

[文章编号] 1000-4718(2008)09-1850-03

· 短篇论著 ·

急性白血病患者 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1* 和 *lrp* 耐药基因表达的临床意义*

郑静, 胡建达[△], 张昭秀, 陈鑫基, 吕联煌

(福建医科大学附属协和医院,福建省血液病研究所,福建福州 350001)

[摘要] 目的: 定量检测急性白血病(AL)患者乳腺癌耐药相关蛋白基因(*bcrp*)、多药耐药基因(*mdr-1*)、多药耐药相关蛋白基因(*mrp-1*)及肺耐药相关蛋白基因(*lrp*)表达及其与临床的关系。方法:应用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR (real time fluorescent quantitative RT-PCR, FQ RT-PCR)检测 105 例 AL 患者 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 等基因的拷贝数,分析其与临床预后的关系。结果: AL 组 *bcrp* 基因拷贝数(2.8×10^3) \pm (8.4×10^3) 明显高于正常对照组(7.6×10^2) \pm (2.3×10^3), $P < 0.05$; *mdr-1* 基因拷贝数(1.3×10^5) \pm (2.2×10^5) 及 *lrp* 基因拷贝数(8.3×10^5) \pm (1.0×10^6) 显著高于正常对照组($P < 0.01$)。复发组 AL 患者的 *mdr-1* 拷贝数(3.7×10^4) \pm (1.1×10^5) 明显高于初治组患者(1.1×10^4) \pm (3.6×10^4), $P < 0.05$ 。在 AL 耐药组 *mdr-1* 拷贝数(2.1×10^4) \pm (9.1×10^4) 明显高于敏感组(1.0×10^4) \pm (3.8×10^4), $P < 0.05$ 。经直线相关分析显示 *mdr-1* 和 *mrp-1*, *mdr-1* 和 *lrp*, *mrp-1* 和 *lrp* 之间呈显著正相关,经等级相关分析显示 *mdr-1* 和 *lrp* 的表达与耐药性密切相关。结论:急性白血病多药耐药的出现与 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 中一项或几项过度表达有关,*mdr-1* 较其它基因更具有预测临床预后的意义。

[关键词] 白血病; 基因, MDR; 基因表达

[KEY WORDS] Leukemia; Genes, MDR; Gene expression

[中图分类号] R733.7 [文献标识码] A

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是导致急性白血病(acute leukemia, AL)化疗失败的主要原因之一。其机制复杂,涉及多方面因素。其中膜蛋白介导的药物外排机制已成为临床研究的重点。有关乳腺癌耐药相关蛋白基因(breast cancer resistance protein, *bcrp*)、多药耐药基因(multidrug resistance, *mdr-1*)、多药耐药相关蛋白基因(multidrug resistance-associated protein, *mrp-1*)、肺耐药相关蛋白基因(lung resistance protein, *lrp*)分别与 AL 临床关系的报道并不少见^[1-3],而在同一个体中较系统地研究这些基因与 AL 的关系则报道较少。为了更准确测定耐药相关基因的拷贝数,本文应用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(real time fluorescent quantitative RT-PCR, FQ RT-PCR)绘制标准曲线,检测 105 例 AL 患者 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 的拷贝数,以探讨其与临床预后的关系。

材 料 和 方 法

1 研究对象

AL 患者 105 例,为我院住院病人,按 FAB 诊断标准进行分型。其中,急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia, AML) 69 例,包括初治 54 例,复发 15 例,急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL) 36 例,包括初治 23 例,复发 13 例。男性 65 例,女性 40 例,中位年龄 30 岁(15-65

岁)。同时以 19 名健康人为正常对照组,男 10 例,女 9 例,中位年龄 28 岁。

2 临床耐药诊断标准^[4]

根据文献报道,对一线诱导化疗 2 个疗程无效者、第一次缓解后 6 个月内复发者、第一次缓解后 6 个月以后复发再经诱导化疗无效者、2 次或 2 次以上复发者,均为难治耐药。

3 分组标准

3.1 根据就诊时疾病状态将病人分为初治组和复发组。

3.2 根据临床耐药诊断标准,将病例分为敏感组和耐药组。其中敏感组 40 例、耐药组 43 例(门诊病人和化疗未滿 1 疗程即出院者皆不列入统计范围)。

4 细胞分离、总 RNA 提取、鉴定及 cDNA 合成

用淋巴细胞分离液分离白血病细胞和正常对照组单个核细胞,用 Trizol (Gibco-BRL) 提取总 RNA,经紫外分光光度计(DU640 型,Beckman)测吸光度值(A),定量 RNA, -80 °C 保存。cDNA 合成按反转录试剂盒(Promega)说明书进行。cDNA 作为 RT-PCR 反应的待测模板, -20 °C 保存。

