

LRP 及 GST- 的表达与非小细胞肺癌的耐药性关系

姬明丽¹, 千智斌², 宋晓荣¹

The Effect of LRP and GST- in Mechanism of Drug Resistance of Non-small Cell Lung Cancer

Ji Ming-li¹, Qian Zhi-bin², Song Xiao-rong¹

1. Department of Pathophysiology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China, 2. Functional Laboratory

Abstract :Objective To investigate the chemoresistance of non-small cell lung cancer (NSCLC) and the expression of correlative protein and genes which can lead to multidrug resistance(MDR) we explore the relation between chmoresistance and the expression of mdr1,MRP and GST- in NSCLC respectively, and define the function of the three kinds of genes in MDR mechanisms. **Methods** 91 cases of NSCLC were tasted with MTT assay to evaluate their chemoresistance. The chemotherapy drugs include cyclophamide ,adriamycin and cisplatin + fluorouracil. The expression of the three kinds of genes above were examined with immunohistochemical assay. **Results** 1. The percentage of drug resistance of cyclophamide ,adriamycin and cisplatin + fluorouracil were 58.2 % ,56.0 % and 46.2 % ,respectively. There are 27 cases resisting all three medications ,while there are 19 cases sensitizing all three medications. The multidrug resistance was not associated with histological types and degree of differentiation of NSCLC. 2. The expression percentage of LRP and GST- in NSCLC were 53.8 % and 64.8 % respectively. There is not significant difference in the expression of LRP and GST- between human adeoncarcinoma and sequamous cell carcinoma($P > 0.05$). 3. The correlation between the positive expression of P-gp ,MRP and GST- and the degrees of chemoresistance to the three kinds of agents were significantly respectively($P < 0.05$) , and the degree of chemoresistance to the three kinds of agents among the different degrees of expressions of LRP and GST- are significantly different respectively($P < 0.05$). **Conclusion** 1. There are certain degrees of intrinsic resistance in different kinds of chemotherapeutic agents in NSCLC. 2. The intrinsic multidrug resistance mechanisms may be of the co-effect of these two genes(lung resistance-related protein gene and GST- gene).

Key words :Non-small lung cancer ;Multidrug resistance ;Lung resistance-related protein gene ; Glutathione s-transferases- ;In vitro chemosensitivity assay ;Immunohistochemistry

摘 要 :目的 探讨 NSCLC 的化疗耐药性和参与介导多药耐药的相关基因和蛋白 LRP 及 GST- 的表达 ,对比分析 NSCLC 的多药耐药性与上述二种耐药相关基因表达的关系。方法 应用肿瘤细胞体外培养和 MTT 法对 91 例未经化疗的 NSCLC 进行体外化疗药物敏感性测试 ,观察 NSCLC 分别对环磷酰胺、阿霉素、顺铂 + 5-Fu 三种单药和联合用药方案耐药情况和总的耐药情况 ,并用免疫组织化学方法对其进行 3 种耐药相关基因(LRP、MRP 及 GST-)表达的检测 ,并将其表达情况与对应的化疗耐药性进行相关分析。结果 91 例 NSCLC 化疗敏感性检测结果显示 :53 例(58.2 %) 对环磷酰胺耐药 ,51 例(56.0 %) 对阿霉素耐药 ,42 例(46.2 %) 对顺铂 + 5-Fu 耐药。其中 ,19 例(20.9 %) 对三种用药均敏感 ,27 例(29.8 %) 对三种用药均耐药 ,其耐药性与组织学类型和分化程度无关($P > 0.05$)。LRP 和 GST- 在 91 例 NSCLC 中总的阳性表达率分别为 :53.8 % 和 64.8 %。鳞癌和腺癌相比 LRP 和 GST- 的表达无显著性差异($P > 0.05$)。且 LRP 和 GST- 的表达与对三种化疗用药的耐药性均呈显著正相关($P < 0.05$) ,并且不同表达程度间也有显著差异性($P < 0.05$)。结论 LRP 和 GST- 在 NSCLC 中均有较高的阳性表达并共同介导参与了 NSCLC 固有多药耐药机制。

