

肿瘤诊断与基因治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.01.001

外周血单个核细胞多药耐药相关基因含量监测
在儿童恶性肿瘤中的应用谭俊杰¹, 张鹏辉², 邹琳¹(重庆医科大学附属儿童医院: 1. 临床分子医学中心; 2. 临床检验中心, 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,
儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:建立检测多药耐药(multi-drug resistance, MDR)相关基因荧光定量 RT-PCR 方法,并动态监测肿瘤患者外周血 MDR 相关基因(MDR1、MRP1 和 LRP)含量,探讨是否根据这些基因含量来指导肿瘤化疗。**方法:**利用 Taq-Man 探针方法,建立检测 MDR 相关基因的荧光定量 RT-PCR 方法。以健康对照组 50 例,肿瘤(含淋巴瘤、神经母细胞瘤、卵黄囊瘤等)组 262 例,化疗不同时期抽取患者外周血 950 份,提取 RNA,检测单个核细胞内 MDR 相关基因(MDR1、MRP1 和 LRP)含量,分析这些基因的含量与肿瘤化疗方案的关系。**结果:**成功建立以 Taq-Man 探针为基础的 MDR 相关基因荧光定量 RT-PCR 方法。①与健康对照组相比,肿瘤组患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear, PBMC)MDR1 基因起始含量较高,尤以神经母细胞瘤和卵黄囊瘤为甚,这 2 类肿瘤可能存在一定程度的原发耐药性。②对同一肿瘤患者,化疗后 PBMC MDR1 含量随化疗疗程增加而逐渐增高,以神经母细胞瘤和卵黄囊瘤最为敏感。**结论:**MDR1、MRP1 和 LRP 含量与肿瘤的化疗方案密切相关, PBMC 和肿瘤组织中 MDR1 的表达与化疗疗效呈显著负相关。检测外周血中 MDR1 基因的含量能够动态监测肿瘤患者的 MDR,利用荧光定量 RT-PCR 方法动态监测肿瘤患者化疗前后外周血 MDR 相关基因(MDR1、MRP1 和 LRP)的含量,对化疗疗效监测及预后判定具有一定的参考价值,可以用来指导相关基因底物的肿瘤药物化疗。

【关键词】多药耐药;外周血;荧光定量 RT-PCR;儿童肿瘤**【中图分类号】**R737.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-05-12Measuring multiple drug resistance related gene expression in the
mononuclear cells of periphery blood in child malignant tumorTan Junjie¹, Zhang Penghui², Zou Lin¹

(1. Center for Clinical Molecular Medicine; 2. Clinical Laboratory Center, Key Laboratory of Developmental Disease Co-founded by Provincial Government and Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders in Chongqing, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish the fluorescence quantitative RT-PCR method to measure multiple drug resistance (MDR) related genes in patient's periphery blood and to explore the feasibility of tumor chemotherapy instruction by dynamically detecting these genes in blood of patients with tumor. **Methods:** Taq-Man probe was applied to establish the fluorescence quantitative RT-PCR method to measure MDR related genes. Periphery blood was collected from 262 patients with tumor (including lymphoma, neuroblastoma, yolk sac tumor, etc.) and 50 healthy persons were taken as normal controls. Mononuclear cells were isolated from these samples, then RNAs were purified and expression of MDR related genes (MDR1, MRP1 and LRP) was detected. Relationship between gene expression and tumor chemotherapy was analyzed. **Results:** Fluorescence quantitative RT-PCR method measuring MDR related genes was established successfully based on Taq-Man probe. Compared with that in normal control group, expression of MDR related genes (MDR1, MRP1 and LRP) was increased in mononuclear cells of periphery blood of patients with tumor. For one tumor patient, expression of MDR related genes (MDR1, MRP1 and LRP) was higher in mononuclear cells of post-chemotherapy than in those of pre-chemotherapy. Expression of MDR1, MRP1 and LRP was closely related with tumor chemotherapy scheme of patients. **Conclusions:** Expression of MDR related genes (MDR1, MRP1 and LRP) in periphery blood of tumor patients is dynamically measured by fluorescence quantitative RT-PCR method, which could instruct the gene related substrate chemotherapeutic drug.

