文章编号:1000-5404(2010)10-1087-04

论著

小儿恶性肿瘤化疗前后外周血多药耐药基因、多药耐药相关蛋白基因、肺耐药蛋白基因的变化及临床意义

邓晓斌,王 珊,邹 琳,李长春,章 均,欧阳军 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院肿瘤外科)

[摘要] **目的** 探讨实体恶性肿瘤化疗患儿外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中多药耐药基因(multi-drug resistance1,MDR1)、多药耐药相关蛋白基因(multi-drug resistance-associated protein1,MRP1)、肺耐药蛋白基因(lung resistance protein,LRP)的表达量及其与临床化疗的关系。**方法** 应用实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR,FQ-PCR)技术,检测患儿化疗前后外周血和手术切除新鲜冻存组织,以及对照组外周血中 MDR1、MRP1、LRP 的 mRNA 表达量。**结果** 所有化疗患儿外周血 MDR1 表达量与同期手术切除的肿瘤组织 MDR1 表达量存在正相关($r=0.894$, $P=0.000$);化疗前后外周血 MDR1 表达量变化与肿瘤大小变化间存在负相关:神经母细胞瘤($r=-0.733$, $P=0.000$),卵黄囊瘤($r=-0.874$, $P=0.000$),淋巴瘤($r=-0.617$, $P=0.005$);化疗前外周血 MDR1 表达量与首次化疗后相应肿瘤标志物变化大小呈负相关:神经母细胞瘤尿香草杏仁酸(VMA)($r=-0.440$, $P=0.046$),卵黄囊瘤甲胎蛋白(AFP)($r=-0.831$, $P=0.000$),淋巴瘤乳酸脱氢酶(LDH)($r=-0.495$, $P=0.031$)。随着化疗次数的增加 MDR1 表达量增加($P<0.05$)。**结论** 动态检测患儿化疗前后 PBMCs 中 MDR1 mRNA 水平对化疗疗效及预后的判定有一定的指导意义,可在一定程度上指导化疗方案的修订。

[关键词] 小儿实体恶性肿瘤;多药耐药基因;多药耐药相关蛋白基因;肺耐药蛋白基因; 外周血;荧光定量 PCR
[中图法分类号] R730.23; R730.53; R394.2 **[文献标志码]** A

Expressions and significance of MDR1, MRP1 and LRP in peripheral blood of chemotherapy children with malignant solid tumors

Deng Xiaobin, Wang Shan, Zou Lin, Li Changchun, Zhang Jun, Ouyang Jun (Department of Surgical Oncology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of multi-drug resistance gene (MDR1), multi-drug resistance-associated protein gene (MRP1), and lung resistance protein gene (LRP) in the peripheral blood mononuclear cells in chemotherapy children with malignant solid tumors and its relationship with clinical chemotherapy. **Methods** A total of 59 children with malignant solid tumors at an age from 9 months to 14 years old who admitted in our hospital from January 2008 to October 2009 were collected in this study. There were 24 cases of neuroblastoma, 16 cases of yolk sac tumor, and 19 cases of lymphoma. Another 30 health age- and sex-matched children served as control. The expressions of MDR1, MRP1 and LRP in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) before and after chemotherapy, in fresh frozen tumor tissue samples and the in the peripheral blood samples of normal control group were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). **Results** All MDR1 expression level in the peripheral blood of chemotherapy children was positively correlated with its expression level in the same period tumor tissue samples ($r=0.894$, $P=0.000$). There was a negative correlation between the mdr1 mRNA changes and the changes of the tumor size before and after chemotherapy (neuroblastoma: $r=-0.733$, $P=0.000$; yolk sac tumor: $r=-0.874$, $P=0.000$; lymphoma: $r=-0.617$, $P=0.005$). A negative correlation was found between MDR1 mRNA level in peripheral blood before chemotherapy and the changes of corresponding tumor markers after the first time chemotherapy [for neuroblastoma, urine vanillylmandelic acid (VMA): $r=-0.440$, $P=0.046$; for yolk sac tumor, alpha-fetoprotein (AFP): $r=-0.831$, $P=0.000$; lymphoma: lactate dehydrogenase (LDH): $r=-0.495$, $P=0.031$]. The increased MDR1 mRNA level in peripheral blood of chemotherapy children was related to the increased

[基金项目] 重庆医科大学校级重点课题(XBZD200708)
[通信作者] 王 珊,电话:(023)63634117,E-mail:wangshan778@163.com

times of chemotherapy treatments ($P < 0.05$). **Conclusion** Dynamically detection for the mdr1 level in PBMCs before and after chemotherapy is valuable for evaluating the treatment response and prognosis in chemotherapy children with malignant solid tumors, and for revising the chemotherapeutic regimen.

