

· 论 著 ·

5 种经典耐药基因在儿童常见恶性肿瘤的表达及临床意义*

向 丽, 金先庆[△]

(重庆医科大学儿童医院普外科 400014)

摘要:目的 通过检测 P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白 1(MRP1)、肺耐药相关蛋白(LRP)、谷胱甘肽转移酶(GST- π)、DNA 拓扑异构酶 II (Topo- II) 5 种耐药基因表达蛋白在儿童常见恶性肿瘤组织中的表达, 探讨儿童恶性肿瘤耐药的机制, 为临床选择敏感的个体化化疗方案提供实验室证据。**方法** 选择 40 例儿童常见恶性肿瘤的病理切片标本, 采用免疫组化的方法检测 5 种耐药蛋白(P-gp、MRP1、LRP、GST- π 、Topo- II) 的表达, 分析常见儿童恶性肿瘤耐药蛋白的表达及差异, 分析儿童常见恶性肿瘤多药耐药的机制。**结果** (1) P-gp 在卵黄囊瘤所有结构中均呈高阳性率、高强度的表达, 说明 P-gp 过度表达是造成卵黄囊瘤耐药的主要机制。MRP1 所介导的药物耐药性可能为卵黄囊瘤耐药的补充机制。LRP、GST- π 在卵黄囊瘤多药耐药机制中可能起着协同作用。(2) 横纹肌肉瘤中 P-gp、GST- π 的表达较其他耐药蛋白高。(3) 神经母细胞瘤中 P-gp、MRP1、Topo- II 的表达较高。(4) 肾母细胞瘤中 LRP、Topo- II 的表达较其他几种耐药蛋白低。(5) 恶性淋巴瘤中 5 种耐药蛋白的表达均低。**结论** 不同的肿瘤类型具有不同的耐药基因表达特点, 其肿瘤细胞的耐药机制也有所差异, 可据此科学、合理、高效地选择敏感药物进行化疗, 从而达到治愈恶性肿瘤的目的。

关键词: 儿童肿瘤; 多药耐药; 化疗

中图分类号: R730.53

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)01-0007-03

Research on expression and clinical application of P-gp, MRP1, LRP, GST- π ,
Topo- II in children with malignant tumors*

XIANG Li, JIN Xian-qing[△]

(Department of Pediatric Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the expression of P-gp, MRP1, LRP, GST- π and Topo- II in the children with malignant tumors, to explore the drug resistant mechanism of common child tumor and to provide the theoretic bases for the program choice of chemotherapy and the judgment of long term living. **Methods** The expression of P-gp, MRP1, LRP, GST- π and Topo- II were detected by immunohistochemistry staining in the cases of child malignant tumors. **Results** (1) In the yolk sac tumor, the expression of P-gp, MRP1, LRP and GST- π in different structures of yolk sac tumor showed significant difference. (2) In rhabdomyoblastoma, the expression of P-gp, GST- π was high in neuroblastoma, the expression of P-gp, MRP1, and Topo- II α was high in Wilm's tumor, the expression of LRP, Topo- II was low. In malignant lymphoma, the expression of all the five drug resistance proteins was low. **Conclusion** (1) The expression of the child malignant drug resistance protein can help the use of drugs in clinic. (2) The effective drugs to cure the child tumor can be applied before operation.

Key words: children with malignant tumors; multidrug resistance; chemotherapy

恶性肿瘤已经成为儿童疾病死亡的首要原因。常见的儿童恶性实体瘤有肾母细胞瘤、肝母细胞瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、恶性淋巴瘤、卵黄囊瘤等。儿童恶性实体瘤常用的治疗包括手术、化疗、放疗、免疫治疗、介入治疗、中医治疗、肿瘤的诱导分化治疗等, 而化疗是目前治疗儿童恶性肿瘤和有效防治肿瘤转移、复发的主要手段。尽管新的抗癌药物和化疗方案不断推出, 但治疗效果却不尽如人意, 其中一个重要的原因就是肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性。产生耐药性的肿瘤细胞不仅对使用过的抗肿瘤药物产生耐药, 而且对多种未曾使用过的结构和作用机制不同的药物也产生耐药, 这种现象称为多药耐药性(multidrug resistance, MDR)。肿瘤多药耐药的机制十分复杂, 现在普遍认为其与多种耐药相关的酶和蛋白有关, 如: P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白 1(multidrug resistance-associated protein, MRP1)、肺耐药相关蛋白(lung resistance-associated protein, LRP)、谷胱甘肽转移酶

