

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.016

· 临床研究 ·

## *Polu* 基因在人肺癌组织中的表达及其与临床病理特征和预后的关系

朱峰, 田辉\*, 岳韦名, 李树海, 田旭东, 齐磊, 朱应超, 胡文思 (山东大学齐鲁医院 胸外科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 检测 DNA 聚合酶  $\iota$  (polymerase *iota*, *Polu*) 基因在人肺癌组织、癌旁组织及正常肺组织中的表达, 结合肺癌临床病理特征及预后分析 *Polu* 在肺癌发生、发展中的意义。方法: 选取 2001 年 1 月至 2003 年 8 月在山东大学齐鲁医院胸外科行手术治疗的明确诊断为原发性肺癌的患者, 应用免疫组化和 RT-PCR 方法检测 62 例肺癌组织、30 例癌旁组织和 30 例正常肺组织标本中 *Polu* 的表达水平, 采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学分析。结果: 人肺癌组织、癌旁组织和正常肺组织中 *Polu* 表达率分别为 54.8%、33.3% 和 10.0%, 不同类型肺癌组织中 *Polu* 表达无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 随着肺癌分化程度升高, *Polu* 表达下降 ( $P < 0.05$ ), III 期和 IV 期肺癌组织中 *Polu* 表达明显高于 I 期和 II 期 ( $P < 0.05$ ), 生存 3 年以下肺癌 *Polu* 表达明显高于 3 年以上者 ( $P < 0.05$ ), 吸烟者 *Polu* 表达高于非吸烟者 ( $P < 0.05$ )。结论: *Polu* 高表达在肺癌发生、发展中起到重要作用, 可能作为肺癌生物学特征和预后判断的参考指标。

[关键词] *Polu* 基因; 肺肿瘤; 免疫组化; RT-PCR

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0503-04

## DNA polymerase *iota* expression in human lung cancer and its correlation with clinicopathological and prognosis of cancer

ZHU Feng, TIAN Hui\*, YUE Wei-ming, LI Shu-hai, TIAN Xu-dong, QI Lei, ZHU Ying-chao, HU Wen-si (Department of Thoracic Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Ji'nan 250012, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of DNA polymerase *iota* (*Polu*) in human lung cancer tissues, adjacent lung cancer tissues, and normal lung tissues, so as to analyze the role of *Polu* gene in the development and progression of lung cancer. **Methods:** Samples were obtained from lung cancer patients who were surgically treated during Aug. 2003 to Jan. 2001 in Qilu Hospital of Shandong University. Immunohistochemistry and RT-PCR were applied to detect *Polu* expression in 60 lung cancer specimens, 30 adjacent lung cancer specimens and 30 normal tissue specimens. Data were analyzed with PSS13.0 software. **Results:** The positive rates of *Polu* in lung cancer, adjacent lung cancer tissues and normal tissues were 54.8%, 33.3% and 10.0%, respectively. *Polu* expression levels were similar in different types of lung cancer ( $P > 0.05$ ). *Polu* expression in lung cancer tissues was decreased with the increase of differentiation grade of lung cancer ( $P < 0.05$ ), with the expression in grade III and IV of lung cancer significantly higher than those in grade I and II ( $P < 0.05$ ). *Polu* expression in patients who survived less than 3 years was markedly higher than in those survived longer than 3 years ( $P < 0.05$ ); and smoking patients had a markedly higher expression than non-smokers ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** High expression of *Polu* plays an important role in development and progression of lung cancer, and it may be used in evaluating the biological characteristics and prognosis of lung cancer.

[Key words] DNA polymerase *iota* (*Polu*), lung neoplasms, immunohistochemistry, RT-PCR

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 503-506]

肺癌的发生和发展是一个多基因参与、多因素作用的过程, 在这种过程中癌基因、抑癌基因和 DNA 修复基因的活性起了关键性的作用。癌基因的激活和抑癌基因的失活导致了肿瘤的发生和发展, 抑癌基因的杂合性丢失被认为是一些肿瘤易感性的分子生物学基础<sup>[1]</sup>。DNA 聚合酶  $\iota$  (polymerase *iota*, *Polu*) 基因是由