[Key words] pediatric malignant solid tumor; multi-drug resistance gene; multi-drug resistance-associated protein gene; lung resistance protein gene; peripheral blood; real-time fluorescence quantitative PCR

Supported by the Key Project of Chongqing Medical University (XBZD200708). Corresponding author: Wang Shan, Tel: 86-23-63634117, E-mail: wangshan778@163.com

小儿实体恶性肿瘤发病率逐年上升,随着感染性、先天性疾病的控制,儿童肿瘤死亡率已跃居前2位。化疗在小儿恶性肿瘤的治疗中占有重要地位。由于肿瘤基因的不稳定性、表达的异质性和肿瘤细胞的高突变率,耐药性一直是肿瘤化疗中的一个主要问题,肿瘤细胞对药物的耐受性常导致化疗的失败。小儿恶性实体瘤的多药耐药性是小儿肿瘤术后复发和转移及化疗失败的主要原因[1]。为探讨多药耐药基因(multi-drug resistance1,MDR1)、多药耐药相关蛋白基因(multi-drug resistance-associated protein1,MRP1)、肺耐药蛋白基因(lung resistance protein,LRP)mRNA在外周血的表达水平及其与肿瘤化疗关系的临床意义,本研究应用荧光定量PCR技术,动态监测经病理证实为恶性实体瘤患儿59例化疗前后外周血MDR1、MRP1、LRP mRNA的表达水平,并与30例健康儿童的检测结果进行比较分析。

1 资料与方法

1.1 标本

收集重庆医科大学附属儿童医院2008年1月至2009年10月经病理证实为恶性肿瘤的初诊患儿59例,年龄9个月至14岁,中位年龄3岁,平均5岁。其中神经母细胞瘤组24例,卵黄囊瘤组16例,淋巴瘤组19例。选择同期门诊健康体检小儿30例为对照组。

1.2 主要的试剂与仪器

血液RNA提取试剂盒(QIAGEN公司),组织RNA提取试剂盒(Bioteke公司),cDNA逆转录试剂盒(Promega公司),扩增体系PCR Mix购于TIANGEN公司,引物由TaKaRa公司合成,探针由上海申友公司合成,所用定量PCR仪为Corrbet公司的Rotor-Gene 6000,及其配套的分析软件系统。

1.3 实验方法

1.3.1 血液提取RNA 在患儿每次化疗前静脉采血2 ml(EDTA抗凝)。按RNA提取试剂盒(QIAamp RNA blood mini kit)的说明提取PBMCs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。

1.3.2 组织提取RNA 收集患儿手术所取肿瘤组织,神经母细胞瘤(化疗前9例,化疗后19例),卵黄囊瘤(化疗后8例),淋巴瘤(化疗前12例)。液氮研磨、匀浆器匀浆,再按RNA提取试剂盒(RNApure高纯总RNA快速提取试剂盒)的说明提取组织中的总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。

1.3.3 合成cDNA 总RNA在70 ℃中孵育10 min。按逆转录cDNA试剂盒(Promega公司)的说明进行cDNA的合成,-20 ℃保存。

1.3.4 PCR标准品的制备 将扩增完毕的PCR产物进行2%琼脂糖电泳。将特异的片段切下,采用PCR产物纯化柱纯化PCR产物。紫外分光和电泳定量后,根据公式:标准品浓度(拷贝/ml) = 6.02 × 1023 × C × $D(260)$/MWt,其中C = 5 × 10^{-5}/ml,MWt = PCR产物的相对分子质量(碱基数 × 6.58 × 10^2),$D(260)$是在260 nm的光密度值,将标准品稀释到10^{12}拷贝/μl,-80 ℃保存。

1.3.5 引物与探针 通过GenBank基因数据库查找人的MDR1、MRP1、LRP基因的mRNA的全基因序列。运用Primer Premier 5.0软件来设计合适的*Taq*Man引物和探针;*Taq*Man探针的5′端被报告基团FAM标记,而3′端被磷酸化以防止PCR过程中其自身序列的延伸(表1)。

