

基因及其蛋白在肿瘤中的表达

DOI: 10.11699/cyxb20130810

经典 P-糖蛋白在儿童淋巴瘤和肾母细胞瘤中的表达及意义

段文娟¹, 丁雄辉¹, 金先庆¹, 王士奇¹, 刘 行¹, 朱 进²(1. 重庆医科大学附属儿童医院肿瘤实验室、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、
儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地; 2. 重庆医科大学附属儿童医院病理科, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在儿童霍奇金淋巴瘤(Hodgkin disease, HL)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin disease, NHL)和肾母细胞瘤(Wilms' tumor, WT)中的表达意义,为临床制定个体化疗方案提供理论依据。**方法:**采用免疫组织化学 SP 法检测 50 例淋巴瘤(HL 26 例、NHL 24 例)和 32 例 WT 中 P-gp 的表达情况及其与临床病理特征的关系。**结果:**(1)P-gp 在 HL、NHL、WT 中的阳性表达率分别为 57.7%、70.8%、65.6%。(2)HL 和 NHL 中 P-gp 的表达差异无统计学意义($P=0.39$),WT 与癌旁对照组中 P-gp 的表达差异无统计学意义($P=1.00$)。(3)HL 的乳酸脱氢酶的量、有无纵膈病变对 P-gp 表达的影响有统计学意义($P=0.03$ 、 $P=0.05$);NHL 的临床分期对 P-gp 的表达影响也有统计学意义($P=0.02$);WT 的组织分型、临床分期、有无淋巴结转移和术前化疗对 P-gp 的表达差异无统计学意义($P=0.53$ 、 $P=0.25$ 、 $P=0.64$ 、 $P=0.45$)。**结论:**(1)P-gp 的高表达与儿童 HL、NHL 和 WT 的耐药密切相关,是这 3 种肿瘤预后的不利因素。(2)在临床上可以根据肿瘤耐药蛋白的表达情况针对性地选择化疗药物,使肿瘤患儿用上敏感的化疗药物。

【关键词】P-糖蛋白;霍奇金淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;肾母细胞瘤;免疫组织化学**【中国图书分类法分类号】**R733.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-04

Expressions and significances of P-glycoprotein in childhood lymphoma and Wilms' tumor

DUAN Wenjuan¹, DING Xionghui¹, JIN Xianqing¹, WANG Shiqi¹, LIU Hang¹, ZHU Jin²

(1. Laboratory of Oncology, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders; 2. Department of Pathology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect the expressions of P-glycoprotein(P-gp) in pediatric Hodgkin disease(HL), non-Hodgkin disease(NHL) and Wilms' tumor(WT) and to provide theoretical basis for individual chemotherapy in clinics. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to detect the expressions of P-gp in pediatric tumors(26 cases of HL, 24 cases of NHL and 32 cases of WT) and relationship between expressions of P-gp and clinical characteristics of tumors was evaluated. **Results:** (1)Positive expression rates of P-gp were 57.7%, 70.8%, 65.6% in HL, NHL and WT. (2)There was no significant difference in P-gp expressions between HL and NHL($P=0.39$), between WT and adjacent normal tissues($P=1.00$). (3)Positive expression of P-gp was closely related with lactate dehydrogenase, lymphnode metastasis in HL($P=0.03$, $P=0.05$) and was related with clinical stages in NHL($P=0.02$). There was no significant correlation between expressions of P-gp and histological type, clinical stage, lymphnode metastasis and preoperative chemotherapy of WT. **Conclusions:** (1)High positive expression of P-gp correlates with tumor resistant of HL, NHL and WT and is one of the unfavorable factors for prognosis. (2)According to expressions of tumor resistant protein, we can better chose chemotherapy drugs in clinics and make children with tumor use sensitive drug.

