维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1023-04

# 5 种耐药基因在成人常见恶性肿瘤中的表达特点

张 燕,金先庆,赵珍珍,宿玉玺

(重庆医科大学附属儿童医院基因表达调控实验室,重庆 400014)

【摘 要】目的:通过对成人肝癌、肺癌、胃癌、肠癌、乳腺癌、卵巢癌 5 种耐药基因蛋白的检测,了解常见恶性肿瘤组织耐药基因表达的一般规律和特点。方法:应用 SP 免疫组织化学法检测 120 例成人常见肿瘤标本 P-gp、MRP、LRP、GST-π、Topo-II 的表达。结果:1.在 6 种常见肿瘤中 P-gp、MRP、LRP、GST-π 相对高表达,而 Topo-II 相对低表达。2.肝癌的 5 种耐药基因蛋白表达均偏高。3.2 种和 2 种以上耐药基因的共表达率达 95.83%,其中 5 种耐药基因共表达率达 21.67%。结论:P-gp、MRP、LRP、GST-π、Topo-II 均不同程度的参与了肿瘤耐药机制,临床上可作为指导用药的综合指标,实现个体化化疗。

【关键词】耐药基因;肿瘤;多药耐药;表达

【中国图书分类法分类号】R730.53 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-12

# Expression characteristics of 5 drug-resistance genes in 6 common adult malignant tumors

*ZHANG Yan,et al*

(*Laboratory of Gene Expression and Control,the Children's Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the expression of five drug resistance genes in hepato cellular cancer,lung cancer, stomach cancer, colorectal cancer, ovarian cancer,breast cancer tissue. *Methods*:The expression of P-gp, MRP,LRP,GST-π, Topo-II in 120 cases of malignant tumors were examined by immunohistochemistry stain. *Results*: 1. The expression of P-gp, MRP,LRP,GST-π in the 6 common cancers were relatively high, while Topo-II was relatively low. 2. P-gp,MRP,LRP,GST-π,Topo-II were all high expressed in hepatocellular cancer. 3. The coexpression rate of two and more genes was 95.83%,the coexpression rate of five genes was 21.67%. *Conclusion*:P-gp,MRP,LRP,GST-π,Topo-II are associated with multidrug resistance in different degree,which can be regarded as valuable indicators for the decision of individual chemotherapeutic program.

【Key words】 Drug resistance gene;Cancer;Multidrug resistance;Expression

近年来,恶性肿瘤治疗的新方法层出不穷,但化疗仍是防止复发和预防转移不可缺少的治疗手段,而肿瘤细胞对药物的耐受性又是导致化疗失败的重要原因。目前普遍认为肿瘤的耐药机制与多种耐药相关的酶和蛋白有关,如:P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)、多药耐药相关蛋白(Multidrug resistance-associated protein,MRP)、肺耐药相关蛋白(Lung resistance-associated protein,LRP)、谷胱甘肽转移酶(Glutathione-S- transferase-pi,GST-π)、DNA 拓扑异构酶 II(Topoisomeras, Topo-II)等。本研究旨在总结成人常见恶性肿瘤的 5 种耐药基因蛋白表达情况,了解其表达的一般规律和特点,为临床个体化化疗提供客观的实验室依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 临床资料

收集术后经病理检查证实的肝癌(肝细胞性癌)20 例、肺癌(鳞癌)20 例、胃癌(腺癌)20 例、肠癌(腺癌)20 例、卵巢癌(浆液性癌)20 例、乳腺癌(浸润性导管癌)20 例(2003 年~2005 年),标本由重庆医科大学病理科提供。其中男 56 例,女 64 例(包括卵巢癌和乳腺癌),年龄 28~77 岁(中位年龄 55.5 岁),11 例为复发或术前接受过化疗,其余均为初治。

### 1.2 实验方法

作者介绍:张 燕(1982- ),女,硕士生,
主要研究方向:肿瘤耐药与耐药基因。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(No.30330590)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



