

## 用PCR方法定量检测多药抗性基因的表达

汲言山 沈倍奋 王文香

(军事医学科学院基础所, 北京100850)

郭静竹 李锦云

(北京医科大学人民医院)

**摘要** 肿瘤细胞对化疗药物的抗性是癌症有效化疗的主要障碍。人类细胞中多药抗性基因(MDR1)编码一种P-糖蛋白,后者功能是能量依赖的跨膜药物外输泵,可降低细胞毒药物在胞内的积累。定量分析MDR1表达水平可说明病人抗药能力的高低。本文应用PCR技术建立了灵敏度高、专一性好、可定量检测临床标本中MDR1表达水平的方法。对周血标本的初步检测表明:白血病化疗效果与MDR1表达水平的高低有关。

**关键词:** 多药抗性基因; P-糖蛋白; 白血病化疗; 基因表达; PCR

肿瘤化疗成功的主要障碍是肿瘤细胞对化疗药物的抗性<sup>[1]</sup>。细胞的药物交叉抗性表型于1970年首次被阐明。近年来的研究表明:多药抗性表型标志是一种分子量170kD的胞膜糖蛋白,称为P-糖蛋白<sup>[2]</sup>,它是一个能量依赖的跨膜药物外输泵<sup>[3]</sup>,可降低细胞毒药物在胞内的积累。人类细胞中有两种多药抗性基因MDR1和MDR3,两者的同源性较高,经检测大于80%<sup>[4,5]</sup>,相应P-糖蛋白的同源性也接近80%,但两者的作用并不相同,研究证实:MDR3对细胞药物抗性没有贡献<sup>[5]</sup>,是MDR1在起主要作用,并交叉抗若干在结构和功能上并不相关的亲脂类药物<sup>[6]</sup>,表现出所谓多药抗性。

多药抗性基因的表达研究一方面增加了对肿瘤抗药性的认识,另一方面可确定病人对化疗药物的抗性,并有可能帮助每个病人选择合理的化疗方案,从而大大改善治疗效果<sup>[7]</sup>。MDR1的表达水平在肿瘤治疗中的重要潜在意义正有待揭示,迫切需要解决的是检测方法学上的改进<sup>[7]</sup>。目前常规检测方法有二类:其一是用P-糖蛋白的抗体作免疫组化检测。其二是核酸杂交方法。这些方法的灵敏度不够高,且易与MDR3或其编码的蛋白发生交叉反应,导致假阳性。因此常规方法所得结果往往规律性不好,不能准确预测化疗效果和预后<sup>[6]</sup>。

本文利用逆转录PCR方法的高灵敏度,高专一性,建立了定量检测MDR1表达水平的方法,该方法样品用量少,专一性高,定量检测的重复性好。

## 材 料 与 方 法

### 一、试剂

AMV 逆转录酶购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶购自医学科学院基础所。

### 二、标本

正常人和白血病人病人的外周血3—5mL 加等体积生理盐水, 置Ficoll分离液上离心分离有核细胞, 用生理盐水洗两次, 取 $1 \times 10^6$ 细胞于 $-70^\circ\text{C}$ 冻存备用。

### 三、RNA 制备及 cDNA 合成

细胞总RNA的提取采用AGPC法<sup>[8]</sup>, 紫外定量, 用尿素变性电泳鉴定RNA的质量。cDNA合成参照Promega公司的操作手册。

### 四、PCR

引物用计算机辅助设计。MDR1 的两条引物分别设在不同的外显子上, 上游引物为: 5' GTACCCATCATTGCAATAGC, 下游引物: 5' CAAACTTCTGCTCCTGAGTC。内对照 $\beta_2$ 微球蛋白基因( $\beta_2$ MG)的两条引物为: 5' CCACTGAAAAAGATGAGTAT, 5' CTTCAACCTCCATGATGCTG。在100 $\mu\text{L}$ 反应体积中含逆转录混合物80ng, 1.25mmol/L dNTP 16 $\mu\text{L}$ , 20 $\mu\text{mol/L}$ 引物各5 $\mu\text{L}$ , Taq DNA聚合酶 2 单位,  $94^\circ\text{C}$ 变性40S,  $55^\circ\text{C}$ 退火40S,  $72^\circ\text{C}$ 延伸50S, 通常扩增30循环。

### 五、PCR产物定量

PCR 扩增结束后, 取10 $\mu\text{L}$ 样品进行电泳, 琼脂糖凝胶的浓度为2.5%, 以6V/cm电泳40min, 溴化乙锭(EB)染色, 紫外照像, 用薄层扫描仪扫描底片上PCR产物带, 曲线下峰面积作为PCR产物的含量, 用MDR1的扩增产物Mdr1与 $\beta_2$ MG的扩增产物 $\beta_2m$ 的比值表示细胞MDR1的表达水平。

