维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0384-04

耐药表型 P-gp, GST-π,及 TOPOⅡ的表达与 Ki67 在肺癌中的表达及其临床意义

彭 乐[1],江跃全[2]

(1. 重庆医科大学七年制;2. 重庆医科大学附属第二医院心胸外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:检测 P-gp ,GST-π , TOPOⅡ 与 Ki67 在肺癌中的表达,探讨其在肺癌中的表达水平及其临床相关性。方法:用免疫组化方法检测 52 例术前未进行化疗的肺癌组织中 P-gp ,GST-π , TOPOⅡ 与 Ki67 的表达。结果:P-gp,GST-π ,TOPOⅡ和 Ki67 在肺癌中的阳性表达率分别是 73%,80.5%,62.5%,23.7%. P-gp ,GST-π 的表达与病理组织学分型,分化程度有显著相关性($P<0.05$);TOPOⅡ 在腺癌中的表达明显低于其他类型的肺癌($P<0.05$);P-gp ,GST-π , TOPOⅡ 的共表达率明显高于其单一表达率($P<0.05$);P-gp ,GST-π , TOPOⅡ 的表达 与 Ki67 之间无显著相关性。结论:P-gp ,GST-π , TOPOⅡ 在不同类型的肺癌中均可表达,且表达水平不同,但它们均与肺癌的耐药相关,且呈共同表达,所以以上指标可以作为临床判断预后和指导化疗的综合指标。

【关键词】肺癌 ;多药耐药; 免疫组化

【中国图书分类法分类号】R734 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-10-23

Expression and clinical significance of muti-drug resistance factors: P-gp, GST-π , TOPOⅡ in lung cancer

PENG Le, et al

(*the Seven the year Department, Chongqing Medical University*)

【 Abstract 】 *Objective*: To examine the expression of P-gp ,GST-π , TOPOⅡ and Ki67 in lung cancer and study the clinical relationship of P-gp ,GST-π , TOPOⅡand Ki67 Co-expression in lung cancer. *Methods*: The expression of P-gp, GST-π , TOPOⅡ in 52 cases of lung cancer without chemotherapy was detected before operation by immunohistochemical staning. ***Results***: The positive rates of P-gp ,GST-π , TOPOⅡ, Ki67 were respectively 73%, 80.5%, 62.5%, 23.7%. The P-gp, GST-π expression was correlated with the histology and differentiation , The expression of TOPOⅡ was obviously lower in adenocarcinoma than in other typers of lung cancers; The coexpression rate of more than one MDR gene production appareatly exceeded individual expression rate. The expression of P-gp, GST-π , TOPOⅡ was not correlated with the expression of Ki67. *Conclusion*: P-gp,GST-π , TOPOⅡ can be expressed in different types of lung cancers and with different expression levels, They are all correlated with multidrug resistance of lung cancer, Thus, they can be regarded as a valuable indicators for clinical chemotherapy and for prognosis in lung cancer patients.

【 Key word 】 Lung cancer; MDR; Immunohistochemistry

肺癌是当今世界对人类健康和生命威胁最大的的恶性肿瘤之一,联合化疗是对中晚期肺癌患者的重要治疗手段之一,但是疗效不佳,主要是因为肿瘤细胞对化疗药物存在多药耐药(Multidrug resistance, MDR)。近年研究较多的是 MDR-1 基因以及由该基因编码的 P- 糖蛋白 (P-gp); 谷胱甘肽 (GSH) 解毒酶系统;DNA 修复机制与拓扑异构酶含量或性质的改变;多药耐药相关蛋白(MRP)肺耐药蛋白(LRP)含量增加,蛋白激酶 C(PKC)的活性增加等。本实验利用免疫组织化学的方法,检测 56 例肺癌患者中 P-gp,GST-π ,TOPO Ⅱ 和 Ki67 的表达情况, 并探讨其于肺癌病理学类型,分化程度和肿瘤分期的关系以及有无淋巴结转移等临床指标的关系, 以及三种耐药因子与 Ki67 之间的相关性及其临床意义。

作者介绍: 彭 乐(1982-),男,在读硕士,
主要研究方向:临床肺癌治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

收集重庆医科大学附属第二医院心胸外科 2002 年至 2005 年有完整随访资料及术前未经过化疗，放疗的肺癌根治术病例 56 例。男例 38，女例 18，年龄岁 35~78 岁，平均年龄 53 岁。临床分期：Ⅱ期例 7 例，Ⅲ期例 43 例，Ⅳ期例 6 例。肿瘤 < 3cm 6 例，> 3cm 50 例，组织学类型：鳞状细胞癌 19 例，腺癌 28 例，小细胞癌 4 例，其他 5 例。病理学分级：低分化癌 32 例，中，高分化癌 24 例；按有无淋巴结转移分为：淋巴结转移组 33 例，无转移组 23 例。所有标本均为 10%的甲醛固定，石蜡包埋，4μm 厚连续切片，常规 HE 染色。

