

Ku 蛋白在膀胱癌组织中表达的免疫组织化学研究

魏晓龙¹ 郭和清² 严景民² 周高标² 穆大为²

【摘要】 目的:研究 Ku 蛋白表达与膀胱癌发生、进展的关系。方法:应用 SP 法对 98 例行经尿道膀胱肿瘤电切术(TURBT)、根治性膀胱切除术的膀胱组织标本进行免疫组织化学染色;应用形态计量学分析方法结合临床相关病理资料分析 Ku 蛋白表达与膀胱癌肿瘤相关指标的关系。结果:98 例膀胱癌组织中 Ku 蛋白总阳性表达数为 79 例(80.61%)。67 例非肌层浸润性膀胱癌组织中 Ku 蛋白阳性表达数为 60 例(89.55%),31 例肌层浸润性膀胱癌中 Ku 蛋白阳性表达数为 19 例(61.29%),两者差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。图像分析结果:肌层浸润性膀胱癌组($2\ 453.05 \pm 221.24$)和非肌层浸润性膀胱癌组($4\ 349.41 \pm 307.20$)之间积分光密度的差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。肿瘤组织($3\ 605.67 \pm 1\ 024.80$)与癌旁组织(396.84 ± 60.24)之间积分光密度的差异度亦有显著统计学意义($P < 0.01$)。结论:Ku 蛋白可能在膀胱癌进展的过程中发挥着重要作用。早期 Ku 蛋白表达增加是膀胱癌发生的一个重要因素。晚期 Ku 蛋白表达下调与膀胱癌的侵袭性密切相关。

【关键词】 Ku 蛋白;膀胱癌;肌层浸润的;免疫组织化学;图像分析

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2013)10-0760-04

Immunohistochemical study on the expression of Ku proteins in carcinoma of bladder

WEI Xiaolong¹ GUO Heqing² YAN Jingmin² ZHOU Gaobiao² MU Dawei²

(¹Air Force Clinical of Anhui Medical University, Hefei, 230032, China; ²Department of Urology, Air Force General Hospital of PLA)

Corresponding author: GUO Heqing, E-mail: guoheqing@sina.com.cn

Abstract Objective: To study the correlation between the expression of Ku proteins and the development and progression of carcinoma of bladder. **Method:** Ku proteins expression levels of 98 cases of samples which were obtained surgically by transurethral resection of bladder (TURBT) or radical cystectomy were examined by immunohistochemistry. The results were analyzed by morphometric analysis combined with the clinicopathologic data. **Result:** Of the 98 cases, 79 cases were positive for the expression of Ku proteins (80.61%). The percentage of positive expression of Ku proteins in the non muscle-invasive bladder cancer group (89.55%, 60/67) was significantly higher ($P < 0.01$) than that of the muscle-invasive bladder cancer group (61.29%, 19/31). Morphometry demonstrated that mean optical density levels of Ku proteins of the non muscle-invasive bladder cancer group ($4\ 349.41 \pm 307.20$) was significantly higher ($P < 0.01$) than that of the muscle-invasive bladder cancer group ($2\ 453.05 \pm 221.24$). There was a significant difference ($P < 0.01$) between the carcinoma ($3\ 605.67 \pm 1\ 024.80$) and the bladder tissues adjacent to the carcinoma (396.84 ± 60.24). **Conclusion:** Ku proteins may play an important role in the progressive processes. The increasing expression of Ku proteins may be one important mechanism of earlier phases of bladder cancer genesis. The down-regulating expression of Ku proteins is closely related with the invasion of carcinoma of bladder.

Key words Ku proteins; carcinoma of bladder; muscle-invasive; immunohistochemistry; image analysis

Ku 蛋白是由 Ku70 和 Ku80 两个亚基组成的异源二聚体,在 1981 年作为自身抗原最先在多发性肌炎-硬皮病重叠综合征患者体内被发现^[1]。Ku 蛋白作为一种 DNA 结合蛋白,与 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)的催化亚基(DNA-PKcs)共同组成 DNA-PK,通过非同源性末端连接(DNA non-homologous end joining, NHEJ)途径激活 DNA-PKcs,在 DNA 双链断裂(DNA double strand breaks, DSBs)修复中发挥重要作用^[2,3]。同时参

