 s,60℃,30 s(45 个循环);95℃,60 s;55℃,30 s。

1.2.2.2 免疫组化 ①4%多聚甲醛室温组织固定过夜,修整组织。组织常规石蜡包埋、切片,切片厚度为 0.5 μm。②柠檬酸抗原修复缓冲液高温修复。③阻断内源性过氧化物酶。④孵育一抗:滴加 γH2AX 和 pATM 一抗,γH2AX 和 pATM 的抗体分别按照 1:100 和 1:200 稀释。4℃孵育过夜。⑤孵育二抗:PBS(pH 7.4)洗涤 3 次,每次 5 min,二抗(HRP 标记)按照 1:200 稀释覆盖组织,室温孵育 50 min。⑥DAB 显色,自来水冲洗终止。⑦复染细胞核。⑧脱水封片。结果评估:

宫颈癌组和对照组 γH2AX 和 pATM 免疫组化染色结果阳性呈黄色或棕黄色。免疫组化染色的强度和分布采用国际 Remmele 评分(international

remmele score,IRS)半定量评分系统<sup>[5]</sup>。染色强度:0 分=无,1 分=弱,2 分=中等,3 分=强;阳性细胞百分比:0 分=无,1 分=<1%,2 分=1%~10%,3 分=11%~33%,4 分=34%~66%,5 分=67%~100%,综合评分最高分 8 分。综合评分 0 分记(-),1~2 分记(+),3~5 分记(++),6~8 分记(+++)。-和+代表阴性,++和+++代表阳性。免疫组化染色的评分由 2 位病理科医生遵循互盲原则进行,二者评分不一致时取均值。

1.2.2.3 HE 染色 按照常规方法,石蜡切片脱蜡,常规苏木精-伊红染色,中性树胶封片。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 处理数据,实时定量 PCR 结果按照 2<sup>-ΔCT</sup>法统计分析,每次数据均有 3 次重复,取均值。正态分布的连续变量用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本 *t* 检验,偏态分布的连续变量用中位数(最小值~最大值)表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验;等级资料采用 Mann-Whitney *U* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 H2AX 和 ATM 在 mRNA 水平的表达情况

实时定量 PCR 分析宫颈癌组和对照组 H2AX 和 ATM 的表达,通过相对定量计算方法 2<sup>-ΔCT</sup>,β-actin 为内参基因。宫颈癌组 ATM mRNA 和 H2AX mRNA 相对表达量较对照组显著高表达,见表 1。

表 1 宫颈癌组和对照组 H2AX 和 ATM mRNA 表达情况

组别	ATM 相对 表达量(2 <sup>-ΔCT</sup> )	H2AX 的相对 表达量(2 <sup>-ΔCT</sup> )
宫颈癌组( <i>n</i> = 30)	2.8546 ± 0.8881	2.4312 ± 0.8224
对照组( <i>n</i> = 18)	1.0018 ± 0.4980	0.7896 ± 0.4791
<i>t</i> 值	9.256	8.738
<i>P</i> 值	0.000	0.000

2.2 HE 染色和免疫组化

宫颈癌组 γH2AX 综合评分中位数 4 分(0~8 分),显著高于对照组中位数 0 分(0~5 分)(Mann-Whitney *U* 检验,*Z* = -4.027,*P* = 0.000);宫颈癌组 pATM 综合评分中位数 5 分(0~8 分),显著高于对照组中位数 0 分(0~5 分)(Mann-Whitney *U* 检验,*Z* = -4.468,*P* = 0.000)。宫颈癌组 γH2AX 阳性 24 例(80.0%),对照组阳性 2 例(11.1%),宫颈癌组显著高于对照组;宫颈癌组 pATM 阳性 25 例(83.3%),对照组阳性 3 例(16.7%),宫颈癌组显著高于对照组,见表 2。HE 染色见图 1,免疫组化染色见图 2。

表 2 宫颈癌组和对照组 pATM 和 γH2AX 免疫组化综合评分比较

组别	pATM				γH2AX			
	阴性		阳性		阴性		阳性	
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
宫颈癌组( <i>n</i> = 30)	2	3	13	12	4	2	13	11
对照组( <i>n</i> = 18)	11	4	3	0	14	2	2	0
<i>Z</i> 值	-4.031				-3.381			
<i>P</i> 值	0.000				0.000			

