

· 论 著 ·

# ATRA 耐药基因 HA117 相关蛋白在肺癌和乳腺癌组织中的表达特点及临床意义\*

牟廷刚, 金先庆<sup>△</sup>, 赵利华, 丁雄辉, 陈建飞, 孙艳辉, 李昆昆, 王士奇  
(重庆医科大学附属儿童医院普外科 400014)

**摘要:**目的 探讨全反式维甲酸(ATRA)耐药基因 HA117 相关蛋白在肺癌和乳腺癌组织中的表达特点及临床意义。方法 随机选择 23 例肺癌组织和 21 例乳腺癌组织作为实验组, 9 例非癌肺组织和 11 例非癌乳腺组织作为对照组, 应用免疫组化 S-P 法检测 HA117 相关蛋白在上述组织切片中的表达, 并结合其临床资料进行回顾性分析。结果 HA117 相关蛋白在肺癌组织、乳腺癌组织、非癌肺组织及非癌乳腺组织中的阳性表达率分别为 60.9%(14/23)、57.1%(12/21)、11.1%(1/9)及 0.0%(0/11)。HA117 相关蛋白在肺癌和乳腺癌组织中的阳性表达明显高于非癌组织( $P < 0.05$ )。HA117 相关蛋白的表达水平与肺癌及乳腺癌患者的年龄、肿瘤分级、病理分型、淋巴结转移及有无术前化疗方面无明显相关性( $P > 0.05$ )。结论 HA117 相关蛋白在肺癌和乳腺癌的高表达提示二者对 ATRA 具有较强的耐药性。

**关键词:**多药耐药相关蛋白类; 基因, HA117; 肺肿瘤; 乳腺肿瘤; 维甲酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.16.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)16-1563-03

## Expression features of ATRA resistance gene HA117 related protein in lung and breast neoplasms and its clinical significance\*

Mu Tinggang, Jin Xianqing<sup>△</sup>, Zhao Lihua, Ding Xionghui, Chen Jianfei, Sun Yanhui, Li Kunkun, Wang Shiqi

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

**Abstract:** Objective To explore the expression features of all trans retinoic acid(ATRA) resistance gene HA117 related protein in lung and breast neoplasm and its clinical significance. **Methods** 23 specimens of lung neoplasm and 21 specimens of breast neoplasm were randomly selected as experimental group, while 9 and 11 specimens of non-cancerous tissue of lung and breast as control group. Streptavidin-peroxidase immunohistochemistry staining method was employed to detect the expression of HA117 related protein in all specimens above and retrospective analysis was conducted combining their clinical data. **Results** The positive expression rates of HA117 related protein in lung neoplasm, breast neoplasm, non-cancerous tissue of lung and breast were 60.9%(14/23), 57.1%(12/21), 11.1%(1/9) and 0.0%(0/11), respectively. The expression levels of HA117 related protein in lung and breast neoplasm were obviously higher than those in non-cancerous tissue( $P < 0.05$ ), which showed no significant correlation with age of patients, tumor grades, pathological types, lymph node metastasis and with or without preoperative chemotherapy( $P > 0.05$ ).

**Conclusion** High levels of HA117 related protein expression in lung and breast neoplasm tissue indicate a strong resistance to ATRA existed in these two kind of cancer.

**Key words:** multidrug resistance-associated proteins; gene, HA117; lung neoplasms; breast neoplasms; tretinoin

在综合治疗恶性肿瘤的措施中, 目前化疗是消除肿瘤、防治肿瘤转移和复发的主要手段。近年来的研究表明全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)具有良好的诱导分化作用<sup>[1]</sup>, 临床上已将其作为治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的首选诱导药物, 但其诱导肿瘤细胞产生对该药及其他化疗药物的耐受现象也引起了国内外学者的广泛关注<sup>[2]</sup>。因此, 深入了解肿瘤细胞对化疗药物产生耐药的机制, 从而改进和优化化疗方案, 将有助于延长患者的无瘤存活期, 提高生存率。前期的研究通过建立多药耐药细胞 HL-60/ATRA, 结合抑制消减杂交及基因芯片技术, 筛选并克隆出一个多药耐药相关新基因 HA117(基因库登陆号 AY210354)<sup>[3]</sup>。本研究分别对肺癌和乳腺癌中 ATRA 耐药基因 HA117 相关蛋白的表达进行分析, 并结合其临床病理资料, 探讨 HA117 介导的耐药机制。