【Key words】multiple drug resistance; periphery blood; fluorescence quantitative RT-PCR; child tumor

作者介绍: 谭俊杰, Email: tanjunjie924@yahoo.com.cn,

研究方向: 疾病的分子诊断。

通信作者: 邹琳, Email: zoulin_74@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 90919013, 30871103);

重庆市自然科学基金资助项目 (编号: 2010BA5008); 重庆

市卫生局中医处基金资助项目 (编号: 2008-2-59)。

恶性肿瘤是严重威胁人类健康疾病的主要病因,是造成人类死亡的第 2 大原因。化疗是根治恶性肿瘤、防止转移和复发的有效手段之一。而目前化疗中肿瘤多药耐药(multidrug-resistance,MDR)问题是严重影响化疗效果的瓶颈。MDR 现象是限制肿瘤患者化疗的重要因素之一,也是肿瘤术后复发转移及化疗失败的主要原因^[1]。由 MDR 基因 MDR1 编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)高表达是产生 MDR 的主要原因之一^[2]。其他的耐药基因也同时发挥了重要作用,如 MDR 相关蛋白 1(multidrug resistance-related protein 1,MRP1)^[3]。此外,肺癌耐药蛋白(lung resistance protein,LRP)也被认为与药物转运有关。

研究表明,MDR1、MRP1 和 LRP 与肿瘤的 MDR 性成明显正相关,且根据不同基因表达选择其适合底物的肿瘤化疗药物,对指导肿瘤化疗及疗效观察具有重要意义^[1-4]。本研究采用 real-time PCR 方法,动态监测已证实为多种实体瘤患儿化疗前后 MDR 基因的表达水平,并同正常儿童的检测结果进行比较分析,以研究其与化疗疗效的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

2008 年 1 月至 2010 年 12 月来我院肿瘤外科接受化疗的肿瘤患者 262 人,包括神经母细胞瘤 62 例、原始神经外胚叶瘤 26 例、非霍奇金淋巴瘤 40 例、卵黄囊瘤 48 例、霍奇金淋巴瘤 32 例、尤文瘤 22 例、肝母细胞瘤 32 例。其中男性 136 例,女性 126 例,年龄 9 个月~18 周岁,平均年龄 5.6 周岁。术前所有患者均无放、化疗和免疫治疗史,化疗时间间隔 3~4 周,化疗次数 4~10 次,平均 5.8 次。化疗不同时期收集外周血标本共 950 份,对照组为同时收集的体检人群中选择的无明显病症的健康人群正常人外周血标本 50 例。

1.2 主要仪器试剂和细胞株

定量 PCR 仪为 RG6000 荧光定量 PCR 仪(Corbet 公司生产),K562 细胞诱导的多药耐药质粒由重庆医科大学附属儿童医院儿童肿瘤研究室提供,TA 克隆载体为 TAKARA 公司生产的 pMD18-T Vector(Code No:D101A),RNA 提取试剂盒为 QIAamp RNA Blood Mini kit,逆转录试剂为 Promega Reverse Transcription System,PCR 试剂为 TIANGEN 公司生产的 Real Master Mix。

1.3 引物和探针

均由 TAKARA 公司合成,序列见表 1。

1.4 实验方法

1.4.1 建立标准曲线 以 K562 细胞诱导的 MDR 质粒为模板,PCR 扩增出 MDR1、MRP1、LRP 和 GAPDH 4 个基因,胶回收 PCR 产物,使用 pMD18-T Vector 将回收产物连接入载体。同时,将载体转化后 LB 培养基 37℃培养 8 h 后提取重组质粒^[4]。并将重组质粒送至重庆医科大学感染病重点实验室测序验证。