【Key words】P-glycoprotein; Hodgkin lymphoma; non Hodgkin lymphoma; Wilms' tumor; immunohistochemistry

作者介绍:段文娟, Email:jiangxidwj@163.com,

研究方向:肿瘤耐药的基础与临床研究。

通信作者:金先庆, Email:etzhl@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30330590)。

儿童恶性淋巴瘤和肾母细胞瘤(Wilms' tumor, WT)均是儿童较常见的儿童实体瘤。淋巴瘤可分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin disease, HL)和非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin disease, NHL),发病率居小儿恶性肿瘤第 3 位^[1],其中 NHL 发病率和病死率居小儿恶性肿瘤第 5 位^[2]。WT 又叫 Wilms' 瘤,是最常见的小儿恶性实体瘤之一,最多见于 3 岁小儿^[3]。化疗是恶性肿瘤必不可少的治疗手段,而肿瘤细胞对化疗药物的耐受性是制约化疗成功与否的关键因素,将直接关系到患儿的预后和生存质量。本研究通过免疫组织化学方法来探讨 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在儿童淋巴瘤和 WT 中的表达及其与肿瘤临床病理特征的关系,为临床优化化疗方案提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集重庆医科大学附属儿童医院病理科存档的 2008 年 5 月-2012 年 3 月经病理科专家诊断为淋巴瘤的组织标本蜡块 50 例(HL 26 例、NHL 24 例),2009 年 6 月-2012 年 3 月

WT 的组织标本蜡块 32 例,WT 癌旁对照组 10 例。HL 中男孩 23 例、女孩 3 例,年龄 2~15 岁(平均 6 岁);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) $\leq 220 \mu\text{mol/L}$ 9 例、 $>220 \mu\text{mol/L}$ 15 例,2 例未测。NHL 中男孩 20 例、女孩 4 例,年龄 2~14 岁(平均 5 岁 4 月);病理分型:均为侵袭性淋巴瘤;根据美国国家肿瘤研究所的标准将其分为 3 型:淋巴母细胞型、小无核裂细胞型和大细胞型。WT 男孩 17 例、女孩 15 例,年龄 5 月~9 岁(平均 4 岁 5 月);组织学类型:预后良好型(favorable histology, FH)包括上皮型 8 例,混合型 10 例,间质型 4 例,胚芽型 7 例;预后不良型(unfavorable histology, UH)又称间变型 3 例;WT 术前均行化疗, <4 周 19 例、 ≥ 4 周 13 例。其余病理特征的病例数见表 1 和表 2。

1.2 试剂

主要试剂多药耐药基因 1(multidrug resistant gene 1, MDR1)单克隆抗体购于美国 Biolegend 公司(CD243);即用型免疫组化 Elivision™ super 试剂盒购于福州迈新生物技术开发有限公司;DAB Kit 浓缩型 DAB 试剂盒购于北京中杉桥生物技术有限公司。

1.3 方法

所有标本均经 10%中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋。将每例蜡块作 4 μm 厚的连续切片,免疫组织化学采用 SP 法检测组织中的 P-gp 的表达,实验步骤按说明书进行。

表 1 P-gp 表达与 HL 和 NHL 临床病理特征的关系 (n, %)

Tab.1 Correlation between expressions of P-gp and clinicopathological features of HL and NHL (n, %)

病理特征	HL				NHL					
	例数 (<i>n</i>)	-	+	阳性率(%)	<i>P</i> 值	例数 (<i>n</i>)	-	+	阳性率(%)	<i>P</i> 值
IPI评分					/					0.67
<3分(低危组)	/	/	/	/		9	2	7	77.8	
≥3分(中高危组)	/	/	/	/		15	5	10	66.7	1.00
治疗情况					0.24					
初治	23	11	12	55.2		21	6	15	71.4	/
复治	3	0	3	100.0		3	1	2	66.7	
LDH					0.03					/
<220 μmol/L	9	7	2	22.2		/	/	/	/	
≥220 μmol/L	15	4	11	93.3		/	/	/	/	0.67
纵膈病变					0.05					
有	5	0	5	100.0		9	2	7	77.8	0.02
无	21	11	10	47.6		15	5	10	66.7	
临床分期					0.11					0.77
I、II	16	9	7	43.8		11	6	5	45.5	
III、IV	10	2	8	80.0		13	1	12	92.3	0.77
病理组织分型					0.08					
结节硬化型	3	0	3	100.0	淋巴瘤细胞型	11	3	8	72.7	
淋巴细胞为主型	12	8	4	33.3		小无核细胞型	1	0	1	
淋巴细胞消减型	2	1	1	50.0		大细胞型	12	4	8	66.7
混合型	9	2	7	77.8						

注:/,不分析该指标;IPI 评分,国际预防指数(international prognostic index)