### 1 材料与与方法

**1.1 标本来源** 随机选取 2009 年 10 月至 2010 年 7 月重庆

市肿瘤医院手术切除并经病理检查确诊的肺癌标本 23 例和乳腺癌标本 21 例作为实验组。另选取 2009 年 4 月至 2010 年 5 月该院手术切除的非癌肺组织标本 9 例和非癌乳腺组织标本 11 例作为对照组。肺癌患者中男 15 例, 女 8 例; 年龄 38~76 岁, 平均 58 岁; 病理分级: I 级 5 例, II 级 11 例, III 级 7 例; 大体分型: 中央型肺癌 15 例, 周围型肺癌 8 例; 淋巴结转移 9 例; 所有患者均为初次就诊。乳腺癌患者均为女性; 年龄 38~60 岁, 平均 46 岁; 病理分级: I 级 4 例, II 级 11 例, III 级 6 例; 病理分型: 非浸润性癌 5 例, 浸润性导管癌 16 例; 淋巴结转移 6 例; 术前化疗 7 例。

**1.2 试剂** HA117 多克隆抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司; 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化即用型超敏试剂购自福州迈新生物技术开发公司; 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.3 实验方法** 所有标本均用 10% 福尔马林溶液固定, 石蜡

包埋,厚 5  $\mu\text{m}$  连续切片,将其贴附于经多聚赖氨酸处理的切片上,60  $^{\circ}\text{C}$  烤片 2 h 后常温保存。切片常规脱蜡至水,磷酸缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)冲洗 3 次,每次 5 min;经 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH6.0)在微波炉中加热煮沸,行抗原修复;凉至室温,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;新鲜配制  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 mL/L) 孵育 20 min,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加牛血清清蛋白(bovine serum albumin,BSA)液孵育 10 min,倾去,勿洗;滴加一抗(稀释比例 1:100)40  $\mu\text{L}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜;复温至室温;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,按 DAB 显色试剂盒说明书依次滴加试剂 A 和试剂 B,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色、冲洗、苏木素复染、脱水、透明及封片。PBS 代替一抗作阴性对照。

**1.4 结果判定** 在 400 倍光学显微镜视野下随机选取 10 个视野,计数每个视野中肿瘤细胞的染色情况,取平均值。以定位部位中出现粗细一致的棕黄色颗粒为阳性染色。根据切片中阳性细胞占全部细胞数的百分比,对 HA117 相关蛋白的表达水平进行分级:阳性细胞数: $<10\%$  为阴性(-), $\geq 10\% \sim 25\%$  为低度表达(+), $\geq 25\% \sim 75\%$  为中度表达(++), $\geq 75\%$  为高度表达(+++),++~+++ 为阳性表达,表示肿瘤对该耐药基因所介导的药物具有耐受性,-~+ 为阴性表达,表示肿瘤对化疗药物不具耐受性。

**1.5 统计学处理** 所有数据均使用 SPSS17.0 软件进行统计分析,用 Fisher 精确检验(Fisher exact test)统计计数资料, $P$

$<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

HA117 相关蛋白表达部位在细胞质。14 例肺癌组织中 HA117 相关蛋白呈阳性表达,占 60.9%(14/23),在非癌肺组织中其阳性表达率仅为 11.1%(1/9);21 例乳腺癌组织中 HA117 相关蛋白阳性表达率为 57.1%(12/21),在 11 例非癌乳腺组织中无阳性表达[0.0(0/11)]。HA117 相关蛋白在肺癌和乳腺癌组织中阳性表达明显高于非癌组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ ,见表 1、封 3 图 1)。HA117 相关蛋白的阳性表达与肺癌及乳腺癌患者的发病年龄、肿瘤分级、病理分型、淋巴结转移及有无术前化疗均无明显相关性( $P>0.05$ ,见表 2)。

表 1 HA117 相关蛋白在组织中的表达情况[n(%)]

组别	HA117 相关蛋白的表达				阳性表达
	-	+	++	+++	
对照组					
非癌肺组织(n=9)	7(77.8)	1(11.1)	1(11.1)	0(0.0)	1(11.1)
非癌乳腺组织(n=11)	9(81.8)	2(18.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
实验组					
肺癌组织(n=23)	4(17.4)	5(21.7)	10(43.5)	4(17.4)	14(60.9)*
乳腺癌组织(n=21)	5(23.8)	4(19.0)	11(52.3)	1(4.8)	12(57.1)*

\*: $P<0.05$ ,与对照组的相应组织比较。

表 2 HA117 相关蛋白在肺癌及乳腺癌组织中的表达与临床表现的相关性[n(%)]