用德国 Eppendorf 公司生产的 Biometer 微量核酸/蛋白定量仪测定质粒浓度,根据公式:待扩增 DNA 浓度(拷贝/ml)=[质粒浓度 × 10⁻⁶/(平均相对分子质量 × 待扩增 DNA 的长度)] × 6.02 × 10²³,换算出质粒 DNA 浓度。将质粒进行梯度稀释,使待扩增质粒 DNA 浓度分别为:1 × 10⁶、1 × 10⁵、1 × 10⁴、1 × 10³ 拷贝/ml。荧光定量 PCR 反应体系为:2 × real-time PCR Master Mix 8 μl,增强子 1 μl,ddH₂O 9.2 μl,引物 F(20 μmol/L)0.3 μl,引物 R(20 μmol/L)0.3 μl,探针(20 μmol/L)0.2 μl,cDNA 100 ng(1 μl)。阴性质控品采用灭菌超纯水。反应条件为:95℃预变性 7 min;95℃ 15 s,60℃ 30 s 45 个循环,60℃时采集荧光;反应结束后计算机根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理并绘制标准曲线。

图 1~4 分别为待扩增浓度为 10³~10⁶ 拷贝/ml 时,MDR1、MRP1、LRP 和 GAPDH 基因的标准曲线。由图 1~4 可见,其检测阈值(cycle threshold,CT)与其基因拷贝数之间呈良好的线性关系。

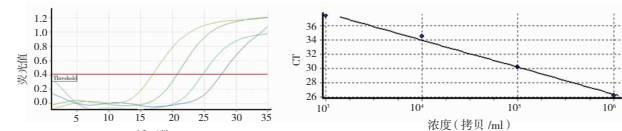


图 1 MDR1 标准曲线
Fig.1 Standard curve of MDR1

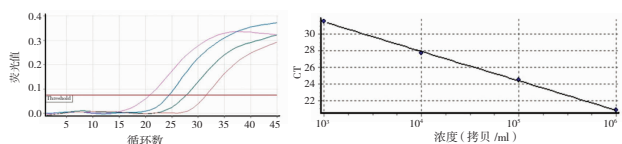


图 2 MRP1 标准曲线
Fig.2 Standard curve of MRP1

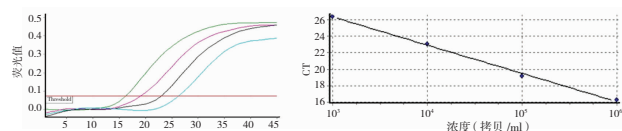


图 3 LRP 标准曲线
Fig.3 Standard curve of LRP

表 1 引物与探针的序列

Tab.1 Sequence of primer and probe

基因	正向引物	反向引物	探针
MDR1	5'-GCTGCTTTGATGTGCACGATGTTGG-3'	5'-ATTTTGTCCACCAATTCCTTCATTAA-3'	CTTAACACCCGACTTACAGATGAT-GTCTCCA
MRP1	5'-TGTGCCCTCCTCCAGACCT-3'	5'-AGACAGGTTACACGCCCT-3'	CCCAGTGGGGATCGGACAGAG
LRP	5'-GGGCTTGCTGCTGTTTATG-3'	5'-AGCCGGATCTCGAGGTCAGCG-3'	CAGGGCAAGTTCGGCTTCGCC
GAPDH	5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3'	5'-AGTCCTCCACGATACCAAAGT-3'	ATCATCAGCAATGCCTCTGCACCA

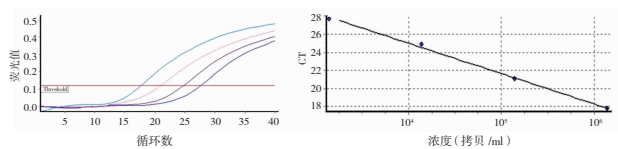


图 4 GAPDH 标准曲线
Fig.4 Standard curve of GAPDH

1.4.2 提取 RNA 使用 QIAamp RNA Blood Mini kit,按照试剂盒说明书从外周血中提取 RNA,吸光度(absorbance,A)_{260nm/280nm} 值测浓度,凝胶电泳验证 RNA 完整性。

