维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0376-03

恶性肿瘤患者外周血细胞P-糖蛋白表达与肿瘤多药耐药相关性研究

金先庆，张喜平，王 珊，许嘉陵
（重庆医科大学儿科学院外科，重庆 400014）

【摘 要】目的：本研究通过外周血单个核细胞（PBMC）、CD_4^+、CD_8^+细胞P-糖蛋白的表达与肿瘤组织P-糖蛋白表达的相关性研究以及PBMC、CD_4^+、CD_8^+细胞P-糖蛋白在化疗过程中的动态变化的观察，寻找动态诊断MDR的新途径。方法：本组共51例肿瘤病人，23例采用免疫组化检测PBMC及肿瘤组织的P-糖蛋白，28例用流式细胞术测定PBMC、CD_4^+、CD_8^+细胞P-糖蛋白，用免疫组化测定相应的肿瘤组织的P-糖蛋白。结果：①肿瘤患者PBMC、CD_4^+、CD_8^+细胞P-糖蛋白表达较正常人高（$P<0.05$）。②PBMC、CD_4^+、CD_8^+细胞P-糖蛋白表达水平与肿瘤组织P-糖蛋白呈显著的相关性（$r=0.419, P<0.05$）；③PBMC、CD_4^+P-糖蛋白化疗后较化疗前显著增加，可通过PBMC、CD_4^+P-糖蛋白的变化动态反映肿瘤细胞的变化。④用FCM检测PBMC P-糖蛋白与IC法比较，FCM方法简单，精确度高，更适合血细胞的检测。结论：PBMC、CD_4^+、CD_8^+P-糖蛋白含量与肿瘤P-糖蛋白表达有明显相关性。通过PBMC、CD_4^+、CD_8^+P-糖蛋白的检测，为临床判断肿瘤耐药提供了一条简便的途径。

【关键词】多药耐药；外周血单个核细胞；肿瘤；免疫组化；流式细胞术
【中国图书分类法分类号】R394 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-01-07

Study on the relationship between expression of p-glycoprotion in peripheral blood mononuclear cell and multidrug resistance of patients with cancer

JIN Xianqing, et al
(Department of Surgery, College of Pediatrics, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: At present, the detection of multidrug resistance depends on resected specimen but it can not be investigated in patients who were not operated on or got a long term chemotherapeutic treatment after operation. In this study, the relationship between p-glycoprotein expression in PBMC, CD_4^+, CD_8^+ and tumor cells has been investigated. In order to obtain a new determination method for multidrug resistance, the changes of p-glycoprotein expression in PBMC, CD_4^+, CD_8^+ during chemotherapeutic stage has been analysed. *Methods*: The expression of p-glycoprotein in PBMC, CD_4^+, CD_8^+ and tumor cells has been detected by means of immunohistochemestry assay in 23 cases, flow cytometry and immunohistochemestry assay in 28 cases to identify the relationship of p-glycoprotein between PBMC, CD_4^+, CD_8^+ and tumor cells. P-glycoprotein in PBMC, CD_4^+ and CD_8^+ was measured in 17 of 28 patients with chemotherapeutic treatment for six months. *Results*: ①The p-glycoprotein expression in PBMC, CD_4^+, CD_8^+ of patient with malignant tumor was higher than the control. ②A significance relationship of p-glycoprotein had been found between PBMC, CD_4^+, CD_8^+ and tumor cells. ③The p-glycoprotein expression in PBMC, CD_4^+, CD_8^+ increased significantly in chemotherapeutic group as compared with non-chemotherapeutic group. ④Flow cytometry assay was more sensitive than immunohistochemestry in detecting p-glycoprotein expression in PBMC, CD_4^+, CD_8^+. *Conclusion*: The detection of p-glycoprotein in PBMC, CD_4^+, CD_8^+ provides a new method in the MDR determination. A relationship of p-glycoprotein has been found between PBMC, CD_4^+, CD_8^+ and tumor cells.

