

MGMT、XRCC1 基因在脑胶质瘤中的表达及其临床应用

王参智¹⁾, 罗林²⁾

(1) 中国五冶集团有限公司医院神经外科, 四川成都 610041; 2) 昆明医科大学第三附属医院神经外科, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 探讨 MGMT、XRCC1 基因在不同级别脑胶质瘤中的表达及其临床应用. **方法** 采用免疫组织化学技术, 检测不同级别脑胶质瘤组织中 MGMT、XRCC1 的表达情况, 分析 MGMT、XRCC1 与胶质瘤的病理级别的关系. **结果** MGMT、XRCC1 阳性表达在不同级别胶质瘤之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), MGMT 和 XRCC1 在胶质瘤中的表达也无相关性 ($P > 0.05$). **结论** MGMT、XRCC1 的表达与胶质瘤恶性程度无相关性, 测定 MGMT、XRCC1 的表达水平可为胶质瘤的个性化化疗提供参考依据.

[关键词] MGMT 基因; XRCC1 基因; 脑胶质瘤; 临床应用

[中图分类号] R739.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 12-0112-05

The Expressions of MGMT and XRCC1 in Human Brain Gliomas and Their Clinical Application

WANG Can-zhi¹⁾, LUO Lin²⁾

(1) Dept. of Neurosurgery, Hospital of China MCC5 Group Co., Ltd., Chengdu Sichuan 610041; 2) Dept. of Neurosurgery, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expressions of MGMT and XRCC1 in human brain gliomas and their clinical application. **Methods** The expressions of MGMT and XRCC1 in glioma tissues were detected by using immunohistochemical technique, and their correlations with tumor grade were analyzed. **Results** There were no statistically significant differences in the expressions of MGMT and XRCC1 in gliomas of different grades ($P > 0.05$). The expressions of MGMT and XRCC1 in gliomas were not related ($P > 0.05$). **Conclusion** The expressions of MGMT and XRCC1 were not related with the tumor grades, and the determination of the expression levels of MGMT and XRCC1 could provide references for individualized chemotherapy of the gliomas.

[Key words] MGMT; XRCC1; Glioma; Clinical application

脑胶质瘤是中枢神经系统中最常见的原发性恶性肿瘤, 其发病率高, 约占颅内肿瘤一半, 且近年来还有不断上升的趋势^[1]. 对胶质瘤的治疗从以往的单一手术发展到目前的以手术切除为主, 术后辅以放疗、化疗、免疫治疗等, 但疗效仍较差, 患者的预后没有明显的改善, 其主要原因是与胶质瘤中耐药基因的存在密不可分. 其中 DNA 修复蛋白 O6-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (O6-methylguanine DNA-methyltransferase, MGMT)

和 X 线修复交叉互补基因 1 (X-ray repair crosscomplementing1, XRCC1) 是临床常见的针对烷类及铂类的耐药基因. XRCC1 在胶质瘤中的研究报道较少, 同时检测胶质瘤中 MGMT 及 XRCC1 的表达、分析其相关性的研究在国内外尚未见报道. 这两个基因在脑胶质瘤的发生发展过程中有无内在的联系尚不清楚. 本研究探讨分析 MGMT、XRCC1 在脑胶质瘤中的表达及其相关性以及与胶质瘤恶性程度的关系, 以期对胶质瘤患者的个性化

[基金项目] 中国金属学会冶金医学科立项项目 (2010-915)

[作者简介] 王参智 (1970~), 男, 四川成都市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事神经外科基础与临床研究工作.

