

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.01.16

P-gp、MRP、p53 蛋白在肺癌组织中的表达及其意义

芮萌 李龙芸 刘丽华 王京岚 张志庸

【摘要】 目的 探讨 P-gp、MRP、p53 在肺癌中可能的临床意义及相互间的关系。方法 采用免疫组化法 (IHC) 检测 31 例石蜡包埋的肺癌及相应远离肿瘤部位的正常肺组织中 P-gp、MRP、p53 的表达情况,同时用流式细胞术 (FCM) 检测其中 29 例冻存的肺癌组织中 P-gp、p53 水平,并与 IHC 结果比较。结果 IHC 方法显示 P-gp、MRP、p53 在正常肺组织中未见表达,在肺癌组织中阳性率分别为 61.3%、54.8%、71.0%。P-gp 与 MRP 表达有相关性 ($P < 0.01$),但 P-gp 与 p53、MRP 与 p53 之间均无显著相关性。P-gp 和 MRP 阳性表达集中在 NSCLC,阳性率分别为 76% 和 68%,且肺癌细胞分化程度越低,P-gp 阳性率越低 ($P < 0.05$)。p53 阳性率在鳞癌 (100%) 明显高于腺癌 (33.3%) ($P < 0.01$),在吸烟患者 (88.9%) 明显高于不吸烟患者 (46.2%) ($P < 0.05$),而与各项病理特征无关。采用 FCM 测得 P-gp、p53 阳性率分别为 65.5% 和 79.3%,两种方法的符合率在 P-gp、p53 分别为 62.1% 和 75.9%。结论 P-gp、MRP 过表达在肺癌中可能具有一定的协同作用,而与 p53 异常无关。

【关键词】 肺肿瘤 免疫组化 流式细胞术 MDR₁ MRP p53

【中图分类号】 R734.2

Expression of P-gp, MRP and p53 and their clinical significance in human lung cancer tissues RUI Meng*, LI Longyun, LIU Lihua, WANG Jinglan, ZHANG Zhiyong. * Department of Respiratory Diseases, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100730, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the clinical roles of P-gp, MRP and p53 expression and their relationship with one another in primary lung cancer. **Methods** P-gp, MRP and p53 proteins were measured in 31 paraffin-embedded lung cancer tissues and corresponding normal lung tissues by immunohistochemistry (IHC). In addition, flow cytometric analysis of P-gp and p53 was performed in 29 of 31 frozen lung cancer specimens in order to compare the results of the two methods. **Results** By IHC, positive rates of P-gp, MRP and p53 were 61.3%, 54.8%, 71.0% respectively in 31 lung cancer cases and there was no expression in all normal lung tissues. P-gp and MRP expressed only in NSCLC. The poorer the cancer cell differentiated, the lower the positive rate of P-gp expression was ($P < 0.05$). Squamous cell carcinomas showed much higher positive rate of p53 than adenocarcinomas did ($P < 0.01$). As compared with the non-smokers, staining for p53 was overwhelmingly positive in the smokers ($P < 0.05$). Neither P-gp nor MRP had significant correlation with p53, however, coexpression of P-gp and MRP had a distinct statistic significance ($P < 0.01$). By flow cytometry (FCM), the expression rates of P-gp and p53 were 65.5% and 79.3% in 29 lung cancer cases. The coincident rates of P-gp and p53 by IHC and FCM were 62.1%, 75.9% respectively. **Conclusion** P-gp and MRP overexpression may be involved in the process of lung cancer in co-ordination. Neither P-gp overexpression nor MRP overexpression has significant correlation with p53 alteration.

【Key words】 Lung neoplasms Immunohistochemistry Flow cytometry MDR₁ MRP p53

This work was supported by a grant from the Scientific Research Fund of Health Ministry of China (to LI Longyun) (No. 962015).

本研究受卫生部科学研究基金(962015)资助

作者单位:100730 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院呼吸内科(芮萌、李龙芸、王京岚、张志庸),安徽医科大学附属医院呼吸内科(刘丽华)

P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)均属于ATP结合盒式超家族,有“药物外排泵”的作用,它们的

过表达与多种肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)密切相关,但在肺癌耐药过程中所起的作用,研究结果并不一致^[1-4];此外有文献报道 p53 异常与 P-gp 过表达亦有一定相关性^[5]。本研究通过检测肺癌组织中 P-gp、MRP、p53 的表达情况,探讨三者在肺癌中可能的作用及相互间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

