维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0293-03

LRP、GST-π 在睾丸生殖细胞肿瘤中的表达及其意义

罗小辑,金先庆,陈 瑾

(重庆医科大学附属儿童医院外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨睾丸生殖细胞肿瘤中 LRP(Lung resistance-related protein)、GST-π 的表达及其临床意义。方法:应用 SP 免疫组织化学法检测 41 例术前未化疗的睾丸生殖细胞肿瘤标本 LRP、GST-π 的表达。结果:LRP 总的表达率为 41.5%,Ⅱ+Ⅲ期为 LRP 的表达率 73.3%高于Ⅰ期 23.1%($P<0.05$);LRP 在精原细胞瘤中表达率为 40.0%,非精原细胞生殖细胞肿瘤中的表达率为 45.5%($P>0.05$)。GST-π 总的表达率为 34.1%,Ⅰ期表达率为 38.5%,Ⅱ+Ⅲ期表达率为 26.7%,在精原细胞瘤中表达率为 30.0%,在非精原细胞生殖细胞肿瘤中的表达率为 45.5%,GST-π 与睾丸生殖细胞肿瘤的临床分期及病理类型之间无显著差异($P>0.05$)。结论:LRP 的表达与睾丸生殖细胞肿瘤的临床分期有关,可用作判断预后有价值的指标。

【关键词】睾丸生殖细胞肿瘤;LRP;GST-π

【中国图书分类法分类号】R737.21 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-01-04

Expression and significance of LRP and GST-π in the testis germ cell tumor

LUO Xiaoji, et al

(*Department of Surgery, Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of LRP, GST-π in the testicular germ cell tumor and evaluate their role in multidrug resistance of the testicular germ cell tumor. *Methods*: 41 samples of germ cell tumor without chemotherapy were analyzed immunohistochemically. *Results*: The total positive percentage of LRP in the testicular germ cell tumor was 41.5%, the frequence of LRP expression in Ⅰ stage, Ⅱ+Ⅲ stage, seminoma and non-seminoma germ cell tumor was 23.1%, 73.3%, 40.0% and 45.5% respectively. There was significant difference of the LRP expression between Ⅰ stage and Ⅱ+Ⅲ stage in the testis germ cell tumor ($P<0.05$). The total positive percentage of the expression of GST-π was 34.1%;the frequence of LRP expression in Ⅰ stage, Ⅱ+Ⅲ stage,seminoma and non-seminoma germ cell tumor was 38.5%, 26.7%, 30.0%and 45.5% respectively. The expression of GST-π was not associated with clinical stage and pathological types ($P>0.05$). *Conclusion*: The expression of LRP was correlational with the clinical stage of the testicular germ cell tumor, and LRP expression may be an important prediction of patients with testicular germ cell tumor.

【Key words】The testicular germ cell tumor; LRP; GST-π

睾丸肿瘤是泌尿生殖系统好发的肿瘤之一,是 20~35 岁年龄组男性最为常见的实体肿瘤,白种人尤为多见,近年来发病率呈逐年上升的趋势。睾丸肿瘤分为生殖细胞瘤和非生殖细胞瘤,前者占 95%以上。目前睾丸生殖细胞肿瘤的治疗采取综合治疗措施,80%的病人经治疗后可基本治愈,播散型的睾丸生殖细胞肿瘤需要化学疗法以防止复发和转移,但是仍有 15%~20%的病人由于对化学治疗药物耐受而导致死亡。本文旨在研究睾丸生殖细胞肿瘤的多药耐药机制,寻找判断肿瘤对药物敏感程度及预后的指标,为选择有效临床化学治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

41例原发性睾丸生殖细胞肿瘤来自重庆医科大学附属第一医院 1988~2002 年病理手术切除标本。其中精原细胞瘤 30例,恶性混合性生殖细胞瘤 4 例,胚胎瘤 6 例,畸胎瘤 1 例;年龄 18~64 岁,平均年龄 41 岁;右侧肿瘤 26 例,左侧肿瘤 14 例,双侧肿瘤 1 例。根据 1996 年美国联合癌症学会的分期办法,Ⅰ期病变局限于睾丸,Ⅱ期病变局限于腹膜后,Ⅲ期病变有膈上转移或累及其他脏器、淋巴结。本研究中,Ⅰ期病例占 26 例,Ⅱ+Ⅲ期病例占 15 例,所有病人术前均未接受

