

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.03.04

非小细胞肺癌MDR1-mRNA、MRP-mRNA 及 LRP-mRNA 表达的研究

杨俊兰 戴为民 石廷章 魏秀芳

【摘要】 目的 观察肺癌组织及癌旁肺组织 MDR1-mRNA、MRP-mRNA 及 LRP-mRNA 的表达。方法 采用 RT-PCR 法检测 30 例肺癌患者癌组织和正常肺组织中 MDR1-mRNA、MRP-mRNA 和 LRP-mRNA 的表达情况。结果 MDR1-mRNA 在肺癌组织及癌旁肺组织的表达阳性率分别为 40% 及 16.67% ($P = 0.045$), 其表达与细胞分化程度、临床分期及病理类型无明显关系。MRP-mRNA 在肺癌组织及癌旁肺组织的表达分别为 43.33% 及 26.67%, 低分化者 MRP 的表达率明显高于中高分化者 ($P = 0.03$), 其表达与临床分期无明显关系。LRP-mRNA 在肺癌组织及癌旁肺组织的表达分别为 56.67% 及 10% ($P = 0.0004$), 其表达与肿瘤类型、临床分期及癌细胞的分化程度无明显关系。30 例肺癌组织中 MDR1-mRNA、MRP-mRNA、LRP-mRNA 共同表达者 7 例 (23.33%), 三者均无表达者 10 例 (33.33%), 三者的一致性达 56.67%。结论 MDR1-mRNA、MRP-mRNA、LRP-mRNA 在肺癌的耐药中可能起重要作用。

【关键词】 MDR1 MRP LRP RT-PCR 非小细胞肺癌

【中图分类号】 R734.2

Expression of MDR1-mRNA, MRP-mRNA and LRP-mRNA in patients with non-small cell lung cancer YANG Junlan, DAI Weimin, SHI Tingzhang, WEI Xiufang. Department of Medical Oncology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the expression of multidrug resistance (MDR1), multidrug resistance-associated protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) genes in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Expression of MDR1, MRP and LRP genes was detected in 30 NSCLC patients by RT-PCR method. **Results** The positive rates of MDR1 expression were 40% and 16.67% respectively in lung cancer tissues and normal lung tissues ($P = 0.045$), and it was not associated with the degree of cell differentiation, histological classification and the clinical stage. The positive rates of MRP expression were 43.33% and 26.67% respectively in lung cancer tissues and normal lung tissues. Its expression was related to degree of cell differentiation ($P = 0.03$), but not to the histological classification and the clinical stage. LRP expression of lung cancer tissues (56.67%) was much higher than that of normal tissues ($P = 0.0004$), and it was not associated with degree of cell differentiation, histological classification and the clinical stage. Of the 30 lung cancer specimens, 7 expressed all the three kinds of genes, and 10 expressed none of them. The coincident rate was 56.67%. **Conclusion** The results suggest that MDR1, MRP and LRP gene may play important roles in drug resistance in NSCLC.

【Key words】 MDR1 MRP LRP RT-PCR Non-small cell lung cancer

多药耐药是肺癌尤其是非小细胞肺癌化疗失败的主要原因。对肺癌多药耐药机理的研究表明, P-糖蛋白 (MDR1) 多药耐药相关蛋白 (MRP) 肺耐药蛋白 (LRP) 谷胱甘肽 S-转移酶、拓扑异构酶 II 等耐药机制与肺癌的多药耐药有密切关系。本研究采用逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 方法检测非小细胞肺癌及癌旁肺组织 MDR1-mRNA、MRP-mRNA 及 LRP-mRNA 的表

达情况, 分析三者在非小细胞肺癌先天耐药机制中的作用及相互关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料 30 例肺癌标本均取自外科肺癌手术患者, 每例患者同时取癌组织和肺正常组织 (肺正常组织为距癌肿块 3 cm 以上的肺组织), 手术后立即取材并储存于液氮罐中。30 例患者中男性 24 例, 女性 6 例, 年龄 35~68 岁, 平均 55.31 岁。其中鳞癌 14 例, 腺

