

· 论 著 ·

# APE1 和 VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成和预后的关系\*

顾咸庆, 杨雪琴, 杨宇馨, 金 丰, 王 东<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心, 重庆 400042)

**摘要:**目的 探讨脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶(APE1)与血管内皮生长因子(VEGF)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织中的表达及其与肿瘤血管生成和预后的关系。方法 免疫组化法检测 136 例 NSCLC 组织 APE1、VEGF 的表达,并测定微血管密度(MVD),分析 APE1、VEGF 与 MVD 之间及三者与无病生存时间(DFS)的关系。结果 NSCLC 组织中 APE1、VEGF 高表达率分别为 77.94%和 66.18%。APE1 表达与性别、年龄、病理类型、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移无关,VEGF 表达和 MVD 值与肿瘤大小和淋巴结转移密切相关( $P < 0.05$ )。APE1 与 VEGF、APE1 与 MVD 和 VEGF 与 MVD 分别呈正相关( $r = 0.369, P = 0.000; r = 0.256, P = 0.003; r = 0.387, P = 0.000$ )。肿瘤大小、淋巴结转移及 APE1 和 VEGF 表达、MVD 与 DFS 密切相关( $P < 0.05$ )。COX 模型多因素分析显示,肿瘤大小、淋巴结转移和 VEGF 表达状态是影响 NSCLC 患者无病生存的独立危险因素。结论 APE1、VEGF 的过表达与 NSCLC 肿瘤血管生成有密切关系,影响 NSCLC 患者局部复发和远处转移等无病生存预后。

**关键词:**癌,非小细胞肺;脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶 1;血管内皮生长因子;肿瘤血管生成;预后

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)11-1047-04

## APE1 and VEGF expression and the relationship with angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer\*

Gu Xianqing, Yang Xueqin, Yang Yuxin, Jin Feng, Wang Dong<sup>△</sup>

(Cancer Center, Daping Hospital and Research Institute of Surgery,

Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract:** **Objective** To study the features of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the correlation with angiogenesis and prognosis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Expression of APE1 and VEGF was detected by immunohistochemistry in 136 cases with NSCLC. Microvessel density (MVD) was evaluated by immunohistochemistry with anti-human CD34 antibody. The relationship among APE1, VEGF and MVD was analyzed, and the correlation with disease free survival (DFS) was analyzed in advance. **Results** Positive rate of APE1 and VEGF was 77.94% and 66.18% in NSCLC. The expression of APE1, VEGF and MVD showed significant correlations ( $r = 0.369, P = 0.000; r = 0.256, P = 0.003; r = 0.387, P = 0.000$ ). Tumor size, lymphatic metastasis, MVD, APE1 and VEGF expression levels were significantly related with DFS by Kaplan-Meier survival curve ( $P < 0.01$ ). Multivariate analysis by COX regression model showed that tumor size, lymphatic metastasis and VEGF expression level were the important independent prognosis factor of DFS. **Conclusion** APE1 may increase angiogenesis by regulating the expression of VEGF. It may be closely related to tumor local recurrence and metastasis, and APE1 high expression may indicate poor prognosis in NSCLC.

**Key words:** carcinoma, non-small-cell lung; APE1; VEGF; angiogenesis; prognosis

肺癌是人类最常见和病死率最高的恶性肿瘤,85%以上的肺癌为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)。NSCLC 最常见的传统治疗方式是手术、放疗和化疗,但近 30 年来肺癌的生存情况改善有限,诊断后能存活 5 年以上的患者在所有肺癌患者中仅占 16%,而在已经发生远处转移的肺癌患者中则更是下降至 4%<sup>[1]</sup>。目前,有很多研究探讨肺癌的基因治疗,将表皮生长因子受体作为靶点,阻断其通路的药物吉非替尼和厄洛替尼已经上市应用于临床,更有许多研究尝试寻找新的基因作为靶点来提高治疗效果。脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶/氧化还原因子-1 (apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1, APE1/Ref-1) 具有 DNA 损伤修复和氧化还原等多种功能。作者前期研究发现 APE1 在 NSCLC 中高表达和亚细胞定位改变与预后密切相关且与铂类耐药有关<sup>[2-3]</sup>,此外, APE1 在骨肉瘤中高表达与骨肉瘤分化以及微血管密度