[通讯作者] 罗林. E-mail: luolvip@163.com

化疗提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机收集昆明医科大学第三附属医院神经外科 2013 年 5 月至 2014 年 5 月手术中切除的病理结果明确的脑胶质瘤标本 47 例, 所有患者术前均未行放、化疗并排除身体其他部位肿瘤。47 例标本中, 女性 17 例, 年龄 21~72 岁, 平均 38.30 岁; 男性 30 例, 年龄 16~69 岁, 平均 40.26 岁, 病程 1 周~8 个月。全部标本经 10% 中性甲醛固定, 梯度酒精脱水后, 进行透明、浸蜡、包埋处理, 然后再用石蜡切片机将石蜡块进行连续切片, 切成厚度为 4 μm 的薄片。

1.2 SP 染色

浓缩型兔抗人 MGMT 单克隆抗体 (北京中山金桥生物公司); 浓缩型兔抗人 XRCC1 单克隆抗体 (北京中山金桥生物公司); SP 广谱试剂盒 (云南晨绿生物公司)。按 SP 法进行操纵, DAB 显色。采用已知的 MGMT、XRCC1 阳性切片作对照 (购买试剂时赠送的阳性对照切片), 用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.3 MGMT、XRCC1 阳性结果判定

采取半定量积分法: MGMT 阳性染色以细胞核或 / 和胞浆呈现淡黄~棕褐染色者为准, XRCC1 阳性染色以细胞核或 / 和胞浆呈现棕黄色颗粒者为准。其标准为: (1) 阳性细胞数: <5% 记 0 分, 6%~25% 记 1 分, 26%~50% 记 2 分, 51%~75% 记 3 分, >75% 记 4 分; (2) 阳性强度 (以多数细胞判定): 淡黄色记 1 分, 黄色记 2 分, 棕褐色记 3 分。以 1 与 2 两者乘积判断阳性等级: 0 分为阴性 (-), 1~4 分为弱阳性 (+), 5~8 分为阳性 (++) , 9~12 分为强阳性 (+++) 。

1.4 统计学方法

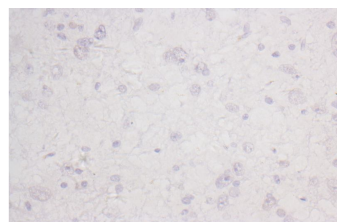
本实验结果均采用 SPSS 统计学软件进行处理。MGMT、XRCC1 在不同级别脑胶质瘤中的表达

水平采用 Spearman 相关性分析; 脑胶质瘤组织中 MGMT、XRCC1 的表达与患者年龄、性别的相关性采用 Fisher 确切概率法分析。MGMT 与 XRCC1 的相关性采用列联表的 χ^2 检验分析, 均取 $\alpha=0.05$ 为显著性标准。

2 结果

胶质瘤细胞中 MGMT、XRCC1 阳性细胞的形态 胶质瘤细胞核或 / 和胞浆出现淡黄~棕褐染色颗粒为阳性 MGMT 细胞, 出现棕黄色颗粒为阳性 XRCC1 细胞, MGMT、XRCC1 的阳性细胞呈局灶性分布或不均匀性分布, 表达见图 1~4。

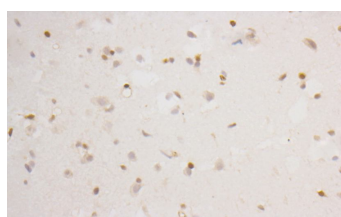
47 例胶质瘤标本中 MGMT、XRCC1 阳性细胞率的表达: 在 47 例胶质瘤标本中, MGMT、XRCC1 阳性细胞率分别为 46.81%、38.30%。在 WHO 分类 I、II、III、IV 级的 MGMT、XRCC1 阳性细胞率分别为 55.56%、41.67%、42.86%、50.00% 及 33.33%、25.00%、50.00%、41.67%。经统计学分析结果表明, 胶质瘤不同级别间 MGMT、XRCC1 阳性细胞表达率, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 胶质瘤不同级别间 MGMT、XRCC1 的阳性表达水平, 差异也无统计学意义 ($P>0.05$) (表 1、4)。在年龄、性别方面之间的差异也无统计学意义 (表 2、3、5、6), $P>0.05$ 。MGMT、XRCC1 在胶质瘤细胞中的表达无相关性 ($P>0.05$), 见表 7。



