

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.010

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.010>

MTH1 在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系

宋玉, 胡轶

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院呼吸科, 武汉 430000)

[摘要] 目的: 评估mutT同系物1(mutT homolog 1, MTH1)在非小细胞肺癌(non-small lung cancer cell, NSCLC)中的表达及与预后的关系。方法: 收集2011年3月至2013年3月于华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院行肺癌切除术的100例患者的肺癌组织, 分成MTH1高表达组和低表达组。免疫组织化学评估MTH1蛋白的表达并分析其与患者临床病理因素的关系。Kaplan-Meier生存曲线分析MTH1的表达与预后间的关系, Cox比例风险模型分析影响总生存率和无瘤生存率的危险因素。结果: MTH1在57%的NSCLC组织中高表达, 在43%的NSCLC组织中低表达。MTH1高表达与吸烟($P=0.031$)、病理类型($P=0.001$)、TNM分期($P<0.001$)、淋巴结转移($P<0.001$)、血管侵犯($P<0.001$)和胸膜侵犯($P<0.001$)相关, MTH1高表达组1、5年总生存率低于MTH1低表达组($P<0.05$); MTH1高表达组1、5年无瘤生存率低于MTH1低表达组($P<0.05$)。TNM分期($P=0.008$)、淋巴结转移($P<0.001$)及MTH1表达($P=0.047$)为影响总生存率的独立危险因素, 多因素分析示淋巴结转移($P<0.001$)及MTH1表达($P=0.039$)为影响无瘤生存率的独立危险因素。结论: MTH1在非小细胞肺癌中高表达, 且与恶性临床病理特征相关, MTH1高表达的患者无瘤生存率和总生存率低于MTH1低表达的患者, MTH1高表达是影响非小细胞肺癌预后的独立危险因素。

[关键词] mutT同系物1; 非小细胞肺癌; 预后

Expression of MTH1 in patients with non-small lung cancer cell and its association with prognosis

SONG Yu, HU Yi

(Department of Respiration, Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression of mutT homolog 1 (MTH1) in non-small lung cancer cell (NSCLC) patients and its association with prognosis. **Methods:** One hundred of NSCLC patients tissues diagnosed in The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology from March 2011 to March 2013 were collected and divided into a MTH1 over-expressed group and a MTH1 low-expressed group. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of MTH1 protein. The relationship between MTH1 expression and clinical characteristics of patients was analyzed. Kaplan-Meier survival curve was used to analyze the relationship between expression of MTH1 and prognosis of patients. The Cox proportional

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-06

通信作者 (Corresponding author): 胡轶, Email: huyin834@126.com

hazards model was used to analyze the independent risk factors of overall survival and disease-free survival. **Results:** MTH1 was highly expressed in 57 cases (57%) and low expression in 43 cases (43%). High expression of MTH1 was significantly associated with smoking state ($P=0.031$), pathology types ($P=0.001$), TNM stage ($P<0.001$), lymph node metastasis ($P<0.001$), vascular infiltration ($P<0.001$) and pleural invasion ($P<0.001$). The 1-, 5-year overall survival rates of MTH1 over-expressed group was significantly lower than that in MTH1 low-expressed group ($P<0.05$). The 1-, 5-year disease-free survival rates of MTH1 over-expressed group was significantly lower than that in MTH1 low-expressed group ($P<0.05$). TNM stage ($P=0.008$), lymph node metastasis ($P<0.001$) and MTH1 expression ($P=0.047$) were independent risk factors of overall survival. While lymph node metastasis ($P<0.001$) and MTH1 expression ($P=0.039$) were independent risk factors of disease-free survival. **Conclusion:** MTH1 protein is over-expressed in NSCLC tissues, which is significantly associated with malignant characteristics. Patients with high MTH1 expression have lower disease-free and overall survival rates than those with low expression of MTH1. MTH1 over-expression is an independent risk factor for the prognosis of non-small cell lung cancer.

