文章编号:1000-5404(2006)02-0111-03

论著

大肠癌 Ref-1/APE 的表达特点及其意义

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

提 要:目的 探讨大肠癌氧化还原因子-1 (redox factor-1, Ref-1),又称脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, APE),在大肠癌的表达特点及其与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管密度的关系。**方法** 应用免疫组化S-P法检测110例大肠癌和40例非癌区大肠组织中Ref-1/ APE和VEGF的表达,采用血管内皮特异标记物CD31标记并计数肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD),最后分析Ref-1/APE与VEGF和MVD的关系。**结果** 所有大肠癌和非癌区大肠组织都有Ref-1/APE表达,但是其在细胞内的定位有所不同。40例非癌区大肠组织细胞核都有Ref-1/APE表达,仅5例有胞质表达(5/40,12.5%);而110例大肠癌中有79例(79/110,71.81%)细胞质有Ref-1/APE表达,比例显著高于非癌区大肠组织($P<0.01$)。而且细胞质Ref-1/APE阳性表达的大肠癌较无细胞质表达者VEGF阳性率显著增加($P<0.05$),MVD也显著增高($P<0.05$)。**结论** 大肠癌Ref-1/APE移位于细胞质的异常表达可能涉及大肠癌的发生,并且可能与VEGF表达和肿瘤血管生成有关。

关键词: 氧化还原因子-1/脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶;血管内皮生长因子;血管密度;大肠癌
中图法分类号: R730.23;R735.3 **文献标识码:** A

Feature of Ref-1/APE expression and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and microvessel density in colorectal cancer

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

Abstract: Objective To study the features of redox factor-1/apurinic endonuclease (Ref-1/APE) expression and its correlation with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvessel density (MVD) in colorectal cancer (CRC). **Methods** The expression of Ref-1/APE and VEGF was detected by S-P immunohistochemical technique in 110 cases of CRC and 40 cases of non-cancerous large intestine. MVD were evaluated by immunohistochemistry with anti-human CD31 antibody. Then, the relationship between the expression of Ref-1/APE or VEGF and MVD was analyzed. **Results** Protein expression of Ref-1/APE was noted in all colorectal cancer and non-cancerous large intestine tissues, but the cellular location of Ref-1/APE was different. The Ref-1/APE expression of non-cancerous large intestine tissues mainly located in the nucleus, while the shifts of Ref-1/APE from nucleus to cytoplasm was observed in 79 of 110 (71.81 %) colorectal cancer tissues. Their difference was highly significant($P<0.01$). Furthermore, the cytoplasmic location of Ref-1/APE was significantly correlated with the overexpression of VEGF and higher MVD in CRC($P<0.05$). **Conclusion** Shift of Ref-1/APE from nucleus to cytoplasm could play role in carcinogenesis, especially in VEGF overexpression and angiogenesis of CRC.

Key words: redox factor-1/apurinic endonuclease; vascular endothelial growth factor; microvessel density; colorectal cancer

Ref-1/APE作为一个双功能蛋白,除了修复氧和烷基化损伤外,也刺激多种转录因子的活化[1]。新近有研究证实Ref-1/APE与HIF-1a、STAT3、CBP/p300一起共同组成转录复合体,调控VEGF的表达[2]。VEGF是最重要的血管生长因子,在大肠癌等多种肿瘤中高表达。我们拟探讨大肠癌Ref-1/APE的表达特

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30340044)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30340044)
作者简介: 牟江洪(1973-),男,四川省自贡市人,硕士,主治医师,主要从事肿瘤病理学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757374
通讯作者: 王 东,电话:(023)68757706,E-mail:dongwang64@hotmail.com
收稿日期: 2005-07-21;**修回日期:** 2005-11-04

点及其与 VEGF 和血管密度的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集我院大肠癌根治术标本 110 例，非癌区大肠组织（远离大肠癌病灶至少 5 cm）40 例，标本经 10% 中性甲醛溶液固定，石蜡包埋，连续切片，厚度 3～5 μm，行 HE 染色和免疫组化染色。

