文章编号:1000-5404(2006)19-1979-04

论著

荧光定量 RT-PCR 法监测肺癌患者化疗前后外周血淋巴细胞 mdr1 mRNA 的变化

王 梅[1],葛明建[2] (重庆医科大学附属第一医院:[1]检验科,[2]胸外科,重庆 400016)

提 要:目的 检测肺癌患者化疗前后外周血淋巴细胞(PBL)中多药耐药基因(mdr1)表达水平,探讨其与化疗疗效的相互关系。**方法** 分别于化疗开始前及化疗周期结束后第 3 周收集肺癌患者($n=32$)外周血标本。采集标本的同时行胸片或胸部 CT 扫描,并计算肿瘤最大径及垂直径的乘积。运用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(fqRT-PCR)法检测 PBL 中 mdr1 基因的表达。**结果** 与化疗前相比,化疗后 PBL 中 mdr1 mRNA 水平上升显著[(3.881 8±0.828 0)与(4.316 6±0.923 1),$t=-4.207$, $P=0.000$]。化疗前后外周血 mdr1 mRNA 水平变化与肿瘤大小改变间亦存在负相关关系($r=-0.389$, $P=0.028$)。化疗前小细胞肺癌(SCLC)与非小细胞肺癌(NSCLC)患者 PBL 中 mdr1 转录本水平间存在显著性差异,SCLC 明显低于 NSCLC[(2.831 4±0.398 4)与(4.231 9±0.603 4),$t=6.101$, $P=0.000$]。**结论** NSCLC 及 SCLC 在化疗耐药机制上可能存在差异性。检测患者化疗前后 PBL 中 mdr1 mRNA 水平对判定化疗疗效有一定的指导意义,可在一定程度上指导化疗方案的修订。

关键词:肺肿瘤;血液;聚合酶链反应;药物耐受性;信使 RNA;化学疗法
中图法分类号:R331.144; R730.43; R734.2 **文献标识码**:A

Longitudinal study of mdr1 level in peripheral blood lymphocyte by fluorescent quantitative real time RT-PCR before and after chemotherapy

WANG Mei[1], GE Ming-Jian[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, [2]Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To detect multidrug resistance gene (mdr1) transcription in peripheral blood lymphocyte (PBL) before and after chemotherapy and to determine its correlation with chemotherapeutic effect. **Methods** The peripheral blood sample was taken from each lung cancer patients ($n=32$) before chemotherapy and at 3rd week after chemotherapy and subjected to fluorescent quantitative real-time RT-PCR. Simultaneously the tumor size was determined by chest X-ray or CT. **Results** The mdr1 mRNA level in PBL after chemotherapy increased significantly as compared with that before chemotherapy [(4.316 6±0.923 1) *vs* (3.881 8±0.828 0), $t=-4.207$, $P=0.000$]. There was an negative correlation between mdr1 mRNA level and the tumor size ($r=-0.389$, $P=0.028$). The level of mdr1 transcription in SCLC patients was significantly less than that of NSCLC patients before chemotherapy [(2.831 4±0.398 4) *vs* (4.231 9±0.603 4), $t=6.101$, $P=0.000$]. **Conclusion** In terms of an anticancer drug resistant mechanism, there could be a difference between NSCLC and SCLC. Longitudinal study of mdr1 level in PBL is valuable for evaluating the treatment response.

Key words: lung neoplasm; blood; polymerase chain reaction; drug tolerance; messenger RNA; chemotherapy

由于外科手术技术的完善以及肿瘤局部治疗措施(如放疗)疗效的不断提高,如今癌症治疗失败的主要原因为远处转移。这就要求我们努力寻找有效的全身性辅助治疗手段。而在此之前,我们需要确定哪些患者能从这些辅助治疗中获益[1]。本实验旨在观察化

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(00-2004)
Supported by the Scientific Research Funds of Chongqing Bureau of Public Health(00-2004)
作者简介:王 梅(1970-),女,四川省遂宁市人,主管技师,主要从事临床检验和流式细胞术方面的研究。电话:(023)68803194
收稿日期:2005-11-09;**修回日期**:2006-07-06

