

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.06.01

· 基础研究 ·

非小细胞肺癌体外化疗药物敏感性 与 GRP78 表达的相关性

王利菊 王琪 王镇山 于志红 王锦光 熊海 尹强 王莺燕 王涛 佟淑萍

【摘要】 背景和目的 糖调节蛋白 78 (GRP78) 在乳腺癌细胞中表达增高并与其对化疗药物的耐药性有关, 而非小细胞肺癌 (NSCLC) 中 GRP78 的表达与其对化疗药物的耐药性是否相关, 研究较少。本研究拟探讨 NSCLC 对 8 种化疗药物的体外敏感性与 GRP78 表达的相关性。方法 采用四噻唑蓝 (MTT) 法对 52 例手术切除的新鲜 NSCLC 组织进行 8 种化疗药物体外敏感性检测; 采用免疫组织化学方法检测其 GRP78 的表达水平。采用 Spearman 相关分析对 NSCLC 的耐药性与 GRP78 表达的相关性进行分析。结果 52 例 NSCLC 对紫杉醇 (PTX)、阿霉素 (ADM)、卡铂 (CBP)、拓扑替康 (TPT)、长春瑞滨 (NVB)、长春新碱 (VCR)、顺铂 (DDP) 和鬼臼乙叉苷 (VP-16) 8 种化疗药物的耐药率分别为 42.31%、57.69%、63.46%、65.38%、67.31%、73.08%、78.85%、90.38%, 其中 14 例表现为完全耐药。GRP78 的表达水平随着肺癌恶性程度的提高而增加, 且其高表达与肺癌细胞对 VP-16、ADM、VCR 和 TPT 的耐药具有相关性 ($P < 0.05$)。结论 MTT 法体外化疗药物敏感性实验对 NSCLC 的治疗具有一定的指导作用, GRP78 对判定 NSCLC 的恶性程度及其耐药性具有一定的参考意义。

【关键词】 非小细胞肺癌 糖调节蛋白 78 四噻唑蓝 体外药敏实验 耐药

【中图分类号】 R734.2; R73-36

Relationship between chemosensitivity *in vitro* and the expression of GRP78 in non-small cell lung cancer

WANG Liju*, WANG Qi, WANG Zhenshan, YU Zhihong, WANG Jinguang, XIONG Hai, YIN Qiang, WANG Yingyan, WANG Tao, TONG Shuping. * Department of Respiratory Diseases, the Dalian Friendship Hospital, Dalian, Liaoning 116001, P. R. China

Corresponding author: WANG Qi, E-mail: wqdl@263.net

【Abstract】 **Background and objective** The expressive level of glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated and correlated with resistance of chemotherapy drugs in breast cancer cell. However, little is known about the relationship between its expression and drug resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). The aim of this study was to explore the relationship between drug resistance and the expression of GRP78 in NSCLC. **Methods** Drug sensitivity test was used to detect the resistance to 8 chemotherapy drugs in 52 NSCLC fresh surgical samples by methylthiazole tetrazolium (MTT), and expression of GRP78 was detected by immunohistochemistry method. Spearman correlation assay was used to investigate the correlation between the GRP78 expression and drug resistance. **Results** The resistance rates to paclitaxel (PTX), adriamycin (ADM), carboplatin (CBP), topotecan (TPT), navelbine (NVB), vincristine (VCR), cisplatin (DDP) and etoposide (VP-16) of the 52 samples were 42.31%, 57.69%, 63.46%, 65.38%, 67.31%, 73.08%, 78.85%, 90.38%, respectively. Fourteen cases showed the complete resistance to the total 8 chemotherapy drugs. Furthermore, the expression of GRP78 was stronger in poorly differentiated cancer as compared with the well and moderately differentiated cancer ($P < 0.05$), so as in stage and cancer than in stage cancer ($P < 0.05$). Spearman correlation assay showed that there was a correlation between the chemotherapeutics resistance to ADM, VP-16, VCR, TPT and the expression of GRP78 in NSCLC ($P < 0.05$). **Conclusion** It is feasible to detect the drug sensitivity to chemotherapy for tumor cells by MTT method. The results of chemosensitivity assay *in vitro* are indicative of clinical drug administration in NSCLC. The detection of GRP78 is

