

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.03.010

原发性肝细胞癌中 P-gp、Topo II α 和 P53 的表达及意义

陈漫霞¹, 姚振江¹, 陈思东¹, 王漫云², 许雅¹, 蔡旭玲¹

Expression and Implication of P-gp, Topo II α and P53 in Primary Hepatocellular Carcinoma

CHEN Man-xia¹, YAO Zhen-jiang¹, CHEN Si-dong¹, WANG Man-yun², XU-Ya¹, CAI Xu-ling¹

1. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China; 2. Department of Information, Second Affiliated Hospital of Zhongshan University

Corresponding Author: CHEN Si-dong, E-mail: cdchen1@tom.com

Abstract: Objective To explore the expression of P-glycoprotein (P-gp), topoisomerase II α (Topo II α), P53 in primary hepatocellular carcinoma (PHC) and their correlations with clinical characteristics.

Methods The expressions of P-gp, Topo II α and P53 were detected by means of SP immunohistochemical technique in 135 cases of PHC. **Results** The positive rates of P-gp, Topo II α and P53 were 80.74% (109/135), 46.67% (63/135), 33.33% (45/135) respectively. The positive rate of P-gp was higher than that of Topo II α or P53 ($P=0.000$). The positive rate of Topo II α was higher than that of P53 ($P<0.05$). The expression of P-gp was related to age, tumor differentiation and tumor size. The expressions of P-gp and Topo II α were higher in cases with AFP-elevated than those of AFP-normal ($P<0.05$). The expressions of P-gp and P53 were higher in cases with AST-elevated than those of AST-normal ($P<0.05$). The expressions of Topo II α and P53 weren't related to age, tumor differentiation and tumor size ($P>0.05$). The co-expression rate of multidrug resistant genes was 51.85% (70/135). The co-expression rate was higher than individual expression rate (34.07%, $\chi^2=8.706$, $P<0.01$). **Conclusion** The multidrug resistance of PHC is affected by various multidrug resistance genes. There is synergistic effect between single and multiple genes, co-expression of multiple genes mainly. It is important that detection of their expressions may guide the clinical use of drugs and predicate chemotherapy effects.

Key words: Primary hepatocellular carcinoma; Multidrug resistance; P-glycoprotein; Topoisomerase II α ; P53

摘要:目的 研究原发性肝细胞癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)组织中多药耐药基因 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、拓扑异构酶 II α (topoisomerase II α , Topo II α) 和 P53 的表达及共表达情况,分析其表达与 PHC 临床特征的关系。**方法** 采用免疫组织化学 SP 法检测 P-gp、Topo II α 和 P53 的表达,并结合临床特征进行分析。**结果** P-gp、Topo II α 和 P53 阳性表达率分别为 80.74% (109/135)、46.67% (63/135) 和 33.33% (45/135), P-gp 阳性率明显高于 Topo II α 、P53 ($P=0.000$), Topo II α 阳性率高于 P53 ($P<0.05$)。P-gp 阳性率与患者年龄、肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小有关,患者血清 AFP 升高者 P-gp、Topo II α 阳性率均高于 AFP 正常者 ($P<0.05$), 血清 AST 升高者 P-gp、P53 阳性率均高于 AST 正常者 ($P<0.05$)。Topo II α 和 P53 阳性率与患者年龄、肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小无关 ($P>0.05$)。两种和三种基因产物共表达阳性率为 51.85% (70/135), 明显高于单一基因产物表达阳性率 34.07% ($\chi^2=8.706$, $P<0.01$)。**结论** 肝癌多药耐药是由多种耐药基因产物共同作用的结果, 单基因和多基因共同作用, 以多基因共表达为主。联合检测肝癌患者的多药耐药基因产物, 对于临床合理用药、提高化疗疗效具有指导意义。

关键词: 原发性肝细胞癌; 多药耐药; P-糖蛋白; 拓扑异构酶 II α ; P53

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)03-0278-03

收稿日期: 2010-03-01; 修回日期: 2010-07-09

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(07117591)

作者单位: 1. 510310 广州, 广东药学院公共卫生学院; 2. 中山大学附属第二医院信息科

通信作者: 陈思东, E-mail: cdchen1@tom.com

作者简介: 陈漫霞(1978-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事肿瘤多药耐药的研究

0 引言

肿瘤细胞对化疗药物的耐受, 即多药耐药 (Multidrug resistance, MDR), 是导致肿瘤化疗失败的主要原因^[1]。肿瘤多药耐药机制错综复杂, 其形成与多种耐药基因产物表达有关。目前多数研究