1.3.6 *Taq*Man PCR反应 PCR反应在以下反应体系中完成:2 × Real time PCR Master Mix 8 μl,Enhancer 1 μl,ddH_2O 8.5 μl,上、下游引物(20 μmol/L)各0.5 μl,探针(20 μmol/L)0.5 μl,cDNA 100 ng(1 μl),同时将定量模板稀释做标准曲线,首先在95 ℃水平起始模板变性5 min,然后按以下反应条件完成45个循环:95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s。在每1批PCR反应中设立阴性对照(水)。所有反应在Rotor-Gene 6000序列检测系统上完成。检测系统自带的软件可以计算Ct(threshold cycle)值,根据所获得的标准曲线,得到各标本的起始浓度(基因拷贝数/ml)。单细胞MDR1、MRP1、LRP基因mRNA表达量用相应的MDR1、MRP1、LRP总拷贝数/GAPDH总拷贝数 × 10 000表示。

表1 各基因引物及探针序列

检测基因	上游引物	下游引物	探针
MDR1	5′-GCTGGTTTGATGTGCACGATGTTGG-3′	5′-ATTTTGTCACCAATTCCTTCATTAA-3′	CTTAACACCCGACTTACAGATGATGTCTCCA
MRP1	5′-TGTGCCCTCCTCCCAGACCT-3′	5′-CAGACAGGTTCACGCCCT-3′	CCCAGTGGGGATCGGACAGAG
LRP	5′-GGGCTTGGTGCTGTTTGATG-3′	5′-AGCCGGATCTCGAGGTCAGCG-3′	CAGGGCAAGTTCGGCTTCGCC
GAPDH	5′-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3′	5′-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3′	ATCATCAGCAATGCCTCCTGCACCA

1.4 化疗疗效监测

肿瘤化疗前 64 排增强 CT 检查，了解肿瘤大小及与周围组织关系，化疗 2 个疗程后用同样方法检查肿瘤的大小变化，了解化疗疗效及有无手术机会；浅表淋巴结用 B 超检查，了解大小变化情况。常规进行相应肿瘤标志物的检查：神经母细胞瘤（尿 VMA）、卵黄囊瘤（AFP）、淋巴瘤（LDH）。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验、方差分析及两变量相关性分析，检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并经正态检验和方差齐性检验。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 相关曲线

Ct 值为报告基团的荧光强度超过阈值时的循环数。以 Ct 值作为纵坐标，MDR1、MRP1、LRP 起始拷贝数作为横坐标，建立标准曲线，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）。

2.2 肿瘤患儿化疗前与正常人 PBMCs 中 MDR1、MRP1、LRP 表达水平比较

神经母细胞瘤组与卵黄囊组患儿化疗前与正常人 PBMCs 中 MDR1 表达有明显差异性，神经母细胞瘤组[（1 662.328 3 ± 723.2784）*vs*（321.680 1 ± 128.657 9），$P < 0.01$]；卵黄囊组[（847.552 2 ± 281.678 09）*vs*（321.680 1 ± 128.657 9），$P < 0.01$]。淋巴瘤组患儿化疗前与正常人 PBMCs 中 MDR1 表达[（390.347 9 ± 187.678 09）*vs*（321.680 1 ± 128.657 9），$P > 0.05$]无明显差异。所有化疗患儿化疗前与正常人 PBMCs 中 MRP1、LRP 表达无明显差异（$P > 0.05$）。

2.3 手术切除肿瘤组织与同期患儿外周血 MDR1、MRP1、LRP 表达的相关性

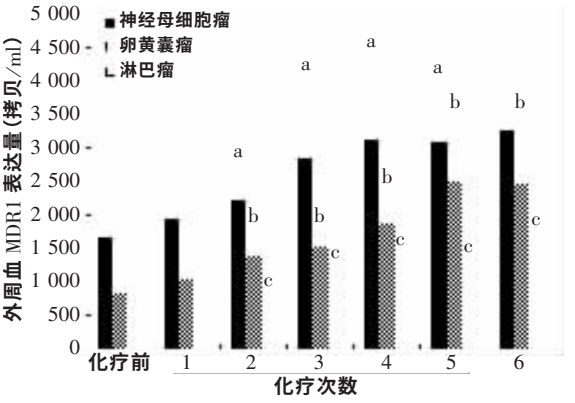
患儿手术切除肿瘤组织神经母细胞瘤（化疗前 9 例，化疗后 19 例），卵黄囊瘤（化疗后 8 例），淋巴瘤（化疗前 12 例）与同期患儿外周血单个核细胞 MDR1 的表达量存在正相关（$r = 0.894$，$P = 0.000$）。MRP1、LRP 两组无明显相关（$P > 0.05$）。