(microvessel density, MVD) 密切相关,并进一步通过体外实验和动物实验证实 APE1 对骨肉瘤血管生成具有调节作用, pSilence APE1 siRNA 可显著抑制骨肉瘤细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达以及骨肉瘤细胞诱导的血管内皮细胞迁徙,并且与内皮抑素具有协同抗血管生成的作用<sup>[4-7]</sup>。因此, APE1 与 NSCLC 的肿瘤血管生成同样可能具有密切关系。本文通过免疫组化法检测 APE1 和 VEGF 在 NSCLC 中的表达及测定 MVD, 分析三者之间的相关性和与无病生存时间(disease free survival, DFS) 的关系, 研究 APE1、VEGF 与 NSCLC 血管生成的关系及其对 NSCLC 局部复发和远处转移等无病生存预后的影响, 同时为今后选择以 APE1 为靶点的 NSCLC 抗血管生成治疗提供理论依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2003~2008 年在第三军医大学大坪医院行

表 1 NSCLC 中 APE1、VEGF 表达及 MVD 与临床病理因素的关系

项目	APE1 低表达	APE1 高表达	P	VEGF 低表达	VEGF 高表达	P	MVD	P
性别								
男	23	79	1.000	35	67	1.000	30.32±6.58	0.548
女	7	27		11	23		29.50±7.84	
年龄(岁)								
<60	14	58	0.535	19	53	0.069	30.49±6.91	0.510
≥60	16	48		27	37		29.70±6.90	
肿瘤大小(cm)								
<5	19	46	0.064	31	34	0.002	27.08±6.54	0.000
≥5	11	60		15	56		32.90±6.01	
淋巴结转移								
无	14	32	0.125	22	24	0.021	27.22±7.08	0.000
有	16	74		24	66		31.60±6.33	
病理类型								
鳞癌	7	42	0.181	15	49	0.837	30.45±7.17	0.779
腺癌	19	57		27	34		30.09±6.86	
混合癌	4	7		4	7		28.82±6.24	
分化程度								
高分化	2	6	0.775	3	5	0.974	27.25±5.95	0.250
中分化	24	80		35	69		29.96±7.08	
低分化	4	20		8	16		31.75±6.17	

手术治疗,术后病理检查确诊为 NSCLC,且术前未行任何抗肿瘤治疗而临床资料及随访资料完整和具有石蜡病理标本的患者共 136 例。其中男 102 例,女 34 例,年龄 32~78 岁,中位年龄 59 岁。按 AJCC 第 7 版癌症分期手册进行临床分期<sup>[8]</sup>,其中 I 期 33 例、II 期 43 例、III 期 60 例。根据 2004 年 WHO 肺癌组织学分类标准对病理组织切片重新复片诊断以统一病理诊断标准,经组织学证实鳞癌 49 例、腺癌 76 例、混合癌 11 例。DFS 的计算从手术日到出现复发或转移或未次随访日。

**1.2 免疫组织化学方法** 136 例 NSCLC 组织石蜡标本切片后应用 SP 免疫组织化学法检测 APE1 和 VEGF 及血管内皮特异标记物 CD34 的表达情况,根据 CD34 计数肿瘤 MVD。鼠抗人 APE1 单克隆抗体购于 Novus Biologicals 公司,兔抗人 VEGF 单克隆抗体和鼠抗人 CD34 单克隆抗体及免疫组化试剂盒均购于北京中杉金桥生物有限公司。严格按照试剂盒说明书进行操作。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照,用已知阳性切片做阳性对照。