Keywords mutT homolog 1; non-small cell lung cancer; prognosis

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)发病率高, 预后差。2018年世界范围内有210万新发肺癌病例, 180万人死于肺癌^[1]。MutT同系物1(mutT homolog 1, MTH1)是一种氧化型嘌呤核苷三磷酸酶, 将8-氧代-dGTP水解成其单磷酸形式, 进而阻止DNA聚合酶将8-氧代-dGTP插入基因组^[2-3], 对细胞基因组的稳态起保护作用。MTH1在胃癌^[3]、食管癌^[4]和乳腺癌^[5]中高表达。动物实验^[1]发现MTH1是癌细胞增殖必需酶, 靶向MTH1可抑制肿瘤细胞增殖, 提示MTH1在肿瘤发生发展中起重要作用。然而, MTH1在NSCLC中的表达及临床意义尚不清楚。本研究通过免疫组织化学检测MTH1蛋白的表达及其与临床病理因素和预后的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本

收集2011年3月至2013年3月间于华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院行肺癌切除术的100例患者, 男60例, 女40例, 年龄(54.6 ± 25.8)岁, 鳞癌66例, 腺癌34例, 均接受肺癌根治术治疗, 术后行放射治疗(以下简称“放疗”)和化学药物治疗(以下简称“化疗”)。纳入标准: 经手术切除且经病理诊断为肺癌患者; 术前未行放疗治疗; 均行根治性肺癌切除; 临床检验和随访资料完整。剔除标准: 临床检验和随访资料不全者。本研究获得华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院医学伦理委员会批准。

1.2 免疫组织化学

肺癌组织切片脱蜡后, 用过氧化物酶封闭剂(080-01186 Wako, 日本东京化成公司)和蛋白封闭剂(19-2410-3 Sigma-Aldrich, 美国Sigma公司)处理标本。将组织切片与抗MTH1抗体(1:100, 美国Sigma公司)温育。然后与DAKO ENVISION+聚合物/HRP(抗兔; K4003 Dako, 日本MBL公司)温育。液体DAB+发色团(049-22831, 日本东京化成公司)用于显现抗原。用苏木精对组织标本进行复染以区分细胞核和细胞质。以胃癌组织MTH1阳性染色为阳性对照, 以不加MTH1抗体的组织化学染色为阴性对照。

由两位独立互不知情的病理医师评估免疫组织化学结果, 根据MTH1显色深浅及阳性细胞百分比确定评分^[4]。MTH1表达强度采用组织学评分(Σpi)表示。p代表即阳性细胞百分比: 0为没有细胞显色或阳性细胞百分数 $<5\%$; 1为 $5\% \sim 35\%$ 细胞显色; 2为 $36\% \sim 65\%$ 细胞显色; 3代表 $>65\%$ 细胞显色。i代表细胞染色强度: 0为不显色; 1为浅黄色; 2为棕黄色; 3为深褐色。总分 ≥ 5 为MTH1高表达组, <5 为MTH1低表达组。

1.3 临床资料的收集及随访

收集患者年龄、性别、吸烟史、肿瘤大小、病理类型、TNM分期、淋巴结转移、血管侵犯等资料。患者手术后即开始随访, 通过电话或门诊方式进行随访, 术后每隔6个月行1次胸部CT和血液肿瘤标志物检查, 随访内容包括: 复发、转移或死亡情况和时间。随访时间(5.5 ± 1.4)年。

1.4 统计学处理

卡方检验分析MTH1表达与患者临床病理因素间的关系。总生存时间被定义为从手术到任何原因死亡的时间, 而无瘤生存时间被定义为从手术到复发的时间, 使用Kaplan-Meier法评估生存率, 使用对数秩检验比较MTH1高低表达患者的生存期的区别, 单因素、多因素及Cox比例风险模型分析影响患者总生存率和无瘤生存率的影响因素, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTH1 蛋白在肺癌组织中的表达

57例(57%)患者肺癌组织中MTH1高表达(图1A), 43例(43%)低表达(图1B)。

2.2 MTH1 的表达与临床病理因素间的关系

MTH1 的表达与吸烟($P=0.031$)、病理类型($P=0.001$)、TNM分期($P < 0.001$)、淋巴结转移($P < 0.001$)、血管侵犯($P < 0.001$)和胸膜侵犯($P < 0.001$)相关, 而与性别($P=0.741$)、年龄($P=0.905$)及肿瘤大小($P=0.949$)不相关(表1)。

