论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1808-04

hOGG1在小细胞肺癌中的表达特点及其与预后的关系

冯 燕[1],李少林[1],杨宇馨[2],李增鹏[2],王 东[2],杨雪琴[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院放射医学教研室[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心[2])

[摘要] **目的** 探讨人8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶(human 8- hydroxyguanine deoxyribonucleic acid glycosidase,hOGG1)在小细胞肺癌中的表达特点及其与患者预后的关系。**方法** 应用免疫组化检测71例小细胞肺癌组织和30例正常肺组织中hOGG1的表达,按细胞阳性百分数及染色强度将其分为低表达组和高表达组,并分析hOGG1在小细胞肺癌表达与临床病理及患者预后的关系。**结果** 正常肺组织与小细胞肺癌组织中均有hOGG1表达,但正常肺组织以细胞质表达为主(60.0%),而小细胞肺癌组织以核质共表达为主(49.3%),两者亚细胞定位有明显差异($P<0.01$);在hOGG1表达高低方面,正常肺组织100%为低表达,而小细胞肺癌组织78.9%为高表达,两者间也存在明显差异($P<0.01$);hOGG1的表达与患者的性别、肿瘤分期、吸烟指数、有无淋巴结转移及有无胸水无明显关系($P>0.05$);Kaplan-Meier分析显示hOGG1的表达强弱与患者的预后明显相关($P<0.05$),hOGG1低表达组中位生存时间为23个月,hOGG1高表达组中位生存时间为13个月。COX比例风险模型分析结果提示hOGG1是影响患者生存的独立预后因素($P=0.004$)。**结论** hOGG1蛋白核质共表达为主的高表达与小细胞肺癌的发生及发展有关,hOGG1蛋白表达增强可能是小细胞肺癌患者预后不良的指标之一。

[关键词] 小细胞肺癌;DNA损伤修复;hOGG1;预后

[中图法分类号] R734.2;R394.2;R730.23 [文献标志码] A

Expression of human 8-hydroxyguanine deoxyribonucleic acid glycosidase 1 in small cell lung cancer and its correlation with prognosis

Feng Yan[1], Li Shaolin[1], Yang Yuxin[2], Li Zengpeng[2], Wang Dong[2], Yang Xueqin[2] ([1]Department of Radiation Medicine, College of Basic Medical Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Center of Cancer, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of human 8-hydroxyguanine deoxyribonucleic acid glycosidase 1 (hOGG1) in small cell lung cancer and its correlation with the prognosis of small cell lung cancer patients. **Methods** Expression of hOGG1 was detected by immunohistochemistry in 71 small cell lung cancer tissue samples and 30 normal lung tissue samples. Small cell lung cancer were divided into high expression group and low expression group according to their positive percentage and staining intensity. Correlation of the hOGG1 expression in small cell lung cancer tissue samples with the clinicopathology and prognosis of small cell lung cancer was analyzed. **Results** The hOGG1 was expressed both in small cell lung cancer tissue samples and in normal lung tissue samples. The expression level of hOGG1 was higher in cytoplasm of normal lung tissue samples than in cytoplasm of small cell lung cancer tissue samples (60.0% *vs* 49.3%, $P<0.01$). The hOGG1 was none over-expressed in normal lung tissue samples but in 78.9% of small cell lung cancer tissue samples ($P<0.01$). The hOGG1 expression was not significantly correlated with gender, tumor staging, smoking index number, lymphatic metastasis or hydrothorax ($P>0.05$). Kaplan-Meier analysis showed that the hOGG1 expression level was significantly correlated with the prognosis of small cell lung cancer patients ($P<0.05$). The median survival time of small cell lung cancer patients with a low hOGG1 expression level and a high hOGG1 expression level was 23 months and 13 months, respectively. COX multivariate proportional hazards model analysis indicated that hOGG1 was an independent factor for the prognosis of small cell lung cancer patients ($P=0.004$). **Conclusion** The high hOGG1 expression level in cytoplasm is correlated with the

[基金项目] 国家自然科学基金(30801367)

[通信作者] 李少林,电话:(023)68485060,E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

occurrence and progress of small cell lung cancer and is one of the poor prognosis indicators of small cell lung cancer patients.