与 DNA 复制、转录、热休克反应、端粒末端精细结构等的调节,在维持染色体的完整性和细胞生存中起着重要作用,同时具有调控凋亡的作用^[4]。近年来的研究表明 Ku 蛋白与肿瘤的发生、发展密切相关,在乳腺癌、子宫内膜癌等肿瘤中已证实其表达会增加。Ku 蛋白的表达与肿瘤生物学行为亦相关,其表达不但与肿瘤的病理类型、分期以及侵袭有关,还与肿瘤的发展状况与阶段有关^[5,6]。探讨 Ku 蛋白在膀胱癌中发生、进展的作用对阐明膀胱癌进展的分子机制具有重要意义。本文收集 2000 年 1 月~2012 年 12 月在中国人民解放军空军总医院

¹安徽医科大学空军临床学院(合肥,230032)

²中国人民解放军空军总医院泌尿外科

通信作者:郭和清, E-mail: guoheqing@sina.com.cn

住院行外科手术切除、甲醛固定、石蜡包埋的膀胱组织标本 98 例,复习全部病例的临床材料,应用免疫组化及形态计量学分析方法,并结合临床病理资料研究 Ku 蛋白与膀胱癌发生、进展的关系,为临床病例生存预后提供参考资料。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组 98 例,男 80 例,女 18 例,年龄 28~87 岁,平均 64.6 岁。复查原病理切片,每例选择有代表性的蜡块 1~2 个,5 μm 厚连续切片,行 HE 染色。按 2009 年国际抗癌协会第 7 版 TNM 分期对组织标本进行统一命名和分期。其中非肌层浸润性膀胱癌(包括 T_a 、 T_1 、 T_{is})67 例,肌层浸润性膀胱癌(包括 T_2 及其以上)31 例。所有患者术前均未进行放射治疗、全身化疗及膀胱灌注治疗。

1.2 免疫组织化学

主要试剂:鼠抗人抗特异性 Ku70/80 单克隆抗体(ab3108)(Abcam, UK);羊抗鼠 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(Dako, Denmark)。染色方法按试剂盒说明书进行,DAB 显色。以 PBS 液代替一抗作阴性对照。结果判定:阳性细胞的判定为细胞核上呈现棕黄色为阳性,未见着色细胞者为阴性^[7]。

1.3 形态计量学分析 Ku 蛋白的表达

利用 CMIAS 多功能真彩色病理图像分析系统(北京航空航天大学与中国人民解放军空军总医院联合开发)对 Ku 蛋白免疫组化染色后的病理图像进行形态学定量分析。图像定量分析法具体步骤如下:①将切片置于 OLYMPUS BX50 镜下,经显微镜三目摄像接口和 1.25 \times 40 的摄像目镜后,连接与日产 JVC 专业摄像系统,将视频信号传送到专业图像卡和计算机中,使切片图像实时地显示在计算机监视器上,并以数值化后的图像格式进行计算机存储与分析。②每张切片在显微镜物镜 \times 40 下随机选择 8 个视野进行彩色图像采集与存储,图像分析时先进行阳性目标(靶目标)的彩色分隔、编辑,计算每个视野的靶目标中的积分光密度值,平均后代表每个样品的染色强度和丰度,计算各组间参数的标准值、标准误、变异系数等。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行 χ^2 检验和 t 检验,定量分析结果用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,定义 $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 Ku 蛋白在肌层浸润性/非浸润性膀胱癌中的表达情况

98 例膀胱癌组织中,表达阳性者 79 例(80.61%)。在 67 例非肌层浸润性膀胱癌组织中,Ku 蛋白表达阳性者 60 例(89.55%);在 31 例肌层

浸润性膀胱癌组织中,Ku 蛋白表达阳性者 19 例(61.29%)。统计学分析显示,两组 Ku 蛋白表达阳性和阴性差异有统计学意义($\chi^2=10.83, P<0.01$),见表 1。

表 1 Ku 蛋白在肌层浸润性/非浸润性膀胱癌中的表达情况例(%)

分组	Ku 蛋白表达		
	阳性	阴性	合计
非肌层浸润癌组	60(89.55)	7(10.45)	67(68.36)
肌层浸润癌组	19(61.29)	12(38.71)	31(31.64)
合计	79(80.61)	19(19.39)	98(100.00)