关键词 :NSCLC ;多药耐药 ;LRP 基因 ;谷胱甘肽转移酶- 基因 ;体外药敏试验 ;免疫组织化学

中图分类号 :R734.2 文献标识码 :A
文章编号 :1000-8578(2006)05-0317-04

收稿日期 :2005-06-01 ;修回日期 :2005-09-12

作者单位 :1. 453003 河南新乡医学院病理生理学教研室 ,2. 机能实验室

作者简介 :姬明丽(1975-) ,女 ,硕士 ,讲师 ,主要从事病理生理学的教学与科研工作

0 引言

化疗是对失去手术机会及术后复发的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者治疗的一个重要手段,但由于多药耐药的(multidrug resistance, MDR)产生常导致化疗失败。本实验应用肿瘤细胞体外培养、MTT法和免疫组织化学对91例NSCLC的化疗耐药性与肺耐药蛋白(lung resistance-related protein, LRP)及谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferases, GST-)的表达关系进行研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 材料 收集2001年9月~2002年10月间新乡医学院第一附属医院、新乡医学院第三附属医院胸外科手术切除的NSCLC新鲜标本91例。所有患者术前均未接受过化、放疗。每例标本分为两份,一部分立即消化后用于药敏试验;另一部分常规10%福尔马林固定、石蜡包埋、连续5 μ m切片,用于免疫组化染色检查相关耐药基因的表达情况。

1.1.2 主要试剂及培养基 小牛血清、RPMI-1640、胶原酶 型为Gibco/BRL公司产品;二甲基亚砜、噻唑蓝为Sigma公司产品。

1.1.3 化疗药物及配制

(1) 化疗药物 环磷酰胺(Cyclophamide)、阿霉素(Adriamycin)为北京协和制药厂产品;顺铂(Cisplatin)、5-Fu为旭东海普药业有限公司产品。

(2) 药物浓度及配制 均采用药物在人体内的血浆高峰浓度为药敏测试的药物浓度。

1.1.4 免疫组织化学试剂 鼠抗人LRP单克隆抗体(LRP-56)、鼠抗人GST-单克隆抗体(A3600)、PV6000通用型二步法免疫组化试剂盒、浓缩型DAB试剂盒及免疫组织化学染色常用试剂,均购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 药敏实验(MTT法) 参照文献[1]进行。药物敏感性判断标准^[2]:肿瘤细胞生长抑制率30%为耐药,31%~50%为低度敏感,51%~70%为中度敏感,70%为高度敏感。

1.2.2 免疫组织化学染色及判断标准 染色方法按PV6000通用型二步法免疫组化试剂盒说明书进行。结果判断,参照文献[3]进行。

1.3 统计学处理 采用卡方检验、Kruskal-Wallis Test和Spearman Test,均借助SPSS10.0软件完成。

2 结果

2.1 NSCLC的化疗耐药性

2.1.1 总体耐药情况 53例(58.2%)对环磷酰胺耐药,51例(56.0%)对阿霉素耐药,42例(46.2%)对顺铂+5-Fu耐药。其中,19例(20.9%)对3种用药均敏感,27例(29.8%)对3种用药均耐药,见表1。

表1 91例NSCLC(鳞癌50例,腺癌41例)对三种用药方式的耐药情况

分组	环磷酰胺		阿霉素		顺铂+5-Fu	
	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)	例数	百分率(%)
高度敏感	5	5.5	4	4.4	8	8.8
鳞癌	3	6.0	2	4.0	5	10.0
腺癌	2	4.8	2	4.8	3	7.3
中度敏感	12	13.2	14	15.4	18	19.8
鳞癌	7	14.0	9	18.0	11	22.0
腺癌	5	12.2	5	12.2	7	17.1
低度敏感	21	23.1	22	24.2	23	25.2
鳞癌	14	28.0	15	30.0	14	28.0
腺癌	7	17.1	7	17.1	9	21.9
耐药	53	58.2	51	56.0	42	46.2
鳞癌	26	52.0	24	48.0	20	40.0
腺癌	27	65.9	27	65.9	22	53.7

2.1.2 组织学类型与化疗耐药性的关系 不同组织学类型(鳞癌和腺癌)的NSCLC的化疗耐药性无差异($P > 0.05$),见表2。

表2 NSCLC组织学类型和分化程度与耐药的关系

组织学类型	例数	耐药例数			P
		环磷酰胺	阿霉素	顺铂+5-Fu	
鳞癌	50	26	24	20	
高分化	12	8	8	7	
中分化	31	17	16	13	>0.05**
低分化	7	1	0	0	<0.05***
腺癌	41	27	27	22	>0.05*
高分化	21	17	16	14	
中分化	17	10	11	8	>0.05**
低分化	3	0	0	0	>0.05***

*鳞癌与腺癌相比;**高分化与中分化相比;***低分化与高分化和中分化相比。

2.1.3 分化程度与化疗耐药性的关系 比较分化程度与化疗耐药性的结果显示:鳞癌:高分化与中分化间无差异($P > 0.05$),但二者与低分化相比,低分化鳞癌对所用化疗药物和药物联合明显敏感($P < 0.05$)。腺癌:高、中、低分化间均无差异($P > 0.05$),但3例低分化腺癌对所用化疗药物和药物联合均敏感,见表2。

