

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.020

骨肉瘤组织中 MGMT 的表达与顺铂治疗后瘤组织坏死程度的关系

Association of tumor necrosis degree with MGMT protein expression in osteosarcoma after cisplatin treatment

崔秋, 郭钧, 刘蜀彬, 姜维浩, 刘耀升, 范海涛, 王磊, 张斌, 李鼎锋* (中国人民解放军军事医学科学院附属解放军 307 医院 骨科, 北京 100071)

[摘要] 目的: 探讨骨肉瘤组织中 O(6)-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶[O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT]的表达与顺铂(cisplatin, DDP)治疗后瘤组织坏死程度的关系。方法: 选取 2001 年 1 月至 2008 年 4 月北京 307 医院骨科收治的骨肉瘤患者 76 例, 全部患者均以标准的 DDP 方案治疗 3 个疗程以上, 然后手术切除肿瘤。以免疫组化法检测顺铂治疗前活检标本中 MGMT 的表达, 以 H-E 染色观察手术切除骨肉瘤组织的坏死程度, 分析 MGMT 表达和肿瘤坏死程度的关系。结果: 本组患者骨肉瘤组织中 MGMT 蛋白的表达率为 68% (52/76), 其毛细血管扩张型、成骨细胞型、成软骨细胞型、成纤维细胞瘤型间的 MGMT 表达率无差异。MGMT 阴性的肿瘤经 DDP 化疗后的组织坏死率高, 反之肿瘤坏死率低 ($P < 0.01$)。结论: MGMT 蛋白表达与 DDP 化疗后骨肉瘤组织的坏死程度呈负相关, 该指标部分地反映肿瘤的耐药性和 DDP 的疗效。

[关键词] 骨肉瘤; O(6)-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT); 顺铂

[中图分类号] R730.5; R738.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)04-0520-03

近年来骨肉瘤患者 5 年生存率和保肢手术成功率明显提高, 得益于化疗在骨肉瘤综合治疗中重要的作用。目前国内外应用顺铂(cisplatin, DDP)进行骨与软组织恶性肿瘤化疗, 但该方案尚不能完全解决化疗产生的耐药性问题。研究发现, 肿瘤细胞的耐药性很大程度上来自两个方面, 一方面是通过 *mdr1* 基因编码的 P-gp 蛋白将细胞内的化疗药物主动转运到细胞外, 从而降低了细胞内药物的有效浓度; 另一方面, 肿瘤细胞顽强的修复机能亦使化疗药物的作用大为削减^[1-3]。O(6)-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶[O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT]可以修复 DNA 鸟嘌呤碱基上的甲基化损伤和任何形式的烷基化损伤, 对抗各种化疗药物杀伤肿瘤细胞的作用, 构成肿瘤细胞对烷化剂药物的耐药性^[4-8]。研究发现肿瘤组织中 DNA 修复蛋白 MGMT 的高表达与化疗疗效呈负相关关系^[9-14]。为此, 本研究探讨了 MGMT 蛋白的表达与 DDP 对骨肉瘤疗效的关系, 进行了比较分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

以 2002 年 1 月至 2008 年 4 月北京 307 医院骨科收治的 76 例骨肉瘤患者为研究对象。76 例患者中男性 42 例, 女性 34 例, 确诊年龄 9~43 岁, 中位年龄 17 岁。病理类型: 毛细血管扩张型 3 例, 成骨细胞型 22 例, 成软骨细胞型 11 例, 成纤维细胞瘤型 16 例。患者入院后, 收集其治疗前活检病理组织标本蜡块进行 MGMT 蛋白的检测, 并按照不同病理类型骨肉瘤加以

区分。所有患者均经标准的 3 次或 3 次以上 DDP 治疗, 剂量 120 mg/m^2 , 化疗后手术切除病灶, 然后评估病灶的坏死程度。

1.2 主要试剂

专用封闭液、鼠抗人 MGMT 单抗、羊抗鼠 IgG 二抗、APPAP 酶复合物、底物、底物缓冲液、苏木精复染液、封片剂等均为军事医学科学院野战输血研究所研制的 MGMT 免疫组化诊断试剂盒中的组分。

