论著

文章编号:1000-5404(2005)13-1370-04

# 骨肉瘤DNA损伤修复相关基因表达与预后的关系

王 东[1],张沁宏[1],仲召阳[1],李增鹏[1],Mark R Kelley[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042;
[2]Herman B Well Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, USA)

**提 要:目的** 研究DNA损伤修复基因MPG、APE1、XRCC1和MGMT在人体骨肉瘤中的表达特点及其与患者预后的关系,为判估骨肉瘤对化疗的反应性及其预后提供有价值的指标。**方法** 应用免疫组化方法检测60例骨肉瘤组织和3株骨肉瘤细胞中MPG、APE1、XRCC1和MGMT的表达,按染色强度将其分为低表达组和高表达组。统计分析它们与临床病理及患者预后的关系。**结果** 3株骨肉瘤细胞中APE1和XRCC1呈强阳性,MPG和MGMT呈弱阳性。60例骨肉瘤中MPG、APE1、XRCC1和MGMT高表达分别为40例(65%)、43例(72%)、23例(38%)和32例(53%)。APE1表达和患者年龄,Price's分级和WHO分型有显著性差异($P<0.05$),MPG表达和WHO分型有显著性差异($P<0.05$)。Spearman秩相关检验显示上述4项指标之间密切相关。单因素相关分析显示APE1和MPG表达与患者预后有显著性差异($P<0.05$),COX比例风险模型显示MPG表达与患者预后有关($P<0.01$)。**结论** DNA损伤修复基因MPG、APE1、XRCC1和MGMT的共同表达是骨肉瘤的特点,APE1和MPG表达对于判估骨肉瘤患者的预后可能更有意义。

**关键词:** 骨肿瘤;DNA损伤与修复;免疫组化
**中图法分类号:** R394.3; R730.23; R738.1 **文献标识码:** A

# Prognostic significance of DNA damage and repair gene expression in human osteosarcoma

WANG Dong[1], ZHANG Qin-hong[1], ZHONG Zhao-yang[1], LI Zeng-peng[1], Mark R Kelley[2] ([1]Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; [2]Herman B Well Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, USA)

**Abstract: Objective** To detect the expression of DNA repair related proteins, including MPG, APE1, XRCC1 and MGMT in osteosarcoma and their relationship with the prognosis to provide potential markers for evaluating the chemotherapeutic reaction and prognosis of osteosarcoma. **Methods** The expression of MPG, APE1, XRCC1 and MGMT were determined by immunohistochemical staining in 60 specimens and 3 cell lines (HOS, SAO-2, U-2OS) of human osteosarcoma. High expression group and low expression group were divided according to the staining intensity, and their association with clinicopathological data as well as prognosis was analyzed statistically with SAS software. **Results** The high expressions of MPG, APE1, XRCC1 and MGMT were found in 40 cases (67%), 43 cases (72%), 23 cases (38%) and 32 cases (53%) respectively. APE1 expression was significantly associated with age, Price's grading and WHO histological classification ($P<0.05$), while MPG expression was significantly associated with WHO histological classification only ($P<0.05$). MPG, APE1, XRCC1 and MGMT expressions were remarkably related with each other by spearman relation test ($P<0.05$). APE1 and MPG expressions were statistically related with prognosis by single factor regression analysis ($P<0.05$). Moreover, only MPG expression was related with prognosis by COX proportion hazard multivariate analysis ($P<0.01$). **Conclusion** The coexpression or related expression of DNA repair proteins MPG, APE1, XRCC1 and MGMT is the important expression pattern in human osteosarcoma. Among them, the MPG and APE1 proteins may be more valuable to therapeutic implications for osteosarcoma.

**Key words:** bone tumor; DNA damage and repair; immunohistochemistry

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30340044, 30472004),第三军医大学校科研基金资助项目(200357)
Supported by the National Natural Science Foundation of china (30340044, 30472004), the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (200357)
**作者简介:** 王 东(1964-),男,天津市人,博士,主任医师,教授,主要从事肿瘤化疗、放疗的分子机制及基因治疗方面的研究,发表论著50篇。电话:(023)68757706,
E-mail: dongwang64@hotmail.com
**收稿日期:** 2005-04-03;**修回日期:** 2005-05-10