疗期间肺癌患者外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)中 mdr1 表达,并探讨其与化疗疗效的相互关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

本组共32例患者,均为2003年1-6月重庆市肺部肿瘤综合治疗中心呼吸内科的住院患者。所有患者都经病理检查证实诊断为肺癌。其中男性24例,女性8例,年龄33~68岁,中位年龄52岁。按1997国际抗癌联盟分期标准,Ⅱ期6例,Ⅲ期10例,Ⅳ期16例。非小细胞肺癌24例(含肺鳞癌15例及肺腺癌9例),小细胞肺癌8例。经患者同意后,分别于化疗开始前及化疗周期结束后第3周收集外周血标本各5 ml。采集标本的同时患者行胸片或胸部CT扫描,并根据检查结果计算肿瘤最大径及垂直径的乘积(cm^2)。对照组($n=20$)外周血标本来自健康体检者。所有患者均为初诊并接受第1周期化疗。其中小细胞肺癌(SCLC)患者的化疗方案为:鬼臼乙甙100 mg/m^2,第1~3天;顺铂50 mg/m^2,第1天。非小细胞肺癌(NSCLC)患者的化疗方案为:丝裂霉素10 mg/m^2,第1天和第8天;长春酰胺3 mg/m^2,第1天;顺铂80 mg/m^2,第1天。化疗疗效:完全缓解2例,部分缓解13例,无效15例,病变恶化2例。分期方法包括胸片、支气管镜、胸部CT、超声检查、骨扫描及活检术(如转移淋巴结活检等)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取RNA 运用人淋巴细胞分离液(上海化学试剂二厂)分离外周血单个核细胞(PBMNs)。按Trizol Reagent (Invitrogen, Cat#15596-026)的说明提取PBMNs中的总RNA。通过测定$D(260)$计算RNA的浓度,以$D(260)/D(280)$值判定纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 合成cDNA 总RNA在70 ℃中孵育5 min。逆转录反应在18 μl 1×RT缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 75 mmol/L KCl及3 mmol/L $MgCl_2$]中完成,同时加入0.5 mmol/L dNTP, 1 μl RNasin及200 U MMLV逆转录酶(Promega),合成条件为37 ℃ 30 min。

1.2.3 引物与探针 运用Primer Express软件(PE Applied Biosystems)来设计合适的Taqman引物和探针。Taqman探针的5′端被报告基团FAM(发光波长为518 nm)标记,而3′端被磷酸化以防止PCR过程中其自身序列的延伸。mdr1的引物序列为(5′→3′):上游引物 AACGTCGAACACGGTCTCATC;下游引物 ATAACAGCATACCGCGCTCAC。探针序列为(5′→3′):TTGTGAAGAAGGCTTGTGTCGATGCC。引物和探针均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.4 Taqman PCR反应 PCR反应在以下反应体系中完成:43 μl PCR反应缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4), 50 mmol/L KCl及1.5 mmol/L $MgCl_2$],0.2 mmol/L dNTP,5 μl CDNA,2 U *Taq* DNA聚合酶(Promega),上、下游引物各0.4 μmol/L,首先在95 ℃水平预变性5 min,然后按以下反应条件完成35个循环:95 ℃ 30 s,62 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s。最后在72 ℃下延伸10 min结束反应。在每一批PCR反应中设立阳性对照(提自LC-5细胞的RNA)及阴性对照(水)。所有反应均在ABI Prism 7000序列检测系统上完成。

根据所获得的标准曲线,得到各检测标本的起始浓度(基因拷贝数/ml)。实验数据均以每毫升血清中mdr1 mRNA拷贝数的常用对数表示。所有反应均在ABI Prism 7000序列检测系统(Perkin-Elmer Applied Biosystem)中完成。它主要原理是根据PCR过程中荧光标记探针所发出的荧光信号来计算CK19 mRNA的起始拷贝数。7000系统包含1个内置的热循环仪以通过纤维光缆与96个标本孔均相连的激光检测头。CCD (charge- coupled device)摄像头可收集发自每个标本的荧光信号并且进行自动分析。检测系统自带的软件可以计算Ct (threshold cycle)值并确定每个标本的起始拷贝数。