McDonald 等<sup>[2]</sup>发现的, 编码产物为 DNA 聚合酶  $\iota$ 。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30571844)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571844)

[作者简介] 朱峰(1982-), 男, 山东省济南市, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

\* 通信作者( Corresponding author)。E-mail: tianhuiy@sohu.com

*Polu* 在 DNA 复制过程中表现出低保真性的特点, 在跨损伤复制过程中碱基的高错配倾向, 易产生基因突变, 对肿瘤的发生、发展起着重要作用<sup>[3]</sup>。*Polu* 的高表达与人葡萄膜黑素瘤的发生相关<sup>[4]</sup>; 另外在乳腺癌细胞中 *Polu* 也呈现高表达, 导致了 DNA 复制保真度显著降低和乳腺细胞基因突变率增高, 当敲除 *Polu* 后乳腺癌细胞的基因突变率降低, 说明在乳腺癌细胞的 DNA 复制过程中, *Polu* 可能参与与自发性强的跨损伤突变, 造成基因损伤的积累, 从而增加肿瘤的易感性<sup>[5]</sup>。本研究主要应用免疫组化和 RT-PCR 方法检测人肺癌组织、癌旁组织及正常肺组织中 *Polu* 的表达水平, 探讨 *Polu* 表达与肺癌临床病理学特征及预后的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2001 年 1 月至 2003 年 8 月在山东大学齐鲁医院胸外科行手术治疗的、有明确病理诊断的原发性肺癌患者 62 例的癌组织标本, 术前未行放射治疗及化学治疗。取其中 30 例标本的肿瘤外缘 0.5 cm 左右的肺组织, 另取距肿瘤边缘 5 cm 以上的正常肺组织 30 例作为阴性对照。

### 1.2 组织标本的处理

全部标本均在手术中收集, 取材后肺组织标本剪为两块, 一块速冻于液氮中,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温贮存备用; 另一块标本经 10% 的甲醛液固定, 石蜡包埋, 常规制备  $5\text{ }\mu\text{m}$  连续切片行免疫组化检测。

### 1.3 免疫组织化学检测 *Polu* 蛋白的表达

石蜡切片烘片 30~60 min, 二甲苯脱蜡 2 次, 各 10 min; 经 100% 酒精至 70% 酒精逐级脱水; 滴加 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醇液, 室温下置放 30 min, PBS 洗 3 次; 滴加 0.05%~0.10% 胰蛋白酶消化 30 min 至 2 h, PBS 洗 3 次; 滴加 1:10 正常小牛血清, 室温下置放 20 min。弃去多余血清, 滴加第一抗体山羊抗 DNAPol $\alpha$  (N-19) 抗体(购自 Santa cruz 公司), 稀释浓度为 1:200, 置湿盒内  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜; PBS 洗 3 次, 滴加第二抗体, 置湿盒内室温下置放 30~60 min, PBS 洗 3 次; 滴加第三抗体, 湿盒内室温下置放 30~60 min; PBS 洗 3 次; 切片置于 DAB 显色液中, 显微镜下控制显色时间 5~20 min; 显微镜下观察并摄片。显微镜下随机选取每张染色片的 3 个  $10\times 40$  高倍视野(细胞总数大于 100 个)观察, 光镜下阳性细胞染色呈棕黄色, 计算阳性细胞占总计数细胞的百分率。

### 1.4 RT-PCR 检测 *Polu* mRNA 在正常肺组织、癌旁组织和肺癌组织中的表达

按试剂盒(购自北京索莱宝科技有限公司)说

明书, 应用 TRIzol 提取总 RNA, 通过  $D_{260}/D_{280}$  的比值来评估提取的 RNA 的质量。用于合成 *Polu* 基因的引物<sup>[6]</sup>由上海生工公司合成。*Polu* (812 bp): 正义引物, 5'-2GAGAAGACCTGACCCGCTACA-3'; 反义引物, 5'-TGAAGGAATAGGGCACTGACG-3'。内参 18S rRNA 引物 (330 bp), 正义引物, 5'-CCTC-GAAAGAGTCCTGTA-3'; 反义引物, 5'-GG-GAACCGCTGCATTTAT-3'。设置循环条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $54\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 总共 30 个循环; 末轮循环  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 保存于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