1.3 免疫组化法检测骨肉瘤组织 MGMT 蛋白的表达

将组织在脱蜡脱水后甲醛固定、石蜡包埋、切片, 将切片置于 0.3% 的过氧化氢中 10 min 灭活内源性酶。PBS 冲洗且封闭后, 上一抗 4℃ 过夜, 第 2 天再用 PBS 冲洗; 二抗 37℃ 孵育 30 min, 接着用 PBS 冲洗; 三抗 37℃ 孵育 30 min, 常规洗涤, 然后 DAB 显色。

1.4 MGMT 表达染色结果判定标准

显微镜下观察, 在肿瘤细胞核或质内有粉红色着色颗粒的为阳性。其中着色细胞 > 30% 的为强阳性(III); 着色细胞在 20%~30% 为中等阳性(II); 着色程度很弱, 阳性细胞 < 10% 的为弱阳性(I)。所有检测结果在双盲情况下由主要研究者及病理科专业人员阅片评估。

1.5 H-E 染色观察手术切除骨肉瘤组织的坏死程度

将 76 例患者手术切除肿瘤标本分别自中心至边缘各部位连续切取 12 个标本, H-E 染色, 每标本随机

[作者简介] 崔秋(1979-), 男, 陕西省西安市人, 硕士, 主治医师, 主要从事骨肿瘤方面的研究

* 通信作者(Corresponding author). E-mail: 307yygk@sina.com

切取2张切片,每张切片选取观察5个视野,计数存活肿瘤细胞。若某张切片未发现有存活肿瘤细胞,则应检查整张切片,计数存活肿瘤细胞。各视野存活细胞数平均值为N。选取化疗前活检标本有代表性的病理切片,随机选取3个视野,计数肿瘤细胞,取其平均值M作为基数,计算肿瘤细胞坏死率(tumor cell necrosis rate,TCNR), $TCNR(\%) = (1 - N/M) \times 100\%$ 。按照Huvos法分级:I级为 $TCNR \leq 50\%$,II级为 $50\% < TCNR \leq 90\%$,III级为 $90\% < TCNR \leq 99\%$,IV级为 $TCNR = 100\%$ 。以TCNR评价DDP的疗效^[15-17]。

1.6 统计学处理

统计学分析用SPSS 13.0软件完成,分别进行 χ^2 检验和方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织MGMT蛋白的表达

免疫组化检测结果(图1)显示,本组76例骨肉瘤活检标本中MGMT阳性52例(52/76,68%),其中(+)27例(35%),(++)18例(24%),(+++)7例(9%)。按不同病理类型统计MGMT阳性率,毛细血管瘤扩张型3例(3/52,6%)、成骨细胞型22例(22/52,42%)、成软骨细胞型11例(11/52,21%)、成纤维细胞瘤型16例(16/52,31%)。经 χ^2 检验,不同病理类型的骨肉瘤中MGMT蛋白表达差异无统计学意义($P = 0.662$,表1)。

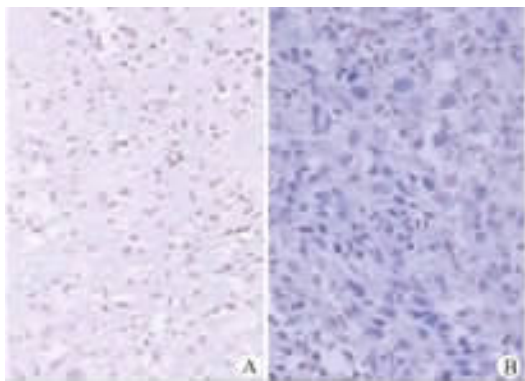


图1 免疫组化检测骨肉瘤组织MGMT蛋白的表达(×40)
A: MGMT阴性表达; B: MGMT阳性表达

2.2 骨肉瘤MGMT的表达与顺铂治疗后肿瘤病灶坏死程度的关系

MGMT阴性的病理标本肿瘤细胞坏死率I级3例(3/24,12.5%),II级7例(7/24,29.1%),III级10例(10/24,41.7%),IV级4例(4/24,16.7%)。MGMT阳性的病理标本肿瘤细胞坏死率I级20例(20/52,38.5%),II级13例(13/52,25.0%),III级11例(11/52,21.0%),IV级8例(8/52,15.4%)。经方差分析显