病例来自北京协和医院胸外科 1998 年 3 月~7 月期间住院患者。原发性肺癌和相应的远离肿瘤部位的正常肺组织新鲜标本各 31 例,每例标本分成两部分,一部分福尔马林固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片,29 例患者(缺 2 例腺癌)的另一部分组织,经液氮速冻后,-70℃ 保存。所有患者在术前均未接受过化疗或放疗。31 例肺癌包括小细胞肺癌(SCLC)6 例,腺癌(adenocarcinoma, AD)12 例,鳞癌(squamous cell carcinoma, SQ)11 例,粘液表皮样癌和腺鳞癌各 1 例。其中男 20 例,女 11 例;平均年龄 62 岁,吸烟者 18 例,不吸烟者 13 例。全部标本均经病理证实。P-TNM 分期,Ⅰ期 18 例,Ⅱ期 9 例,Ⅲ期 4 例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化(immunohistochemistry, IHC)

采用 SP 免疫组化法。P-gp 单抗 JSB1 购自 Zymed 公司,MRP 单抗由北京市肿瘤医院呼吸内科刘叙仪教授惠赠,p53 单抗 DO-1 来自 Santa Cruz 公司。P-gp 单抗以 1:30 稀释,MRP 单抗为工作液,p53 单抗以 1:100 稀释。每例均设有阳性对照、阴性对照以及空白对照;检测 P-gp 以 MCF/ADR(耐 ADR 乳腺癌细胞株)为阳性对照,亲本 MCF/WT 为阴性对照(细胞株由北京市肿瘤医院呼吸内科提供);检测 MRP、p53 以已知阳性及阴性的肺癌标本为对照;空白对照以 PBS 代替一抗。P-gp、MRP 以背景不着色,仅胞浆呈黄褐色的细胞数 > 1% 为阳性,< 1% 或全部肿瘤细胞胞浆均无染色为阴性;p53 以背景不着色,仅胞核呈黄褐色的细胞数 > 5% 为阳性,< 5% 或全部肿瘤细胞胞核均无染色为阴性。

1.2.2 流式细胞术(flow cytometry, FCM)

采用间接免疫荧光标记法(1)样品制备:冻存组织经解冻、固定(检测 P-gp 用 4% 甲醛,检测 p53 用 70% 冷乙醇),以搓网法制备单细胞悬液(浓度 10⁶/ml),取 1 ml 细胞悬液,离心、洗涤、弃上清,加入 1:100 稀释的 P-gp 单抗(JSB1, Monosan 公司)或 p53 单抗(Pab1801, Oncogene Science 公司)100 μl,室温、避光孵育 30 分钟,离心、洗涤、弃上清,加入 1:200 稀释的羊抗鼠 FITC-IgG(Jackson 公司)100 μl,孵育 30 分钟,离心、洗涤,除去未结合的

多余荧光抗体。除设正常肺组织对照外,还设有:①阴性对照,PBS 代替一抗;②阳性对照,为一抗和 FITC-IgG。免疫荧光染色后,将细胞涂片在荧光显微镜下观察,可见细胞发出的黄绿色荧光,P-gp 染色主要在浆膜,p53 主要在胞核。(2)定量测定及分析:应用 Becton Dickinson 公司的 FACS420 型流式细胞仪进行样品测定。测量数据及图形均输入 HP-300 Consort30 计算机行相应的程序软件处理,测定前以鸡红细胞作为标准样品,调整仪器的变异系数在 5% 以内。参照 Morkve 等^[6]提出的方法,以荧光指数(fluorescence index, FI)表示 P-gp 和 p53 蛋白的相对量,公式:

$$FI = \frac{\text{待测组织 P-gp 或 p53 蛋白表达的平均荧光强度} - \text{对照样品的平均荧光强度}}{\text{正常肺组织细胞 P-gp 或 p53 蛋白表达的平均荧光强度}}$$

以正常肺组织细胞 P-gp 或 p53 蛋白表达的平均荧光强度 $FI = \bar{x} \pm 2s$ 为阴性表达标准,超过此值为阳性表达。

1.2.3 统计学处理

采用精确概率法及 *t* 检验。

2 结果

2.1 免疫组化检测结果

2.1.1 P-gp、MRP、p53 的表达及其与临床指标间的关系(表 1)

远离肿瘤部位的正常肺组织均未见 P-gp、MRP、p53 表达。31 例肺癌组织中,P-gp、MRP 阳性表达分别为 19 例(61.3%)和 17 例(54.8%),且均为非小细胞肺癌(NSCLC)(图 1、2),腺、鳞癌间 P-gp 与 MRP 表达均无显著性差异。p53 阳性共有 22 例(71.0%)(图 3),鳞癌中的阳性率(11/11,100%)明显高于腺癌(4/12,33.3%)($P < 0.01$),NSCLC 与 SCLC 间 p53 表达无显著差异。

