文章编号:1000-5404(2005)10-1045-04

论著

骨肉瘤中 APE1 的表达及其与血管生成的关系

仲召阳[1],王 东[1],李增鹏[2],向德兵[1],张沁宏[2],肖华亮[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1] 肿瘤中心,[2] 病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨 APE1 在骨肉瘤中的表达及其与肿瘤发生、发展以及血管生成的关系。**方法** 采用免疫组化 S-P 法检测 10 例正常骨、10 例良性骨瘤和 60 例骨肉瘤组织中 APE1、CD34 和 FⅧ-Rag 等蛋白表达,并根据 CD34 和 FⅧ-Rag 染色结果计数微血管密度。**结果** APE1 蛋白表达主要定位于肿瘤细胞的胞核,骨肉瘤中 APE1 显著高于正常骨($P<0.05$),60 例骨肉瘤中 43 例(72%)呈高表达,17 例呈低表达,APE1 强表达组中的 MVD 显著高于弱表达组($P<0.01$)。**结论** APE1 在骨肉瘤中过度表达与骨肉瘤分化以及微血管密度密切相关,有可能作为骨肉瘤抗血管生成治疗中一个新的靶向分子。

关键词: 骨肉瘤;APE1;血管生成;微血管密度;抗血管生成

中图法分类号: R394.2; R730.23; R738.1 **文献标识码:** A

Expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease in human osteosarcoma and relationship with angiogenesis

ZHONG Zhao-yang[1], WANG Dong[1], LI Zeng-peng[2], XIANG De-bing[1], ZHANG Qin-hong[2], XIAO Hua-liang[2] ([1]Center of Cancer, [2]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) protein in human osteosarcoma and evaluate its role in tumor initiation, development and angiogenesis. **Methods** Expression of APE1 proteins was detected immunohistochemically in 10 normal bone samples, 10 cases of human bone benign tumor and 60 cases of human osteosarcoma. Intratumor microvessel density (MVD) was counted according to the result of CD34 and FⅧ-RAg protein staining. **Results** APE1 protein was predominantly localized in the nucleui of osteosarcoma cells. The protein level of the APE1 in osteosarcoma was significantly higher than that in normal bone and benign tumor. Forty-three of 60 osteosarcomas (72%) were determined to demonstrate high levels of APE1 expression, whereas the remaining 17 (28%) showed low expression of APE1. The MVD in APE1 high expression cases was significantly higher than that in low expression cases ($P<0.01$). **Conclusion** The over-expression of APE1 in osteosarcoma was significantly correlated to tumor differentiation and microvessel density. It may be a new target marker in antiangiogenesis.

Key words: ostesarcoma; APE1; angiogenesis; microvessel density; antiangiogenesis

骨肉瘤是多发于青少年的富含血管的高度恶性肿瘤,其生长依赖于血管的供应的范围及其程度。随着新辅助化疗的开展,骨肉瘤的缓解率达到 60% ~ 70%,但由于肿瘤基因组的非稳定性,使其能快速地产生耐药,因此,血管生成及抗血管生成治疗成为研究的热点。DNA 损伤修复基因脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apuinic/apyrimidic endonuclease, APE1)在骨肉瘤中高表达与患者预后不良密切相关,用 RNA 干扰技术抑制 APE1 的表达,能引起骨肉瘤细胞的凋亡,并能显著提高骨肉瘤细胞对放射线以及 DNA 毒性化疗药物的敏

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30340044,30472004),第三军医大学校管基金(XG200357)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340044, 30472004) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (XG200357)

作者简介: 仲召阳(1977-),男,江苏省连云港市人,硕士研究生,医师,主要从事骨肉瘤病理方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68757374

通讯作者: 王 东,电话:(023)68757706,E-mail: dongwang64@hotmail.com

收稿日期: 2005-03-01;**修回日期:** 2005-03-25

感性[1]。APE1除了具有核酸内切酶活性参与DNA损伤修复外，还具有氧化还原功能，调节多种细胞反应关键的转录因子，如：P53、HIF-α、NF-KB、AP-1等[2]。已有研究表明，上述转录因子直接或间接参与调节肿瘤血管生成，因此，我们首先提出APE1可能与肿瘤血管生成有关。本研究应用免疫组化技术检测骨肉瘤中APE1的表达，同时定量检测肿瘤内微血管密度，旨在探讨APE1与骨肉瘤血管生成的关系，为今后以APE1为靶点的骨肉瘤抗血管生成治疗提供临床病理依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