注:-和+代表阴性,++和+++代表阳性

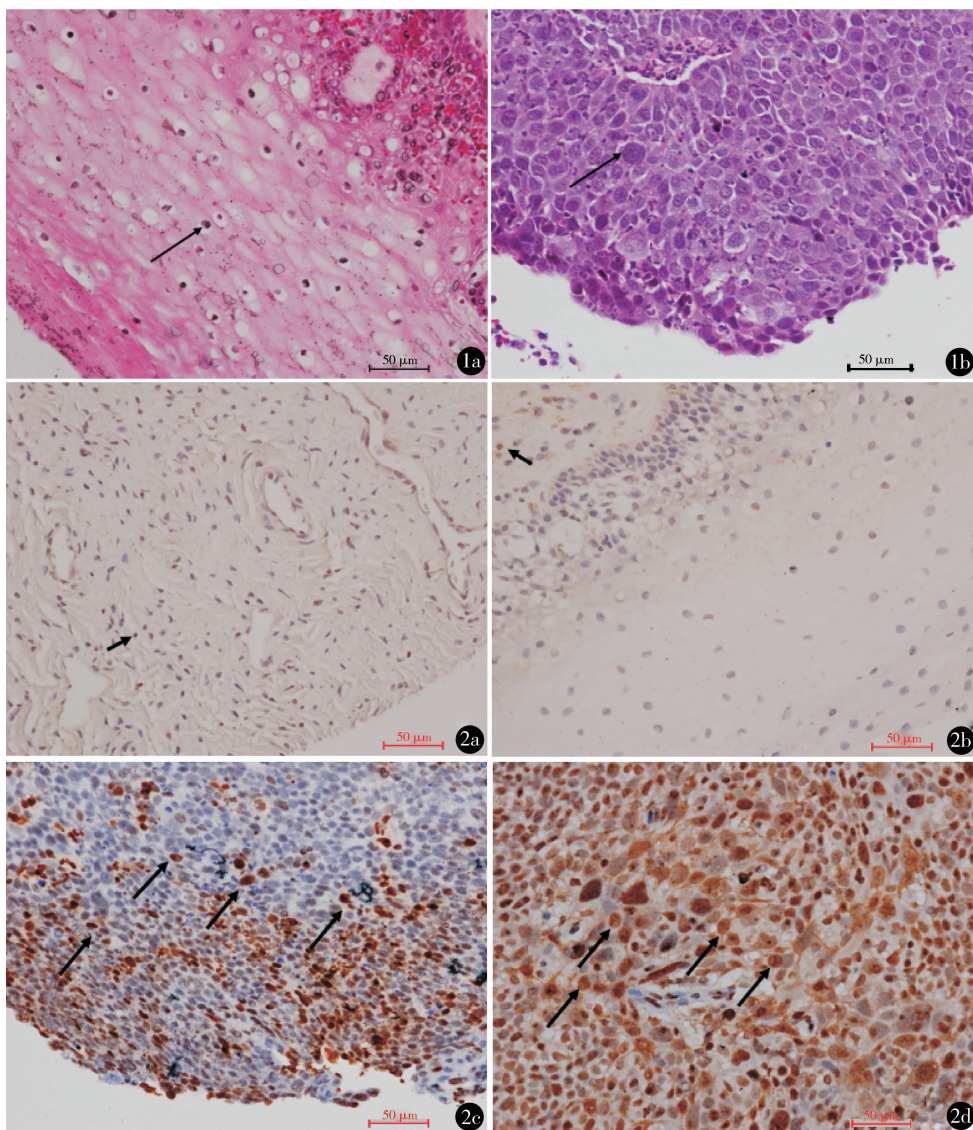


图 1 宫颈癌组 and 对照组 HE 染色 a. 对照组宫颈上皮细胞排列整齐, 细胞核形态正常 (黑色箭头: 正常宫颈上皮); b. 宫颈癌组可见明显癌灶, 细胞排列紊乱, 细胞核形态消失 (黑色箭头: 癌细胞) (HE 染色  $\times 200$ ) 图 2 宫颈癌组 and 对照组  $\gamma$ H2AX 和 pATM 免疫组化表达情况 a, b. 对照组  $\gamma$ H2AX 和 pATM 免疫组化 (黑色箭头: 细胞呈弱阳性); c, d. 宫颈癌组  $\gamma$ H2AX 和 pATM 免疫组化均有明显表达, 棕黄色或黄色为阳性显色, 两者均定位于细胞核 (  $\times 200$ )

