论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0776-03

APE1在非小细胞肺癌中的表达特点及其与预后的关系

张云嵩[1,2],范士志[1],王 东[2],杨镇洲[2],向德兵[2],李增鹏[3],陈建明[1],蒋耀光[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]全军胸外科中心,[2]肿瘤中心,[3]病理科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨脱嘌呤/嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, APE1)在非小细胞肺癌中的表达特点及其与患者预后的关系。**方法** 应用免疫组化方法检测103例非小细胞肺癌组织和36例正常肺组织中APE1的表达情况,按染色强度将其分为低表达组和高表达组,并分析APE1在非小细胞肺癌表达情况与临床病理及患者预后的关系。**结果** 正常肺组织及肺癌组织均有APE1表达,但正常肺组织以细胞核表达为主,肺癌组织主要在细胞质表达;APE1的表达与患者的年龄、性别、肿瘤大小、有无淋巴结转移及组织类型无明显关系;生存分析显示APE1的表达强弱与患者的预后明显相关。**结论** APE1蛋白表达增强与定位的改变与肺癌发生及发展有关,APE1基因表达增强可能是非小细胞肺癌患者预后不良的指标之一。

关键词: APE1;非小细胞肺癌;DNA损伤与修复;免疫组化

中图法分类号: R394.3; R730.23; R734.2 **文献标识码:** A

APE1 expression and its correlation with prognosis in non-small cell lung cancer

ZHANG Yun-song[1,2], FAN Shi-zhi[1], WANG Dong[2], YANG Zhen-zhou[2], XIANG De-bing[2], LI Zeng-peng[3], CHEN Jian-ming[1], JIANG Yao-guang[1] ([1]Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, [2]Cancer of Center, [3]Department of Pathology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To detect the apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) expression and its correlation with prognosis of non-small cell lung cancer. **Methods** The expression of APE1 was detected by immunohistochemistry in 103 cases of non-small cell lung cancer and 36 normal lung tissues. High expression group and low expression group were defined according to the staining intensity of APE1, and its association with clinicopathologic data and prognosis of non-small cell lung cancer was analyzed. **Results** Protein expression of APE1 was noticed in all non-small cell lung cancer and normal lung tissues. The APE1 expression of normal lung tissues mainly located in nucleus, while APE1 expression of non-small cell lung cancer in cytoplasm. APE1 expression was not related with age and gender, tumor size, lymphatic metastasis, nor pathological classification. There was a significant correlation between expression levels of APE1 and prognosis by Kaplan-Meier survival curve. **Conclusion** High expression of APE1 and shift of APE1 location was associated with non-small cell lung cancer. High expression of APE1 protein may indicate poor prognosis.

Key words: APE1; non-small cell lung cancer; DNA damage repair; immunohistochemistry

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,居所有恶性肿瘤死因的首位,且发病率及病死率呈逐年增长的趋势[1]。目前对于非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗主要是手术结合放化疗,然而NSCLC对放化疗耐受不敏感仍然是肺癌治疗过程中的难点。随着肺癌分子生物学研究的深入和医学分子生物学研究的进展,人们进一步认识了肺癌发生、发展、复发及转移的分子机制,其中认为肺癌组织针对于放化疗过程中引起的DNA损伤修复是治疗耐受的主要原因之一[2]。脱嘌呤嘧啶核酸内切酶(apurinic/apyrimidinic endonuclease, APE1)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电离辐射损伤的DNA脱嘌呤/嘧啶(apurinic/apyrimidinic, AP)位点,APE1在多种肿瘤均存在高表达[3]。本

基金项目: 国家自然科学基金(30571849)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571849)

作者简介: 张云嵩(1974-),男,贵州省遵义市人,博士研究生,医师,主要从事胸部肿瘤基础与临床方面的研究。电话:(023)68757241

通讯作者: 王 东,电话:(023)68757706

收稿日期: 2006-12-12;**修回日期:** 2007-01-11

研究应用免疫组化检测 APE1 在 NSCLC 中的表达情况，并探讨它与 NSCLC 预后的关系，为今后 NSCLC 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　研究对象

