

PARPi 通过抑制 XRCC1 的表达增加食管鳞癌 放射治疗敏感性

李祎萍¹ 张予菲¹ 孙光志² 叶蕴瑶¹ 沈小舟¹ 韩高华^{1,2}

¹(南京医科大学附属泰州人民医院肿瘤科 泰州 225300)

²(南京医科大学附属泰州人民医院放疗中心 泰州 225300)

摘要 探讨 PARP 抑制剂(PARPi)对 XRCC1 的表达以及对食管鳞癌(ESCC)放射治疗敏感性的影响。收集接受直线加速器照射治疗的 ESCC 患者组织标本,免疫组化法检测其中 XRCC1、PARP-1 表达,观察其表达对 ESCC 患者放疗近期疗效的影响。ECA109 细胞经 AZD2281 (PARP 抑制剂)处理后接受加速器照射,检测 PARPi 的放疗增敏比(SER)。利用 RT-PCR 实验检测 AZD2281 联合照射后 XRCC1 mRNA 转录情况,探讨 PARPi 对照射后 ECA109 细胞 XRCC1 mRNA 转录的影响。结果发现, XRCC1 阳性者放疗的客观有效率(ORR)低于阴性者(38.1% vs. 88.9%, $p=0.017$); PARP-1 阳性者放疗的 ORR 低于阴性者(36.8% vs. 81.8%, $p=0.026$)。AZD2281 的浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 时,联合组的 SER=1.744。AZD2281 可增强 ECA109 细胞的辐射损伤作用。照射后 48 h XRCC1 mRNA 相对表达量明显上升;联合 PARPi 可抑制辐射诱导的 XRCC1 mRNA 表达上调。本组结果显示, XRCC1、PARP-1 高表达者放疗近期疗效较差,放疗可诱导 XRCC1 基因转录, AZD2281 能有效抑制辐射诱导的 XRCC1 mRNA 表达上调,其可能的机制是 PARPi 抑制 DNA-PKcs 进而下调 XRCC1 表达。该结果提示 PARPi 可能通过抑制 XRCC1 表达、减少 DNA 损伤修复,从而增加 ESCC 放疗敏感性。

关键词 食管鳞癌,放射敏感性,聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶抑制剂,X射线损伤修复基因-1

中图分类号 R735

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0122

引用该文:

李祎萍,张予菲,孙光志,等. PARPi 通过抑制 XRCC1 的表达增加食管鳞癌放射治疗敏感性[J].

辐射研究与辐射工艺学报, 2023, 41(03): 030303. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0122.

LI Yiping, ZHANG Yufei, SUN Guangzhi, *et al.* PARPi increases radiotherapy sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting XRCC1 expression[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2023, 41(03): 030303. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0122.



PARPi increases radiotherapy sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting XRCC1 expression

LI Yiping¹ ZHANG Yufei¹ SUN Guangzhi² YE Yunyao¹ SHEN Xiaozhou¹ HAN Gaohua^{1,2}

¹(Department of Oncology, Taizhou people's Hospital affiliated to Nanjing Medical University, Taizhou 225300, China)

²(Radiotherapy Center, Taizhou people's Hospital affiliated to Nanjing Medical University, Taizhou 225300, China)

基金资助: 江苏省“六个一工程”课题(LGY2019038)和泰州市“311工程”课题(RCPY201813)资助

第一作者: 李祎萍,女,1980年9月出生,2010年获南京医科大学医学学士学位,研究方向为放射性损伤防护

通信作者: 韩高华,主任医师, E-mail: danny_75@njmu.edu.cn

收稿日期: 初稿 2022-11-09; 修回 2023-01-31

Supported by the Health Top Talent Project of “Six One Projects” in Jiangsu Province (LGY2019038) and the “311 Project” of Taizhou City (RCPY201813)

First author: LI Yiping (female) was born in September 1980 and received her bachelor's degree in medicine from Nanjing Medical University in 2010, majoring in radiation damage protection

Corresponding author: HAN Gaohua, chief physician, E-mail: danny_75@njmu.edu.cn

Received 09 November 2022; accepted 31 January 2023

ABSTRACT This study investigated the effect of poly-ADP ribose polymerase inhibitor (PARPi) on X-ray repair cross complementing 1 gene (XRCC1) expression and radiotherapy sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Tissue samples from patients with ESCC treated with irradiation using a linear accelerator were collected to detect the expression of XRCC1 and PARP-1 with immunohistochemical staining, and the effect of their expression on radiotherapy efficacy was evaluated. A linear accelerator was used to irradiate ECA109 cells after treatment with different concentrations of AZD2281 (a PARP inhibitor) to detect the radiotherapy sensitization ratio (SER) of PARPi. An RT-PCR assay was used to assess the relative expression of XRCC1 mRNA in ECA109 cells treated with irradiation and AZD2281 and to explore the effect of PARPi on the transcription of the XRCC1 gene in ECA109 cells after irradiation. Our data indicated that the objective response rate (ORR) of XRCC1-positive patients was lower than that of XRCC1-negative patients (38.1% vs. 88.9%, $p=0.017$), while the ORR of PARP-1-positive patients was lower than that of PARP-1-negative patients (36.8% vs. 81.8%, $p=0.026$). The SER of the cells treated with irradiation and AZD2281 at a concentration of 3 $\mu\text{mol/L}$ was 1.744, implying that AZD2281 can enhance the irradiation damage of ECA109 cells. The relative expression level of XRCC1 mRNA increased significantly at 48 h after irradiation; however, when combined with PARPi, the radiation-induced up-regulation of XRCC1 mRNA was inhibited. The results of this study showed that patients with ESCC with a high expression of XRCC1 and PARP-1 display poor short-term radiotherapy efficacy and that irradiation can induce XRCC1 gene transcription. AZD2281 effectively inhibited the radiation-induced up-regulation of XRCC1 expression and increased the radiosensitivity of ECA109 cells. A possible mechanism is that PARPi inhibited DNA-PKcs and then down-regulated XRCC1 expression. These results suggest that PARPi may increase the radiotherapy sensitivity of patients with ESCC by inhibiting XRCC1 expression and reducing DNA damage repair.