骨肉瘤是好发于青少年的恶性肿瘤,近年由于术后化疗的进展,其 5 年存活率已达到 60% ~ 70%,然而局部复发和远处转移仍是临床肿瘤学家面临的难点[1]。内外环境的多种因素,包括紫外线、电离辐射、活性氧分子以及化疗药物等,均会导致细胞 DNA 损伤。DNA 损伤的修复主要有 4 种途径,即直接修复、碱基切除修复、核苷酸切除修复和错配修复,而参与 DNA 损伤修复的基因已 130 多个。本研究应用免疫组化检测 DNA 损伤修复相关基因 MGMT、APE1、MPG 和 XRCC1 在骨肉瘤中的表达,旨在探讨它们与骨肉瘤预后的关系,并为今后以 DNA 损伤修复途径为靶点的基因治疗提供临床病理依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　临床材料

60 例长骨髓内型骨肉瘤选自第三军医大学大坪医院存档病例(1972 年 3 月至 1999 年 12 月),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 48 例,瘤段切除灭活再植或断端融合 10 例,活检未治 2 例。除 2 例未治出院外,所有病例都进行了术后辅助化疗,化疗药物包括氨甲喋呤、阿霉素和环磷酰胺等,化疗周期 2 ~ 6 周期(平均 3.4 周期)。36 例有随访,随访时间 3 ~ 20 年。

### 1.2　细胞培养

骨肉瘤细胞株(HOS、SAOS-2、U-2OS)购于北京协和细胞库,10%胎牛血清 MEM 培养基,5% $CO_2$,37 ℃孵育。$2 \times 10^5$ 细胞,6 孔板培养 24 h,4%多聚甲醛固定,用于免疫组化染色。

### 1.3　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。ABC 免疫组化染色用 Ventana 自动染色系统进行;APE1 单克隆抗体购自 Novus Biologicals 公司(Littleton, CO),工作浓度为 1:1 000;XRCC1 单克隆抗体购自 NeoMarkers Inc,工作浓度为 1:200;MGMT 和 MPG 单克隆抗体购自 Clontech Inc,工作浓度分别为 1:200 和 1:400。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

### 1.4　结果判定

染色结果判定参照 Mark Kelley[2] 实验室的标准进行。避开肿瘤边缘及坏死区域,在高倍镜下计数1 000个肿瘤细胞,根据肿瘤细胞阳性百分数及染色强度分为 4 级:阴性(-),弱阳性(+),阳性(++)和强阳性(+++)。其中,- 和 + 记为低表达组,++ 和 +++ 记为高表达组。

### 1.5　统计学处理

采用 SAS 统计软件。蛋白表达与临床各病理因素之间的关系采用 $\chi^2$ 检验,各种蛋白表达之间的相互关系应用 Spearman 秩相关检验,蛋白表达与患者预后的关系分别应用单因素回归和 COX 比例风险模型分析。

## 2　结果

### 2.1　DNA 损伤修复基因在骨肉瘤及骨肉瘤细胞株中的表达

DNA 损伤修复基因 MGMT、APE1、XRCC1 和 MPG 阳性表达产物呈棕黄色细颗粒状,均定位于肿瘤细胞核(图 1)。它们各自表达的阳性分级及阳性率见表 1。三株骨肉瘤细胞 HOS、SAO-2 和 U-2OS 阳性表达基本一致,均显示 APE1、XRCC1 强阳性表达,而 MGMT 和 MPG 为弱阳性表达。Spearman 相关分析结果显示 MGMT ($r = 0.36$, $P < 0.05$)、APE1($r = 0.43$, $P < 0.05$)、XRCC1($r = 0.27$, $P < 0.05$)和 MPG($r = 0.43$, $P < 0.05$)蛋白表达呈显著相关($P < 0.05$)。

