论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1692-04

食管鳞状细胞癌 P-gp、GST-π、Topo Ⅱ的表达及临床意义

唐 郡[1],阎晓初[1],彭贵勇[2],孙永刚[2],程 龙[1],陈春燕[1] (第三军医大学西南医院:[1]病理学研究所,[2]全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨耐药基因蛋白 P-gp、GST-π 和 Topo Ⅱ在食管鳞状细胞癌及正常食管组织中的表达及其与临床病理的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法检测 144 例手术切除的食管鳞状细胞癌组织和 30 例正常食管组织中 P-gp、GST-π 和 Topo Ⅱ的表达。**结果** P-gp、GST-π、Topo Ⅱ的表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、肿瘤大小及浸润深度无关($P>0.05$),与肿瘤的分化程度有关,高分化、中分化和低分化鳞癌组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 食管鳞状细胞癌耐药由多种耐药基因共同参与,联合检测多项耐药相关蛋白表达,对指导临床化疗药物选择具有意义。

关键词:食管癌;P-糖蛋白;谷胱甘肽转移酶;DNA 拓扑异构酶;免疫组织化学染色

中图法分类号:R341;R730.23;R735.1 **文献标识码**:A

Expression and clinical significance of P-gp, GST-π, and Topo Ⅱ in esophagus cancer

TANG Jun[1], YAN Xiao-chu[1], PENG Gui-yong[2], SUN Yong-gang[2], CHENG Long[1], CHEN Chun-yan[1] ([1]Department of Pathology, [2]Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of P-gp, GST-π, and Topo Ⅱ, as well as its relationship with clinical pathologic characteristics of esophageal squamous cell carcinoma. Methods Totally 144 tissue samples of esophagus squamous cell carcinoma and 30 normal esophagus tissues were examined for the expression of P-gp, GST-π, and Topo Ⅱ by immunohistochemistry. Results The expression of P-gp, GST-π, and Topo Ⅱ was not associated with patients' age, gender, lymph node metastasis, tumor size, and infiltration depth but with cellular differentiation. On this aspect, there was significant difference among well-, moderately, or poorly differentiated squamous cell carcinomas ($P<0.05$). Conclusion P-gp, GST-π, and Topo Ⅱ play an important role in multidrug resistance. Detecting the expression of P-gp, GST-π, and Topo Ⅱ has an important significance in chemotherapy for esophagus squamous cell carcinoma.

Key words: esophageal cancer; P-glycoprotein; glutathione-S-transferase-π; DNA topoisomerase; immunohistochemical staining

化疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一,尽管新的抗癌药物及化疗方案不断推出,但治疗效果仍不尽如人意,其中一个重要原因就是肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性,近年对多药耐药(multidrug resistance, MDR)发生机制的研究已成为肿瘤研究的热点领域。研究表明,P-糖蛋白(P-gp)、胎盘型谷胱甘肽-S-转移酶(GST-π)、DNA 拓扑异构酶(Topo Ⅱ)在肿瘤 MDR 中发挥着重要作用[1]。本研究应用免疫组化染色方法,检测这 3 种蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达,以探讨其表达与临床病理参数的相关性,为临床化疗药物选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集本院 2003 – 2005 年手术切除食管鳞状细胞癌标本 144 例,男性 118 例,女性 26 例;年龄最小者 30 岁,最大者 82 岁,平均年龄 58.8 岁;组织学分级:高分化 90 例,中分化 42 例,低分化 12 例;伴淋巴结及远处转移 41 例,无淋巴结转移 103 例。所有病例术前均未作放疗、化疗。选取相对正常食管黏膜组织 30 例。所有标本经 10% 中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片,HE 染色。

1.2 免疫组化染色

采用免疫组化 S-P 法,鼠抗人 P-gp 单抗、兔抗人 GST-π 单抗、鼠抗人 Topo Ⅱ单抗及 S-P 试剂盒均为福州迈新生物技术开发公司产品。5 μm 切片经脱蜡、脱苯、水化后进行高压抗原修复,滴加抗体后置石蜡于 4 ℃冰箱过夜。用已知染色阳性的胃癌组织切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判定

P-gp 阳性染色定位于细胞质和细胞膜,GST-π 染色定位于细胞质,个别可位于细胞核,Topo Ⅱ阳性染色定位于细胞核内。根据肿瘤细胞的阳性细胞数及其染色强度进行判定评分。分别记为:阳性细胞数 <5% 为阴性(–),5% ~25% 为 1 分,26% ~50% 为 2 分,51% ~75% 为 3 分,75% 以上为 4 分。阳性强度以淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。两者相乘,1 ~4 分为弱阳性(+),5 ~8 分为阳性(++),9 ~12 分为强阳性(+++)。