KEYWORDS Esophageal squamous cell carcinoma, radiotherapy sensitivity, Poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, X-ray cross complementing gene-1

CLC R735

食管癌在我国是一种高发恶性肿瘤,发生率和死亡率在所有恶性肿瘤中排第6名和第4名^[1],食管鳞状细胞癌(Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是最主要的组织学类型。对于颈段、胸上段及晚期ESCC患者,利用直线加速器产生的高能X射线进行辐照治疗(即放射治疗)是重要的治疗手段,一些可手术患者也可能需要接受术前新辅助和术后辅助放射治疗,但是临床上观察到部分患者出现放疗抵抗,导致疗效不佳。放射治疗主要通过高能射线使靶细胞DNA链化学键断裂,造成DNA损伤,从而杀伤肿瘤细胞。辐照引起DNA损伤后,癌细胞通过一系列复杂而精密的途径可修复DNA损伤,因此,抑制细胞DNA损伤修复能力是增加ESCC放射治疗敏感性、提高放射治疗疗效的重要方式。

聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶(Poly(ADP-ribose)polymerase, PARP)与X射线损伤修复基因-1(X-ray cross complementing gene, XRCC1)是DNA损伤修复中碱基切除修复(Base excision repair, BER)途径的关键因子。PARP-1是PARP家族中最丰富和最活跃的酶,可感应受损DNA的存在、激活形成聚ADP核糖(PAR),招募XRCC1至DNA损伤

处作为“支架”,与DNA连接酶III, DNA聚合酶 β 组成复合物,通过BER途径参与DNA单链断裂(Single-strand breakage, SSB)的修复^[2]。研究表明,PARP、XRCC1与多种肿瘤的预后^[3-5]及放化疗敏感性^[6-7]相关。显然,抑制PARP介导的DNA损伤修复可以维持DNA链断裂、激活细胞死亡信号通路从而提高靶细胞的辐射敏感性。近年来,PARPi已被作为一种有效的增敏剂与放射治疗联合用于肺癌^[8]、乳腺癌^[9]、脑胶质瘤^[10]等恶性肿瘤的治疗。PARPi主要通过抑制PAR,从而减少招募XRCC1,但是PARPi对XRCC1的表达有无影响尚不清楚,尤其是高能射线辐照治疗后,ESCC细胞内XRCC1的表达变化是否受到PARPi的影响也未见报道。本研究检测XRCC1、PARP-1在ESCC组织中的表达,观察表达情况与ESCC患者放疗近期疗效的相关性;在ECA109细胞中验证PARPi(AZD2281)对ESCC细胞的放疗增敏作用,并研究PARPi对ESCC细胞放疗后XRCC1表达变化的影响,从而寻找PARPi抑制ESCC修复辐射损伤的新机制,为临床上提高ESCC的放疗疗效提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

医用直线加速器为 Varian Trilogy, 购自瓦里安公司; 免疫组化实验的一抗购自 Affinity Biosciences 公司; 鼠抗人 XRCC1 (AB2833462, 稀释 1:100)、羊抗人 PARP-1 (AB2839150, 稀释 1:75), 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司; 人 ECA109 细胞购于中国科学院上海细胞库; 胎牛血清及青霉素、链霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司; RPMI-1640 培养基购自 Biosharp; MTT 溶液购自 Solarbio 公司; PARP 抑制剂 (olaparib, AZD2281) 购自 selleck 公司; RNA 提取试剂盒 (DP419) 和 Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR103) 购自天根公司; DNA 聚合酶 Taq Plus Master Mix II (Dye Plus), 购自诺唯赞公司; Applied Biosystems PCR 仪购自赛默飞(中国)公司。