[**Key words**] small cell lung cancer; DNA damage repair; human 8-hydroxyguanine deoxyribonucleic acid glycosidase 1; prognosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30801367). Corresponding author: Li Shaolin, Tel: 86-23-68485060, E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤,其发病率和死亡率均居第一位。小细胞肺癌(small cell lung cancer,SCLC)占所有肺癌的20%~25%,且5年生存率最低,如果不进行有效的治疗,患者可能在3个月内死亡[1-2]。近年来随着分子生物学研究的飞速发展,人们进一步从微观上认识了肿瘤,认为DNA损伤修复基因的表达水平与许多恶性肿瘤发生、进展及预后密切相关[3]。在众多的DNA氧化损伤中,鸟嘌呤8位碳原子的氧化最常见,其氧化产物8-羟基鸟嘌呤(8-oxoguanine 8-oxoG)在体内形成后较为稳定、易于检测,被视为DNA氧化损伤的生物标志物,而人类8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶(human 8- hydroxyguanine deoxyribonucleic acid glycosidase,hOGG1)基因编码产物hOGG1蛋白主要功能是识别和切除DNA双链中的8-oxoG[4]。目前针对hOGG1基因研究最多的是其遗传多态性,尤其是第7外显子的第1 245位碱基的C/G多态性,结果使第326位密码子产生丝氨酸或半胱氨酸,形成hOGG1-Ser326和hOGG1-Cys326两种蛋白,但是究竟哪种等位基因的修复能力更强,携带哪种等位基因的个体可能罹患肿瘤的危险更大目前尚无定论。目前针对hOGG1蛋白的表达与肿瘤的关系研究较少,国内外文献报道主要集中在鼻咽癌、肝癌和宫颈癌,其表达与小细胞肺癌之间的关系国内外尚少见报道。本研究应用免疫组化方法检测hOGG1在小细胞肺癌组织中的表达,探讨hOGG1的表达高低与小细胞肺癌患者预后之间的关系,为今后进一步认识SCLC发展过程的规律提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

71例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病理科存档小细胞肺癌活检或手术病例(2003年2月至2008年10月),其中男性63例,女性8例,年龄23~85(57.1±12.3)岁,所有患者取标本之前均未行放化疗。按美国退伍军人医院制定的SCLC分期标准,确诊时局限期(LD)48例(67.6%),广泛期(ED)23例(32.4%)。其中30例进行单纯化疗(化疗周期2~8个周期,平均4个周期),41例进行放化综合治疗。71例病例随访2~7年。同时收集30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)作为对照。

1.2 免疫组化染色

SCLC患者活检或手术标本71例,非癌区组织30例。所有标本均经10%甲醛固定,石蜡包埋,4 μm连续切片。运用即用型二步法行免疫组化染色,免疫组化MaxVision™试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。染色步骤按试剂盒说明书进行。兔抗人hOGG1多克隆抗体购自Novus Biologicals公司,工作浓度为1∶120。DAB显色,苏木精复染,中性树胶封片。PBS替代一抗作为阴性对照,采用已知阳性表达的大肠癌组织切片作阳性对照。

1.3 结果判定

免疫组化阳性信号为棕黄色细小颗粒状,定位于细胞核和(或)细胞质。染色结果判定参照Mark Kelley实验室的标准进行[5]。以细胞阳性百分数及染色强度进行细胞阳性计分,首先在高倍镜下计数1 000个细胞,肿瘤组织需避开肿瘤边缘及坏死区域,根据阳性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。根据瘤细胞着色的深浅程度计分:标本无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。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(+)为低表达组,(++)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。用COX比例风险模型分析影响SCLC患者生存的可能因素,模型变量包括hOGG1蛋白表达、性别、年龄、肿瘤分期、吸烟指数、淋巴结是否转移、有无胸水,变量筛选方法采用基于偏最大似然估计的前进法。