【Key words】Peripheral blood mononuclear cell; Multidrug resistance; Tumor; Flow cytometry; Immunohistochemistry

近年来国内外多采用手术切除肿瘤标本进行抗癌药物敏感试验，为临床提供敏感的抗癌药物，同时结合肿瘤细胞mdr1基因表达产物P-糖蛋白(P-gp)的检测，判定肿瘤病人多药耐药程度，为在后程化疗中抗癌药物选择提供科学依据，但这种检测途径仅限于手术的肿瘤病例，对于非手术肿瘤病人及术

作者介绍：金先庆（1945- ），男，教授，博士生导师，主要研究方向：肿瘤的基因治疗。
基金项目：国家自然科学基金（30070781）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

后长期化疗病人，是否对化疗药物耐受及耐受程度无法得知，使这类病人的化疗带有明显的盲目性，因此在化疗全过程中，明确地了解肿瘤病人对化疗药物是否耐受及耐受程度是一个亟待解决的课题。

国外学者曾检测正常人外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cell，PBMC）P-gp的表达得到肯定结论[1]，对于肿瘤病人而言，PBMC与肿瘤细胞一样在肿瘤细胞化疗过程中接触天然的细胞毒性物质而诱导产生P-gp，增强自身防御系统，抵抗毒性物质的损害作用。因此可利用PBMC对化疗药物的反应，判断肿瘤细胞的耐药情况。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验组：标本取自重庆医科大学临床学院1997年1月至1998年1月恶性肿瘤患者51例，其中消化道肿瘤41例，包括食管癌、胃癌、结肠癌、直肠癌，此外肺癌7例、淋巴肉瘤1例、骨肉瘤2例。51例肿瘤患者均于术前抽取静脉血1ml，肝素抗凝。23例PBMC细胞免疫组化（Immunohistoche-mistry，IC）测定P-gp，28例行流式细胞术（Flow cytometry, FCM）检测P-gp。28例肿瘤病人17例术后化疗6个月内静脉采血行PBMC P-gp测定，化疗采用VMF或VDF方案。51例肿瘤组织均采用IC法检测P-gp，患者年龄为31岁～60岁，男39例，女12例，男:女为3.1:1。对照组：正常人23例，10例做IC检测PBMC P-gp，13例行FCM检测PBMC P-gp。

1.2 实验方法

1.2.1 LSAB法检测PBMC、肿瘤细胞P-gp

结果判定：JSB1阳性者胞浆内棕红色，UIC2阳性者胞膜染成棕红色。每张涂片计数200个细胞，胞膜，胞浆内无反应者为“-”按百分数计数，＜1%为阴性。

1.2.2 FCM检测PBMC、CD_4^+、CD_8^+ P-gp

结果判定：应用FACSCalibur型检测仪，收集2万个细胞，测定后在 Macintosh 650型计算机上用 Cell quest 软件（BD Co USA）分析数据。PBMC P-gp的表达用直方图表示，横坐标表示荧光强度，纵坐标表示细胞数。CD_4^+、CD_8^+ P-gp用散点图表示。横坐标表示CD_4^+或CD_8^+荧光强度，纵坐标表示P-gp的荧光强度。

(1) PBMC P-gp阳性率 = P-gp阳性细胞数/总细胞数% - 非特异性染色细胞数%

(2) CD_4^+ P-gp阳性率 = CD_4^+ P-gp阳性数/总细胞数% - 非特异性染色细胞数%

(3) CD_8^+ P-gp阳性率 = CD_8^+ P-gp阳性数/总细胞数% - 非特异性染色细胞数%

1.3 统计学分析

数据分析，采用SAS统计学软件进行分析，两均数比较用 t 检验，多组均数比较用单因素方差分析，等级资料比较用秩和检验，率的比较用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 PBMC细胞化学检测P-gp

所有肿瘤病例的PBMC均表达一定数量的P-gp，JSB1为针对胞内段P-gp的特异性抗体，特异性染色以胞内为主，UIC2为胞膜段P-gp的特异性抗体，阳性染色主要位于细胞膜。

表1 正常人及肿瘤患者PBMC IC法P-gp的表达(%)