标本均经 10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋,5μm 连续切片,50℃恒温箱中固定 72h,梯度酒精脱蜡水化,其余步骤按照 SP 免疫组化试剂盒说明书进行,DAB 显色, 苏木素复染,中性树胶固封。鼠抗人 P-gp、MRP、LRP、GST-π、Topo-Ⅱ单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂试剂盒,均购于福州迈新生物技术开发公司。使用已知阳性片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。P-gp 表达位于细胞膜,MRP1、LRP、GST-π 表达均位于细胞膜和/或细胞浆,Topo-Ⅱ表达位于细胞核,阳性反应为棕色;每张切片在高倍镜下(×400)随机计数 10 个视野,计算其阳性率。判断标准:阳性细胞数 <10%为阴性(-),10%~25%为(+),25%~75%为(++),>75%为(+++);达(++)以上为阳性,表示肿瘤对该耐药基因所介导的药物具有耐受性。

1.3 统计学分析

数据应用 SPSS 软件进行 $\chi^2$ 检验,$\alpha$=0.05。

## 2 结 果

2.1 5 种多药耐药基因蛋白在 120 例成人肿瘤中的表达情况(表 1、图 1~6)

表 1 5 种多药耐药基因蛋白在肝癌、肺癌、胃癌、肠癌、卵巢癌、乳腺癌的表达

| 名 称 | 例数 | P-gp(%) | MRP(%) | LRP(%) | GST-π(%) | TopoII(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 肝 癌 | 20 | 88.52 | 71.32 | 70.23 | 51.27 | 53.98 |
| 肺 癌 | 20 | 47.47 | 74.64 | 56.03 | 95.28 | 51.49 |
| 胃 癌 | 20 | 46.47 | 71.76 | 37.34 | 73.51 | 37.73 |
| 肠 癌 | 20 | 66.34 | 37.47 | 47.66 | 73.96 | 20.54 |
| 卵巢癌 | 20 | 74.67 | 67.11 | 40.52 | 78.33 | 58.99 |
| 乳腺癌 | 20 | 70.42 | 66.00 | 62.75 | 75.96 | 40.09 |

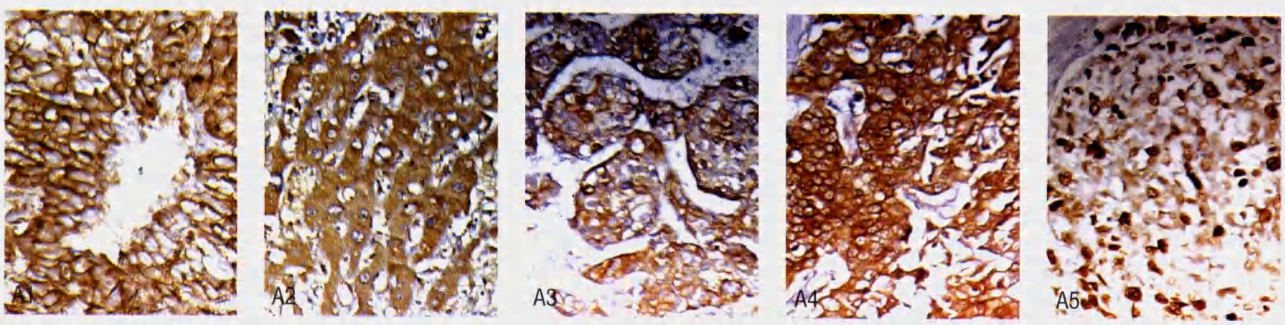



图 1 肝癌 5 种耐药基因表达 A1:P-gp A2:MRP A3:LRP A4:GST-π A5:Topo-II(SP,×400)