2.3 MTH1 的表达与患者总生存及无瘤生存率的关系

MTH1高表达组1年总生存率为92.4%, MTH1

低表达组1年总生存率为96.3%, MTH1高表达组1年总生存率低于MTH1低表达组($P < 0.01$); MTH1高表达组5年总生存率为70.7%, 显著低于MTH1低表达组90.4%($P=0.001$, 图2A); MTH1高表达组1年无瘤生存率为87.1%, 显著低于MTH1低表达组93.9%($P < 0.01$); MTH1高表达组5年无瘤生存率为64.2%, 显著低于MTH1低表达组86.7%($P < 0.001$, 图2B)。

2.4 影响总生存率的单因素和多因素分析

单因素分析示: TNM分期($P < 0.001$)、淋巴结转移($P < 0.001$)、血管侵犯($P=0.037$)及MTH1表达($P=0.000$)为影响总生存期的因素; 多因素分析示: 临床分期($P=0.008$)、淋巴结转移($P < 0.001$)及MTH1表达($P=0.047$)为影响总生存率的独立危险因素(表2)。

2.5 影响无瘤生存率的单因素和多因素分析

单因素分析示: TNM分期($P < 0.001$)、淋巴结转移($P < 0.001$)、胸膜侵犯($P=0.036$)、血管侵犯($P=0.041$)及MTH1表达($P < 0.001$)为影响无瘤生存率的危险因素; 多因素分析示: 淋巴结转移($P < 0.001$)及MTH1表达($P=0.039$)为影响无瘤生存率的独立危险因素(表3)。

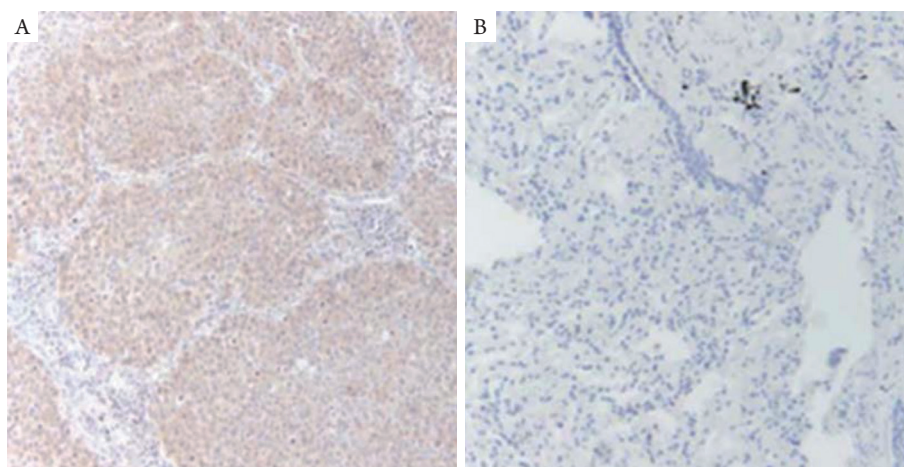


图1 MTH1在NSCLC中的表达(IHC, $\times 100$)

Figure 1 Expression of MTH1 in NSCLC (IHC, $\times 100$)

(A)MTH1在NSCLC 中高表达; (B)MTH1在NSCLC中低表达。

(A) MTH1 was over-expressed in NSCLC tissue; (B) MTH1 was low-expressed in NSCLC tissue.

表1 MTH1的表达与肺癌患者临床病理因素间的关系

Table 1 Association between MTH1 expression and clinic-pathological characteristics in NSCLC patients

组别	n	性别		年龄/岁		吸烟/(包·年 ⁻¹)		病理类型	
		男	女	<65	≥65	<20	≥20	鳞癌	腺癌
低表达组	43	25	18	32	11	28	15	21	22
高表达组	57	35	22	43	14	17	40	45	12
P		0.741		0.905		0.031		0.001	

组别	TNM分期		肿瘤大小/cm		淋巴结转移		血管侵犯		胸膜侵犯	
	I, II	III, IV	<3	≥3	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
低表达组	28	15	36	7	32	11	38	5	30	13
高表达组	54	3	48	9	17	40	12	45	20	37
P	<0.001		0.949		<0.001		<0.001		<0.001	