(glutathione-S-transferase- π , GST- π)、DNA 拓扑异构酶 II (topoisomeras, Topo- II) 等^[1-2]。本研究旨在通过对 40 例儿童常见恶性实体瘤中耐药基因表达蛋白的分析, 探讨儿童常见恶性肿瘤的耐药机制, 为临床化疗制定敏感的个体化化疗方案提供实验依据。

1 临床资料

1.1 一般资料 选取 2000~2005 年重庆医科大学附属儿童医院收治的 5 种儿童常见恶性实体瘤病例 40 例, 资料完整; 病理石蜡切片由重庆医科大学附属儿童医院病理科提供, 包括: 肾母细胞瘤(10 例)、恶性淋巴瘤(19 例)、横纹肌肉瘤(3 例)、神经母细胞瘤(3 例)、卵黄囊瘤(5 例)。其中男 23 例, 女 17 例; 年龄小于 1 岁 8 例, 1~3 岁 11 例, 大于 3 岁 21 例, 平均年龄 4 岁, 中位年龄为 4.2 岁。

1.2 实验方法 标本均经 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 μ m 连续切片, 50 $^{\circ}$ C 恒温箱中固定 72h, 梯度酒精脱蜡水化,

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目(NO. 30330590)。[△] 通讯作者。

表 1 5 种耐药蛋白在 6 种常见儿童恶性肿瘤中的表达

疾病名称	n	P-gp(%)	MRP1(%)	LRP(%)	GST-π(%)	Topo-II(%)	χ^2	P
肾母细胞瘤	10	90.0	70.0	40.0	100	30.0	19.707	0.001▲
非霍奇金淋巴瘤	5	80.0	40.0	60.0	100	40.0	7.447	0.113
霍奇金淋巴瘤	14	85.7	21.4	57.1	35.7	50.0	13.143	0.011▲
卵黄囊瘤	5	100	60.0	20.0	100	40.0	14.207	0.006▲
神经母细胞瘤	5	100	66.7	0	66.7	100	11.45	0.022▲
横纹肌肉瘤	3	100	33.3	0	100	0	16.908	0.002▲

▲: 所在组对应的儿童恶性实体瘤中 5 种耐药蛋白的表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

其余步骤按照 SP 免疫组化试剂盒说明书进行, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶固封。鼠抗人 P-gp、MRP、LRP、GST-π、Topo-II 单克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色剂试剂盒均购于福州迈新生物技术开发公司。使用已知阳性片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。P-gp、MRP1、LRP、GST-π 表达均位于细胞膜或者细胞浆, Topo-II 表达位于细胞核上, 阳性反应为棕色; 每张切片在高倍镜下计数 5 个视野, 计算其阳性率。判断标准: 阳性细胞数小于 10% 为阴性 (-), 10%~25% 为 (+), 25%~75% 为 (++), >75% 为 (+++); 达 (++) 以上为阳性, 表示肿瘤对该耐药基因所介导的药物具有耐受性。

1.3 统计学方法 所有数据应用 SAS 统计软件行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 种耐药基因蛋白在 40 例儿童常见恶性肿瘤中的表达情况见表 1。

2.2 37 例有两种或两种以上耐药基因表达阳性, 共表达率达 92.5%, 明显高于单基因表达率 ($P < 0.05$)。其中 9 例 5 种耐药基因表达均为阳性, 共表达率达 22.5%。