2.2 Ku 蛋白表达的形态计量学分析及其与肿瘤生物学指标关系

所有膀胱组织 Ku 蛋白免疫组化染色的病理图像形态学分析结果与膀胱癌肿瘤的相关指标的关系(表 2)。

表 2 Ku 蛋白表达(积分光密度)与膀胱癌相关病理参数的关系

临床病理指标	例数	积分光密度值 ($\bar{x}\pm s$)	t/F 值	P 值
肌层浸润			$t=28.12$	<0.01
有	31	2 453.05 \pm 221.24		
无	67	4 349.41 \pm 307.20		
组织学分化			$t=3.67$	<0.01
高分化	63	4 037.82 \pm 111.65		
中-低分化	35	3 321.90 \pm 168.15		
肿瘤或癌旁组织			$t=14.77$	<0.01
肿瘤组织	20	3 605.67 \pm 1 024.80		
癌旁组织	20	396.84 \pm 60.24		

对图像分析测定的积分光密度值进行统计学分析(t 检验及方差分析),结果表明,Ku 蛋白表达在膀胱癌肌层浸润组和非浸润组之间差异有显著统计学意义($P<0.01$),肿瘤组织及肿瘤旁组织之间 Ku 蛋白的表达强度差异有显著统计学意义($P<0.01$),并且在肿瘤组织学分化方面 Ku 蛋白的表达差异也具有显著统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

DNA 是细胞最重要的遗传物质。多种外源性损伤如电离辐射、拟放射药物、拓扑异构酶毒剂等及内源因素如细胞代谢时的氧化损伤、淋巴细胞成熟过程中的 V(D)J 重排、DNA 复制时的自然产生等都可以产生 DSBs,是发生在基因组水平上最严重的 DNA 损伤形式之一。正确的 DSBs 修复对维持生物体的基因组完整性和正常的生理功能至关重要^[8,9]。生物体 DSBs 两大修复途径为:同源重组(homologous recombination, HR)途径和非同源末端连接(NHEJ)途径,真核生物尤以 NHEJ 途径

普遍^[10,11]。当前研究表明^[12,13],肿瘤是由于一系列的基因表达、DNA 结构的缺陷或变异导致控制细胞生长、分化、死亡机制的紊乱或基因组的不稳定而引发的多基因紊乱性疾病。NHEJ 修复途径在保护基因组的稳定性而抑制肿瘤发生和进展方面起着重要作用。

近年来发现 NHEJ 修复途径是通过 DNA-PK 介导的。DNA-PK 是由 Ku70 及 Ku80 异二聚体组成的调节亚基和催化亚基 DNA-PKcs 构成。其中 Ku70/80 作为一种结合蛋白,在 DNA-PK 介导的 NHEJ 修复途径中扮演着重要角色,同时 Ku70/80 与端粒结构的维持亦关系密切,考虑 Ku 蛋白可作为一个肿瘤抑制蛋白^[14]。因而 Ku70/80 在肿瘤发生、发展过程中的作用的研究引起人们的关注。已发现多种实体的肿瘤细胞和组织表达 Ku70/80,同时发现 Ku70/80 与肿瘤生物学行为、肿瘤的放疗耐受密切相关。如在人类肿瘤中的乳腺癌、结肠癌、黑色素瘤、宫颈癌、淋巴瘤细胞中可检测到 Ku70/80 的表达,并且发现 Ku70/80 的表达高低与肿瘤的恶性程度具有相关性,并与其增殖速度有关^[15~17]。