5 荧光定量 RT-PCR 检测 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 基因的拷贝数

为了能够更准确地测定 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 这 4 个基因的拷贝数,我们建立了实时荧光定量 RT-PCR 检测上述 4 个目的基因。

[收稿日期] 2007-09-17 [修回日期] 2008-02-15

* [基金项目] 福建省科技三项费用基金资助项目(No. 2002Y048);福建省医学创新课题基金资助项目(No. 2001-cx-02)

△通讯作者 Tel: 0591-83357896-8377; E-mail: jdhu@medmail.com.cn

5.1 标准模板的制备 扩增目的基因片段,插入质粒载体,用于标准曲线的制备。

① 普通 RT-PCR 的扩增 半定量 RT-PCR 扩增检测 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1* 和 *lrp* 的 mRNA 表达。PCR 总反应体系 25 μ L,其中 cDNA 1.5 μ L、10 \times Mg-free-buffer 2.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、10 mmol/L dNTP 0.5 μ L、25 μ mol/L 引物各 0.5 μ L(β -actin 引物 0.2 μ L)、TaqDNA 聚合酶(华美公司)1.5 U。反应在 PCR 仪(2400 型,PE)上进行。先 99 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,再 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s。进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

② 纯化 PCR 产物 采用 QIAquick PCR 纯化试剂盒(Qiagen),按产品说明书进行操作。纯化的产物经电泳鉴定、定量。

③ PCR 产物与 T 载体(上海生工生物工程公司)连接。按产品说明书进行操作。

④ 转化感受态细胞 JM109。

⑤ PCR 鉴定白色菌落,筛选出带插入片段的菌落。

⑥ 扩增阳性菌落。

⑦ 提取纯化质粒 DNA。采用 QIAprep 质粒纯化试剂盒(Qiagen),按产品说明书进行操作。应用 PCR、酶切及测序鉴定重组质粒 DNA 的插入片段为准确的目的基因序列。构建好的含有目的基因插入片段的质粒用于定量 PCR 的标准曲线的制备。

5.2 定量 PCR 反应体系及反应参数 采用 TaqMan PCR core reagent kit(PE-ABI)在 ABI PRISMTM7700 定量 PCR 仪上进行,反应体系如下:cDNA 2 μ L,1 \times TaqMan buffer,MgCl₂ 2.5 mmol/L,dNTP 200 μ mol/L,上、下游引物各 0.3 μ mol/L,荧光探针 0.05 μ mol/L,AmqIiTaqGold 酶 1.25 U,加 ddH₂O 至 50 μ L。荧光探针由上海申友生物工程有限公司合成标记,在探针 5' 端标记上荧光报道基团 FAM,3' 端标记上荧光淬灭基团 TAMRA。反应参数参考前述的普通 RT-PCR。标准曲线的制备是以梯度稀释的含 10¹-10⁷ 拷贝数目的基因的质粒为模板进行扩增。

6 统计学处理

因结果数据为非正态分布,图形表示时经取以 10 为底的对数后转换为正态分布,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经 *t* 检验、直线和等级相关分析,应用 SPSS10.0 统计学软件处理。

结 果

1 标准曲线的制备

7700 PCR 仪可以对 PCR 扩增的整个过程进行实时监测,直观明了。通过分子克隆方法,制备了含有 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 4 个目的基因片段的质粒,经测序证实无误,可以用于定量 RT-PCR 标准曲线的制备。从扩增动力学曲线可以看出,不同起始拷贝数(分别为 10¹、10²...10⁷)进入 PCR 指数扩增期的起始点即循环阈值(cycle threshold,CT)不同,拷贝数越大,CT 值越小,越早进入指数扩增期。根据不同起始拷贝数标准模板与 CT 值关系的曲线,分别制备了 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1* 和 *lrp* 的标准曲线,相关系数为 0.986-0.999,斜率为 3.483-3.739。说明标准曲线稳定可行。

2 对照组与 AL 患者 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1* 和 *lrp* mRNA 拷贝数的比较

荧光 RT-PCR 检测了 AL 组和正常对照组的 4 个基因表

达量,其中 *bcrp*、*mdr-1* 和 *lrp* 基因在 AL 患者中拷贝数明显高于正常对照组,分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$,而 *mrp-1* 在两组间表达无明显差别(图 1)。

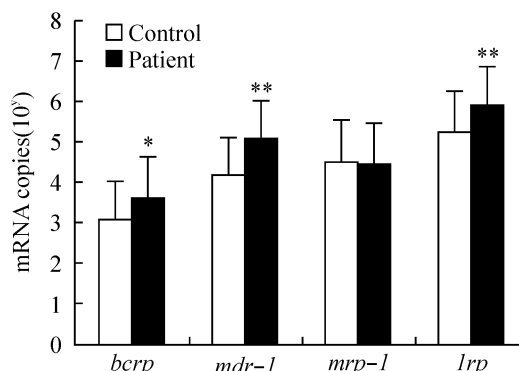


Fig 1 Comparison of the copies of *bcrp*, *mdr-1*, *mrp-1*, *lrp* between normal controls ($n = 19$) and AL patients ($n = 105$). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. AL: acute leukemia.