组 别	n	P-gp阳性细胞	t	P
正常人	10	2.98 ± 0.80		
消化道肿瘤病人	23	6.71 ± 1.10	1.78	<0.05

肿瘤患者PBMC P-gp表达（IC）法：见表1。

2.2 PBMC、CD_4^+、CD_8^+ P-gp在化疗前后的动态变化：见表2。

2.3 IC法检测肿瘤组织P-gp

JSB1及UIC2单克隆抗体标记的P-gp抗原阳性者，表现为胞浆或胞膜棕红色着色区。其中腺癌P-gp一般位于腺腔面细胞顶端，而食管癌呈岛状或巢状阳性细胞团。肺癌细胞P-gp表达相对较低。

表2 正常人及肿瘤病人PBMC、CD_4^+、CD_8^+ FCM P-gp表达（%）

组 别	n	PBMC P-gp	CD_4^+P-gp	CD_8^+P-gp
正常人①	13	5.96 ± 1.42	0.67 ± 0.29	0.36 ± 0.14
化疗前②	28	9.17 ± 1.20	0.92 ± 0.38	1.09 ± 0.38
化疗后③	17	12.30 ± 4.13	1.16 ± 0.28	0.75 ± 0.44

注：①与②P <0.05，②与③P <0.05

2.4 PBMC、CD_4^+、CD_8^+ P-gp的表达与肿瘤MDR相关性（表3）

上表经行×列表 χ^2 检验，χ^2=0.33，P>0.05，说明PBMC P-gp、CD_4^+ P-gp、CD_8^+ P-gp与肿瘤组织P-gp阳性率无显著性差异，PBMC、CD_4^+、CD_8^+ P-gp与肿瘤组织P-gp阳性符合率分别为57.1%、60.7%、60.7%。秩相关分析，r=0.419，P <0.01。说明肿瘤患者PBMC、CD_4^+、CD_8^+ P-gp与肿瘤组织P-gp的表达有相关性。

2.5 IC法与FCM法检测

PBMC P-gp蛋白结果比较（表4）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 PBMC、CD_4^+、CD_8^+及肿瘤组织P-gp的表达

组 别	n	阳性数	阴性数	阳性率%
PBMC P-gp	28	21	7	75.28
CD_4^+ P-gp	28	23	5	82.14
CD_8^+ P-gp	28	16	12	57.34
肿瘤组织P-gp	28	20	8	71.40

表4 IC法与FCM法检测PBMC P-gp表达情况

组别	n	IC	FCM	t	P
正常人	23	2.98 ± 0.80(10)	5.96 ± 1.42(13)	2.23	<0.05
肿瘤患者	51	6.71 ± 1.10(23)	9.17 ± 1.20(28)	1.69	<0.05

3 讨 论

3.1 P-gp在肿瘤组织及正常组织的表达及意义

在诸多MDR的机理中，P-gp介导的MDR是主要原因。这一观点已为众多学者所共识[2]，作者的研究表明，41例消化道肿瘤P-gp的阳性率为71.40%，多数标本P-gp的表达为++～+++，表明消化道肿瘤原发性耐药的存在，也与临床消化道肿瘤的耐药现象符合。为了深入了解P-gp的实质以及与肿瘤组织的关系，更好地了解P-gp在多药耐药中的作用，许多作者对P-gp在正常组织的表达及功能进行了研究。Fojo等[3]首次报道P-gp大量存在于正常组织，如肾上腺、肾脏、肺、小肠、肝脏、结肠和直肠，P-gp作为一种转运蛋白，所在的组织和细胞不同，其生理功能也大不相同，其中包括排毒维持一个正常的生存内环境，维持正常的激素水平及正常的血脑屏障，血组织屏障，血胎盘屏障，血睾屏障。作者的研究中也发现类似情况，正常的结肠、肝脏及血管内皮细胞均表达高水平的P-gp（资料未显示）。