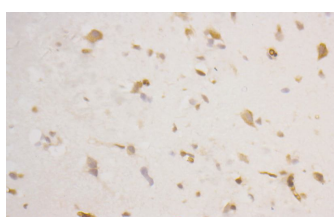
MGMT-(10×40)

图 1 MGMT 在胶质瘤细胞中的阴性表达 (10×40)

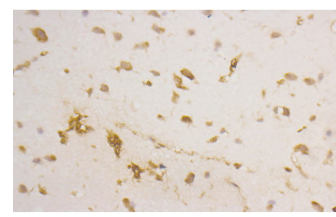
Fig. 1 Negative expression of MGMT in glioma cells (10×40)



MGMT+(10×40)



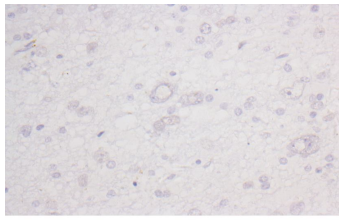
MGMT++(10×40)



MGMT+++ (10×40)

图 2 MGMT 在胶质瘤细胞中的阳性表达 (10×40)

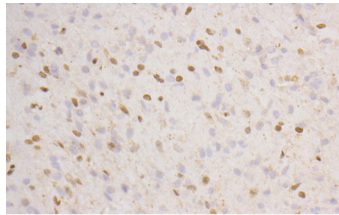
Fig. 2 Positive expression of MGMT in glioma cells (10×40)



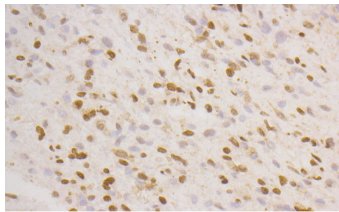
XRCC1-(10×40)

图 3 XRCC1 在胶质瘤细胞中的阴性表达 (10×40)

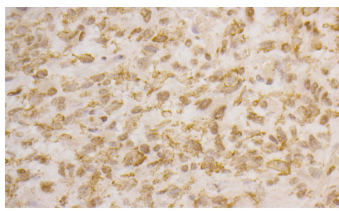
Fig. 3 Negative expression of XRCC1 in glioma cells (10×40)



XRCC1+(10×40)



XRCC1++(10×40)



XRCC1+++ (10×40)

图 4 XRCC1 在胶质瘤细胞中的阳性表达 (10×40)

Fig. 4 Positive expression of XRCC1 in glioma cells (10×40)

表 1 MGMT 在不同级别胶质瘤间阳性细胞表达率和阳性表达水平 (n)

Fig. 1 The positive expression rate and positive expression of MGMT in different levels of glioma cells (n)

WHO 肿瘤分级	n	MGMT				阳性率 (%)
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
I	9	4	3	2	0	55.56
II	12	7	2	2	1	41.67
III	14	8	3	2	1	43.86
IV	12	6	2	2	2	50.00

表 2 MGMT 在不同性别胶质瘤病人中的阳性表达率 (n)
Tab. 2 The positive expression rate of MGMT in patients with different sex (n)

性别	n	-	+	阳性率 (%)
女	17	7	10	58.82
男	30	18	12	40.00

表 3 MGMT 在不同年龄段胶质瘤病人中的阳性表达率 (n)
Tab. 3 The positive expression rate of MGMT in patients with different ages (n)

年龄 (岁)	n	-	+	阳性率 (%)
< 40	16	6	10	62.50
≥40	31	19	12	38.71

表 4 XRCC1 在不同级别胶质瘤间阳性细胞表达率和阳性表达水平 (n)
Tab. 4 The positive expression rate and positive expression of XRCC1 in different levels of glioma cells (n)

WHO 肿瘤分级	n	XRCC1				阳性率 (%)
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
I	9	6	3	0	0	33.33
II	12	9	3	0	0	25.00
III	14	7	3	3	1	50.00
IV	12	7	3	1	1	41.67

