论著

文章编号:1000-5404(2005)06-0554-03

多发性骨髓瘤患者APE1蛋白表达的临床意义

杨镇洲[1],陈幸华[1],王 东[2],向德兵[2],张 曦[1],张沁宏[2] (第三军医大学:[1]新桥医院血液内科,重庆 400037,[2]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

提 要:目的 检测多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, APE1)基因表达,探讨其临床意义。**方法** 采用免疫细胞化学、Western blot分析在MM细胞系KM3、32例MM患者和10例正常自愿者骨髓标本中检测APE1蛋白表达及定位,并且通过图像分析系统计算其积分光密度值。**结果** 在阳性对照的MM细胞系KM3中胞核、胞核/胞浆、胞浆均有APE1表达,其中尤以胞核明显。APE1胞浆阳性分度在正常对照组、初治组、复发或难治组间依次增高($P<0.01,0.05$)。**结论** APE1蛋白表达强度与MM疗效有关,APE1基因表达增强可能是MM患者预后不良的指标之一。

关键词: 多发性骨髓瘤;APE1;DNA损伤修复

中图法分类号: Q503; R394.2; R733.3 **文献标识码:** A

Detection of APE1 protein in multiple myeloma patients and its clinical significance

YANG Zhen-zhou[1], CHEN Xing-hua[1], WANG Dong[2], XIANG De-bing[2], ZHANG Xi[1], ZHANG Qin-hong[2] ([1]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, 400037; [2]Department of Oncology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To detect expression of the apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) protein in multiple myeloma (MM) and illuminate its clinical significance. **Methods** Expression and location of APE1 protein were detected in MM cell line KM3, bone marrow specimens of 32 MM patients and 10 normal volunteers using immunocytochemical staining and Western blot assay followed by measuring integral optical density by means of image analytic system. **Results** Nuclear, nucleus/cytoplasmic and cytoplasmic types of APE1 positive staining could be noticed in MM. Expression of APE1 gene in nucleus was significantly elevated compared with those in nucleus/cytoplasm and cytoplasm. In normal control group, untreated patients group and relapse/refractory group, the positive degree of cytoplasmic staining was increased significantly in turn ($P<0.05$). **Conclusion** Expressive degree of APE1 protein was associated with MM therapeutic efficacy. High expression of APE1 protein may indicate poor prognosis.

Key words: multiple myeloma; APE1; DNA damage repair

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是一种浆细胞克隆性增殖和异常积聚的恶性肿瘤,常规化疗的完全缓解率不超过5%,大剂量化(放)疗加造血干细胞移植的完全缓解率也仅有20%~40%,且最终仍难免复发[1],多数学者认为MM细胞耐药是导致多发性骨髓瘤治疗失败的主要原因。近来有研究表明多发性骨髓瘤细胞耐药与DNA损伤修复密切相关[2,3]。碱基切除修复(base excision repair, BER)是DNA损伤修复的一种基本方式,脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic apyrimidinic endonuclease, APE1),又称氧化还原因子-1(redox factor-1, ref-1),是DNA碱基切除修复通路中的重要成员之一,主要负责修复烷化剂和氧化性损伤的DNA脱嘌呤/脱嘧啶(AP)位点[4]。文献[5,6]报道APE1在多种肿瘤高表达,但目前对其在多发性骨髓瘤细胞中的表达及定位尚不清楚。为此,我们采用免疫细胞化学及Western blot方法在32例MM患者中检测APE1蛋白表达情况,旨在探讨APE1表达与MM疗效及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

32例MM患者中18例选自第三军医大学大坪医院肿瘤中心2003年1月至今的MM患者,14例为第三军医大学新桥医院血液科MM患者,均符合诊断标准[7],男17例,女15例,年龄37~75岁,中位年龄53岁。在32例MM患者中12例为初治,20

作者简介:杨镇洲(1970-),男,浙江省浦江县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事血液肿瘤方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757346

通讯作者:陈幸华,电话:(023)68755609

收稿日期:2004-11-05;修回日期:2005-03-02

例为曾用过含“马法兰”方案化疗的复发或难治患者。以 10 例非肿瘤患者骨髓标本作正常对照。

1.2　试剂和仪器

MM 细胞系 KM3 由第二军医大学长征医院血液科侯健教授惠赠，常规传代培养。鼠抗人 APE1 单克隆抗体购自 Novus Biologicals 公司，S-P 试剂盒购自北京中山公司，淋巴细胞分离液购于上海恒信化学试剂公司。Olympus 倒置显微镜数码摄像仪，image-pro plus 4.5 图像分析系统，垂直平板式电泳槽为北京六一厂产品，电泳仪为 Hoefer 产品。