### 1.5 统计学处理

实验数据采用 SPSS13.0 统计软件, 采用  $\chi^2$  检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 *Polu* 蛋白在肺癌组织中的表达

*Polu* 蛋白阳性染色以细胞质呈黄色至棕黄色为主, 根据染色强度和阳性细胞数进行综合评分。按着色程度分为: 未着色、染色与背景相似者为 0 分; 着色浅、略高于背景者为 1 分; 中度着色、明显高于背景者为 2 分; 强着色、呈深棕色者为 3 分。按阳性细胞数分为: 阳性细胞数  $<10\%$  为 0 分,  $10\% \sim 50\%$  为 1 分,  $51\% \sim 75\%$  为 2 分,  $>75\%$  为 3 分。2 项评分相加,  $0 \sim 1$  分为阴性(-),  $\geq 2$  分为阳性。

免疫组化染色检测了肺癌组织、癌旁组织及正常肺组织中 *Polu* 蛋白的表达, 结果显示: 肺癌组织和癌旁组织 *Polu* 的表达率明显高于正常肺组织 ( $P < 0.05$ ; 图 1、表 1)。

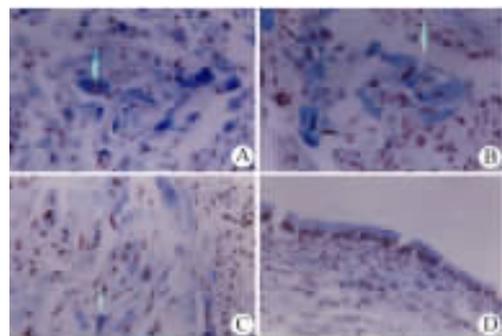


图 1 免疫组化检测 *Polu* 蛋白在肺癌组织中的表达 ( $\times 200$ )

Fig. 1 *Polu* protein expression in lung cancer tissues as detected by immunohistochemical staining ( $\times 200$ )

A: Poorly differentiated squamous carcinoma;

B: Moderately differentiated adenocarcinoma;

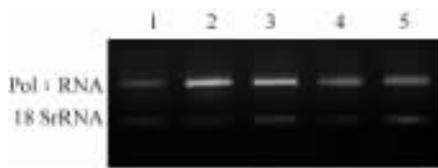
C: Adjacent lung tissues; D: Normal lung tissues

表 1 *Polu* 蛋白在肺癌组织中的表达Tab. 1 *Polu* protein expression in lung cancer tissues

Group	N	<i>Polu</i> expression			
		n	%	$\chi^2$	P
Lung cancer tissues	62	34	54.8	16.906	0.000
Adjacent lung tissues	30	10	33.3	4.812	0.028
Normal lung tissues	30	3	10.0		

2.2 肺癌组织和癌旁组织中 *Polu* mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果显示,肺癌组织和癌旁组织中 *Polu* mRNA 的表达水平明显高于正常肺组织中表达水平(图 2)。

图 2 RT-PCR 检测 *Polu* mRNA 在肺癌组织的表达Fig. 2 Expression of *Polu* mRNA in lung cancer tissues as detected by RT-PCR

1: Normal tissues; 2,3: Lung cancer tissues;  
4,5: Adjacent lung cancer tissues

2.3 *Polu* 蛋白的表达与肺癌组织类型、分化程度、分期及预后的关系

不同类型的肺癌组织中 *Polu* 表达无显著性差异( $P > 0.05$ );不同分化程度的肺癌组织中 *Polu* 表达有显著性差异,且其表达有按低分化、中分化、高分化、未分化的顺序依次降低的趋势( $P < 0.05$ );Ⅲ期和Ⅳ期肺癌组织中 *Polu* 表达明显高于Ⅰ期和Ⅱ期( $P < 0.05$ );生存 3 年以下者肺癌 *Polu* 表达明显高于 3 年以上者( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.4 *Polu* 表达与年龄、性别、吸烟、肿瘤部位的关系

*Polu* 表达在年龄、性别、肿瘤部位三个因素中无显著性差异( $P > 0.05$ );吸烟者 *Polu* 表达高于非吸烟者( $P < 0.05$ )见表 3。吸烟者的定义是:目前为止吸烟  $\geq 100$  支,且过去 30 d 内有吸烟者史者<sup>[7]</sup>。