2.2 耐药相关基因表达与NSCLC耐药性的关系

2.2.1 LRP在NSCLC的表达与化疗耐药性的关系

(1)LRP在NSCLC的表达及与化疗耐药性的关系 LRP阳性部位定位于细胞浆,呈棕黄色,见

图 1、2。91 例 NSCLC 中 LRP 阴性者 42 例(包括鳞癌和腺癌,46.2%),阳性者 49 例(包括鳞癌和腺癌,53.8%)。鳞癌和腺癌相比 LRP 的表达无显著性差异($P>0.05$),见表 3。

表 3 LRP、GST 在 NSCLC 中的表达

组织学类型	LRP 表达			GST- 表达		
	-	+	++	-	+	++
鳞癌	26	12	12	17	18	15
腺癌	16	8	17	15	11	15

(2) NSCLC 中 LRP 的表达与耐药性的关系 LRP 的表达在 NSCLC 的组织学类型(鳞癌和腺癌)间无显著性差异,故对其表达与 NSCLC 耐药性的关系也未进行组织学类型的分解,结果显示:对于三种化疗用药方案,LRP 的表达与 NSCLC 的耐药性均呈显著的正相关($P<0.05$);其不同表达程度间也有差异性显著($P<0.05$),见表 4。

表 4 LRP、GST 的表达与 NSCLC 化疗耐药性的关系

方案	LRP 表达			GST- 表达		
	-	+	++	-	+	++
环磷酰胺						
耐药	8	16	29	7	16	30
敏感	34	4	0	25	13	0
阿霉素						
耐药	8	15	28	6	16	29
敏感	34	5	1	26	13	1
顺铂 + 5-Fu						
耐药	0	14	28	0	14	28
敏感	42	6	1	32	15	2

2.2.2 GST- 在 NSCLC 的表达及与化疗耐药性的关系

(1) GST- 在 NSCLC 中的表达 GST- 阳性部位定位于细胞浆,呈棕黄色,见图 3、4。91 例 NSCLC 中 GST- 阴性者 32 例(包括鳞癌和腺癌,35.2%),阳性者 59 例(包括鳞癌和腺癌,64.8%)。鳞癌和腺癌相比 GST- 的表达无显著性差异($P>0.05$),见表 3。

(2) NSCLC 中 GST- 的表达与耐药性的关系 GST- 的表达在 NSCLC 的组织学类型(鳞癌和腺癌)间无显著性差异,故对其表达与 NSCLC 耐药性的关系未进行组织学类型的分解,结果显示:对于三种化疗用药方案,GST- 的表达与 NSCLC 的耐药性均呈显著正相关($P<0.05$);其不同表达程度间也有显著性差异($P<0.05$),见表 4。

3 讨论

本研究对 91 例 NSCLC 化疗敏感性检测结果显示:53 例(58.2%)对环磷酰胺耐药,51 例

(56.0%)对阿霉素耐药,42 例(46.2%)对顺铂 + 5-Fu 耐药。其中,19 例(20.9%)对三种用药均敏感,更有 27 例(29.8%)对三种用药均耐药,说明部分 NSCLC 有着固有的化疗耐药性。目前 NSCLC 诱导化疗的总缓解率一般在 70%左右^[4],与本研究结果相符。本研究结果还显示:不同组织学类型(鳞癌和腺癌)的 NSCLC 化疗耐药性无差异($P>0.05$);比较分化程度与化疗耐药性的结果显示:鳞癌:高分化与中分化间无差异($P>0.05$),但二者与低分化相比,低分化鳞癌对所用化疗药物和药物联合明显敏感($P<0.05$)。腺癌:高、中、低分化间均无差异($P>0.05$),但所有 3 例低分化腺癌对所用化疗药物和药物联合均敏感,说明低分化者对所用化疗药物和药物联合有较好的敏感性。有研究^[5]表明肿瘤在未接触化疗药物前已存在有 MDR 基因的表达,从本实验的结果来看,有 46.2%~58.2%的 NSCLC 在化疗前已存在着对多种化疗药的耐药性,与此相符。