表 5 XRCC1 在不同性别胶质瘤病人中的阳性表达率 (n)
Tab. 5 The positive expression rate of XRCC1 in patients with different sexes (n)

性别	n	-	+	阳性率 (%)
女	17	9	8	47.06
男	30	20	10	33.33

表 6 XRCC1 在不同年龄段胶质瘤病人中的阳性表达率 (n)
Tab. 6 The positive expression rate of XRCC1 in patients with different ages (n)

年龄 (岁)	n	-	+	阳性率 (%)
< 40	16	9	7	43.75
≥40	31	20	11	35.48

表 7 MGMT、XRCC1 在胶质瘤中表达的相关性 (n)
Tab. 7 The relationship of the expressions of MGMT and XRCC1 in gliomas (n)

MGMT 表达情况	XRCC1 蛋白表达情况		合计
	+	-	
+	10	12	22
-	8	17	25
合计	18	29	47

3 讨论

胶质瘤的发生是多因素的结果, DNA 损伤修复基因在其中扮演着重要的角色, DNA 修复能力缺陷或低下将增加基因突变和细胞癌变的风险. DNA 损伤修复系统在维持基因组稳定性及完整性方面起着重要的作用. 同时 DNA 损伤修复基因在肿瘤细胞中过度表达又会导致肿瘤细胞对化疗药物产生耐药, 这也是脑胶质瘤治疗效果欠佳的主要原因, 而且不同的胶质瘤患者可能存在不同的耐药基因. MGMT 是临床常见的针对烷类的耐药基因, 而 XRCC1 是针对铂类的耐药基因.

MGMT 是一种高效的 DNA 直接修复酶, 能修复 DNA 序列中的 6 氧甲基鸟嘌呤损伤, 是人类细胞中迄今发现的唯一一种修复该损伤的甲基转移酶. MGMT 蛋白的表达与 MGMT 基因启动子区域的甲基化状态有关, MGMT 基因启动子过甲基化则 MGMT 蛋白表达低, MGMT 基因启动子去甲基化则 MGMT 蛋白表达高. MGMT 蛋白表达的高低与 DNA 损伤修复能力相关. DNA 修复能力与肿瘤易感性和肿瘤化疗敏感性密切相关: DNA 修复能力强, 肿瘤易感性就低, 但对化疗可能存在抵抗作用^[2]. MGMT 既是抗癌基因又是耐药基因: 一方面在正常情况下其可以修复外界作用于机体引起的 DNA 的损伤, 保护正常组织免受烷化剂等的损伤, 减少癌症发生; 另一方面烷类药物对肿瘤的作用和对正常细胞的作用相似, 主要作用机制是烷类药物在体内分解后释放出的烷化基因可以造成 DNA 上鸟嘌呤第 6 位氧原子烷基化, 而烷基化产物又可以与胸腺嘧啶共价结合, 从而导致 DNA 链间交链, 阻断 DNA 的复制和转录, 杀伤肿瘤细胞. MGMT 主要是通过不可逆地将烷化基因从 O6-MG 转移到 MGMT 蛋白活性部位 145 位的半胱氨酸残基上, 形成 S-烷基半胱氨酸, 使 DNA 恢复原貌, 而保护细胞免受烷化剂的损伤^[3], 从而导致肿瘤细胞对烷化剂产生耐药. 同时, MGMT 蛋白反应位点被烷化基因不可逆结合而失活, 故该反应又称为自杀反应^[4]. MGMT 可使 DNA 烷基化损伤得到修复, 是恶性胶质瘤细胞对化疗产生耐药的主要原因^[5]. MGMT 与其它酶不同, 它是消耗性的, 因此 O6 苯甲基鸟嘌呤与烷化剂化疗药联合应用明显增强化疗效果.