表 2 P-gp 的表达与 WT 的临床病理参数间的关系 ($n, \%$)Tab.2 Correlation between expressions of P-gp and clinicopathological features of WT ($n, \%$)

临床病理参数	例数 (n)	P-gp		阳性表达率 ($\%$)	P 值
		-	+		
组织分型					0.53
FH	27	11	18	62.1	
UH	3	0	3	100.0	
临床分期					0.25
I、II	12	6	6	50.0	
III、IV	20	5	15	75.0	
淋巴结转移					0.64
无	26	10	16	61.5	
有	6	1	5	83.3	
术前化疗					0.45
<4 周	19	8	11	57.9	
≥ 4 周	13	3	10	76.9	

1.4 结果判断

具体标准为:P-gp 主要以胞膜和细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。采用半定量积分判读结果^[4],染色强度分级:0 分为无着色,1 分为浅黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色;再按阳性细胞所占比例评分: $\leq 10\%$ 为 0 分,11%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,>50%为 3 分,然后将两者积分相加:阴性组“-”为 0~4 分,阳性组“+”>4 分。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理。样本率比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 P-gp 在淋巴瘤和 WT 组织中的表达比较

P-gp 在 HL、NHL、WT 组织中的定位主要在胞膜,少量在胞质。P-gp 在 HL 与 NHL 中阳性表达率分别为 57.7%(15/26)、70.8%(17/24),但差异无统计学意义($P=0.39$)(图 1 D-I);P-gp