作者介绍:罗小辑(1977-),男,博士研究生,主要研究方向:基因治疗。

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

化疗。

1.2 方法

标本均经 10%中性甲醛固定，常规石蜡包埋，连续 5μm 切片，贴于载玻片上，37℃孵箱固定 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，苏木精复染。抗 LRP、GST-π 的单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒均来自北京中山公司，使用已知阳性片做阳性对照，用 PBS 代替一抗作阴性对照，其余步骤同上。睾丸生殖细胞肿瘤 LRP 和 GST-π 阳性染色主要是胞浆呈棕色。判断标准根据阳性瘤细胞所占百分比，参考染色深浅进行划分，阳性瘤细胞数小于 1%定为阴性（-），1%~10%者为弱阳性（+），大于 10%为强阳性（++）。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS10.0 统计软件处理。χ^2 检验分别分析 LRP、GST-π 与睾丸生殖细胞肿瘤临床分期、病理分类之间的关系，以及 LRP 与 GST-π 的共表达关系。

2 结果

2.1 LRP、GST-π 的表达与睾丸生殖细胞肿瘤临床分期之间的关系

大多数标本 LRP 染色显示出强阳性（15/17），主要着色部位在胞浆，所有的 4 例混合性生殖细胞肿瘤均为阳性染色（见表）。LRP 总的阳性率为 41.5%（17/41），Ⅰ期表达率为 23.1%（6/26），Ⅱ+Ⅲ期患者表达率为 73.3%（11/15），Ⅱ+Ⅲ期 LRP 的表达表达率上明显高于Ⅰ期（$P<0.05$）。GST-π 总的阳性率为 34.1%（14/41），Ⅰ期表达率为 38.5%（10/26），Ⅱ+Ⅲ期表达率为 26.7%（4/15），Ⅰ期与Ⅱ+Ⅲ期 GST-π 的表达率无显著性差异（$P>0.05$）。

LRP、GST-π 与睾丸生殖细胞肿瘤临床分期及病理分类的关系

	Ⅰ stage	Ⅱ+Ⅲ stage	S	NS
LRP	*23.1%	*73.3%	40.0%	45.5%
GST-π	38.5%	26.7%	30.0%	30.0%

S：精原细胞瘤

ns：非精原细胞生殖细胞肿瘤

* 差别有统计学意义（$P<0.05$）

2.2 LRP、GST-π 的表达与病理分型之间的关系

LRP 在精原细胞瘤中总的阳性率为 40.0%（12/30），在非精原细胞生殖细胞肿瘤中的表达率为 45.5%（5/11），两者之间差别无统计学意义（$P>0.05$）。GST-π 在精原细胞瘤中表达率为 30.0%（9/30），在非精原细胞生殖细胞肿瘤中的表达率为 45.5%（5/11），两者之间无统计学意义。

2.3 LRP、GST-π 的表达的相关性

睾丸生殖细胞肿瘤中 LRP 与 GST-π 同时阳性 5 例，两者之间无相关性（$P>0.05$），其共表达率与睾丸肿瘤的临床分期也无关。

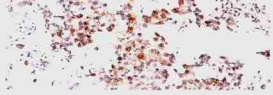


图 1 LRP 阳性着色 20 倍

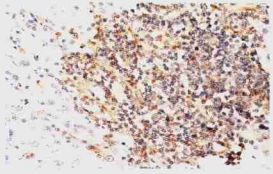


图 2 GST-π 阳性着色 20 倍

3 讨论

多药耐药性（Multidrug drug resistance，MDR）是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药的同时，对结构和作用机制不同的其他抗肿瘤药物产生交叉耐药，恶性肿瘤多药耐药是化疗失败的主要原因，然而目前已知的抗肿瘤药物几乎都能发生耐药，因此认识和克服肿瘤的多药耐药性具有重要的临床意义。肿瘤多药耐药的机制十分复杂，现已发现多种与耐药相关的酶和蛋白质，如：LRP、GST-π、P-gp（P-glycoprotein）、BCRP、MRP 等。目前关于肿瘤多药耐药研究最深入广泛的基因是 P-gp，但是 P-gp 与睾丸生殖细胞肿瘤在临床分期、病理类型、化疗敏感性及预后有无关系，存在较大争议。其它耐药相关蛋白如 LRP、GST-π 与睾丸生殖细胞肿瘤耐药之间的关系尚缺乏研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

