

膀胱癌多药耐药基因 *MDR-1* 与金属硫蛋白 -3 表达的关系

Relationship Between Expressions of MT-3 and MDR-1 in Bladder Cancer

朱 斌/杨罗艳/赵晓昆

(中南大学湘雅二医院泌尿外科,长沙 410011)

ZHU Bin, YANG Luo-yan, ZHAO Xiao-kun

(Department of Urology, Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

【摘要】背景与目的:探讨膀胱移行细胞癌中多药耐药基因(*MDR-1*)与金属硫蛋白-3(MT-3)的表达及其相互关系。材料与方法:采用RT-PCR对11例正常膀胱黏膜和23例膀胱移行细胞癌(BTCC)组织MT-3和*MDR-1* mRNA表达情况进行分析。结果:11例正常膀胱黏膜组织中*MDR-1*和MT-3 mRNA表达阳性率分别为9.1%(1/11)和0%(0/11),23例膀胱癌组织中*MDR-1*和MT-3表达阳性率分别为56.5%(13/23)和78.3%(18/23);膀胱移行细胞癌组织与正常膀胱黏膜中*MDR-1*、MT-3表达阳性率相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而*MDR-1*与MT-3的表达无明显相关关系($P > 0.05$)。结论:*MDR-1*可能为肿瘤组织分化程度的一个标志,MT-3的表达与膀胱移行细胞癌的早期诊断相关,可能成为一种新的肿瘤标志物。

【关键词】膀胱移行细胞癌;金属硫蛋白;多药耐药性

中图分类号:R737.14

文献标识:A

文章编号:1004-616X(2007)05-0412-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To investigate the role of MT-3 in transitional cell carcinomas of bladder and the possible relation with MDR-1. MATERIALS AND METHODS: Using RT-PCR technique, the expressions of MT-3 and MDR-1 mRNA in 11 specimens from normal bladder mucosa and 23 specimens from bladder transitional cell cancer (BTCC) were measured. RESULTS: MT-3 and MDR-1-positive expression rates were found in 0 and 9.1% in normal bladder mucosa, respectively. But they were 78.3% and 56.5% in 23 BTCC specimens, respectively. The positive rate was significantly higher in BTCC specimens than in normal tissue ($P < 0.05$). The expressions of MT-3 and MDR-1 were not related with the grade, stage and recurrence after postoperative intravesical chemotherapy. CONCLUSION: MT-3 mRNA could not be identified in normal bladder mucosa, but highly expressed in bladder neoplasm, MT-3 might be used as a tumor marker.

【KEY WORDS】 bladder neoplasms; metallothionein; multidrug resistance

肿瘤组织中金属硫蛋白(MTs)的表达是临床化疗药物耐药的机制之一。MTs蛋白包括4种亚型,MT-1和MT-2被认为在维持内环境中金属离子新陈代谢、对重金属的解毒作用中扮演重要角色^[1-2]。MT-4类似于MT-1和MT-2,可能参与锌离子水平的调节以及镉解毒作用,但与金属结合的特异性很难评估^[3]。而MT-3因其独特性,如金属离子不能诱导其合成,可抑制神经细胞生长,在缺锌的条件

下能更有效的分离锌等,而成为当前的研究重点。因此我们在基因水平上观察了MT-3在正常的膀胱黏膜组织和膀胱癌组织中的表达及其与MDR-1表达的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象及临床资料

23例膀胱移行细胞癌标本均取自2002年9月~

收稿日期:2006-07-31;修订日期:2007-04-28

作者简介:朱斌(1976-),男,湖南省株洲人,博士,主治医师,研究方向:泌尿系肿瘤发病机制及治疗。Tel: 13786150199, E-mail: Ronaldzhubin@163.com