1.2 实验材料及方法

鼠抗人 Ref-1/APE 单克隆抗体购自 Novus Biologicals 公司（Litlleton，CO），工作浓度为 1∶500；鼠抗人 VEGF、CD31 单克隆即用型抗体以及 S-P 免疫组化试剂盒 HistostainTM-plus 均购自北京中山公司。采用免疫组化 S-P 法进行 Ref-1/APE、VEGF 和 CD31 染色，具体操作步骤参照试剂说明书进行，DAB 显色。每批染色采用已知阳性的大肠癌切片作阳性对照，并设立替代实验和阴性对照。

1.3 结果判定

Ref-1/APE、VEGF 和 CD31 免疫组化阳性信号均为棕黄色细颗粒状。Ref-1/APE 或 VEGF 阳性表达细胞比例 >10% 视为阳性表达。CD31 定位于血管内皮胞膜或胞质，参照 Weidner 等[3]的方法进行微血管密度计数，先在低倍镜下选取大肠癌组织血管最丰富区（即“hot spot”），再在 400 ×（0.16 mm^2）视野下分别计数 MVD，每例计数 3 个视野，并求其均值。

1.4 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验；计数资料比较采用 χ^2 或 Fisher 精确检验。

2 结果

2.1 Ref-1/APE 的表达特点

Ref-1/APE 有 3 种细胞内表达模式，分别定位于细胞核、细胞质、细胞核和细胞质，见图 1、2。所有大肠癌和非癌区大肠组织都有 Ref-1/APE 表达，但是其定位有所不同（表 1）。大肠癌有细胞质表达者 79 例（71.81%），非癌区大肠组织有胞质表达者 5 例（12.50%），前者显著高于后者（$\chi^2 = 41.89$，$P < 0.01$）。



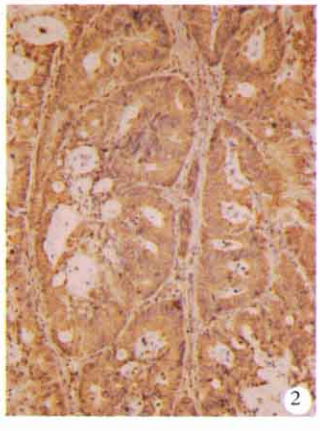


图 1 非癌区大肠组织 Ref-1/APE 细胞核表达 （S-P × 100）

图 2 大肠癌 Ref-1/APE 移位于细胞质表达 （S-P × 200）

表 1 大肠癌与非癌区大肠组织 Ref-1/APE 表达部位的比较

组织	n	胞核	胞质	胞核和胞质
大肠癌	110	31	9	70
非癌区大肠组织	40	35	0	5

2.2 大肠癌 VEGF 的表达与 Ref-1/APE 的关系

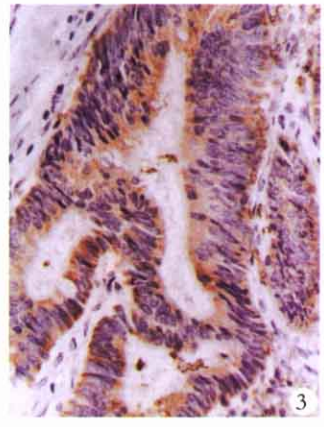
VEGF 主要定位于大肠癌细胞胞质，见图 3。110 例大肠癌有 76 例 VEGF 阳性表达，阳性率为 69.10%。以有无 Ref-1/APE 胞质表达将大肠癌分为两组，χ^2 检验显示有 Ref-1/APE 胞质表达的大肠癌 VEGF 阳性率显著高于无 Ref-1/APE 胞质表达者（$P < 0.05$），见表 2。