1.3　免疫细胞化学染色

免疫组化染色采用 S-P 二步法：骨髓片（KM3 细胞制成悬液滴于涂有凝胶的载玻片，作为阳性对照）干燥后置于 30 ml/L H_2O_2-甲醇室温 20 min，加入 0.1% Triton-X 100 穿膜 10 min，滴加一抗（工作浓度 1:200），4 ℃过夜，加二抗 50 μl 37 ℃孵育 30 min，DAB-H_2O_2 显色，苏木精复染。阴性对照以 PBS 替代一抗。APE1 免疫组化阳性信号为棕黄色细小颗粒状，定位于胞核/胞浆，染色结果参照 Mark Kelley 实验室的标准[5]进行肿瘤细胞阳性计分。采用 image-pro plus 4.5 图像分析系统，每张切片选取 10 个具代表性视野（×400 倍），自动选取阳性区域并计算积分光密度值（IOD）。

1.4　Western blot 分析

抽取患者骨髓 3～4 ml，注入含有肝素的离心管中（肝素终浓度约为 25 U/ml），加盖后摇匀，充分抗凝，按常规方法分离单个核细胞。用 PBS（pH 7.4）洗涤后，取约 1×10^7 个单个核细胞或 KM3 细胞（作为阳性对照）加入 100 μl 预冷至 0 ℃的细胞裂解液冰上放置 30 min，然后低温超速离心（12 000 r/min）10 min，取上清液加入 2×SDS 凝胶加样缓冲液 100 ℃煮沸变性 5 min，为确保蛋白上样量一致，样品中蛋白经 Bradford 定量，样品中蛋白通过 12%SDS-PAGE 被分离后转至预先用 5%的脱脂奶粉封闭的 PVDF 膜上，加 1:500 稀释的抗-APE1 抗体 37 ℃孵育 1 h，加入羊抗鼠 IgG（1:1 000）温育 60 min，加 ABC 复合物，DAB 显色。

1.5　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 软件包进行 χ^2 检验和方差分析。

2　结果

2.1　免疫细胞化学检测 APE1 在 MM 患者骨髓有核细胞中的表达情况

2.1.1　APE1 在 MM 患者骨髓有核细胞中表达的定位观察

MM 细胞系 KM3 和复发/难治组 MM 患者骨髓有核细胞存在胞核、胞核/胞浆、胞浆 3 种 APE1 表达方式（图 1），初治组 MM 患者有单纯胞核表达和胞核/胞浆联合表达两种形式，而在正常对照组仅有 4 例（40.0%）胞核表达。APE1 胞核表达，复发/难治性 MM 组与初治 MM 组、正常对照组间两两比较无显著差异（$P>0.05$）；胞核/胞浆联合表达，复发/难治性 MM 组和初治 MM 组明显高于正常对照组，且复发/难治性 MM 组与初治 MM 组间也有显著差异（$P<0.01$）；APE1 胞浆表达虽仅有 2 例，但这一方式却只出现于复发/难治性 MM 组中，具有提示意义（表 1）。



A: Nuclear expression; B: Cytoplasmic expression; C: Nuclear/cytoplasmic expression

图 1　复发/难治组 MM 患者中 APE1 蛋白有核细胞中表达　（S-P×200）

Fig 1　Expression of APE1 protein in nucleated cells of relapse/refractory MM patients　（S-P×200）

表 1　MM 患者骨髓有核细胞 APE1 蛋白表达的定位

Tab 1　Location of APE1 protein in nucleated cells of MM patients

Group	n	Nucleus (%)	Cytoplasm (%)	Nucleus/cytoplasm(%)
Normal control	10	4(40.0)	0	0
Untreated patients	12	7(58.3)	0	2(16.7)
Relapse/refractory	20	8(40.0)	2(10.0)	10(50.0)*

*：$P<0.01$，*vs* untreated patients group

2.1.2　APE1 在 MM 患者骨髓有核细胞中表达的阳性分度

APE1 免疫组化染色结果参照 Mark Kelley 实验室的标准[5]进行肿瘤细胞阳性计分。APE1 胞核阳性分度在正常对照组、初治 MM 组与复发/难治性 MM 组呈依次递增趋势，统计分析有显著差异（$P<0.01,0.05$）（表 2）。免疫细胞化学检测 MM 患者骨髓有核细胞 APE1 表达的图像分析结果同样表明，复发/难治性 MM 组、初治 MM 组与正常对照组间两两比较也有明显差异（$P<0.01$）。

表 2　APE1 在 MM 患者骨髓有核细胞中表达的阳性分度

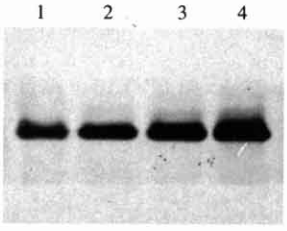
Tab 2　Expressive degree of APE1 protein in nucleated cells of MM patients

Group	n	Nucleus			Nucleus/cytoplasm		
		−	+	++	−	+	++
Normal control	10	6	4	0	10	0	0
Untreated patients	12	3	4	5	10	2	0
Relapse/refractory	20	2	4	14*	2	11	7**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，untreated patients group

2.2 Western blot 检测 APE1 在 MM 患者骨髓有核细胞中的表达情况

免疫印迹分析发现，正常对照组、初治 MM 组、复发/难治性 MM 组与 MM 细胞系 KM3 APE1 基因蛋白表达呈依次递增趋势（图 2）。



1: KM3 cells group; 2: Relapse/refractory group; 3: Untreated patients group; 4: Control group