图 1 对照组和 AL 患者 4 个基因 mRNA 拷贝数的比较

3 初治与复发组 AL 患者 *bcrp*、*mdr-1* 等耐药相关基因 mRNA 拷贝数的比较

由图 2 结果可见,4 个基因中仅 *mdr-1* 的 mRNA 拷贝数在复发组明显高于初治组,差别显著, $P < 0.05$,而 *bcrp*、*mrp-1*、*lrp* 在两组间无明显差别。

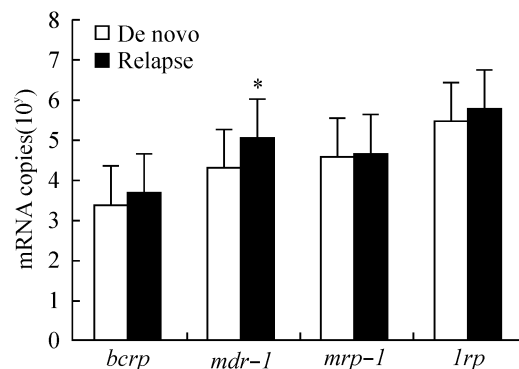


Fig 2 Comparison of the copies of *bcrp*, *mdr-1*, *mrp-1*, *lrp* between de novo ($n = 77$) and relapsed AL ($n = 28$). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs de novo (control).

图 2 初治与复发组 AL 患者 4 个基因 mRNA 拷贝数的比较

4 敏感组与耐药组 4 个基因 mRNA 拷贝数的比较

图 3 结果显示,*mdr-1* 基因拷贝数在耐药组的表达水平明显高于敏感组,差别显著, $P < 0.05$,余基因则在两组间差别无显著。

5 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1* 和 *lrp* 4 个基因直线相关分析

发现 *mdr-1* 和 *mrp-1*、*mdr-1* 和 *lrp*、*mrp-1* 和 *lrp* 之间呈显著正相关,相关系数 r 分别为:0.293、0.216 及 0.434, $P < 0.05$ 。

6 4 个基因与耐药性等级相关分析

结果显示 *mdr-1*、*lrp* 与耐药性密切相关,相关系数 r 分别为 0.389 和 0.212, $P < 0.05$ 。

讨 论

MDR 是白血病化疗失败的主要原因之一。其机制复杂,

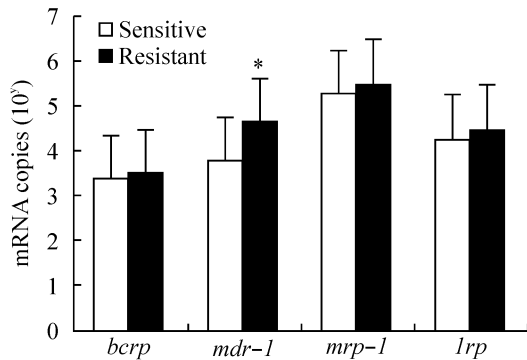


Fig 3 Comparison of the copies of 4 genes between sensitive groups ($n = 40$) and resistant groups ($n = 43$) in AL. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs sensitive groups (control).

图3 AL患者敏感组和耐药组4个基因mRNA拷贝数的比较

涉及多方面因素。其中膜蛋白介导的药物外排机制与临床耐药之间的关系是目前国内外研究的热点之一,我们选择了与其密切相关的 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1*、*lrp* 作为耐药相关基因的检测指标,应用实时荧光定量 RT-PCR 检测上述 4 个基因 mRNA 的拷贝数。结果发现 *mdr-1* 在 AL 组高于正常对照组,复发组高于初治组,耐药组高于敏感组,二者之间差别显著,且经等级相关分析也表明 *mdr-1* 与耐药性呈显著正相关,是判断预后的重要指标之一。*mrp-1* 基因位于人类 16 号染色体上,编码相对分子质量为 190 kD 的膜糖蛋白,属于 ATP 超家族成员。关于 *mrp-1* 与预后、*mrp-1* 与 *mdr-1* 之间的关系目前尚有争议^[5]。我们的结果显示 *mrp-1* 在初治组和复发组、敏感组和耐药组的 AL 患者间无明显差别,虽经直线相关分析发现 *mrp-1* 和 *mdr-1* 的表达之间具有显著正相关关系。但其独立预后因素来说,*mdr-1* 较 *mrp-1* 更具有预测 MDR 的意义。