**表 1　骨肉瘤 DNA 损伤修复基因蛋白表达**

**Tab 1　Expressions of DNA damage and repair gene related proteins in human osteosarcoma**

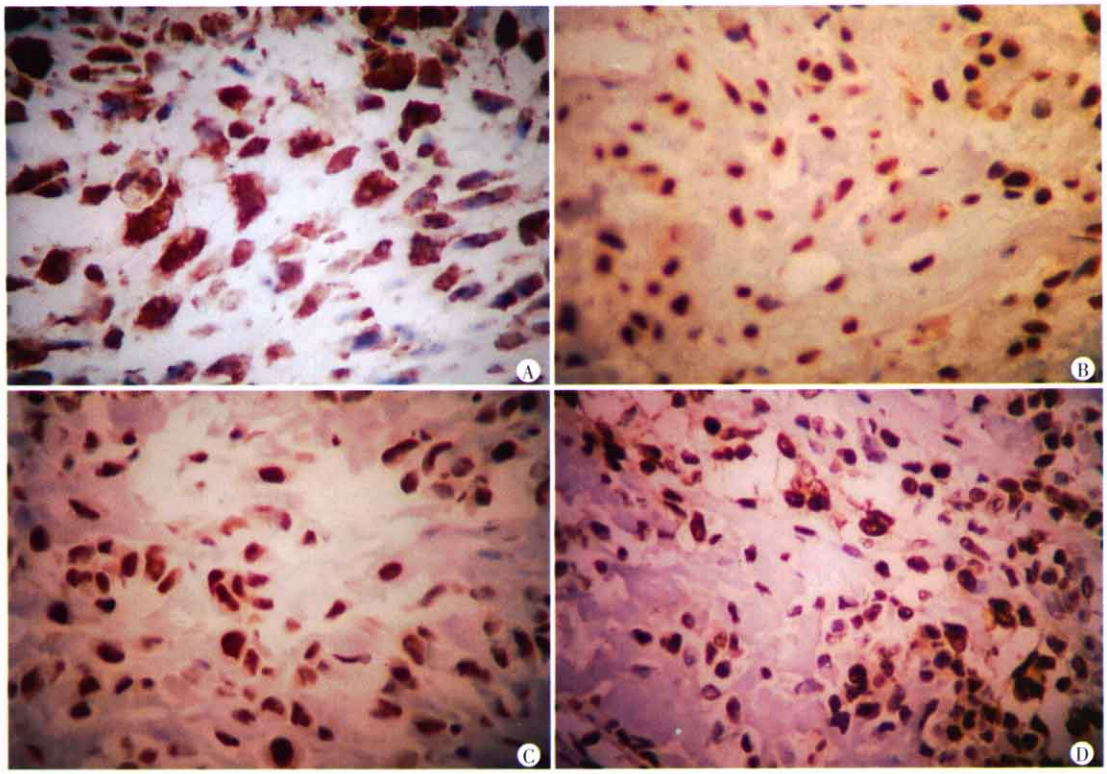
| Protein | Low expression | | | High expression | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | - | + | Total (%) | ++ | +++ | Total (%) |
| APE1 | 4 | 13 | 17(28) | 14 | 29 | 43(72) |
| MGMT | 8 | 20 | 28(47) | 10 | 22 | 32(53) |
| MPG | 8 | 12 | 20(33) | 14 | 26 | 40(67) |
| XRCC1 | 33 | 4 | 37(62) | 10 | 13 | 23(38) |

### 2.2　DNA 损伤修复基因表达与骨肉瘤临床病理之间的关系

APE1 蛋白表达与患者年龄、Price's 分级和 WHO 分型有统计学意义($P < 0.05$),而与患者年龄、性别,肿瘤的大小以及 Dahlin's 分型无关;MPG 只与 WHO 分型有显著性差异($P < 0.05$);而 XRCC1 和 MGMT 则与临床病理各项参数之间无显著差异($P > 0.05$)。

### 2.3　DNA 损伤修复基因表达与骨肉瘤患者预后的关系

应用 SAS 软件,对 DNA 损伤修复基因 APE1、XRCC1、MPG 和 MGMT 表达各自与骨肉瘤患者的预后进行分析。APE1 高表达组中位生存期为 14 个月,低表达组为 25 个月;MPG 高表达组中位生存期为 14 个月,低表达组为 26 个月,经 Log rank 检验,APE1 和 MPG 的表达与骨肉瘤患者预后有显著的统计学意义($P > 0.05$)。XRCC1 高表达组中位生存期为 13 个月,低表达组为 24 个月,MGMT 高表达组中位生存期为 15 个月,低表达组为 24 个月,经 Log rank 检验,XRCC1 和 MGMT 的表达与骨肉瘤患者预后无显著性差异($P > 0.05$)。进一步应用 COX 多因素回归分析,APE1 的 $P$ 值为 0.145,XRCC1 为 0.526,MPG 为 0.041,MGMT 为 0.481,表明 MPG 为影响骨肉瘤预后的主要因素。