## 3 讨论

肺癌是恶性肿瘤中病死率最高的肿瘤<sup>[8]</sup>。近年来,对肺癌的发生、发展的研究逐渐增多,其中 *Polu* 作为一个 DNA 修复基因<sup>[8]</sup>,与肺癌的关系密切。与其他 DNA 聚合酶显著不同,*Polu* 不是 Watson-Crick 碱基配对<sup>[9]</sup>,而是通过 Hoogsteen 键进行

碱基配对<sup>[10]</sup>,从而在嘌呤碱基模板上掺入正确核苷酸比在嘧啶碱基模板上更为高效、精确<sup>[11-12]</sup>。同时 *Polu* 缺少 3'-5' 端外切酶活性,在 DNA 复制中缺乏错配碱基的校正阅读功能,因此在 DNA 复制时有高度的碱基错配倾向<sup>[13]</sup>,表现出极低的保真性<sup>[14]</sup>。

表 2 *Polu* 表达与肺癌组织类型、分化程度、TNM 分期及预后的关系Tab. 2 Correlation of *Polu* expression with clinical pathological features of lung cancer

Group	N	<i>Polu</i> expression			
		n	%	$\chi^2$	P
Histology				1.893	0.595
Quamous carcinoma	29	17	58.6		
Adenocarcinoma	22	13	59.1		
Small cell carcinoma	5	2	40.0		
Others	6	2	33.3		
Differentiation				8.036	0.045
High	16	6	37.5		
Moderate	19	11	57.9		
Low	16	13	81.3		
Others	11	4	36.4		
TNM stage				9.389	0.025
I	11	4	36.4		
II	20	7	35.0		
III	19	14	73.7		
IV	12	9	75.0		
Survival time(t/a)				4.987	0.026
<3	34	23	67.6		
$\geq 3$	28	11	39.3		

目前认为,当机体受到外界干扰 DNA 产生损伤时,在 DNA 聚合酶作用下进行 DNA 复制,由于其保真度低,遗传表现为不稳定性,最终可导致基因突变<sup>[15]</sup>。本研究显示,*Polu* 在肺癌组织中呈现高表达。由于 *Polu* 在 DNA 损伤复制过程中碱基的高错配倾向,易产生基因突变。DNA 损伤后的修复对维持细胞的完整性来说十分重要。因此对 *Polu* 基因的表达与不同人群的不同肿瘤的发生、发展关系的研究有助于阐明该基因在肿瘤发生、发展中的重要作用。

表 3 *Polu* 表达与肺癌患者年龄、性别、吸烟以及肿瘤部位的关系

Tab.3 Correlation of *Polu* expression with age, sex, smoking and tumor location of lung cancer patients

Group	N	<i>Polu</i> expression			
		n	%	$\chi^2$	P
Age				0.105	0.746
≤60	23	12	52.2		
>60	39	22	56.4		
Sex				0.077	0.781
Male	41	23	56.1		
Female	21	11	52.4		
Smoking				6.120	0.013
Yes	35	24	68.6		
No	27	10	37.0		
Location				0.018	0.894
Central type	36	20	55.6		
Peripheral type	26	14	53.8		

