

· 论 著 ·

ABCG2 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义*

周 韬, 方针强, 周 锋, 叶 钢[△]

(第三军医大学新桥医院泌尿外科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨干细胞标志物 ABCG2 在膀胱移行细胞癌中的表达及意义。方法 对 40 例膀胱移行细胞癌组织(其中 I 级 12 例, II 级 18 例, III 级 10 例)和 15 例正常膀胱组织采用免疫组织化学法检测, 对人膀胱癌细胞株 BIU-87 采用免疫荧光法检测 ABCG2 蛋白的表达, 显微镜观察并对相关图片进行光密度分析。结果 ABCG2 阳性表达定位于癌细胞的胞浆和胞膜, 在膀胱移行细胞癌组织和人膀胱癌细胞株 BIU-87 中均检测到 ABCG2 蛋白的表达, 而在 15 例正常膀胱组织中表达全为阴性, 光密度分析提示其表达强度与肿瘤病理分级呈正相关($P < 0.05$)。结论 膀胱移行细胞癌中干细胞标志物 ABCG2 的表达提示, 肿瘤的恶性程度与膀胱移行细胞癌的发生、发展可能存在关联。

关键词: ABCG2; 膀胱移行细胞癌; 免疫组织化学法; 免疫荧光法

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)23-2954-03

Expression and significance of ABCG2 in transitional cell carcinoma of bladder*

ZHOU Tao, FANG Zhen-qiang, ZHOU Feng, et al.

(Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of ABCG2 expression in transitional cell carcinoma of bladder. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect expression of ABCG2 in 40 cases of transitional cell carcinoma of bladder with different pathology grades(12 cases were Grade I, 18 cases were Grade II, 10 cases were Grade III) and 15 normal bladder tissues, while immunofluorescence was used to detect expression of ABCG2 in BIU-87 cell line. Photos were analysed by Imagepro-Plus to mensurate optical density. **Results** ABCG2 was expressed in almost all cases of transitional cell carcinoma of bladder and BIU-87 cell line, while no significant expression in normal bladder tissues. Optical density analysis showed that expression intensity of ABCG2 positive correlated with tumor pathology grade($P < 0.05$). **Conclusion** Expression of ABCG2 in transitional cell carcinoma of bladder may reveal the malignant grade of tumor, which may also relate with the biological behavior of tumor.

Key words: ABCG2; transitional cell carcinoma of bladder; immunohistochemistry; immunofluorescence

膀胱移行细胞癌是泌尿系统最常见的肿瘤之一, 近年有发生率增加和年轻化趋势。目前, 对膀胱癌仍然采用手术为主、化疗为辅的治疗方案, 但其复发率高、易耐药、易转移的特点给治疗带来很大的困难。随着干细胞研究的逐渐深入, 肿瘤干细胞学说日益被接受和重视, 研究发现, 在肿瘤细胞中存在极少量的侧群(side population, SP)细胞, SP 细胞具备干细胞的多种特性且易于分离, 并高表达 ATP 结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运家族中的耐药蛋白 ABCG2(ATP-binding cassette superfamily G member 2)/BCRP1(breast cancer resistance protein 1), 可能是肿瘤发生、产生耐药和复发的原因^[1], SP 表型也逐渐成为分离肿瘤干细胞的候选标志^[2], 为肿瘤的研究提供了新途径。本研究通过免疫组织化学、免疫荧光等方法检测 ABCG2 蛋白在膀胱移行细胞癌组织及细胞中的表达, 探讨其与膀胱癌发生、发展的关系。

1 资料与方法

1.1 标本与临床资料 收集 2007 年 1 月至 2008 年 12 月第三军医大学新桥医院行开放性手术切除的膀胱移行细胞癌标本及患者完整病历资料共 40 例。其中男 30 例, 女 10 例, 年龄 40~75 岁。按 WHO 病理分级, I 级 12 例, II 级 18 例, III 级 10 例。另取 15 例新鲜尸体正常膀胱组织作比较研究。所有标本均经病理学证实。

1.2 细胞株来源和培养基 研究使用的 BIU-87 细胞株均为膀胱移行细胞癌细胞株, 由第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所保存。培养基为 RPMI-1640, 配制时添加 NaH-

CO₃ 2.4g/L, 青霉素 100u/mL, 链霉素 100u/mL, 10% 胎牛血清(HyClone 公司)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 免疫组织化学采用 SP 法, 切片厚度 4 μ m。一抗为小鼠抗人 BCRP/ABCG2 单克隆抗体 BXP-21(ab3380, Abcam 公司), 稀释度 1:100; 二抗为生物素标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。抗原修复采用枸橼酸盐热修复(15min), 染色步骤按照试剂盒说明书进行, 用胎盘组织作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.3.2 免疫组织化学染色结果判定 以细胞胞浆内和胞膜上出现明确可见的棕黄色或棕褐色为阳性。阳性标本在肿瘤组织较集中的区域随机选取 5 个高倍视野($\times 400$), 用 Imagepro-Plus 6.0 软件对图像行平均光密度(density mean)测定, 平均光密度值越大, 表达强度越高; 反之, 表达强度越低。