作为构成人体穹隆蛋白(major vault protein, MVP)的主要成分,LRP 广泛分布在人体体腔上皮、分泌器官等正常组织中,与 P-gp、MRP 一样,LRP 的主要作用是清除外源性毒性物质,使机体免受损害,其作用机制——阻止以细胞核为靶点的药物通过核孔进入细胞核,并将药物转运到细胞浆的囊泡中,以胞吐的方式排到细胞外^[5]。有研究证实 LRP 参与多种肿瘤对多种化疗药物的耐药^[6],但 LRP 在 NSCLC 的表达和与耐药关系的研究较少。本研究发现 LRP 在 NSCLC 中阳性表达为 53.8%,表明 LRP 在 NSCLC 中有着较高而强的阳性表达,提示 LRP 在 NSCLC 的固有化疗耐药机制中起着一定的作用。本研究发现 91 例 NSCLC 中 LRP 的表达与对环磷酰胺、顺铂 + 5-Fu、阿霉素的耐药性均呈显著正相关,并随表达程度的增加而增加($P<0.05$),说明在 NSCLC 中 LRP 参与了阻止顺铂和 5-Fu 等对肿瘤细胞 DNA 的破坏,并且通过胞吐作用对阿霉素影响转录的作用予以限制。故化疗前对 NSCLC 的 LRP 表达的检测,对于预测 NSCLC 对上述药物的耐药有着积极的指导意义。

GSTs 是一多基因家族,目前已发现有 μ 、 π 、 θ 和膜结合型 5 种同工酶,不仅可做为肿瘤转化的标志,而且能催化谷胱甘肽(GSH)与亲电性物质如抗癌药物结合,通过的活性将抗癌药物排出细胞,是肿瘤细胞对抗癌药物的代谢和运输能力增强,从而使肿瘤产生耐药性,而且很多对常规化疗药物耐药的细胞株的 GSTs 活性较高,GST- 是 GST 的几种同工酶中表达最高的一种^[5]。本研究发现 GST- 在

肺癌中肿瘤抑制基因 CEACAM1 的选择性拼接与 PTB 的过表达有关

袁榴娣, 丁洁, 李震

Alternating Splicing of Tumor Suppressor Gene CEACAM1 is Correlated with Over-expression of PTB in Lung Cancer

YUAN Liur-di, DING Jie, LI Zhen

Department of Genetics and Development Biology, Genetics Center of Southeast University, Nanjing 210009, China

Corresponding Author: YUAN Liur-di, E-mail: yld@seu.edu.cn

Abstract: Objective The possibility of modulating the difference of CEACAM1 splicing pattern between tumor tissues and their corresponding non-malignant lung tissue. **Methods** Detect the expression pattern of CEACAM1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) by Hot-PCR, mini-gene constructs and co-transfection with PTBs. **Results** The RNA transcript from this mini-gene could be spliced in a cell-specific manner. The exon 7 was predominantly included in H1944, but predominantly excluded in 22B. Over-expression of PTB could ubiquitously alter the ratio of CEACAM1L and CEACAM1S. The amount of CEACAM1L was decreased in a dosage-dependent manner. **Conclusion** We identified polypyrimidine tract binding protein (PTB) as the splicing factor that involves in inclusion / exclusion of CEACAM1 exon 7. A clear correlation was found between over-expression of PTB and the alternative processing of CEACAM1.

Key words: CEACAM1; Alternative splicing; PTB; Mini-gene

收稿日期: 2005-06-01; 修回日期: 2005-10-20

作者单位: 210009 南京, 东南大学遗传与发育生物学系, 东南大学遗传中心

通讯作者: 袁榴娣, E-mail: yld@seu.edu.cn

作者简介: 袁榴娣(1965-), 女, 博士, 副教授, 主要从事 RNA 拼接机制研究

摘要: 目的 研究 CEACAM1 通过选择性拼接而产生的两种变体在小细胞肺癌及癌旁组织中表达比例不同的调控机制。 **方法** 通过 Hot-PCR 检测小细胞

NSCLC 的阳性表达率为 64.8%, 也证明 GST- 在 NSCLC 中有着高而强的阳性表达, 提示 GST- 可能是介导 NSCLC 固有耐药性的主要原因之一。有关 NSCLC 中 GST- 表达与以顺铂为主的诱导化疗疗效分析的研究表明, GST- 高表达患者的生存期明显低于低表达者, 且 GST- 高表达与 p53 突变显著相关, 说明 GST- 通过外排顺铂抑制了由顺铂导致的 p53 依赖的肿瘤细胞的凋亡。本研究结果也显示 GST- 的表达与 NSCLC 对环磷酰胺、顺铂 + 5-Fu 及阿霉素的化疗耐药性呈显著的正相关并与表达程度有关 ($P < 0.05$), 说明 GST- 是介导 NSCLC 固有耐药性的重要耐药性因素之一。