LRP是人类主穹窿蛋白，由定位于 16 号染色体短臂 LRP 基因编码，编码的蛋白分子量 110KD，由 896 个氨基酸组成，是核糖核蛋白颗粒的主要成分[1]，LRP 在细胞内主要位于胞浆，少部分位于核膜核孔复合体上，起到调节核及穹隆内外的物质分布的作用。LRP 在多种组织、肿瘤都有表达，正常组织中多表达在支气管、消化道、肾脏等接触外源性物质、有排泌功能的组织；而 LRP 在不同肿瘤中的差异表达基本上反映了该类型肿瘤对化疗的相对敏感程度[2]。LRP 导致肿瘤多药耐药的机制可能是：①使那些以细胞核为靶点的药物不能通过核孔进入细胞核，即使进入核内也会很快被转运到胞质；②使胞质中的药物进入运输囊泡，呈房室性分布，最终通过胞吐作用将药物排出。LRP 在瘤细胞内表达可能与长春新碱、鬼臼乙叉甙、阿霉素、顺铂等耐药有关，但是不引起对紫杉醇等药物的耐药。AJ Zurita 等研究发现睾丸生殖细胞肿瘤中 LRP 的表达与临床分期有关，Ⅰ+Ⅱ~Ⅲ期患者 LRP 表达率为 33%，Ⅳ期患者表达率为 65%；且 LRP 阳性的患者生存期短于 LRP 表型为阴性的患者，认为 LRP 可以作为判断睾丸肿瘤预后有价值的指标，这一结果与本研究相似[3]。另外一项实验直接研究了 LRP 在肿瘤中的表达与化疗依从程度的关系，在非精原细胞生殖细胞肿瘤中，对化学治疗敏感者的 LRP 表达率为 30.8%，明显低于对化疗不敏感者 LRP 表达率 68.8%[4]。LRP 介导肿瘤耐药可能不是孤立的发挥作用，多项实验发现 LRP 与 P-gp 在耐药肿瘤中存在共表达，二者可能存在协同作用[5]。尽管 LRP 的表达提示预后不良，但是尚缺乏直接证据证明 LRP 是引起的耐药的根本原因，LRP 也许是与睾丸生殖细胞肿瘤的侵袭特性有关的的生物学标志，LRP 阳性表达者预后不良不是因为 LRP 引起耐药，而是这种表型的肿瘤具更高的恶性生物特征。

GST-π 属谷胱甘肽转移酶 GST 一种亚型，是 GST 引起耐药的主要原因，GST-π 主要存在于胞浆，尤其是在鳞癌中的表达较高，主要介导烷化剂，顺铂的耐药。GST 本身还可以与亲脂性药物结合，增加抗癌药的水溶性，促进其代谢，分解和降低抗癌药物的细胞毒作用。根据生化特性，GST 可为 α、μ、π 3 种同功酶，除了 GST-π 以外，研究证实 GST-α 的过度表达与氮芥类抗癌药物的耐受有关，GST-μ 与硝基类抗癌药物的耐受有关。目前较为肯定 GST-π 是卵巢癌预后不良的危险因素。A Katagiri 研究发现 GST-π 更多的表达在非精原细胞生殖细胞肿瘤，特别是畸胎瘤，western-blot 显示 GST-π 的强度高于精原细胞瘤，这种差异可能是非精原细胞生殖细胞肿瘤对化疗的敏感性低于精原细胞瘤的原因[6]，研究中发现 GST-π 在精原细胞瘤中的表达高于非精原细胞生殖细胞肿瘤，可能是由于样本量太小。尽管本实验中发现 GST-π 的表达与睾丸生殖细胞肿瘤的临床分期、病理分型存在关联，但是在正常精原细胞中不表达的 GST-π 出现在生殖瘤细胞中[7]。提示 GST-π 的表达与睾丸肿瘤耐药可能存在联系。

任何睾丸肿瘤都须先施行经腹股沟高位睾丸切除术，再根据临床分期、病理类型选用具体的治疗方案。虽然睾丸精原细胞瘤长期生存率已经超过 85%，但是Ⅱ、Ⅳ期病例单纯放疗的治愈率仅为 20%~40%，Ⅱc 期单纯放疗复发率高达 35%~50%；而播散性的非精原细胞生殖细胞肿瘤仍有 10%不能治愈。因而远处转移是治疗失败的主要原因，化疗在预防和治疗播散型睾丸生殖细胞肿瘤有重要作用，目前主要应用以顺铂为主的联合化疗方案，近年来使用卡铂、异环磷酰氨等也取得较好的疗效。而睾丸生殖细胞肿瘤 LRP、GST-π 表达增高都可以导致对顺铂不敏感，目前要逆转 GST-π 引起的耐药已有一些方法，如依他尼酸；尚缺乏有效逆转 LRP 引起的耐药。但是可以参照以往运用的逆转 P-gp 的方法，如：1.加大化疗药物剂量，2.换用其它有效的抗癌药物，3.交替使用化疗药，4.使用与耐药因素相关的逆转剂或抗体，5. 运用分子生物学的方法，如反义核苷酸、核酶及 RNA 干扰技术。

LRP 的表达水平与睾丸生殖细胞肿瘤的临床分期、化疗敏感性有一定关系，有可能成为筛选化疗药物、判断病人预后的重要指标。进一步证实了 LRP 在耐药中的作用，因此有必要进行深入得研究，以提高睾丸肿瘤的治愈率。

参 考 文 献

[1] Scheffer GL, Wijingard PL, Flens MJ, et al. The drug resistance related protein LRP is the human major vault protein [J]. Nat Med, 1995;1(6):578-582.