### 3 讨论

在我国, 宫颈癌患者每年新发病例约在 11 万以上, 每年有 2 万 ~ 3 万女性死于宫颈癌。与其他肿瘤相比, 宫颈癌具有明确的致病因素及癌前病变病程进展, 通过早期预防和筛查, 可以降低发病率和死亡率<sup>[6]</sup>。性交年龄早、多个性伴侣、早婚、早产、多次流产、肥胖、家族史、高危型 HPV16 和 18 感染均可导致宫颈癌的发生。宫颈癌预后与多因素相关, 年龄是宫颈癌患者独立预后因素之一<sup>[7]</sup>。目前, 宫颈癌的研究重心已转向对癌前病变的早期发现和治疗<sup>[8]</sup>。本研究探讨参与 DNA 双链损伤修复相关因子  $\gamma$ H2AX 和 pATM 在宫颈癌中的表达情况, 并分析其是否可以作为诊断预测的标记分子。本研究中免疫组化判读结果将“+”判定为阴性, 是根据黄晓园

等<sup>[9]</sup>的评分判断方法, 以除外非特异性染色的干扰。本研究结果显示二者在 mRNA 和蛋白质水平宫颈癌组织中表达明显高于对照组 ( $P$  均 = 0.000)。因此,  $\gamma$ H2AX 和 pATM 因子在宫颈癌的早期诊断有一定临床意义。

DNA 损伤是肿瘤发生的明确病因, 尤其是 DNA 双链断裂伴随细胞周期检查点的激活。宫颈癌可能由于 DNA 损伤导致肿瘤的发生, 并伴随 DNA 损伤修复相关因子的激活<sup>[10]</sup>。pATM 和  $\gamma$ H2AX 是参与 DNA 双链断裂损伤修复的重要因子, ATM 活化会进一步激活  $\gamma$ H2AX, 磷酸化修饰会启动 DNA 修复和激活检查点的相关途径, 从而阻止细胞周期的进展<sup>[11,12]</sup>。Roossink 等<sup>[13]</sup>研究 DNA 损伤修复 (DNA damage repair, DDR) 组成成分包括 pATM 在内作为潜在的治疗靶点以及 DDR 活化在放化疗的宫颈癌

患者的预测和预后价值,最终认为宫颈癌患者中 pATM 对放化疗的保护性意义,并指出 pATM 抑制可能是促进放化疗的可能途径。 $\gamma$ H2AX 是磷酸化的 H2AX,可以作为宫颈癌患者新辅助化疗的预测因子,但仍需进一步探索<sup>[14]</sup>。对宫颈癌的特征性信号通路和基因的探索研究显示,ATM 信号通路的激活、细胞周期调控异常、内切酶活性增强和 3q 区域的扩增等都有希望成为评价宫颈癌发病风险的指标,提供更好的宫颈癌防治策略<sup>[15]</sup>。

宫颈癌可通过定期妇科体检达到一定的预防、早期诊断目的,但患者早期症状无特异性,临床误诊、漏诊率较高<sup>[16]</sup>,诊断缺乏准确性,无论是病毒还是肿瘤相关标记物检测均没有完全准确的手段,感染程度和癌症病程进展关系难以提前预知<sup>[17]</sup>。早期检出并给予积极的治疗是防治宫颈癌的关键,目前,宫颈癌的诊断多通过 TCT、高危型 HPV 感染、肿瘤相关标记物以及影像学检查等联合诊断<sup>[18-21]</sup>。本文提出 DNA 损伤修复因子  $\gamma$ H2AX 和 pATM 参与宫颈癌的发生,期望通过对宫颈组织早期检测达到诊断目的。近年来,不断出现新的宫颈癌相关的生物标记,比如 ATB(转化生长因子- $\beta$  诱导激活的一种 lnc RNA)的高表达是宫颈癌预后的独立危险因素<sup>[22]</sup>,PBX3(Pre-B-cell leukemia homeobox 3)<sup>[23]</sup>和 microRNA-466 也同样发现有宫颈癌早期预测,疾病进展以及预后的标记作用<sup>[24]</sup>。本研究显示宫颈癌细胞中存在显著的  $\gamma$ H2AX 与 pATM 激活,即大量的 DNA 损伤,表明 DNA 损伤很可能是驱动癌症发生的主要原因之一。除  $\gamma$ H2AX 与 pATM 外,细胞内还含有数十种其他 DNA 损伤响应因子,如 MDC1、NBS1、PNKP 等。这些因子的功能异常或基因突变都有可能引起 DNA 损伤修复的失败、基因组紊乱以及最终的癌症发生。因此,检测 DNA 损伤修复因子的基因表达或相关生化特性,很可能对宫颈癌的早期诊断及分级治疗提供新策略。