XRCC1 是参与哺乳动物 DNA 修复的 130 种基因之一, 而且是第一个被分离出来的参与修复离子辐射所致损害的哺乳动物的修复基因. 它与 DNA 聚合酶 β 、连接酶 III、聚多酶结合形成复合体参

与 DNA 损伤后的单链断裂修复和碱基切除修复. XRCC1 在碱基切除修复中起整体作用, 编码碱基损伤修复联合序列的一种重要蛋白^[6], 对一系列内外氧化剂导致的 DNA 单链断裂和碱基损伤修复起重要作用. XRCC1 单核苷酸多态影响 XRCC1 的活性^[7], 当 XRCC1 低表达或阴性表达时, DNA 损伤的修复能力下降或得不到及时修复, 从而引发癌变或者促进癌变的发生, 当 XRCC1 高表达或阳性表达时, 可以修复 DNA 的损伤, 就降低癌变的风险. 以往的研究显示: XRCC1 基因多态性与头颈部、肺、结肠及前列腺癌等多种恶性肿瘤发病风险有关^[8,9]. 近期的研究显示: XRCC1 基因多态性与脑胶质瘤的发生有明显的相关性^[10]. 铂类药物的主要作用靶点是 DNA, 药物进入肿瘤细胞后与 DNA 形成铂-DNA 加合物, 导致 DNA 损伤, 从而影响 DNA 的复制与转录, 抑制肿瘤的分裂导致细胞凋亡^[11]. 这些铂-DNA 加合物的形成是药物发挥毒性作用的关键, 体内铂-DNA 加合物水平较高的肿瘤患者, 对化疗具有更高的敏感性且有更好的临床预后^[12-14]. 影响铂类化疗敏感性的因素很多, 但 DNA 修复在其耐药机制中起重要作用^[15,16]. DNA 损伤后的修复能力与 XRCC1 密切相关. XRCC1 是碱基切除修复及单链断裂修复系统中的核心成员, 参与铂类药物引起的损伤修复过程^[7]. 肿瘤细胞中的 XRCC1 编码的蛋白质与 DNA 连接酶 III 相互作用, 修复 DNA 单链断裂, 并与 DNA 聚合酶 β 一起进行碱基切除修复, 降低铂类药物的细胞毒作用, 是造成肿瘤细胞耐药的主要原因. 不同个体的 XRCC1 活性不一样^[18], 这可能是导致个体间 DNA 修复能力差异的分子基础. 肿瘤细胞中的 XRCC1 阳性表达率和表达水平越高, DNA 修复能力越强, 肿瘤耐药越明显, 化疗敏感性就越差.

本研究结果显示, 不同级别胶质瘤间 MGMT、XRCC1 的阳性表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 不同级别胶质瘤间 MGMT、XRCC1 的阳性表达水平差异也无统计学意义 ($P > 0.05$). 其原因, 可能是因为在不同个体、不同器官以及同一肿瘤组织的不同部位中 MGMT、XRCC1 的表达存在很大的差异. 在不同级别的肿瘤细胞或同一肿瘤组织切片中发现 MGMT、XRCC1 阳性细胞的染色强度和分布并不均匀, 缺乏规律. 因此 MGMT、XRCC1 阳性表达率和表达水平与肿瘤的恶性程度之间并无关系. 本研究发现 MGMT、XRCC1 在胶质瘤中的表达无相关性与莫丽等^[19]MGMT、XRCC1 在食道癌中表达研究一致, 说明这两个基因通过不同的分子生物学机制导致癌变及肿瘤细胞对不同的

化疗药物产生耐药。

另外,在脑胶质瘤中 MGMT 的表达水平在性别、年龄方面所存在的差异无统计学意义与 Esteller 等^[20]的研究一致;在脑胶质瘤中 XRCC1 的表达水平在性别、年龄方面所存在的差异也无统计学意义,因此在临床诊疗过程中给患者制定个性化治疗方案时,性别、年龄不能作为参考因素。