本研究受国家自然科学基金 (No. 30470464)、辽宁省科技厅 (No. 20022125) 及辽宁省教育厅 (No. 20223274) 资助

作者单位: 116001 大连市友谊医院呼吸内科 (王利菊); 大连医科大学 (王琪、王镇山、于志红、王锦光、熊海、尹强、王莺燕、王涛、佟淑萍) (通讯作者: 王琪, E-mail: wqdl@263.net)

also indicative of the resistance to chemotherapy drugs and the differentiation and the clinical stage in NSCLC.

【Key words】 Non-small cell lung cancer Glucose-regulated protein 78 Methylthiazoletrazolium
Chemosensitivity *in vitro* Resistance

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (to WANG Qi) (No. 30470464), Bureau of Science and Technology of Liaoning Province (to WANG Qi) (No. 20022125) and Bureau of Education of Liaoning Province (to WANG Qi) (No. 20223274).

大多数实体瘤细胞对化疗药物具有一定的耐药性,而肿瘤细胞对化疗药物的耐药性与其生存的微环境有关,由于血管及营养不足等原因,肿瘤处于低糖、酸中毒和缺氧的微环境中^[1]。这种微环境不仅是肿瘤细胞对许多化疗药物如阿霉素(ADM)、氟尿嘧啶和放线菌素 D 等产生耐药性的重要因素^[2],而且还能诱导糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)的表达^[3]。GRP78 也叫免疫球蛋白重链结合蛋白(immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip),广泛存在于各种细胞的内质网中,在低糖、缺氧等应激条件下合成量明显增高。许多研究表明,在部分肿瘤细胞中 GRP78 的表达呈增高趋势,并随恶性程度的提高而增加,与肿瘤细胞对化疗药物的耐药性有关^[4-6]。但关于 GRP78 在肺癌中的表达及其是否与肺癌细胞对化疗药物的耐药性具有相关性,目前国内外研究较少。本研究旨在通过对 52 例非小细胞肺癌(NSCLC)对化疗药物的敏感程度与 GRP78 表达的检测,探讨肺癌细胞对化疗药物的耐药性及其与 GRP78 表达的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选择自 2004 年 12 月到 2005 年 6 月大连医科大学附属第一医院胸外科手术切除的 52 例新鲜肺癌标本。所有患者术前、术中均未使用化疗药物治疗及全身或局部放疗。其中男 31 例,女 21 例;平均年龄 63.21 岁; 期 28 例, 期 21 例, 期 3 例(2002 年 AJCC 和 UICC 标准);所有肺癌标本均经病理证实,21 例为鳞癌,28 例为腺癌,3 例为腺鳞癌(以鳞癌为主的腺鳞癌记为鳞癌,以腺癌为主的腺鳞癌记为腺癌);中-高分化 28 例,低分化 24 例。

1.1.2 试剂 96 孔板为 FALCON 公司产品,Multi-skan MKs 型酶标仪、四噻唑蓝(methylthiazoletrazolium, MTT)、小牛血清为 Costar 公司产品,二甲亚砜(DMSO)为 Amresco 公司产品。所用抗癌药物分别为紫杉醇(商品名:紫素,PTX)、拓扑替康(商品名:金喜素, TPT)、ADM、卡铂(CBP)、长春瑞滨(商品名:诺

维本, NVB)、鬼臼乙叉苷(商品名:足叶乙甙, VP-16)、长春新碱(VCR)、顺铂(DDP),以上各药均有明确的生产批号及厂家。根据各种化疗药物的说明书,参照文献 7 将 8 种受试药物均稀释成血浆峰浓度的 10 倍为实验的终浓度。8 种化疗药物中,DDP、CBP、ADM 为周期非特异性药物,VCR、NVB、VP-16、PTX 为周期特异性药物,VP-16 为拓扑异构酶抑制剂,TPT 为拓扑异构酶抑制剂,VCR、NVB、PTX 作用于微管。