仅涉及单个或两个耐药基因的检测,多个耐药基因共同引起肝癌耐药现象及其共表达情况报道较少。本文通过免疫组织化学方法检测原发性肝细胞癌 PHC 组织中 P-糖蛋白、拓扑异构酶 II α 和 P53 的表达及共表达情况,分析其表达与临床特征的关系,为指导临床合理用药,预测化疗疗效,预防肝癌的复发和转移提供参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料及试剂

研究对象来源于 2008 年 9 月—2009 年 8 月在广州市中山大学附属第二医院和南方医院三级甲等医院进行原发性肝癌手术切除病例,所有病例均经术后病理证实为肝细胞癌。共收集 PHC 患者 135 例,其中男 118 例,女 17 例;年龄 19~83 岁,中位年龄 52 岁。按肝癌的临床病理分级分为:高分化 36 例、中分化 74 例、低分化 25 例;10 例术前接受过化疗,其余为初次诊治。

单克隆抗体、免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 显色剂等试剂均购于北京中杉生物技术有限公司。

1.2 组织标本处理及免疫组织化学方法

组织标本来源于病例手术切除的肝癌组织,经 10% 的中性福尔马林固定、脱水、常规石蜡包埋。将石蜡标本 4 μ m 厚连续切片,进行常规 HE 染色和免疫组织化学染色。

采用免疫组织化学 SP 二步法,用柠檬酸盐缓冲液高压抗原修复,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。用已知阳性片作阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替第一抗体作阴性对照。

1.3 结果判断标准

P-gp 阳性表达主要位于细胞膜和细胞质,表现为黄色,细胞核无表达;Topo II α 、P53 阳性表达主要位于细胞核。评分标准参照文献^[2]:按阳性细胞百分率评分:无阳性细胞为 0 分、阳性细胞 $\leq 10\%$ 为 1 分、阳性细胞 11%~50%为 2 分、阳性细胞 51%~80%为 3 分、阳性细胞 $> 80\%$ 为 4 分;按阳性细胞着色强度评分:无色为 0 分、浅黄色为 1 分、黄色为 2 分、棕黄色为 3 分。将阳性细胞百分率和着色强度的得分相乘, ≤ 2 分者为阴性, > 2 分为阳性。所有切片的免疫组织化学结果均读片两次以上。

1.4 统计学方法

所有数据资料采用 EpiData3.1 录入,数据分析采用 SPSS15.0 软件;组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 P-gp、Topo II α 、P53 在 PHC 组织中的表达

P-gp 阳性表达率最高,为 80.74% (109/135),Topo II α 和 P53 阳性表达率分别为 46.67% (63/135) 和 33.33% (45/135)。P-gp 阳性率明显高于 Topo II α 和 P53 ($\chi^2 = 33.89$; $\chi^2 = 61.91$, $P = 0.000$)。Topo II α 阳性率高于 P53 ($\chi^2 = 5.0$, $P < 0.05$)。

2.2 PHC 组织中 P-gp、Topo II α 、P53 表达与临床特征的关系

P-gp 阳性表达率与患者年龄、肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小有关,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。患者血清 AFP 升高者 P-gp、Topo II α 阳性率均高于 AFP 正常者 ($P < 0.05$),患者血清 AST 升高者 P-gp、P53 阳性率明显高于 AST 正常者 ($P < 0.05$)。低、中和高分化 PHC 中 P-gp 表达阳性率分别为 96.00% (24/25)、82.43% (61/74) 和 66.67% (24/36),即肝癌细胞分化程度越低,P-gp 阳性率越高。Topo II α 、P53 阳性表达率与患者年龄、肝癌细胞分化程度、肿瘤大小无关 ($P > 0.05$),见表 1。

2.3 P-gp、Topo II α 、P53 在 PHC 组织中共表达情况

在 135 例 PHC 组织中,同时检测这三种基因产物,均可出现单一耐药基因阳性表达。P-gp、Topo II α 、P53 单一基因表达阳性率合计为 34.07% (46/135);两种基因产物共表达阳性率合计为 28.89% (39/135),三种基因产物共表达阳性率为 22.96% (31/135),即两种和三种基因产物共表达阳性率为 51.85% (70/135),明显高于单一基因产物表达阳性率 (34.07%, $\chi^2 = 8.706$, $P < 0.01$),见表 2。