尽管P-gp在正常实体组织容易检测到，但在造血系统的报道较少。血液系统作为维持体内外环境平衡的重要器官，同其他组织一样，表达P-gp，并具有P-gp的防御、排毒功能，防止外来毒性物质对机体的侵袭。Drach等[4]研究发现所有的细胞亚群均表达P-gp，但单核细胞及粒细胞表达较少，walter[1]研究表明P-gp表达水平为 $CD_4 > CD_8 \approx CD_{15} > CD_{19} > CD_{14}$，粒细胞虽表达mdr1 mRNA，但P-gp的表达及功能缺乏。研究表明，无论是肿瘤病人或正常人PBMC、CD_4^+、CD_8^+均表达一定数量的P-gp，进一步证实了以上作者的研究成果。

3.2 PBMC、CD_4^+、CD_8^+接触细胞毒性药物后P-gp的动态变化

多药抗性肿瘤细胞的明显生化特征就是过度表达P-gp，这是肿瘤细胞自身保护的重要机制。P-gp也可出现在PBMC、NK细胞、CD_4^+、CD_8^+及其他类型的淋巴细胞膜上，同肿瘤细胞一样，在药物的长期作用下，可诱导P-gp的表达增加。在化疗情况下，研究PBMC MDR与肿瘤MDR表达之间的关系，具有重要的临床价值，通过PBMC MDR的变化，间接反应肿瘤MDR的变化。实验结果显示，无论是用IC法或FCM法检测MDR，肿瘤病人外周血PBMC P-gp均高于正常对照，化疗后肿瘤病人外周血PBMC P-gp表达（12.30 ± 4.13）明显高于化疗前（9.17 ± 1.20）（P<0.05），说明肿瘤对人体的侵袭可能引起外周血细胞的反应。PBMC同肿瘤细胞一样，可诱导产生P-gp。P-gp作为人类防御机制中重要的标志物表达于正常组织，对机体产生保护作用，若被肿瘤组织遗传，则产生对化疗药物的耐药而引起化疗障碍。

为了解这种人类遗传机制的内在关系，研究了CD_4^+、CD_8^+细胞在病人经受化疗前、后P-gp的变化，发现化疗后CD_4^+ P-gp增加（0.92 ± 0.38，1.16 ± 0.28），CD_8^+ P-gp降低（1.09 ± 0.38，0.75 ± 0.44）。CD_4^+ P-gp的增加具有较好的临床意义，而CD_8^+ P-gp降低临床指导意义不大。

3.3 肿瘤病人PBMC、CD_4^+、CD_8^+与肿瘤组织MDR的关系

尽管MDR有多种作用机理，检测方法逐渐用于临床，但MDR的检测和诊断只能用于肿瘤细胞体外检测，取原发灶，转移灶获取信息作出判断[5]。一些晚期肿瘤或不能手术的肿瘤病人或一些术后长期化疗的病人，由于不能得到肿瘤标本进行MDR的诊断，使这类病人的化疗带有明显的盲目性，导致肿瘤复发，病人死亡，因此动态观察肿瘤患者MDR的变化情况成为肿瘤化疗的重大课题。

研究结果表明，瘤组织71.40%有mdr1基因产物P-gp的表达，PBMC无论是FCM或IC法检测P-gp，均有不同程度的表达，PBMC、CD_4^+、CD_8^+阳性率分别为75.28%、82.14%、57.34%，与肿瘤组织阳性率71.40%相比，无明显差异（P >0.05），其阳性符合率分别为57.1%、60.7%、60.7%，说明PBMC、CD_4^+、CD_8^+ P-gp与肿瘤组织P-gp有明显相关性（r =