103 例非小细胞肺癌患者选自第三军医大学大坪医院野战外科研究所存档肺癌手术病例（1999 年 3 月至 2002 年 3 月），其中男性 75 例，女性 28 例，年龄 27～78（57.23±12.16）岁，其中全肺切除 21 例，肺叶切除 82 例，所有患者术前未行放化疗，术后 90 例进行了术后辅助化疗，化疗周期 2～8 个周期（平均 4 个周期），54 例进行术后放疗，13 例术后未行治疗。78 例随访时间 4～7 年。排除手术后 2 周与手术死亡有关的病例。同时收集 36 例非癌区肺组织（与癌组织不在同一肺叶或同一肺叶内远离肺癌病灶至少 5 cm）。

1.2　免疫组化染色

收集 NSCLC 患者标本 103 例，非癌区肺组织（与癌组织不在同一肺叶或同一肺叶内远离肺癌病灶至少 5 cm）36 例。所有标本均经 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（Litlleton，CO），工作浓度为 1∶1 000，以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

1.3　结果判定

染色结果判定参照 Mark Kelley 实验室的标准[4]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，根据其 APE1 阳性表达比例分为 4 级：<25% 为阴性（－），25%～50% 为弱阳性（＋），50%～75% 为阳性（＋＋），>75% 强阳性（＋＋＋）。其中，－和＋记为低表达组，＋＋和＋＋＋记为高表达组。

1.4　统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件。计数资料比较采用 χ^2 检验，蛋白表达与患者预后的关系采用 Kaplan-Meier 生存曲线进行分析。

2　结果

2.1　APE1 在 NSCLC 与正常肺组织中的表达特点

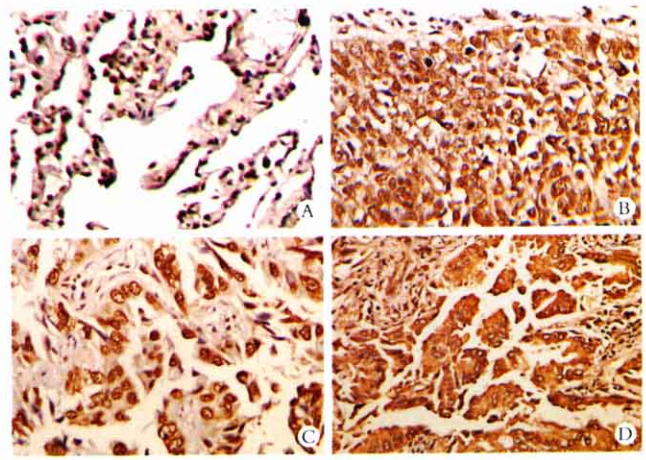
正常肺组织及 NSCLC 组织均有 APE1 表达，见图 1，但其表达的定位有明显区别。正常肺组织有胞质表达 5 例（13.89%），NSCLC 组有细胞质表达 84 例（81.55%），后者胞质表达显著高于前者（$\chi^2=53.03$，$P<0.01$）。

2.2　NSCLC 中 APE1 表达与临床病理的关系

APE1 蛋白表达与患者性别、肿瘤大小、淋巴结是否转移、病理学类型均无密切关系。见表 1。

2.3　APE1 表达与 NSCLC 患者预后的关系

对 78 例随访至今的病例进行 Kaplan-Meier 生存分析，结果显示在 APE1 高低表达组之间生存时间有显著性差异（$P<0.01$，图 2），其中 APE1 低表达组中位生存时间为 54.82 个月。APE1 高表达组中位生存期为 25.95 个月，表明 APE1 表达高低与 NSCLC 的预后密切相关。



A：正常肺组织；B：肺鳞癌 APE1 细胞质＋细胞核强表达；C：肺腺癌 APE1 细胞质＋细胞核强表达；D：肺腺癌 APE1 细胞质为主强表达

图 1　正常肺组织与非小细胞肺癌组织 APE1 的表达　（S-P×200）

表 1　APE1 蛋白表达与 NSCLC 临床病理关系

项目	n	APE1 低表达	APE1 高表达	P 值
患者	103	27(21%)	76(79%)	<0.05
性别				
男性	75	26	49	>0.05
女性	28	10	18	
国际 T 分期				
T_1	17	9	8	>0.05
T_2	62	13	49	
T_3～T_4	24	5	19	
淋巴结转移				
N_0	68	15	53	>0.05
N_1～N_2	35	12	23	
病理学类型				
鳞癌	62	17	45	>0.05
腺癌	41	10	31	