组别	年龄(岁)			肿瘤分级			病理分型				淋巴结转移		术前化疗	
	<50	$\geq 50 \sim 60$	>60	I	II	III	中央型	周围型	非浸润性	浸润性	有	无	有	无
肺癌	3(50.0)	5(55.6)	6(75.0)	2(40.0)	7(63.6)	5(71.4)	10(66.7)	4(50.0)	-	-	7(77.7)	7(50.0)	-	-
乳腺癌	7(50.0)	5(71.4)*	-	1(25.0)	7(63.6)	4(66.7)	-	-	2(40.0)	10(62.5)	4(66.7)	8(53.3)	5(71.4)	12(57.1)

-:表示此项无数据;\*: $\geq 50$  岁。

## 3 讨 论

目前 ATRA 除了作为 APL 诱导分化治疗的首选药物,还广泛用于其他恶性肿瘤的治疗<sup>[4]</sup>。最近的研究表明 ATRA 使用后,肿瘤细胞出现的耐药现象严重影响 ATRA 诱导分化治疗的疗效<sup>[2-5]</sup>。因此,ATRA 相关耐药已成为临床亟待解决的问题。本课题组前期研究发现,与 ATRA 耐药有关的基因是位于 14 号染色体上长度为 1 991 bp 的新基因序列,即 HA117 相关蛋白<sup>[6]</sup>。HA117 相关蛋白主要表达于儿童恶性肿瘤,如白血病细胞中,参与肿瘤细胞的耐药作用<sup>[7-8]</sup>。但它在其他实体瘤组织中的表达情况及其耐药机制目前尚不清楚。本研究通过检测 HA117 相关蛋白在肺癌和乳腺癌组织中的表达,进一步探讨其耐药功能。

本研究结果显示,肺癌和乳腺癌组织中 ATRA 耐药基因 HA117 相关蛋白的表达明显高于非癌组织,表明 HA117 相关蛋白参与了肺癌和乳腺癌的耐药。通过检测患者体内 HA117 相关蛋白表达情况可以更客观地评价患者癌组织对 ATRA 的耐药情况。

比较 HA117 相关蛋白在各临床资料组间的阳性表达率发现肺癌组织中,HA117 相关蛋白阳性表达与患者发病年龄、肿瘤分级、病理分型以及有无淋巴结转移方面均无明显相关性( $P>0.05$ );在乳腺癌组织中,HA117 相关蛋白阳性表达除了

与患者发病年龄、肿瘤分级、局部浸润深度、有无淋巴结转移方面无明显相关性( $P>0.05$ )外,与患者是否采用术前化疗亦无明显相关性( $P>0.05$ ),上述结果提示不同病理分级的肿瘤组织均可发生较强的 ATRA 耐药,临床上不能将 HA117 相关蛋白表达测量值作为判断肿瘤恶性程度的标准。化疗前肿瘤组织 HA117 相关蛋白的高表达提示 HA117 相关蛋白所介导的肿瘤耐药可能为使用化疗药物后获得,还可能为肿瘤细胞内在性耐药,即原发存在的耐药。这与前期研究所得出的肿瘤细胞产生耐药性大多是在用药过程中获得的观点不同<sup>[9]</sup>。此外,化疗前 HA117 相关蛋白的高表达亦可能是其与其他肿瘤耐药基因存在交叉耐药的結果,可通过和其他肿瘤耐药基因对比,研究 HA117 相关蛋白所介导的肿瘤耐药。HA117 相关蛋白阳性表达在有、无淋巴结转移及不同年龄组间比较虽无明显差异,但存在肿瘤淋巴结转移或年龄较大的患者癌组织中 HA117 相关蛋白阳性表达率有增加趋势,推测 ATRA 相关肿瘤耐药除了与肿瘤细胞本身特性有关外,尚与肿瘤其他生物学特性有关。HA117 相关蛋白介导的 ATRA 相关肿瘤耐药与淋巴结转移以及发病年龄的关系尚需大样本实验进一步证实。

肿瘤耐药是一个多基因参与、涉及多种基因产物的复杂过程,如经典的多药耐药基因 1(multidrug resistance gene 1,MDR1)<sup>[10]</sup>、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,