示,不同坏死程度肿瘤组织的MGMT表达率间差异有统计学意义($P = 0.004$,表2),表明MGMT阴性的骨肉瘤对DDP敏感,MGMT蛋白表达与化疗后的肿瘤病理坏死呈负相关,MGMT表达强阳性的骨肉瘤化疗后病灶病理坏死较轻。

表1 不同病理类型骨肉瘤组织MGMT蛋白的表达[n(%)]

病理分型	MGMT表达		
	+	++	+++
毛细血管瘤扩张型	2(4)	1(2)	0(0)
成骨细胞型	10(19)	9(17)	3(6)
成软骨细胞型	6(12)	2(4)	3(6)
成纤维细胞瘤型	9(17)	6(12)	1(2)

表2 不同病理类型骨肉瘤组织MGMT的表达与化疗后肿瘤病灶坏死程度的关系[n(%)]

MGMT表达	肿瘤灶坏死程度			
	I	II	III	IV
-	3(4)	7(9)	10(13)	4(5)
+	4(5)	7(9)	9(12)	7(9)
++	11(14)	4(4)	2(3)	1(1)
+++	5(7)	2(3)	0(0)	0(0)

3 讨论

研究证明烷化剂抗肿瘤药可造成DNA碱基的烷化损伤,其中以形成O(6)-甲基鸟嘌呤对细胞的威胁最大,它能导致G:C→A:T突变,造成细胞突变或死亡。MGMT是从细菌到哺乳类动物机体中都存在的一种独特的DNA修复酶,它同时发挥转移酶与甲基接受体的作用,在DNA交联形成前将烷化基团从O(6)-mG的O(6)位转移到自身的半胱氨酸残基上,使DNA链上的鸟嘌呤损伤修复,同时MGMT在转甲基后不可逆地失去活性。目前还没有发现其他蛋白质参与此过程,因此,MGMT是决定细胞对烷化剂类药物产生耐药的分子基础^[4,8]。

DDP具有类似烷化剂双功能基团的作用,能抑制DNA的合成。Preuss等^[18]发现MGMT酶活性高的肿瘤细胞对DDP耐药,MGMT酶活性低的肿瘤细胞对DDP敏感。Mattern等^[19]将14株肿瘤细胞系接种到裸鼠右腋下,分别注射CTX和DDP,观察MGMT活性和上述两种化疗药对肿瘤移植物的疗效,发现MGMT活

性与肿瘤对 CTX 的敏感性呈负相关, 而 DDP 实验组未发现有此相关性。Bruheim 等^[20]为进一步改善骨肉瘤个体化治疗策略, 以多柔比星、顺铂、甲氨蝶呤、异环磷酰胺、洛莫司汀等不同化疗药物作用于骨肉瘤, 发现 GST - PI 反转录水平和多柔比星抑制负相关, MGMT 和洛莫司汀的疗效呈负相关, 而表达的 MRP1 与顺铂抑制呈正相关。王东等^[21]在研究骨肉瘤 DNA 损伤修复相关基因表达与预后的关系时指出, 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 MGMT 高表达为 32 例(53%)。

本实验通过对 76 例骨肉瘤患者的 MGMT 蛋白检测发现, 不同病理类型骨肉瘤的 MGMT 蛋白表达无明显差异。通过对肿瘤活检标本 MGMT 蛋白表达及手术切除病理标本的坏死程度分析, 间接评价其化疗效果, 发现 MGMT 蛋白表达与化疗后的肿瘤坏死程度呈负相关($P < 0.01$), MGMT 蛋白表达阴性、弱阳性的肿瘤化疗后坏死程度高于 MGMT 蛋白表达强阳性的坏死程度。该结果说明, MGMT 强阳性表达的骨肉瘤对 DDP 产生耐药性的概率大, 因而疗效较差。