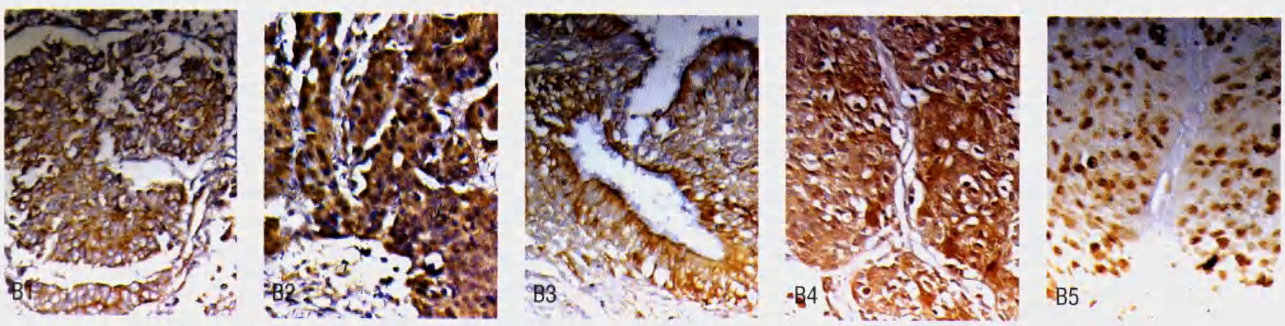



图 2 肺癌 5 种耐药基因表达 A1:P-gp A2:MRP A3:LRP A4:GST-π A5:Topo-II(SP,×400)

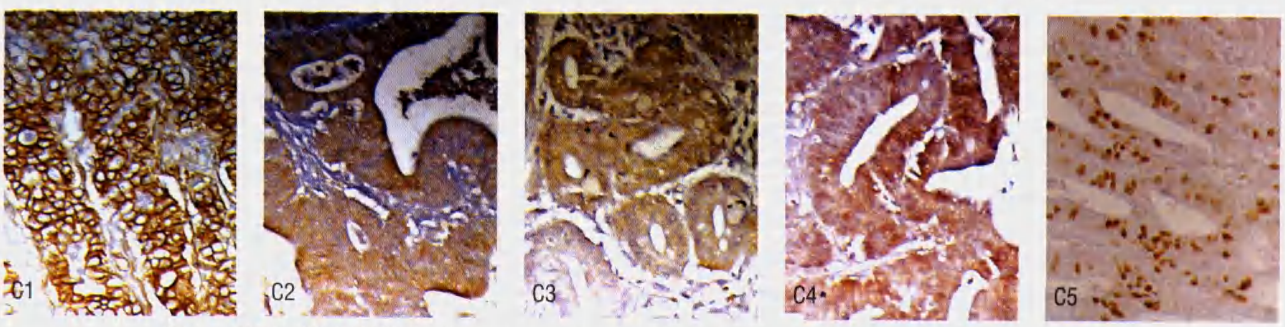



图 3 胃癌 5 种耐药基因表达 C1:P-gp C2:MRP C3:LRP C4:GST-π C5:Topo-II(SP,×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com



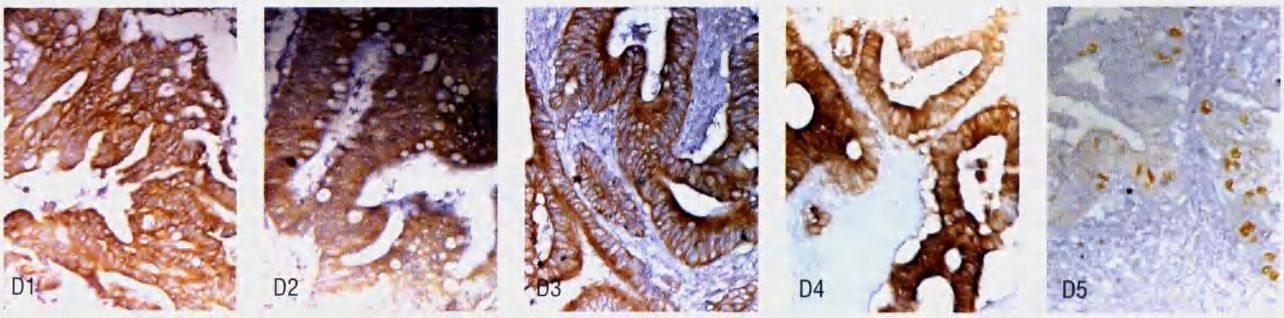



图 4 肠癌 5 种耐药基因表达 D1:P-gp D2:MRP D3:LRP D4:GST-π D5:Topo-II(SP,×400)

