

大肠癌组织中 ABCG2 的表达及临床病理意义

胡潇红 沙卫红 林锋 岑荣英 王启仪 廖山婴

【摘要】 目的 通过检测大肠癌组织中 ABCG2 在蛋白和 mRNA 水平的表达量,分析该基因及蛋白的表达与大肠癌临床病理的关系。**方法** 分别采用 SYBR Green 实时定量 RT-PCR 技术及免疫组化 SP 法检测 35 例大肠癌患者的癌组织及相应癌旁和远端正常组织中 ABCG2 基因的 mRNA 及蛋白的表达;评价其基因及蛋白的表达与临床病理参数的关系。**结果** 大肠癌组织中 ABCG2 蛋白的阳性表达率显著高于正常组织 ($P < 0.05$);ABCG2 mRNA 在癌组织中的表达显著高于癌旁及正常组织 ($P < 0.05$);ABCG2 的表达高低与肿瘤直径有关 ($\chi^2 = 5.55, P = 0.018$);肿瘤低分化患者 ABCG2 mRNA 阳性表达率明显高于肿瘤中-高分化患者;ABCG2 的表达与患者性别、年龄、淋巴结转移、Duke 分期及组织浸润深度无明显关系。**结论** 大肠癌 ABCG2 的表达水平与患者肿瘤发生、发展及分化程度密切相关,检测其表达水平不但可以预测大肠癌患者预后而且对指导制订化疗方案有一定参考价值。

【关键词】 肠肿瘤; 载体蛋白质类; 基因表达; 病理学,临床

The correlation between the expressions of ABCG2 and clinicopathological parameters of colorectal cancer HU Xiao-hong, SHA Wei-hong, LIN Feng, CEN Rong-ying, WANG Qi-yi, LIAO Shan-ying.

Gastroenterology Specialty, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China

Corresponding author: SHA Wei-hong, Email: wh-sha@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of ABCG2 in colorectal cancer and its correlation with clinical pathologies. **Methods** The expressions of ABCG2 mRNA in 35 cases of colorectal cancer, adjacent and distal non-cancerous tissues were quantified by SYBR Green real-time RT-PCR. The expression of ABCG2 protein and relationship with clinical parameters and the differential expression of genes were detected by immunohistochemistry (SP method). **Results** The protein positive rate of ABCG2 in colorectal cancer was significantly higher than that in normal tissue. There were statistically significant differences among cancer tissues, adjacent and distal non-cancerous tissues, and normal tissues for positive expression of ABCG2 mRNA ($P < 0.05$). There was significant correlation between the expression of ABCG2 and tumor diameter ($\chi^2 = 5.55, P = 0.018$). The mRNA expressions of ABCG2 in patients with poor differentiated tumors were much higher than those patients with well differentiated tumors. No correlation was found between the mRNA expression of ABCG2 and sex, age, lymph node metastasis, Duke staging and depth of invasion. **Conclusions** The expression of ABCG2 in colorectal cancer is closely related with the developing and differentiated of the tumors. To detect the levels of the ABCG2 expression not only can predict the patients' prognosis but also has reference value to guide the development of chemotherapy.

【Key words】 Intestinal neoplasms; Carrier proteins; Gene expression; Pathology, clinical

ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白是一类可以引起多药物耐药性的蛋白超家族。ABCG2 转运体是最晚发现的 ABC 转运蛋白,被认为是侧群(side population, SP)干细胞的表型,它结合并利用水解 ATP 的能量主动把不同化学结构和作用靶点的化疗药物泵出细胞外,产生抗药性,从而导致耐药及肿瘤发生或复发。ABCG2 作为从肿瘤组织中发现的一种耐药蛋白,其与大肠癌的关系备受关注。关于干细胞基因 ABCG2 在

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.12.079

基金项目:广东省自然科学基金(9151008004000014)

作者单位:510182 广州医学院消化内科学专业(胡潇红);广东省人民医院 广东省医学科学院消化内科(胡潇红、沙卫红、林锋、岑荣英、王启仪、廖山婴)