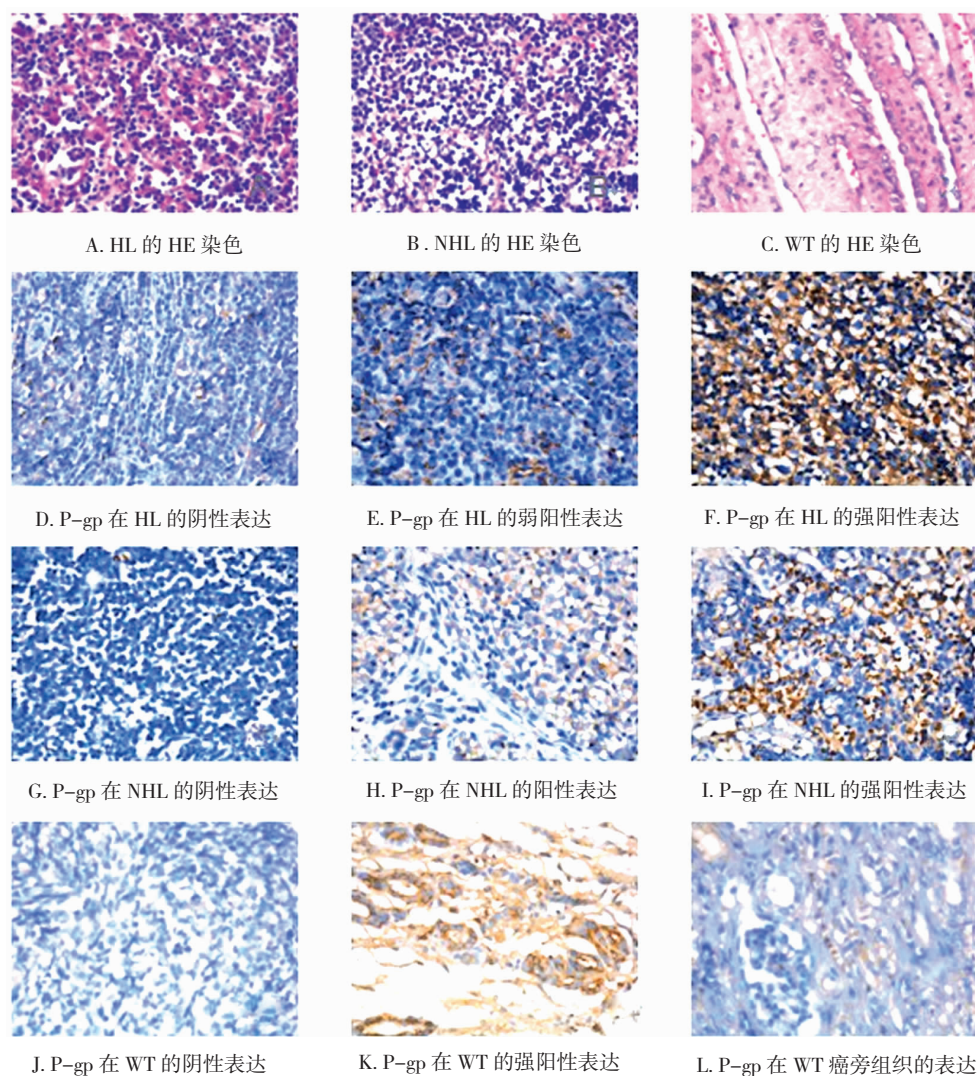


图 1 P-gp 在 HL、NHL、WT 及 WT 癌旁组织中的表达

Fig.1 Expressions of P-gp in HL, NHL, WT and adjacent normal tissues of WT

在 WT 和癌旁组织中均表达,阳性表达率分别为 65.6%(21/32)、70.0%(7/10),其中主要表达于肾小管,而肾小球中未见阳性表达。P-gp 在 WT 和癌旁对照组中的表达差异无统计学意义($P=1.00$)(图 1 J-L)。

2.2 P-gp 表达水平与淋巴瘤临床病理特征的关系

HL 中 P-gp 阳性表达率与患儿 LDH、有无纵膈病变差异有统计学意义($P=0.03$ 、 $P=0.05$);复治患者 P-gp 的表达(100.0%)高于初治患者(55.2%),但差异无统计学意义($P=0.24$)。NHL 中 P-gp 的阳性表达率与临床分期差异有统计学意义($P=0.02$),而与国际预后指数(international prognostic index, IPI)评分、治疗情况、有无纵膈病变及临床分型差异无统计学意义($P=0.67$ 、 $P=1.00$ 、 $P=0.67$ 、 $P=0.77$);见表 1。

2.3 P-gp 的表达与 WT 的临床病理特征的关系

WT 患儿的临床分期、有无淋巴结转移及术前化疗的时间对 P-gp 的阳性表达率的影响差异无统计学意义($P=0.25$ 、 $P=0.64$ 、 $P=0.45$);FH 与 UH 两者差异无统计学意义($P=0.53$)。见表 2。

3 讨论

恶性肿瘤是主要的致死性疾病之一,对人类生存构成了严重的威胁。目前化疗是临床上恶性肿瘤的主要治疗方法之一,但肿瘤细胞的多药耐药,使其不能被有效杀灭而导致化疗失败。MDR1 基因是最早被发现,也是最重要的多药耐药相关基因。P-gp 是一种由 MDR1 基因编码的膜糖蛋白,具有跨膜转运泵的功能,能与抗癌药物结合,将药物从胞内泵出胞外,使得胞内的药物浓度下降,药物作用逐渐减弱甚至消失,以此产生耐药性^[5]。

国内向丽和金先庆的研究结果^[6]显示,P-gp 在 HL、NHL、WT 的阳性表达率分别为 90.0%、80.0%、85.7%。钱素英等^[7]用 RT-PCR 法检测 MDR1 基因在 NHL 中的表达为 59.1%。国外 Teixeira 等^[8]最近研究显示 P-gp 在 WT 中的阳性表达率为 45%。本实验检测经典耐药蛋白 P-gp 在儿童 HL、NHL、WT 中的阳性表达率分别为 57.7%、70.8%、65.6%,均呈高表达,相比国外而言,P-gp 在我国耐药方面更据主要地位,这提示可能 P-gp 介导的耐药机制是我国这些儿童肿瘤产生耐药的主要机制之一。

目前国内单独针对于 HL 的耐药性研究较少,本实验显示 P-gp 在 HL 中不仅高表达,而且与 LDH、有无纵膈病变相关,表达差异性有统计学意义。P-gp 的阳性表达率在有纵膈病变明显高于无纵膈病变、LDH>220 $\mu\text{mol/L}$ 明显高于 LDH $\leq$ 220 $\mu\text{mol/L}$,这提示也许 P-gp 在肿瘤的预后方面具有重要的预测作