作者简介:唐 郡(1974 –),男,山东省栖霞市人,硕士研究生,医师,主要从事消化道肿瘤诊断与治疗方面的研究。电话:(023)68765191

通讯作者:阎晓初,电话:(023)68754432

收稿日期:2007-01-24;修回日期:2007-06-05

1.4　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　P-gp、GST-π、Topo Ⅱ在食管鳞状细胞癌与正常食管组织中的表达

P-gp 阳性主要定位于细胞膜及细胞质（图 1），GST-π 阳性定位于细胞质，个别细胞可细胞核着色（图 2）。Topo Ⅱ阳性定位于细胞核（图 3），P-gp 在食管癌组织中的阳性表达率（67.4%）高于正常食管组织（40%），阳性表达差异有统计学意义（$P<0.05$）。GST-π 在食管癌组织中的阳性表达率（63.9%）高于正常食管组织（30%），阳性表达差异有统计学意义（$P<0.05$）。Topo Ⅱ在食管癌组织中的阳性表达率（41.0%）高于正常食管组织（20%），阳性表达差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

2.2　食管鳞癌 P-gp、GST-π、Topo Ⅱ表达与病理特征的关系

在 144 例食管癌病理标本中，高、中分化与低分化的食管癌相比，GST-π、P-gp 和 Topo Ⅱ表达的阳性率均有显著的差异（$P<0.05$），在不同的年龄、性别、有无淋巴结转移、肿瘤大小及浸润深度中，GST-π，P-gp，Topo Ⅱ的表达无显著差异（$P>0.05$）。见表 2。

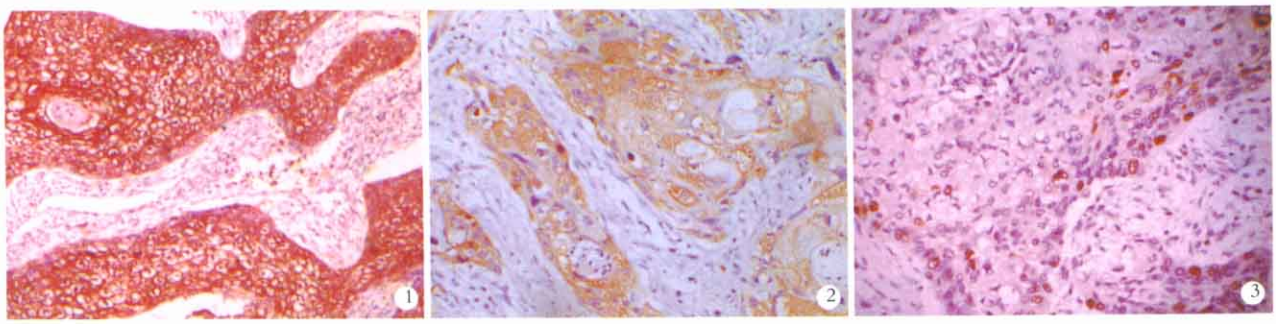


图 1　食管鳞状细胞癌，P-gp 癌细胞呈细胞膜、细胞质强阳性　（S-P×200）

图 2　食管鳞状细胞癌，GST-π癌细胞呈细胞质强阳性　（S-P×200）

图 3　食管鳞状细胞癌，Topo Ⅱ癌细胞呈细胞核弱阳性　（S-P×200）

表 1　P-gp、GST-π、Topo Ⅱ在食管鳞癌和正常食管组织中的表达

组别	例数	P-gp		GST-π		Topo Ⅱ	
		阳性数	阳性率%	阳性数	阳性率%	阳性数	阳性率%
食管鳞癌组织	144	97	67.4[a]	92	63.9[a]	59	41.0[a]
正常食管组织	30	12	40	9	30	6	20