**1.3 结果判定** APE1 阳性产物定位于肺癌细胞浆或(和)细胞核,VEGF 则主要表达于肺癌细胞浆。避开肿瘤边缘及坏死区域,在高倍镜下选取 10 个视野,观察计数 1 000 个细胞。根据阳性肿瘤细胞所占百分比计分:<5%为 0 分,5%~<26%为 1 分,26%~<51%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;根据肿瘤细胞着色的深浅即染色强度计分:淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。两项相加为最终判定结果:1 分为(-),2~3 分为(+),4~5 分为(++),6~7 分为(+++),其中一和+记为低表达,而++和+++记为高表达。CD34 阳性染色定位于血管内皮细胞胞浆和(或)胞膜,呈棕黄色颗粒。肿瘤间质区任何黄染的细胞或细胞簇即使未显示管状结构均计为一个微血管,内径大于 8 个红细胞或有较厚肌层的血管不计数为微血管。在低倍镜下选取 3 个肿瘤微血管最丰富的区域在高倍镜(×200)下计数每一视野的微血管数目,取平均值作为 MVD 值。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS18.0 软件进行数据分析,率的比较采用  $\chi^2$  检验,计量资料两组间采用 *t* 检验分析,多组间采用单因素方差分析,相关性采用 spearman 相关分析,单因素生

存分析采用 Kaplan-Meier 法,组间比较采用 Log-rank 检验,多因素生存分析采用 COX 回归模型并计算相对危险度(RR)及其 95%可信区间(95%CI)。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 NSCLC 中 APE1、VEGF 表达特点及其与 MVD 值的关系

APE1 阳性产物呈棕黄色颗粒状,主要在肺癌细胞的胞浆表达,部分定位于细胞核(插图 1);VEGF 主要表达于细胞浆,呈棕黄色至深棕色颗粒状(插图 2);CD34 阳性产物主要表达于肿瘤间质区血管内皮细胞胞浆和(或)胞膜,呈棕黄色颗粒状(插图 3)。APE1、VEGF 的高表达率分别为 77.94%(106/136)和 66.18%(90/136)。APE1 高表达组 MVD 值(31.08±6.57)明显高于低表达组(26.70±7.01)(P=0.002),VEGF 高表达组 MVD 值(31.93±6.65)明显高于低表达组(26.57±5.97)(P=0.000)。Spearman 等级相关分析显示,APE1 与 VEGF、APE1 与 MVD 和 VEGF 与 MVD 在 NSCLC 中呈正相关( $r=0.369$ , $P=0.000$ ; $r=0.256$ , $P=0.003$ ; $r=0.387$ , $P=0.000$ )。

表 2 NSCLC 中 APE1 及 VEGF 表达、MVD 和临床病理因素与 DFS 的关系

项目	n	1 年无病生存率(%)	3 年无病生存率(%)	5 年无病生存率(%)	P
性别					
男	102	61.8	40.7	37.9	0.096
女	34	76.5	55.9	55.9	
年龄(岁)					
<60	72	69.4	42.6	40.5	0.922
≥60	64	60.9	46.9	44.4	
肿瘤大小(cm)					
<5	65	89.2	70.5	65.9	0.000
≥5	71	43.7	20.8	20.8	
淋巴结转移					
无	46	84.8	71.7	68.2	0.000
有	90	55.6	30.9	29.4	
病理类型					
鳞癌	49	69.4	44.5	41.0	0.799
腺癌	76	63.2	43.2	41.5	

续表 2 NSCLC 中 APE1 及 VEGF 表达、MVD 和临床病理因素与 DFS 的关系

项目	n	1 年无病生存率(%)	3 年无病生存率(%)	5 年无病生存率(%)	P
混合癌	11	63.6	54.5	54.5	
分化程度					
高分化	8	75.0	56.3	56.3	0.394
中分化	104	65.4	44.0	42.8	
低分化	24	58.3	36.5	36.5	
APE1					
低表达	30	86.7	69.0	63.3	0.003
高表达	106	59.4	36.4	36.4	
VEGF					
低表达	46	93.5	75.9	70.2	0.000
高表达	90	51.1	28.5	28.5	
MVD					
<30	60	83.3	66.0	61.0	0.000
≥30	76	51.3	27.6	27.6	

表 3 NSCLC 预后因素的多因素 COX 回归分析

项目	回归系数(B)	标准误(SE)	Wald 检验	自由度(df)	P	相对危险度(RR)	RR 95.0%可信区间
肿瘤大小	1.080	0.274	15.533	1	0.000	2.943	[1.721,5.035]
淋巴结转移	0.761	0.311	5.970	1	0.015	2.140	[1.162,3.939]
APE1	0.358	0.353	1.033	1	0.309	1.431	[0.717,2.855]
VEGF	1.085	0.336	10.428	1	0.001	2.961	[1.532,5.722]
MVD	0.236	0.285	0.688	1	0.407	1.267	[0.725,2.214]