1.2 试剂和方法

免疫组织化学染色方法采用 s-p 法，所用鼠抗人特异性单抗 P-gp，GST-π，TOPOⅡ Ki67 及 s-p 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司提供的试剂盒。严格按照试剂盒说明书进行操作，最后用苏木精复染，脱水，封固。每批染色均设阴性空白对照（以 PBS 液代替第一抗体）和阳性对照（由公司提供）。

1.3 阳性结果判断

P-gp 阳性定位于癌细胞质或细胞膜上，GST-π 阳性物质定位于癌细胞核或细胞质，TOPOⅡ 阳性物质定位于细胞核内，Ki67 阳性物质定位于细胞核，根据肿瘤细胞的阳性细胞数及其染色反应得深浅进行判断。选 10 个高倍镜视野（×400）随机视野（每个视野计数 100 个肿瘤细胞）计算的阳性比例，定为 4 级：1）切片内务阳性细胞或阳性细胞 <10% 为阴性（-）；2）阳性细胞 10%~30%为弱阳性（+）；3）阳性细胞占 31%~50%为中度阳性（++）；4）阳性细胞 > 50%为强阳性（+++）；阳性染色细胞比例 > 10% 全记为阳性表达。

1.4 统计学处理

各组资料间的比较采用 χ^2 检验及四格表确切概率法分析，用 SPSS10.0 统计软件计算，$P<0.05$ 表示相差显著。

2 结 果

2.1 P-gp，GST-π，TOPOⅡ 蛋白表达与肺癌临床组织病理特征的关系（如表 1）

P-gp，GST-π，TOPOⅡ 在肺癌中的阳性表达率分别是 73%，80.5%，62.5%。P-gp 和 GST-π 在非小细胞组的阳性表达率为（76%）明显高于小细胞癌组（25%）的且具有显著性差异（$P < 0.05$）。P-gp 和 GST-π 的阳性表达率在低分化癌组（65% 和 68%）明显低于中高分化癌组（87%和 91%）（$P < 0.05$）。TOPOⅡ 在鳞癌组（84%）和小细胞癌组（75%）的阳性表达率明显高于腺癌组（51%）（$P < 0.05$）。P-gp，GST-π，TOPOⅡ 的阳性表达率与肺癌患者的年龄大小，肿瘤的大小，是否有常年的吸烟史（> 20 年），临床 TMN 分期，有无淋巴结的转移等因素之间均无明显相关性（$P > 0.05$）。

表 1 P-gp，GST-π，TOPOⅡ 蛋白表达与肺癌临床组织病理特征的关系

组别		P-gp 阳性例数		GST-π 阳性例数	TOPOⅡ
年龄	< 60	35	26（74%）	28（80%）	22（63%）
	> 60	21	15（71%）	17（81%）	13（61%）
吸烟	是	46	35（76%）	37（80%）	29（63%）
	否	10	6（60%）	7（70%）	6（60%）
肿瘤大小	> 3	50	37（74%）	40（80%）	32（64%）
	< 3	6	4（66%）	4（66%）	3（50%）
组织学类型					
非小细胞癌		52	40（76%）	43（83%）	35（67%）
磷癌		19	13（68%）	15（78%）	16（84%）
腺癌		28	24（85%）	25（89%）	15（51%）
其他		5	3（60%）	3（60%）	1（20%）
小细胞癌		4	1（25%）	1（25%）	3（75%）
病理学分级					
	低分化癌	32	21（65%）	22（68%）	20（62%）
	中高分化癌	24	21（87%）	22（91%）	15（62%）
淋巴结转移					
	无	23	15（65%）	16（89%）	13（56%）
	有	33	27（81%）	28（84%）	22（66%）

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 肺癌组织中 P-gp,GST-π,TOPOⅡ的共表达

	P-gp	GST-π	TOPOⅡ	P-gp+GST-π	P-gp+TOPOⅡ	GST-π+TOPOⅡ	P-gp+GST-π+TOPOⅡ
阳性病例数 N	2	0	7	20	2	8	17
阳性性例数%	3.5%	0	12.5%	35.7%	3.5%	14%	20%
总数			16%			84%	