2.3 5 种耐药基因蛋白在儿童常见恶性肿瘤表达的免疫组化结果见图 1~6。

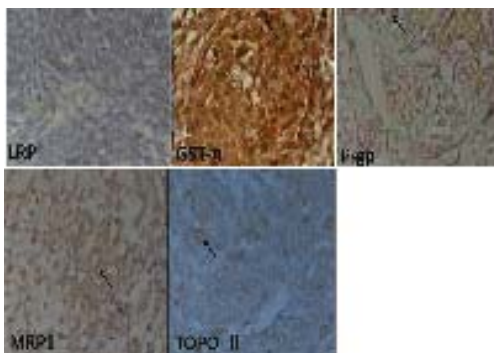


图 1 肾母细胞瘤耐药蛋白的表达 (箭头示阳性表达, $\times 400$)

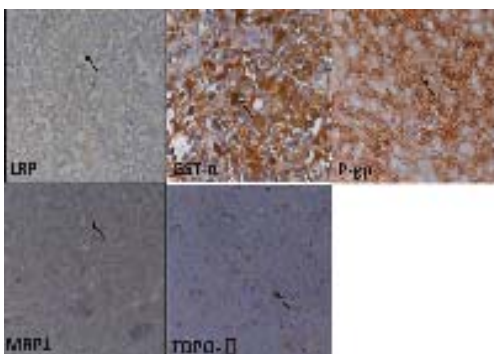


图 2 霍奇金淋巴瘤耐药蛋白的表达 (箭头示阳性表达, $\times 400$)

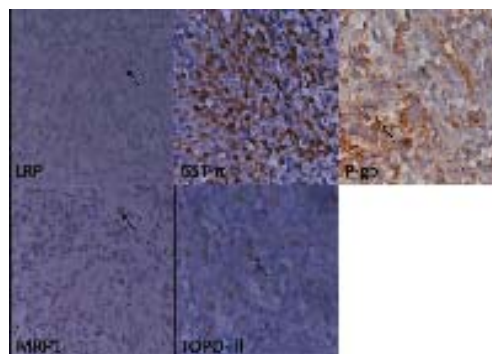


图 3 非霍奇金淋巴瘤耐药蛋白的表达 (箭头示阳性表达, $\times 400$)

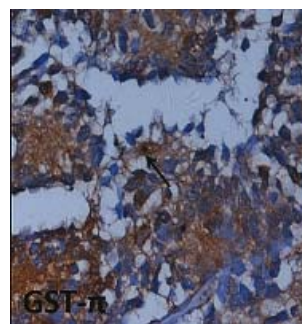


图 4 神经母细胞瘤耐药蛋白的表达 (箭头示阳性表达, $\times 400$)

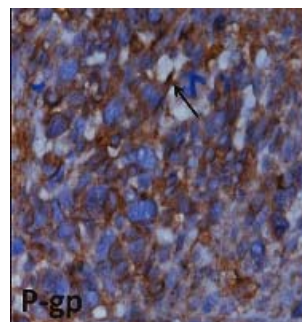


图 5 横纹肌肉瘤耐药蛋白的表达 (箭头示阳性表达, $\times 400$)

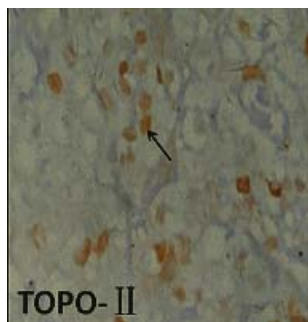


图 6 卵黄囊瘤耐药蛋白的表达(箭头示阳性表达, $\times 400$)

3 讨 论

3.1 5 种耐药基因的耐药机制 P-gp 是由 MDR1 基因编码的一种能量依赖性药物排除泵,当药物进入细胞后,P-gp 结合药物分子,同时其 ATP 位点结合 ATP 后释放能量,使药物转运到胞外,也可直接从胞膜排除药物,使胞内药物浓度始终维持于低水平,由此可介导植物碱类、阿霉素、紫杉醇、泰素帝等抗癌药物的耐药。P-gp 在人类正常组织中有不同程度的表达,其中肾上腺、肺脏、胃肠、胰腺、肾脏等组织中表达较高,而在卵巢、胸腺、骨髓中表达率很低甚至不表达^[3-4],这也解释了抗癌药物为何会引起对造血系统的严重损坏从而导致化疗疗程的缩短或中断。P-gp 主要分布在有分泌功能的上皮细胞中,可转运蛋白、碳水化合物、药物、色素等物质,所以其不仅是引起肿瘤组织耐药的主要机制之一,而且在机体分泌、排泄功能中也起着特殊的作用。