2003 年 3 月间住院患者手术切除的膀胱肿瘤组织,经病理学检查证实。其中男 15 例,女 8 例,年龄 38-75 岁,平均年龄 58.4 岁;初发的肿瘤 17 例,经化疗药物膀胱内灌注后复发的肿瘤 6 例。多发肿瘤 11 例,单发肿瘤 12 例; ≥ 3 cm 的肿瘤 13 例, < 3 cm 的肿瘤 10 例。标本均在手术切取膀胱肿瘤时收取,取材后立即放入液氮,然后转入 -70 °C 超低温冰箱中保存待检。病理类型:23 例均为膀胱移行细胞癌,按 WHO 病理组织分级: G_1 4 例, G_2 8 例, G_3 11 例;临床分期按 TNM 标准, T_{is} - T_1 期 5 例, T_2 期以上 18 例,正常对照为经膀胱前列腺摘除术和膀胱切开取石术中的正常膀胱黏膜,并经病理科组织学检查为正常者。

1.2 主要试剂和仪器

UNI-Q-10 柱式总 RNA 抽提试剂盒、引物 Oligo(dT)18 购自上海生物工程公司, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; MMLV 逆转录酶、TaqDNA 聚合酶、dNTPs 均为 Promega 公司产品; PE2400 型 PCR 扩增仪(美国 PERKIN ELMER 公司产品), GEL DOC 2000 凝胶影像分析仪(BioRad 公司), ECP3000 型多用电泳仪(北京六一仪器厂), UV-2 型紫外透射分析仪(科学器材公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 引物 MT-3、MDR-1 引物分别由上海生物工程公司和上海捷倍思基因技术有限公司合成,分别为 MT-3:(F)5'-TTGGAGAAGCCCCGTTTCAC-3',(R)5'-TGGGATTTATTGTCATTCCCTCC-3'; MDR-1:(F)5'-ACTGAGC

CTGGAGGTGAAGA-3',(R)5'-CCACCAGAGAGCTGAGT TCC-3';内参照引物 β -actin:(F)5'-GTGGGGCGCCCCA GGCACCA-3',(R)5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGAT TTC-3';扩增片段的长度分别为 325 bp、396 bp 和 540 bp。其中 MT-3 引物参考文献[4]。

1.3.2 RT-PCR 检测 组织中 MT-3 和 MDR-1 总 RNA 抽提及其鉴定、cDNA 的合成和 PCR 检测参见分子克隆^[5];反应条件: β -actin 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 1 min 及 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环,最后 72 °C 延伸 2 min。MT-3 反应条件为:94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环;MDR-1 反应条件为:94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环。扩增后用 2% 的琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/ml 溴乙锭)进行电泳,在相应的位置出现对应大小的条带即为阳性。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 MT-3 和 MDR-1 的 RT-PCR 结果

13 例膀胱癌和 1 例正常膀胱粘膜标本在 396 bp 处显示 MDR-1 基因特异扩增片断(图 1),且各病理分级均有表达;18 例膀胱癌在 325 bp 处显示 MT-3 基因特异扩增片断(图 2),且各病理分级均有表达;正常膀胱粘膜标本中未见 MT-3 基因表达。

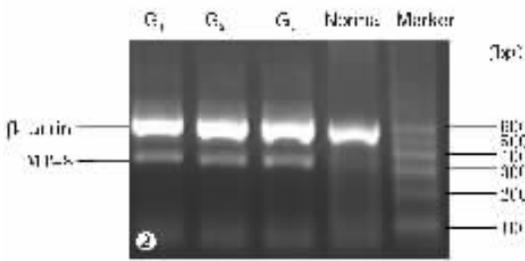
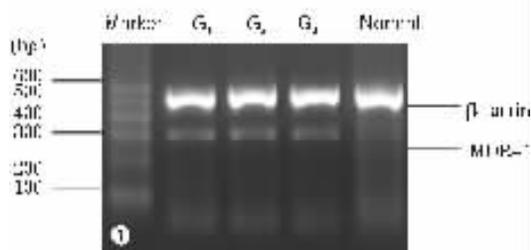


图 1 PCR 扩增的 MDR-1 的琼脂糖凝胶电泳结果。图 2 PCR 扩增的 MT-3 的琼脂糖凝胶电泳结果。Marker:DNA 分子量标准,Normal:正常对照膀胱黏膜; $G_1 \sim G_3$:BTCC 病理分级 1~3 级黏膜