2 结果

2.1 hOGG1在SCLC与正常肺组织中的表达特点

正常肺及SCLC组织均有hOGG1表达(图1)。在30例正常肺组织中,无单纯的细胞核表达,单纯的细胞质表达18例(占60.0%),核质共表达4例(占13.3%)。在71例小细胞肺癌组织中,单纯的细胞核表达19例(占26.8%),单纯的细胞质表达7例(占9.9%),核质共表达35例(占49.3%)。这一表达方式表明,小细胞肺癌组织与正常肺组织中hOGG1蛋白表达定位有明显差异($\chi^2=38.385$, $P<0.01$)。单纯的核表达仅出现在小细胞肺癌组织中,单纯细胞质表达在正常肺组织中明显高于小细胞肺癌组织($\chi^2=28.466$, $P<0.01$),核质共表

达在小细胞肺癌组织中明显高于正常肺组织($\chi^2=11.506$, $P<0.01$)。在30例正常肺组织中,hOGG1均为低表达。在71例小细胞肺癌组织中,hOGG1低表达15例(占21.1%),高表达56例(占78.9%),统计分析显示小细胞肺癌组织与正常肺组织hOGG1蛋白表达高低有明显差异($\chi^2=53.108$, $P<0.01$),小细胞肺癌组织中hOGG1蛋白以高表达为主,而正常肺组织中hOGG1蛋白以低表达为主(图1)。

2.2 SCLC中hOGG1表达与临床病理的关系

hOGG1蛋白表达与患者性别、肿瘤分期、吸烟指数、淋巴结是否转移、有无胸水等均无显著关系($P>0.05$)(表1)。

表1 hOGG1蛋白表达与SCLC临床病理关系

项目	n	hOGG1低表达	hOGG1高表达	P值
患者	71	15(21.1%)	56(78.9%)	
性别				
男性	63	14	49	>0.05
女性	8	1	7	
国际分期				
局限期	48	11	37	>0.05
广泛期	23	4	19	
吸烟指数				
≤400	28	7	21	>0.05
>400	43	8	35	
淋巴结转移				
无	60	12	48	>0.05
有	11	3	8	
胸水				
无	61	15	46	>0.05
有	10	0	10	

2.3 hOGG1表达与SCLC患者预后的关系

对71例随访至今的病例进行Kaplan-Meier生存分析,结果显示在hOGG1高低表达组之间生存时间有显著性差异($P<0.05$),其中hOGG1低表达组中位生存时间为23个月,hOGG1高表达组中位生存时间为13个月,表明hOGG1表达的高低与SCLC患者的预后密切相关。

2.4 COX比例风险模型多因素分析结果

应用COX比例风险模型分析影响SCLC患者生存的可能因素,模型变量包括hOGG1蛋白表达、性别、年龄、肿瘤分期、吸烟指数、淋巴结是否转移、有无胸水等因素。分析结果提示hOGG1蛋白表达($P=0.004$)和肿瘤分期($P=0.05$)是影响患者生存的独立预后因素(两因素相关系数$r=0.125$)(表2)。

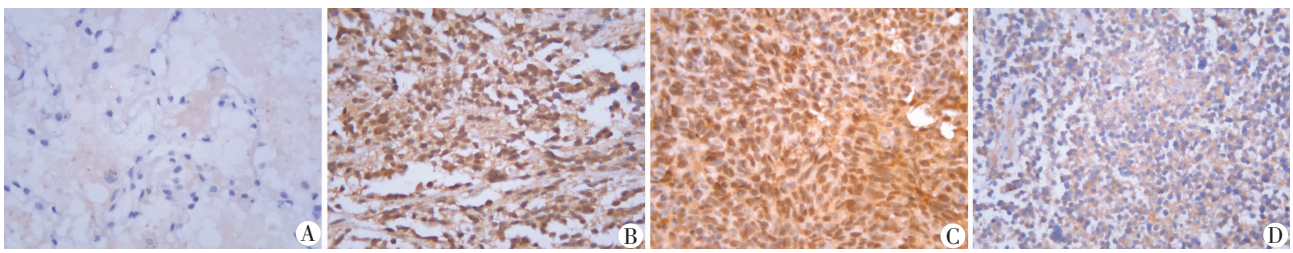
表2 COX模型多因素生存分析结果

影响因素	回归系数	标准误	Wald	P值	RR(95%可信区间)
分期	0.599	0.306	3.831	0.050	1.820(0.999-3.315)
hOGG1表达	1.056	0.369	8.213	0.004	2.876(1.396-5.922)