1.3.3 细胞培养及细胞爬片 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养剂, 常规方法 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养人膀胱癌细胞株 BIU-87, 待细胞长满培养瓶底后, 接种到 16 孔细胞培养板并于孔内放置 8mm \times 8mm 盖玻片, 继续孵育并观察, 以备荧光染色。

1.3.4 BIU-87 细胞株免疫荧光染色及观察 采用间接免疫荧光法检测。一抗为小鼠抗人 BCRP/ABCG2 单克隆抗体 BXP-21(ab3380, Abcam 公司), 稀释度 1:100。二抗为 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。用 PBS 代替一抗作为空白对照。荧光染色用 DAPI 复染胞核并

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(2006BB5090)。 [△] 通讯作者, 电话: (023)68774624; E-mail: gangye@163.com。

封片,于 1h 内在荧光显微镜下观察,以细胞胞浆内和胞膜上出现明显的绿色荧光为阳性。

1.4 统计学方法 所有数据采用统计软件 SPSS 11.0 分析,阳性率采用 χ^2 检验,数据均值比较采用独立样本 t 检验,定量分析结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ABCG2 蛋白在膀胱移行细胞癌组织和正常膀胱组织中的表达 ABCG2 阳性表达定位于胞浆和胞膜,棕黄色或棕褐色。在 40 例膀胱移行细胞癌组织中,36 例均表达且表达较丰富(图 1~3);15 例正常膀胱组织中均未见阳性表达(图 4)。ABCG2 蛋白在肿瘤组织与正常组织中的表达差异明显。图 5 为阳性对照图片。

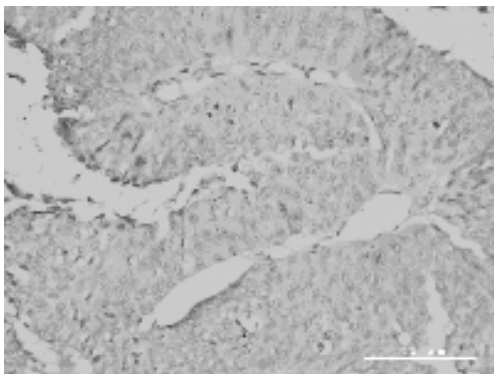


图 1 ABCG2 在膀胱移行细胞癌组织(Ⅰ级)中阳性表达(SP,×400)

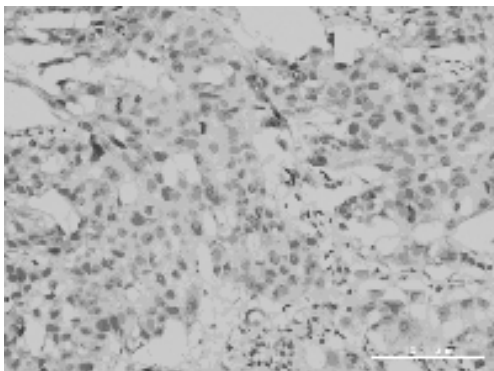


图 2 ABCG2 在膀胱移行细胞癌组织(Ⅱ级)中阳性表达(SP,×400)

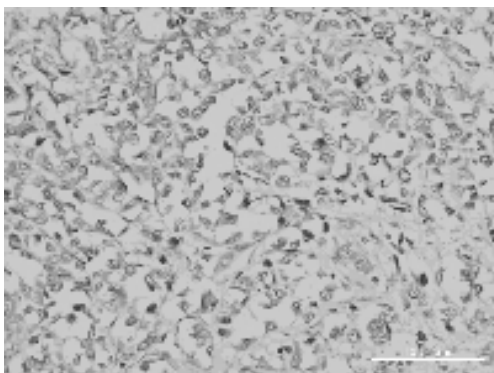


图 3 ABCG2 在膀胱移行细胞癌组织(Ⅲ级)中阳性表达(SP,×400)

2.2 ABCG2 蛋白在人膀胱移行细胞癌细胞株 BIU-87 中的表达 ABCG2 在癌细胞株中阳性表达呈现明显的绿色荧光。通过对癌细胞株的免疫荧光染色,进一步验证 ABCG2 在膀胱肿瘤细胞中阳性表达,并且可以更清楚地观察到其表达位于胞浆