10例正常骨、10例良性骨瘤和60例长骨髓内型骨肉瘤均选自第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科存档病例(1972－1999年)，其中男性35例，女性25例，年龄为11～67岁，平均年龄为24.3岁，肿瘤大小为6.5～20 cm，手术切除标本56例，活检标本4例。截肢加化疗30例，单纯性截肢18例，瘤段切除灭活再植或断端融合10例，活检未治2例。36例有随访，随访时间3～20年。

1.2 免疫组化染色

全部标本均经10%甲醛固定，石蜡包埋，4 μm连续切片。浓缩型APE兔抗人单克隆抗体(Litlleton, CO)购自Novus Biologicals公司，工作浓度为1∶200，染色方法用Ventana自动染色系统；即用型CD34、FⅧ-Rag鼠抗人单克隆抗体和Histostain™试剂盒均购自北京中山公司。按Histostain™试剂盒介绍的方法进行。以PBS替代一抗作为阴性对照，已知APE1阳性的卵巢癌标本作为阳性对照。

1.3 结果判定

APE1染色结果判定参照Mark Kelley[1]实验室的标准进行，以肿瘤细胞阳性百分数及染色强度进行肿瘤细胞阳性计分，首先在高倍镜下计数1 000个肿瘤细胞，避开肿瘤边缘及坏死区域，根据阳性瘤细胞数目所占百分比分为4级：①Ⅰ：0分，<10%；②Ⅱ：1分，10%～25%；③Ⅲ：2分，25%～50%；④Ⅳ：3分，50%以上。按瘤细胞着色的深浅计分染色强度：1分，弱；2分，中等；3分，强。2个分值相加即为该标本的免疫组化阳性计分：0～1分为阴性，记为－；2～4分为弱阳性，记为＋；5分以上为阳性，记为＋＋。其中，－和＋记为低表达组，＋＋记为高表达组。

肿瘤内微血管密度(microvessel density, MVD)计数应用CMIAS真彩色图像分析系统测定[3]。对FⅧ-RA和/或CD34染色切片在低倍镜下选取3个肿瘤微血管最丰富的区域(即"hot spot")，在高倍镜下计数3个视野的微血管密度，取平均值作为MVD值。

1.4 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件行χ^2检验、t检验。

2 结果

2.1 APE1蛋白在骨肉瘤组织中的表达特点

APE1蛋白阳性产物呈棕黄、棕褐色细颗粒状，主要定位于肿瘤细胞的胞核(图1)。各种肿瘤细胞包括骨母细胞、纤维母细胞、软骨母细胞和多核巨细胞都呈阳性表达。60例骨肉瘤中43例呈强阳性表达(72%)，17例(28%)呈弱阳性或不表达。10例正常骨和10例良性骨瘤APE1呈弱阳性或不表达(图2)。

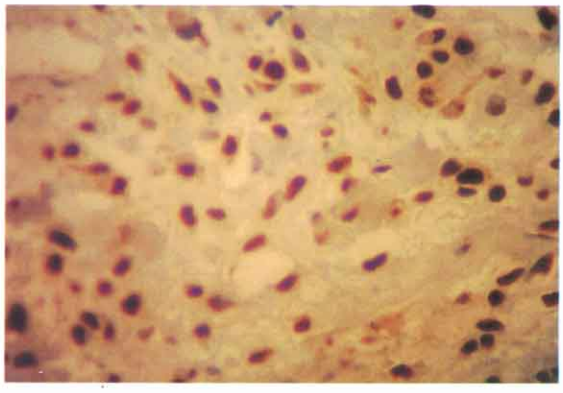


图1 骨肉瘤细胞中APE1蛋白的高表达阳性反应主要定位于肿瘤细胞胞核 (S-P×400)

Fig 1 High expression of APE1 protein mainly localized in nucleus of osteosarcoma cells (S-P×400)