Figure 1 Expression of MDR-1 mRNA in bladder cancer by RT-PCR. Figure 2 Expression of MT-3 mRNA in bladder cancer by RT-PCR. Marker: DNA marker; Normal: normal bladder mucosa; $G_1 \sim G_3$: bladder transitional cell cancer (BTCC) mucosa with pathological stage 1-3, respectively

2.2 MT-3 和 MDR-1 mRNA 表达与膀胱癌病理特征及生物学行为的关系

见表 1。与正常膀胱黏膜组织相比较,膀胱移行细胞癌中 MT-3 和 MDR-1 的表达阳性率均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在膀胱移行细胞癌组织中 MT-3 和 MDR-1 表达阳性率与肿瘤的病理分级、临床分期、术后化疗后复发、肿瘤的大小及数目均无明显相关性($P > 0.05$)。MT-3 与 MDR-1 的表达无明显相关性

($P > 0.05$)(表 2)。

3 讨论

有学者^[6]研究认为肿瘤对化疗药物的抗性是一个多因素的现象,MDR-1 仅为其中的一种,MDR-1 调控的耐药现象通过其编码的糖蛋白 P-gp 起作用。P-gp 为跨膜蛋白,能将细胞内药物主动泵出细胞外,降低细胞内药物蓄积,从而使肿瘤细胞逃脱化疗药物攻击,产生耐



表 1 MT-3 和MDR-1 mRNA表达与膀胱癌病理特征及生物学行为的关系

Table 1 Correlation between expression of MT-3 and MDR-1 mRNA and clinicopathological features of BTCC

Groups	n	MT-3		MDR-1	
		+	Positive rate (%)	+	Positive rate (%)
Normal bladder mucosa	11	0	0 [*]	1	9.1 [*]
BTCC	23	18	78.3 ^{**}	13	56.5 [*]
Pathological stage					
G ₁	4	4	100	2	50
G ₂	7	5	71.4	4	57.1
G ₃	12	9	75	7	58.3
Clinical stage					
Tis-T1	5	3	60	4	80
T2-T4	18	15	83.3	9	50
Tumor recurrence					
Without recurrence	17	13	76.5	10	58.8
Recurrence	6	5	83.3	3	50
Tumor quantity					
Multiple	11	10	90.9	7	63.6
Single	12	8	66.7	6	50
Tumor size					
≥3cm	13	10	76.9	7	53.8
<3cm	10	8	80	6	60

Compared with normal mucosa. ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01.

表 2 MT-3 和MDR-1 mRNA的相关性

Table 2 Correlation between expression of MT-3 and MDR-1 mRNA

Index	MDR-1		Total
	+	-	
MT-3 +	10	8	18
-	3	2	5

药性^[7]。MDR-1 不仅存在人体正常组织器官, 在一些恶性肿瘤中也表达。其表达水平高低与膀胱癌的临床分型及其预后有无直接关系尚需进一步研究。早期认为MDR-1 的表达水平预示化疗的抗性^[8], MDR-1 表达水平越高, 肿瘤的恶性程度、复发率越高预后较差^[9]。本研究发现 11 例正常膀胱组织中 MDR-1 的阳性率为 9.1% (1/11), 而在膀胱癌中阳性率为 56.5% (13/23), 提示在膀胱癌组织中 MDR-1 表达可以作为肿瘤组织分化程度的一个标志, 虽然 MDR-1 的阳性表达率随着膀胱癌的病理分级增高而增加, 但差异无统计学意义, 而且与肿瘤的临床分期、复发、肿瘤大小和数目也没有相关性, 说明肿瘤分化和进展并不能完全决定 MDR-1 表达。虽然 MDR-1 作为介导典型 MDR 的机制在人类许多肿瘤中表达, 但有些肿瘤的多药耐受不能或不能完全用 MDR-1/P-gp 的机制解释, 存在更为复杂的机制, 如金属硫蛋白以及谷胱甘肽相关酶类、MRP 等相互之间的调节。