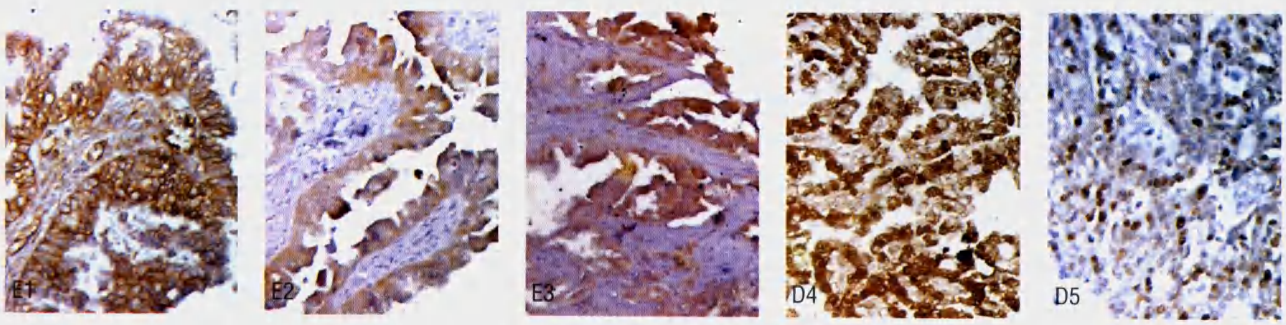



图 5 卵巢癌 5 种耐药基因表达 E1:P-gp E2:MRP E3:LRP E4:GST-π E5:Topo-II(SP,×400)

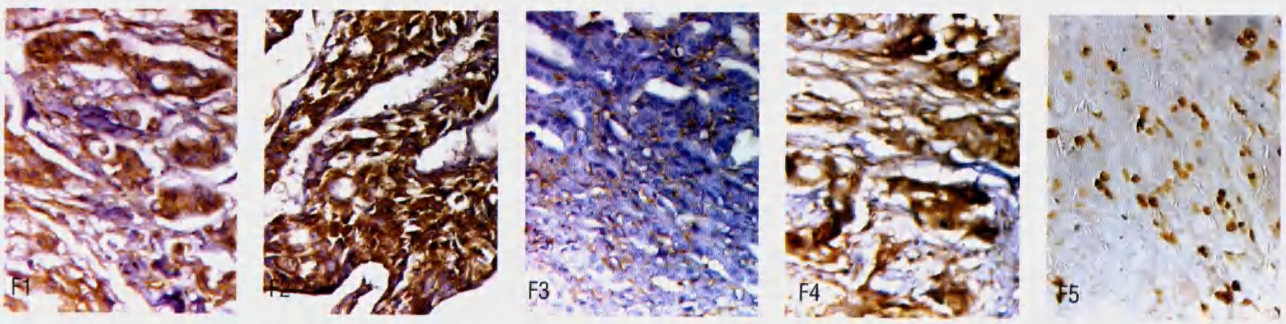



图 6 乳腺癌 5 种耐药基因表达 F1:P-gp F2:MRP F3:LRP F4:GST-π F5:Topo-II(SP,×400)

2.2 耐药基因蛋白的共表达现象

115 个病例有 2 种和 2 种以上耐药基因蛋白表达阳性,共表达率达 95.83%,其中 26 个病例 5 种耐药基因表达均为阳性,共表达率达 21.67%,明显高于单基因表达率 2.5%($P<0.05$)。