3 讨 论

肺癌是人类最常见和病死率最高的恶性肿瘤,但目前 NSCLC 的治疗效果欠佳,尤其是局部中晚期肺癌化疗作用有限,在化疗过程中常常产生化疗抵抗而影响疗效。肿瘤血管在肿瘤生长、浸润和转移中起重要作用。一方面肿瘤细胞的快速增殖能力依赖于微血管网络的不断扩张,伴随着血管发生,癌灶生长迅速;另一方面肿瘤新生血管除其内皮细胞分泌的胶原酶和纤溶酶原激活因子可使瘤细胞从肿瘤组织中脱落外,其还缺乏或仅有基底膜片段,为脱落的肿瘤细胞进入血循环提供开放的门户,肿瘤血管密度越大癌细胞脱落进入血循环的概率越大,肿瘤转移的概率就越大<sup>[9]</sup>,因此肿瘤血管生成已受到越来越多的研究者重视。肿瘤血管生成是一个非常复杂的过程,它与许多基因和细胞内外微环境的改变均有关系,受多种细胞因子的正负性调节。VEGF 是经典的促血管生成因子之一,可作用于血管内皮细胞,使其分化形成新的血管,并增加血管通透性<sup>[10]</sup>。

人类 APE1 基因定位于 14 号染色体长臂(14q11.2-12),全长 2.6 kb,包含 4 个内含子和 5 个外显子,其 cDNA 长约 1.4 kb,包含 1 个由 954 个核苷酸组成的编码区,编码 318 个氨基酸的蛋白(相对分子量约 37×10<sup>3</sup>)<sup>[11]</sup>。APE1 蛋白含有两个不同的结构域,其 C 末端主要为 DNA 损伤修复内切酶活性区,N 末端主要为氧化还原调控区<sup>[11-12]</sup>。研究还表明 APE1 蛋白除发挥自身的氧化还原功能外,还充当氧化还原伴侣蛋白的角色,使氧化还原敏感型转录因子更易被其他还原剂还原<sup>[13]</sup>。

APE1 是细胞 DNA 放射性和化学性损伤碱基切除修复的重要限速酶。研究已经证实 APE1 表达增强可导致肺癌化疗抵抗,是预后不良因素之一,抑制 APE1 表达则可增强放化

疗敏感性<sup>[3,14]</sup>。APE1 通过氧化还原功能可保持 AP-1、Egr-1、p53、HIF-1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 等多种转录因子活性的还原状态,增强它们与 DNA 的结合能力<sup>[11-12]</sup>。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<sup>[15-16]</sup>,而 HIF-1 $\alpha$  是目前较为肯定对 VEGF 存在调控的核转录因子<sup>[17]</sup>,在 VEGF 5'端增强子内存在 HIF-1 $\alpha$  结合位点——低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)<sup>[18]</sup>。低氧条件下,APE1 作为转录辅激活因子与 HIF-1 $\alpha$  形成复合物,一方面与 VEGF 的 HRE 结合使 VEGF 的转录和表达增强,增加血管生成<sup>[19-20]</sup>;另一方面,还可增加缺氧情况下 VEGF mRNA 的稳定性<sup>[21]</sup>。APE1 也可以通过其氧化还原功能上调 H-ras 基因的表达,而 H-ras 基因的激活上调在皮肤癌形成的不同阶段与 VEGF 的表达呈正相关<sup>[22]</sup>,还能增强内皮细胞中的一氧化氮合酶对钙的敏感性,提高一氧化氮的生成量,而一氧化氮可以诱导内皮细胞表型改变,促使其出芽及移动,提高其克隆形成能力,形成新生血管<sup>[23]</sup>。Kakolyris 等<sup>[24]</sup>首先在乳腺癌中提出 APE1 表达可能与淋巴结转移和肿瘤血管生成有关。本实验前期研究也证实 APE1 对骨肉瘤血管生成具有调节作用,pSilence APE1siRNA 可显著抑制骨肉瘤细胞 VEGF 的表达及其诱导的血管内皮细胞迁徙,并且与内皮抑素具有协同抗血管生成的作用<sup>[4-7]</sup>。沈春燕等<sup>[25]</sup>最近研究了 APE1、VEGF 在 II、III 期手术 NSCLC 中的表达,认为 APE1 与 VEGF 的表达存在相关性,APE1 过表达可能促进肿瘤组织血管的生成,并多因素分析显示 APE1 表达是影响 NSCLC 患者生存率的独立危险因素,可导致患者预后不良,总生存期缩短。