MT-3 基因于 1992 年首次分离出来, 位于 16q13 染色体上, 有一个独特的 8 氨基酸序列, 即 C 末端 6 肽氨基酸序列 (EAAEAE) 和 N 末端苏氨酸, 这个序列提示 MT-3 表达可能充当肿瘤的标志物。近年越来越多的资

料显示 MT-3 与肿瘤的关系密切。Dutta 等^[10] 发现将 MT-3 基因转染至前列腺癌 PC-3 细胞后, MT-3 过度表达可提高癌细胞的耐药性。在本研究结果中, 11 例正常膀胱粘膜标本中无 MT-3 mRNA 表达; 23 例膀胱肿瘤中 MT-3 mRNA 的阳性率为 78.3%, 两组间比较差异具有统计学意义 (P < 0.01), 与文献^[11] 报道一致, 该结果提示 MT-3 可作为膀胱肿瘤诊断和鉴别诊断的参考指标。最近研究结果表明^[12-13] MTs 含量与膀胱癌患者预后密切相关。在乳腺导管原位癌中, MT-3 过表达的患者的 5 年存活率明显下降^[14]; 但在本研究中, MT-3 的阳性表达率与膀胱肿瘤的临床分期、病理分级、肿瘤复发无明显相关性。

本研究选取 BTCC 患者评估 2 种耐药指标对耐药的预测作用, 结果提示, 选用 MT-3 耐药谱之外的药物作为早期膀胱癌的初始化疗药, 其疗效可能更佳。目前认为肿瘤耐药性与原癌基因 Ras 突变关系密切, 有研究报道 Ras 基因可明显调节 MDR-1 基因的表达^[15-16], 以及将 c-Ha-ras 转染 NIH3T3 细胞, 可激活 MT 的产生^[17], 从而促使肿瘤耐药性的产生。本研究可能由于收集的肿瘤标本量不够, 未发现两组之间有相关性 (P > 0.05); MDR 形成是一个诸多因子参与的复杂生物过程, MT-3 的过度表达很可能影响锌离子的浓度, 从而影响某些需要 Zn²⁺ 的蛋白的功能, 例如 Ras、p53 等, 但是它们之间具体机制及相互作用程度, 仍不清楚, 此推测有待进一步验证。

参考文献:

- [1] Kagi JHR, Hunziker P. Mammalian metallothionein[J]. *Biol Trace Element Res*, 1989, 21(1): 111-118.
- [2] Goering PL, Klaassen CD. Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1983, 70(5): 1995-2003.
- [3] Meloni G, Zovo K, Kazantseva J, et al. Organization and assembly of metal-thiolate clusters in epithelium-specific metallothionein-4 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14588-14595.
- [4] Matthias P, Ebert TG, Juliane H, et al. Expression of Metallothionein II in Intestinal Metaplasia, Dysplasia, and Gastric Cancer[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(10): 1995-2001.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 2版. 北京: 科学出版社, 1995: 343-491.
- [6] 李文成, 陈在贤. 膀胱癌化疗耐药机制的研究进展[J]. *重庆医学*, 2002, 31(4): 339-341.