SP 试剂盒购自福州迈新生物技术公司,羊抗 GRP78 为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 原代细胞培养和 MTT 比色法 参照文献 8、9 的方法,标本在离体后立即采集,大小约 1 cm × 1 cm × 1 cm,在层流超净台上剔除标本上的坏死组织和出血组织,用生理盐水反复冲洗,机械分离、净化癌细胞,用 RPMI1640 培养液调成含有活细胞数 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ / mL 单细胞悬液。每孔取 90 μ L 细胞悬液、10 μ L 化疗药物和 100 μ L RPMI1640 培养液,加入 96 孔培养皿,每种化疗药物设 2 个副孔,阴性对照为不加药物的细胞悬液,置入 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h;终止培养前加 MTT 磷酸缓冲液 20 μ L,作用 4 h,加 DMSO 溶解甲臞,用酶联免疫检测仪在吸收波长为 540 ~ 570 nm 条件下测出吸光度(A)。细胞生长抑制率(%) = (1 - 药物孔 A 值/对照孔 A 值) × 100%。参考文献 10 的判定方法,细胞生长抑制率 50% 为敏感, < 50% 为耐药,每种化疗药物的耐药率 = 耐药例数/总例数 × 100%。

1.2.2 免疫组织化学染色 新鲜的标本于 10% 福尔马林液固定 24 h 后,取约 1 ~ 2 cm² 大小,厚度为 0.2 ~ 0.3 cm 的组织块,流水冲 12 h,依次用 75% ~ 100% 的乙醇脱水,二甲苯透明 3 次,浸入 60 石蜡中进行包埋,取 4 μ m 厚连续切片进行免疫组化染色。采用 SP 法,详细步骤严格按照说明书进行,用 PBS 代替一抗为阴性对照,采用乳腺癌为阳性对照。DAB 显色,光学显微镜下进行观察。结果判断:每张切片至少观察 3 个视野,每高倍视野至少观察 100 个细胞。

GRP78 主要表达在细胞质,呈棕黄色颗粒。参考文献 11 判定方法分为 4 级: - :无染色细胞或单个表达的细胞; + :弱表达,阳性率 10% ~ 35%; # :中度表达,阳性率 35% ~ 70%; ## :强表达,阳性率 > 70%。

1.3 统计学方法 不同病理类型、分化程度和临床分期肺癌组织中 GRP78 的表达应用成组设计的秩和检验进行分析,完全耐药率的比较应用 χ^2 检验。肺癌细胞对化疗药物的细胞生长抑制率与 GRP78 表达的相关性应用 Spearman 相关分析。数据处理应用 SPSS13.0 软件包完成。

2 结果

2.1 NSCLC 体外药物敏感性试验结果 52 例 NSCLC 对 8 种化疗药物的敏感性以 VP-16 最低,为 9.62% (耐药率为 90.38%),以 PTX 最高,为 57.69% (耐药率为 42.31%)。在铂类化疗药物中 CBP 的敏感性比 DDP 高,耐药率分别为 63.46% 和 78.85%。长春碱类化疗药物中 NVB 的敏感性比 VCR 高,耐药率分别为 67.31% 和 73.08%。作用于微管的化疗药物中 VCR、NVB、PTX 的耐药率分别为 73.08%、67.31% 和 42.31%,以 PTX 的敏感性最高。周期非特异性和周期特异性化疗药物中分别以 CBP 和 PTX 的敏感性最高。耐药率结果详见表 1。

表 1 52 例 NSCLC 患者对 8 种化疗药物的耐药率

Tab 1 Resistance rate of 8 chemotherapy drugs in 52 NSCLC samples

Drug	No. of resistant cases	Resistance rate
DDP	41	78.85 %
CBP	33	63.46 %
VP-16	47	90.38 %
ADM	30	57.69 %
VCR	38	73.08 %
PTX	22	42.31 %
NVB	35	67.31 %
TPT	34	65.38 %