## 3 讨 论

恶性肿瘤的耐药机制十分复杂,产生耐药性的肿瘤细胞不仅对使用过的抗肿瘤药物产生耐药,而且对多种未曾用药物治疗的肿瘤和作用机理不同的药物也产生耐药,这种现象称为多药耐药性(Multidrug resistance,MDR)[1]。多药耐药可表现为肿瘤细胞对抗癌药物的天然不敏感,即内源性耐药,也可在化疗过程中由抗癌药物诱导或其他因素激活而产生,即获得性耐药。目前普遍认为肿瘤耐药可能与多种耐药基因的过度表达有关,多药耐药基因是一个大家族,研究比较肯定的有 P-gp、MRP、LRP、GST-π、Topo-Ⅱ等,其中 P-gp 被认为是介导肿瘤多药耐药的最主要机制[2]。

P-gp 是由 MDR1 基因编码的一种能量依赖性药物排除泵,当药物进入细胞后,P-gP 结合药物分子,同时其 ATP 位点结合 ATP 后释放能量,使药物转运到胞外,也可直接从胞膜排除药物,使胞内药物浓度始终维持于低水平,P-gp 是一系列复杂的疏水化合物底物的转运者,由此可介导植物碱类、阿霉素、紫杉醇、泰素帝等抗癌药物的耐药。P-gP 主要分布在有分泌功能的上皮细胞细胞膜中,在人类正常组织中有不同程度的表达,其中肾上腺、肺脏、胃肠、胰腺、肾脏等组织中表达较高,而在卵巢、胸腺、

维普资讯 http://www.cqvip.com



骨髓中表达率很低甚至不表达[3],这也解释了抗癌药物为何会引起对造血系统的严重损坏从而导致化疗疗程的缩短或中断。众多研究证实,P-gP 是多药耐药机制的标志,由它介导的耐药称为经典的耐药途径。

MRP 与 P-gP 同属 ABC 超家族膜转运蛋白,可转运多种有机阴离子物质,如一些内源性或外源性物质的还原性谷胱甘肽 GSH、葡萄糖醛酸、硫酸盐共轭结合物等。它也是一种 ATP 依赖泵,能将带负电荷的药物分子逆浓度泵出到细胞外,还可通过改变细胞浆及细胞器的 pH 值,使药物到达作用部位的靶位点时浓度减少,从而产生肿瘤耐药。MRP 与 P-gP 之间存在交叉耐药种类,包括长春碱类、阿霉素、足叶乙甙等,均为能与 GSH 共轭结合的药物。

LRP 是穹隆蛋白的主要成份,阻止以细胞核为靶点的药物通过核孔进入胞核,并将进入胞浆的药物转运到运输囊泡中,以胞吐的方式排出体外,从而影响药物的胞内转运与分布,致靶点药物有效浓度下降产生耐药。LRP 分布在人体体腔上皮、分泌器官等正常组织中,也不同程度的表达于各种肿瘤组织中,主要介导阿霉素、铂类、柔红霉素、米托蒽醌、烷化剂等的耐药。

GST 是机体中催化 GSH 与亲电物质发生结合的一类酶系,具有多种生物学功能,结构多样,分为 α、μ、θ、π、膜结合微粒体,其中 GST-π 与恶性肿瘤耐药关系最密切。GST-π 不仅可催化亲电物质与 GSH 结合,本身可和亲脂性细胞毒药物结合,增加其水溶性促进代谢,最终将毒性物质从尿液中排出或降解为无毒性的醇类物质,从而降低抗肿瘤药物的细胞毒作用,其主要介导对顺铂、氮芥类、烷化剂、蒽环类等的耐药。

Topo 是一种能催化 DNA 超螺旋结构局部构型改变的基本核酶,分为Ⅰ、Ⅱ类,其中 Topo-II 与细胞耐药关系密切。化疗药物通过该酶与 DNA 交联形成共价复合物,即可分割复合物引起 DNA 断裂,导致肿瘤细胞死亡。DNA 拓扑异构酶同时又是许多化疗药物重要的攻击靶点,导致该酶减少或活性下降,使得可分割的复合物减少,肿瘤细胞 DNA 损害减少,并具有修复力,使肿瘤细胞不因 DNA 断裂而死亡,从而产生耐药。Topo-II 表达越低提示对化疗药物越不敏感,又因其与肿瘤细胞的增殖活性密切相关,成为反映肿瘤细胞生物学行为和预后的重要标记物。以 Topo-II 为靶点的药物主要为蒽环类、鬼臼霉素、阿霉素等。