MRP 与 P-gp 同属 ABC 超家族膜转运蛋白,可转运多种有机阴离子物质,如一些内源性或外源性物质(还原性谷胱甘肽 GSH、葡萄糖醛酸、硫酸盐共轭结合物等)。它也是一种 ATP 依赖泵,能将带负电荷的药物分子逆浓度泵出到细胞外,还可通过改变细胞浆及细胞器的 pH 值,使药物到达作用部位的靶位点时浓度减少,从而产生肿瘤耐药。MRP 与 P-gp 之间存在交叉耐药种类,包括长春碱类、阿霉素、足叶乙甙等,均为能与 GSH 共轭结合的药物。

LRP 是穹隆蛋白的主要成分,阻止以细胞核为靶点的药物通过核孔进入胞核,并将进入胞浆的药物转运到运输囊泡中,以胞吐的方式排出体外,从而影响药物的胞内转运与分布,致靶点药物有效浓度下降而产生耐药。LRP 分布在人体腔上皮、分泌器官等正常组织中,也不同程度的表达于各种肿瘤组织中,主要介导阿霉素、铂类、柔红霉素、米托蒽醌、烷化剂等

的耐药。GST 是机体中催化 GSH 与亲电物质发生结合的一类酶系,具有多种生物学功能,结构多样,分为 α 、 μ 、 θ 、 π 等膜结合微粒体,其中 GST- π 与恶性肿瘤耐药关系最密切。卵巢并不是 P-gp 的富集器官,但 GST- π 却是优势亚型,肿瘤高表达也正反映了其胚胎特征^[5]。GST- π 不仅可催化亲电物质与 GSH 结合,本身可和亲脂性细胞毒药物结合,增加其水溶性促进代谢,最终将毒性物质从尿液中排出或降解为无毒性的醇类物质,从而降低抗肿瘤药物的细胞毒作用,其只要介导对顺铂、氮芥类、烷化剂、蒽环类等的耐药。

Topo 是一种能催化 DNA 超螺旋结构局部构型改变的基本核酶,分为 I、II 类,其中 Topo-II 与细胞耐药关系密切。化疗药物通过该酶与 DNA 交联形成共价复合物,即可分割复合

物引起 DNA 断裂,导致肿瘤细胞死亡。DNA 拓扑异构酶同时又是许多化疗药物重要的攻击靶点,导致该酶减少或活性下降,使得可分割的复合物减少,肿瘤细胞 DNA 损害减少,并具有修复力,使肿瘤细胞不因 DNA 断裂而死亡,从而产生耐药。Topo-II 表达越低提示对化疗药物越不敏感,又因其与肿瘤细胞的增殖活性密切相关,成为反映肿瘤细胞生物学行为和预后的重要标记物。以 Topo-II 为靶点的药物主要为蒽环类、鬼臼霉素、阿霉素等。

3.2 5 种耐药蛋白在儿童恶性肿瘤中的表达特点及其表达现象 本研究结果显示,肾母细胞瘤、恶性淋巴瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、卵黄囊瘤中 P-gp、MRP、LRP 和 GST- π 表达相对较高,Topo-II 普遍表达较低,提示 P-gp、MRP、LRP、GST- π 的高表达和 Topo-II 的低表达均可导致肿瘤组织的耐药,这与有关报道相符。事实上,肿瘤化疗的耐药性常常是多种耐药蛋白参与及不同机制共同作用的结果^[6-7]。本实验结果显示,两种或两种以上耐药基因的共表达率达 92.5%,5 种耐药基因均表达率达 22.5%,表明 P-gp、MRP、LRP、GST- π 、Topo-II 不同程度地同时参与了肿瘤的耐药形成,表达上的差异性与不一致性也正说明了影响肿瘤耐药机制的多因素性。有学者提出这些耐药基因间不存在相互关联性,各自发挥耐药作用^[8]。因此,联合检测肿瘤多个耐药相关标志,同时评估多个耐药基因的表达,能更加客观地反映肿瘤的耐药情况。临床上可依据耐药机制的不同优化治疗方案,实现个体化化疗,以增强疗效。