[2] Zquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, et al. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors [J]. Ame02rican Journal of Pathology, 1996;148(3):877-887. (下转第 301 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础，要在分枝杆菌中高效表达外源蛋白就要求所用的穿梭表达载体中含有能被分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶所识别的启动子。本研究采用的穿梭表达质粒 pBCG 具有卡那霉素和 $HgCl_2$ 抗性基因、大肠杆菌－分枝杆菌的复制起始点及人结核分枝杆菌热休克蛋白 70（heat shock protein 70，HSP70）的启动子。HSP70 是一种高度保守的蛋白质，从细菌到人体细胞的 HSP 序列具有很高的同源性，麻风杆菌 HSP70 全长氨基酸序列分别与结核杆菌、人的同源性为 95%、46%[2]。HSP70 在应激环境下能大量表达，生物的进化过程中具有高度的保守性，因此用人结核分枝杆菌 HSP70 启动子作为分枝杆菌中表达外源基因的启动子既能利用种属之间的高度同源性使不同分枝杆菌的 RNA 聚合酶对其易于识别而启动外源基因的表达，又可在受到热、过氧化物及被巨噬细胞吞噬等应急情况下使目的蛋白大量表达[3]。当 BCG 在体内被巨噬细胞吞噬后，HSP70 启动子被活化，诱导转录及外源蛋白的产生，并通过抗原递呈而激活机体的保护性免疫反应。HSP70 启动子这种活化方式利于载体在分枝杆菌中保持稳定性，减少外源蛋白表达对宿主细胞生长产生的影响以及减少宿主细胞蛋白酶对所表达蛋白的降解作用。

Em 续绦期幼虫表达 Em14-3-3 蛋白水平是 Em 成虫的 10 倍，免疫荧光显示其定位于生发层，与泡球蚴无限制浸润生长密切相关[1,4]。本研究发现 rBCG-Em14-3-3 经热诱导而高效表达 Em14-3-3 重组蛋白，从理论上揭示 rBCG-Em14-3-3 疫苗免疫接种后，被单核巨噬细胞吞噬的同时活化 HSP70 启动子，使 rBCG 在生存和繁殖的过程中表达大量的 Em14-3-3 重组蛋白，分泌或释放到吞噬体内，经抗原提呈细胞提呈而激活特异的免疫保护作用，从而为 rBCG-Em14-3-3 疫苗成为一种有价值的疫苗奠定物质基础。而非热诱导的 rBCG 可能由于表达量少而没被 SDS-PAGE 检测出来。免疫印迹试验发现，鼠抗血清能特异识别 SDS-PAGE 相对分子量为 27kDa 的目的蛋白带，提示 rBCG 中表达的重组抗原能够正确地折叠，保持着具有活性的免疫功能区，具有特异抗原性。这为进一步研究 rBCG-Em14-3-3 疫苗的免疫保护力奠定了基础，但外源基因在分枝杆菌中表达量的控制和翻译后修饰等问题尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Siles-Lucas M, Felleisen RS, Hemphill A, et al. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in Echinococcus multiloculris [J]. Mol Biochem Parasitol, 1998;91(2):281-293.

[2] Mckenzie K R, Adams E, Britton W J, et al. Sequence and immunogenicity of the 70 kDa heat shock protein of Mycobacterium leprae[J]. Immunol, 1991;147 (1):312-319.

[3] 程继忠，皇甫永穆，冯作化，等. 人结核分枝杆菌热休克蛋白 70 启动子对外源基因在分枝杆菌中表达的影响[J]. 中国微生物学和免疫学杂志，1997;17(6):410-415.

[4] Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis metacestodes[J]. Parasitol, 2001; 122(3):281-287.

（上接第 298 页）

[3] AJ Zurita, JE Diestra, E Condom, et al. Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours [J]. Br J Cacncer, 2003;88(6):879-886.

[4] Mandoky L, Geczi L, Doleschall Z, et al. Lung resistance protein analysis in testicular cancer [J]. Magy Onkol, 2002;46(4): 339-345.

[5] Goasguen JE, Lamy T, Bergeron C, et al. Multifactorial drug-resistance phenomenon in acute leukemias: impact of P170-MDR1, LRP56 protein, gluthatione-transferases and metallothione systems on clinical outcome [J]. Leukaemia and Lymphoma, 1996;23(5-6):567-576.

[6] A Katagiri, Y Nishiyama, M Kimura, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in testis cancer [J]. Br J Cancer, 1993;68(1):125-129.

[7] Klys HS, Whillis D, Howard G, et al. Glutathione S-transferase expression in the human testis and testicular germ cell neoplasia [J]. Br J Cancer, 1992;66(3):589-593.