本研究显示,肝癌、肺癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌中 P-gp、MRP、LRP 和 GST-π 表达相对较高,Topo-II 普遍表达稍低,提示 P-gp、MRP、LRP、GST-π 的高表达和 Topo-II 的低表达均可导致肿瘤组织的耐药,这与有关报道相符。事实上,肿瘤化疗的耐药性常常是多种耐药蛋白参与及不同机制共同作用的结果[4,5]。本实验结果得出,2 种和 2 种以上耐药基因的共表达率达 95.83%,5 种耐药基因均表达率达 21.67%,表明 P-gp、MRP、LRP、GST-π、Topo-II 不同程度地同时参与了肿瘤的耐药形成,表达上的差异性与不一致性也正说明了影响肿瘤耐药机制的多因素性。有人也提出这些耐药基因间不存在相互关联性,各自发挥耐药作用[6]。因此,联合检测肿瘤多个耐药相关标志,同时评估多个耐药基因的表达,能更加客观地反映肿瘤的耐药情况。临床上可依据耐药机制的不同,筛选出产生耐药可能性最小的联合化疗方案,优化组合,增强疗效。

纵观 6 种成人常见恶性肿瘤的耐药基因表达情况,肝癌位于耐药之首,耐药基因阳性表达程度较高,根据临床资料其化疗效果也相对最差,预后不理想,胃肠道肿瘤和乳腺癌相对表达低,化疗效果较好,实验研究与临床疗效基本相一致,进一步证实了耐药基因的表达是肿瘤产生耐药性的机理之一,因此我们可以针对不同耐药基因的耐药机制,通过细胞因子逆转剂、化学增敏剂、反义寡核苷酸、RNAi 等[7]技术逆转肿瘤细胞的多药耐药现象,从而提高化疗药物的杀伤作用。

目前临床医师制定化疗方案一般根据经验用药或教科书参考,具有盲目性和不科学性。本研究可看出,耐药基因在不同肿瘤中及不同个体中表达不尽相同,结合耐药基因蛋白的作用机制与化疗药物的作用特点,针对个人选择敏感的化疗药物是十分必要的。例如,顺铂是现今临床上卵巢癌化疗方案中必不可少的一线药物,卵巢并不是 P-gP 的富集器官,但 GST-π 却是优势亚型,肿瘤高表达也正反映了其胚胎特征[8]。根据本研究结果,卵巢癌组织高表达 GST-π,且 GST-π 主要介导顺铂类药物的耐药,如果按部就班传统的化疗方案,结果将不能高效的杀死肿瘤细胞,同时这也解释了临床上化疗效果的不一致性。因此化疗前检测病人肿瘤组织的耐药基因表达情况对于化疗方案的制定具有一定

(下转第 1031 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



板、以两对引物为引物扩增出包含了 $\beta_7$ 基因的两个片断 PCR-A、PCR-B，然后再以 PCR-A、PCR-B 为模板扩增出完整的 $\beta_7$ 基因。成功使结构复杂的基因得以克隆[13]。

对 RT-PCR 反应过程中产生的造成编码氨基酸改变的突变碱基进行了定点突变修复，定点突变修复方法的应用使得在 RT-PCR 反应过程中不可避免出现的个别碱基突变得到修复，这一技术的应用可以确保通过 RT-PCR 方法克隆基因碱基序列的正确，该基因所表达蛋白发挥原有准确功能，也可使继续研究该基因的功能成为可能[13]。

整合素 $\beta_7$ 基因成功被克隆至 T 载体 pMD19-T simple，为构建携带有 $\alpha_4$ 和 $\beta_7$ 基因的腺病毒载体，以便为将 $\alpha_4$ 和 $\beta_7$ 基因转入树突状细胞，使树突状细胞能够定植到肠道淋巴组织做准备。

（通讯作者：胡　燕，Tel:023-63622764，E-mail:hy420@126.com）

## 参 考 文 献

[1] MacDonald TT. Vector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites[J]. Curr Top Microbiol Immunol,1999;236:113-135.