1.2 临床研究

收集 2019 年 1 月至 2020 年 12 月期间于泰州市人民医院肿瘤科行根治性放射治疗的局晚期不可切除的 ESCC 患者。纳入标准: (1) 病理诊断为 ESCC; (2) 所有患者在取得标本前未接受任何抗肿瘤治疗; (3) 放射治疗剂量 ≥ 50 Gy; (4) 无放射治疗禁忌症; (5) 入组时 PS 评分 0~1 分。所有患者均进行食管癌根治性放射治疗, 采用三维适形放疗 (3D-CRT) 或调强放疗 (IMRT) 技术, 主要参数包括: 15 MV 的 X 射线等中心照射、源瘤距为 100 cm, 剂量率 450 cGy/min, 2 Gy/次或 1.8 Gy/次, 每周 5 次, 总剂量 50~60 Gy。所有患者放疗结束 1 个月行胸部 CT 及食管钡餐检查, 采用实体瘤疗效评价标准 1.1 (Response evaluation criteria in solid tumours, RECIST 1.1) 进行食管癌近期放疗疗效评估, 按照标准分为完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、疾病稳定 (SD) 和病情进展 (PD), CR 和 PR 患者所占比例定义为客观有效率 (ORR)。

1.3 免疫组化实验

收集患者的胃镜活检标本, 通过免疫组化检测 XRCC1、PARP-1 的表达, 操作严格按试剂盒说明书进行。根据细胞染色强度及阳性染色细胞数所占比例进行综合评分。评分标准为: ①染色强度评分: 0 分为无色, 1 分为淡黄色, 2 分为棕黄色, 3 分为棕褐色; ②阳性细胞比例评分: 视野中阳性细胞占有

肿瘤细胞的比例为 0~4% 为 0 分, 5%~24% 为 1 分, 25%~49% 为 2 分, 50%~74% 为 3 分, 75%~100% 为 4 分。将强度评分和比例评分相乘进行定量积分, 0~4 分定义为阴性表达, 大于 4 分定义为阳性表达。每张切片取 5 个高倍镜视野进行观察、评分, 最后取平均值为最终得分。

1.4 细胞培养

人 ECA109 细胞在含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素、链霉素双抗的 RPMI-1640 培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 恒温箱中培养。细胞生长至 80% 丰度时传代。

1.5 MTT 实验

ECA109 细胞在 96 孔板中长至 50% 丰度时换液, 加入 PARP 抑制剂 (AZD2281), 使其终浓度分别为 1 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L、15 μ mol/L、20 μ mol/L、25 μ mol/L、30 μ mol/L, 每个浓度设 6 个复孔, 并设调零孔 (仅有培养基) 和对照孔 (不含 AZD2281), 继续培养 24 h (3 个孔) 和 48 h (3 个孔) 时分别加入 MTT 以检测细胞增殖情况, 添加了 MTT 的 96 孔板置于恒温箱再培养 4 h, 使用酶标仪于 490 nm 波长处检测各个孔的吸光光度值 (OD 值)。计算各个药物浓度细胞抑制率见式 (1)。

$$\text{细胞抑制率} = 1 - \frac{(\text{药物组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})}{(\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})} \quad (1)$$

进而分别得到 24 h、48 h 的 IC₅₀ 值, 选取 1/8 的 IC₅₀ 值的 AZD2281 浓度为后续细胞克隆形成实验所用的 PARPi 浓度。

1.6 细胞克隆形成实验

生长至 80% 丰度的 ECA109 细胞经消化、离心收集, 完全培养基重悬制成单细胞悬液, 接种至 6 孔板中。根据吸收剂量不同接种不同数量的细胞: 接受 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy 辐照的孔分别接种 250、500、1 000、1 500 个细胞。每个辐照剂量分为 2 组: 单纯辐照组、联合组 (辐照 + AZD2281), 联合组中加入含 AZD2281 的完全培养基 2 mL (AZD2281 终浓度为上述 MTT 实验所确定), 辐照组加入同等体积的完全培养基, 每组设有 3 个复孔。辐照参数包括: 利用 Varian Trilogy 直线加速器, 选择 6 MeV 的电子射线固定源皮距照射, 辐照时培养板上放置 1.5 cm 厚度的有机玻璃板, 使得 SSD=100 cm, 剂量率

400 cGy/min, 分别予以0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy的单次照射。辐照后继续培养, 每3 d换液一次, 每次换液后的培养液条件同前(联合组的培养基中加入AZD2281)。每天观察细胞形态, 当显微镜下观察到有细胞团(细胞团中细胞超过50个)时终止培养。加入4%多聚甲醛固定15 min, 结晶紫染色液染色, 拍照后使用Image J软件计算每组克隆形成数。再计算每组的细胞存活率(Survival fraction, 以 f_s 表示)。见式(2)。

$$f_s = \frac{\text{实验组的克隆数}}{\text{该组细胞种植数} \times \text{贴壁率}} \quad (2)$$

式中: 贴壁率=未照射细胞的克隆数/细胞种植数。

利用SPSS26.0软件按照单击多靶模型拟合并绘制细胞生存曲线, 计算平均致死剂量(Mean lethal dose, D_0), 按照公式(3)计算放射增敏比(Sensitization enhancement ratio, SER, 以 R_{sc} 表示)。SER定义为达到相同生物效应时单纯照射的剂量和联合组的剂量之比。结果以SER大于1为具有放疗增敏性。选择SER最大的照射剂量进行后续实验。

$$R_{sc} = D_{0\text{辐照组}} / D_{0\text{联合组}} \quad (3)$$

1.7 RT-PCR实验

ECA109细胞培养至细胞贴壁后分为4组: 对照组(培养基, 0 Gy)、药物组(AZD2281, 0 Gy)、辐照组(培养基, 4 Gy单次辐照)、联合组(AZD2281联合4 Gy单次辐照), 每组设置3个复孔, 辐照参数同上。辐照后细胞继续培养48 h后, 收集细胞于冰上裂解, 利用RNAsimple总RNA提取试剂盒提取RNA, 测量 OD_{260} 值, 计算所得RNA浓度后冻存总RNA。按试剂盒要求配置逆转录混合液, 利用Quant cDNA第一链合成试剂盒逆转录合成cDNA。利用2×Taq