和胞膜(图 6)。

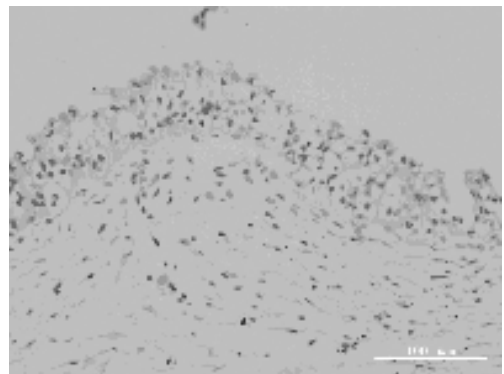


图 4 ABCG2 在正常膀胱组织中阴性表达(SP,×400)

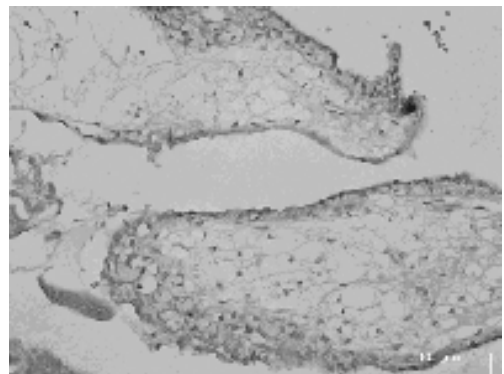


图 5 ABCG2 在胎盘组织中阳性表达(SP,×400)

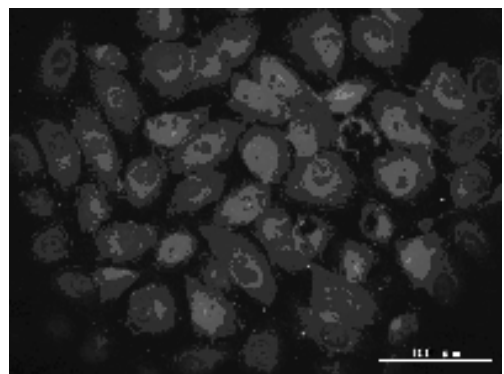


图 6 ABCG2 蛋白在人膀胱癌细胞株 BIU-87 中阳性表达(免疫荧光,×400)

表 1 不同病理分级中 ABCG2 蛋白的阳性率

病理分级	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	χ^2	P
Ⅰ级	10	2	83.3	—	—
Ⅱ级	16	2	88.9	1.728	>0.05
Ⅲ级	10	0	100	—	—

—:表示无数据。

2.3 ABCG2 蛋白表达与膀胱移行细胞癌病理分级的关系 ABCG2 在Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级膀胱移行细胞癌中表达阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1),但表达强度随病理分级升高而增强($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 不同病理分级中 ABCG2 蛋白的平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

病理分级	平均光密度值	t	P
Ⅰ级	0.228 7±0.004 2	10.333(Ⅰ、Ⅱ)	<0.05
Ⅱ级	0.249 2±0.005 8	11.876(Ⅱ、Ⅲ)	<0.05
Ⅲ级	0.290 2±0.011 7	15.541(Ⅰ、Ⅲ)	<0.05

3 讨 论

ABC 超家族是一种由多种转运体组成的、在机体内广泛表达的大家族,参与许多物质如离子、糖、氨基酸、多肽、蛋白质、磷脂、毒素和药物的转运。ABCG2 作为 ABC 转运体家族的成员之一,最早被定义为多药耐药转运蛋白,是从 MCF-7 乳腺癌耐药细胞株克隆出来的,因此又称作 BCRP1,与典型的 ABC 转运蛋白不同的是只含有一个 ATP 结合结构域和一个疏水性的跨膜结构域,因此称其为半转运蛋白。研究发现,ABCG2/BCRP1 是导致哺乳类细胞耐药的主要转运子之一,其底物包括多种抗肿瘤药,如盐酸米托蒽醌、甲氨蝶呤及喜树碱等,致使肿瘤细胞对这些药物不敏感^[3]。早期研究发现,用 Hoechst 33342 荧光染色对小鼠骨髓造血干细胞进行检测时,通过紫外激发检测双波长分别为 450nm 的蓝色荧光和 675nm 的红色荧光,发现不到 0.1% 的细胞发出极弱的蓝光和红光,这群细胞被称为“侧群”(side population, SP)细胞,进一步证实 ABCG2/BCRP1 与这种 SP 细胞表型密切相关。目前在乳腺癌 MCF27 细胞系、胶质瘤细胞系^[4]、肝癌细胞系 Huh7^[5]、间充质肿瘤细胞^[6]、前列腺肿瘤^[7]均发现并分离了表达 ABCG2 的 SP 细胞,这些小于 2% 的细胞表现出干细胞特性,具有肿瘤起始的潜能。