[2] Evans SS,Wang WC,Bain MD,et al. Fever-range hyperthermia dynamically regulates lymphocyte delivery to high endothelial venules [J]. Blood,2001;97(9):2727-2733.

[3] Lenschow DJ,Walunas TL,Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation[J]. Annu Rev Immunol,1996;14:233.

[4] Salmi M,Alanen K,Grenman S,et al. Immune cell trafficking in uterus and early life is dominated by the mucosal addressin MAdCAM-1 in humans[J]. Gastroenterology,2001;121:853-864.

[5] Michie SA,Streeter PR,Butcher EC,et al. L-selectin and alpha 4 beta 7 integrin homing re ceptor pathways mediate peripheral lymphocyte traffic to AKR mouse hyperplastic thymus[J]. Am J Pathol,1995;147:412-421.

[6] Berlin C,Bargatze RF,Campbell JJ,et al. Alpha 4 integrin mediates lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow[J]. Cell,1995;80:413-422.

[7] 武金宝，王继德，张亚历.肠粘膜屏障研究进展[J]. 世界华人消华杂志，2003;11(5):619-623.

[8] Berlin C,Bargatze RF,Campbell JJ,et al. 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow[J]. Cell,1995;80:413-422.

[9] Wagner N,Lihler J,Kunkel EJ,et al. Critical role for B7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue[J]. Nature,1996;382:366-370.

[10] 吴　琦，张立平. 淋巴细胞归巢至肠粘膜组织的分子机理[J]. 四川解剖学杂志，2002;10(4):231-233.

[11] 毛国强，彭明利，黄　琴，等. 人 MxA 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报，2006;31(4):498-501,508.

[12] M C Hu,D T Crowe,I L Weissman,et al. Cloning and expression of mouse integrin beta p (beta 7):a functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992;89(17):8254-8258.

[13] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular cloning:a laboratory manual[M]. 2nd ed,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.516-698.

（上接第 1026 页）

的指导意义。

总之，耐药基因的表达直接影响了化疗疗效，对恶性肿瘤患者的手术切除标本进行多药耐药基因检测，依据耐药机制的不同，合理选择用药，优化治疗方案，实现个体化化疗，将会大大地提高肿瘤的治愈率和生存率。

（通讯作者：金先庆，博士生导师，重庆医科大学儿童医院外科研究室 400014，电话：023-63893006　E-mail:lexiner82@126.com）

## 参 考 文 献

[1] FilerJS,Underhill LH.Multiple-drug resistance in human cancer [J]. N Engl J Med,1987;316:1388-1393.

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

[3] Juranka PF,Zastawny RL,Ling V.P-glycoprotein:multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins [J]. FASEB J,1989;3:2583-2592.

[4] Boutonnat J,Bonnefoix T,Mousseau M,et al. Coexpression of multidrug resistance involve proteins:a flow cytometric analysis[J]. Anticancer Res,1998;18(4C):2993-2999.

[5] Lehnert M. Clinical multidrug resistance in cancer:a multifactorial problem[J]. Eur J Cancer,1996;32A(6):912-920.

[6] Fan K,Fan D,Cheng LF,et al.Expression of multidrug resistance-related markers in gastric cancer[J]. Anticancer Res,2000;20 (6C):4809-4814.

[7] Lage H.MDR1/P-glycoprotein (ABCB1) as target for RNA interference-mediated reversal of multidrug resistance[J]. Curr Drug Targets,2006;7(7):813-821.

[8] Soh Y,Goto S,Kitajima M,et al. Nuclear localisation of glutathione S-transferase pi is an evaluation factor for drug resistance in gynaecological cancers[J]. Clin Oncol,2005;17(4):264-270.