BCRP)<sup>[11]</sup>、肺耐药蛋白(lung resistance protein,LRP)<sup>[12]</sup>以及抗凋亡基因 survivin<sup>[13]</sup>等。新基因 HA117 相关蛋白的发现,无疑补充了参与肿瘤多药耐药基因的基因组,初步提示了 ATRA 相关耐药的分子机制。已证实该基因编码的碱性蛋白含有 4 个与蛋白激酶磷酸化有关的功能位点,其功能结构域与新近发现的参与调控细胞凋亡的重要基序“PYRIN”同源<sup>[14-15]</sup>。近来研究还表明 HA117 相关蛋白参与的肿瘤耐药性与 MDR1 相当,但其耐药机制却明显不同<sup>[16]</sup>,其可通过增加耐药细胞 K562 的数量而参与肿瘤的耐药<sup>[17]</sup>。到目前为止,该基因参与肿瘤耐药的机制尚未完全清楚。因此,关于 HA117 相关蛋白在其他实体肿瘤中的表达特点及其参与肿瘤耐药的详尽机制尚需更多前瞻性研究证实。

#### 参考文献:

- [1] Tsai WH, Hsu HC, Lin CC, et al. Role of interleukin-8 and growth-regulated oncogene-alpha in the chemotactic migration of all-trans retinoic acid-treated promyelocytic leukemic cells toward alveolar epithelial cells [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(3): 879-885.
- [2] Candoni A, Damiani D, Michelutti A, et al. Clinical characteristics, prognostic factors and multidrug-resistance related protein expression in 36 adult patients with acute promyelocytic leukemia [J]. *Eur J Haematol*, 2003, 71(1): 1-8.
- [3] 郭玉霞, 罗庆, 徐西华. 耐药相关新基因 HA117 的克隆及重组腺病毒制备 [J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(6): 641-644.
- [4] Dokmanovic M, Chang BD, Fang J, et al. Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes [J]. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1(1): 24-27.
- [5] Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Retinoids in cancer chemoprevention [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004, 4(3): 285-298.
- [6] Zheng GH, Fu JR, Xu YH, et al. Screening and cloning of multi-drug resistant genes in HL-60/MDR cells [J]. *Leuk Res*, 2009, 33(8): 1120-1123.
- [7] Che Y, Xu YH, Zheng GH, et al. Clinical significance of HA117 expression in children with acute leukemia [J]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2009, 40(5): 873-

876.

- [8] Zheng GH, Jin XQ, Guo YX, et al. Study on the related function of a novel gene HA117 in the multi-drug resistance of lymphoma Raji cells [J]. *Tumor*, 2009, 29(4): 315-318.
- [9] 张健, 张积仁, 汪森明, 等. CD3AK、LAK 对 KB、KBv200 细胞株耐药逆转前后的杀伤作用 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(3): 288-291.
- [10] Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target [J]. *Mol Interv*, 2001, 1(2): 117-125.
- [11] Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, et al. Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(1): 26-33.
- [12] Paredes Lario A, Blanco García C, Echenique Elizondo M, et al. Expression of proteins associated with multidrug resistance and resistance to chemotherapy in lung cancer [J]. *Arch Bronconeumol*, 2007, 43(9): 479-484.
- [13] Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(6): 1133-1139.
- [14] Manji GA, Wang L, Geddes BJ, et al. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(13): 11570-11575.
- [15] Wu GQ, Liao YJ, Qin ZQ, et al. PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma [J]. *Plasmid*, 2010, 64(1): 41-50.
- [16] Zhao L, Jin X, Xu Y, et al. Functional study of the novel multidrug resistance gene HA117 and its comparison to multidrug resistance gene 1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 98.
- [17] Guo Y, Zheng G, Jin X, et al. HA117 gene increased the multidrug resistance of K562 cells in vitro: an investigation to the function of a novel gene related to drug resistance [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 63.

(收稿日期:2010-12-09 修回日期:2011-04-07)

(上接第 1562 页)

- al. High incidence of optic disc swelling at very high altitudes [J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(5): 644-650.
- [13] Sutherland AI, Morris DS, Owen CG, et al. Optic nerve sheath diameter, intracranial pressure and acute mountain sickness on Mount Everest: a longitudinal cohort study [J]. *Br J Sports Med*, 2008, 42(3): 183-188.
- [14] Reeves JT, Leon-Velarde F. Chronic mountain sickness:

recent studies of the relationship between hemoglobin concentration and oxygen transport [J]. *High Alt Med Biol*, 2004, 5(2): 147-155.

- [15] 马恩龙, 曲立文, 孟宪法. 进入高原后人体体液免疫功能状态的观测 [J]. *医学理论与实践*, 2000, 13(12): 709-710.

(收稿日期:2010-11-13 修回日期:2011-03-17)