本研究结果发现,人肺癌组织、癌旁组织和正常肺组织中均有 *Polu* 的表达,但肺癌组织和癌旁组织中 *Polu* 的表达率分别为 54.8% 和 33.3%,明显高于正常肺组织的 10.0%( $P < 0.05$ )。由于 *Polu* 具有极低的保真性,其高水平的表达可能导致 DNA 修复过程中基因的高突变,提示 *Polu* 高表达可能与肺癌的发生有关。随着肺癌分化程度的升高,*Polu* 的表达下降,低分化、中分化、高分化和未分化癌组织中 *Polu* 阳性表达率有显著性差异( $P < 0.05$ ),提示 *Polu* 高表达可作为肺癌分化程度的参考指标。本研究还发现Ⅲ期和Ⅳ期肺癌组织中 *Polu* 表达明显高于Ⅰ期和Ⅱ期( $P < 0.05$ ),提示 *Polu* 高表达可能与肿瘤的进展有关。*Polu* 在人肺癌组织和癌旁组织是高表达的,并且在不同分化程度以及不同分期的肺癌中的表达是不一样的,恶性程度越高、分期越晚,其表达水平越高,从而预后越差。所以导致本研究中生存 3 年以下者肺癌 *Polu* 表达明显高于 3 年以上者( $P < 0.05$ ),提示 *Polu* 表达水平也可作为判断肺癌预后的指标。吸烟对 *Polu* 表达也有一定影响,吸烟患者 *Polu* 表达高于非吸烟患者( $P < 0.05$ )。另外,在肺癌组织和癌旁组织中 *Polu* 基因的表达水平明显高于正常肺组织中表达水平。总之,*Polu* 表达水平与肺癌的发生、发展密切相关,有可能作为肺癌生物学特征和预后判断的参考指标。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, *et al.* Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers [ J ]. *Cell*, 1997, 90 ( 4 ): 809-819.

[ 2 ] McDonald JP, Rapić-Otrin V, Epstein JA, *et al.* Novel human and mouse homologs of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase eta [ J ]. *Genomics*, 1999, 60( 1 ): 20-30.

[ 3 ] Tissier A, McDonald JP, Frank EG, *et al.* Pol iota, a remarkably error-prone human DNA polymerase [ J ]. *Genes Dev*, 2000, 14 ( 13 ): 1642-1650.

[ 4 ] Gening LV, Grishina EE, Petrochenkov AN, *et al.* Association between high activity of DNA polymerase iota and the development of human uveal melanoma [ J ]. *Genetika*, 2006, 42 ( 1 ): 98-103.

[ 5 ] Yang J, Chen Z, Liu Y, *et al.* Altered DNA polymerase iota expression in breast cancer cells leads to a reduction in DNA replication fidelity and a higher rate of mutagenesis [ J ]. *Cancer Res*, 2004, 64 ( 16 ): 5597-5607.

[ 6 ] 赵 谦, 杨 劲, 金锡御, 等. *Polu* 与移行细胞癌发生关系的实验研究 [ J ]. *现代生物医学进展*, 2007, 7( 10 ): 1513-1516.

[ 7 ] 钮建中, 陈爱芳. 某社区居民吸烟情况分析 [ J ]. *上海预防医学杂志*, 2004, 16( 4 ): 194-195.

[ 8 ] Jain R, Nair DT, Johnson RE, *et al.* Replication across template T/U by human DNA polymerase-iota [ J ]. *Structure*, 2009, 17 ( 7 ): 974-980.

[ 9 ] Washington MT, Johnson RE, Prakash L, *et al.* Human DNA polymerase iota utilizes different nucleotide incorporation mechanisms dependent upon the template base [ J ]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 ( 2 ): 936-943.

[ 10 ] Choi JY, Lim S, Eoff RL, *et al.* Kinetic analysis of base-pairing preference for nucleotide incorporation opposite template pyrimidines by human DNA polymerase iota [ J ]. *J Mol Biol*, 2009, 389 ( 2 ): 264-274.

[ 11 ] Johnson RE, Prakash L, Prakash S. . Biochemical evidence for the requirement of Hoogsteen base pairing for replication by human DNA polymerase iota [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 ( 30 ): 10466-10471.

[ 12 ] Nair DT, Johnson RE, Prakash L, *et al.* Human DNA polymerase iota incorporates dCTP opposite template G via a G. C + Hoogsteen base pair [ J ]. *Structure*, 2005, 13( 10 ): 1569-1577.

[ 13 ] Prakash S, Johnson RE, Prakash L. Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function [ J ]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 317-353.

[ 14 ] Kirouac KN, Ling H. Structural basis of error-prone replication and stalling at a thymine base by human DNA polymerase [ J ]. *EMBO J*, 2009, 28( 11 ): 1644-1655.

[ 15 ] 余应年. 细胞信号转导、DNA 聚合酶与体细胞基因突变 [ J ]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16( 10 ): 929-930.

[ 收稿日期 ] 2009 - 07 - 14 [ 修回日期 ] 2009 - 09 - 24  
[ 本文编辑 ] 韩 丹