52 例 NSCLC 患者中 14 例对 8 种化疗药物表现为完全耐药,且依不同病理类型、分期及分化而不同。从病理类型来看,22 例鳞癌中有 3 例(13.64%)、30 例腺癌中有 11 例(36.67%)表现为完全耐药;从临床分期来看,28 例 Ⅰ期中有 8 例(28.57%)、24 例 Ⅱ期中有 6 例(25.00%)表现为完全耐药;从分化程度来看,29 例中-高分化的癌组织中有 6 例(20.69%)、23 例低分化的癌组织中有 8 例(34.78%)表现为完全耐药。但病理类型、分化程度和临床分期期间,其完全耐药率均无统计学差异 ($P > 0.05$),详见表 2。

表 2 52 例 NSCLC 对 8 种化疗药物的耐药性

Tab 2 Resistance of 8 chemotherapy drugs in 52 NSCLC samples

Item	No. of cases	No. of complete resistant cases	No. of non-complete resistant cases	χ^2 value	P value
Pathological type				3.356	0.060
Squamous cell carcinoma	22	3	19		
Adenocarcinoma	30	11	19		
Differentiation				0.260	0.205
Poor	23	8	15		
Well-moderate	29	6	23		
Clinical stage				0.082	0.511
Ⅰ	28	8	20		
Ⅱ	24	6	18		

2.2 GRP78 在 NSCLC 组织中的表达 免疫组化染色显示,在癌组织细胞的胞质内均可检测到 GRP78 阳性颗粒(图 1 的 C、D)。GRP78 在低分化组的染色强度明显高于中-高分化组 ($P < 0.05$);临床分期为 Ⅰ、Ⅱ期的癌组织明显高于 Ⅲ期 ($P < 0.05$)。但在不同病理类型的癌组织细胞中其染色强度未见有显著性差异,详见表 3。

2.3 细胞生长抑制率与 GRP78 表达的相关性 NSCLC 对 8 种化疗药物的细胞生长抑制率与 GRP78 表达的相关系数均为负数,Spearman 相关分析表明,肺癌细胞对化疗药物 VP-16、ADM、VCR、TPT 的耐药性与 GRP78 的表达相关 ($P < 0.05$),而对其他化疗药物的耐药性则无统计学意义,详见表 4。

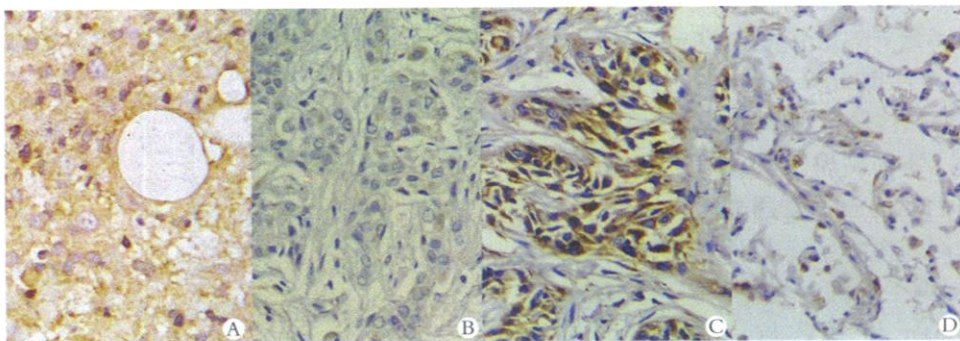


图 1 免疫组织化学检测 NSCLC 组织中 GRP78 的表达(SP 法,原始放大倍数 ×200)

A:阳性对照;B:阴性对照;C、D:分别为 GRP78 在腺癌、鳞癌组织中的表达

Fig 1 The expression of GRP78 was detected by immunohistochemistry in NSCLC tissues (SP method, original magnification ×200)
A: positive control; B: negative control; C and D: expression of GRP78 in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma respectively