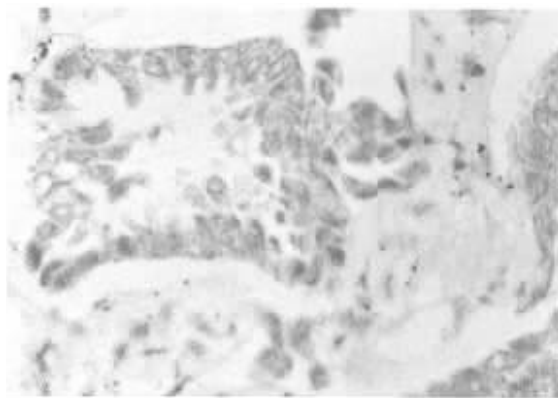


图 1 肺腺癌 P-gp 阳性表达(免疫组化法, ×400)

Fig 1 Positive P-gp immunostaining in primary adenocarcinoma of the lung. (IHC, ×400)

肿瘤分化程度愈低,P-gp 阳性率愈低($P < 0.05$),24 例患者(P-gp 阳性者 14 例,阴性 10 例;MRP 阳性 11

例,阴性 13 例)随访 7~10 个月,4 例出现远处转移(2 例死亡),其中 P-gp 阳性 1 例,P-gp 阴性 3 例,MRP 均为阴性。P-gp 与 MRP 阳性表达率与吸烟与否无明显关系。p53 与各项病理特征间无相关性,而与吸烟有密切关系,吸烟者阳性率(16/18,88.9%)明显高于不吸烟者(6/13,46.2%)($P < 0.05$)。

2.1.2 P-gp、MRP、p53 之间的关系 P-gp、MRP、p53 共阳性 10 例(32.3%),P-gp 与 MRP 共阳性 15 例,共阴性

10 例,两者表达有相关性($P = 0.0011$);P-gp、p53 共阳性 12 例,MRP、p53 共阳性 10 例,但均无相关性($P > 0.05$)。

2.2 流式细胞术检测结果 10 例远癌肺组织 P-gp、p53 蛋白均为阴性表达。29 例肺癌组织中 P-gp 阳性 19 例,占 65.5%;p53 阳性 23 例,占 79.3%。两种方法检测 P-gp、p53 的符合率分别为 62.1%、75.9%,不符合率分别为 37.9%、24.1%(表 2,3)。

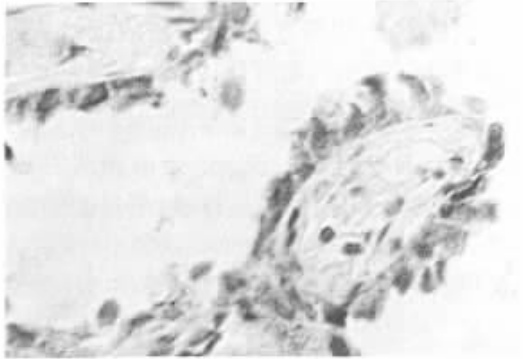


图 2 肺腺癌 MRP 阳性表达(免疫组化法,×400)

Fig 2 Positive MRP immunostaining in primary adenocarcinoma of the lung. (IHC, ×400)

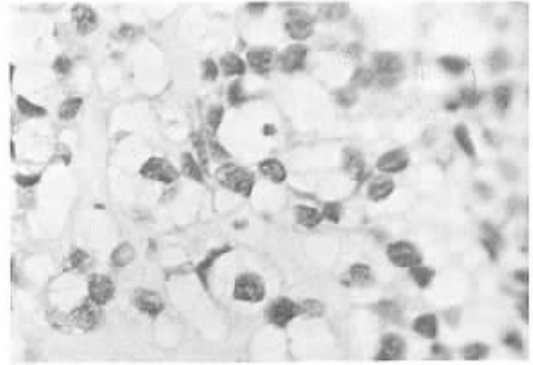


图 3 小细胞肺癌 p53 阳性表达(免疫组化法,×400)

Fig 3 Positive p53 immunostaining in primary small cell lung cancer. (IHC ×400)

