维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)01-0034-03

肾母细胞瘤术前化疗前后P-糖蛋白表达的变化及临床意义

魏光辉，金先庆，李旭良，林　涛，何大维

（重庆医科大学儿科学院外科　重庆　400014）

【摘　要】目的：探讨肾母细胞瘤术前化疗耐药性的生物学特性及与疗效相关性。方法：对18例未术前化疗和经不同疗程术前化疗病理档案，以JSD-单克隆抗体对肾母细胞瘤组织多药耐药蛋白(P-glycoprotein, P-gp)进行免疫组织化学，检测P-gp在术前化疗不同疗程的表达、确定其耐药性；同时对15例资料记录完整、术前化疗>5周的小儿肾母细胞瘤，通过B超随访测量术前化疗不同疗程肿瘤大小，了解其疗效及与耐药性的相关性。结果：术前化疗后的肿瘤细胞P-gp表达比未经术前化疗的肿瘤细胞强，而术前化疗疗程越长，肿瘤细胞P-gp表达越强，疗效降低。结论：术前化疗4周后疗效降低与瘤组织对化疗药物耐药性明显增强有关，免疫组织化学检测P-gp可为制定或更改肾母细胞瘤术前化疗方案及术后化疗方案提供有用的依据。

【关键词】肾母细胞瘤；术前化疗；多药耐药蛋白

【中国图书分类法分类号】R979.62　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000-06-19

Clinical significance and immunohistochemical assays of P-glycoprotein of preoperative chemotherapy for Wilms' tumor

WEI Guang-hui, et al

（Department of Surgery, College of Padiatrics, Chongqing Medical University, 400014）

【Abstract】 *Objective*: To explore the decrease of the efficacy of preoperative chemotherapy decreases with the period of chemotherapy due to multidrug resistance. *Methods:* We analyzed 18 cases with or without preoperative chemotherapy. Monoclonal antibody was used to detect the expression of P-glycoprotein (P-gp) in Wilms' tumor. Fifteen Wilms' tumor cases with complete clinical records and more than five weeks preoperative chemotherapy were followed up by ultrosonography to identify the relationship between the volume of tumor and the period of chemotherapy and multidrug resistance. *Results:* It was suggested that the expression of multidrug resistance increases after preoperative chemotherapy. The longer the preoperative chemotherapy, the stronger the expression of multidrug resistance. *Conclusion:* We have found that decrease of efficacy of chemotherapy after four weeks preoperative chemotherapy is due to the increase of multidrug resistance. We recommend that determination of P-gp using immunohistochemical assay can be served as a basis to formulate preoperative and/or postoperative chemotherapy treatment program.

【Key words】 Wilms' tumor; Preoperative chemotherapy; P-glycoprotein

肾母细胞瘤是小儿最常见的恶性实体瘤之一，占肾肿瘤的97%[1,2]。肾母细胞瘤国际诊疗机构SIOP (The Societe Internationale d'Oncologic Pediatrique)推荐使用的术前化疗方案，已成为晚期肾母细胞瘤治疗的重要手段[3,4]。然而，术前化疗至一定疗程后，肿瘤细胞对化疗药物将产生多药耐药性（Multidrug resistance, MDR），影响术前化疗疗效。本文通过检测肾母细胞瘤不同疗程术前化疗前后的多药耐药蛋白（P-glycoprotein, P-gp）表达，结合疗效，以探讨其变化与临床意义。

基金项目：重庆市科学技术委员会资助（98-28）

作者介绍：魏光辉（1963- ），男，副教授，博士

1　材料与方法

1.1　P-gp免疫组织化学检测

1.1.1　标本来源及处理

选择1997年8月至1999年12月，重庆医科大学儿童医院18例小儿肾母细胞瘤病理档案，其中，未术前化疗6例；术前化疗≤3周5例；术前化疗4～5周7例。术前化疗方案为长春新碱（Vincristine, VCR）0.05mg/kg/次、每周1次，更生霉素（Actinomycin D, AMD）15μg/kg.d 连用5天[1,5]。手术切除的肿瘤标本经10%福尔马林固定后，常规石蜡包埋，采用4～5μm连续切片，行免疫组织化学检测。

1.1.2　SP（labled Streptavidin-biotin method）免疫组织化学法[6]

维普资讯 http://www.cqvip.com

采用JSB-1单克隆抗体检测肾母细胞瘤细胞术前化疗前后P-gp表达。将石蜡切片脱蜡和水化后，用PBS（pH= 7.4）漂洗三次，每张切片加1滴（或50 μl） 过氧化酶阻断溶液阻断内源性过氧化物酶的活性，室温下孵育5min，再用PBS漂洗5min，共3次；每张切片加1滴（或50 μl）10%非免疫动物血清，室温下孵育5min，PBS冲洗一次；又在每张切片加1滴（或50 μl）单克隆抗体JSB-1（福州迈新生物技术开发公司产品），室温下孵育60min或4℃过夜；次日用PBS漂洗5min，共3次；每张切片加1滴（或50 μl） 生物素标记的第二抗体（福州迈新生物技术开发公司产品），室温下孵育10min，PBS漂洗（同前）；每张切片加1滴（或50 μl） 链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶溶液（福州迈新生物技术开发公司产品），室温下孵育10min，PBS漂洗（同前）；每张切片加2滴（或100 μl）新鲜配制的二氨基联苯二胺盐酸盐（DAB溶液）显色，显微镜下观察5～10min，自来水冲洗后，苏木素复染1min，再自来水冲洗，彻底干燥后，中性树胶封固。