Plus Master Mix II试剂盒扩增XRCC1基因, 上下游引物以及内参引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成, 具体序列为Forward sequence: 5'-GATGAGAACACGGACAGTGAGGAAC-3';

Reverse sequence: 5'-AGAAGTGCTTGCCCTGGAAGAAATC-3'

反应条件为94 °C 5 min, 然后按以下操作进行热循环: 94 °C 45 s、56 °C 30 s、72 °C 30 s, 循环30次, 最后72 °C延伸10 min。取PCR产物6 μL与2 μL上样缓冲液混合后上样于2%琼脂糖凝胶, 以GAPDH作为内参。100 mV电泳, 溴乙锭染色, 使用紫外图像扫描仪扫描, 通过image J软件分析目的基因与GAPDH电泳带的平均灰度, 结果以目的基因泳带与GAPDH泳带平均灰度的比值表示。

1.8 统计学方法

利用SPSS 26.0软件进行统计学分析, 等级资料的比较采用卡方检验, 单元格样本量小于5时采用Fisher确切概率法, 以双侧 $p < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化实验结果

本研究筛选30例患者, 其中, 24例患者XRCC1染色阳性细胞比例超过50%, 21例患者的最终评分大于4分, 判断为阳性表达, 阳性率为70%(21/30)。XRCC1蛋白表达于胞浆和细胞核中, 显微镜下阳性表达的胞浆/胞核呈棕黄色(图1); 22例患者的PARP-1染色阳性细胞比例超过50%, 其中, 19例最终评分大于4分, 判断为阳性表达, 阳性率为63.3%(19/30)。PARP-1蛋白定位在细胞核, 阳性表达部位在显微镜下呈黄褐色颗粒(图2)。

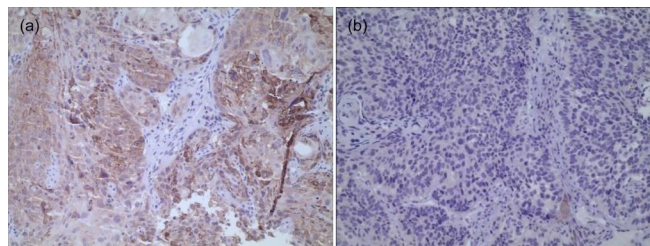


图1 XRCC1在ESCC中的表达(SP法, ×200):

(a)XRCC1阳性, 着色部位为细胞浆和细胞核, 呈黄褐色颗粒; (b)XRCC1阴性

Fig.1 Expression of XRCC1 in ESCC (SP method, ×200):

(a) XRCC1 positive, with cytoplasm and nuclei, yellowish-brown particles; (b) XRCC1 negative expression

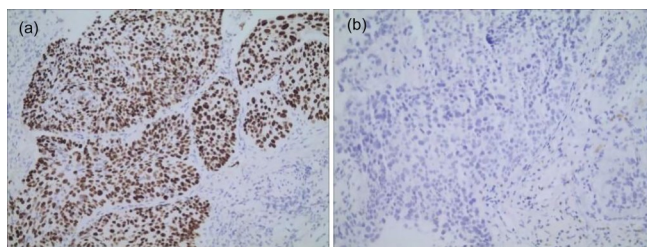


图2 PARP-1在ESCC中的表达(SP法,×200):(a)PARP-1阳性,着色部位为细胞浆和细胞核,呈黄褐色颗粒;(b)PARP-1阴性
Fig.2 Expression of PARP-1 in ESCC (SP method, ×200):
 (a) PARP-1 positive, with cytoplasm and nuclei, yellow-brown granules; (b) PARP-1 negative expression

2.2 XRCC1、PARP-1表达情况对ESCC患者放疗近期疗效的影响

30例ESCC患者中,无CR病例(0/30),16例为PR(53.3%),12例为SD(40%),2例为PD(6.7%),总的ORR为53.3%。XRCC1阳性表达患者的ORR为38.1%(8/21),显著低于XRCC1阴性的患者88.9%(8/9)($p=0.017$);PARP-1阳性表达患者的ORR为36.8%(7/19),显著低于XRCC1阴性的患者81.8%(9/11)($p=0.026$)。结果提示XRCC1、PARP-1表达情况与ESCC患者放疗疗效负相关,XRCC1、PARP-1蛋白表达越高者放疗近期疗效越差。