癌 16 例。根据肿瘤的分级标准,14 例鳞癌中,中~高分化者 8 例,低分化者 6 例;16 例腺癌中,中~高分化者 9 例,低分化者 7 例。所有患者术前均未进行任何抗肿瘤治疗。

1.2 引物序列 MDR1 引物序列:5'-AAAAAGATCAACTCGTACCACTC-3';5'-GCACAAAATACACCAACAA-3' 扩增片段为 170 bp,上游引物为第 2 外显子,下游引物为第 4 外显子。

MRP 引物序列:5'-ACACTCCACAGATCACTC-3';5'-CATGGTGCAGGGTCTACG-3';扩增片段为 290 bp,上游引物为 5'非编码端,下游引物为第 4 外显子。

LRP 引物序列:5'-TTCTGGATTGTTGGACGC-3';5'-ACTTCTCTCCCTTGACCAC-3' 扩增片段为 285 bp,上游引物为 5'非编码端,下游引物为第 4 外显子。

1.3 主要仪器 Minicycler™ 基因扩增仪购自美国 MJ Research 公司。ZF-4 型紫外透射反射分析仪购自上海长明光学电子仪器厂。TGI-16C 高速台式离心机购自上海安亭科学仪器厂。

1.4 步骤

1.4.1 总 RNA 提取 取新鲜组织 2~3 mg,捣碎后,置样品管中,加入 200 μl 裂解液,充分震荡,使沉淀完全溶解,加入 40 μl 氯仿混匀,12 000 r/min 离心 5 分钟,小心吸取上层水相,加 3 倍体积无水乙醇,-20℃ 放置 20 分钟,12 000 r/min 离心 5 分钟,弃上清,室温晾干约 20 分钟,即可得到标本的总 RNA。

1.4.2 RNA-cDNA 反转录 向处理好的样品中加入 15 μl 逆转录液和 1 μl 酶混合液,离心数秒,42℃ 水浴 30 分钟。

1.4.3 PCR 扩增 分别以 MRP、MDR1、LRP 阳性模板作为阳性对照,以 DEPC 水代替 cDNA 作为空白对照。取反转录产物、阳性对照及空白对照各 5 μl,分别加入 20 μl PCR 液和 1 μl Taq 酶,一滴石蜡油,离心数秒,按下述条件扩增 35 个循环:94℃ 45 秒,55℃ 45 秒,72℃ 45 秒。

1.4.4 电泳鉴定 含 EB 的 2% 琼脂糖配制:100 ml TBE(Tris-硼酸)+2 g 琼脂糖+5 μl EB。用 10 μl PCR 产物、2 μl 上样缓冲液混匀后点样,恒压 5 V/cm,电泳时间为溴酚蓝染料走至 1/3~1/2 胶长处。

1.5 结果记录及判断 阳性结果均为两条带:MDR1 带及内标带(图 1),MRP 带及内标带(图 2),LRP 带及内标带(图 3)。阴性结果均为一条带:内标带。

1.6 统计学处理 采用校正 χ² 检验。

2 结果

2.1 MDR1-mRNA 的表达情况 30 例肺癌组织中

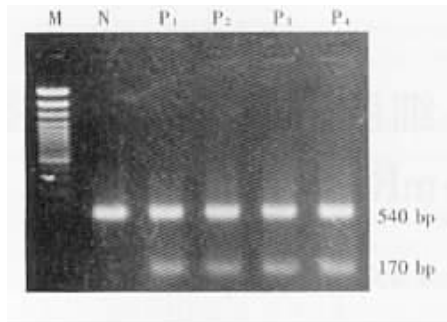


图 1 MDR1 基因产物电泳结果

Fig 1 Electrophoresis result for PCR product of MDR1 gene
M: Marker; N: Negative specimen; P: Positive specimen