图 2 Western blot 检测 APE1 在 MM 患者骨髓有核细胞中的表达

Fig 2 Expression of APE1 protein measured by Western blot in nucleated cells of MM patients

3 讨论

多发性骨髓瘤是目前难治的肿瘤之一。MM 细胞耐药是导致多发性骨髓瘤治疗失败的主要原因，有学者认为获得性 DNA 损伤修复基因表达增强可能也是肿瘤细胞耐药的重要机制[2,3]。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶（APE1），是一种广泛存在于生物体中唯一能在脱嘌呤/脱嘧啶（apurinic apyrimidinic，AP）位点修复 DNA 损伤的双功能酶，同时具有两种与碱基切除修复有关的 AP 核酸内切酶和 3′-磷酸二酯酶活性。此外，APE1 还具有氧化还原功能，它能通过调节转录因子来激活多种肿瘤基因产物如 c-jun，c-fos，c-myb 及 Pax 蛋白的活性[8]。AP 位点寡核苷酸裂解标记法提示 Ref-1 蛋白的水平与 DNA 修复活性相一致。我们应用免疫细胞化学和 Western blot 方法检测了 APE1 基因在 MM 患者骨髓有核细胞及 MM 细胞系 KM3 上的表达，结果显示它们均较正常自愿者高表达。结合 MM 患者的临床疗效，伴发浆细胞白血病的多发性骨髓瘤细胞系 KM3 和复发/难治组与初治组 MM 患者 APE1 的表达差异有显著性意义，提示 APE1 表达增强与多发性骨髓瘤疗效欠佳有关。

大量资料表明，ref-1 蛋白在细胞中表达的部位与肿瘤的发生、发展及预后有关。APE1 在不同组织及同一组织的不同细胞亚群定位有所不同，文献[9]报道 APE1 主要有 3 种着色模式：胞核着色、胞浆着色和胞核/胞浆着色。APE1 在蛋白质 N 端区有一个核定位序列，而恶性肿瘤胞浆染色阳性可解释为氧化性损伤造成了线粒体内的 DNA 损伤，在线粒体内形成了 AP 位点，且在线粒体内出现了 DNA AP 位点的修复。因此，ref-1 在碱基切除修复途径中，在胞核及胞浆均行使其保护性功能[10]。Kakolyris 等[9]在一项关于乳腺癌的研究也发现 APE1 胞核胞浆定位与预后差显著相关，认为单纯核表达提示组织分化良好，预后较好，而胞浆着色者预示代谢活跃及高蛋白合成，病变预后差。目前多数研究表明，APE1 表达定位的改变很可能是细胞表型异常的决定因素。我们研究也表明，单纯性胞核表达在全部研究对象中最为多见，但在组间无明显差异；而 APE1 胞核/胞浆联合表达在复发/难治组明显增高，与初治组和正常对照组比较有显著差异（$P < 0.01$）。APE1 胞浆表达虽仅有 2 例，但这一方式却只出现于复发/难治性 MM 组中，有一定提示作用。因此，我们认为 APE1 蛋白在 MM 患者骨髓有核细胞胞浆出现表达对判断临床疗效有重要意义。

参考文献：

[1] Attal M, Harousseau J L, Stoppa A M, *et al*. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma[J]. N Engl J Med, 1996, 335(2): 91 - 97.

[2] Tai Y T, Teoh G, Lin B, *et al*. Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sentivity to DNA damage [J]. J Immunol, 2000, 165(11): 6347 - 6355.

[3] Efferth T, Fabry U, Osieka R. Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells[J]. Anticancer Res, 2002, 22(1A): 231 - 234.

[4] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83 - 108.

[5] Dong Wang, Meihua Luo, Mark Kelley. Human apurinic endonucleasa 1 (APE1) expressiong and prognostic significance in osteosarcoma: Enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(6): 679 - 686.

[6] Puglisi F, Barbone F, Tell G, *et al*. Prognostic role of Ape/Ref-1 subcellular expression in stage Ⅰ-Ⅲ breast carcinomas[J]. Oncol Rep, 2002, 9 (1): 11 - 17.

[7] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1998. 373 - 379.

[8] Tell G, Scaloni A, Pellizzari L, *et al*. Redox potential controls the structure and DNA binding activity of the paired domain[J]. J Biol Chem, 1998, 273(39): 25062 - 25072.

[9] Kakolyris S, Kaklamanis L, Giatromanolaki A, *et al*. Expression and subcellular localization of human AP endonuclease 1(HAP1/Ref-1) protein: a basis for its role in human disease[J]. Histopathology, 1998, 33(6): 561 - 569.

[10] Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K, *et al*. Human AP endonuclease 1 (Ape1) protein expression in breast cancer correlates with lymphode status and angiogenesis[J]. Br J Cancer, 1998, 77(7): 1169 - 1173.

（编辑 刘洪娥）