对 Ku 蛋白功能的研究多数是以细胞系为模型的体外实验,以人体标本为实验基础的研究还不是很多,且这些研究的结果也不尽相同。研究发现,Ku70/80 基因是一个 caretaker 基因,其缺失会大大增加肿瘤的易感性^[18]。Difilippantonio 等^[19]对敲除 Ku 基因的小鼠研究发现,敲除 Ku70 基因可造成成纤维细胞姐妹染色体互换率增高及淋巴瘤的发生,而敲除 Ku80 基因的小鼠,虽不自发产生肿瘤,然而成纤维细胞表现出明显的染色体畸形。其他的动物研究也证实 Ku 基因在维持基因的完整性及抑制肿瘤的发生中起着重要作用。然而,对人体组织标本 Ku 蛋白的研究结果并不完全一致。Holgerson 等^[20]比较了恶性淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤患者肿瘤组织与正常人的骨髓、扁桃腺及淋巴结组织内 Ku70/80 的表达,发现除多发性骨髓瘤外,Ku70/80 的表达的高低与肿瘤的恶性程度密切相关,并与其增殖速度有关。Rigas 等^[21]比较了人正常结肠组织、结肠腺瘤、结肠癌和结肠癌周边的正常组织中 Ku 蛋白的表达水平,发现结肠腺瘤中 Ku70/Ku80 水平只有结肠癌的 1/3~1/2 水平,但两者均较正常结肠组织低,因此认为腺瘤阶段 Ku70 和 Ku86 的低表达达对结肠癌的发展起关键性的作用。

本研究应用免疫组化方法检测膀胱癌组织中 Ku 蛋白的表达情况,结果发现:在膀胱癌细胞及癌旁组织细胞中均可见染色呈棕黄色颗粒的 Ku 蛋白表达,颗粒位置主要位于细胞核。说明 Ku 蛋白作为一种重要的 DNA 修复蛋白的组成成分,在

良、恶性组织细胞中均发挥着生物学作用。进一步对 Ku 蛋白免疫组化染色后的病理图像进行形态学定量分析发现,膀胱癌组织中 Ku 蛋白的表达丰度明显高于癌旁膀胱组织,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$),这点与 Stronati 等^[22]的研究结果类似。证明早期 Ku 蛋白的表达上调与膀胱癌的发生密切相关。Ku 蛋白作为 DNA 修复蛋白,在癌旁细胞中 Ku 蛋白的表达量很低,而在膀胱癌中其表达量增高,说明 DNA 修复加快、破坏的 DNA 增多可能是肿瘤的一个重要特点。同时非肌层浸润性膀胱癌组织中 Ku 蛋白阳性表达率明显较肌层浸润性膀胱癌组织高,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。进一步对图像分析测定的积分光密度分析,显示 Ku 蛋白在肌层浸润性膀胱癌组与非肌层浸润性膀胱癌组织之间的表达丰度有明显差异,表达差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。说明 Ku 蛋白在肿瘤进展期表达下调与膀胱癌侵袭性密切相关。

[参考文献]

- 1 Mimori T, Akizuki M, Yamagata H, et al. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap [J]. *J Clin Invest*, 1981, 68(3): 611-620.
- 2 Lieber M R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 181-211.
- 3 Grob P, Zhang T T, Hannah R, et al. Electron microscopy visualization of DNA-protein complexes formed by Ku and DNA ligase IV [J]. *DNA Repair*, 2012, 11 (1): 74-81.
- 4 Fleck O, Nielsen O. DNA repair [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 4): 515-517.
- 5 Sibanda B L, Chirgadzhe D Y, Blundell T L. Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats [J]. *Nature*, 2010, 463 (7277): 118-121.
- 6 Douglas P, Cui X P, Block W D, 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.
- 7 Liu Q H, Li L M, Wang J F. Expression and significance of hTERT, P53 and Ki-67 in astrocytoma by tissue microarray [J]. *Chin Remedies Clin*, 2005, 5(5): 354-356.
- 8 Lu H, Shimazaki N, Raval P, et al. A biochemically defined system for coding joint formation in V(D)J recombination [J]. *Mol Cell*, 2008, 31(4): 485-497.
- 9 Mahaney B L, Meek K, Lees-Miller S P. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by