3 讨论

小细胞肺癌是一种恶性度极高的肿瘤,是一种多基因参与和协同作用的恶性肿瘤,以生长迅速、早期广泛转移、高度侵袭性为特点,多数患者在一线治疗以后仍会出现复发或转移。目前吸烟是公认的诱发肺癌的最重要危险因素,而小细胞肺癌即是与吸烟相关性最强的一种肺癌类型[6]。近年来,由于PET-CT检查的应用,其早期检出率已明显提高[7],但因经济原因或医疗设备的缺乏仍有部分患者发现时已为晚期,严重限制后继治疗策略的选择。小细胞肺癌的分子细胞生物学特征常表现为多种染色体异常,以及癌基因和抑癌基因的变异[8],伴随着遗传变异,小细胞肺癌还表现出肿瘤相关蛋白的过度表达。随着肿瘤分子生物学研究的深入,人们进一步认识了小细胞肺癌发生、发展、复发及转移的分子机制,其中认为DNA损伤修复缺陷是其发生、发展的主要原因之一[9]。

DNA修复系统在维持正常的细胞进程和基因的稳定性方面具有重要地位,在保证生命系统正常运行中的作用举足轻重。DNA损伤修复有4种基本形式,即碱基切除修复、核苷酸切除修复、酶修复和双链断裂修复。其中碱基切除修复(BER)是DNA损伤修复系统中最主要的一种修复途径。参与DNA损伤修复的基因已有130多个,其中21种DNA修复酶基因被列为重点研究对象[10],而hOGG1就是其中一种。脱嘌呤/脱嘧啶位点(AP位点)是DNA损伤的最主要形式[11],而hOGG1基因编码的蛋白产物具有AP裂解酶活性,可以特异性地切除DNA氧化损伤的重要产物8-羟基脱氧鸟嘌呤,从而恢复基因组的正常配对,在防止8-羟基脱氧鸟嘌呤的致突变作用中起着十分重要的作用。目前已有大量资料表明,hOGG1的多态性与多种恶性肿瘤的易感性相关,例如食管癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌、前列腺癌和乳腺癌[12-13]等。



A:正常肺组织hOGG1细胞质为主弱表达;B:小细胞肺癌hOGG1细胞核为主强表达;C:小细胞肺癌hOGG1细胞核+细胞质强表达;D:小细胞肺癌hOGG1细胞质为主强表达

图1 正常肺组织与小细胞肺癌组织hOGG1的表达 (MaxVision™ ×400)

本研究应用免疫组织化学手段检测了 hOGG1 蛋白在 71 例小细胞肺癌标本和 30 例正常肺组织标本中表达情况,结果显示 hOGG1 蛋白在 SCLC 组织中可呈现 3 种表达形式:细胞核表达、细胞质表达和核质共表达,且表达程度强弱不等,但以细胞核表达和核质共表达为主。正常肺组织中以细胞质表达为主,且大部分为低表达。这一表达方式的出现原因可能为,与其他类型的肺癌相比,小细胞肺癌的组织细胞学表现较为独特,常呈神经内分泌增生样改变,核质比例增大有关[14-15]。文献报道,部分恶性肿瘤细胞质免疫组化染色阳性的原因为氧化性损伤可致肿瘤细胞质中线粒体的 DNA 损伤,并在线粒体内形成了 AP 位点及 DNA AP 位点的修复[16]。因此,hOGG1 在 DNA 损伤修复过程中,在肿瘤细胞的细胞核及细胞质均行使其 DNA 损伤后的保护性功能。