在膜糖蛋白介导的耐药机制中,LRP 和 *bcrp* 是近年来新提出的两种与耐药有关的转运蛋白。其中 LRP 分子量为 110 kD,它不位于细胞膜上,而以颗粒的形式分布于细胞浆外部区域,推测其可能与核、浆及囊泡/溶酶体系统的物质转运有关。Van den Heuvel - Eibrink 等^[6]应用定量 PCR 研究了 20 对初治和复发难治 AML 病人 *lrp* 和 *bcrp* 表达水平,发现 *lrp* mRNA 表达随疾病的进展呈降低趋势,*bcrp* 则升高。我们的结果显示,*lrp* 在 AL 患者中的表达明显高于正常对照组,初治组与复发组之间表达水平却无明显差别。同时经直线相关分析又发现 *lrp* 和 *mdr-1*、*mrp-1* 之间呈显著正相关关系。这说明 *lrp* 可能引起非 *mdr-1* 所致的耐药机制,是一个独立的预后因素。而 *bcrp* 是 1998 年新从人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/Adr VP 中被克隆的又一与 MDR 相关的肿瘤耐药蛋白。有关 *bcrp* 在临床耐药及预后中的作用目前尚不明了。Uggla 等^[7]用 FQ RT-PCR 研究了 40 例 AML 患者 *bcrp* 表达情况,结果发现 *bcrp* 在敏感和耐药的病人间表达无明显差别。Damiani 等^[8]、Benderra 等^[9]的结果则相反,Damiani 应用定量 PCR 方法研究了 73 例正常表型 AML 患者 *bcrp* 和 *P-gp* 表达,结果发现 *bcrp* 和 *P-gp* 密切相关,*bcrp* 过表达不影响白血病患者临床缓解率,但影响了临床缓解期的长短。Benderra 应用 RT-PCR 和荧光技术检测了 149 例 AML 患者 *bcrp* 的表

达,结果发现 *bcrp* 阳性者的 4 年无病生存期明显低于阴性者。*bcrp* 过表达是临床复发与无病生存期较短的高风险因素。Galimberti 等^[10]还认为 *bcrp* 与 *mdr-1* 显著相关,*bcrp* 与 *mdr-1* 均阳性者,预后更差。我们的结果与 Uggla 研究结果相仿,AL 患者 *bcrp* 表达明显高于对照组,但该基因在初治组和复发组、敏感组和耐药组之间无显著差别。作为新的耐药相关基因,*bcrp* 在耐药机制中确切作用有待进一步探讨。本文应用实时荧光定量 RT-PCR 检测 *bcrp*、*mdr-1*、*mrp-1* 和 *lrp* 4 个基因的表达,所得到的结果更直观地反映 mRNA 起始拷贝数,与半定量 RT-PCR 相比,FQ RT-PCR 检测方法更加敏感。

[参 考 文 献]

[1] Trnkova Z, Bedrlíkova R, Markova J, et al. Semiquantitative RT-PCR evaluation of the MDR1 gene expression in patients with acute myeloid leukemia [J]. Neoplasma, 2007, 54(5): 383-390.

[2] Plasschaert SL, de Bont ES, Boezen M, et al. Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(24 Pt 1): 8661-8668.

[3] Plasschaert SL, Van Der Kolk DM, De Bont ES, et al. Breast cancer resistance protein (BCRP) in acute leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45(4): 649-654.

[4] 上海市白血病协作组. 急性白血病患者 P-gp, mdr-1, MRP 和 Topo II 表达及其与预后关系的研究 [J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(2): 90-93.

[5] Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, et al. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Eur J Cancer, 2006, 42(3): 295-309.

[6] Van den Heuvel - Eibrink BM, Wiemer EA, Prins A, et al. Increased expression of breast cancer resistance protein (*bcrp*) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia [J]. Leukemia, 2002, 16(5): 833-839.

[7] Uggla B, Stahl E, Wagsater D, et al. BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients [J]. Leuk Res, 2005, 29(2): 141-146.

[8] Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype [J]. Hematologica, 2006, 91(6): 825-828.

[9] Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(23): 7896-7902.

[10] Galimberti S, Guerrini F, Palumbo GA, et al. Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients [J]. Leuk Res, 2004, 28(4): 367-372.