本研究显示 APE1 在 I、II、III 期手术 NSCLC 中的高表达率为 77.94%,与沈春燕等<sup>[25]</sup>的研究 APE1 在 II、III 期手术 NSCLC 中的高表达率 78.2% 相似,但沈春燕等<sup>[25]</sup>的研究认为

本研究显示 APE1 在 I、II、III 期手术 NSCLC 中的高表达率为 77.94%,与沈春燕等<sup>[25]</sup>的研究 APE1 在 II、III 期手术 NSCLC 中的高表达率 78.2% 相似,但沈春燕等<sup>[25]</sup>的研究认为

APE1 与吸烟和淋巴结转移相关。本研究则显示 APE1 与性别、年龄、病理类型、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移均无相关性,与张云嵩等的研究结果一致<sup>[2]</sup>。在沈春燕等<sup>[25]</sup>的研究中,VEGF 在Ⅱ、Ⅲ期手术 NSCLC 中的高表达率为 64.1%,并与肿瘤大小、分化程度和淋巴结转移相关,本研究则显示 VEGF 的高表达率为 66.18%,与肿瘤大小和淋巴结转移密切相关,与分化程度无相关性。本研究定量分析肿瘤血管生成的方法仍采用大多数研究所采用的 MVD 计数,结果与沈春燕等的研究相似,APE1 高表达组的 MVD 明显高于低表达组;VEGF 高表达组的 MVD 亦明显高于低表达组,均具有统计学意义( $P=0.002$ 和 $P=0.000$ )。经 Spearman 相关分析表明,三者两两间表达均存在相关性( $r=0.369,P=0.000$ ;  $r=0.256,P=0.003$ ;  $r=0.387,P=0.000$ )。

目前认为 MVD 值高提示肿瘤更易于发生转移,是预后不佳的指标。本研究按中位数将 MVD 分为两组,用 Kaplan-Meier 法进行单因素生存分析也证实其与 DFS 的关系密切,MVD 值高者 DFS 明显缩短( $P=0.000$ )。APE1 和 VEGF 与 MVD 均有相关性,因此 APE1 和 VEGF 也有可能是预后不良的因素。通过 Kaplan-Meier 法对 136 例Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期手术 NSCLC 病例进行单因素生存分析,结果显示 APE1 和 VEGF 不同表达组间无疾病进展生存时间差异有统计学意义( $P=0.003$ 和 $P=0.000$ ),并且对单因素生存分析显示与无病生存密切相关具有统计学意义的肿瘤大小、淋巴结转移、APE1 表达、VEGF 表达、MVD 等进行 COX 模型多因素分析,结果显示肿瘤大小、淋巴结转移和 VEGF 表达是 NSCLC 患者无病生存的独立危险因素,与沈春燕等的实验结论肿瘤大小、淋巴结转移和 APE1 表达是影响 NSCLC 患者预后的独立因素不尽相同<sup>[24]</sup>。可能原因是本研究采用 DFS 进行生存分析,而沈春燕等的实验结论则通过总生存时间来判断预后,APE1 是多功能基因存在多种通路影响恶性肿瘤生长和转移,而大多数患者出现疾病复发和转移会选择进一步放化疗等治疗,APE1 高表达与 DNA 损伤修复所致放化疗抵抗有关,增大了 APE1 在预后中的作用。另外一个原因为本研究包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期手术 NSCLC 病例,部分患者术后不需要放化疗,而沈春燕等的实验则只包括Ⅱ、Ⅲ期手术 NSCLC 病例,术后均需要放化疗。