3 讨论

肿瘤耐药机制错综复杂,目前研究较多的有 P-gp、MRP、Topo II α 、GST- π 、P53 等,其中 P-gp 高表达被认为是介导肿瘤多药耐药最主要机制之一^[3],介导经典的耐药途径。P-gp 是一种跨膜糖蛋白,具有能量依赖性药泵功能,其作用机制是在细胞膜上形成 ATP 依赖性膜泵,当抗肿瘤药物进入时,将药物泵出细胞,使细胞内药物浓度降低,导致细胞耐药^[4]。Topo II α 是在 DNA 复制和重组中起重要作用的一种核酶,目前多用于肿瘤多药耐药判断的指标及作为抗癌药物的靶点研究^[5]。Topo II α 是酶介导的耐药机制^[6],介导非典型的耐药途径。本研究结果表明 P-gp 膜蛋白介导的耐药在 PHC 多药耐药中起重要作用,三种基因产物不同程度地参与了肝癌多药耐药的形成,这也说明了肝癌多药耐药机制的多途径、多因素性。

表 1 PHC 组织中 P-gp、Topo II α、P53 表达与临床特征的关系

Table 1 Relationships between expressions of P-gp, Topo II α, P53 and clinical characteristics

Clinical characteristics	n	P-gp		χ^2	Topo II α		χ^2	P53		χ^2
		+	-		+	-		+	-	
Age(years)										
≤40	37	29	8		14	23		9	28	
41~60	76	67	9	8.596*	35	41	3.716	29	47	2.170
>60	22	13	9		14	8		7	15	
Differentiation										
Well	36	24	12		15	21		11	25	
Middle	74	61	13	9.277*	37	37	0.763	21	53	4.863
Poor	25	24	1		11	14		13	12	
Tumor size(cm)										
d≤3	32	30	2		17	15		8	24	
3<d≤5	33	20	13		14	19		9	24	
5<d≤10	43	36	7		18	25		16	27	
d>10	27	23	4	12.675**	14	13	1.466	12	15	3.336
AFP										
Elevated	97	85	12		51	46		34	63	
Normal	38	24	14	10.515**	12	26	4.837*	11	27	0.458
AST										
Elevated	70	63	7		35	35		31	39	
Normal	65	46	19	8.016**	28	37	0.649	14	51	7.848**

Note: * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$

表 2 P-gp、Topo II α、P53 在 PHC 组织中共表达情况

Table 2 The co-expression of P-gp, Topo II α, P53 in PHC

Multidrug resistance gene			n	Constituent ratio (%)
P-gp	Topo II α	P53		
+	-	-	40	29.63
-	+	-	5	3.70
-	-	+	1	0.74
+	+	-	26	19.26
+	-	+	12	8.89
-	+	+	1	0.74
+	+	+	31	22.96
-	-	-	19	14.08

本研究发现肝癌细胞分化程度越低, P-gp 阳性率越高, 与蒋业贵等^[7] 研究结果一致, 这与临床上 PHC 分化程度越低, 恶性程度越高, 预后越差, 对化疗不敏感, 易产生耐药性相符。研究还发现肝癌 P-gp 阳性表达与患者年龄、肿瘤大小、谷草转氨酶水平等因素也即肝癌的临床病理特征、病情发展有关, 说明 P-gp 能较好地反映肝癌的一些生物学特性。研究结果发现 Topo II α、P53 阳性率与患者年龄、肿瘤细胞分化程度、肿瘤大小无关, 文献也有类似报道^[8-9], 是因为 Topo II α、P53 介导的耐药机制不受肝癌生物学特性的影响还是其他原因, 这有待于进

一步研究。

有研究发现, 在肺癌、乳腺癌及其他恶性肿瘤组织中多药耐药基因产物存在共表达现象^[10-12]。本研究发现在原发性肝细胞癌组织中 P-gp、Topo II α、P53 也存在共表达, 结果显示两种和三种基因产物的阳性表达率为 51.85%, 明显高于单一基因产物阳性表达率(34.07%, $P<0.01$), 提示它们通过不同的机制引起肝癌多药耐药, 单基因和多基因共同作用, 多基因共表达为主可能是肝癌多药耐药的主要特征。耐药基因产物的共表达对肝癌临床化疗方案选择具有指导意义, 也提示临床耐药逆转研究应考虑多个基因的共同作用。因此联合检测肝癌组织中多个耐药基因产物, 一方面可以揭示肝癌耐药机制, 另一方面可更客观地反映肝癌的耐药情况, 对有目的地选择化疗方案、优化组合、提高疗效有重要意义。

致谢: 非常感谢南方医院申洪教授、齐文娟同学对本研究的大力支持与帮助!