阳性对照片为按上述方法检测的肾癌组织标本（福州迈新生物技术开发公司提供）。设正常鼠血清（1:80）和PBS分别代替P-gp单克隆抗体作替代对照和空白对照，其实验步骤与被测标本相同。结果判定：光镜下阳性对照片上观察到细胞膜或胞浆内出现棕红色颗粒，故以细胞膜或胞浆内出现棕红色颗粒为P-gp表达阳性。高倍镜下随机选择视野，计数200个细胞，按阳性细胞占全部观察细胞的百分比计算，进行分级定量分析判定：“-”： P-gp阳性细胞数<1%；“+”： P-gp阳性细胞数1%～30%；“++”： P-gp阳性细胞数>30%。

1.2 术前化疗肾母细胞瘤疗效的观察

1.2.1 病例资料

选择1994年5月至2000年4月，重庆医科大学儿童医院收治且资料记录完整的小儿肾母细胞瘤15例，其中，男：9例，女：6例；发病年龄：7月～7岁（平均年龄：2.5岁）；均为单侧肾母细胞瘤，左侧：9例；右侧：6例；病理学分期：Ⅰ期，3例；Ⅱ期，5例；Ⅲ期，5例；Ⅳ期，2例（根据NWTS-3临床病理分期原则）[3]。均按前述化疗方案接受术前化疗5周以上。

1.2.2 不同疗程术前化疗前后肿瘤体积的变化情况

采用彩色超声诊断仪分别测量术前化疗前、术前化疗1周、2周、3周、4周、5周后，肾母细胞瘤瘤体的最长前后径、纵径、横径，根据Macomber计算公式 $V=1/4\ \pi D^2.LK$[7]分别求得肿瘤体积，比较肾母细胞瘤术前化疗前后体积的变化情况。

1.3 统计学分析

不同疗程术前化疗后肿瘤细胞P-gp表达程度的比较，采用精确概率法（Fishers Exact Test）。不同疗程术前化疗前后肿瘤体积的变化量之间的比较采用配对资料方差分析。统计学分析采用SAS 6.12统计软件处理。

2 结 果

2.1 不同疗程术前化疗后肾母细胞瘤细胞P-gp的表达情况

术前化疗后比未经术前化疗的肿瘤细胞P-gp表达程度显著增强（$P<0.05$），术前化疗>3周与术前化疗<3周的P-gp表达程度比较，统计学处理无显著性差异，但有明显的增强趋势。提示术前化疗时间越长，肿瘤细胞P-gp表达越强（见表1）。

表1 不同疗程术前化疗后肾母细胞瘤细胞P-gp表达情况

组别	n	-	+	++
对照组	6	3	3	0
疗程≤3周	5	0	4	1
疗程>3周	7	0	2	5

2.2 不同疗程术前化疗后P-gp的表达与疗效的相关性

15例肾母细胞瘤经术前化疗后均有肿瘤体积的缩小，通过多组间两两比较统计学分析，以2周、3周术前化疗后，其肿瘤体积缩小值最显著（$P<0.05$）；而4周术前化疗后，其体积缩小值减缓，且部分病例有逐渐增大趋势，而术中并未发现瘤体内明显出血所致增大的征象（见图1）。