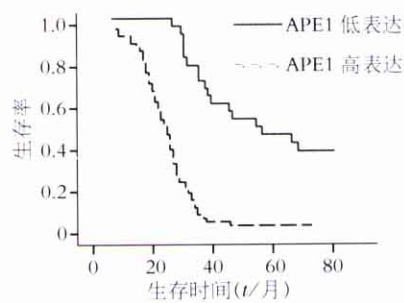


图 2　NSCLC 患者 APE1 高表达组和低表达组的 Kaplan-Meier 生存曲线

3 讨论

原发性支气管肺癌发病率在多数发达国家及我国京津沪等城市已跃居常见恶性肿瘤之首，然而目前NSCLC在治疗过程中常常产生放化疗耐受而影响疗效，除了受肺癌相关的多药耐药基因的影响外，有研究表明DNA损伤修复基因表达增强是导致肺癌预后不好的因素之一[1,2]。人体细胞内存在着的NDA损伤修复系统对维持基因组的稳定和完整起着极其重要的作用，其中APE1为DNA碱基切除修复(base excision repair，BER)途径中的限速酶，亦是细胞DNA放射性损伤和烷化剂损伤重要的修复因子。APE1由DNA修复和氧化还原两个相对独立的功能区构成。APE1的DNA修复功能是参与BER途径，主要修复由氧自由基造成的DNA损伤。当DNA碱基受到损伤时，首先由DNA糖基化酶负责切除那些受损的碱基，形成AP位点，然后，APE1催化靠近AP位点5′端的磷酸二酯键水解，去除脱碱基的残基，形成3′-OH端和5′-脱氧核苷，为下一步DNA聚合酶及连接酶插入一个正确的碱基提供合适的底物，从而完成BER修复。此外，APE1也是一种氧化还原因子，其通过调节多种转录因子(如AP-1、NF-κB等)潜在的DNA结合活性及随后特异性目标基因表达，从而参与氧化应激、细胞周期调控及凋亡等多种关键的细胞反应过程[5]。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。

我们应用免疫细胞化学检测了APE1蛋白在NSCLC及正常肺组织中的表达，结果显示NSCLC及正常肺组织中APE1的定位差异明显，正常肺组织以细胞核表达为主，NSCLC组织以细胞质表达为主。文献[6]报道APE1主要有3种着色模式：细胞核着色、细胞质着色和细胞核/细胞质着色。APE1在蛋白质N端区有一个核定位序列，而恶性肿瘤细胞质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，APE1在碱基切除修复途径中，在细胞核及细胞质均行使其保护性功能[6]。所以，APE1保护功能的发挥可以导致肺癌细胞耐受放射性及烷化剂损伤，产生治疗抵抗，降低肺癌的疗效。

同时我们通过生存分析还发现APE1在肺癌细胞中的表达强度与预后明显相关，APE1高表达组的预后显著差于APE1低表达组。究其原因，正如上述的APE1可以修复肺癌细胞的DNA及氧化损伤，对放射线及烷化剂损伤产生耐受。此外，肿瘤局部缺氧的微环境状态可以诱导APE1表达升高。APE1可以调控的多种转录因子包括p53、HIF-α、NF-κB、Fos/Jun(AP-1)等[5,7]。其中HIF-α可以通过对成纤维细胞生长因子、表皮生长因子及转化生长因子等的调节来促进血管生成。而p53、NF-κB、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[8,9]。所以APE1表达增高也可以通过血管生成来保障肿瘤的生长。

综上所述，APE1在肺癌组织中的表达移位及表达增强可能与肺癌的发生、发展及预后密切有关，其机制有待进一步探寻。该结果对于评估NSCLC的临床预后具有一定重要的价值，同时为今后选择DNA损伤修复靶点的NSCLC靶向治疗提供了理论基础。

参考文献：

[1] 王 瑾，许 峰，周清华. 肺癌流行病学研究进展[J]. 中国肺癌杂志，2005，8(5)：395－400.

[2] Puglisi F，Aprile G，Minisini A M，*et al*. Prognostic significance of Ape1/ref-1 subcellular localization in non-small cell lung carcinomas [J]. Anticancer Res，2001，21(6A)：4041－4049.

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

[4] 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.

[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] 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.

[7] Chou K M，Cheng Y C. An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA[J]. Nature，2002，415(6872)：655－659.

[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] 仲召阳，王 东，李增鹏，等. 骨肉瘤中APE1的表达及其与血管生成的关系[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：1045－1048.

(编辑 邓强庭)