2.2 Ki67 的表达与肺癌临床组织病理特征的关系(表 3)

Ki67 在小细胞癌组中的表达(75%)明显高于鳞癌组和腺癌组(26%和 21%)($P<0.05$);Ki67 的阳性表达率在低分化组(34%)中要明显高于中高分化癌组(16%)($P<0.05$)。Ki67 的阳性表达率与肺癌患者的年龄大小,肿瘤的大小,是否有常年的吸烟史(>20 年),临床 TMN 分期,有无淋巴结的转移等因素之间均无明显相关性($P>0.05$)。

表 3 Ki67 的表达与肺癌临床组织病理特征的关系

项目	例数	阳性率
组织学类型		
非小细胞癌	52	
磷癌	19	26%
腺癌	28	21%
其他	5	20%
小细胞癌	4	75%
病理学分级		
低分化癌	32	34%
中高分化癌	24	16%

2.3 肺癌组织中 P-gp,GST-π,TOPOⅡ的共表达(表 2)

在以上肺癌细胞组织中 P-gp,GST-π,TOPOⅡ单独表达率分别是:3.5%,0,12.5% P-gp,GST-π 的共表达率是 35%,P-gp ,TOPOⅡ的共表达率是 3.5%,GST-π,TOPOⅡ的共表达率是 14%,P-gp,GST-π,TOPOⅡ共表达率是 30%,即其中两个或两个以上 MDR 基因产物的共表达率为 84%,明显高于单独基因的表达率 14%($P<0.05$);共表达率是 30%,即其中两个或两个以上 MDR 基因产物的共表达率为 84%,明显高于单独基因的表达率 14%($P<0.05$)。

2.4 肺癌组织中 P-gp,GST-π,TOPOⅡ的表达与 Ki67 表达的关系

Ki67 的阳性表达率与 P-gp,GST-π,TOPOⅡ的阳性表达之间无显著相关性($P>0.05$)。

3 讨 论

现就该实验探讨多药耐药产生的机制,及其与临床组织病理学的关系,有利于指导临床对联合化疗药物的选择。

P-gp 是多耐药基因 mdr1 基因编码的蛋白产物,其分子量为 170KD,在正常的肝胆管,胃肠,肾等具有分泌功能的细胞中有表达[1]。P-gp 一旦与抗肿瘤药物结合便通过 ATP 提供的能量,将药物从细胞内泵到细胞外,细胞内的药物浓度不断下降,其细胞毒性作用随之减或消失,从而出现耐药现象[2]。有报道指出其对天然的疏水性抗肿瘤药物有较强的外泵作用,如长春花碱,紫杉醇等。本组实验显示:P-gp 在非小细胞癌(腺癌+磷癌)组中阳性表达率明显高于在小细胞癌组($P<0.05$),而且腺癌组与磷癌组比较,腺癌组高于磷癌组,此结果与临床上小细胞癌化疗最敏感,磷癌次之,腺癌最差相符。说明 P-gp 是非小细胞癌癌组织产生易耐药性的因数之一。本实验还显示 P-gp 的表达与年龄,是否吸烟,肿瘤大小,有无淋巴结转移无关。与国外相关报道相符[3,4]。

GST-π 是一种多功能的药物代谢酶,主要分布在泌尿,消化和呼吸上皮,能催化谷胱甘肽(GSH)与化疗药物结合而解毒,导致肿瘤细胞产生耐药性。GST-π 本身也可与亲脂性的药物结合增加其水溶性,促进其外排而降低化疗药物的细胞毒作用[5]。有实验报道[6]GST-π 阳性表达对顺铂,环磷酰胺,阿霉素等药物疗效不佳。本实验结果显示:GST-π 的阳性率为 80.5%,在高,中分化癌的阳性表达率与低分化癌组比较,前者明显高于后者($P<0.05$),说明癌细胞分化程度越高,GST-π 的表达越高,其耐药性也越高。其次 GST-π 的表达还与肺癌组织学类型有关,非小细胞癌癌组阳性率明显高于小细胞癌组($P<0.05$),与临床小细胞癌对化疗敏感相符。由此我们可以推测 GST-π 为非小细胞肺癌而不是小细胞肺癌产生内源性 MDR 的机理。本