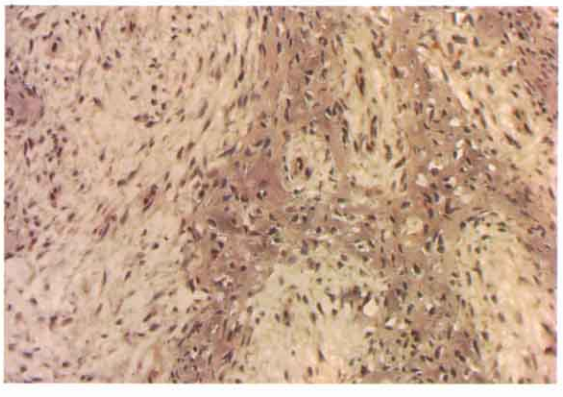


图2 APE1在良性骨瘤中呈低表达 (S-P×200)

Fig 2 Low APE1 expression in benign bone tumor (S-P×200)

2.2 骨肉瘤中APE1表达与临床病理的关系

如表1所示，APE1蛋白表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、Dahlin's分型等均无密切关系。而Price分级Ⅲ级骨肉瘤中的表达显著高于Ⅰ、Ⅱ级($P<0.05$)，WHO分型中高分化型则显著低于其它类型。

2.3 骨肉瘤微血管密度计数

FⅧ-Rag和CD34阳性产物定位于血管内皮细胞浆(图3)，60例骨肉瘤中38例两种抗原皆为阳性，另外22例中FⅧ-RA阳性12例，CD34阳性10例。因此，本组肿瘤微血管密度是综合FⅧ-Rag和/或CD34免疫组化染色结果计数的。60例骨肉瘤中MVD值为7.0～93.3，中位数为41.3，平均值为42.7。

表 1　APE1 蛋白表达与骨肉瘤临床病理的关系

Tab 1　Correlation of APE1 protein expression with various clinicopathological data in osteosarcoma

Item	n	APE1 low expression	APE1 high expression
Patient	60	17(28%)	43(72%)
Gender			
male	35	11(65%)	24(56%)
female	25	6(35%)	19(44%)
Age	24.3 ± 10.6	30.4 ± 13.3	21.9 ± 8.4
Size (cm)	6.5 – 20	7 – 16	6.5 – 20
	10.2 ± 2.7	10.3 ± 3.3	10.2 ± 2.5
Dahlin's classification			
Osteoblastic	32	6	26
Chondroblastic	12	3	9
Fibroblastic	13	8	5
Others	3	0	3
WHO classification			
Well-differentiated	9	8	1*
Conventional central	47	9	38
Telangiectatic	2	0	2
Round cell	2	0	2
Price's grading			
Ⅰ	5	4	1
Ⅱ	26	7	19
Ⅲ	29	6	23*

*：$P < 0.05$，*vs* APE1 low expression

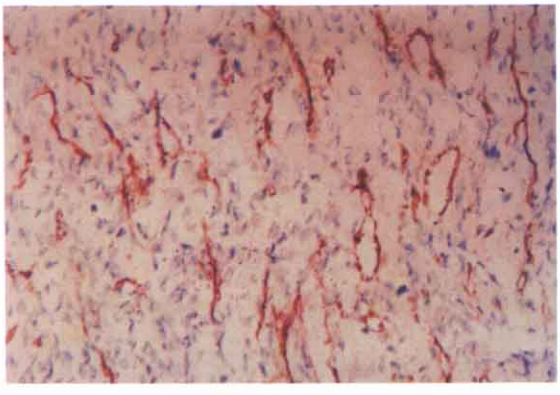


图 3　CD34 免疫组化染色,示肿瘤内微血管密度　(S-P × 200)

Fig 3　The intratumoral microvessel density by immunohistochemical staining of CD34 in osteosarcoma　(S-P × 200)

2.4　骨肉瘤微血管密度计数与临床病理的关系

骨肉瘤微血管密度呈明显的异质性。肿瘤边缘区,细胞丰富和瘤细胞高度异质区以及骨样组织少和幼稚区微血管密度高,而在骨样组织成熟区,特别是在肿瘤骨化区微血管密度则较低。60 例骨肉瘤微血管计数范围为 7.3 ~ 93.3,中位数为 41.3,平均值为 42.7。骨肉瘤微血管计数与肿瘤大小、Dahlin's 分型无关,而 Price's 分级中的Ⅲ级和Ⅰ、Ⅱ级,骨样组织分型中Ⅰ型和Ⅲ型,WHO 分型中高分化型和其它类型的微血管计数有显著差异($P < 0.05$,表 2)。