## 结 果

### 一、不同模板量对Mdr1与 $\beta_2m$ 比值的影响

为了消除不同样本及实验批次之间的误差, 设一内对照, 在同一反应管内同时逆转录PCR扩增Mdr1和内对照 $\beta_2m$ , 以二者的比值Mdr1/ $\beta_2m$ 衡量MDR1的表达水平。取一标本的总RNA逆转录混合物320ng, 对倍稀释至20ng, 分别作模板进行PCR扩增(Fig.1), 当模板量为80ng时, 比值Mdr1/ $\beta_2m$ 波动小, 大于160ng时比值偏大, 小于20ng时扩增产物量少不易测定。本文所有样本的PCR模板量调节在80ng。

### 二、PCR产物定量

取一样本的总RNA逆转录混合物80ng进行PCR扩增, 从第21循环起间隔3循环取样10 $\mu\text{L}$

至36循环, 样品作2.5%琼脂糖凝胶电泳, (Fig.2), EB染色, 紫外灯下照像, 扫描底片定量。Mdr1和 $\beta_2m$ 的扩增动力学相似, 小于33循环时, PCR产物与扩增循环数之间有线性关系。在选定的逆转录PCR条件下, EB染色产生的荧光能很好地体现PCR产物量的变化。15例正常人和白血病人病人的 $\beta_2m$ 表达量较稳定, MDR1表达量差别很大, 见Fig.3。为消除测量及系统误差, 本实验以比值Mdr1/ $\beta_2m$ 来定量分析MDR1的表达水平。

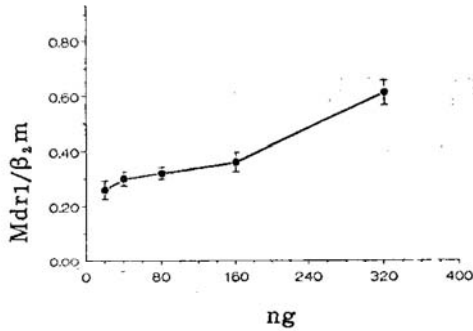


Fig.1 Effect of templet quantity on Mdr1/ $\beta_2m$

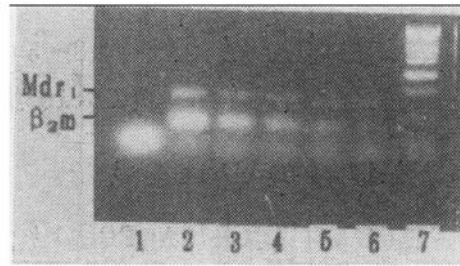


Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR products  
(1) primer (2)(3)(4)(5)(6)33,30,27, 24, 21 cycles (7) MW marker

### 三、PCR循环数对比值Mdr1/ $\beta_2m$ 的影响

固定PCR条件, 对MDR1表达水平不同的7例白血病人标本作定循环取样分析。结果见Fig.4。在30循环左右时比值Mdr1/ $\beta_2m$ 变化不大, 大于36循环时比值下降, 另外3例比值高(1.35)和比值低(0.018)的未显示, 不论比值高低均有相同趋势。当选定循环数为30时, 比值Mdr1/ $\beta_2m$ 的大小反映了每个标本MDR1表达水平的高低。

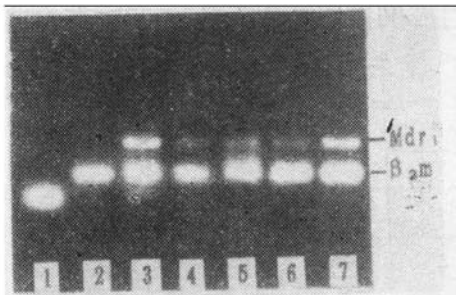


Fig.3 PCR products of normal and leukemia specimen  
1 primer, 2 normal, 3-7 leukemia

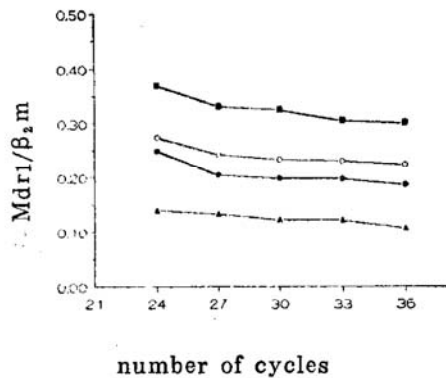


Fig.4 The effect of PCR cycles on Mdr1/ $\beta_2m$

### 四、临床标本的初步检测结果

采用上述实验选定的逆转录PCR条件, 对15例正常人和白血病人标本进行检测(Table 1)。正常人的MDR1表达水平很低或检测不到, 与常规方法检测结果一致。临床上化疗易缓解或持续缓解的白血病人病人的Mdr1/ $\beta_2m$ 小于0.2, 化疗不缓解或极易复发的病人Mdr1/ $\beta_2m$