1.4.3 逆转录 cDNA 使用 Promega Reverse Transcription System 将 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。反应条件为:37 ℃ 20 min 后 95 ℃ 5 min。合成的 cDNA 置于-20 ℃中备用。

1.4.4 荧光定量 PCR 检测 cDNA 中 MDR1、MRP1 和 LRP 基因表达含量 使用与标准曲线相同体系和条件扩增样本 MDR1、MRP1、LRP 和 GAPDH 基因,其绝对定量结果由软件根据标准曲线自动算出,3 种耐药基因的绝对表达数值分别由图 1~3 的标准曲线得出,再由图 4 的标准曲线可得出其 GAPDH 基因的绝对表达数值,耐药基因表达强度表述为拷贝数/GAPDH 10⁴ 拷贝。

1.5 统计分析

使用 SPSS 10.0 软件对 2 组数据进行差异性分析,采用 *t* 检验和 χ^2 检验方法,同时,对 MDR1 基因表达量的变化,采用重复测量方差分析方法,比较各组不同时间的测定值有无差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 化疗前不同肿瘤患者与对照组外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear,PBMC)中 3 种耐药基因表达水平的比较

详细结果见表 2。

2.2 不同肿瘤化疗期间患者 MDR1 基因表达水平变化情况

在未改变化疗方案前提下,3 种类型肿瘤(神经母细胞瘤,卵黄囊瘤和淋巴瘤)外周血 MDR1 表达量随化疗疗程的增加而表达增高($P\leq 0.05$),而肝母细胞瘤 MDR1 表达量则变化不显著,见表 3、图 5。其中,神经母细胞瘤和卵黄囊瘤 MDR1 表达量与化疗前比较,从第 2 次起具有统计学差异($P<0.05$);淋巴瘤 MDR1 表达量与化疗前比较,从第 3 次起具有统计学差异($P<0.05$);肝母细胞瘤 MDR1 表达量变化均不显著。可见,对部分类型肿瘤患者,化疗后 PBMC MDR1 含量较化疗前逐渐增高,且神经母细胞瘤和卵黄囊瘤最为敏感。

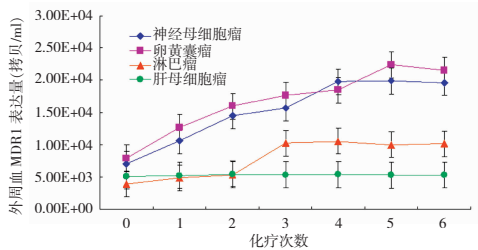


图 5 不同肿瘤患儿化疗过程中外周血 MDR1 表达的变化
Fig.5 MDR1 expression changes with peripheral blood in different tumor during chemotherapy in patients

表 2 化疗前不同肿瘤患者与健康对照组PBMC中 3 种耐药基因表达水平 (以 GAPDH 10⁴ 拷贝为参考)
Tab.2 Expression levels of three drug resistance genes in PBMC of patients with different tumors and healthy controls before chemotherapy (taking GAPDH 10⁴ copies as references)

