

子生物学水平逐步研究至对临床治疗起指导作用的意义。

参考文献

- Oh KS, Bustin M, Mazur SJ, *et al.* UV - induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair - deficient XP - B cells[J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(1): 5 - 15
- Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double - strand break repair in somatic mammalian cells[J]. Biochem J, 2009, 423(2): 157 - 168
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double - strand break repair pathway choice[J]. Cell Res, 2008, 18(1): 134 - 147
- San FJ, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination[J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 229 - 257
- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, *et al.* ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation - induced DNA double - strand breaks in G2[J]. EMBO J, 2009, 28(21): 3413 - 3427
- Lieber MR. The mechanism of double - strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end - joining pathway[J]. Annu Rev Biochem, 2010, 79: 181 - 211
- Gu J, Lu H, Tiffin B, *et al.* XRCC4: DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps[J]. EMBO J, 2007, 26(4): 1010 - 1023
- Yano K, Morotomi - Yano K, Wang SY, *et al.* Ku recruits XLF to DNA double - strand breaks[J]. EMBO Rep, 2008, 9(1): 91 - 96
- Boboila C, Jankovic M, Yan CT, *et al.* Alternative end - joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7): 3034 - 3039
- Wang M, Wu W, Wu W, *et al.* PARP - 1 and Ku compete for repair

- of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6170 - 6182
- Mariet PO, Florea BI, Persengiev SP, *et al.* Dynamic assembly of end - joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(49): 18597 - 18602
- Ribalto E, Kuhne M, Rief N, *et al.* A pathway of double - strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma - H2AX foci[J]. Mol Cell, 2004, 16(5): 715 - 724
- Downs JA, Jackson SP. A means to a DNA end: the many roles of Ku[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004, 5(5): 367 - 378
- Douglas P, Cui X, Block WD, *et al.* The DNA - dependent protein kinase catalytic subunit is phosphorylated in vivo on threonine 3950, a highly conserved amino acid in the protein kinase domain[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(5): 1581 - 1591
- Uematsu N, Weterings E, Yano K, *et al.* Autophosphorylation of DNA - PKCS regulates its dynamics at DNA double - strand breaks[J]. J Cell Biol, 2007, 177(2): 219 - 229
- Berg E, Christensen MO, Dalla RI, *et al.* XRCC4 controls nuclear import and distribution of Ligase IV and exchanges faster at damaged DNA in complex with Ligase IV[J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(12): 1232 - 1242
- Van HD, Brugmans L, Verkaik NS, *et al.* End - joining of blunt DNA double - strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA - PK and XRCC4[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(1): 43 - 50
- Enders A, Fisch P, Schwarz K, *et al.* A severe form of human combined immunodeficiency due to mutations in DNA ligase IV[J]. J Immunol, 2006, 176(8): 5060 - 5068

(收稿日期: 2012 - 04 - 29)

(修回日期: 2012 - 05 - 22)

乳腺癌脑转移的表观遗传学研究进展

应明真 王雅杰

乳腺癌是我国乃至全球范围内女性最常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年增高和年轻化趋势。虽然总体治疗方法较多,但仍有约 50% 的患者在首次治疗后的 5 年内出现复发转移,包括脑转移在内的远处转移是乳腺癌致死的主要原因。在脑转移的治疗中,传

统手术的价值有限,虽然根治剂量的放疗可以达到治疗目的,但是由此产生的对脑组织的高损伤及致残性,极大程度限制了该手段的应用。相对而言,内科治疗(包括化疗、内分泌治疗和生物靶向治疗)是预防和治疗脑转移的重要手段^[1]。

一、乳腺癌脑转移的临床及分子病理学特征

研究表明,中枢神经系统的转移本身具有较强的侵袭性,约 50% ~ 75% 的脑转移患者为多发性颅内转移灶,缺乏像内脏和骨转移一样有效的治疗手段,往往预后不良^[2]。Dawood 等^[3] 研究结果显示以脑转移为首发部位的乳腺癌其中位生存时间为 5.8 个月,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072175, 81102010);上海市科委基金资助项目(06DZ19505, 114119a7500);上海市卫生局科研项目(2009113, 2011198);上海市重点学科建设项目(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,教授,博士生导师,主任医师,电子信箱: yajiewa0459@163.com

and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2010 16: 1509 – 1519

9 Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2 – positive advanced gastric or gastro – oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open – label, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2010, 376: 687 – 697