通讯作者:沙卫红,Email:wh-sha@163.com

大肠癌的表达及其与大肠癌临床、病理及预后治疗关系的研究相对较少,本研究对此进行探讨。

资料与方法

一、一般资料

收集2009年8~11月广东省人民医院外科35例大肠癌患者癌组织、癌旁(距肿瘤组织5 cm)及正常组织(距肿瘤10 cm以上)标本(33例原发肿瘤未经任何治疗,2例术后未行化疗复发患者)。其中男20例,女15例,年龄34~82岁,平均63.30岁。组织取材后立即放入液氮冻存备用。所有切除标本经病理学证实为大肠腺癌,其中高分化1例,中分化32例,低分化2例,其中伴结肠腺瘤或息肉患者2例。按照2003年国际抗癌联盟和美国肿瘤联合会联合制定的Duke分期法:A期1例,B期20例,C期12例,D期2例。有淋巴结转移者15例;所有病例术前未经任何抗肿瘤治疗。

二、试剂

兔抗人 ABCG2、GAPDH(北京博奥森生物技术有限公司);PromegaZ3100 总 mRNA 提取试剂盒;Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix(美国 Stratagene 公司);引物均由广州瑞真生物技术有限公司合成。

三、方法

1. 总 RNA 提取和 cDNA 合成:按照 PromegaZ3100 总 mRNA 提取试剂盒说明书提取 3 个部分标本组织总 RNA。RNA 纯度 A260/A280 比值均在 1.7~2.0。取 2 μg 总 RNA,用 M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司)进行 cDNA 合成, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 荧光定量 PCR 反应:ABCG2 上游引物:5'-GCAACCATCAATTCAGGCAAGA-3',下游引物:5'-GAAACACAACACTTGGCTGTAGCA-3';标准品内参基因 GAPDH 上游引物:5'-TGGTCTCCTCTGACTTCAAC-3',下游引物:5'-GTGAGGGTCTCTCTCTTCCT-3';应用 Brilliant SYBR Green QPCR 试剂盒进行荧光定量 PCR。Bmi-1、GAPDH 各 25 μl 反应体系:2 μl cDNA,12.5 μl mix,上游引物、下游引物各 0.5 μl ,0.375 μl 显色液,Nuclease-Free Water 9.125 μl ;反应条件:95 $^{\circ}$ 变性 1 min,78 $^{\circ}$ 45 s,72 $^{\circ}$ 40 s,反复循环 40 次。读板,检测荧光值。各目标基因的表达水平通过内参基因校正。比较肿瘤组织、癌旁组织及正常组织中基因表达差异。

3. 免疫组织化学染色:所有组织离体后液氮固定并做冰冻切片(厚 4 μm),按免疫试剂说明书对每例分别做常规 HE 和免疫组织化学染色。DAB 镜下控制显色,蒸馏水终止染色后苏木素复染细胞核。梯度酒精脱水,中性树脂胶封片。PBS 代替第一抗体作阴性对照,在光学显微镜下观察。免疫组织化学的结果判断采用病理学四级改良评分法分析组织中蛋白表达情况:按染色强度将其分为四级;无显色为 1 分,淡黄色为 2 分,棕黄色为 3 分,棕褐色为 4 分。按照阳性细胞所占的百分比计分:阳性细胞率 $\leq 25\%$ 为 1 分,阳性细胞率 $> 25\%$ 且 $\leq 50\%$ 为 2 分,阳性细胞率 $> 50\%$ 为 3 分。再通过二者相乘得到的积判断结果: ≤ 8 分(-~++) 归为低表达组, > 8 分(+++~++++) 归为高表达组。

4. 数据收集与处理:样品数据的收集由荧光定量 PCR 仪的支持软件 Opticon Monitor Analysis Software version 2.02 完成。组织样品数据由荧光定量 PCR 仪收集并处理,各目标基因的表达水平通过内参基因校正,mRNA 表达水平为目标基因总拷贝/GAPDH 总拷贝。

四、统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学处理,计数资料用 χ^2 检验,计量资料用 Mann-Whitney U 检验。

结 果

一、ABCG2 mRNA 在大肠癌组织、癌旁组织及远端大肠正常组织中的表达情况

ABCG2 mRNA 的阳性表达水平是目标基因总拷贝/内参基因 GAPDH 总拷贝;通过统计学检验在癌与正常组织($P=0.002$)、癌与癌旁组织($P=0.015$)间存在明显差异;癌旁与正常组织间无明显差异($P>0.05$)。大肠癌中 ABCG2 mRNA 表达水平与肿瘤直径相关,直径 > 3 cm 患者 ABCG2 mRNA 表达强度高于直径 ≤ 3 cm 者($P<0.05$);而 ABCG2 表达与患者性别、年龄、淋巴结转移、Duke 分期及组织浸润深度无明显关系($P>0.05$)(表 1)。