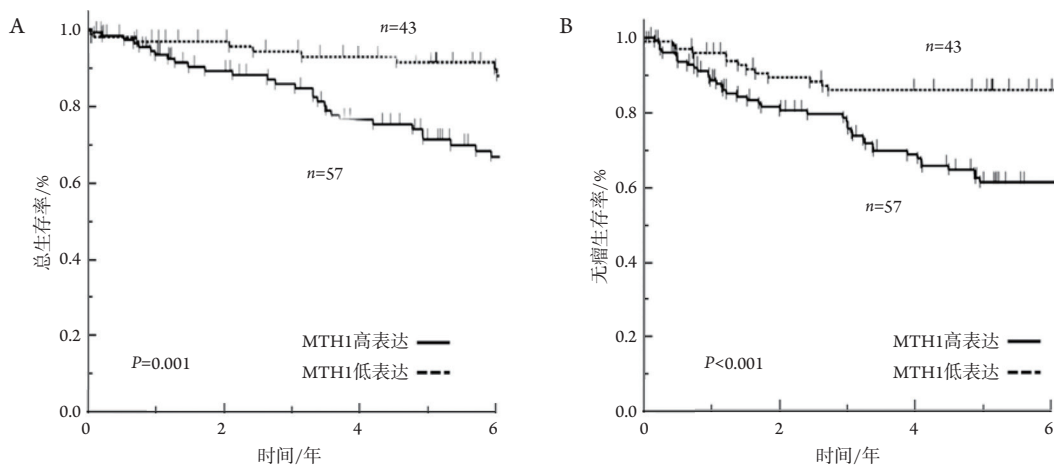


图2 MTH1高低表达组患者总生存及无瘤生存曲线比较

Figure 2 Comparison of overall and disease-free survival curve between MTH1 over-expressed and low-expressed group

(A) MTH1高低表达组总生存曲线比较; (B) MTH1高低表达组无瘤生存曲线比较。

(A) Comparison of overall survival curve between MTH1 over-expressed and low-expressed group; (B) Comparison of disease-free survival curve between MTH1 over-expressed and low-expressed group.

表2 总生存率的单因素和多因素分析

Table 2 Univariate and multivariable analysis of overall survival rate

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
性别(男/女)	1.552 (0.269~3.967)	0.077	1.764 (0.320~3.118)	0.539
年龄(≥65岁/<65岁)	1.207 (0.559~2.397)	0.612	2.093 (0.895~4.681)	0.086
吸烟[≥20(包·年 ⁻¹)/<20(包·年 ⁻¹)]	1.890 (1.000~3.688)	0.150	1.079 (0.454~2.715)	0.867
病理类型(鳞癌/腺癌)	2.251 (1.077~4.479)	0.231	0.924 (0.404~2.052)	0.847
TNM分期(III, IV/I, II)	7.632 (3.759~17.124)	<0.001	3.760 (1.167~5.907)	0.008
肿瘤大小(≥3 cm/<3 cm)	3.141 (1.627~6.439)	0.089	1.794 (0.835~3.988)	0.135
淋巴结转移(阳性/阴性)	9.945 (5.066~20.950)	<0.001	9.190 (2.824~39.457)	<0.001
胸膜侵犯(阳性/阴性)	4.468 (2.332~8.993)	0.165	2.216 (1.041~4.910)	0.068
血管侵犯(阳性/阴性)	4.729 (2.448~9.698)	0.037	1.846 (0.851~4.155)	0.121
MTH1表达(高/低)	3.247 (1.604~7.271)	<0.001	1.713 (1.865~4.118)	0.047