A: MPG; B: APE1; C: XRCC1; D: MGMT

**图1 DNA损伤修复相关蛋白在骨肉瘤中表达** (ABC×100)

**Fig 1 DNA damage and repair related gene expression in osteosarcoma** (ABC×400)

## 3 讨论

骨肉瘤是高度恶性的骨原发性肿瘤。由于新辅助化疗的应用,其生存率虽已明显提高,但仍有部分患者死于局部复发和远处转移,提示骨肉瘤对化疗的抵抗可能是影响患者预后的重要因素。有关骨肉瘤化疗抵抗的分子机制尚未完全清楚,其中包括P-糖蛋白和多药耐药基因MDR,以及细胞外基质和破骨细胞分化调节因子等[3]。临床上用于骨肉瘤的常见化疗药物有氨甲喋呤、阿霉素、放线菌素D、足叶乙甙等,其中多数药物都会引起DNA损伤,并通过DNA碱基切除途径而起作用。

DNA碱基切除修复主要负责非正确碱基(如尿嘧啶)以及活性氧分子、烷化剂所致的损伤碱基(如3-甲基胸腺嘧啶)的修复。N-甲基嘌啶-DNA糖基化酶(N-Methylpurine-DNA glycosylase, MPG)主要负责N-烷化嘌呤和其它相关的加合物。MPG在乳腺癌、SV40T转基因小鼠中的胸腺癌中都表现高表达。Kim等[4]用RT-PCR和免疫组化比较研究脑胶质瘤和瘤旁正常脑组织MPG的表达,结果显示MPG定位于肿瘤细胞核,而瘤旁脑组织未见MPG免疫组化染色。MPG在肿瘤组织的表达不仅存在表达强度的差异,而且细胞内定位也有异质性。MPG主要定位于正常的卵巢组织的细胞核,胞浆只有浅着色,而卵巢癌,不论是浆液型或粘液型,其癌细胞仅表现MPG胞浆阳性,而核着色消失[5]。本研究显示MPG定位于骨肉瘤细胞核,胞浆未见着色,骨肉瘤细胞OS-732呈弱阳性表达,60例骨肉瘤中,20例呈弱阳性表达(33%),40例呈强阳性表达(67%)。MPG高表达组比低表达组存活期明显缩短($P<0.05$)。

X线修复交叉互补基因1(X-ray repair cross-complementing gene 1, XRCC1)是BER途径中的又一重要基因。它自身没有酶活性,而是与DNA连接酶Ⅲ、多聚酶β以及PARP等相结合而发挥"脚手架"的作用。XRCC1突变的中国仓鼠卵细胞对烷化剂、紫外线、过氧化氢和放线菌素C等敏感。Park等[6]的研究表明上皮样癌细胞过度表达XRCC1与拓扑酶抑制剂喜树碱和VP-16的化学抵抗有关。本研究显示,在3株骨肉瘤细胞中XRCC1均呈高表达;60例骨肉瘤中,37例呈弱阳性(62%),强阳性表达23例(38%)。XRCC1高表达组较低表达组存活期缩短,但无显著性差异($P>0.05$)。

APE1是一个多功能的DNA碱基切除修复途径的限速酶,是细胞DNA放射性损伤和烷化剂致伤重要的修复因子[7],具有AP核酸内切酶和3/-磷酸二酯酶的

活性。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(P53, AP-1, NF-κB, HIF-α 等),而参与多种关键的细胞反应[7]。APE1 在机体内的表达具有组织和器官特异性,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。Puglisi[8] 认为在乳腺癌中,乳腺癌的不良预后与胞核胞浆定位有关,并且是不依赖其它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等的独立预后因素。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。在卵巢癌中胞浆表达通常是恶性的指征且和预后不良关系密切。本研究结果显示,APE1 在骨肉瘤中呈高表达,主要定位于胞核,而且高表达组患者生存期显著缩短($P<0.05$)。