10 Jørgensen JT. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer [J]. Oncology, 2010, 78: 26 – 33

11 Iqbal S, Goldman B, Lenz HJ, *et al.* S0413: a phase II SWOG study of GW572016 (lapatinib) as 1st line therapy in patients (pts) with advanced or metastatic gastric cancer[J]. J Clin Oncol, 2007, 25:4621

12 Hecht JR, Urba SG, Koehler M, *et al.* Lapatinib monotherapy in recurrent upper gastrointestinal malignancy: phase II eYcacy and biomarker analyses[J]. Proc GI ASCO, 2008: 43

13 Kang Y, Ohtsu A, Van Cutsem E, *et al.* AVAGAST: A randomized, double – blind, placebo – controlled, phase III study of first – line capecitabine and cisplatin plus bevacizumab or placebo in patients with advanced gastric cancer (AGC) [J]. Journal of Clinical Oncology, 2010, 28(18): 18s(abstr LBA4007)

14 Sun W, Powell ME, O'Dwyer P, *et al.* A phase II study: combination of sorafenib with docetaxel and cisplatin in the treatment of metastatic or advanced unresectable gastric and gastroesophageal junction (GEJ) adenocarcinoma (ECOG 5203) [J]. J Clin Oncol, 2008, 26:4535

15 Morgensztern D, McLeod HL. PI₃K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy[J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(8):797 – 803

(收稿日期:2012 – 05 – 24)

(修回日期:2012 – 06 – 25)

NHEJ 途径修复 DSB 的研究进展

孟荣荣 应明真 王雅杰

一个活细胞的基因组时常受到来自内源性和外源性因素的损伤,包括活性氧和电离辐射损伤的风险。为维护基因组的完整性和预防癌症的发生,迅速和适当的修复受损 DNA 是必不可少的。DNA 双链断裂(DSB)是最有害的 DNA 损伤类型,并且是由一些化疗药物、电离辐射、紫外线辐射、微束激光、重离子辐照诱导^[1]。未受到保护的 DSB 周围遗传信息常导致细胞内核溶解活性缺失的风险,而 DSB 立即早期的反应对于准确的 DSB 修复和基因组维护是至关重要的。因此,为了及时和准确的维修,细胞必须迅速回应 DNA 双链断裂。NHEJ 主要是在哺乳动物细胞中的 DNA 双链断裂的修复过程。故本综述以下主要介绍 NHEJ 途径及其核心因素的研究进展。

一、哺乳动物中 DSB 修复途径的选择

在哺乳动物中,DSB 可以通过两种机制修复:同源重组(HR)和非同源末端连接(NHEJ)^[2]。HR 利用姐妹染色单体固定模板,因此只限于发生在细胞周期晚 S 和 G₂ 期。另一方面,NHEJ 能直接重新连接

两个断裂的 DNA 末端,从而不需要为 DSB 修复的同源序列。在当前的 DSB 修复研究的主要问题之一是细胞周期对于 HR 和 NHEJ 途径的依赖性选择的分子机制^[3]。NHEJ 的活跃贯穿整个细胞周期,而在 S 后期和 G₂ 期 HR 和 NHEJ 可共修复 DSB。HR 在所有生物体从细菌到人类是一个保守机制,并且在维护基因组稳定性中起着至关重要的作用^[4]。HR 通过利用一个完整的姐妹染色单体作为修复模板为 DSB 提供了高度精确的修复,因此,主要限于在哺乳动物中 S 后期和 G₂ 期。NHEJ 任意正常细胞周期起作用,在哺乳动物中是 DSB 修复的主要途径。

二、NHEJ 途径的研究进展

NHEJ 途径是指 DSB 在一些修复元件的参与下直接连接的修复过程。参与 NHEJ 的主要分子有 DNA – PK(一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,由催化亚基 DNA – PKcs 和两个辅助因子 Ku70 和 Ku80 组成的全酶)、DNA 连接酶 IV、X 射线修复交叉互补蛋白 4(XRCC4)等多个分子^[5]。在真核生物中,编码段的连接依赖 NHEJ,其包括多个生化事件^[6]。