表 2 大肠癌 Ref-1/APE 胞质表达模式与 VEGF 表达的关系

胞质	VEGF(+)	VEGF(−)	χ^2	P 值
Ref-1/APE(+)	50	29	4.42	0.0356
Ref-1/APE(−)	26	5		

2.3 大肠癌血管密度和 Ref-1/APE 表达的关系

CD31 定位于血管内皮胞质和/或胞膜，见图 4。110 例大肠癌血管密度 19～124，平均（43.3 ± 21.4）。有 Ref-1/APE 胞质表达的大肠癌 MVD 为（53.9 ± 19.4），无 Ref-1/APE 胞质表达的大肠癌 MVD 为（38.2 ± 20.1），t 检验显示前者 MVD 显著高于后者（$t = 2.056$，$P < 0.05$）。



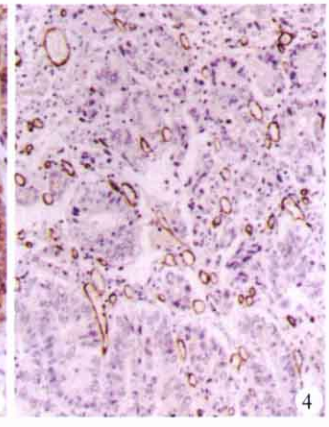


图 3 大肠癌 VEGF 阳性表达 （S-P × 400）

图 4 大肠癌 CD31 阳性血管 （S-P × 200）

3 讨论

Ref-1/APE 是一个具有 DNA 修复和氧化还原功能的双功能蛋白。通过碱基切除修复机制，Ref-1/APE 可以修复细胞内大量存在的嘌呤嘧啶缺失位点，降低细胞凋亡、微卫星不稳定性或基因突变的发生几率[4]；Ref-1/APE 的氧化还原功能可通过维持细胞内多种转录因子的激活还原态调节许多转录因子的 DNA 结合活性，涉及细胞的增殖、分化、凋亡等方面[5-7]。以上两种功能的异常均可导致肿瘤发生。在骨肉瘤、宫颈癌、上皮性卵巢癌、前列腺癌中 Ref-1/

APE 的表达水平较正常组织显著升高[5,8,9]。

快速增殖的肿瘤细胞需要持续的氧和营养物质的供给，大多数肿瘤组织生长超过血管所能提供的供给，因此会发生组织缺氧。组织缺氧会影响很多种组织细胞反应，包括氧化应激、转录因子调节、细胞周期控制与凋亡、血管生成等，这些对肿瘤的生长和转移具有非常重要的影响。VEGF 是研究最多、最深入的血管生长因子，在许多种肿瘤中高表达，包括胰腺癌、结肠癌、膀胱癌等。研究表明 VEGF 能增强内皮细胞迁移、增殖，并逆转内皮细胞的“老化”，因而具有刺激血管生成的作用[10]。

我们检测 110 例大肠癌和 40 例非癌区大肠组织，结果显示，Ref-1/APE 在非癌区大肠组织和大肠癌中均有表达，有胞核表达、胞质表达、胞核和胞质共表达 3 种模式。大肠癌和非癌区大肠组织 Ref-1/APE 的表达部位有所不同，所有非癌区大肠组织细胞核都有 Ref-1/APE 表达，仅 5 例出现移位于胞质的异常表达；而 71.81% 的大肠癌中 Ref-1/APE 出现了胞质移位，比例显著高于非癌区大肠组织，提示 Ref-1/APE 的胞质异常表达可能与大肠癌的发生有关。进一步以有无 Ref-1/APE 胞质表达模式将大肠癌分为两组，统计学处理结果显示有 Ref-1/APE 胞质表达的大肠癌不仅 VEGF 阳性率显著高于无 Ref-1/APE 胞质表达者，而且血管密度也显著增加。这提示 Ref-1/ APE 胞质移位表达可能参与调控 VEGF 的高表达，从而促进大肠癌血管生成。