2.4 外周血 MDR1 表达量与肿瘤大小变化及首次化疗后相应肿瘤标志物变化大小的关系

肿瘤化疗前后 64 排增强 CT 检查，观察肿瘤大小变化，了解化疗疗效及有无手术机会，浅表淋巴结用 B 超检查，观察大小变化情况。化疗前后外周血 MDR1 表达量变化与肿瘤大小变化间存在负相关，神经母细胞瘤（$r = -0.733$，$P = 0.000$），卵黄囊瘤（$r = -0.874$，$P = 0.000$），淋巴瘤（$r = -0.617$，$P = 0.005$）；常规检查化疗前及第 1 次化疗后相应肿瘤标志物的表达量，统计相应标志物首次化疗后减少量与化疗前外周血的 MDR1 表达量亦存在负相关，神经母细胞瘤尿 VMA（$r = -0.440$，$P = 0.046$），卵黄囊瘤 AFP（$r = -0.831$，$P = 0.000$），淋巴瘤 LDH（$r = -0.495$，$P = 0.031$）。

2.5 肿瘤患儿化疗过程中 MDR1 表达水平变化情况

各型肿瘤外周血 MDR1 表达量随着化疗疗程的增加而表达增高（$P < 0.05$）。见图 1。



a：$P < 0.05$，与神经母细胞瘤化疗前比较；b：$P < 0.05$，与卵黄囊瘤化疗前比较；c：$P < 0.05$，与淋巴瘤化疗前比较

图 1　肿瘤患儿化疗过程中外周血 MDR1 表达的变化

3 讨论

化疗在小儿恶性实体瘤的治疗中占有越来越重要的地位，影响化疗效果的一个重要问题在于发生了肿瘤细胞对细胞毒药物的耐药性。根据肿瘤细胞的耐药特点，耐药可分为原药耐药（primary drug resistance，PDR）和多药耐药（multi-drug resistance，MDR）两大类[1]，原药耐药（PDR）是指对一种抗肿瘤药物产生抗药性后，对非同类型药物仍敏感；多药耐药（MDR）是指一些癌细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性，同时对其他非同类药物也产生抗药性，是造成肿瘤化疗失败的主要原因[2]。多药耐药可有肿瘤细胞对抗癌药物的天然不敏感，即内源性多药耐药（intrinsic MDR）；以及在化疗过程中由化疗药物诱导或其他因素作用下产生，即获得性多药耐药（acquired MDR）。目前认为肿瘤出现对化疗耐药可能与多种耐药基因的过度表达有关，比较肯定的有 MDR1、MRP1、LRP 等[3]，其中 MDR1 的过度表达被认为是肿瘤多药耐药的最重要机制[4]。

目前临床多采用全身性化疗，药物首先进入外周循环系统，再到达肿瘤和骨髓，药物在引起肿瘤耐药性增加的同时，也诱导了外周血耐药基因的表达。本研究通过检查化疗患儿 PBMCs 的 MDR1、MRP、LRP 的表达证实化疗前后 PBMCs 中 MDR1 的表达与肿瘤组织 MDR1 的表达有明显相关性，提示我们可以通过检测化疗患儿 PBMCs 的 MDR1 表达间接反应肿瘤组织对化疗药物的耐受程度[5]。

本实验还观察到神经母细胞瘤组和卵黄囊瘤组化疗前 PBMCs 中 MDR1 的表达量，明显高于对照组和淋巴瘤组，提示神经母细胞瘤和卵黄囊瘤患儿可能存在原发性耐药[6-8]，这与临床上神经母细胞瘤和卵黄囊瘤患儿化疗疗效较淋巴瘤差相一致。所有化疗患儿 PBMCs 的 MRP、LRP 与对照组无明显差异，MRP1 与

LRP 化疗后只有少数患儿 PBMCs 中出现表达增加,但整体无统计数意义,这可能与 PBMCs 中 MRP1 与 LRP 表达本身较低或不表达有关,提示检测外周血中 MRP、LRP 的表达对化疗的指导意义不大。

根据 RECIST 标准实体瘤化疗疗效可通过观察化疗前后瘤体大小变化来评定[9],本研究结果显示,化疗前后外周血 MDR1 表达量变化与肿瘤大小变化间存在负相关;化疗前后肿瘤标志物的变化,对化疗疗效的评定有一定的参考价值,研究还发现,化疗前PBMCs 中 MDR1 基因表达水平与各型肿瘤标志物首次化疗后的变化大小间也存在负相关关系。由此可以提示检测患者化疗前后 PBMCs 中 MDR1 基因表达水平对判定疗效有一定帮助。

本实验还观察到随着化疗次数的增加,化疗患儿 PBMCs 中 MDR1 表达量也逐渐增加,实验中发现一些患儿因为化疗方案的调整,外周血中 MDR1 表达量出现一段时间的下降或维持某一水平不上升,提示我们可以通过动态监测外周血 MDR1 的表达量,及时调整化疗方案,防止肿瘤耐药。因本实验样本量较少,确定化疗患儿 PBMCs 中 MDR1 超量表达,调整化疗方案的阈值,尚需结合临床进行大量标本的检测后才能得出。

