论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2478-03

化疗耐药相关基因在弥漫性大B细胞淋巴瘤中的表达及其临床意义

谢家印,王 东,杨镇洲,王 阁,向德兵 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨p53、bcl-2、P-gp、GST-π、TopoⅡ耐药相关基因在弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL)中的表达及其临床意义。**方法** 用免疫组织化学S-P法对34例DLBCL患者p53、bcl-2、P-gp、GST-π、TopoⅡ蛋白表达进行检测,分析其表达与DLBCL治疗效果及生存期的关系。**结果** p53、bcl-2、P-gp、GST-π、TopoⅡ蛋白在DLBCL中表达阳性率分别为32.4%、47.0%、25.2%、52.9%、64.7%,p53、bcl-2、P-gp、GST-π蛋白表达阳性患者化疗有效率、3年生存率低于阴性患者,TopoⅡ蛋白表达阳性患者化疗有效率高于阴性表达患者,但3年生存率却较低。**结论** p53、bcl-2、P-gp、GST-π、TopoⅡ蛋白可作为DLBCL患者化疗效果和预后的预测指标,指导DLBCL患者的个体化治疗。

关键词: 弥漫性大B细胞淋巴瘤;p53;bcl-2;P-糖蛋白;谷胱甘肽转移酶;拓扑异构酶

中图法分类号: R394.6;R730.263 **文献标识码:** A

Expression of drug resistance-related genes in diffuse large B cell lymphoma and their clinical significance

XIE Jia-yin, WANG Dong, YANG Zhen-zhou, WANG Ge, XIANG De-bing (Department of Oncology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of drug resistance-related genes including p53, bcl-2, P-glycoprotein (P-gp), glutathione-S-transferase-π (GST-π) and DNA topoisomerase Ⅱ (TopoⅡ) and their clinical significance in diffuse large B cell lymphomas (DLBCL). **Methods** Tissue samples from 34 DLBCL patients were immunohistochemically stained for p53, bcl-2, P-gp, GST-π and TopoⅡ. **Results** The positive expression rate of p53, bcl-2, P-gp, GST-π and TopoⅡ in DLBCL was 32.4%, 47.0%, 25.2%, 52.9% and 64.7% respectively. Patients with positive expression of p53, bcl-2, P-gp and GST-π had lower efficacy to chemotherapy and shorter overall survival at 3 years than patients with negative expression. However, the patients with positive expression of TopoⅡ had higher efficacy, but shorter overall survival at 3 years than the patients with negative expression. **Conclusion** The expressions of p53, bcl-2, P-gp, GST-π and TopoⅡ can be used as predictors of chemotherapeutic efficacy and survival of DLBCL patients, and provide guidance for individual therapy for DLBCL patients.

Key words: diffuse large B cell lymphoma; p53; bcl-2; P-glycoprotein; glutathione-S-transferase-π; topoisomerase Ⅱ

弥漫性大B细胞淋巴瘤(diffuse large B cell lymphoma,DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma,NHL)中最为常见的组织学类型,占成人NHL的30%~40%[1]。尽管多年来CHOP方案(环磷酰胺+长春新碱+阿霉素+泼尼松)一直是DLBCL的标准化疗方案,然而患者10年生存率仅为30%左右[2]。研究表明,化疗耐药与DLBCL复发、预后密切有关,但目前尚不完全清楚DLBCL化疗耐药的机制。p53和bcl-2基因表达状况与肿瘤细胞对化疗药物诱导凋亡的敏感性直接有关。P-糖蛋白(P-gp)、谷胱甘肽转移酶-π(GST-π)、DNA拓扑异构酶Ⅱ(TopoⅡ)表达异常是肿瘤细胞产生耐药的常见原因。本研究利用免疫组织化学方法检测p53、bcl-2、P-gp、GST-π、TopoⅡ耐药相关基因在34例DLBCL患者中的表达,并探讨这些蛋白表达与DLBC化疗效果及预后的关系。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(2004.BB5031)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2004.BB5031)