表 3 GRP78 在 52 例 NSCLC 组织中的表达

Tab 3 Expression of GRP78 in 52 NSCLC samples

Item	No. of cases	-	+	#	##	z value	P value
Pathological type						- 1.353	0.176
Squamous cell carcinoma	22	0	5	12	5		
Adenocarcinoma	30	0	6	10	14		
Differentiation						- 2.722	0.006
Poor	23	0	1	10	12		
Well-moderate	29	0	10	12	7		
Clinical stage						- 2.633	0.008
	28	0	10	11	7		
+	24	0	1	11	12		

表 4 52 例 NSCLC 对 8 种化疗药物的细胞生长抑制率与 GRP78 表达的相关性

Tab 4 Relationship between the cell growth inhibiting rate of 8 chemotherapy drugs and the expression of GRP78 in 52 NSCLC samples

Drug	Rs value	P value
DDP	- 0.162	0.250
CBP	- 0.265	0.058
VP-16	- 0.396	0.004
ADM	- 0.332	0.016
VCR	- 0.328	0.018
PTX	- 0.186	0.188
NVB	- 0.240	0.087
TPT	- 0.341	0.013

3 讨论

GRP78 是进化上高保守的蛋白质,与热休克蛋白 70 有 60% 的同源性,可迅速与新生的多肽以非共价键形式结合以促进蛋白质的正确折叠和装配,并抑制错误折叠的蛋白质的聚集^[12]。研究表明,GRP78 在肺癌组织中呈高表达趋势,但其是否与肺癌对化疗药物

的耐药具有相关性则研究甚少,本研究通过对 52 例 NSCLC 对化疗药物的敏感程度与 GRP78 在蛋白水平表达的检测,探讨了肺癌细胞对化疗药物的耐药性与 GRP78 表达的相关性。

MTT 比色法是快速、敏感地检测肿瘤对化疗药物敏感性的实验方法,临床相关性好,现已被广泛用于体外肿瘤药物敏感性的测定,尤其在肿瘤化疗方面,有较高的临床参考价值^[13~15],但其测定的结果与临床化疗药物敏感性并不完全相符,其原因在于体外肿瘤细胞生存与体内肿瘤细胞生长的环境差别很大。本文 52 例 NSCLC 对 VP-16 的敏感性最差,耐药率为 90.38%,对 PTX 的敏感性最好,耐药率为 42.31%。此外,14 例 NSCLC 对 8 种化疗药物表现为完全耐药。说明体外化疗药物敏感实验预测耐受药物的阴性准确率较高,所以实验结果对于化疗前剔除不敏感的化疗药物很有价值。

在 52 例 NSCLC 组织细胞中均可检测到 GRP78,其表达与肺癌的分化程度和临床分期密切相关,低分化组明显高于中+高分化组 ($P < 0.05$),+ 期癌组织明显高于 - 期 ($P < 0.05$),而在不同病理类型中

其表达强度未见显著性差异。Gazit 等研究证明在人类乳腺癌细胞系中 GRP78 呈高表达^[4], 王琪等和 Uramoto 等研究证明在 mRNA 和蛋白水平 GRP78 在肺癌组织中呈高表达^[16,17], 表明肺癌的微环境有利于诱导 GRP78 的表达。而 Spearman 相关分析显示, 8 种化疗药物对 52 例 NSCLC 的细胞生长抑制率与 GRP78 表达的相关系数均为负数, 其中 VP-16、ADM、VCR、TPT 对细胞的生长抑制率与 GRP78 表达的相关性具有统计学意义, 而其它药物则无明显相关性。GRP78 对化疗药物产生抗药性的机制目前认为有如下几方面: 在实体瘤内, GRP78 的表达能够降低作用于 G₁ 期和 S 期化疗药物的毒性; 在肿瘤细胞中预先诱导 GRP78, 能对拓扑异构酶抑制剂如 VP-16、ADM 等产生耐药性^[2]; GRP78 的产生还可以减少肿瘤细胞的凋亡, 并且通过影响凋亡效应器的作用来阻断化学药物引起肿瘤的细胞凋亡; GRP78 引起肿瘤细胞对化疗药物耐药是由于 GRP78 的高表达能够抑制暴露在网内质网应激中肿瘤细胞的损伤, 对肿瘤细胞起到保护的作用。NSCLC 组织中 GRP78 的高表达可能正是通过上述机制对 VP-16、ADM 等化疗药物产生耐药。而且, GRP78 表达越高, 癌组织对化疗药物 VP-16、ADM、VCR、TPX 的敏感性越低。因此, 对于 NSCLC 患者, 化疗前应用药物敏感性试验, 结合 GRP78 的检测, 对选择敏感的化疗药物具有一定的指导意义。抑制 GRP78 的表达及其功能, 可能会成为 NSCLC 的一种治疗手段。