总之 MGMT、XRCC1 是 DNA 损伤修复的重要基因, MGMT、XRCC1 突变使基因的稳定性下降,可能增会加肿瘤易感性, MGMT、XRCC1 在胶质瘤的发生、发展过程中起着重要的作用。 MGMT、XRCC1 的过表达与胶质瘤细胞对烷化剂及铂类化疗药物产生耐药有关,同时也为胶质瘤的个性化治疗提供了一个新的靶点和方向。由于 MGMT、XRCC1 阳性表达率和表达水平与肿瘤的恶性程度之间并无关系,所以仅根据肿瘤恶性程度而使用烷化剂或铂类药物进行化疗是不科学的。检测脑胶质瘤中 MGMT、XRCC1 表达水平的高低可作为脑胶质瘤对烷化剂及铂类化疗药是否耐药的指标,从而为不同级别的脑胶质瘤患者制定有预见性的个性化治疗方案提供合理的理论依据。

[参考文献]

- [1] OHGAKI H, KLEIHUES P. Epidemiology and etiology of gliomas [J]. *Acta Neuropathologica*, 2005, 109 (4):93 - 108.
- [2] WEI Q, FRAZIER M L, LEVIN B. DNA Repair a double-edged sword [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 6:440 - 441.
- [3] PEGGA. A repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases [J]. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3): 83 - 100.
- [4] BEARZATTO A, SZADKOWSKI M, MACPHERSON P, et al. Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(12):3 262 - 3 270.
- [5] HEGI M E, DISERENS A C, GORLIA T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352:997 - 1 003.
- [6] THACKER J, ZDZIENICKA M Z. The mammalian XRCC1 genes: their roles in DNA repair and genetic stability [J]. *DNA Repair*, 2003, 2:655 - 672.
- [7] ROSELLI, LORD R V, TARON M, et al. DNA repair and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2002, 38 (3):217 - 227.
- [8] 朱虔兮, 边建超. XRCC1 基因多态性与肿瘤遗传易感性研究进展 [J]. *国外医学肿瘤分册*, 2004, 31:323 - 326.
- [9] LIN Y, SCHEURER M Z, EL-ZEIN R, et al. Association and interactions between DNA repair gene polymorphisms and adult glioma [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18:204 - 204.
- [10] 刘建民, 孙鸿, 黄良文, 等. XRCC1 基因多态性与脑胶质瘤相关性研究 [J]. *现代预防医学*, 2011, 38(16):3 340 - 3 341.
- [11] ALTAHA R, LIANG X, YU J J, et al. Excision repair cross complementing group 1: gene expression and platinum resistance [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 14:959 - 970.
- [12] JORDAN P, CARMO FONSECA M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57:1 229 - 1 235.
- [13] VAN DE VAART PJM, B ELDERBOS J, DE JONG D, et al. DNA adduct levels as a predictor of outcome for NSCLC patients receiving daily cisplatin and radiotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2000, 89:160 - 166.
- [14] FURUTA T, UEDA T, AUNE G, et al. Transcription coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62:4 899 - 4 902.
- [15] LORD R V N, BRABENDER J, GANDARA D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (11):2 286 - 2 291.
- [16] KENNEDY R D, QUINN J E, MULLAN P B, et al. The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy [J]. *Natl Cancer Inst*, 2004, 96(22):1 659 - 1 669.
- [17] ROSELLI, LORD R V, TARON M, et al. DNA repair and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2002, 38:217 - 227.
- [18] LUNN R M, LANGLOIS R G, HSIEH L L, et al. XRCC1 polymorphism: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency [J]. *Cancer Res*, 1999, 59:2 557 - 2 561.
- [19] 莫丽, 陈远能. DNA 修复基因 MGMT、XRCC1 在食道癌中表达的研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(10):1 953 - 1 956.
- [20] ESTELLER M, GARCIA-FONCILLAS J, ANDION E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(19):1 350 - 1 354.

(2015-09-02 收稿)