用,或可作为预后评估的独立指标。

国内现在对于 P-gp 的阳性表达率与 NHL 的临床病理特征的关系尚存在分歧,袁晓露^[9]研究显示 P-gp 的表达与年龄、性别、组织类型、临床分期等无关,与 LDH、IPI 评分、组织大小、化疗效果相关,而温晓莲^[10]研究显示 P-gp 在 NHL 中的表达和年龄、性别、IPI 无明显相关性,与 LDH、临床分期相关。本实验研究显示,P-gp 的表达与 NHL 的 IPI 评分、治疗情况、有无纵膈病变无相关,而与临床分期存在相关,即 P-gp 在 III、IV 期患儿中明显高于 I、II 期的表达,也就是说 III、IV 期患儿可能具有更强的耐药性,预后相对较差。

国内近 5 年来关于 WT 中耐药蛋白的表达研究较少,有报道^[11]显示多药耐药相关蛋白 1 在 WT 癌旁组织中高表达(61.1%),而在 WT 中低表达(16.7%),这显示 WT 的癌旁组织中存在耐药蛋白的高表达。本研究显示,WT 的癌旁对照组中 P-gp 的表达与 WT 组织中的表达差异无统计学意义,产生这种现象的原因可能有:①P-gp 在人体正常组织和癌组织中都有不同程度的表达,主要分布于有分泌功能的上皮细胞中^[8],其中肾上腺、肺脏、胃肠、胰腺、肾脏等组织中表达较高^[12];②本实验组选取的肿瘤组织术前均有化疗,这可能使得本研究的 WT 和癌旁组织中 P-gp 的表达量都较高;③由于儿童 WT 属于分化不全所致的肿瘤,在临床上经过术前诱导化疗,可使部分肿瘤细胞诱导分化成正常的肾脏细胞。何小伟等^[13]用维甲酸分化诱导移植 WT 的裸鼠研究结果显示维甲酸通过诱导 WT 分化发挥抑瘤作用。

van Kalken 等^[14]证实了 P-gp 在 WT 的表达依赖于分化管状结构的程度。国内也有文献报道^[15-16]WT 的上皮细胞的表达与预后也存在明显负相关。本实验也观察到 P-gp 主要表达在肾小管样的上皮细胞中,而在胚芽型组织中表达较弱,因此 WT 中 P-gp 的阳性表达率与肿瘤的预后存在负相关。

随着研究的不断深入,多药耐药的逆转已取得了诸多可喜的成果^[17-18],但肿瘤的耐药是一个多因素、多基因共同参与的过程,临床上的耐药问题远没有得到很好的解决,很多具体的问题仍需要进一步的探讨与研究。明确各种肿瘤所对应的耐药蛋白的表达程度,为临床选择有效的、敏感的化疗药物提供指导,减少治疗的盲目性,提高预见性,改善患者的预后状况,提高患者生存质量。