表3 无瘤生存率的单因素和多因素分析

Table 2 Univariate and multivariable analysis of disease-free survival rate

因素	单因素分析		多因素分析	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
性别(男/女)	2.531 (2.293~6.921)	0.173	1.984 (1.487~3.955)	0.962
年龄(≥ 65 岁/ < 65 岁)	0.778 (0.383~1.447)	0.443	1.160 (0.545~2.301)	0.686
吸烟(≥ 20 (包·年 ⁻¹)/ < 20 (包·年 ⁻¹)	1.798 (1.061~3.112)	0.379	1.824 (0.430~6.621)	0.568
病理类型(鳞癌/腺癌)	1.657 (0.880~2.969)	0.113	2.929 (0.456~10.843)	0.835
TNM分期(III, IV/I, II)	8.532 (4.708~16.564)	<0.001	3.625 (0.567~4.441)	0.357
肿瘤大小(≥ 3 cm/ < 3 cm)	2.050 (1.214~3.524)	0.587	1.238 (0.684~2.257)	0.480
淋巴结转移(阳性/阴性)	9.585 (5.537~17.148)	<0.001	4.502 (1.942~11.546)	<0.001
胸膜侵犯(阳性/阴性)	3.543 (2.094~6.104)	0.036	1.815 (0.985~3.396)	0.056
血管侵犯(阳性/阴性)	4.562 (2.659~8.095)	0.041	1.739 (0.907~3.416)	0.961
MTH1表达(高/低)	3.004 (1.683~5.703)	<0.001	2.605 (1.627~7.248)	0.039

3 讨论

癌症的发生是在各种内外环境刺激下细胞原癌基因和抑癌基因的平衡失调、细胞增殖失控的过程^[2]。氧化应激、缺氧和表观遗传障碍在癌症的发生发展中起重要作用^[3]。呼吸、正常代谢和炎症反应过程均产生ROS^[4]，ROS可氧化核苷酸和蛋白质，诱导基因突变和导致细胞衰老^[5]。ROS可氧化核苷酸库中的dGTP或直接氧化DNA中的鸟嘌呤碱基而产生8-氧代-鸟嘌呤(8-氧-G)。在DNA复制过程中，DNA聚合酶通常在模板DNA中插入8-氧代-dGTP，从而导致A到C或G到T的颠换突变^[6]。

NSCLC的发病机制为癌基因和抑癌基因失衡导致的细胞增殖失控，DNA精准复制过程是基因表达的基础，内外各种原因所致的DNA或DNA组分的损伤均可导致基因表达失控或细胞凋亡。MTH1是一种氧化型嘌呤核苷三磷酸酶，将8-氧代-dGTP水解成单磷酸形式，通过清除核苷酸库中的氧化核苷酸来维持体细胞中遗传信息的完整性，防止细胞在复制过程中将8-氧代G掺入DNA^[7-8]和8-氧代G在细胞核中过度累积而导致细胞死亡。癌细胞常暴露于比周围正常细胞更高的氧化应激水平，且MTH1在癌细胞中高表达，通过阻止氧化的dNTPs掺入DNA^[1]，表明MTH1有助于癌细胞增殖。MTH1活性对癌细胞的完整性是必需的^[1]。有研究^[9]报道NSCLC癌组织中MTH1活性高于正常肺组织。然而，NSCLC中MTH1蛋白升高的临床意义尚不清楚。

本研究发现：MTH1蛋白高表达与NSCLC患者吸烟、TNM分期、淋巴结转移、血管侵犯和胸膜侵犯等恶性临床病理特征相关，在胃癌^[3]、食管癌^[4]及乳腺癌^[5]中，MTH1也呈高表达，且与恶性临床病理特征相关，本研究结果与此一致。本研究还发现MTH1高表达患者的无瘤生存率和总生存率均低于MTH1低表达的患者，提示MTH1高表达与NSCLC预后差相关。多因素分析显示MTH1高表达是患者无瘤生存率和总生存率的独立预后因子。

MTH1如何影响NSCLC的生物学行为的精确机制尚不清楚。肺癌中MTH1表达增加患者癌细胞的恶性潜能，具有高侵袭性的肿瘤细胞可能较多的暴露在ROS刺激下，诱导MTH1高表达，修复DNA，导致快速增殖，使得肿瘤细胞更具有向淋巴管、血管和胸膜浸润的潜能^[10]。癌细胞代谢研究^[11]提示：高侵袭性和进行性增殖的癌细胞依赖于有氧糖酵解，实现DNA快速复制，分裂成子细胞并传播到身体其他部位，这表明癌细胞中产生更多的氧化应激和ROS^[12]，导致更多的8-氧代-G累积，引起癌细胞的死亡。事实上，癌细胞可能通过MTH1表达的增加逃避ROS所致的DNA损伤，从而表现出更高的恶性潜能，导致患者预后更差。本研究显示MTH1高表达与重度吸烟(即 > 20 包/年)显著相关，吸烟则是氧化应激的触发因素，Asami等^[10]表明吸烟量显著增加肺组织中ROS的水平。结合本研究的发现：提示吸烟患者肺癌的癌细胞恶性潜能更高，能应对过度的氧化应激。高氧化应激环境中的癌细胞可能通过提高MTH1的表达