2.3 MTT实验结果

利用MTT法检测ECA109细胞经不同浓度AZD2281作用24 h、48 h后的生长情况,计算各个药物浓度下细胞抑制率,并得到24 h、48 h的IC₅₀值,通过Graph Pad软件绘制曲线图(图3)。曲线图显示,AZD2281对于ECA109细胞生长有抑制作用,且抑制效率随着药物浓度增加而上升,AZD2281作用24 h与48 h的细胞生存曲线相似,24 h的IC₅₀=26.15 μmol/L,48 h的IC₅₀=22.497 μmol/L。24 h与48 h的IC₅₀的1/8值分别为3.27 μmol/L与2.81 μmol/L,选取中间整数3 μmol/L作为后续实验

AZD2281的干预浓度,选取48 h为干预时间。

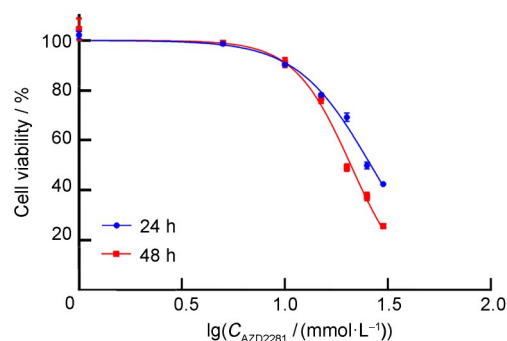


图3 不同浓度AZD2281作用24 h、48 h后ECA109细胞存活率曲线
Fig.3 Curves of viability of ECA109 cell treated with different concentrations of AZD2281 for 24 h and 48 h

2.4 克隆形成实验结果

ECA109细胞培养至75%丰度左右时进行平板克隆形成实验,联合组细胞在培养基中加入AZD2281,使其终浓度为前述MTT实验确定的浓度(3 μmol/L),辐照组细胞加入等量的培养基。两组细胞均分别接受0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy剂量的辐照。通过image J软件统计各组集落形成数(表1),按照前述方法计算得到各组的D₀值和SER,结果见表2。使用Graph Pad软件绘制细胞存活曲线,如图4所示。

表1 各组集落形成数
Table 1 Number of colonies formed in each group

剂量 / Gy Dose	接种数 Number of cells inoculated	放疗组集落形成数 Number of colony formation in radiotherapy group	联合组集落形成数 Number of colony formation in combined treatment group
0	250	225	218
2	500	196	162
4	1 000	231	139
6	1 500	189	77

表2 拟合单击多靶模型所得参数
Table 2 Parameters obtained by fitting a single-hit multi-target model

组别 Group	k	n	D_0	D_q	SER
放疗组 Radiation group	0.246	0.610	4.065	-2.009	1.744
联合组 Combined treatment group	0.429	0.845	2.331	-0.393	

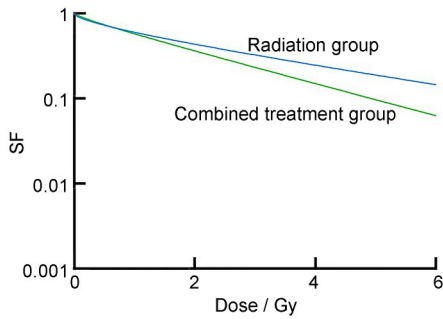


图4 细胞存活曲线
Fig.4 Cell survival curves

实验结果显示,辐照组 $k=0.246$ 、 $n=0.610$,联合组 $k=0.429$ 、 $n=0.825$,进而可得出辐照组 $D_0=4.065$ 、

联合组 $D_0=2.331$ 。与单纯辐照相比,AZD2281对ECA109细胞具有放射增敏作用。

2.5 RT-PCR 实验结果

空白组、药物组、辐照组、联合组细胞在辐射实验后继续培养48 h,RT-PCR检测XRCC1mRNA表达,结果显示,辐照组XRCC1mRNA相对表达量上升;药物组细胞的XRCC1mRNA相对表达量低于对照组;联合组细胞的XRCC1mRNA相对表达量明显低于辐照组。结果提示,辐射可促进XRCC1的基因转录,而AZD2281可显著抑制辐射诱导的XRCC1mRNA转录上调(表3、图5)。

表3 各组细胞的XRCC1mRNA相对表达量
Table 3 XRCC1mRNA relative expression in ECA109 cells of each group

组别 Group	对照组 Contl group	药物组 PARPi treated group	辐照组 Radiation group	联合组 Combined treatment group
XRCC1mRNA 表达量 Expression level of XRCC1 mRNA	1.218	0.941	1.682	0.648
XRCC1mRNA 相对表达量 Relative expression level of XRCC1 mRNA	1	0.772	1.381	0.532