从获取的肿瘤组织中直接检测多药耐药基因表达,能最直接的反映肿瘤耐药情况,但肿瘤组织一般只能检测一次,临床还存在难以获取或瘤灶消散后无从获取的情况。有研究显示外周血 MDR1 基因的表达量与肿瘤的化疗敏感性间存在相关[10-12]。本研究对小儿恶性实体肿瘤患儿 PBMCs 中的 MDR1 基因表达水平与瘤体的 MDR1 基因表达及化疗反应间的关系进行了初步探索,研究结果与以上结果基本一致。检测患者化疗前后 PBMCs 中 MDR1 mRNA 表达量,可间接反应肿瘤组织的耐药情况,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制定或选择应用耐药逆转剂[13, 14]。此外,本法的检测标本为外周血,容易获得且可进行动态观测,实时荧光定量 PCR 操作相对简便,且能绝对定量,能较准确定量基因的表达,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。有研究通过将外源性 MDR1 转染到小鼠骨髓单个核细胞,再回输到荷瘤小鼠体内,从而增加小鼠骨髓对化疗药物的耐受性,增加化疗药物剂量,得到更好的化疗效果[15]。本研究过程中也发现随着化疗疗程增加,患儿外周血中单个核细胞的 MDR1 表达量也逐渐增加,化疗后白细胞的减少量也逐渐变小,说明骨髓对化疗药物也产生了一定的耐受[16]。我们设想可否通过检测外周血的 MDR1 表达量来确定患儿化疗药物的最大耐受剂量? 随着 PBMCs 中的 MDR1 表达增加,可适量地增加化疗药物剂量,以取得更好的化疗效果。但是,化疗药物的毒性作用不仅仅局限在骨髓,所以此设想还需进一步实验研究。

参考文献:

[1] Bram E E, Stark M, Raz S, *et al*. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance[J]. Neoplasia, 2009, 11(12): 1359-1370.

[2] Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer[J]. N Engl J Med, 1987, 316(22): 1388-1393.

[3] Berger W, Setinek U, Hollaus P, *et al*. Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(6): 355-363.

[4] Perez-Tomas R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anticancer drug treatment[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(16): 1859-1876.

[5] Oue T, Yoneda A, Uehara S, *et al*. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies[J]. J Pediatr Surg, 2009, 44(2): 377-380.

[6] Pajic M, Norris M D, Cohn S L, *et al*. The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1/2): 241-246.

[7] de-Cremoux P, Jourdan-Da-Silva N, Couturier J, *et al*. Role of chemotherapy resistance genes in outcome of neuroblastoma[J]. Pediatr Blood Cancer, 2007, 48(3): 311-317.

[8] Pop I V, Pop L M, Ghetie M A, *et al*. Targeting mammalian target of rapamycin to both downregulate and disable the P-glycoprotein pump in multidrug-resistant B-cell lymphoma cell lines[J]. Leuk Lymphoma, 2009, 50(7): 1155-1162.

[9] Eisenhauer E A, Therasse P, Bogaerts J, *et al*. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(2): 228-247.

[10] 王梅, 葛明建. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19): 1979-1982.

[11] Trnkova Z, Bedrlikova R, Markova J, *et al*. Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia[J]. Neoplasma, 2007, 54(5): 383-390.

[12] Rodriguez-Antona C, Leskela S, Zajac M, *et al*. Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas[J]. Blood, 2007, 110(9): 3345-3351.

[13] Kwak J O, Lee S H, Lee G S, *et al*. Selective inhibition of MDR1 (ABCB1) by HM30181 increases oral bioavailability and therapeutic efficacy of paclitaxel[J]. Eur J Pharmacol, 2010,627(1/3): 92-98.

[14] Ktitorova O V, Kakpakova E S, Rybalkina EIu, *et al*. Adaptation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for clinical diagnosis of expression of MDR1 gene[J]. Klin Lab Diagn, 2000, (4): 16-20.

[15] 张秀亚, 王珊, 李圆, 等. 多药耐药基因转染对荷瘤小鼠骨髓造血细胞的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2164-2167.

[16] Cortez M A, Scrideli C A, Yunes J A, *et al*. mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death[J]. Pediatr Blood Cancer, 2009, 53(6): 996-1004.

(**收稿**:2009-11-12;**修回**:2009-12-26)

(编辑 张 维)