1.3 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件包进行配对样本t检验、独立样本t检验及两变量相关性分析等。

2 结果

2.1 荧光定量PCR相关曲线

当报告基团的荧光强度超过阈值(threshold)时的循环数就是Ct值(cycle threshold)。以Ct值作为纵坐标,mdr1起始拷贝数作为横坐标,建立标准曲线(图1),此曲线显示4个数量级的动态范围。荧光定量PCR的扩增过程包括3个阶段:基线期(baseline phase)、指数期(exponential phase)及平台期(plateau phase)。图2示一典型的实时荧光定量扩增曲线。

2.2 化疗前后PBL中mdr1 mRNA水平变化

与化疗前相比,化疗后肺癌患者PBL中mdr1 mRNA水平上升显著(3.881 8±0.828 0与4.316 6±0.923 1, $t=-4.207$, $P=0.000$)。mdr1 mRNA水平变化与肿瘤大小改变间亦存在负相关($r=-0.389$, $P=0.028$)。

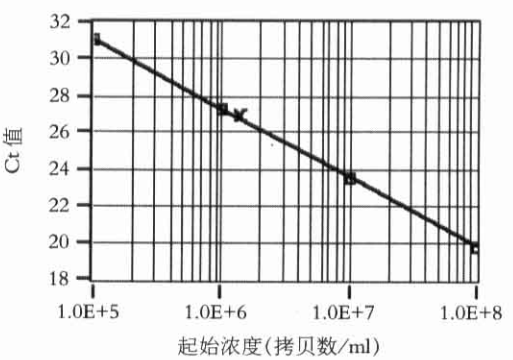


图1 mdr1 mRNA起始浓度标准曲线

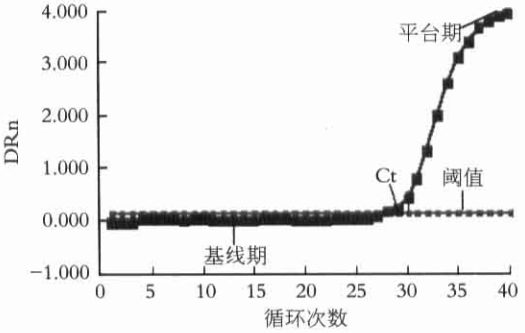


图 2　实时荧光定量 PCR 扩增曲线

2.3　化疗期间 SCLC 与 NSCLC 患者 PBL 中 mdr1 mRNA 水平比较

化疗前 SCLC 与 NSCLC 患者 PBL 中 mdr1 转录本水平间存在显著差异，SCLC 明显低于 NSCLC［(2.831 4 ± 0.398 4) 与 (4.2319 ± 0.603 4)，$t = 6.101$，$P = 0.000$］。治疗前后 2 组患者比较，mdr1 mRNA 水平变化无显著差别（$t = 1.116$，$P = 0.273$）。化疗期间 mdr1 mRNA 水平改变与肿瘤分期、患者性别及年龄等无关（$P > 0.05$）。

3　讨论

能定量检测标志物基因表达水平的精细变化代表了一个里程碑。与现有的其他定量 PCR 方法相比，实时 PCR 法有一些明显的优点[2]。实时 PCR 的重要特征之一就是在 PCR 产物扩增过程中实时得出产物的量，这一点与终点检测法完全不同，后者是只有当反应完成预设循环数后才计算产物的累积数量。靶基因的起始拷贝数越高，则反应过程中能被监测到的增高的荧光信号就越早。Ct 值就是指反应过程中荧光探针被裂解产生的荧光信号超过预设的阈值高于基线水平时的循环数。