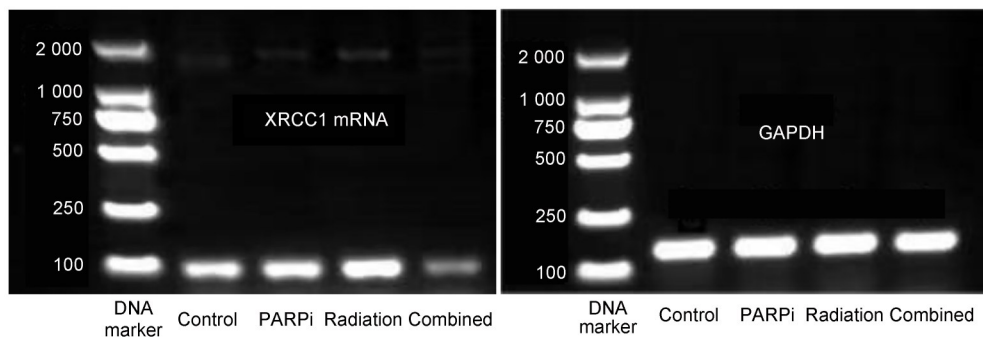


图5 RT-PCR分析XRCC1mRNA表达量
Fig.5 RT-PCR analysis of XRCC1 mRNA expression

3 讨论

XRCC1是第一个从哺乳动物中鉴定出的电离辐射损伤修复基因,在辐射导致的DNA断裂修复中

具有重要意义。它编码产生的蛋白没有任何酶活性,而是作为其他修复因子的支架蛋白存在。XRCC1已被证明与PARP^[11]、DNA连接酶III^[12]和DNA聚合酶 β ^[13]相互作用形成复合物共同参与

DNA 损伤修复。显然高表达 XRCC1 的癌细胞更容易修复放疗引起的 DNA 损伤、导致对放射治疗及化疗抗拒。有研究发现 XRCC1 高表达的头颈部鳞状细胞癌患者放射治疗后生存率较差^[3],但是 Wang 等^[14]报道 XRCC1 表达低的胃癌患者 DFS 明显短于高表达的患者。因此, XRCC1 表达与放射治疗敏感性的关系尚存争议。本研究结果显示, ESCC 组织标本中 XRCC1 阳性表达率为 70%, XRCC1 阳性表达组放射治疗的 ORR 显著低于 XRCC1 阴性组,提示 XRCC1 表达可能与 ESCC 患者辐照的近期疗效呈负相关。

PARP 在 1963 年从鸡肝细胞核中提取并纯化,可作为 DNA 损伤感应器参与多种 DNA 修复途径^[15],其中最主要的是 BER 途径。PARP 家族共有 17 个亚型, PARP-1 是含量最高、研究最广泛的亚型,由 DNA 结合结构域(DBD)、中心自修饰结构域和羧基末端催化域 3 个主要结构域组成^[16-17]。当 DNA 单链断裂(SSB)时, PARP-1 通过 DBD 识别损伤部位,与 DNA 损伤部位结合并被激活。活化的 PARP-1 催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)产生 ADP 核糖,与组蛋白结合形成聚 ADP 核糖(PAR)。PAR 脱离 DNA 链,使染色质松弛^[18],便于 PAR 募集 XRCC1 至 SSB 断裂处与 DNA 聚合酶 β 及 DNA 连接酶 III 相结合^[19-22]形成复合物参与 DNA 修复。研究结果显示, PARP 的高表达可能与多种实体癌的预后不良相关^[4,23]。本实验结果也显示, PARP-1 高表达与 ESCC 患者辐照近期疗效呈负相关。

PARPi 在 BRCA1/2 基因缺陷细胞中被发现有“合成致死”效应^[24-25], Fong 等^[26]通过临床试验证明, PARPi(olaparib)在 BRCA1/2 基因突变的肿瘤中获得比化疗更好的疗效,且副作用更小。由于 PARP 在 DNA 损伤修复过程中的重要作用, PARPi 对恶性肿瘤放射治疗增敏效应成为研究热点。辐照导致哺乳动物细胞 DNA 损伤中 SSB 比 DSB 更常见^[27],通常这种 SSB 可被快速有效地修复,而 DSB 是放射治疗导致细胞死亡的主要原因。PARPi 通过延迟 BER 使 DNA 复制叉崩塌,将辐照产生的一部分非致命性的 SSB 转换为致命性的 DSB,从而增加辐照的敏感性。本研究通过克隆平板实验发现联合组与单纯辐照组的放疗增敏比 SER=1.744, PARPi 明显增强了辐照对 ECA109 细胞的损伤作用。

PARP-1 活性对于 XRCC1 蛋白的募集是必需的^[22,28], PARPi 抑制 PARP 的激活从而阻止 PAR 链产生,也就不能招募 XRCC1 蛋白进行损伤修复。

Prasad 等^[29]利用免疫共成像研究发现, PARPi 可破坏宫颈癌细胞中 XRCC1 在 γ -H2AX 焦点处的位移。PARPi 可以减少 XRCC1 在 DNA 损伤处的募集,并且 XRCC1 缺陷预示着 PARPi 治疗敏感^[23],但是 PARPi 是否会影响 XRCC1 蛋白的表达尚不清楚。本研究结果显示, ECA109 细胞在辐照后 48 h 的 XRCC1 mRNA 相对表达量高于对照组,提示辐照可诱导 XRCC1 转录增加;联合组细胞在辐照后 48 h 的 XRCC1 mRNA 相对表达量明显低于辐照组,说明 AZD2281 可抑制辐照诱导的 XRCC1 转录上调,提示 PARPi 具有抑制 XRCC1 表达的作用。