作者简介: 谢家印(1964-),男,四川省安岳县人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事肿瘤细胞DNA损伤修复方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68757346

收稿日期: 2006-06-11;**修回日期:** 2006-07-03

1　资料与方法

1.1　病例选择

选择 1999－2005 年在我院血液科住院治疗的 DLBCL 患者 34 例。其中男性 23 例，女性 11 例，年龄 14～62 岁，中位年龄 56 岁。所有患者均进行标准 CHOP 化疗方案，疗效评价参照 WHO 标准。

1.2　免疫组织化学检测

p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ单克隆抗体和 S-P 试剂盒均为北京中山生物技术公司产品。采用 S-P 法进行免疫组织化学染色，P-gp、bcl-2、GST-π 染色阳性定位于细胞质和/或细胞膜，p53、Topo Ⅱ染色阳性定位于细胞核，根据染色阳性肿瘤细胞所占的比例进行定性判断：阴性（－），染色阳性细胞数＜10%；阳性（＋），染色阳性细胞数≥10%。

1.3　统计学分析

采用统计软件 SAS 8.0，p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ表达与治疗效果的关系采用 Fisher's 精确概率法，生存分析采用 Kaplan-Meier 分析。

2　结果

2.1　p53、bcl-2、P-gp、GST-π、TopoⅡ在 DLBCL 中的表达

p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ在 34 例 DLBCL 中表达的阳性率分别为 32.4%、47.0%、25.2%、52.9%、64.7%。bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ在 DLBCL 中阳性表达情况见图 1～4，着色部位多数在细胞质。

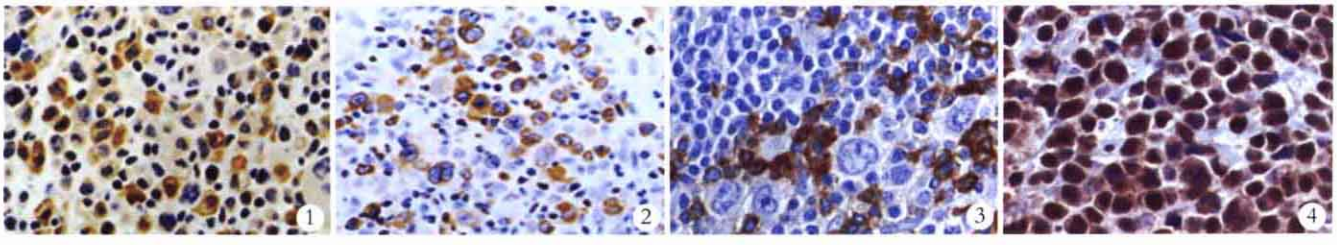


图 1　bcl-2 在 DLBCL 中呈阳性表达　（S-P×200）
图 2　P-gp 在 DLBCL 中呈阳性表达　（S-P×400）
图 3　GSTπ在 DLBCL 中呈阳性表达　（S-P×400）
图 4　Topo Ⅱ在 DLBCL 中呈阳性表达　（S-P×400）

2.2　p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ表达与 DLBCL 治疗反应的关系

p53、bcl-2、P-gp、GST-π 蛋白表达阳性患者组化疗有效率分别为 45.4%、31.2%、42.8%、44.4%，而阴性组有效率分别为 78.3%、88.9%、85.0%、87.5%，对应比较阳性组有效率显著低于阴性组（$P<0.05$），Topo Ⅱ蛋白表达阳性患者组化疗有效率为 81.8%，显著高于阴性表达患者组有效率 50.0%（$P<0.05$）。

2.3　p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ表达与 DLBCL 生存期的关系

按 p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ蛋白表达阳性或阴性分组，Kaplan-Merier 生存曲线分析结果显示：p53、bcl-2、P-gp、GST-π、Topo Ⅱ蛋白表达阳性组的 3 年生存率分别为 29.2%、34.8%、30.5%、45.3%、54.6%，而阴性组则分别为 56.8%、72.4%、74.6%、84.6%、82.8%，对应比较均有显著性差异（$P<0.05$）。