Holland 等[3] 首先运用 Taqman 技术对单管 RT-PCR 法进行优化后来定量检测靶基因的量，其原理就是利用 *Taq* DNA 聚合酶的 5′→3′核酸外切酶的活性。不久，这一方法就被改进，人们运用双标记的荧光探针，而这种探针可以特异性地与引物间的模板序列结合。探针的 5′端被标记上荧光报告基团 FAM（6-羧基荧光素），而 3′端则被标记上荧光淬灭基团（6-羧基四甲基若丹明）。当荧光探针结构完整时，报告基团的发射频谱就被淬灭抑制，一旦与模板紧密结合的探针被核酸酶降解后，就会释放出报告基团，导致荧光信号的增加。PCR 过程中，荧光产生越多，提示产物的量就越多，两者成正比。ABI Prism 7000 检测仪就能检测到这种荧光信号。在一个具体的反应中，若某一个循环荧光信号水平开始增加并高于背景水平时，则该循环数就被称为循环阈值（Ct value）。Ct 值与标本中的 mRNA 起始拷贝数成反比。在反应的指数增长期，可以实时监测荧光信号，这样就允许对许多标本进行同时分析，而勿需考虑不同标本可能在不同循环时到达反应平台的因素的影响。

通过建立标准曲线可完成对实验结果的准确定量。若知道某个标本的 Ct 值，就可以通过标准曲线得到该标本中靶基因起始量。标准曲线是根据线性回归分析法计算得来的，它显示了 Ct 值与起始浓度对数间的线性关系（图 1）。本实验的数据均以每毫升血清中 mdr1 mRNA 拷贝数的常用对数来表示。理论上，本实验检测方法的灵敏度，即能够有效检测并定量的 mdr1 mRNA 的最小量为 1 000 拷贝/ml。实际上，本实验能检测到的最低浓度为 4.2×10^2 拷贝/ml，原因是标准曲线的线性范围允许我们检测低于浓度动态范围下限值（1×10^3 拷贝/ml）以下浓度的标本。同理，也可以测定浓度高于 10^8 拷贝/ml 的待测标本。因此，理想的浓度检测范围和灵敏度允许我们来测定起始浓度相差很大的外周血标本。

就方法的特异性而言，只有与探针结合的靶序列被扩增的时候，Taqman 荧光探针才会发生断裂，从而产生荧光信号。因此，非特异性扩增时是不会有荧光信号产生的。另一方面，由于实验过程缺少了 PCR 后的操作步骤（如琼脂糖凝胶电泳），真正避免了前次 PCR 产物的后续污染可能带来的假阳性。

多药耐药（multidrug resistance，MDR）是由一种药物诱发而同时对其他多种结构和作用机制完全不同的抗癌药物产生的交叉耐药现象，即癌细胞对广泛的结构和功能不相同的抗肿瘤药物产生的耐药，从而导致某些联合化疗方案失败[4]。肿瘤耐药原因很多，目前公认最主要的是多药耐药基因的过度表达，克服此障碍，肿瘤化疗将取得决定性突破。迄今为止，文献[5]报道的联合化疗的有效率大约为 30%。

mdr1 基因编码的蛋白产物为一 ATP 依赖的、专门针对广谱异型生物质复合物的药物泵，由于该流出泵的作用，使得癌细胞内的药物聚集减少，从而产生抗癌药物耐药性。检测患者化疗前后 PBL 中 mdr1 mRNA 水平对判定疗效及预后有一定的指导意义，可在一定程度上指导化疗方案的修订或选择应用耐药逆转剂。一般认为，直接获取肿瘤组织并检测其 mdr1 基因表达

能最直接、真实地反映 mdr1 mRNA 水平，但临床上存在难以获取或病灶消散后无从获取的问题。相反，检测 PBL 中的 mdr1 基因表达则简便易行，临床上能反复定期获取血液标本，可长期动态监测 mdr1 基因表达水平变化，且不易受杂质细胞干扰，能较稳定地获取结果[6]。