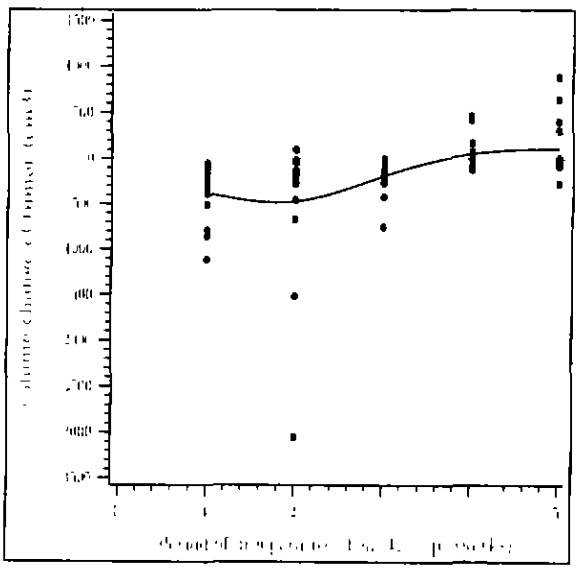


图 不同术前化疗疗程后的肿瘤体积变化程度

3 讨 论

据美国癌症协会报告，该国每年死亡的49万例癌症患者中，90%以上病例受到不同程度耐药的影响[8]。而与MDR有关的常见药物正是肾母细胞瘤术

维普资讯 http://www.cqvip.com

前化疗常用的长春新碱、更生霉素和阿霉素等。MDR可由多种原因引起，如谷胱甘肽及相关酶的改变，DNA损伤修复能力增强，多药耐药相关蛋白（Multidrug resistance associtated protein，MRP）表达增多，蛋白激酶C的变化等，但很多研究均证实：多药耐药基因（Multidrug resistance gene 1，*mdr1*）及其产物P-gp的过度表达是其主要原因之一[9]。分子生物学研究证实：肿瘤细胞长期接触抗肿瘤药物，*mdr1*基因的拷贝数可诱导扩增几十倍甚至上百倍，且肿瘤细胞最终的MDR表型是通过P-gp的作用而实现的。P-gp属于ATP能量依赖性外输泵，主要分布在细胞膜上，即P-gp作为药泵能将抗肿瘤药物泵出细胞，使细胞内药物的浓度降低，从而使细胞产生耐药性[9,10]。通过P-gp的测定，能够提供有用的临床信息，提示肿瘤细胞对化疗产生耐药性，是筛选对化疗敏感药物的良好方法。本研究结果显示术前化疗后的肿瘤细胞P-gp表达强于未经术前化疗的肿瘤细胞，而且具有术前化疗时间越长，肿瘤细胞P-gp表达越强的趋势，以术前化疗疗程＞3周组的P-gp表达呈强阳性例数最多。提示肾母细胞瘤术前化疗3周后，其疗效因产生了较强耐药性而降低。

本研究在临床观察、B超及CT随访确定术前化疗临床疗效的基础上，通过对同一病人不同疗程术前化疗前后肿瘤大小的定量检查，研究肿瘤变化程度与疗程及P-gp表达变化的相关性。结果显示经4周术前化疗后，所有15例患儿的肿瘤均明显缩小，但以2~3周术前化疗后，肿瘤体积的缩小值最明显；而术前化疗4周后，肿瘤体积缩小趋势减缓。进一步随访发现，4/15例在4周术前化疗后，肿瘤体积有逐渐增大的趋势，但瘤体内并无明显出血倾向，且有2/15例在连续5周术前化疗后，肿瘤体积甚至大于化疗前。为此，我们认为肾母细胞瘤术前化疗疗效以2～3周疗程后最显著。根据不同疗程P-gp表达的检测，肿瘤体积缩小减缓或有逐渐增大的结果与不同疗程P-gp表达变化情况相一致。

尽管术前化疗对肾母细胞瘤敏感而有效，能使肿瘤明显缩小，包膜增厚，降低肿瘤临床分期，抑制远处转移灶，但不易彻底消灭肿瘤细胞[3,5]，其临床应用的意义不同于术后化疗。本研究提示肾母细胞瘤术前化疗疗程以3～4周为适宜；对早期、可轻易切除肿瘤的病例，不必术前化疗；如病人经过3～4周术前化疗后，一般情况无明显改善，瘤体无缩小，则应立即停止术前化疗，尽快手术。同时，为了提高术后化疗的疗效，最好根据术后切除肿瘤标本肿瘤细胞P-gp表达测定及化疗药物敏感试验结果，选择术后化疗药物，更换已经产生耐药的术前化疗药物，或采用多化疗方案交替使用的方法。

参 考 文 献

[1] Dale PS. Webb HW. Wilkinson AH Jr. Resection of the inferior vena cava for recurrent Wilms tumor.[J]. J Pediatr Surg, 1995;30:121-122.

[2] 孙 宁，黄澄如，白继武，等. 影响肾母细胞瘤预后的因素[J]. 中华小儿外科杂志，1995;16(3):158-160

[3] Godzinski J, Tournade MF, Kraker JD, et al.The role of preoperative chemotherapy in the treatment of nephroblastoma: the SIOP experience[J]. Semin Urol Oncol. 1999;17(1):28-32.

[4] Michael L, Ritchey MD. The role of preoperative chemotherapy for Wilms tumor: the NWTSG perspective[J]. Semin Urol Oncol. 1999;17(1):21-27.

[5] Michael G. Levien MD. Kam A. et al. Postopertive chemotherapy in the National Wilms Tumor Studies[J]. Semin Urol Oncol. 1999;17(1):40-45.

[6] 任占平. 应用免疫组化染色的体会[J]. 诊断病理学杂志，1994;1(3):176.

[7] 黄永孝. 超声医学影像诊断学[M]. 成都：四川科技出版社，1996;492-493.

[8] By ML, Capra DA.Walker WM, et al. Wilmstumor: a 25-year review of the role of preoperative chemotherapy[J]. J Pediatr Surg, 1999;34(4):579-582.

[9] 扬纯正. 肿瘤耐药研究进展及逆转对策[J]. 中华血液杂志，1997;18(1):59-60.

[10] 蒙育林，张国成，许东亮，等. 小儿肾母细胞瘤、髓母细胞瘤多药耐药蛋白的表达及意义[J]. 第四军医大学学报，1999;20(4):344-347.