3　讨论

DLBCL 是一组恶性程度不一的异质性肿瘤，CHOP 化疗方案目前仍是其主要治疗方法。根据组织学、免疫组织化学和细胞遗传学特征，DLBCL 可分为不同的组织学亚型，不同组织学亚型 DLBCL 的化疗效果、预后存在较大差异。化疗耐药与不同组织学亚型的 DLBCL 治疗效果、预后关系密切，但 DLBCL 目前广泛采用的国际预后指数（international prognostic index，IPI）是基于患者的年龄、血清乳酸脱氢酶水平、体力状况、临床分期和节外病变 5 个方面进行综合评分的，不能直接反映 DLBCL 的化疗耐药情况，在预测 DLBCL 患者的治疗效果和预后方面尚存在一定的缺陷。

化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡是其杀灭肿瘤细胞的重要机制之一。大量研究表明细胞凋亡受众多基因调控，凋亡调控基因表达异常与肿瘤化疗耐药有关。p53 和 bcl-2 基因是细胞凋亡的 2 个重要调节基因，野生型 p53 具有促进细胞凋亡的作用，而 bcl-2 则是 bcl-2 家族中的重要抑制凋亡成员。文献[3,4]报道 p53 基因突变和 bcl-2 高表达在 DLBCL 中较为常见，并与化疗耐药、不良预后有关。另有研究表明：p53 突变型的 DLBCL 中 P53 蛋白免疫组织化学染色阳性率很高[5]。本研究显示，p53 和 bcl-2 阳性表达的患者化疗效果明显低于阴性患者，3 年生存率也较低。我们认为 P53 蛋白阳性表达患者中可能大部分为 p53 突变型，失去了调节化疗药物诱导肿瘤细胞凋亡的功能，而 Bcl-2 蛋白表达阳性则直接使化疗诱导肿瘤细胞凋亡受到抑制，从而导致 DLBCL 患者对化疗的反应性降低、生存

期较短。如果临床上检测 p53 突变存在困难，可以通过免疫组织化学染色同时检测 p53 下游基因 p21 蛋白的表达情况反映 p53 是否突变，如 p53 表达阳性，而 p21 表达阴性则表明 p53 可能发生突变。

肿瘤细胞的多药耐药（multidrug resistance，MDR）是导致肿瘤化疗失败的重要原因。大量研究表明 P-gp、GSTπ、Topo Ⅱ等是肿瘤细胞产生 MDR 的重要物质基础。P-gp 是一种跨膜转运蛋白，可与多种药物结合，并以主动方式将扩散进入肿瘤细胞的亲脂类药物泵出细胞外，从而使细胞内药物浓度降低，导致肿瘤耐药。Ohsawa 等[6]报道了 41 例 DLBCL 患者中 P-gp 的表达情况及其与治疗效果的关系，结果表明 P-gp 蛋白阳性率为 37%，P-gp 蛋白表达阳性组患者的化疗完全缓解率显著低于 P-gp 蛋白表达阴性组。本研究结果显示，P-gp 蛋白表达阳性率为 25.2%，且 P-gp 蛋白表达阳性的患者化疗有效率、3 年生存率均显著低于阴性患者，与文献报道结果相似。提示 P-gp 可作为判断 DLBCL 疗效和预后的指标之一。