表 2　微血管计数与骨肉瘤临床病理的关系($\bar{x} \pm s$)

表 2　Correlation of microvessel density (MVD) with clinicopathological data in osteosarcoma ($\bar{x} \pm s$)

Item	n	MVD
Tumor size(cm)		
< 10	27	43.9 ± 19.8
≥10	33	41.7 ± 22.8
Price's grading		
Ⅰ	5	35.9 ± 22.2
Ⅱ	26	35.2 ± 17.4
Ⅲ	29	50.5 ± 20.4
Dahlin's classification		
Osteoblastic	32	41.2 ± 18.0
Chondroblastic	11	42.1 ± 22.1
Fibroblastic	14	40.1 ± 20.4
Others	3	42.4 ± 23.1
WHO classification		
Well-differentiated	9	30.9 ± 24.2
Conventional central	47	45.1 ± 21.2
Telangiectatic	2	38 ± 5.6
Round cell	2	43.5 ± 5.5
Osteoid classification		
Ⅰ	5	21.0 ± 10.8
Ⅱ	26	39.9 ± 18.6
Ⅲ	29	48.8 ± 22.5*

*：$P < 0.05$，*vs* Osteoid clacssifieation Ⅰ，Ⅱ

2.5　APE1 蛋白表达与肿瘤微血管密度之间的关系

APE1 高表达组 MVD (46.4 ± 26.7)显著高于低表达组(33.3 ± 20.7)($P < 0.05$),提示 APE1 蛋白表达与 MVD 之间存在密切关系。

3　讨论

DNA 碱基缺失(脱嘌呤/脱嘧啶位点,AP 位点)是细胞在体内外理化因素的刺激下最主要的损伤形式,AP 位点能阻断 DNA 的复制,具有细胞毒及基因毒作用,引起细胞凋亡、微卫星不稳定或基因突变[4]。机体通过碱基切除修复、直接转录、错配修复以及核酸切除修复等多种修复途径参与基因损伤的修复,以维持基因的完整及稳定性。体内外研究表明,DNA 修复机制的紊乱被认为是癌症演进的发病机制。APE1 是一个多功能的 DNA 碱基切除修复途径(base excision repair, BER)的限速酶,是细胞 DNA 放射性损伤和烷化剂致伤重要的修复因子[2,5]。当 DNA 碱基受到损伤时,首先是特异的糖基化酶切除被修饰的碱基,形成脱嘌呤/脱嘧啶位点(AP 位点)。APE1 则与 AP 位点结合,通过 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶作用,水解 AP 位点 5′端,形成 3′-OH 端和 5′-脱氧核苷[2],为下一步 BER 修复途径创造了必要条件。此外,APE1 还具有氧化还原功能(reduction-oxidation, redox),通过维持细胞内多种转录因子的激活还原态,而参与多种关键的细胞反应,如氧化应激,转录因子调节,细胞周期控制与凋亡[2]。因此,

APE1与细胞增殖、分化、损伤修复有关，其在肿瘤发生和演进中的作用受到广泛的关注。APE1基因敲除小鼠在胚胎期即死亡，表明APE1是决定细胞存活的关键基因[6]。

APE1在机体内的表达具有器官和组织特异性，因功能和分化程度的差异，其表达方式有3种：胞浆、胞核和核浆共表达，但其主要功能定位与胞核有关。因APE1蛋白在肿瘤细胞中存在的形式不同，其在肿瘤发生、发展中扮演的角色不同。研究表明，在肺癌、乳腺癌[2,7]、前列腺癌、宫颈癌[8]等多种肿瘤中发现APE1扩增和/或过表达，并与肿瘤细胞的恶性转化、浸润和转移密切相关。因采用定性定量或单纯定量的评估方法不同，其在不同肿瘤中的预后意义存在争议。