有关 ABCG2 在膀胱移行细胞癌中的研究尚少,其是否是膀胱癌细胞系或组织中存在肿瘤干细胞的一个标志? 本实验结果发现 ABCG2 蛋白在膀胱癌细胞系和组织中表达较丰富,按照干细胞理论及相关研究,不论用何方法,所标记出的细胞应该只是整体中的极少数,因此,其不适合作为膀胱移行细胞癌干细胞的标志物。但本研究发现 ABCG2 蛋白的表达强度随膀胱癌病理分级升高而增强,故可将 ABCG2 作为膀胱移行细胞癌病理分级的参考指标。牛海艳等^[8]对 ABCG2 在肺癌组织及肺癌细胞系中的定性、定量分析中也得到了类似的结果和结论。

ABCG2 在正常组织中高表达于胎盘合体滋养层细胞的顶浆面、小肠和结肠上皮细胞的肠腔面、肝细胞膜胆小管面、乳腺导管和小叶以及脑和前列腺组织等,它可以泵出细胞内毒物,保护组织免受损伤。也有研究发现其在正常膀胱移行上皮中呈弱阳性或阴性表达^[9],与本研究中正常膀胱组织的阴性结果稍有差异,考虑到实验设计的不完全相同,仍可以认为 ABCG2 蛋白在正常膀胱组织中难以检测,而在膀胱癌细胞中显著表达。关于这种差异的产生,可以假设为正常膀胱移行上皮细胞也存在 ABCG2 基因,但是处于关闭或者低表达状态以至于蛋白水平的检测阳性表达低,而当正常细胞突变为肿瘤细胞时该基因受某些因素影响活化,致使蛋白表达增加。Krishnamurthy 等^[10]发现低氧环境诱导 ABCG2 的高表达,并且不仅在体外培养的干细胞如此,在小静脉的正常低氧细胞环境下也是如此。这一现象主要通过 HIF- α 介导,正常情况下 HIF- α 结合于抑癌基因 VHL(von hippel-lindau, VHL)蛋白,通过蛋白酶降解途径灭活,但当环境缺氧时 HIF- α 是稳定的,并催化启动因子激活低氧效应元件 HRE(hypoxia response elements,

HRE)启动 ABCG2 的相应转录和翻译。因此可以推论,在肿瘤细胞生长的过程中,基因突变以及肿瘤细胞快速生长所造成的缺氧环境使 HIF- α 含量增加,进而上调 ABCG2 的表达。已有研究证实 HIF- α 在动物及人体许多肿瘤中(包括膀胱肿瘤)大量表达,对肿瘤的生长、血管形成、转移、凋亡及耐药皆有影响^[11],如果能进一步证实 ABCG2 与 HIF- α 的相关性,不仅能证明上述推论,也可为 ABCG2 与肿瘤耐药的研究提供依据。

参考文献:

- [1] Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(19): 3701.
- [2] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207.
- [3] Robey RW, Polgar O, Deeken J, et al. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 39.
- [4] Kondo T, Setoguchi T, Taga T, et al. Persistence of a small subpopulation of cancer stemlike cells in the C6 glioma cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(3): 781.
- [5] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell like properties[J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240.
- [6] Wu C, Wei Q, Utomo V, et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17): 8216.
- [7] Brown MD, Gilmore PE, Hart CA, et al. Characterization of benign and malignant prostate epithelial Hoechst 33342 side populations[J]. *Prostate*, 2007, 67(13): 1384.
- [8] 牛海艳, 申洪. ABCG2 作为肺癌干细胞标志的意义探讨[J]. *数理医药学杂志*, 2008, 21(2): 145.
- [9] Fetsch PA, Abati A, Litman T, et al. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues[J]. *Cancer Lett*, 2006, 235(1): 84.
- [10] Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, et al. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(23): 24218.
- [11] 宗建, 吴诚义. HIF- α 的生物学机制及在肿瘤研究中的进展[J]. *重庆医学*, 2004, 33(5): 780.

(收稿日期: 2009-07-29)

(上接第 2953 页)

- coli [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2008, 41(5): 380.
- [5] Nouri-Aria KT, Durham SR. Regulatory T. Cells and allergic disease [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008, 7(4): 237.
 - [6] 崔玉宝, 李朝品, 王健. 粉尘螨浸液免疫治疗螨性哮喘患者的免疫功能观察[J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2003, 16

(5): 305.

- [7] 桂芹, 孔祥英, 白家骊. 哮喘缓解期豚鼠经低压缺氧处理后 BALF 中一氧化氮及肺组织病理的变化[J]. *重庆医学*, 2004, 33(4): 497.

(收稿日期: 2009-07-13)