传统标准评定实体瘤疗效是通过观察化疗前后肿瘤大小改变来实现的。本研究结果显示，治疗前后 PBL 中 mdr1 基因表达差异与肿瘤大小变化间存在负相关关系（$r=-0.389$，$P=0.028$），提示检测患者化疗前后 PBL 中 mdr1 基因表达水平对判定疗效有帮助。此外，化疗前 SCLC 与 NSCLC 患者 PBL 中 mdr1 mRNA 水平存在显著差异，SCLC 明显低于 NSCLC（$P<0.05$），即在未进行化疗前，NSCLC 患者 PBL 中 mdr1 基因就已呈高表达，表明 NSCLC 患者可能存在内在性耐药性，即先天耐药。与此同时，SCLC 对化疗的耐药则可能是获得性的。NSCLC 及 SCLC 在化疗耐药机制上可能存在差异性。

有研究表明，卵巢癌细胞不仅可以表达 mdr1 基因的蛋白产物 P_{170}，并且可随化疗疗程的增加而耐药逐渐增强，PBL 中 P_{170} 的含量可间接反映残余或复发卵巢癌细胞对化疗药物耐受的程度[7]。接受化疗的患者中非缓解组化疗后 PBL 的 mdr1 基因表达水平与化疗前及对照组相比有显著差异[6]。近年来，有不少研究结果显示 mdr1 基因或其编码的糖蛋白产物（P-gp）在组织或细胞株中的过表达或阳性表达与肺癌的化疗敏感性间存在相关性[8-12]。本研究对肺癌患者 PBL 中的 mdr1 基因表达水平与化疗反应间的关系进行了初步探索，研究结果与以上基于肿瘤组织表达的研究结果一致。此外，本法的检测对象为外周血，标本容易获得且可进行动态观测，因此可对患者进行长期观察，以便及时调整化疗方案，具有更加明显的优势。

研究 mdr1 基因表达与临床化疗的关系，是从分子水平来探讨肿瘤对化疗药物的敏感性与耐受性，可用来预测患者对化疗的反应以及化疗过程中疗效的判断和监测预后，可在更高水平上对肿瘤进行治疗和观察，使化疗个体化、合理化。临床医师可根据化疗过程中每个患者 PBL 中 mdr1 基因的表达水平变化来判断耐药程度，从而制定合理的化疗方案。

参考文献：

[1] GE M J, SHI D, WU Q C, *et al*. Observation of circulating tumour cells in patients with non-small cell lung cancer by real-time fluorescent quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction in perioperative period[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2006, 132(4): 248-256.

[2] CELI F S, COHEN M M, ANTONARAKIS S E, *et al*. Determination of gene dosage by a quantitative adaptation of the polymerase chain reaction (gd-PCR): rapid detection of deletions and duplications of gene sequences[J]. Genomics, 1994, 21(2): 304-310.

[3] HOLLAND P M, ABRAMSON R D, WATSON R, *et al*. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′-3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(16): 7276-7280.

[4] 张真路，吴人亮. 多药耐药基因的临床意义与检测方法[J]. 肿瘤防治研究，1999，26(6)：476-479.

[5] PANTEL K, COTE R J, FODSTAD O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, 91(13): 1113-1124.

[6] 黄广清，赵 晶，冯 霞，等. 实体瘤患者外周血多药耐药基因表达与疗效观察[J]. 徐州医学院学报，2001，21(4)：293-294.

[7] 伊格平，陈涌芬，孙晓明，等. 卵巢癌组织及外周血淋巴细胞多药耐药基因表达蛋白的定量研究[J]. 中华妇产科杂志，1998，33(5)：287-289.

[8] IKUTA K, TAKEMURA K, SASAKI K, *et al*. Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(4): 707-712.

[9] BERGMAN A M, PINEDO H M, TALIANIDIS I, *et al*. Increased sensitivity to gemcitabine of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-overexpressing human cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 2003, 88(12): 1963-1970.

[10] FUJISHITA T, LODA M, TURNER R E, *et al*. Sensitivity of non-small-cell lung cancer cell lines established from patients treated with prolonged infusions of Paclitaxel[J]. Oncology, 2003, 64(4): 399-406.

[11] YEH J J, HSU W H, WANG J J, *et al*. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression [J]. Respiration, 2003, 70(1): 32-35.

[12] HSIA T C, LIN C C, WANG J J, *et al*. Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression[J]. Lung, 2002, 180(3): 173-179.

（编辑 薛国文）