NHEJ 的第 1 步涉及的异源二聚体的 Ku 蛋白结合于双链 DNA 的末端。DNA 结合 Ku 蛋白招募 DNA 依赖蛋白激酶催化亚基(DNA – PKcs),并激活其激酶活性。在体内 DNA – PK 底物的活性仍有待确定。有证据表明,DNA – PKcs 发生自身磷酸化,调节其

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072175,81102010);上海市科委基金资助项目(06DZ19505,114119a7500);上海市卫生局科研项目(2009113,2011198);上海市重点学科建设项目(B905)

作者单位:200433 上海,第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者:王雅杰,教授,博士生导师,主任医师,电子信箱:yajiewa0459@163.com

与 DNA 结合,发挥连接断裂 DNA 双链的功能。DNA 结合 Ku'蛋白也可以募集 DNA 连接酶 IV 和 XRCC4 的,这与它紧密关联。DNA 连接酶 IV/XRCC4 复合体存在于内源性前腺嘌呤核苷酸。募集的 DNA 连接酶 IV/XRCC4 形成一个严密的复合体,导致 Ku 蛋白向内移位,使 AMP 连接酶腺苷酸复杂的基团以瞬时连接到 DNA 末端。有效地催化两个适合的 DNA 末端重新连接,而对于不相容和不匹配的 DNA 末端有相当较小程度的连接^[7]。在连接不相容和不匹配的 DNA 末端时,XLF 对 XRCC4/LigIV 复合体有刺激性活化作用。在 DNA 依赖方式 XLF 与 Ku 相互作用,似乎可以去测知 DSBS 并且连接 DNA^[8]。除了传统的 NHEJ,最近的研究表明,细胞内存在一个微型的同源性依赖的另一种 NHEJ。这种类型的加盟与广泛的缺失有关,因为它采用小的同源性区域。虽然确切的机制尚不清楚,它已被证明另一种不依赖 Ku70/Ku80 异源二聚体和连接酶 IV 的 NHEJ 途径^[9]。

以前认为 NHEJ 中从一个事件到下一个事件的进展是被具有特殊生物功能的核心因素有序募集反应所实现的,即如上所述过程。然而,成像分析表明,NHEJ 中的核心因素开始积累在平行双链断裂,同时在 DSB 处形成一个复合物。这表明,NHEJ 是在 DSB 处通过存在的所有核心因素预先组装成的功能结构进行的。因此,新的模式提出了当所有的核心因素在 DSB 的预装配时,NHEJ 是驱动如何从一个事件到下一个事件的问题。此外,有人建议,PARP-1 可能与 Ku70/DNA LigIV 复杂的相互作用,以阻断其活性,在 DNA 损伤^[10]。

三、参与 NHEJ 修复的核心因素

1. Ku 蛋白:Ku 蛋白是 Ku70 和 Ku80 异源二聚体,并形成一个环形结构,是识别 DSB 扮演着至关重要的作用。在人类细胞中,Ku 是最丰富的非组蛋白核蛋白之一,对于 DNA 某端具有极高的亲和力。由于这些特性,在活细胞中,Ku 可快速绑定到新生成的 DNA 双链断裂,在 NHEJ 途径中作为 DSB 传感器。Mariet 等^[11]报道在激光诱导 DSB 中 FRAP 测量蛋白质动力学,Ku 分子位于链断裂的半衰期约 2min。他们观察到 GFP-Ku80 开始在几秒钟内积累在激光诱导损伤的部位,然后约 3min 达到最高水平。在最大的积累后,损坏部位的大量 GFP-Ku80 逐渐降低,约 20% 的累计蛋白质在 2h 时保持在受损部位,这似乎反映了正在进行 DSB 修复的时间进程,当然不仅在异染色质中可观察到 GFP-Ku80 的积累,在有丝分

裂细胞中的染色体也可见其高度浓缩^[12]。此修复率比其他 NHEJ 蛋白的慢,可能是因为 Ku 蛋白环形结构紧密结合在 DNA 末端。Ku 募集反应不需要其他的 NHEJ 因素,因为在缺乏 DNA-PKcs 和 XRCC4 细胞中 GFP-Ku80 聚集在 DSB。这个观察支持这个想法,Ku 是最初的 DSB 的反应因子,并为随后的蛋白质组装的提供支架。研究发现,NHEJ 途径中 Ku70 功能缺失会增加细胞对电离辐射或甲基化类抗肿瘤药物的敏感性^[13]。