综上所述,APE1 与 VEGF 的表达和 MVD 在 NSCLC 中存在相关性,APE1 高表达可能通过调控 VEGF 促进 NSCLC 肿瘤组织血管生成,从而导致肿瘤复发或转移。但是,APE1 可能只是调控 VEGF 促进 NSCLC 肿瘤组织血管生成的因素之一,以之为靶点的抗血管生成治疗可能需与其他抗血管生成治疗联合才能达到最佳的抗肿瘤血管生成效果。因此未来的研究方向可能为如何与其他抗血管生成治疗联合以达到最佳治疗效果。

#### 参考文献:

- [1] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011; the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 212-236.
- [2] 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.
- [3] Wang D, Xiang DB, Yang XQ, et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the

- activity of cisplatin in A549 cells[J]. *Lung Cancer*, 2009, 66(3): 298-304.
- [4] 王东, 仲召阳, 李增鹏, 等. DNA 损伤修复基因 APE1 在骨肉瘤中的表达及其与血管生成的关系[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(15): 1121-1126.
- [5] 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.
- [6] 王东, 仲召阳, 李增鹏, 等. pSilence APE1 对骨肉瘤诱导血管内皮细胞迁徙抑制作用的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(2): 93-96.
- [7] Wang D, Zhong ZY, Li MX, et al. Vector-based Ape1 small interfering RNA enhances the sensitivity of human osteosarcoma cells to endostatin in vivo[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(12): 1993-2001.
- [8] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC Cancer Staging Manual*[M]. 7th ed. New York: Springer, 2010.
- [9] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis[J]. *Semin Oncol*, 2002, 29(6 Suppl 16): 15-18.
- [10] Korpanty G, Smyth E, Sullivan LA, et al. Antiangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(1): 3-9.
- [11] Erans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1[J]. *Mutat Res*, 2000, 461(2): 83-108.
- [12] Tell G, Quadrioglio F, Tiribelli C, et al. The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(3): 601-620.
- [13] Ando K, Hirao S, Kabe Y, et al. A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF-kappaB and AP-1, and activation of their DNA-binding activity[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(13): 4327-4336.
- [14] Singh-Gupta V, Joiner MC, Runyan L, et al. Soy isoflavones augment radiation effect by inhibiting APE1/Ref-1 DNA repair activity in non-small cell lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6(4): 688-698.
- [15] Vidal F, Aragonés J, Arantzazu A, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 after endothelial denudation: role of transcription factor Egr-1[J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3387-3395.
- [16] Wu HH, Cheng YW, Chang JT, et al. Subcellular localization of apurinic endonuclease 1 promotes lung tumor aggressiveness via NF-kappaB activation[J]. *Oncogene*, 2010, 29(30): 4330-4340.
- [17] Damert A, Machein M, Breier G, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and enolase1: involvement of HIF-1 in tumor progression[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(23): 5328-5335.
- [18] Tsuzuki Y, Fukumura D, Osthuysen B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha hypoxia response element VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6248-6252.
- [19] Ziel KA, Campbell CC, Wilson GL, et al. (下转第 1054 页)

hTERT<sub>p</sub> 或 CMV<sub>p</sub> 驱动的 LF 真核表达载体, 转染 A549 细胞和 MRC-5-2 细胞株, 观察 LF 的表达和对细胞的杀伤。结果发现, hTERT<sub>p</sub> 和 CMV<sub>p</sub> 都能驱动 LF 表达于并杀伤 A549 细胞, 杀伤效能包括细胞活力下降, 凋亡/坏死率上升。所采用的 Annexin V-FITC 标记法, 可以同时检测凋亡和坏死比例, 其结果和 MTT 分析法检测的细胞活力下降相一致。但 hTERT<sub>p</sub> 的效能较 CMV<sub>p</sub> 弱, 这可能和 hTERT<sub>p</sub> 的活性可能比 CMV<sub>p</sub> 的活性低有关。另一方面, 和 CMV<sub>p</sub> 能驱动 LF 表达于 MRC-5 细胞并杀伤后者相反, hTERT<sub>p</sub> 并不能驱动 LF 表达于并杀伤 MRC-5 细胞。提示可能和 MRC-5 细胞中端粒酶活性为阴性有关。这提示, hTERT<sub>p</sub> 驱动 LF 表达是肿瘤特异性的, 避免了对正常细胞的毒性。