本研究发现,辐照可引起靶细胞内 XRCC1 表达上调,这和 Cho 等^[30-31]的结果相似,提示 DNA 受损后细胞启动修复程序,然而 Rezapoor 等^[32]却报道辐照后 XRCC1 表达下调。这些不一致的结果可能与细胞内 XRCC1 的基线表达、照射模式、检测时间点等有关。电离辐射可以通过刺激 PI3K/Akt 通路介导人肿瘤细胞 DNA-PKcs 的磷酸化,而 DNA-PKcs 直接作用于 XRCC1。Toulany 等^[33]发现 DNA-PKcs 缺陷的胶质瘤细胞中 XRCC1 的表达明显受到辐照诱导,而 DNA-PKcs 功能正常的细胞中辐照并不能诱导 XRCC1 表达。本组结果显示, PARPi 可抑制食管癌细胞经辐照诱导的 XRCC1 表达, Prasad 等^[29]在宫颈癌细胞中观察到 PARPi 可引起 XRCC1 焦点减少,和我们的研究结果一致。PARPi 抑制 XRCC1 表达的可能机制是 PARP 活性与 DNA-PKcs 密切相关^[34], PARPi 通过抑制 DNA-PKcs 最终负向调控 XRCC1 的表达,但详细的机制还需进一步研究。本组结果还显示单纯 PARPi 在相同时间节点并未显著抑制 XRCC1 的表达,可能是由于本实验所选择的 AZD2281 浓度较低,在此浓度下 AZD2281 并未导致大量 ECA109 细胞损伤,细胞发生 SSB 较少, PARP 尚未被大量激活。

4 结论

本研究证明 PARP1 和 XRCC1 高表达的食管鳞癌放射治疗近期疗效不佳,辐照可引起食管癌细胞中 XRCC1 表达上调,而 PARPi 可抑制辐照诱导的 XRCC1 转录与表达并且增加食管癌辐照敏感性。PARPi 抑制 XRCC1 表达可能是其减少 XRCC1 募集之外的一个新的合成致死机制,值得进一步研究。

作者贡献声明 李祎萍负责医学情报收集及文献检索和分析,参与设计实验;张予菲完成实验;孙光

志协助辐射实验;李祎萍和张予菲完成论文初稿的写作;沈小舟、叶蕴瑶参与文献资料整理和讨论;韩高华设计了实验思路 and 过程,并提供了重要的实验指导和文章修改指导。全体作者都阅读并同意最终的文本。

参考文献

- 1 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, **41**(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.008.
- 2 Tang Q, Çağlayan M. The scaffold protein XRCC1 stabilizes the formation of pol β /gap DNA and ligase III α /nick DNA complexes in base excision repair[J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, **297**(3): 101025. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101025.
- 3 Gong L, Luo M, Sun R H, *et al.* Significant association between XRCC1 expression and its rs25487 polymorphism and radiotherapy-related cancer prognosis [J]. Frontiers in Oncology, 2021, **11**: 654784. DOI: 10.3389/fonc.2021.654784.
- 4 Thakur N, Yim K, Abdul-Ghafar J, *et al.* High poly(ADP-ribose) polymerase expression does relate to poor survival in solid cancers: a systematic review and meta-analysis[J]. Cancers, 2021, **13**(22): 5594. DOI: 10.3390/cancers13225594.
- 5 Zhang Y W, Dong S W, Xu R P, *et al.* Prognostic and predictive role of COX-2, XRCC1 and RASSF1 expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma receiving radiotherapy[J]. Oncology Letters, 2017, **13**(4): 2549-2556. DOI: 10.3892/ol.2017.5780.
- 6 Niu Y J, Zhang X, Zheng Y X, *et al.* XRCC1 deficiency increased the DNA damage induced by γ -ray in HepG2 cell: involvement of DSB repair and cell cycle arrest[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, **36**(2): 311-319. DOI: 10.1016/j.etap.2013.04.009.
- 7 Wu Z C, Miao X Y, Zhang Y F, *et al.* XRCC1 is a promising predictive biomarker and facilitates chemoresistance in gallbladder cancer[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2020, **7**: 70. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00070.
- 8 Hastak K, Bhutra S, Parry R, *et al.* Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, an effective radiosensitizer in lung and pancreatic cancers[J]. Oncotarget, 2017, **8**(16): 26344-26355. DOI: 10.18632/oncotarget.15464.
- 9 Feng F Y, Speers C, Liu M L, *et al.* Targeted radiosensitization with PARP1 inhibition: optimization of therapy and identification of biomarkers of response in breast cancer[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2014, **147**(1): 81-94. DOI: 10.1007/s10549-014-3085-5.
- 10 Mueller S, Bhargava S, Molinaro A M, *et al.* Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitor MK-4827 together with radiation as a novel therapy for metastatic neuroblastoma [J]. Anticancer Research, 2013, **33**(3): 755-762.
- 11 Demin A A, Hirota K, Tsuda M, *et al.* XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair [J]. Molecular Cell, 2021, **81**(14): 3018-3030. e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.05.009.
- 12 Rashid I, Hammel M, Sverzhinsky A, *et al.* Direct interaction of DNA repair protein tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 and the DNA ligase III catalytic domain is regulated by phosphorylation of its flexible N-terminus[J]. Journal of Biological Chemistry, 2021, **297**(2): 100921. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100921.
- 13 Vasil'eva I A, Moor N A, Lavrik O I. Effect of human XRCC1 protein oxidation on the functional activity of its complexes with the key enzymes of DNA base excision repair[J]. Biochemistry (Moscow), 2020, **85**(3): 288-299. DOI: 10.1134/S0006297920030049.
- 14 Wang W M, Yang J J, Yu Y, *et al.* Expression of JWA and XRCC1 as prognostic markers for gastric cancer recurrence[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2020, **13**(12): 3120-3127.
- 15 Pascal J M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage[J]. DNA Repair, 2018, **71**: 177-182. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.08.022.
- 16 Hanzlikova H, Kalasova I, Demin A A, *et al.* The importance of poly(ADP-ribose) polymerase as a sensor of unligated Okazaki fragments during DNA replication [J]. Molecular Cell, 2018, **71**(2): 319-331. e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.06.004.
- 17 Abbotts R, Wilson D M III. Coordination of DNA single strand break repair[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017, **107**: 228-244. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039.
- 18 Tallis M, Morra R, Barkauskaite E, *et al.* Poly(ADP-ribosyl)ation in regulation of chromatin structure and the DNA damage response[J]. Chromosoma, 2014, **123**(1):