通过本研究, 我们发现非小细胞肺癌存在着固有的化疗耐药性, 而且 LRP 及 GST- 的表达与 NSCLC 的耐药性呈明显的相关性并与表达程度正相关, 说明 LRP 及 GST- 基因共同参与作用了 NSCLC 的固有的化疗耐药性。

(本文图见第 384 页)

参考文献:

- [1] 辛华雯, 王润帮. MTT 显色法快速测定实体瘤化疗药物敏感性方法[J]. 肿瘤防治研究, 1993, 20(4): 254-256.
- [2] Abe S, Kubota T, Matsuzaki SW, et al. Chemotherapy test is useful in evaluating the appropriate adjuvant cancer chemotherapy for stage non-scirrhus and scirrhus gastric cancers [J]. Anticancer Res, 1999, 19(5C): 4581-4586.
- [3] 赵彤, 朱梅刚, 黄宗义, 等. 肺癌癌基因蛋白产物同步检测的对比分析[J]. 癌症, 1995, 1(3): 13-14.
- [4] Carmichael J, Mitche JB, Degraff G. Chemotherapy testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay [J]. Br J Cancer, 1998, 57(6): 540-544.
- [5] Volm M, Mattern J, Samsel B. Overexpression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase in resistant non-small cell lung carcinomas of smokers [J]. Br J Cancer, 1991, 6(4): 700-705.
- [6] 王洁, 刘叙仪, 蒋薇, 等. LRP, MRP, MDR1 基因在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义 [J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(4): 304-308.

[编辑: 安凤]

苏拉明联合槲皮素抑制肺腺癌小鼠移植瘤的转移

(正文见 314 页)

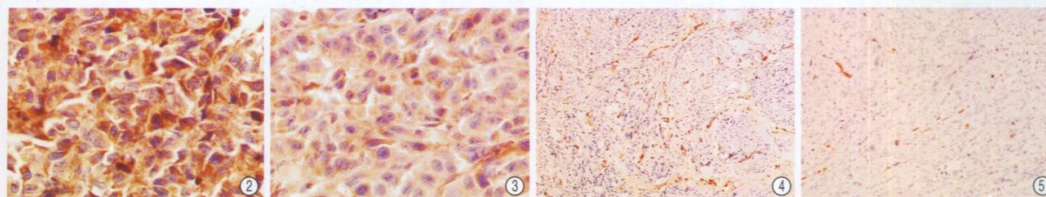


图2 对照组 VEGF 表达 (SP×400)
图3 联合组 VEGF 表达 (SP×400)

图4 对照组 CD34(MVD)表达 (SP×100)
图5 联合组 CD34(MVD)表达 (SP×100)

LRP 及 GST-π 的表达与非小细胞肺癌的耐药性关系

(正文见 317 页)

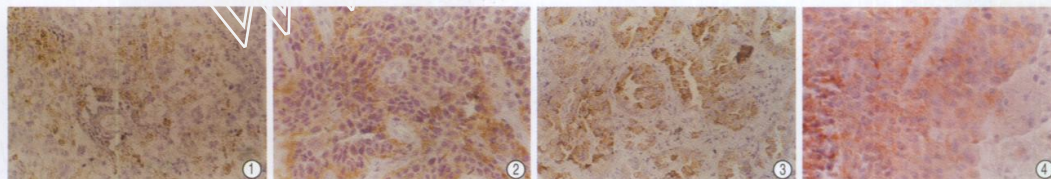


图1 LRP 在肺腺癌的阳性表达 (10×20)
图2 LRP 在肺鳞癌的阳性表达 (10×40)

图3 GST-π 在肺腺癌的阳性表达 (10×20)
图4 GST-π 在肺腺癌的阳性表达 (10×40)

UTI 抑制骨肉瘤细胞侵袭与转移的实验研究

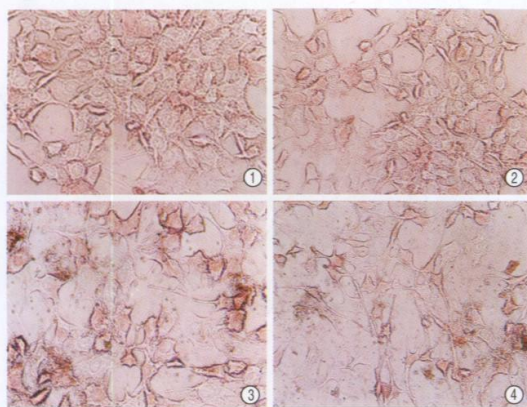


图1 所示 SP 免疫组化结果: ①为对照组②、③、④、⑤和⑥组分别为加入 10nM、50nM、100nM、300nM 和 500nM UTI 组(×100)

(正文见 355 页)