本研究设想以下几种进一步增进 hTERT<sub>p</sub> 的活性, 以得到更强的抑瘤效应的策略: (1) 包括肺癌在内的实体肿瘤细胞往往处于缺氧环境<sup>[7]</sup>, 且往往需要放射治疗, 故可在 hTERT<sub>p</sub> 上游增加缺氧或放射反应元件, 构建成缺氧或放射诱导型增强子, 以增强 hTERT<sub>p</sub> 的效能。(2) hTERT<sub>p</sub> 内部存在 E-box 结合元件, 它是 c-Myc 等癌基因激活 hTERT<sub>p</sub> 的重要结构<sup>[8-9]</sup>, 故可通过人工基因合成, 增加 E-box 结合元件的拷贝数, 亦有望增加 hTERT<sub>p</sub> 在肿瘤细胞内的活性。这方面, 值得进一步研究。此外, 近来还发现, 肿瘤血管表达炭疽毒素的另一组份 EF 的受体 TEM-8 和 CMG-2<sup>[10-11]</sup>, 设想如果用 hTERT<sub>p</sub> 驱动分泌型 EF 表达于肿瘤细胞, 则有可能实现对肿瘤血管的靶向性破坏。这方面, 亦值得进一步地探索。

#### 参考文献:

[1] Su Y, Ortiz J, Liu S, et al. Systematic urokinase-activated anthrax toxin therapy produces regressions of subcutaneous human non-small cell lung tumor in athymic nude mice[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 3329-3336.

[2] Deng WG, Jayachandran G, Wu G, et al. Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2beta in human lung cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(36): 26460-26470.

(上接第 1050 页)

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): 986-988.

[20] Gray, MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-1a, 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.

[21] Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(4): 908-914.

[22] Larcher F, Robles AI, Duran H, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability

[3] Horikawa I, Cable PL, Afshari C, et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 826-830.

[4] 张明满, 李德华, 苟兴华, 等. 靶向肝癌细胞的重组腺相关病毒载体的构建[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2005, 12(2): 142-146.

[5] Bromberg-White JB. Biochemical Characterization of Anthrax Lethal Factor. A proteolytic inhibitor of MEK signaling pathways[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 438(8): 355-365.

[6] Wei W, Lu Q, Chaudry GJ, et al. The LDL receptor-related protein LRP6 mediates internalization and lethality of anthrax toxin[J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1141-1154.

[7] Wang T, Niki T, Goto A, et al. Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(4): 506-511.

[8] Purification JH. Identification of a transcription factor. USF-2, binding to E-box element in the promoter of human telomerase reverse transcriptase (hTERT)[J]. *Proteomics*, 2010, 10(2): 203-211.

[9] Xu DK, Dwyer J, Li H, et al. Ets2 maintains hTERT gene expression and breast Cancer cell proliferation by interacting with c-Myc[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(35): 23567-23580.

[10] Cryan LM, Rogers MS. Targeting the anthrax receptors, TEM-8 and CMG-2, for anti-angiogenic therapy[J]. *Front Biosci*, 2011, 16(2): 1574-1588.

[11] Reeves CV, Dufraigne J, Young JA, et al. Anthrax toxin receptor 2 is expressed in murine and tumor vasculature and functions in endothelial proliferation and morphogenesis[J]. *Oncogene*, 2010, 29(6): 789-801.

(收稿日期: 2011-11-21 修回日期: 2011-12-22)

factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(23): 5391-5396.

[23] Jeon BH, Gupta G, Park YC, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone[J]. *Circ Res*, 2004, 95(9): 902-910.

[24] Kakolyris S, Kaklamanis L, Engels K, et al. Human AP endonuclease 1 (HAP1) protein expression in breast cancer correlates with lymph node status and angiogenesis[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(7): 1169-1173.

[25] 沈春燕, 穆海玉, 王忱, 等. APE1、VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. *天津医科大学学报*, 2011, 17(2): 166-169, 193.

(收稿日期: 2011-11-18 修回日期: 2011-12-17)