3.3 耐药蛋白在儿童恶性实体瘤中表达的临床意义及应用 儿童恶性肿瘤的耐药蛋白的进一步认识,对于儿童恶性肿瘤的临床化疗的盲目性有一定的指导作用,目前儿童恶性肿瘤的化疗方案来源于书本、文献或医师的个人经验,本实验结果对儿童恶性肿瘤的临床治疗有一定的指导意义。目前治疗恶性淋巴瘤的化疗药物有环磷酰胺、长春新碱、阿霉素、表阿霉素、博来霉素、长春花碱、足叶乙甙、氮芥等^[9]。本研究结果显示儿童恶性淋巴瘤中 P-gp 耐药表达高,MRP1 的表达较低,如 P-gp 的主要耐药药物是阿霉素、柔红霉素、表阿霉素、长春花碱、长春新碱等,MRP1 的主要耐药药物是阿霉素、长春新碱、鬼臼乙甙、柔红霉素等,在选择时以环磷酰胺、博来霉素、氮芥、鬼臼乙甙等作为一线基础药,从而提高对儿童恶性淋巴瘤药物治疗的疗效。

儿童恶性肿瘤以胚胎为主,位于软组织内,肿瘤与周围组织的关系密切,这一特点给手术造成一定的难度,而通过术前化疗就可以使瘤体充血减少,瘤体体积缩小,与周围组织界限更清楚,同时减少术中出血。这明显表明术前化疗的重要性。对于儿童恶性实体瘤的治疗方法中术前化疗可以作为一种常规的治疗方法。而明确各种儿童肿瘤耐药基因的表达特点可以为临床化疗提供理论依据,做到有的放矢,高效、快速的杀灭肿瘤细胞,提高治愈率,改善患儿的生活质量。

参考文献:

- [1] Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment[J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1859.
- [2] 朱少君,李艳红,张伟,等. P-gp、LRP 和 GST-II 在非小细胞肺癌组织中的表达及与预后的关系[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 15: 1348.

降解起关键作用。Smurf2 是具有 HECT 结构域的 E3,是本实验研究的主要内容。UPP 参与细胞生长、分化与凋亡、信号转导、转录调控、免疫应答及抗原呈递等多种生命活动过程,尤其是通过降解细胞内各信号通路的抑制因子或(和)激活因子发挥着上调或下调作用^[3]。该途径成分的改变可致蛋白质降解发生异常,细胞功能受到破坏,发生疾病。针对泛素蛋白酶体进行干预是疾病治疗的新手段,前景喜人。

有关糖尿病并发症时泛素蛋白酶体的研究尚少。国内王晓等^[4]发现高糖可使培养的血管内皮细胞泛素表达增加,其参与了凋亡的发生。Mastrocola 等^[5]和 Cai 等^[6]研究发现糖尿病肌肉萎缩是肌肉蛋白泛素降解增加的结果,糖尿病时心肌蛋白的泛素降解亦增加。Adachi Uehara 等^[7]研究发现糖尿病大鼠和 2 型糖尿病视网膜病变患者泛素蛋白酶体途径中泛素表达增加,提示糖尿病视网膜病变时存在蛋白转录后的调节异常与其发病相关。综上所述,UPP 在糖尿病并发症的发生、发展过程中起了重要作用,因此深入研究泛素蛋白酶体与糖尿病并发症之间的相互关系,有助于了解糖尿病并发症的发病机制。