参 考 文 献

- [1] 栾 佐.儿童恶性淋巴瘤的诊断与治疗[J].实用儿科临床杂志, 2005,20(1):1-2.
- Luan Z.Diagnosis and treatment of children lymphoma[J].Journal of applied Clinical Pediatrics, 2005,20(1):1-2.
- [2] 陶晓明,张 华.侵袭性非霍奇金淋巴瘤的治疗进展[J].内科, 2011,6(5):494-496.
- Tao X M,Zhang H.Advances in the treatment of aggressive non Hodgkin's lymphoma[J].Internal Medicine of China, 2011,6(5):494-496.
- [3] 金先庆,施诚仁.儿童实体瘤诊疗指南[M].北京:人民卫生出版社, 2011:51.
- Jin X Q,Shi C R.Guide of diagnosis and treatment in pediatric solid tumor[M]. Beijing:People's Health Publishing House, 2011:51.
- [4] 张冠军,梁 华,王春宝,等.NDRG-1 及 MMP-7 在肾细胞癌中的表达及意义[J].肿瘤防治研究, 2012,39(1):54-58.
- Zhang G J,Liang H,Wang C B,et al.Expression and significance of NDRG-1 and MMP-7 in renal cell carcinoma[J].Cancer Research on Prevention and Treatment, 2012,39(1):54-58.
- [5] Nooter K,Sonneveld P.Multidrug resistance(MDR) genes in haematological malignancies[J].Cytotechnology, 1993,12(1-3):213-230.
- [6] 向 丽,金先庆.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[J].重庆医学, 2010,39(1):7-9.
- Xiang L,Jin X Q.Research on expression and clinical application of P-gp,MRP1,LRP,GST- π ,Topo-II in children with malignant tumor[J].Chongqing Medicine, 2010,39(1):7-9.
- [7] 钱素英,毛联钢,吴宁宁,等. BCRP 及 MDR1 在非霍奇金淋巴瘤的表达及预后分析[J].实用肿瘤杂志, 2009,3(3):266-268.
- Qian S Y,Mao L G,Wu N N,et al.Expressions of BCRP and MDR1 gene in patients with non Hodgkin lymphoma and its clinical significance[J].Journal of Practical Oncology, 2009,3(3):266-268.
- [8] Teixeira R A,Odone-Filho V,de Camargo B,et al.P-glycoprotein expression,tumor weight,age,and relapse in patients with stage I and II favorable-histology Wilms' tumor[J].Pediatr Hematol Oncol, 2011,28(3):194-202.
- [9] 袁晓露.P-gp,p53 在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的表达及其临床意义[D].黑龙江:佳木斯大学, 2008.
- Yuan X L.P-gp,p53 expression in large B-cell lymphoma and its significances[D].Heilongjiang:Jiamusi University, 2008.
- [10] 温晓莲.耐药蛋白 P-gp,Topo II 和 GST- π 在非霍奇金淋巴瘤中表达的意义[D].山西:山西医科大学, 2011.
- Wen X L.Resistance protein P-gp,Topo II and GST- π expression in non-Hodgkin's lymphoma[D].Shanxi:Shanxi Medical University, 2011.
- [11] 张宝欣,王常林,蔡炜嵩,等.多药耐药相关蛋白在肾母细胞瘤中的表达及临床意义[J].中国医科大学学报, 2002,31(6):449-451.
- Zhang B X,Wang C L,Cai W S,et al.Expression of multidrug resistance associated protein in nephroblastoma[J].Journal of China Medical University, 2002,31(6):449-451.
- [12] Westerlund M,Belin A C,Olson L,et al.Expression of multi-drug resistance 1 mRNA in human and rodent tissues;reduced levels in Parkinson patients[J].Cell Tissue Res, 2008,334(2):179-185.
- [13] 何小伟,高解春,袁胜涛,等.维甲酸对肾母细胞瘤分化诱导和生长抑制的实验研究[J].中华小儿外科, 2003,24(5):455-458.
- He X W,Gao J C,Yuan S T,et al.Experimental study of differentiation and growth suppression of Wilms'tumor in response to All-trans-retinoic acid[J].Chinese Journal of Pediatric Surgery, 2003,24(5):455-458.
- [14] van Kalken C K,van der Valk P,Hadisaputro M M,et al.Differentiation dependent expression of P-glycoprotein in the normal and neoplastic human kidney[J].Ann Oncol, 1991,2(1):55-62.
- [15] 董淳强.肾母细胞瘤的血管生成调节因子和多药耐药研究进展[J].中国临床新医学, 2009,2(6):657-660.
- Dong C Q.Reaserch of vascularization regulatory factor and multidrug resistance in Wilms tumor[J].Chinese Journal of New Clinical Medicine, 2009,2(6):657-660.
- [16] Camassei F D,Arancia G,Cianfriglia M,et al.Nephroblastoma: multidrug-resistance P-glycoprotein expression in tumor cells and intratumoral capillary endothelial cells[J].Am J Clin Pathol, 2002,117(3):484-490.
- [17] 张 政,翁敬锦,兰桂萍.重组人 p53 腺病毒注射液逆转鼻咽癌化疗耐药的研究[J].实用医学杂志, 2012,28(3):385-388.
- Zhang Z,Weng J J,Lan G P.Reversal of chemo-resistance in advanced nasopharyngeal carcinoma by injection of recombinant human p53 adenovirus[J].The Journal of Practical Medicine, 2012,28(3):385-388.
- [18] 桂 琳,李 静,陈宝安,等.环氧化酶-2 抑制剂联合苦参碱逆转 K562/A02 细胞多药耐药的研究[J].东南大学学报, 2012,2(5):174-178.
- Gui L,Li J,Chen B A,et al.Research of the cyclooxygenase-2 combined with matrine inhibitor multidrug resistance in K562/A02 cell[J].Journal of Southeast University, 2012,2(5):174-178.

(责任编辑:冉明会)