维普资讯 http://www.cqvip.com

实验还显示 GST-π 的表达与年龄，是否吸烟，肿瘤大小，有无淋巴结转移无关。

TOPOⅡ是 DNA 复制和转录所需要的基本核酶，其主要有两种功能：一是作为细胞的增殖指数；二是作为抗癌药物的作用靶点。化疗药物主要通过与 TOPOⅡ结合而造成 DNA 复制和转录异常，是肿瘤化疗的重要靶酶。有研究表明[7]，细胞内 TOPOⅡ水平字节影响化疗药物的抗肿瘤活性，其靶点水平越高，对抗癌药物敏感性越高。本实验显示腺癌组的阳性表达率明显低于小细胞癌组，提示肺腺癌细胞中 TOPOⅡ的表达率低，使一些化疗药物丧失重要的靶点，从而降低化疗效果，产生耐药。故 TOPOⅡ的表达率的高低可以作为临床选择化疗药物及判断化疗敏感性的指标。本实验还显示 TOPOⅡ的表达与年龄，是否吸烟，肿瘤大小，有无淋巴结转移，分化程度无关。

近年的研究表明[8]，某些类型的肿瘤细胞中，显示耐药因子共同表达现象。本实验中肺癌组织中 P-gp，GST-π，TOPOⅡ的两两共表达率明显高于单表达率，说明肺癌中耐药的单基因作用较弱，肺癌的多药耐药机制是多基因共同表达的结果，三者基因可能受共同的调控因子控制，能受某一共同因素启动，造成协同表达，但是其具体机理尚待进一步阐明。我们可以利用三种耐药机理的不同，筛选出产生耐药可能性最小的联合化疗方案，提高化疗的有效率，提高患者的治愈率及生存率。

Ki67 表达的出现于有丝分裂 G_0,G_1 早期以外的细胞周期，并在有丝分裂后迅速将解和失去抗原决定簇[9]，因此成为评价细胞增殖活性的准确，简单，可靠的指标。本实验显示：Ki67 在低分化组的阳性表达率高于高中分化组，且有显著性差异（$P<0.05$），与国内外相关试验结果一致，可见低分化癌的癌细胞的增殖能力强于高中分化癌，且 Ki67 在小细胞癌组中的表达明显高于磷癌组和腺癌组，与临床上小细胞癌的恶性程度高相符，故 Ki67 在肺癌中的表达有助于判断肿瘤的恶性程度及预后，指导临床治疗。

本实验还比较了 P-gp，GST-π，TOPOⅡ三组阳性表达的病例中 Ki67 的阳性表达率，结果显示三组间无显著性差异，提示我们肺癌组织的恶性程度的高低，与其是否产生耐药性无显著性联系。

综上所述，本实验表明 P-gp，GST-π，TOPOⅡ同时参与了肺癌耐药性的形成，且具有协同作用；Ki67 与肺癌的恶性程度成正相关。因此，临床上检测上述四种基因的综合意义很大，一方面揭示肿瘤耐药，复发的原因，估计化疗效果和判断预后；另一方面依据其固有的耐药机制来指导化疗，制定有效的个体化化疗方案。通过以上方法来指导临床工作，从而提高治疗效果和患者的生存率。

参 考 文 献

[1] Sugawaral, kataoka L. The effect of anti-p-glycoprotrin antibody on resistance in coler cancer [J]. Cancer Res, 1993;48(9):1926.

[2] Goldstein LJ. MDR1 gene expression in solid tumors[J]. EurJ cancer, 1996;32A :1039-1050.

[3] Galimberti S, Marcetti A, Buttitta F, et al. Multi-drug resistance related gendes and P53 expression in human non-small cell lung cancer [J]. Anticancer Res,1998;18:2973-2977.

[4] Beer TW, Rowlands DC, Crocker, et al. Detection of the multi-drug resistance marker P-glycoprotein by immunohistochemistry in malignantlungtumors [J]. Thorax,1996;15:526-529.

[5] O′ Brien ML, Tew KD. Glutathione and related enzymes in mutidrug resistance [J]. Eur J cancer, 1996;32a:967-978.

[6] Arai T, Yasuda Y, Takaya T, et al. Immunohistochemical expression of glutatheione transferade pi in untreated primary non-small-cell lung cancer [J]. Cancerdetect Prev, 2000;24(3):252-257.

[7] Yabuki N, Sasano H, Kato K, et al. Immunohistovhemical-study of DNA topisomerade Ⅱ in human cancer disordes [J]. Am J Pathol, 1996;149(3):997.

[8] HUO Jianmin, CHE Chunli, et al. Coexpression and clinical significance of multidrug resistance factors in lung cancer [J]. Chin J Lung Cancer June, 2004;7:218-220.

[9] Kitamura H, Kameda Y, Nalarmurs N, et al. Proliferative potential and p53 overexpression in precursor and carly stage lesions of broncheioloslveolar lung cancer [J]. Ant J Pathol,1995;146(4):876-887.