表 1 P-gp、MRP、p53 与肺癌临床病理特征的关系

Tab 1 Relationship between the expression of P-gp, MRP and p53 and the clinicopathologic characteristics in lung cancer

| Items | n | No. positive(%) | | |
|------------------------------|----|-----------------|----------|----------|
| | | P-gp | MRP | p53 |
| Histology | | | | |
| NSCLC | 25 | 19(76) | 17(68) | 16(64) |
| AD | 12 | 10(83.3) | 8(66.7) | 4(33.3)* |
| SQ | 11 | 7(63.6) | 7(63.6) | 11(100) |
| Others | 2 | 2(100) | 2(100) | 2(100) |
| SCLC | 6 | 0(0)★ | 0(0)☆ | 5(83.3) |
| Size of tumor | | | | |
| T1 | 7 | 7(100) | 6(85.7) | 5(71.4) |
| T2 | 22 | 12(54.5) | 11(50) | 15(68.2) |
| T3-4 | 2 | 0(0) | 0(0) | 2(100) |
| Lymph node metastasis | | | | |
| N0 | 19 | 13(68.4) | 13(68.4) | 12(63.2) |
| N1-2 | 12 | 6(50) | 4(33.3) | 10(83.3) |
| P-TNM stage | | | | |
| I | 18 | 13(72.2) | 13(72.2) | 11(61.1) |
| II | 9 | 6(66.7) | 4(44.4) | 7(77.8) |
| III | 4 | 0(0) | 0(0) | 4(100) |
| Differentiation | | | | |
| G1-2 | 19 | 15(78.9) | 14(73.7) | 11(57.9) |
| G3 | 12 | 4(33.3)△ | 3(25) | 11(91.7) |
| Total | 31 | 19(61.3) | 17(54.8) | 22(71.0) |

Note: ★(NSCLC vs SCLC) $P = 0.0013$; ☆(NSCLC vs SCLC) $P = 0.0041$;

* (AD vs SQ) $P = 0.0013$; △(G1-2 vs G3) $P = 0.0219$

表 2 IHC 和 FCM 两种方法中 P-gp 结果的比较

Tab 2 Correlation of P-gp immunoreactivity between IHC and FCM

| IHC | FCM | |
|---------------|---------------|---------------|
| | P-gp positive | P-gp negative |
| P-gp positive | 13 | 5 |
| P-gp negative | 6 | 5 |

Coincident rate : 62.1% (18/29)

表 3 IHC 和 FCM 两种方法中 p53 结果的比较

Tab 3 Correlation of p53 immunoreactivity between IHC and FCM

| IHC | FCM | |
|--------------|--------------|--------------|
| | p53 positive | p53 negative |
| p53 positive | 19 | 3 |
| p53 negative | 4 | 3 |

Coincident rate : 75.9% (22/29)

3 讨论

P-gp 是定位于 7q21.1 的 MDR₁ 基因所编码的跨膜糖蛋白,分子量为 170 ku,MRP 基因位于 16p13.1,其编码蛋白 MRP 分子量为 190 ku,两者结构同源性不到 15%,但均属于 ATP 结合盒式超家族,有“药物外排泵”的作用,它们的过表达与多种肿瘤的 MDR 密切相关。有研究发现肺癌中 P-gp、MRP 与耐药有一定相关性^[1,2],但也有实验表明 P-gp、MRP 与肺癌耐药关系不大^[3,4]。本研究采用免疫组化方法,发现肺癌组织中 P-gp、MRP 均有不同程度的过表达,阳性率分别为 61.3% 和 54.8%,而正常肺组织中未见 P-gp、MRP 表达,表明两者在肺癌发生及耐药形成过程中可能起一定作用。31 例肺癌组织中,P-gp 与 MRP 共阳性 15 例,共阴性 10 例,两者表达具有显著相关性($P < 0.01$)。Narasaki 等^[7]亦报道大部分肺癌组织共表达 MDR₁、MRP 基因,提示 P-gp、MRP 可能通过一定的协同作用来参与肺癌细胞的多药耐药。

本实验中 P-gp 和 MRP 阳性表达集中在 NSCLC,6 例 SCLC 均无阳性表达,与 Beer、Sugawa 等的研究结果基本一致^[8,9],这可能解释临床上 SCLC 对首次化疗反应性高,而 NSCLC 对化疗敏感性低的现象。由此亦可以推测 P-gp、MRP 为 NSCLC 而不是 SCLC 的两种内源性 MDR 机制。