Topo Ⅱ是一种能将 DNA 由一种拓扑异构体变为另一种拓扑异构体的酶，是真核细胞不可缺少的重要核酶，参与基因重组、转录、姐妹染色单体分离和 DNA 修复。Topo Ⅱ表达降低和/或活性下降，可导致肿瘤细胞对 Topo Ⅱ抑制剂类化疗药物（蒽环类和鬼臼毒素类药物）产生耐药。Topo Ⅱ在 DLBCL 中的表达及临床意义尚少见相关文献报道。本研究结果显示，Topo Ⅱ蛋白阳性率为 64.7%，Topo Ⅱ蛋白表达阳性组患者的化疗有效率显著高于阴性患者组，但生存率显著低于阴性患者组。研究表明：乳腺癌、胃癌等肿瘤中 Topo Ⅱ蛋白表达与肿瘤分化程度密切相关，分化程度低者阳性率高于分化程度高者，这与肿瘤细胞的增殖活性有关，肿瘤分化程度低，其恶性程度高，肿瘤细胞增殖快，存在于 S、M 期细胞中的 Topo Ⅱ蛋白就多，故阳性率较高[7,8]。但 Topo Ⅱ蛋白表达对于 Topo Ⅱ抑制剂类化疗药物发挥抗肿瘤作用却有积极意义。因此，DLBCL 患者中 Topo Ⅱ蛋白表达阳性有助于其对化疗的反应性，但同时可能又预示其临床进展快、生存期短。

GST-π 是一组多功能药物代谢酶，与细胞内解毒功能密切相关，临床应用的许多抗癌药物都可在其催化下通过谷胱甘肽（GSH）结合而解毒。许多耐药表型的肿瘤细胞随耐药程度的增加，细胞内 GST-π 水平亦不断增加。关于 DLBCL 中 GST-π 表达的临床意义报道较少。Ribrag 等[9]报道在 DLBCL 中 GST-π 蛋白表达与化疗效果、生存期有关，高表达者化疗有效率低、生存期短是独立于其他因素的 DLBCL 预后指标。本研究结果同样显示，GST-π 阳性表达患者组的化疗有效率和 3 年生存率显著低于阴性组，与文献报道结果一致。

CHOP 化疗方案是 DLBCL 的常用治疗方法。本研究结果表明 p53、bcl-2、P-gp、GST-π 和 Topo Ⅱ等耐药相关基因表达与 DLBCL 患者的治疗效果及预后有关，提示临床上 DLBCL 患者对 CHOP 方案的反应性和预后存在较大差异可能与 DLBCL 患者中上述耐药相关基因表达状况不同有关。一些研究表明，DLBCL 初治时的疗效如何对其预后有着重大影响，因此，临床上对 DLBCL 患者的化疗应以 CHOP 方案为基础，并根据以上耐药相关基因表达检测结果，采取一些相应的措施如调整化疗药物种类、使用耐药逆转剂或结合美罗华（CD20 单克隆抗体）等进行个体化治疗，从而克服耐药问题，提高初治疗效。

参考文献：

[1] HARRIS N L, JAFFE E S, DIEBOLD J, *et al*. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997[J]. J Clin Oncol, 1999, 17(12): 3835-3849.

[2] 刘 霆. 恶性淋巴瘤 WHO 分型——以病理学为基础的治疗策略[J]. 临床内科杂志, 2005, 22(9): 583-588.

[3] HERMINE O, HAIOUN C, LEPAGE E, *et al*. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)[J]. Blood, 1996, 87(1): 265-272.

[4] ICHKAWA A, KINOSHITA T, WATANABE T, *et al*. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma[J]. N Engl J Med, 1997, 337(8): 529-534.

[5] LEROY K, HAIOUN C, LEPAGE E, *et al*. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas[J]. Ann Oncol, 2002, 13(7): 1108-1115.

[6] OHSAWA M, IKURA Y, FUKUSHIMA H, *et al*. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma[J]. Oncology, 2005, 68(4-6): 422-431.

[7] 李 杰, 许良中, 吴 炅. 三种耐药基因蛋白表达在乳腺癌中的临床意义[J]. 癌症, 2001, 20(8): 866-868.

[8] 曲利娟, 余英豪, 曾 玲. P-gp、GSTπ 及 Topo Ⅱ在胃癌中的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18(4): 389-392.

[9] RIBRAG V, KOSCIELNY S, CARPIUC I, *et al*. Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas[J]. Leukemia, 2003, 17(5): 972-977.

（编辑 栾 嘉）