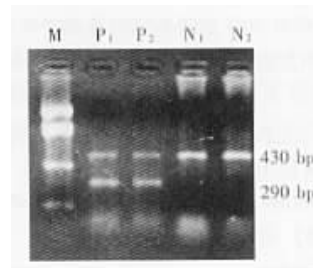


图 2 MRP 基因产物电泳结果

Fig 2 Electrophoresis result for PCR product of MRP gene
M: Marker; N: Negative specimen; P: Positive specimen

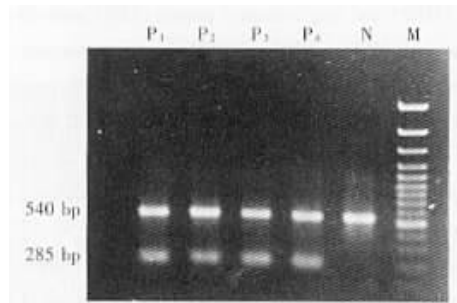


图 3 LRP 基因产物电泳结果

Fig 3 Electrophoresis result for PCR product of LRP gene
M: Marker; N: Negative specimen; P: Positive specimen

MDR1-mRNA 阳性者 12 例,肺正常组织中阳性者 5 例,肺癌组织中 MDR1-mRNA 表达率明显高于肺正常组织 ($P = 0.045$)。分析不同病理特征患者 MDR1-mRNA 表达结果提示 MDR1-mRNA 的表达与病理类型、分期、组织分化无明显关系 ($P > 0.05$)。

2.2 MRP-mRNA 的表达情况 30 例肺癌组织中,MRP-mRNA 表达阳性者 13 例,肺正常组织中阳性者 8 例。MRP 的表达与病理类型、临床分期均无明显关系 ($P > 0.05$)。低分化者 9 例表达阳性,中~高分化者 4

例表达阳性($P = 0.03$)。

2.3 LRP-mRNA 的表达情况 30 例肺癌组织中 LRP-mRNA 表达阳性者 17 例, 30 例肺正常组织中 LRP-mRNA 表达阳性者 3 例, 差异有显著性($P = 0.0004$)。LRP 的表达与肿瘤的病理类型、临床分期及癌细胞的分化程度无明显关系。

2.4 MDR1-mRNA、MRP-mRNA 及 LRP-mRNA 表达之间的相关性分析 30 例肺癌组织中 MDR1-mRNA、MRP-mRNA、LRP-mRNA 共同表达者 7 例(23.33%), 三者均无表达者 10 例(33.33%), 三者的一致性达 56.67%。采用校正 χ^2 检验分析三者中两两表达的相关性, 未见统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

关于肺癌耐药机制的研究报道颇多, MDR1 是最早发现的一种肿瘤耐药机制, 但 MDR1 基因与肺癌耐药的关系一直存在着争议。有研究认为 MDR1 与肺癌耐药明显相关, 也有研究认为尚有其它耐药机制在肺癌耐药中起作用。本研究结果表明 40% 肺癌组织表达 MDR1-mRNA, 而肺正常组织仅 16.67% 表达阳性($P < 0.05$), 说明在肺组织恶变过程中 MDR1-mRNA 表达增加。分析 30 例患者病理特征, 未显示病理类型、分期、分化程度与 MDR1-mRNA 表达率有密切的关系, 该结果与国外文献报道一致^[1]。

1992 年 Cole 发现多药耐药相关蛋白(MRP)后, 研究 MRP 与肺癌多药耐药的关系成为人们关注的热点。MRP 基因位于 16 号染色体 p13.1 带上, 由 2.8 kb 碱基组成。该基因编码 1 531 个氨基酸组成的蛋白质, 其分子量为 190 ku, 其多药耐药作用与 P-gp 的表达无关, 而与细胞内 MRP 的药物泵作用及其引起细胞内药物浓度降低有关。MRP 的耐药谱与 MDR1 相仿。国外研究表明: MRP 基因的表达与肺癌的分期、分化及预后有关^[2,3]。本研究检测了肺癌及肺正常组织 MRP 基因的表达情况, 结果表明: 43.33% 的肺癌组织有 MRP-mRNA 表达, 低分化者 MRP-mRNA 的表达率(69.23%) 明显高于中高分化者(23.53%) ($P < 0.05$), 说明 MRP 的表达与细胞分化程度有密切关系。