关于 P-gp、MRP 的表达与肿瘤进展等临床指标之间的关系,文献报道不尽相同。本研究结果表明,分化程度较高的肺癌组织 P-gp 表达阳性率较高,与临床上恶性度高的肿瘤反而对化疗敏感的现象相符合。

Scotlandi 等^[10]发现骨肉瘤的转移能力与 P-gp 表达水平呈负相关,认为这可能是由于 P-gp 使得瘤细胞

获得某种变异表型,改变了细胞粘附特性,从而影响肿瘤的扩散。在我们随访的 24 例患者中,有 4 例出现远处转移,主要发生于 P-gp、MRP 阴性者,但由于本研究样本量少,未得出统计学差异。P-gp、MRP 与肺癌转移之间的关系,有待于进一步的研究。

p53 是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因,本研究中 p53 阳性率达 71.0%,鳞癌阳性率明显高于腺癌($P < 0.01$),吸烟患者阳性率明显高于不吸烟患者($P < 0.05$),而与肿瘤分期、分化、淋巴结转移无明显关系。有研究发现突变型 p53 能刺激 MDR₁ 基因促动子活性^[11],Bodey 等^[5]亦报道乳腺癌中 p53 突变与 MDR₁ 基因过表达有关,但 Angelis 等^[12]发现大肠癌中 MDR₁ 表达并不依赖于 p53 突变。在我们的实验中,p53、P-gp 阳性率均较高,但两者间没有显著相关性。本结果并不支持 p53 异常与 P-gp 的过表达有关。一种可能的解释是异常 p53 在不同肿瘤中受不同细胞因子影响,体现出不同的构象和功能。

作为检测细胞蛋白表达的两种方法,FCM 和 IHC 各有优点。使用 FCM 时,可同时处理大量标本,具有快捷、敏感、客观的特点,而 IHC 比较直观,能观察组织的结构分布和蛋白表达的定位。本研究发现两种方法的符合率在 P-gp、p53 分别为 62.1% 和 75.9%,表明两者同时应用可以相互印证,提高检测的可靠性。但 FCM 和 IHC 尚存在一定的不符合率,可能与标本固定条件、所用单抗、检测技术不同以及标本的异源性等因素有关。

参 考 文 献

- 1 Abe Y, Ohnishi Y, Yoshimura M, et al. P-glycoprotein-mediated acquired multidrug resistance of human lung cancer cells in vivo. *Br J Cancer*, 1996, 74(12): 1929-1934.
- 2 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.
- 3 Oka M, Fukuda M, Sakamoto A, et al. The clinical role of MDR₁ gene expression in human lung cancer. *Anticancer Res*, 1997, 17(1B): 721-724.
- 4 Futscher BW, Abbaszadegan MR, Domann F, et al. Analysis of MRP mRNA in mitoxantrone-selected, multidrug resistant human tumor cells. *Biochem Pharmacol*, 1994, 47(9): 1601-1606.
- 5 Bodey B, Bodey BJR, Groger AM, et al. Immunocytochemical detection of the P170 multidrug resistance (MDR) and the p53 tumor suppressor gene proteins in human breast cancer cells: clinical and therapeutical significance. *Anticancer Res*, 1997, 17(2B): 1311-1318.
- 6 Morkve O, Laerum OD. Flow cytometric measurement of p53 protein expression and DNA content in paraffin-embedded tissue from bronchial carcinomas. *Cytometry*, 1991, 12(5): 438-444.
- 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.

- 8 Beer TW , Rowlands DC , Crocker J. Detection of the multidrug resistance marker P-glycoprotein by immunohistochemistry in malignant lung tumours. *Thorax* ,1996 ,51(5):526-529.
- 9 Sugawara I , Yamada H , Nakamura H , et al. Preferential expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. *Int J Cancer(Pred Oncol)* ,1995 ,64(5):322-325.
- 10 Scotlandi K , Serra M , Nicoletti G , et al. Multidrug resistance and malignancy in human osteosarcoma. *Cancer Res* ,1996 ,56(10):2434-2439.
- 11 Zastawny RL , Salvino R , Chen J , et al. The core promoter region of the P-glycoprotein gene is sufficient to confer differential responsiveness to wild-type and mutant p53. *Oncogene* ,1993 ,8(6):1529-1535.
- 12 Angelis PD , Stokke T , Smedshammer L , et al. P-glycoprotein is not expressed in a majority of colorectal carcinomas and is not regulated by mutant p53 in vivo. *Br J Cancer* ,1995 ,72(2):307-311.

(收稿 :1999-10-21 修回 2000-02-23)

(本文编辑 李蓓兰)