在肾脏方面,UPP 是调节肾脏纤维化 TGF- β /smad 信号通路的重要机制之一,其中 Smurf2 能特异地降解 Smads 和 Smad 通路某些调节蛋白^[8],活化 TGF- β /smad 通路。kavsak 等^[9]在与糖尿病肾脏纤维化发病有关的 UUO 小鼠模型中证实,肾脏纤维化时 Smad7 减少是由于 Smurf2 泛素化降解增加所致,提示泛素化降解 Smad7 增加是导致肾小管间质纤维化的重要原因。对 Smurf2 表达的调控可能成为阻断肾脏 TGF- β 效应的具有生理学基础的诱人策略。而 DN 时,TGF- β /smad 通路作为多种致病因素的交汇点,同样导致了肾脏纤维化,UPP 是否亦在 DN 的病理进程中也发挥了重要作用?

本研究结果显示在正常 GMC 内只有少量的 Smurf2 mRNA 和蛋白表达,高糖可诱导 GMC 中泛素连接酶 Smurf2 的 mRNA 和蛋白增多,且具有浓度依赖性,提示高糖致泛素化降解增加,表明 UPP 参与 DN 的发病机制。高糖时 Smurf2 的高表达与渗透压不相关,表明高糖不是通过渗透压途径,而是通过其他途径影响 Smurf2 的表达。

DN 时 TGF- β /Smad 通路的活化已得到公认。由于泛素存在的广泛性,泛素对于细胞内蛋白质降解的重要性,以及 Smurf2 对于 Smad 降解的特异性,结合本研究结果,作者推测:

糖尿病时高糖激活肾脏 Smurf2,致 TGF- β /Smad 信号通路的活化。这是肾脏内细胞因子 TGF- β 增多引起 DN 肾纤维化进展的机制之一。

参考文献:

- [1] 黄晓燕,陈积雄,姚辉,等. 2 型糖尿病大鼠肾组织 nephrin 蛋白的表达及影响[J]. 重庆医学,2009,38(3):305.
- [2] 王午喜. 替米沙坦治疗早期 2 型糖尿病肾病患者临床观察[J]. 重庆医学,2008,37(21):2455.
- [3] Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E[J]. J Biol Chem, 2006, 281(29):20788.
- [4] 王晓,李果,李纪平. 泛素在高糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的表达[J]. 上海第二医科大学学报,2005,25(1):36.
- [5] Mastrocola R, Reffo P, Penna F, et al. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(4):584.
- [6] Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, et al. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice[J]. Cell, 2004, 119(2):285.
- [7] Adachi Uehara N, Kato M, Nimura Y, et al. Up-regulation of genes for oxidative phosphorylation and protein turnover in diabetic mouse retina[J]. Exp Eye Res, 2006, 83(4):849.
- [8] Lin X, Liang M, Feng X. Smurf2 is an ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling [J]. J Biol Chem, 2000, 275(47):36818.
- [9] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF- β receptor for degradation[J]. Mol Cell, 2000, 6(6):1365.

(收稿日期:2009-06-05 修回日期:2009-08-07)

(上接第 9 页)

- [3] Juranka PF, Zastawny RL, Ling V. P-glycoprotein; multi-drug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins[J]. FASEB J, 1989, 3:2583.
- [4] Huls M, Russel FG, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 328(1):3.
- [5] Soh Y, Goto S, Kitajima M, et al. Nuclear localisation of glutathione S-transferase pi is an evaluation factor for drug resistance in gynaecological cancers[J]. Clin Oncol, 2005, 17(4):264.

- [6] Mattern J. Drug resistance in cancer: a multifactorial problem[J]. Anticancer Res, 2003, 23(2C):1769.
- [7] Nishio K, Nakamura T. Conquering drug resistance in lung cancer[J]. Nippon Rinsho, 2000, 58(5):1041.
- [8] Fan K, Fan D, Cheng LF, et al. Expression of multidrug resistance-related markers in gastric cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20(6C):4809.
- [9] Jeha S. New therapeutic strategies in acute lymphoblastic leukemia[J]. Semin Hematol, 2009, 46(1):76.

(收稿日期:2009-07-10)