肿瘤分类	例数 (n)	MDR1表达强度	MRP1表达强度	LRP表达强度
神经母细胞瘤	62	(6.99 ± 0.42) × 10 ³	(1.24 ± 0.15) × 10 ³	42.50 ± 2.10
原始神经外胚叶瘤	26	(2.86 ± 0.44) × 10 ³	(1.79 ± 0.12) × 10 ³	25.50 ± 1.70
卵黄囊瘤	48	(7.94 ± 0.26) × 10 ³	(1.91 ± 0.12) × 10 ³	35.20 ± 2.70
霍奇金淋巴瘤	32	(3.80 ± 0.15) × 10 ³	(1.29 ± 0.20) × 10 ³	30.10 ± 2.60
非霍奇金淋巴瘤	40	(3.90 ± 0.47) × 10 ³	(1.48 ± 0.29) × 10 ³	33.50 ± 2.60
尤文瘤	22	(3.32 ± 0.17) × 10 ³	(1.93 ± 0.16) × 10 ³	29.70 ± 1.90
肝母细胞瘤	32	(3.39 ± 0.26) × 10 ³	(1.38 ± 0.27) × 10 ³	38.70 ± 3.50
正常对照	50	(2.45 ± 0.47) × 10 ³	(1.53 ± 0.59) × 10 ³	31.60 ± 4.22

表 3 不同肿瘤患者化疗过程中外周血 MDR1 表达水平 (以 GAPDH 10⁴ 拷贝为参考)
Tab.3 MDR1 expression levels in peripheral blood of different tumor patients during chemotherapy (taking GAPDH 10⁴ copies as references)

化疗次数	神经母细胞瘤	卵黄囊瘤	淋巴瘤	肝母细胞瘤
化疗前	(6.99 ± 0.42) × 10 ³	(7.94 ± 0.26) × 10 ³	(3.90 ± 0.47) × 10 ³	(5.12 ± 0.26) × 10 ³
第 1 次	(10.60 ± 0.33) × 10 ³	(12.70 ± 0.36) × 10 ³	(4.85 ± 0.40) × 10 ³	(5.21 ± 0.21) × 10 ³
第 2 次	(14.50 ± 0.43) × 10 ³	(16.00 ± 0.35) × 10 ³	(5.32 ± 0.38) × 10 ³	(5.46 ± 0.19) × 10 ³
第 3 次	(15.70 ± 0.25) × 10 ³	(17.70 ± 0.29) × 10 ³	(10.20 ± 0.41) × 10 ³	(5.34 ± 0.23) × 10 ³
第 4 次	(19.80 ± 0.18) × 10 ³	(18.50 ± 0.21) × 10 ³	(10.50 ± 0.27) × 10 ³	(5.39 ± 0.13) × 10 ³
第 5 次	(19.90 ± 0.19) × 10 ³	(22.40 ± 0.22) × 10 ³	(9.97 ± 0.31) × 10 ³	(5.29 ± 0.17) × 10 ³
第 6 次	(19.60 ± 0.36) × 10 ³	(21.60 ± 0.33) × 10 ³	(10.20 ± 0.42) × 10 ³	(5.31 ± 0.23) × 10 ³

3 讨 论

化疗药物的耐受性是与耐药基因的表达强度相关的,因此检测耐药基因在耐药前后表达强度的变化就可以发现在耐药产生中可能起了比较重要的作用的基因^[6],对判定疗效及预后有一定指导意义,可在一定程度上指导化疗方案的修订或选择应用敏感化疗药物^[7]。在本项研究与实验结果中,由表 2 可见,与健康对照组相比,肿瘤组患 PBMC MDR1 基因起始含量相对较高,其中神经母细胞瘤和卵黄囊瘤表达强度与健康对照组相比具有显著性的统计学差异,可见这 2 类肿瘤可能存在一定程度的原发耐药性,这与临床上神经母细胞瘤和卵黄囊瘤患儿化疗效果较淋巴瘤差的结论比较吻合。

在本实验中,所有患儿 PBMC 的 MRP1、LRP 基因起始表达量与健康对照组无明显差异,化疗后也只有少数患儿 PBMC 中出现表达增加,但整体无统计学意义,这可能与这 2 个基因本身表达水平较低有关,在后续的研究中还需加大样本量并优化反应条件来进一步进行验证。在本实验中还发现,如神经母细胞瘤患儿,随着化疗次数的增加,患儿的 PBMC 中 MDR1 表达量逐渐增加,而化疗方案调整后,外周血中 MDR1 表达量出现一段时间的下降或维持某一水平不上升,提示可以通过动态监测外周血 MDR1 的表达量,及时调整化疗方案,以防止肿瘤耐药。因本实验中此类样本量较少,确定化疗患儿 PBMC 中 MDR1 超量表达,调整化疗方案的阈值,尚需结合临床进行大量标本的检测后才能得出。