Puglisi等[7]认为在乳腺癌中，乳腺癌的不良预后与胞核胞浆定位有关，并且是不依赖其他主要预后预测因子如：组织学分级、淋巴结有无转移、和肿瘤大小的独立预后因素。在肺腺癌中胞浆定位的病例生存率较低，而肺腺癌中APE1核定位以及核定位、p53染色阴性与预后好密切相关。在卵巢癌[9]中胞浆表达通常是恶性的指征，和预后不良关系密切。因此有学者提出假说[2]认为，APE1在细胞内的定位不同与DNA修复程序相关的特定功能有关，表达定位的改变以及表达强度的变化很可能是细胞表型异常的决定因素。但其在骨肉瘤中的表达特点及其在骨肉瘤发生、发展中的作用研究较少。本研究结果显示，APE1在骨肉瘤中呈高表达，主要定位于胞核，并与良性骨瘤有显著差异，而且高表达组患者生存期较短。该结果提示APE1与骨肉瘤恶性生物学行为以及肿瘤的分化不良相关，其在骨肉瘤的发生和演进过程中可能起着重要的作用，并且APE1可作为判定骨肉瘤预后的有效指标，可作为临床治疗的重要评估手段。

肿瘤的血管生成是肿瘤生长和转移的先决条件，是一个有局部微环境、癌基因与抑癌基因等因素共同参与，最后通过影响血管生成正负因子之间的平衡状态进行调节的复杂的病理生理过程。目前定量分析肿瘤血管生成的方法多采用肿瘤微血管密度(MVD)计数，我们研究结果表明骨肉瘤的微血管密度与肿瘤的体积、Dehlin分型无关，而与肿瘤的恶性度、肿瘤的浸润、复发以及预后存在密切的联系，在临床上可作为判断肿瘤恶性度高低、预测复发和转移、判断预后的重要指标。

肿瘤的局部微环境常为缺氧状态，我们研究发现，低氧培养可很快诱导APE1表达升高(6～12 h)。APE1能调控的多种转录因子包括p53，HIF-a，NF-kB，Fos/Jun(AP-1)等[2,8]。其中HIF-a通过VEGF依赖途径和VEGF非依赖途径影响血管生成。依赖途径主要表现为增强VEGF的转录活性与增强VEGF mRNA稳定性两个方面来调控血管生成。VEGF非依赖途径通过诱导COX-2的表达，而COX-2及其合成产物通过除VEGF以外的碱性成纤维细胞生长因子、表皮生长因子及转化生长因子等多种途径调节血管生成。而p53、NF-kB、AP-1也可通过增加促进肿瘤血管生成因子的表达和降低抑制肿瘤肿瘤血管生成因子的表达来调节肿瘤血管的生成。另外，APE1可通过DNA损伤修复酶和氧化还原调节细胞转录因子双功能保护低氧诱导的细胞凋亡，进而影响肿瘤细胞对抗血管生成的敏感性。研究表明[7]乳腺癌中APE1核浆共表达与高度血管生成及淋巴结转移有关，胞核表达与低度血管生成及淋巴结阴性有关。我们的研究表明，APE1蛋白在骨肉瘤细胞中的表达与肿瘤微血管密度(MVD)密切相关，提示它们在肿瘤血管生成中可能起着重要的作用。但APE1参与骨肉瘤血管生成的确切机制及调控基础目前尚不清楚。我们正在进行APE1敲除骨肉瘤细胞对抗血管生成治疗的研究，以期为今后联合抗肿瘤血管生成提供依据。

参考文献：

[1] Wang D, Luo M, Kelley M R. Human apurinic endonuclease 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.

[2] Parsons J L, Dianova I I, Dianov G L. APE1 is the major 3′-phosphoglycolate activity in human cell extracts[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(12): 3531－3536.

[3] Gaiddon C, Moorthy N C, Prives C. Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 *in vivo*[J]. EMBO J, 1999, 18(20): 5609－5621.

[4] Hollings worth H C, Kohn E C, Steinberg S M, *et al*. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 33－41.

[5] Gros L, Ishchenko A A, Ide H, *et al*. The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(1): 73－81.

[6] Xanthoudakis S, Smeyne R J, Wallace J D, *et al*. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(17): 8919－8923.

[7] 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.

[8] Schindl M, Oberhuber G, Pichlbauer E G, *et al*. DNA repair-redox enzyme apurinic endonuclease in cervical cancer: evaluation of redox control of HIF-1α and prognostic significance[J]. Int J Oncol, 2001, 19(4): 799－802.

[9] Tanner B, Grimme S, Schiffer I, *et al*. Nuclear expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease increases with progression of ovarian carcinomas [J]. Gynecol Oncol, 2004, 92(2): 568－577.

(编辑 栾 嘉)