虽然关于化疗药物耐药性的形成机制还未完全搞清楚, 但在部分肿瘤细胞系中, 通过抑制 MGMT 活性结合化疗药物可取得良好的结果, 检测肿瘤组织中 MGMT 活性高低可以对骨肉瘤等肿瘤实施预见性的个体化药物治疗。

[参考文献]

- [1] 邱俊骏, 施鑫, 赵建宁, 等. 骨肉瘤化疗耐药相关基因的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2005, 18(2): 164-166.
- [2] 徐珊, 徐昌芬. 肿瘤多药耐药性发生机制及中药逆转作用的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(6): 404-411.
- [3] 张宁宁, 丁也. 肿瘤多药耐药性的相关研究[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(11): 27-29.
- [4] 章扬培. 甲基转移酶与肿瘤耐药预见性、个体化化疗的研究[J]. 癌症, 2004, 23(6): 724-734.
- [5] Zhang Y, You Y. Sensitization of acnu killing effects on HeLa S3 cells by MGMT antisense RNA transfection[J]. Chinese Med Sci J, 1998, 13(1): 14-19.
- [6] 季守平, 由英, 吴英, 等. 反义 RNA 调节肿瘤细胞 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶活性[J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 1998, 3(4): 322-327.
- [7] 任会明, 章扬培, 张保民, 等. 抗人甲基转移酶单克隆抗体的制备及临床应用研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2001, 25(2): 81-86.
- [8] 朱凌冬, 蔡景龙, 远里美. O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶的研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(12): 802-804.
- [9] 薄爱华, 邢立强, 卢广平, 等. DNA 修复酶(MGMT)在人胃肠道癌中表达的临床意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(3): 284-287.
- [10] 张俊平, 史鸿渊, 赛克, 等. 体外药敏实验及 MGMT 表达为依据的恶性脑胶质瘤个体化化疗: 42 例近期疗效分析[J]. 癌症, 2006, 25(12): 1533-1537.
- [11] 康马飞, 秦自科. MGMT 表达与恶性肿瘤化疗关系的研究现状[J]. 肿瘤学杂志, 2008, 14(1): 67-70.
- [12] 白金君, 王发亮, 薄爱华, 等. O6-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(MGMT)在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(9): 1499-1051.
- [13] 杜永杰, 李坚, 陈萍. 顺铂对肺癌细胞耐药基因表达水平的影响[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2008, 18(3): 238-241.
- [14] 徐丽, 崔云, 李桂林, 等. 胶质瘤组织 MGMT 和 Ki-67 表达对患者预后的影响[J]. 首都医科大学学报, 2009, 30(3): 285-288.
- [15] Rosen G, Caparros B, Huvos AG, et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy[J]. Cancer, 1982, 49(6): 1221-1230.
- [16] 徐瑾. 化疗所致恶性骨肿瘤坏死的组织学评估及其意义[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(1): 23-25.
- [17] 于秀淳, 刘晓平, 周银, 等. MMIA 术前化疗在骨肉瘤保肢术中的意义[J]. 肿瘤防治研究, 2003, 30(2): 217-219.
- [18] Preuss I, Eberhagen I, Haas S, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors[J]. Int J Cancer, 1995, 61(3): 321-326.
- [19] Mattem J, Eichhorn U, Kaina B, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity and sensitivity to cyclophosphamide and cisplatin in human lung tumor xenografts[J]. Int J Cancer, 1998, 77(6): 919-922.
- [20] Bruheim S, Bruland OS, Breistol K, et al. Human osteosarcoma xenografts and their sensitivity to chemotherapy[J]. Pathol Oncol Res, 2004, 10(3): 133-141.
- [21] 王东, 张沁宏, 仲召阳, 等. 骨肉瘤 DNA 损伤修复相关基因表达与预后的关系[J]. 第三军医大学学报, 2005(13): 1370-1373.

[收稿日期] 2009-07-18

[修回日期] 2009-09-15

[本文编辑] 韩丹