LRP 是近几年来新发现的一种与耐药有关的蛋白。LRP 基因位于 16 号染色体短臂 16p11.2, 其分子量为 110 ku。国外研究认为, LRP 在非小细胞肺癌中的表达明显高于小细胞肺癌, LRP 的表达与 AML 和晚期卵巢癌的临床化疗敏感性有关^[4,5], 可以作为预后指标。本研究采用 RT-PCR 方法检测了 30 例肺癌及肺正常组织 LRP 的表达情况, 结果表明, 56.67% 的肺

癌组织有 LRP-mRNA 表达, 而肺正常组织仅为 10% ($P = 0.0004$), 提示 LRP 在肺癌恶变过程中表达增加。分析 30 例肺癌组织 LRP 基因表达与病理类型、组织分化、TNM 分期的关系, 未显示统计学意义。

肿瘤的多药耐药是近几年肿瘤治疗中研究的重点之一。目前产生多药耐药的机制仍不明了, 但有一点十分明确, 多药耐药的产生决非单一因素, 而是多种机制共同作用的结果。关于 MDR1、MRP、LRP 基因及其表达的蛋白质在多药耐药中各自及其相互作用的机制十分复杂, 目前尚不明确, 三者的主要功能均为清除外源性生物活性物质, 使机体免受这些物质的损害。有众多文献报道了 MDR1 与 MRP 基因在恶性肿瘤的表达^[6]。也有研究认为 MRP 在肺癌耐药中的作用有可能大于 MDR1^[7]。本研究结果表明, 30 例肺癌组织中共同表达 MDR1-mRNA、MRP-mRNA、LRP-mRNA 者 7 例(23.33%), 三者均无表达者 10 例(33.33%), 三者的一致性达 56.67%。由于本组例数尚少, 肺癌的多药耐药是否与这三种基因共同作用有关, 尚需大样本资料进一步研究证实。

本研究的所有患者术前均未行化疗, 说明 MDR1、MRP、LRP 基因的表达为先天性。对这些基因的检测, 有利于指导临床用药。对 MDR1、MRP、LRP 表达阳性者, 临床用药时尽量避免使用与耐药基因有关的化疗药物, 以期获得较好的治疗效果。

参 考 文 献

- 1 Abe Y, Nakamura M, Ota E, et al. Expression of the multidrug resistance gene(MDR1) in non-small cell lung cancer. Jpn J Cancer Res, 1994, 85(5): 536-541.
- 2 Higashiyama M, Doi O, Kodama K, et al. Immunohistochemically detected expression of motility-related protein-1(MRP-1/CD9) in lung adenocarcinoma and its relation to prognosis. Int J Cancer, 1997, 74(2): 205-211.
- 3 Ota E, Abe Y, Oshika Y, et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein(MRP) gene in non-small-cell lung cancer. Br J Cancer, 1995, 72(3): 550-554.
- 4 Izquierdo MA, van der Zee AG, Vermorken JB, et al. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(16): 1230-1237.
- 5 Hart SM, Ganeshaguru K, Scheper RJ, et al. Expression of the human major vault protein LRP in acute myeloid leukemia. Exp Hematol, 1997, 25(12): 1227-1232.
- 6 Kim WJ, Kakehi Y, Wu WJ, et al. Expression of multidrug resistance-related genes (mdr1, MRP, GST-pi and DNA topoisomerase II) in urothelial cancers. Br J Urol, 1996, 78(3): 361-368.
- 7 Narasaki F, Matsuo I, Ikuno N, et al. Multidrug resistance-associated protein(MRP) gene expression in human lung cancer. Anticancer Res, 1996, 16(4A): 2079-2082.

(收稿 2000-11-22 修回 2001-03-23)

(本文编辑 李蓓兰)