二、ABCG2 蛋白在大肠癌组织、癌旁组织及远端大肠正常组织中的表达水平

蛋白表达方面,经免疫组化染色阳性表达的 ABCG2 在大肠癌细胞胞质及胞膜呈弥漫性黄色或棕黄色;35 例患者中 ABCG2 蛋白在癌组织中阳性率明显高于正常组织(图 1)。经免疫组化染色,放大 40 倍后观察,显示肿瘤分化程度越低 ABCG2 蛋白表达强度越强,低分化腺癌组织中可见胞质及间质内弥漫性棕黄色染色,经病理评分计算 >8 分为 ABCG2 阳性高表达;中分化腺癌组织中可见胞质及间质内淡黄色弥漫性染色,经病理评分计算 <8 分为 ABCG2 阳性低表达(图 2~4);大肠癌中 ABCG2 蛋白表达水平与肿瘤直径相关,直径 >3 cm 患者 ABCG2 蛋白表达强度高于直径 ≤3 cm 者($P < 0.05$);比较低分化肿瘤与中、高分化肿瘤患者癌组织中 ABCG2 蛋白表达显示存在差异($P = 0.04$)。而 ABCG2 表达与患者性别、年龄、淋巴结转移、Duke 分期及组织浸润深度无明显关系(表 2)。

表 1 ABCG2 mRNA 表达与大肠癌临床病理因素之间的关系

| 项目 | 例数 | ABCG ₂ mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$) | P 值 |
|---------|----|---|------|
| 性别 | | | 0.39 |
| 男 | 20 | 0.018 ± 0.016 | |
| 女 | 15 | 0.030 ± 0.068 | |
| 年龄 | | | 0.27 |
| ≤50 岁 | 2 | 0.013 ± 0.088 | |
| >50 岁 | 33 | 0.025 ± 0.018 | |
| 肿瘤直径 | | | 0.02 |
| ≤3 cm | 9 | 0.013 ± 0.020 | |
| >3 cm | 26 | 0.025 ± 0.073 | |
| 淋巴结转移 | | | 0.30 |
| 无 | 20 | 0.027 ± 0.016 | |
| 有 | 15 | 0.027 ± 0.083 | |
| 浸润深度 | | | 0.22 |
| ≤肌层 | 9 | 0.024 ± 0.022 | |
| ≥浆膜层 | 26 | 0.020 ± 0.053 | |
| Duke 分期 | | | 0.28 |
| A + B | 21 | 0.017 ± 0.005 | |
| C + D | 14 | 0.033 ± 0.046 | |
| 分化程度 | | | 0.13 |
| 高、中分化 | 33 | 0.050 ± 0.060 | |
| 低分化 | 2 | 0.010 ± 0.003 | |

表 2 ABCG2 蛋白表达与大肠癌临床病理因素之间的关系[例,(%)]

| ABCG2 蛋白 | 性别 | | 年龄 | | 肿瘤直径 | | 淋巴结转移 | |
|------------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|
| | 男 | 女 | ≤50 岁 | >50 岁 | ≤3 cm | >3 cm | 无 | 有 |
| 低表达 | 8(40.0) | 3(20.0) | 0 | 11(33.3) | 1(11.1) | 11(42.3) | 7(35.0) | 4(26.7) |
| 高表达 | 12(60.0) | 12(80.0) | 2(100.0) | 22(66.7) | 8(88.9) | 15(57.7) | 13(65.0) | 11(73.3) |
| χ^2 值 | 1.59 | | 0.97 | | 5.55 | | 0.28 | |
| P 值 | 0.21 | | 0.32 | | 0.02 | | 0.60 | |

| ABCG2 蛋白 | 浸润深度 | | Duke 分期 | | 分化程度 | |
|------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | ≤肌层 | ≥浆膜层 | A + B | C + D | 高、中分化 | 低分化 |
| 低表达 | 3(33.3) | 8(30.8) | 7(33.3) | 4(28.6) | 24(72.7) | 0 |
| 高表达 | 6(66.7) | 18(69.2) | 14(66.7) | 10(71.4) | 9(27.3) | 2(100.0) |
| χ^2 值 | 0.02 | | 0.09 | | 3.60 | |
| P 值 | 0.89 | | 0.77 | | 0.04 | |