而防止DNA中8-氧代G的累积。因此, MTH1可能是癌细胞氧化应激的标志物, 也是肺癌患者生存期较差的指标^[13-14]。另外, 有研究^[15-16]报道阻断MTH1有助于抑制细胞增殖和上皮-间质转化, 从而支持MTH1可作为NSCLC患者治疗靶点。本研究中57%的NSCLC患者MTH1高表达, 提示NSCLC患者可能会在抑制MTH1的靶向治疗中获益, 其作为治疗靶点的潜力尚需要进一步研究。

本研究尚有局限性: 这是一项在单一机构中进行的回顾性研究, 尚需要多中心、大样本的研究验证; 肿瘤细胞中MTH1高表达的精确机制尚待进一步研究。

综上所述, 在NSCLC中, MTH1高表达的患者表现出更高的恶性特征, MTH1高表达的患者无瘤生存率和总生存率低于MTH1低表达的患者, 同时MTH1高表达是NSCLC预后的独立危险因素, NSCLC患者术后MTH1表达水平有助于评估患者的预后, MTH1可能为NSCLC潜在的治疗靶点。

参考文献

- Gad H, Koolmeister T, Jemth A-S, et al. Mth1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dntp pool[J]. *Nature*, 2014, 508(7495): 215.
- Fehrmann RS, Karjalainen JM, Krajewska M, et al. Gene expression analysis identifies global gene dosage sensitivity in cancer[J]. *Nat Genet*, 2015, 47(2): 115.
- Lu X, Kang Y. Hypoxia and hypoxia-inducible factors: Master regulators of metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(24): 5928-5935.
- Korpanty GJ, Graham DM, Vincent MD, et al. Biomarkers that currently affect clinical practice in lung cancer: Egfr, alk, met, ros-1, and kras[J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 204.
- Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, et al. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids[J]. *Biol Chem*, 2006, 387(4): 373-379.
- Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 12543-12557.
- Ichikawa J, Tsuchimoto D, Oka S, et al. Oxidation of mitochondrial deoxynucleotide pools by exposure to sodium nitroprusside induces cell death[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2008, 7(3): 418-430.
- Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D, et al. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial dnas[J]. *EMBO J*, 2008, 27(2): 421-432.
- Speina E, Arczewska KD, Gackowski D, et al. Contribution of hmth1 to the maintenance of 8-oxoguanine levels in lung DNA of non-small-cell lung cancer patients[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(5): 384-395.
- Asami S, Manabe H, Miyake J, et al. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(9): 1763-1766.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2): 85-95.
- Toyokuni S. Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(7/8): 1373-1377.
- Kennedy CH, Cueto R, Belinsky SA, et al. Overexpression of hmth1 mrna: A molecular marker of oxidative stress in lung cancer cells[J]. *FEBS Lett*, 1998, 429(1): 17-20.
- Niu Y, Pan D, Shi D, et al. Influence of chirality of crizotinib on its mth1 protein inhibitory activity: Insight from molecular dynamics simulations and binding free energy calculations[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145219.
- Huber KV, Salah E, Radic B, et al. Stereospecific targeting of mth1 by (s)-crizotinib as an anticancer strategy[J]. *Nature*, 2014, 508(7495): 222-227.

本文引用: 宋玉, 胡轶. MTH1在非小细胞肺癌中的表达及其与预后的关系[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(3): 523-528. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.010

Cite this article as: SONG Yu, HU Yi. Expression of MTH1 in patients with non-small lung cancer cell and its association with prognosis[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(3): 523-528. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.010