- [7] Nooterk KE, Herwijer H. Multidrug resistance (mdr) gene in human cancer [J]. *B J Cancer*, 1991, 63(7): 663 - 667.
- [8] Cao L, Duchrow M, Windhovel U, et al. Expression of MDR1 mRNA and encoding P-glycoprotein in archival formalin-fixed paraffin-embedded gall bladder cancer tissues[J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10): 1612 - 1617.
- [9] Tobe SW, Noble-Topham SE, Andrulis IL, et al. Expression of the multiple drug resistance gene in human renal cell carcinoma depends on tumor histology, grade, and stage [J]. *Clin Cancer Res*, 1995, 1(12): 1611 - 1615.
- [10] Dutta R, Sens DA, Somji S, et al. Metallothionein isoform 3 expression inhibits cell growth and increases drug resistance of PC-3 prostate cancer cells[J]. *The prostate*, 2002, 2(52): 89 - 97.
- [11] Sens MA, Somji S, Lamm DL, et al. Metallothionein isoform 3 as a potential biomarker for human bladder cancer [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(5): 413 - 418.
- [12] Yamasaki Y, Smith C, Weisz D, et al. Metallothionein expression as prognostic factor for transitional cell carcinoma of bladder [J]. *Urology*, 2006, 67(3): 530 - 535.
- [13] Wulfing C, van Ahlen H, Eltze E, et al. Metallothionein in bladder cancer: correlation of overexpression with poor outcome after chemotherapy[J]. *World J Urol*, 2007, 25(2): 199 - 205.
- [14] Sens MA, Somji S, Garrett SH, et al. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(1): 211 - 216.
- [15] Chin KV, Ueda K, Pastan I, et al. Modulation of activity of the promoter of the human MDR-1 gene by ras and p53 [J]. *Science*, 1992, 255(5043): 459 - 462.
- [16] Chen X, Qin ZY, Hu ZP, et al. Effects of Ras antisense oligoribonucleotide on multidrug resistance of pancreatic carcinoma Pc-2 cells [J]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2005, 27(5): 633 - 636.
- [17] Schmid CJ, Hamar DH. Cell specificity and an effect of ras on human metallothionein gene expression [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, 83(10): 3346 - 3350.

(上接第 402 页)

8. 所给药物的配制

通常水溶性化合物用生理盐水或去离子水(或蒸馏水)配制,不溶性物质用乙醇配(以上 3 种溶剂应使用药典允许的指定纯度产品),原来有许多使用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作为有机溶媒的报道,但近年来发现 DMSO 可诱导部分 MN 产生一些似是而非的结果,故 1991 年国际微核专家委员会建议不要用 DMSO 作为有机溶媒用于 MNT。使用混悬液时机体吸收效率低,此外溶媒也可能诱发 MN 形成或改变溶剂的性质而诱发 MN 形成,实验中应充分考虑这些因素。

9. 给药途径

被检化合物给药途径对 MNT 的影响, MMS/CSGMT 曾作出过共同评价,目前认为经腹腔给药是最为敏感的给药途径。对 17 种作用机理不同的诱变剂研究结果表明,在给药剂量较低时,腹腔注射给药能最灵敏地诱发 MN 形成。而高剂量接近耐受限量给药时,无论那种药途径均能诱发 MN 形成。给药途径不同,被检化合物进入体内的吸收、分布、代谢、排泄途径也不一致,实际工作中选择那种给药途径,应根据实验目的来确定。一般情况下,应选择实际可能的接触途径,如食品添加剂应选择经口给药。

10. 给药次数

MNT 出现的早期, Schmid 等推荐间隔 24 h 给药 2 次,在第 2 次给药后 6 h 取材制作观察标本。用这一方法检测了很多的化合物的诱变作用,并且发表了大量的文献。但是,按 MN 形成机理的时序,标本制作前 6 h 给药与 MN 形成基本无关。至于间隔多长时间给药、给药多少次以及何时采样制作观察标本,这些问题目前还没有令大家都满意的统一的答案。很多情况下一次给药足以诱发 MN 出现,但一般来说,多次给药效果更为明显。

有学者曾用阳性诱变剂阿糖胞苷(Ara-C)、6-巯嘌呤(6-MP)、丝裂霉素 C(MMC)模拟了连续给药后 MN 形成的经时变化过程。模拟实验结果与实测经时变化过程中 MN 出现的频率基本吻合。Salamone 等的研究结果也与本模拟结果相一致。但需注意的是,若被检化合物具有细胞毒性时,被检化合物多次给药可抑制骨髓细胞的增殖,从而减少 PCE 在整个红细胞中的百分比,进而影响 MN 的检出率。

MacGregor 等推荐的给药方案是以 24 h 的间隔连续给药 4 次,最后一次给药后 24 h 取材制作标本。但这一方案必须考虑 4 次连续给药可能抑制骨髓细胞增殖而影响 MN 检出频率。

我们认为选择给药次数的自由度较大,但必须充分考虑诸方面因素对实验结果的影响。

(下转第 417 页)