由于 Ku 是在整个细胞周期细胞核含量丰富,并且对于 DNA 末端具有极高的亲和力,Ku 在任何情况下总是第 1 个募集在 DSB 处似乎是可能的。据推测自从 Ku 的环状结构允许 Ku 蛋白沿着 DNA 链转移,其他 DSB 修复/传感因素的能使 DSB 处 Ku 局部化。TUNEL 法使用末端脱氧转移酶可以使通过激光或电离辐射产生的细胞核内的 DNA 双链断裂的位置可视化,强烈表明 Ku 结合的 DNA 两端使其他蛋白质易于进入。

2. DNA-PKcs:DNA 依赖蛋白激酶的催化亚基(DNA-PKcs)属于磷酸肌醇 3 激酶相关蛋白激酶家族,仅在脊椎动物中发现。DNA-PKcs 可在多个位点发生磷酸化,包括自磷酸化位点^[14]。携带有主要磷酸化位点突变或激酶活化的激活位点突变的 YFP-DNA-PKcs 可以正常地聚集在 DSB 位点,但是不能持续保留在损伤位点^[15]。磷酸化突变 DNA-PKcs 的缓慢分离的一个原因可能是在表达的磷酸化突变的 DNA-PKcs 的细胞中 NHEJ 反应是无效的。然而 FRAP 分析重新揭示在 DSB 处突变的 DNA-PKcs 这种缓慢的解离的另一种可能的解释。在 FRAP 分析中,在 DSB 处的野生型 DNA-PKcs 的荧光性在荧光漂白后恢复约 60%。然而,在多个磷酸化位点突变和激酶失活的 DNA-PKcs 在荧光漂白后重新恢复非常缓慢,这些突变的 DNA-PKcs 比野生型 DNA-PKc 的最大回收率非常低。FRAP 分析这些意见表明,自磷酸化与招募在 DSB 处的 DNA-PKcs 的动力有关,在 NHEJ 中 DNA-PKcs 的磷酸化功能意义的理解提供新的线索。

在 DNA 依赖方式中,与相关 Ku 的 DNA-PKcs 形成一个功能齐全的 DNA-PK 的全酶。Uematsu 等^[15]报道在激光诱导损伤部位 YFP 标记的 DNA-PKcs 的动态行为。YFP-DNA-PKcs 对 DSB 诱导的损伤迅速做出反应,聚集在损伤部位。在 Ku80 缺陷的细胞,YFP-DNA-PKcs 不积聚在 DNA 双链断裂,

并且在 Ku80 缺陷细胞中介入功能性 Ku80 可复苏 YFP-DNA-PKcs 对 DSB 重新做出反应,这清楚地表明 Ku 对于 DNA-PKcs 的响应 DSB 至关重要的作用。众所周知 DNA-PKcs 与 XRCC4 相互作用,但这样的生化相互作用对于 DSB 诱导的 DNA-PKcs 的初步反应不是必需的,因为通常在 XRCC4 的缺陷细胞中 DNA-PKcs 能正常聚集在 DNA 双链断裂处。在 XRCC4 的缺陷细胞中的 DNA 双链断裂处积累的 YFP-DNA-PKcs 解离是明显延长的,主要是由于缺乏 XRCC4 导致修复效率低。

3. XRCC4/lig4: DNA 连接酶 IV 在其氨基端有一保守的 DNA 连接酶结构域和与其羧基端域有串联的 BRCT 域。C-末端两个 BRCT 域的地区,是需要与 XRCC4 交互作用的。与 DNA 连接酶 IV 的相互作用的 XRCC4 的共结晶区域表明, XRCC4 的一个球状的头部区域和两个卷曲螺旋中有一小弯与 DNA 连接酶 IV 的相互作用。有研究显示, XRCC4 控制连接酶 IV 的入核转运和分布,并且在 DNA 损伤处使 DNA 连接酶 IV 复合体交流加速^[16]。虽然尚未确定的 DNA 连接酶 IV 的晶体结构,但是其他 DNA 连接酶的结构已得到解决,并在参与保守的连接酶域提供了重要的见识。连接酶 N-端区域(域 1)包括腺苷酰作用的位点涉及一个高度保守的基环绕在 ATP 一部分基团的周围。第 2 个域,通常被称为 OB(寡结合)或结构域,包括进一步保守的催化所需的基序。