参 考 文 献

- Mese H, Sasaki A, Nakayama S, et al. Analysis of cellular sensitization with cisplatin-induced apoptosis by glucose-starved stress in cisplatin sensitive and -resistant A431 cell line. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A) 1029-1033.
- Ogiso Y, Tomida A, Lei S, et al. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res*, 2000, 60(9) 2429-2434.
- Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*, 2005, 10(2) 86-103.
- Gazit G, Lu J, Lee AS. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 54(2) 135-146.
- Koomagi R, Mattern J, Volm M. Glucose-related protein (GRP78) and its relationship to the drug-resistance proteins P170, GST-pi, LRP56 and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res*, 1999, 19(5B) 4333-4336.
- Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 59(1) 15-26.
- Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, et al. Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumour cells using the MTT assay. *Br J Cancer*, 1992, 66(5) 794-799.
- ZHANG ZR. Cultural cytology and technique for cell culture. 1st ed. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Education Publishing House, 2004. 309-313. [张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术. 第 1 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004. 309-313.]
- Xin HW, Wang RB. Study on rapid detection of chemotherapeutic sensitivity of tumor by MTT method. *Cancer Res Prev Treat*, 1993, 20(4) 254-256. [辛华雯, 王润帮. MTT 显色法快速测定实体瘤化疗药物敏感性的方法研究. *肿瘤防治研究*, 1993, 20(4) 254-256.]
- Liu LZ, Zhou XD, Huang G, et al. Study of the drug sensitivity of primary cultured lung cancer cells and the expressions of four drug resistance related proteins. *Acta Academ Med Militaris Tertiae*, 2003, 25(8) 712-714. [刘凌志, 周向东, 黄桂君, 等. 人肺癌细胞原代培养药敏检测及 4 种耐药相关蛋白表达的研究. *第三军医大学学报*, 2003, 25(8) 712-714.]
- Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, et al. GRP78 expression correlates with histologic differentiation and favorable prognosis in neuroblastic tumors. *Int J Cancer*, 2005, 113(6) 920-927.
- Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK. Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1997, 272(5) 3057-3063.
- Liu SQ, Yu JP, Yu HG, et al. Activation of Akt and ERK signaling pathways induced by etoposide confer chemoresistance in gastric cancer cells. *Dig Liver Dis*, 2006, 38(5) 310-318.
- Lin ZY, Chuang WL, Chuang YH, et al. Discordant influence of amphotericin B on epirubicin cytotoxicity in primary hepatic malignant cells collected by a new primary culture technique. *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(2) 398-405.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, et al. Chemosensitivity testing for gastrointestinal cancer: survival benefit potential and limitations. *Anticancer Drugs*, 2003, 14(9) 715-723.
- Wang Q (王琪), He Z, Zhang J, et al. Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. *Cancer Detect Prev*, 2005, 29(6) 544-551.
- Uramoto H, Sugio K, Oyama T, et al. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. *Lung Cancer*, 2005, 49(1) 55-62.

(收稿: 2006-06-03 修回: 2006-09-10)

(本文编辑 张世雯)