## 参考文献

- 1 应倩,夏庆民,郑荣寿,等. 中国 2009 年宫颈癌发病与死亡分析. 中国肿瘤,2013,22(8):612-616.
- 2 张昕蕾,张军,蔡有芹,等. 腹腔镜手术治疗 108 例宫颈癌的临床分析. 中国微创外科杂志,2016,16(11):980-982.
- 3 Larsen DH, Stucki M. Nucleolar responses to DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res,2016,44(2):538-544.
- 4 Vici P, Buglioni S, Sergi D, et al. DNA damage and repair biomarkers in cervical cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy: an exploratory analysis. PloS One, 2016, 11(3):e0149872.
- 5 Cuppens T, Annibali D, Coosemans A, et al. Potential targets' analysis reveals dual PI3K/mTOR pathway inhibition as a promising therapeutic strategy for uterine leiomyosarcomas-an ENITEC Group initiative. Clin Cancer Res,2017,23(5):1274-1285.
- 6 李英伟,刘海枝. 宫颈癌高危因素及检测的研究进展. 中外医疗,2010,29(5):98-99.
- 7 郑晓霞,李琼珍,李玲,等. 宫颈癌预后状况及其影响因素分析. 实用癌症杂志,2014,29(3):314-316.
- 8 Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. Am J Obstet Gynecol,2007,197(4):340-345.
- 9 黄晓园,李琼珍,马丁,等. Chk1/2 和 Plkl 蛋白在宫颈良恶性病变组织中的表达及其意义. 中国癌症杂志,2007,17(6):429-432.
- 10 Jin Y, Xu X, Li M, et al. Increasing sensitivity to DNA damage is a potential driver for human ovarian cancer. Oncotarget,2016,7(31):49710-49721.
- 11 Turinetto V, Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. Nucleic Acids Res,2015,43(5):2489-2498.
- 12 Larsen DH, Stucki M. Nucleolar responses to DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res,2016,44(2):538-544.
- 13 Roossink F, Wieringa HW, Noordhuis MG, et al. The role of ATM and 53BP1 as predictive markers in cervical cancer. Int J Cancer,2012,131(9):2056-2066.
- 14 Zhao J, Wang Q, Li J, et al. Comparative study of phosphorylated histone H2AX expressions in the cervical cancer patients of pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. Eur J Gynaecol Oncol, 2015, 36(3):318-322.
- 15 程静,潘光鑫,周素,等. 宫颈癌发病机制的探讨. 中国妇幼保健,2014,29(28):4545-4547.
- 16 姚春慧,李波,谭娟,等. 子宫颈癌患者肿瘤标志物联合 MRI 影像诊断的临床价值. 中国 CT 和 MRI 杂志,2017,15(6):103-106.
- 17 王楠,马蓉,吴建中,等. 宫颈癌的发病机制、诊断及治疗进展. 中国肿瘤外科杂志,2013,5(2):121-124.
- 18 杨辉,郑君. 联合检测血清 SCCA,CA19-9 及 CA125 对宫颈癌诊断及预后判断的临床意义. 中国妇幼保健,2013,28(5):772-774.
- 19 颜萍,龚旭华. 多种血清肿瘤标志物检测在早期宫颈癌诊断中的意义. 实用癌症杂志,2014,29(7):741-743.
- 20 左拥军,史丽静,谢雁. MRI 扫描技术对诊断宫颈癌的临床研究. 中国临床医生杂志,2017,45(2):83-86.
- 21 张志娟,薛燕. TCT 与高危型 HPV-DNA 检测在宫颈癌筛查中的应用价值探讨. 中国妇幼保健,2016,31(24):5339-5341.
- 22 Cao W, Peng T, Zhou Y. Long noncoding RNA activated by transforming growth factor- $\beta$  promotes cancer development and is a prognostic marker in cervical cancer. J Cancer Res Ther,2017,13(5):801.
- 23 Li H, Sun G, Liu C, et al. PBX3 is associated with proliferation and poor prognosis in patients with cervical cancer. Onco Targets Ther, 2017,10:5685-5694.
- 24 Zhou LL, Shen Y, Gong JM, et al. MicroRNA-466 with tumor markers for cervical cancer screening. Oncotarget, 2017, 8(41):70821-70827.

(收稿日期:2018-01-04)

(修回日期:2018-03-11)

(责任编辑:李贺琼)