虽然以往的研究报道中提出,直接获取肿瘤组织并检测其 MDR 相关基因的表达能最直接真实反应其基因表达水平,但临床上取样较为困难。相反,检测外周血中的 MDR 基因表达较为容易,临床上可定期反复抽取样本。同时,也有研究显示外周血 MDR1 基因的表达量与肿瘤的化疗敏感性间存在相关。从本实验结果也可以看出,针对不同类型的肿瘤,长期动态检测基因表达水平变化,对其治疗有更大的指导意义^[8-10]。

应用 Taq-Man 探针针对靶基因进行实时荧光定量分析,其探针特异地同模板结合,准确性、灵敏性都比普通 RT-PCR 高。可分为相对定量和绝对定量 2 类。绝对定量是靶基因根据其标准曲线得到的绝对拷贝数,相对定量是靶基因与内参基因绝对

拷贝数之间的比值。由于在实验中 RNA 提取、逆转录等效率不同,采用相对定量来分析结果会更准确。在本项研究中采用了此类方法,也是目前可以进行连续监测的。

综上所述,MDR1、MRP1 和 LRP 含量与肿瘤的化疗方案密切相关,外周血 PBMC 和肿瘤组织中 MDR1 的表达与化疗疗效呈负相关。检测外周血中 MDR1 基因的表达能够动态监测肿瘤患者的 MDR,利用荧光定量 RT-PCR 方法动态监测肿瘤患者化疗前后外周血 MDR 相关基因(MDR1、MRP1 和 LRP)的含量,对化疗疗效监测及预后判定具有一定的参考价值,在指导相关基因底物的肿瘤药物化疗等方面具有广泛的应用前景,也将为临床的合理用药提供理论和实践依据。

参 考 文 献

- [1] Bram EE, Stark M, Raz S, et al. Chemotherapeutic drug-induced ABCG2 promoter demethylation as a novel mechanism of acquired multidrug resistance[J]. *Neoplasia*, 2009, 11(12): 1359-1370.
- [2] 陈晓军, 丰有吉. 孕激素对肿瘤多药耐药的作用[J]. *中华妇产科杂志*, 2000, 35(4): 376-377.
- [3] Wu H, Halt WN, Yang JM. Small interfering RNA induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 1515-1518.
- [4] 邓晓斌, 王 珊, 邹 琳, 等. 小儿恶性肿瘤化疗前后外周血多药耐药基因、多药耐药相关蛋白基因、肺耐药蛋白基因的变化及临床意义[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(10): 1087-1090.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 3 版, 北京: 科学出版社, 2002: 663-666.
- [6] Herman B, John AF, Maxime PL. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated protein 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(9): 827-831.
- [7] Kwak JO, Lee SH, Lee GS, et al. Selective inhibition of MDR1 (ABCB1) by HM30181 increases oral bioavailability and therapeutic efficacy of paclitaxel[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 627(1/3): 92-98.
- [8] 黄广清, 赵 晶, 冯 霞, 等. 实体瘤患者外周血多药耐药基因表达与疗效观察[J]. *徐州医学院学报*, 2001, 21(4): 293-294.
- [9] 王 梅, 葛明建. 荧光定量 RT-PCR 法监测肺癌患者化疗前后外周血淋巴细胞 mdrl mRNA 的变化[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(19): 1979-1982.
- [10] Oue T, Yoneda A, Uehara S, et al. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies[J]. *J Pediatr Surg*, 2009, 44(2): 377-380.

(责任编辑: 关蕴良)