a：$P<0.05$，与正常食管细胞相比较

表 2　144 例食管鳞癌中 P-gp、GST-π、Topo Ⅱ表达与病理特点的关系

指标	n	P-gp		GST-π		Topo Ⅱ	
		阳性	P	阳性	P	阳性	P
性别							
男	118	81(68.6)	>0.05	73(61.9)	>0.05	47(39.8)	>0.05
女	26	16(61.5)		19(73.1)		12(46.2)	
年龄（岁）							
<55	49	31(63.3)	>0.05	29(59.2)	>0.05	18(36.7)	>0.05
≥55	95	66(69.5)		63(66.3)		41(43.2)	
分化程度							
Ⅰ	90	68(75.6)		65(72.2)		29(32.2)	
Ⅱ	42	23(54.8)	<0.05	22(52.4)	<0.05	22(52.4)	<0.05
Ⅲ	12	6(50)		5(41.7)		8(66.7)	
淋巴结转移							
有	41	22(53.7)	>0.05	25(61.0)	>0.05	15(36.6)	>0.05
无	103	75(72.8)		67(65.0)		44(38.8)	
肿瘤大小							
<5 cm	89	57(64.0)	>0.05	56(62.9)	>0.05	37(41.6)	>0.05
≥5 cm	55	40(72.7)		26(47.3)		22(40.0)	
浸润深度							
T1 + T2	94	62(66.0)	>0.05	60(63.8)	>0.05	38(40.4)	>0.05
T3 + T4	50	35(70.0)		32(64.0)		21(42.0)	

2.3　食管鳞癌组织中 P-gp、GST-π 和 Topo Ⅱ的共表达

144 例食管鳞状细胞癌组织中，P-gp 、GST-π 的共表达率为 50.7%（73/144），两者表达成正相关（$r=8.231$，$P<0.01$）。Topo Ⅱ和 P-gp 的共表达率为 11.8%（17/144），两者表达成负相关（$P<0.05$）。GST-π 和 Topo Ⅱ的共表达率为 7.6%（11/144），两者表达成负相关（$P<0.05$）。P-gp 和 Topo Ⅱ的单一蛋白表达率为 11.1%（16/144）和 13.1%（19/144），没有发现GST-π的单一蛋白表达。其中两种蛋白的共表达率为 65.2%，显著高于单一蛋白的表达率（$P<0.05$）。3 种蛋白的共表达率为 4.9%（7/144），有两个或两个以上蛋白共表达率合计为 70.1%，明显高于单一蛋白的表达率（$P<0.05$）。

3　讨论

肿瘤的发生系一个多基因改变协同作用的过程，具有基因控制和多因素调节的复杂性。肿瘤多药耐药是导致肿瘤化疗失败的主要原因。许多研究表明，耐药是多种机制共同作用的结果，目前已发现 GST-π、P-gp 和 Topo Ⅱ在多种恶性肿瘤耐药性上起主要作用，对食管鳞状细胞癌中同时检测上述 3 种蛋白表达及其意义研究报道极少。为此，检测食管鳞癌的 GST-π、P-gp 和 Topo Ⅱ的表达，以便能较客观地反映出食管鳞癌的耐药相关信息，有助于指导临床对食管鳞癌针对性选择化疗药物。

P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)是一种分子量为 170×10^3 的跨膜糖蛋白,又称 P-170,P-gp 由 7 号染色体上的多药耐药基因 1(multidrug resistance gene 1,MDR1)编码,属于 ABC 转运蛋白超家族成员,它是一种相对分子质量为 170×10^3、有 12 个跨膜区和 2 个 ATP 结合点,具有能量依赖性"药泵"功能的跨膜糖蛋白,能将细胞内带阳性电荷的亲脂类化疗药物逆浓度泵至细胞外,使细胞内化疗药物达不到有效作用浓度从而产生耐药性。因而 P-gp 的表达水平与耐药程度成正比。P-gp 所介导的抗癌药物主要为植物碱类、阿霉素、紫杉醇和泰素帝等[2];本研究结果显示,P-gp 蛋白在食管鳞状细胞癌和正常食管组织中的表达阳性率分别为 67.4% 和 40%,两者比较有统计学差异($P<0.05$),P-gp 在食管鳞癌组织中表达显著高于正常食管黏膜组织,提示 P-gp 是引起食管肿瘤耐药性的原因之一,表明食管鳞状细胞癌存在天然耐药;而在正常食管黏膜组织中,P-gp 可作为一种防御机制,促使进入食管黏膜细胞内的毒物外排,减少毒性作用,可能与分泌代谢产物、防御外源性毒物的侵害、转运激素等有关。同时在胃肠道腺癌和肾细胞癌研究显示 P-gp 蛋白阳性表达率均显示较高水平分别为 80% 和 78% 左右,表明胃肠道腺癌和肾细胞癌细胞的耐药性更高[3]。进一步证实食管鳞状细胞癌的化疗较胃肠道腺癌和肾细胞癌相对敏感。本研究结果还显示 P-gp 蛋白的表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、肿瘤大小及浸润深度无关,而与食管鳞癌的分化程度相关($P<0.05$),其中高、中分化鳞状细胞癌阳性表达率较低分化者表达率高,提示食管鳞状细胞癌分级越高,P-gp 蛋白表达也越高,其对植物碱类、阿霉素、紫杉醇和泰素帝等抗癌药物耐药性越强,反之食管鳞癌组织学分化越低,其 P-gp 表达率也越低,其耐药性越低。这与恶性肿瘤分化程度低,其化疗一般较敏感相一致。与 Beer 等[4]研究结果相吻合。

谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione-S-transferase,GST)具有对外来毒素及中间代谢产物的解毒功能,与肿瘤 MDR 相关的有 GST-α、GST-μ 和 GST-π。其中 GST-π 在多种肿瘤有明显的基因扩增与表达增高,目前认为它是与肿瘤耐药关系最密切的一种亚型,GST-π 的高表达可能是抗药性的标志之一,它不仅可催化亲电子物质与谷胱甘肽结合,而且与亲脂性细胞毒药物结合增加其水溶性,促进药物的代谢,从而降低抗癌药物的细胞毒作用。GST-π 基因定位于 11q13,具有多种生物学功能,包括转运亲脂性化合物、清除细胞毒性产物、细胞间黏连等[5]。肿瘤细胞内 GST-π 的过度表达与顺铂、氮芥、环磷酰胺、瘤可宁和阿霉素耐药有关。本结果显示 GST-π 蛋白在食管鳞状细胞癌和正常食管黏膜组织中的阳性表达率分别为 63.9% 和 30%,两者经统计学处理具有显著性差异($P<0.05$),GST-π 在食管鳞癌组织中高表达,是引起耐药性的因素之一。GST-π 在正常食管黏膜组织中表达率为 30%,表明其在保护正常食管黏膜组织免受毒物损害方面起一定作用。这与其在机体内的解毒作用及毒性物质的排出是一致的,它有可能是继 P-gp 之后的又一个重要的耐药蛋白。本研究显示 GST-π 蛋白的阳性表达率与患者年龄、性别、淋巴结转移、肿瘤大小及浸润深度无关,而与肿瘤分化程度有关,随高、中、低分化级别不同,GST-π 蛋白阳性表达率具有显著性差异($P<0.05$),食管鳞癌细胞 GST-π 的表达与肿瘤分化程度明显相关,随鳞癌组织学分级增高,GST-π 阳性率也相应升高,反之癌组织分化低,阳性表达率也较低。与张军航等[6]研究发现 GST-π 在分化较好的食管癌组织中的表达明显高于分化差的食管癌组织的结果相一致。

DNA 拓扑酶是催化 DNA 拓扑结构改变的酶系,分为 Topo Ⅰ 和 Topo Ⅱ。Topo Ⅱ 是真核细胞生存所必不可少的核酶,它催化 DNA 拓扑异构体相互转换,直接参与 DNA 修复、转录及分离,是许多抗肿瘤药物的重要靶点。当 Topo Ⅱ 基因发生点突变,可改变其特异的氨基酸序列,使 Topo Ⅱ 发生质与量的改变,直接影响 Topo Ⅱ 与药物及 DNA 的结合,导致 DNA 裂解受抑制,最终形成耐药[7]。以 Topo Ⅱ 为靶点的药物主要为蒽环类抗生素和鬼臼霉素类如 VP16、替尼泊苷、玫瑰树碱、新霉素和阿霉素[8]。本组食管鳞状细胞癌中,Topo Ⅱ 蛋白阳性表达率为 41.0%,而正常食管黏膜组织 Topo Ⅱ 阳性率为 20%,经统计学处理具有显著性差异($P<0.05$),提示食管鳞状细胞癌中 Topo Ⅱ 表达明显低于 P-gp、GST-π 蛋白表达,提示化疗药物作用靶点相对较少,继而引起食管鳞癌耐药。本研究 Topo Ⅱ 的表达与患者年龄、性别、淋巴结转移、肿瘤大小及浸润深度无关,与组织学分级有关,具有显著的统计学差异($P<0.05$),Topo Ⅱ 在低分化癌中的阳性率显著高于高、中分化癌。与孙丽梅等[9]的研究结果一致。这可能与肿瘤细胞的增殖有关,分化差者肿瘤细胞增殖快,使 Topo Ⅱ 蛋白发生质和量改变,可能引起化疗药物作用靶点增加。此外,有研究也表明 Topo Ⅱ 主要表达于细胞周期 S 期和 G_2/M 期,在有丝分裂后下降,可能为反映细胞恶性程度较客观的指标[10]。高、中分化癌比低分化癌更易产生 MDR,这与临床上多数低分化