（下转第382页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

目前尚无定论。大多数学者认为致痫后，GABA能神经元存活下来，而SS能神经元和苔状细胞则发生了不可逆损伤,导致神经元脱失。由于正常状态下苔状细胞轴突支配齿状回分子层内侧，与分布于该层的颗粒细胞树突建立突触联系。致痫后苔状细胞丢失，齿状回分子层发生去神经支配，该区突触密度也随之减少，原来支配CA3区的齿状回颗粒细胞的轴突—MFs便开始分支、出芽，并穿过颗粒细胞层，分布于分子层内1/3，与颗粒细胞树突棘形成大量异位非对称突触，该区突触密度又得以恢复[7,8]。可见齿门神经元的脱失直接导致齿状回分子层去神经支配，而实验发现点燃后3天至14天期间，齿状回分子层内MAP2-IR的面积百分比与齿门神经元的数目/面积百分比间存在着指数曲线相关关系，这一关系提示齿门神经元的脱失伴随着MAP-2的增加。本实验发现齿状回分子层内MAP2-IR的增加与该层再神经支配密切相关，结合MAP-2对细胞骨架成分的轴突转运作用，我们认为，MAP-2的过度表达导致微管聚合物的过度产生，在癫痫大鼠苔纤维出芽和突触重建过程中发挥了重要作用，而大量受损伤的齿门神经元对抑制性细胞广泛的去神经支配可能启动了MAP-2的过度表达，因此我们认为癫痫状态维持的可能机制为：齿门神经元的脱失引起齿状回分子层发生去神经支配，成为该层分子层内MAP2增加的始动因素，MAP2增加所致的颗粒细胞轴突出芽并与树突建立突触联系使得颗粒细胞树突再神经支配，从而使颗粒细胞产生回馈性兴奋，导致癫痫状态的维持。

参 考 文 献

[1] Nunez J. Immature and mature variants of MAP2 and tau proteins and neuronal plasticity[J]. Trends Neurosci,1988; 11:477-479.

[2] Folkerts MM, Berman RF, Muizelaar JP,et al. Disruption of MAP-2 immunostaining in rat hippocampus after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma. 1998;15:349-363.

[3] Wenzel HJ, Wolley CS, Robbins CA, et al. Kainic acid-induced mossy fibers sprouting and synapse formation in the dentate gyrus of rats[J]. Hippocampus, 2000;10:244-260.

[4] Lynch M, Sutula T. Recurrent excitatory connectivity in the dentate gyrus of kindled and kainic acid-treated rats[J]. J Neurophysiol, 2000;83:693-704.

[5] Wuarin JP, Dudek FE. Excitatoty synaptic input to granule cells increases with time after kainate treatment[J]. J Neurophyiol, 2001;85:1067-1077.

[6] De Lanerolle. N C., J.H.Kim, et al. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human teporal lobe epilepsy[J]. Brain Res, 1989;495:387-395.

[7] Sloviter R.S. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats[J]. Neurosci Lett, 1992;17:91-96.

[8] Represa A., Jorquera I. Epilepsy induced collateral sprouting of hippocampal mossy fibers: does it induce the development of ectopic synapses with granule cell dendrites [J]. Hippocampus, 1993;3:257-268.

(上接第378页)

0.419, $P<0.01$）。PBMC、CD_4^+、CD_8^+与肿瘤细胞一样，在化疗过程中同样接受细胞毒性药物的损伤而产生“自净”，同时血液作为人体的保护屏障具有排毒、解毒功能，用血细胞的变化来反映组织的变化，使MDR的检测趋于简单。

3.4 IC法与FCM法检测PBMC P-gp 的比较

无论是肿瘤病人或正常人，用IC检测PBMC P-gp表达率较FCM低（$P<0.05$），说明IC法较FCM法敏感性差，检出率低。

参 考 文 献

[1] Walter T, Klimecki, Bernard W.P Glycorprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers [J]. blood,1994;83(9):2451-2458.

[2] Peteni M, Galimberti S. Treatment of multidrug resistance in oncology and hematology[J]. Tumori,1997;83 (s5): 17-21.

[3] Fojo AT, Ueda K, Slamor DJ, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissue[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:265-272.

[4] Doris Drach, Shourong zhao, Johannes Drach, et al. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cell express a function multidrug resistance phenotype[J]. Blood , 1992;80(11):2729-2735.

[5] Dhoge CR, Moerloose BM, Benoit YC, et al. Expression of the MDR gene product p-glycoprotein in childhood neuroblastoma[J]. Cancer , 1997;80(7):1250-1257.