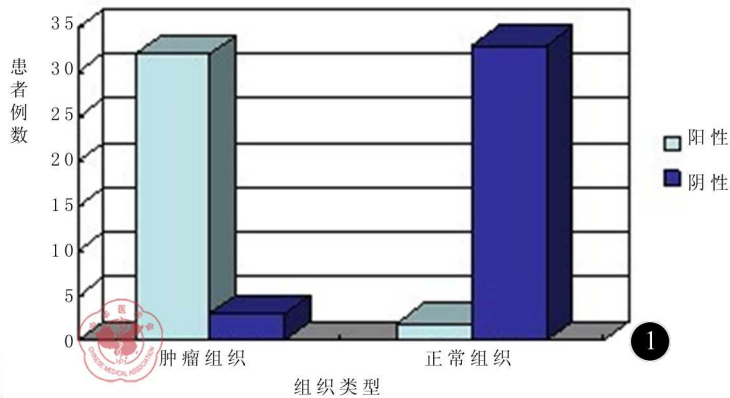


图1 35例患者肿瘤组织和正常组织中ABCG2蛋白表达情况

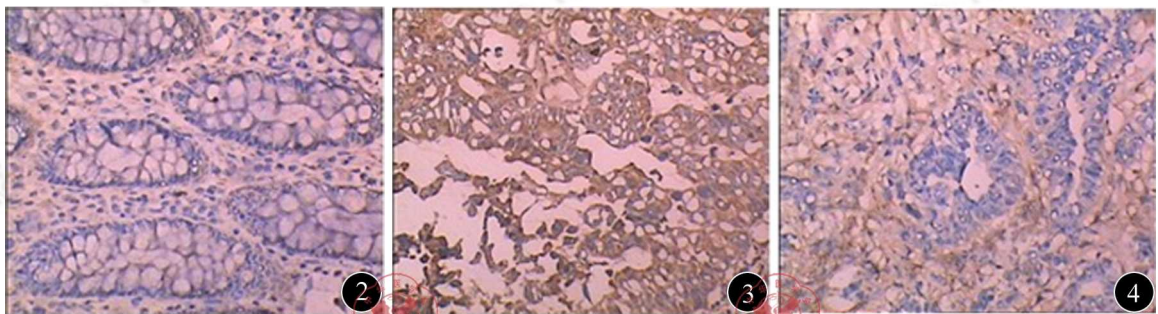


图2 阴性对照/正常组织染色后表达情况 (DAB显色, 苏木精复染 $\times 40$) 图3 低分化腺癌组织表达情况 (DAB显色, 苏木精复染 $\times 40$) 图4 中分化腺癌组织表达情况 (DAB显色, 苏木精复染 $\times 40$)

讨 论

结肠癌是威胁人类健康的主要问题,数据显示2007年美国有153 760例新发病例,52 180人死于该病,占有癌症死亡人数的10%左右^[1]。近几年我国大肠癌发生率逐渐升高,早期癌根治性治疗后5年生存率可高达90%^[2],但是难以早期发现并诊断,临床中存在大量初发及复发患者需要通过化疗提高生存率。而化疗药物耐药、肿瘤复发、转移等临床实际问题严重影响了患者的生存及预后,困扰众多医师。ABCG2转运体是最晚发现的ABC转运蛋白(也被称为BCRP),它结合并利用水解ATP的能量主动把不同化学结构和作用靶点的化疗药物泵出细胞外,产生抗药性,其作用效果与P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和多药耐药蛋白(multidrug resistance protein, MRP)相似^[3]。本实验通过SYBR Green II PCR技术及免疫组化技术对结肠癌组织、癌旁组织及正常组织进行ABCG2 mRNA和蛋白的检测,结果显示大肠癌组织ABCG2 mRNA阳性表达明显高于正常和癌旁组织;同时ABCG2蛋白在肿瘤胞质及胞膜上呈阳性表达,且明显高于正常组织,在正常组织中该蛋白表达水平不同提示在不同的个体中ABCG2表达活跃程度存在差异。Diestra等^[4]研究也发现ABCG2在多种实体肿瘤中有表达,其中以消化道肿瘤及肺相关肿瘤中表达最强。在哺乳动物体内ABC转运基因编码的蛋白定位于质膜和多种细胞器内,黏膜中ABCG2转运体发挥重要的防御功能,它在正常肠上皮内主动转运多种化合物穿过细胞膜,一方面为细胞提供防御功能,减少外来化学物质对细胞上皮的损伤;另一方面防止细胞过分暴露于毒素环境,避免诱导成为肿瘤。研究显示过分活跃的ABCG2存在遗传易感性并可导致肿瘤的发生^[5]。