XRCC4/DNA 连接酶 IV 是能够连接断裂链,即使在突变点反平行链不能连接至少两个碱基对(4 个氢键)稳定两个 DNA 末端。然后其余的单链断裂可作为一个单链损伤被修补。一些证据表明,在 XRCC4 的和连接酶 IV 遗传变异可促进基因组不稳定和放射敏感性。XRCC4 截断突变导致各自细胞株蛋白质和放射敏感的表型的缺乏。XRCC4 的突变的细胞系,双链断裂修复的效率和保真度显著降低^[17]。源于放射敏感性的白血病患者 180BR 细胞系的特点是存在于连接酶 IV 的催化中心的 R278H 突变,可导致突变酶的活性受损。在人类连接酶 IV 的突变连接酶 IV 综合征、畸形相关的疾病、免疫缺陷、细胞的放射敏感性与染色体不稳定相关^[18]。这种综合征的临床表型和缺乏 XRCC4、连接酶 IV 或任何其他 NHEJ 因素的严重联合免疫缺陷病(SCID)的小鼠相类似。

迄今为止,由于缺乏大型的人口数据与放射敏感性相关联,在总人口中或在癌症患者中 XRCC4 和 LIG4 多态性能否赋予放射诱发肿瘤的易感性是不清

楚。只有很少的基因研究,旨在评估 XRCC4 和 LIG4 基因和人类的放射敏感性的遗传变异之间的关系。威尔丁等人未能找到从英国塞拉菲尔德核燃料设施的无癌前工人的外周血 T 淋巴细胞 XRCC4 的变种和易位频率之间的关联。Borgmann 等报道在连接酶 IV 中突变在淋巴母细胞株放射敏感的患者,颈部和头部肿瘤放疗后出现严重的不良反应。然而,这种突变的杂合子也被发现在无癌前对照,在一般人群中这种删除是比较常见的多态性。这种缺失并不影响连接酶 IV 基因的编码序列,这表明遗传的改变最有可能是功能的缺失。

4. XLF: XLF 的结构上与 XRCC4 相似,在物理上与其相互作用。并刺激 XRCC4/LigIV 复合体中 DNA 连接酶的活性。XLF 的刺激活动,尤其对于不相容或不匹配的 DNA 末端的连接是至关重要的。XLF 形成一个卷曲螺旋区域同二聚体,具有球状域的氨基末端的, C-端延伸区域。XLF 的是目前已知与 DNA-PKcs 和 Ku 相互作用,因此,所有 4 个 NHEJ 的重要组成部分彼此间相互作用。

一度 XLF 被认为在活细胞中与 XRCC4 一起迁移到 DSB 的,因为最初确定 XLF 被认为是一个与 XRCC4 的相互作用的蛋白。然而,在活细胞中 XLF 的成像清楚地表明, XLF 的募集在 DSB 处于 XRCC4 存在无关。FRAP 测试分析表明,在 DNA 双链断裂募集的 XLF 由 XRCC4 稳定。XLF 募集至 DSB 处需要 Ku,但不需要 DNA-PKcs。因此, Ku 是 XLF 募集到链断裂的唯一重要因素。募集后的 XLF,据生物化学研究观察通过蛋白质相互作用, XRCC4 维持其稳定性。使用高纯度的 XLF 和 Ku 蛋白的凝胶移位和蛋白质相互作用的分析表明, Ku 和 XLF 之间的相互作用是依赖 DNA 的。

四、展 望

NHEJ 途径作为真核生物中 DSB 修复的主要途径之一,充分研究其作用过程以及构成组分具有重要的意义。参与该途径的蛋白分子彼此间相互作用共同完成 DNA 损伤修复,活细胞成像分析表明,在 DSB 处已募集 NHEJ 因素的动态和持续的交换,并且这种动态的蛋白质行为可能推动 NHEJ 反应。这种动态和连续的蛋白质交换可能有助于调节每个生化事件形成 NHEJ 最佳机械结构的较适秩序,并且促进 NHEJ 能从一个步骤及时地到下一步。另一种猜测是从观测中得到的,即磷酸化赋予双链断裂处 DNA-PKcs 的流动。通过一系列的研究,我们可以从分