参考文献:

[1] Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, et al. *In Vitro* and *in Vivo* Reversal of P-Glycoprotein-mediated Multidrug Resistance by a Novel Potent Modulator, XR9576 [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2):749-758.

老年肿瘤是一特殊人群,在对他们的诊治过程中,强调规范化的同时也要重视个体化^[10]。在制定治疗计划时,不能单依据年龄来制定,应同时结合肿瘤情况、合并症、KPS 评分及期望寿命等综合评估考虑,使治疗风险最小化、病人获益最大化,以达到延长患者生存期,提高生存质量。

参考文献:

[1] 元姝楠,谢方云,卢泰祥,等. 老年鼻咽癌患者的临床特征[J]. 癌症, 2006, 25(6):40-74.

[2] 朱小东,韦军葆,曲颂,等. 840 例鼻咽癌预后的多因素分析[J]. 中国肿瘤临床, 2008, 35(17):961-966.

[3] Tombolini V, De Sanctis V, Donato V, et al. Prognostic features and treatment outcome in patients with nasopharyngeal carcinoma: an experience of 20 years[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2B):1413-1418.

[4] Pinto A, De Filippi R, Frigeri F, et al. Aging and the hemopoietic system[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, 48(suppl): S3-S12.

[5] Itzhaki O, Kaptzan T, Skutelsky E, et al. Age-adjusted anti-tumoral therapy based on the demonstration of increased apop-

tosis as a mechanism underlying the reduced malignancy of tumors in the aged[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1688(2): 145-159.

[6] Repetto L, Fratino L, Audisio RA, et al. Comprehensive geriatric assessment adds information to Eastern Cooperative Oncology Group performance status in elderly cancer patients: an Italian Group for Geriatric Oncology Study[J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(2):494-502.

[7] Yancik R, Wesely MN, Ries L, et al. Comorbidity and age as predictors of risk for early mortality of male and female colon carcinoma patients. A population based study[J]. *Cancer*, 1998, 82(11): 2123-2134.

[8] Kwong DL, Sham JS, Chua DT, et al. The effect of interruptions and prolonged treatment time in radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997, 39(3):703-710.

[9] Bernardi D, Barzan L, Franchin G, et al. Treatment of head and neck cancer in elderly patients: state of the art and guidelines[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 3(1):71-80.

[10] 吴琼雅,周道安,李爱武,等. 老年局部晚期非小细胞肺癌放化疗综合治疗的疗效分析[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(5):352-354.

[编辑校对:周永红]

(上接第 280 页)

[2] Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in invasive ovarian carcinoma: implication for prognosis [J]. *Histopathology*, 2009, 54(6):657-666.

[3] Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1859-1876.

[4] Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease [J]. *Gut*, 2003, 52(5):759-766.

[5] Zorzos HS, Lazaris AC, Korkolopoulou PA, et al. Multidrug resistance proteins and topoisomerase II alpha expression in colon cancer: association with metastatic potential[J]. *Pathology*, 2003, 35 (4): 315-318.

[6] Okada Y, Tosaka A, Nimura Y, et al. Atypical multidrug resistance may be associated with catalytically active mutants of human DNA topoisomerase II alpha[J]. *Gene*, 2001, 272(1-2):141-148.

[7] 蒋业贵,王宇明,刘同华. 肿瘤耐药相关标志在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. *重庆医学*, 2006, 35(1): 47-48, 51.

[8] 闵婕,冯英明,张贺龙,等. 多药耐药相关蛋白 Topo II 在原发性肝细胞癌的表达及意义[J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(7): 787-789.

[9] 闵婕,李刚,宋扬,等. 原发性肝细胞癌 p53 蛋白和多药耐药相关蛋白的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2005, 13 (4): 444-446.

[10] 霍建民,车春莉,黄淇. 肺癌多药耐药因子共表达相关性及其临床意义的研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2004, 7(3):218-221.

[11] 曾晓华,周洪伟,余永康,等. 乳腺癌组织中多药耐药基因产物的表达及其相互关系[J]. *重庆医学*, 2002, 31(11):1068-1069.

[12] 张燕,金先庆,赵珍珍,等. 5 种耐药基因在成人常见恶性肿瘤中的表达特点[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(10): 1023-1026, 1031.

[编辑:安 凤;校对:周永红]