同时本研究中ABCG2 mRNA及蛋白的表达与肿瘤直径有关,当肿瘤直径 >3 cm时ABCG2的表达强度明显高于直径 ≤ 3 cm肿瘤;在临床治疗方面,肿瘤直径较大的患者往往难以一次手术根治,常需要术前采用辅助化疗手段缩小瘤体提高患者根治性机会,所以检测ABCG2的表达情况有助于对患者进行术前评估。同时本研究显示肿瘤低分化患者ABCG2 mRNA及蛋白阳性表达率高于肿瘤中-高分化患者;与患者性别、年

龄、淋巴结转移、Duke 分期及组织浸润深度无明显关系。一般已分化瘤细胞从低分化到高分化呈连续光谱样变化。细胞体积逐渐变大,尤其胞核增大明显,胞浆由少量到相当丰富,或多或少地表现出相应正常细胞某些特点。本实验中肿瘤体积较大患者癌组织 ABCG2 存在高表达,影响化疗药物效果,导致肿瘤体积难以缩小、部分残留或继续增殖严重影响进一步的治疗,并导致肿瘤复发或转移。其次,ABC 转运体表达于部分肿瘤干细胞^[6],ABCG2 作为该家族一员表达在早期干细胞并随细胞分化逐渐停止表达,当干细胞表达 ABCG2 时,化疗仅攻击成熟肿瘤细胞,而具备增殖潜能的干细胞可以重新生长为肿瘤,所以肿瘤的复发和转移是肿瘤干细胞逃脱药物杀伤作用的结果。本研究仅对 ABCG2 的表达情况与肿瘤耐药性方面进行简单分析,需扩大样本例数延长随访时间进一步研究。基于以上分析研究结果提示高表达 ABCG2 的大肠肿瘤可能已经存在耐药性风险,文献提示选择有拮抗作用的化疗药物或者加入有拮抗作用的辅助药物可以提高化疗效果^[7-9]。但是尚有部分学者对肿瘤中 ABCG2 的表达情况存在异议^[10],可能是该基因引起肿瘤的发生存在其他生物学事件,尚需扩大样本量进一步证实。

目前尚未有特异的肠道肿瘤干细胞标记物,ABCG2 作为潜在的干细胞基因参与肿瘤的发生发展。通过研究、检测,该基因有助于提高大肠癌的检出率,进一步改善肿瘤患者的生存质量。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57:43-66.
- [2] 吴芳. 预测大肠癌化疗疗效的分子或基因指标. *癌症进展*, 2006, 4:248-254.
- [3] Wang YZ, Duan XL, Li YF, et al. Multidrug resistance mediated by half ABC transporter ABCG2. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36:1523-1529.
- [4] Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *J pathol*, 2002, 198:213-219.
- [5] Daniele C, Barbara P, Alwssio N, et al. A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Mutation Research*, 2008, 10:56-60.
- [6] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res*, 2007, 67:3716-3724.
- [7] Yoh K, Ishii G, Yokose T, et al. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum based chemotherapy for advanced non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10:1691-1697.
- [8] Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 2003, 22:7340-7358.
- [9] Yuan SQ, Zhou ZW, Liang YJ, et al. Correlation of chemosensitivity tested using histoculture drug response assay to expression of multidrug resistance genes and proteins in colorectal cancer tissues. *Ai Zheng*, 2009, 28:932-938.
- [10] Gupta N, Martin PM, Miyauchi S, et al. Down-regulation of BCRP/ABCG2 in colorectal and cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343:571-577.

(收稿日期:2011-05-04)

(本文编辑:巨娟梅)

胡潇红,沙卫红,林锋,等. 大肠癌组织中 ABCG2 的表达及临床病理意义[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(12):3436-3440.