- 79-90. DOI: 10.1007/s00412-013-0442-9.
- 19 Breslin C, Hornyak P, Ridley A, *et al.* The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(14): 6934-6944. DOI: 10.1093/nar/gkv623.
 - 20 Kumar A, Reed A J, Zahurancik W J, *et al.* Interlocking activities of DNA polymerase β in the base excision repair pathway[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, **119**(10): e2118940119. DOI: 10.1073/pnas.2118940119.
 - 21 Polo L M, Xu Y Q, Hornyak P, *et al.* Efficient single-strand break repair requires binding to both poly(ADP-ribose) and DNA by the central BRCT domain of XRCC1 [J]. *Cell Reports*, 2019, **26**(3): 573-581.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.082.
 - 22 Lavrik O I. PARPs' impact on base excision DNA repair [J]. *DNA Repair*, 2020, **93**: 102911. DOI: 10.1016/j.dnarep.2020.102911.
 - 23 Ali R, Alabdullah M, Alblihy A, *et al.* PARP1 blockade is synthetically lethal in XRCC1 deficient sporadic epithelial ovarian cancers[J]. *Cancer Letters*, 2020, **469**: 124-133. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.10.035.
 - 24 D'Andrea A D. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance[J]. *DNA Repair*, 2018, **71**: 172-176. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.08.021.
 - 25 Ferrara R, Simionato F, Ciccarese C, *et al.* The development of PARP as a successful target for cancer therapy[J]. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2018, **18**(2): 161-175. DOI: 10.1080/14737140.2018.1419870.
 - 26 Fong P C, Boss D S, Yap T A, *et al.* Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, **361**(2): 123-134. DOI: 10.1056/NEJMoa0900212.
 - 27 Nickoloff J A, Sharma N, Taylor L. Clustered DNA double-strand breaks: biological effects and relevance to cancer radiotherapy[J]. *Genes*, 2020, **11**(1): 99. DOI: 10.3390/genes11010099.
 - 28 Reber J M, Božić-Petković J, Lippmann M, *et al.* PARP1 and XRCC1 exhibit a reciprocal relationship in genotoxic stress response[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2022: 1-20. DOI: 10.1007/s10565-022-09739-9.
 - 29 Prasad C B, Prasad S B, Yadav S S, *et al.* Olaparib modulates DNA repair efficiency, sensitizes cervical cancer cells to cisplatin and exhibits anti-metastatic property[J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 12876. DOI: 10.1038/s41598-017-13232-3.
 - 30 Cho E A, Juhn Y S. The cAMP signaling system inhibits the repair of γ -ray-induced DNA damage by promoting Epacl-mediated proteasomal degradation of XRCC1 protein in human lung cancer cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, **422**(2): 256-262. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.139.
 - 31 Mei P J, Bai J, Miao F A, *et al.* Relationship between expression of XRCC1 and tumor proliferation, migration, invasion, and angiogenesis in glioma[J]. *Investigational New Drugs*, 2019, **37**(4): 646-657. DOI: 10.1007/s10637-018-0667-9.
 - 32 Rezapoor S, Shirazi A, Abbasi S, *et al.* Modulation of radiation-induced base excision repair pathway gene expression by melatonin[J]. *Journal of Medical Physics*, 2017, **42**(4): 245-250. DOI: 10.4103/jmp.JMP_9_17.
 - 33 Toulany M, Dittmann K, Fehrenbacher B, *et al.* PI3K-Akt signaling regulates basal, but MAP-kinase signaling regulates radiation-induced XRCC1 expression in human tumor cells *in vitro*[J]. *DNA Repair*, 2008, **7**(10): 1746-1756. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.06.017.
 - 34 Huang R X, Zhou P K. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, **5**: 60. DOI: 10.1038/s41392-020-0150-x.