恶性肿瘤对化疗较敏感的现象相符。

近年研究表明 MDR 相关蛋白共表达普遍存在于一些恶性肿瘤细胞，共表达是 MDR 基因产物受共同因子调控的证据[11,12]。本组 144 例食管鳞状细胞癌组织中，P-gp、GST-π 的共表达率为 50.7%，两种蛋白在食管鳞癌表达呈平行增高关系，提示 P-gp 和 GST-π 二者可能存在相互的调节机制，相互依赖，共同作用，也表明两种蛋白产生耐药的机制有关，这与两种蛋白均对亲脂类化疗药物影响可能有关。本研究结果也显示大约半数食管鳞癌是通过“药泵”作用降低细胞内药物浓度和解毒降低抗癌药物的细胞毒作用产生对化疗药物的耐药性。本研究结果提示 P-gp 和 Topo Ⅱ共表达率为 11.8%，GST-π 和 Topo Ⅱ的共表达率为 7.6%，两种蛋白表达情况相反（$P<0.05$）。提示食管鳞状细胞癌 Topo Ⅱ表达与其耐药性产生的机制不同于 P-gp、GST-π 蛋白的作用。免疫组化染色呈现此种表型的食管癌在选择化疗药物时，尽量选取针对 Topo Ⅱ蛋白阳性表达，增加药物作用靶点的化疗药物，包括蒽环类抗生素和鬼臼霉素类如 VP16、替尼泊苷、玫瑰树碱、新霉素等，避免使用具有“药泵”作用和降低抗癌药物细胞毒作用的药物。对于 P-gp、GST-π 和 Topo Ⅱ 3 种蛋白同时表达的食管鳞状细胞癌，可根据免疫标记反应强度和阳性细胞比例，尽量避免使用耐药性高的化疗药物，充分选用耐药性低的药物，从而提高对食管鳞癌化疗的敏感性。

参考文献：

[1] Zhao Y, You H, Liu F, *et al*. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells[J]. Cancer Lett, 2002, 185(2): 211-218.

[2] Kabanov A V, Batrakova E V, Alakhov V Y. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(5): 759-779.

[3] 周英琼，曾思恩，侯巧燕，等. P-gp、GST-π、p53 和 CD44v6 在肺癌中的表达[J]. 肿瘤防治研究，2005，32(11)：699-701.

[4] Beer T W, Rowlands D C, Crocke J. Detection of the multidrug resistance marker P-glycoprotein by immunohistochemistry in malignant lung tumours [J]. Thorax, 1996, 51(5): 526-529.

[5] Schneider S, Uchida K, Brabender J, *et al*. Downregulation of TS, DPD, ERCC1, GST-Pi, EGFR, and HER2 gene expression after neoadjuvant three-modality treatment in patients with esophageal cancer [J]. J Am Coll Surg, 2005, 200(3): 336-344.

[6] 张军航，马　琳，崔　肃，等. P-糖蛋白，GST-π，Topo Ⅱ在食管癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床，2001，28(6)：434-435，438.

[7] Potter A J, Rabinovitch P S. The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase Ⅱ-targeting chemotherapeutic drugs [J]. Mutat Res, 2005, 572(1-2): 27-44.

[8] Park K, Kim J, Lim S, *et al*. Topoisomerase Ⅱ-alpha (topo Ⅱ) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(5): 631-634.

[9] Zhao Y, You H, Liu F, *et al*. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells[J]. Cancer Lett, 2002, 185(4): 211-218.

[10] 孙丽梅，朱继江，王恩华，等. 耐药基因 Topo Ⅱ在肺癌中表达与预后的研究[J]. 中国医科大学学报，2000，29(1)：17-18.

[11] 赵　韬，魏　莉，刘　健. 胃癌多药耐药的研究进展[J]. 实用临床医药杂志，2005，9(11)：42-48.

[12] 于冬青，易永芬. MRP、GST-π、Topo Ⅱα 和 LRP 在胃癌组织中的表达及意义[J]. 癌症，2003，22(5)：496-499.

（编辑　邓强庭）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又能普遍的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用汉字：

1. 公历世纪、年代、年、月、日和时间。例如：公元前 5 世纪，20 世纪 90 年代，1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全省，1995 年不能写成 95 年或 95'年；1953-1958 年不能写成 1953-58 年。年月日可以写成 1995-06-08，时间用“:”分隔的形式，如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2. 计数和计量（整数、小数、分数、百分数、约数）后带单位，编号，4 位和 4 位以上的数字不用三位分节法，不用“千分撇”，当与非公制计量单位相邻数字的空间（如 2.431 改为 2 431）。年份、部分代号、技能型号等非计量数字不用分节，此条如千分撇、尾数“0”等。5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但千位以上、百、十、百万、千亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万如千位写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部