- non-homologous end-joining [J]. *Biochem*, 2009, 417 (3): 639–650.
- 10 Neal J A, Dang V, Douglas P, et al. Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(8): 1719–1733.
 - 11 Hammel M, Yu Y, Mahaney B L, et al. Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(2): 1414–1423.
 - 12 Yu Y, Mahaney B L, Yano K, et al. DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks [J]. *DNA Repair*, 2008, 7(10): 1680–1692.
 - 13 Lim D S, Vogel H, Willerford D M, et al. Analysis of Ku80-mutant mice and cells with deficient levels of p53 [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(11): 3772–3780.
 - 14 Gaymes T J, Mufti G J, Rassool F V. Myeloid leukemias have increased activity of the non-homologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10): 2791–2797.
 - 15 Korabiowska M, Tscherny M, Grohmann U, et al. Decreased expression of Ku70/Ku80 proteins in malignant melanomas of the oral cavity [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(1A): 193–196.
 - 16 Pucci S, Mazzarelli P, Rabitti C, et al. Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies [J]. *Oncogene*, 2001, 20(6): 739–747.
 - 17 Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 95(6): 1199–1205.
 - 18 Kinzler K W, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers [J]. *Nature*, 1997, 386(6627): 761, 763.
 - 19 Difilippantonio M J, Zhu J, Chen H T, et al. DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation [J]. *Nature*, 2000, 404 (6777): 510–514.
 - 20 Holgersson A, Erdal H, Nilsson A, et al. Expression of DNA-PKcs and Ku86, but not Ku70, differs between lymphoid malignancies [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 77(1): 1–6.
 - 21 Rigas B, Borgo S, Elhosseiny A, et al. Decreased expression of DNA-dependent protein kinase, a DNA repair protein, during human colon carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(23): 8381–8384.
 - 22 Stronati L, Gensabella G, Lamberti C, et al. Expression and DNA binding activity of the Ku heterodimer in bladder carcinoma [J]. *Cancer*, 2001, 92(9): 2484–2492.

(收稿日期: 2013-05-20)

(上接第 759 页)

效有待进一步研究。此外,受 Saber^[8]的启发,该术式用于开展成人睾丸鞘膜积液门诊手术不无可能。

[参考文献]

- 1 Onol S Y, Ilbey Y O, Onol F F, et al. A novel pull-through technique for the surgical management of idiopathic hydrocele [J]. *J Urol*, 2009, 181(3): 1201–1205.
- 2 Kiddoo D A, Wollin T A, Mador D R. A population based assessment of complications following outpatient hydrocelectomy and spermatocelectomy [J]. *J Urol*, 2004, 171(2 Pt 1): 746–748.
- 3 Mihmanli I, Kantarci F. Sonography of scrotal abnormalities in adults: an update [J]. *Diagn Interv Radiol*, 2009, 15(1): 64–73.
- 4 Mihmanli I, Kantarci F, Kulaksizoglu H, et al. Testicular size and vascular resistance before and after hydrocelectomy [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2004, 183(5): 1379–1385.
- 5 那彦群, 郭振华. 实用泌尿外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 569.
- 6 Khaniya S, Agrawal C S, Koirala R, et al. Comparison of aspiration-sclerotherapy with hydrocelectomy in the management of hydrocele: a prospective randomized study [J]. *Int J Surg*, 2009, 7(4): 392–395.
- 7 Darzi A, Mackay S. Recent advances in minimal access surgery [J]. *BMJ*, 2002, 324(7328): 31–34.
- 8 Saber A. New minimally access hydrocelectomy [J]. *Urology*, 2011, 77(2): 487–490.
- 9 王穗, 张湛英, 徐勋, 等. 鞘膜开窗术治疗小儿睾丸鞘膜积液 82 例 [J]. *中华现代外科学杂志*, 2006, 3(3): 241–242.
- 10 Taniel E, Mongiat-Artus P. Treatment of adult hydrocele [J]. *Ann Urol*, 2004, 38(4): 180–185.
- 11 Swartz M A, Morgan T M, Krieger J N. Complications of scrotal surgery for benign conditions [J]. *Urology*, 2007, 69(4): 616–619.
- 12 Kim J K, Shin J H, Lim J S. 10-Year retrospective study of the operative treatment results of adult type hydrocele [J]. *Korean J Urol*, 2008, 49: 82–87.
- 13 Ross L S, Flom L S. Azoospermia: a complication of hydrocele repair in a fertile population [J]. *J Urol*, 1991, 146(3): 852–853.
- 14 Osterman M J, Martin J A. Epidural and spinal anesthesia use during labor: 27-state reporting area, 2008 [J]. *Natl Vital Stat Rep*, 2011, 59(5): 1–13, 16.

(收稿日期: 2012-12-12)