Ref-1/APE 高表达被证实能够增强 HIF-1 的转录活性，后者是一种重要的转录因子，能够调控细胞对缺氧的适应性[11]。Ref-1/APE 还涉及缺氧引起的 VEGF 转录复合体的关键序列氧化碱基的修复，提示 Ref-1/APE 的 DNA 修复和氧化还原功能存在潜在的联系[12,13]。不仅如此，新近有研究[2,14]采用细胞核抽提物免疫沉淀试验证实 HIF-1a、STAT3、CBP/p300 和 Ref-1/APE 都存在于 VEGF 启动子中。Ref-1/APE 除了增加转录因子的 DNA 亲和力外，还能促进转录复合体中 p300 的募集；也有利于包括 HIF-1a 和 STAT3 在内的多种转录因子的 DNA 结合和转录激活。激活的 HIF-1a 和 STAT3 转移至细胞核与 Ref-1/APE 结合共同组成 VEGF 启动子，最后募集更多的 p300 组成转录复合体激活 VEGF 基因表达。总之，研究证实 HIF-1a、STAT3、CBP/p300 和 Ref-1/APE 组成的转录复合体增强 VEGF 表达，促进血管生成，有利于肿瘤的生长和转移。

综上所述，我们的研究结果提示，Ref-1/APE 移位于胞质的异常表达可能涉及大肠癌的发生，并且与大肠癌 VEGF 高表达和血管生成密切相关，可能为大肠癌的治疗，尤其是抗血管生成治疗提供新的思路。

参考文献：

[1] EVANS A R, LIMP FOSTER M, KELLEY M R. Going APE over ref-1[J]. Mutat Res, 2000, 461(2): 83 - 108.

[2] GRAY M J, ZHANG J, ELLIS L M, *et al*. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas[J]. Oncogene, 2005, 24(19): 3110 - 3120.

[3] WEIDNER N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication[J]. Semin Diagn Pathol, 1993, 10(4): 302 - 313.

[4] MISRA R R, RATNASINGHE D, TANGREA J A, *et al*. Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland[J]. Cancer Lett, 2003, 191(2): 171 - 178.

[5] WANG D, LUO M, KELLEY M R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression 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] ANGKEOW P, DESHPANDE S S, QI B, *et al*. Redox factor-1: an extra-nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(7): 717 - 725.

[7] HALL J L, WANG X, VAN ADAMSON, *et al*. Overexpression of Ref-1 inhibits hypoxia and tumor necrosis factor-induced endothelial cell apoptosis through nuclear factor-kappab-independent and - dependent pathways[J]. Circ Res, 2001, 88(12): 1247 - 1253.

[8] MOORE D H, MICHAEL H, TRITT R, *et al*. Alterations in the expression of the DNA repair/redox enzyme APE/ref-1 in epithelial ovarian cancers[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(2): 602 - 609.

[9] KELLEY M R, CHENG L, FOSTER R, *et al*. Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(4): 824 - 830.

[10] FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis [J]. Semin Oncol, 2002, 29(6 Suppl 16): 15 - 18.

[11] CARRERO P, OKAMOTO K, COUMAILLEAU P, *et al*. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(1): 402 - 415.

[12] KILLILEA D W, HESTER R, BALCZON R, *et al*. Free radical production in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(2): L408 - L412.

[13] GRISHKO V, SOLOMON M, BREIT J F, *et al*. Hypoxia promotes oxidative base modifications in the pulmonary artery endothelial cell VEGF gene[J]. FASEB J, 2001, 15(7): 1267 - 1269.

[14] ZIEL K A, CAMPBELL C C, WILSON G L, *et al*. Ref-1/Ape is critical for formation of the hypoxia-inducible transcriptional complex on the hypoxic response element of the rat pulmonary artery endothelial cell VEGF gene[J]. FASEB J, 2004, 18(9): 986 - 998.

（编辑　薛国文）