$O^6$-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶($O^6$-methylgunine DNA methyltransferase, MGMT)主要负责对 $O^6$-mG 的修复。烷化剂是一类重要的化疗药物,其分子中的 1 个或多个活性烷基(主要是甲基和乙基)可转移到 DNA 分子碱基上,形成烷基加合物。最易被烷化的是鸟嘌呤,鸟嘌呤 $O^6$ 位甲基化形成 $O^6$-mG 加合物。如果 $O^6$-mG 在 DNA 复制前未被修复,甲基化的鸟嘌呤将与胸腺嘧啶错误配对,经两轮复制后,导致 G:C→A:T 突变;$O^6$-mG 还可与对侧链上的胞嘧啶起交联反应,影响 DNA 的复制。MGMT 同时发挥转移酶和甲基接受体的作用,将甲基从 $O^6$-MedG 的 $O^6$-位转移到自身半胱氨酸残基上,使 DNA 链上的鸟嘌呤复原,同时自身不可逆的失活,这种"自杀"式的反应机制使得机体对烷基加合物的修复能力取决于细胞内 MGMT 的含量及其合成速度。MGMT 在不同个体、组织以及细胞类型间表达具有高度多样性。在正常组织中,以肝脏、淋巴结、肠道表达较高,肺及脑组织中相对较低。

MGMT 主要是通过 CPG 岛的甲基化而失活,在非霍奇金氏淋巴瘤的研究中证实甲基化的 MGMT 免疫组化显示 MGMT 阴性,而非甲基化 MGMT 免疫组化显示 MGMT 阳性。脑胶质细胞瘤 MGMT 高表达组比低表达存活期显著缩短,MGMT 甲基化或表达缺失预示该肿瘤对化疗有较好的反应性,进而有较好的预后[9]。本研究结果显示,3 株骨肉瘤细胞 MGMT 均呈弱阳性表达,60 例骨肉瘤中,28 例呈弱阳性表达(47%),32 例呈强阳性表达(53%),弱表达组比强表达组生存期较长,但无显著性差异($P>0.05$)。

DNA 损伤修复途径是细胞内的一个网络系统,同一种刺激可通过不同的 DNA 修复途径,而且不同的 DNA 修复途径之间,相互关联,彼此联系。现在的研究表明,多种蛋白分子参与 BER 途径,而且不同蛋白分子表达维持 BER 途径的平衡,对于细胞的存活是至关重要的。外源性使乳腺癌细胞过度表达 MPG 或抑制 APE1 的表达都会破坏 BER 途径的平衡态,从而使乳腺癌细胞对多种因素刺激,如电离辐射、$H_2O_2$ 和烷化剂化疗药变得更加敏感[10]。为此,我们分析了上述检测 DNA 修复蛋白的相关性,并应用 COX 比例风险模型分析它们与预后的关系。结果显示 MPG、APE1、XRCC1 和 MGMT 的表达彼此密切相关,4 种因素中 MPG 与骨肉瘤患者的预后显著相关($P<0.05$)。

综上所述,DNA 修复相关蛋白 MPG、APE1、XRCC1 和 MGMT 在骨肉瘤中呈现相关表达,从而共同影响肿瘤细胞的生物学行为对化疗药物的反应性以及患者的预后,单因素回归分析结果显示 APE1 和 MPG 与预后有关,多因素回归分析结果仅显示 MPG 与预后有关。该结果对于临床评估骨肉瘤对化疗的反应性以及患者的预后有一定价值,同时为今后选择 DNA 损伤修复靶点的靶向治疗提供了临床病理基础。

**参考文献:**


[1] Ragland B D, Bell W C, Lopez R R, *et al*. Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma[J]. Lab Invest, 2002, 82(4): 365 - 373.

[2] Dong Wang, Meihua Luo, Mark Kelley. 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.

[3] Mintz M B, Sowers R, Brown K M, *et al*. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma[J]. Cancer Res, 2005, 65(5): 1748 - 1754.

[4] Kim N K, Ahn J Y, Song J, *et al*. Expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in astrocytic tumors[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B): 1417 - 1423.

[5] Kim N K, An H J, Kim H J, *et al*. Altered expression of the NDA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in human gonads[J]. Anticancer Res, 2002, 22(2A): 793 - 798.

[6] Park S Y, Lam W, Cheng Y C. X-ray repair cross-complementing gene I protein plays an important role in camptothecin resistance[J]. Cancer Res, 2002, 62(2): 459 - 465.

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

[8] 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.

[9] Esteller M, Herman J G. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of $O^6$-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(1): 1 - 8.

[10] Rinne M, Caldwell D, Kelley M R. Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(8): 955 - 967.


(编辑　栾　嘉)