同时我们通过 Kaplan-Meier 分析还发现 hOGG1 在小细胞肺癌组织中的表达强度与预后明显相关,hOGG1 高表达组的预后显著差于 hOGG1 低表达组。鉴于 hOGG1 保护性功能的发挥,主要体现在放化疗过程中 DNA 损伤修复能力增强,可以增强小细胞肺癌细胞耐受外界因素(诸如放射性电离辐射、化学制剂等)的损伤,从而维持肿瘤细胞增殖的周期循环,降低肿瘤治疗的效果,影响了患者的生存和预后。因此,对于 hOGG1 高表达的 SCLC 病例,在临床治疗上可能需要增加化疗周期数或增加放疗剂量来达到杀伤肿瘤的目的,但目前尚无相关研究支持。本研究为回顾性分析,30 例为单纯化疗,41 例为放化综合治疗,由于治疗措施的不均一性,未将放化疗对预后的影响纳入生存分析,故不能排除放化疗治疗措施对生存时间的干扰。本研究中 COX 比例风险模型分析结果提示 hOGG1 蛋白表达和肿瘤分期是影响患者生存的独立预后因素,而吸烟指数、淋巴结是否转移、有无胸水等因素未能入选 COX 比例风险模型方程进行分析,考虑是否与不同状态下治疗方式的选择差异有关。近年来国内针对小细胞肺癌患者预后的多因素分析结果显示[17],对一般行为状态好的小细胞肺癌患者经综合治疗后,性别、LDH 升高、手术和体质量下降是影响其预后的主要因素。

综上所述,hOGG1 在小细胞肺癌组织中的表达增强可能与小细胞肺癌的发生、发展及预后密切有关,其机制有待进一步探寻。在以后的临床工作中,可通过分子水平的检测来预测肿瘤患者的预后,为肿瘤的防治工作提供有力的依据,同时为今后选择 DNA 损伤修复靶点的 SCLC 靶向治疗提供理论基础。同时,由于一些 DNA 损伤修复基因的单核苷酸位点多态性会导致 DNA 修复能力的改变,致使某些疾病发生的危险性增加。目前针对 hOGG1 的多态性的研究主要集中在 Ser326Cys 位点,但该位点与小细胞肺癌易感性之间的关系尚不清楚。这也将是我们课题组进行下一步研究的方向。

参考文献:

[1] Kurup A, Hanna N H. Treatment of small cell lung cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 52(2): 117-126.

[2] Cook R, Miller Y, Bunn P A Jr. Small cell lung cancer: etiology, biology, clinical features, staging, and treatment[J]. Curr Probl Cancer, 1993, 17(2): 69-141.

[3] 李红卫, 蒋俊青, 杨竹林, 等. DNA 损伤修复蛋白在胆囊病变组织中的表达及其临床意义[J]. 湘南学院学报: 医学版, 2010, 12(1): 1-5.

[4] Cooke M S, Evans M D, Dizdaroglu M, *et al*. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease[J]. FASEB J, 2003, 17(10): 1195-1214.

[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] Demedts I K, Vermaelen K Y, van-Meerbeeck J P. Treatment of extensive-stage small cell lung carcinoma: current status and future prospects[J]. Eur Respir J, 2010, 35(1): 202-215.

[7] Azad A, Chionh F, Scott A M, *et al*. High impact of 18F-FDG-PET on management and prognostic stratification of newly diagnosed small cell lung cancer[J]. Mol Imaging Biol, 2010, 12(4): 443-451.

[8] D'Angelo S P, Pietanza M C. The molecular pathogenesis of small cell lung cancer[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2010, 13(11): C46-C57.

[9] Poehlmann A, Roessner A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers[J]. Pathol Res Pract, 2010, 206(9): 591-601.

[10] Lindahl T, Wood R D. Quality control by DNA repair[J]. Science, 1999, 286(5446): 1897-1905.

[11] Maynard S, Schurman S H, Harboe C, *et al*. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(1): 2-10.

[12] Weiss J M, Goode E L, Ladiges W C, *et al*. Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature[J]. Mol Carcinog, 2005, 42(3): 127-141.

[13] Yuan W G, Xu L, Feng Y, *et al*. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 122(3): 835-842.

[14] Junker K, Wiethege T, Muller K M. Pathology of small-cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126(7): 361-368.

[15] Travis W D. Pathology of lung cancer[J]. Clin Chest Med, 2002, 23(1): 65-81, viii.

[16] 张云嵩, 范士志, 王东, 等. APE1 在非小细胞肺癌中的表达特点及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9): 776-778.

[17] 李勇, 张湘茹, 孙燕. 小细胞肺癌患者预后的多因素分析[J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(6): 525-529.

(**收稿**:2011-04-05;**修回**:2011-05-27)

(编辑 汪勤俭)