都大于0.2。用本方法检测比值Mdr1/ $\beta_2m$ 的高低与白血病人的常规化疗结果符合的很好。初步检测结果虽不能统计处理，但已表明比值Mdr1/ $\beta_2m$ 是白血病人化疗的一个较好的预后指标。

**Table 1** MDR1 Expression and Clinical Characteristics of Patients with Leukemia and Normal Control

| Specimens      | Age/Sex | Diagnosis | Outcome (months) | MDR1* expression |
|----------------|---------|-----------|------------------|------------------|
| Leukemia       |         |           |                  |                  |
| 1              | 50/M    | M2        | NR(18+)          | 0.32             |
| 2              | 14/M    | L1        | RR(2)            | 0.23             |
| 3              | 10/F    | M5        | CR(14+)          | 0.12             |
| 4              | 2/M     | L1        | CR(6+)           | 0.05             |
| 5              | 35/M    | M5        | NR(8+)           | 1.35             |
| 6              | 14/M    | L2        | RR(3)            | 0.20             |
| 7              | 8/M     | L2        | CR(30+)          | <0.01            |
| 8              | 35/F    | M4        | PR               | 0.21             |
| 9              | 8/M     | L1        | CR(30+)          | 0.04             |
| 10             | 3/F     | ALL       | CR(6+)           | <0.01            |
| 11             | 27/M    | M4        | CR(4+)           | 0.14             |
| Normal Control |         |           |                  |                  |
| 12             | 15/M    |           |                  | —                |
| 13             | 21/F    |           |                  | —                |
| 14             | 9/F     |           |                  | —                |
| 15             | 42/M    |           |                  | <0.01            |

\* Mdr1/ $\beta_2m$  — negative sample CR complete remission PR partial remission NR no remission RR relapse

## 讨 论

目前较好的PCR检测方法是以细胞系为样本，分两步用同位素检测MDR1的表达<sup>[9]</sup>。本文方法的优点是：以白血病人周血样本建立的检测方法，可直接用于临床标本的检测；以EB染色代替放射性<sup>32</sup>P的液闪计数，方便快捷，避免了同位素的污染；用一次反应即可准确定量省时省力。

PCR专一产物的定量检测并非易事，由于RNA纯度、定量、逆转录及PCR扩增效率、甚至不同管号等一系列因素的影响，很难对基因转录产物作绝对定量。解决这一困难的唯一办法是设内对照，在大多数细胞膜上都高表达的 $\beta_2MG$ 是一个较好的内对照，不论MDR1与 $\beta_2MG$ 在逆转录和PCR时有无竞争，都可用比值Mdr1/ $\beta_2m$ 的大小来衡量MDR1表达水平的相对高低。

本实验用正常人和白血病人标本确定实验条件，可直接用于临床标本的检测，初步测定的11例白血标本中有5例Mdr1/ $\beta_2m \geq 0.2$ 的病人化疗结果是不缓解或很快复发，与临床白血病人化疗40%—60%的缓解率相对应。本实验方法可准确地测定每个病人抗药能力的高低，期望能指导帮助临床医生选择最佳化疗方案，改善治疗效果，并为病人提供一个很重要的预后指标。

## 参 考 文 献

- 1 Nooter K, et al. *Br J Cancer*, 1991, 63: 663—669
- 2 Kartner N, et al. *Science*, 1983, 221: 1285—1288
- 3 Kathryn L, et al. *Seminars in Oncolog*, 1991, 16: 156—165
- 4 Chen C, et al. *Cell*, 1986, 47: 381—389
- 5 Vander Bliet AM, et al. *Gene*, 1988, 71: 401—411
- 6 Musto P, et al. *Br J of Haematology*, 1991, 77: 50—53
- 7 Baer M R, et al. *J of the National Cancer Institute*, 1991, 83: 663—665
- 8 Piotr Chomczynski, et al. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156—160
- 9 Noonan L E, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7160—7164

### Quantitative Analysis of Multidrug Resistance Gene Expression by Polymerase Chain Reaction

Ji, Yan-shan    Shen, Bei-fen    Wang, Wen-xiang

(*Institute of the Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

Guo, Jing-zhu    Li, Jin-yun

(*People's Hospital, Beijing Medical University*)

**Abstract** The presence of drug resistant malignant cells is a major obstacle to effective cancer chemotherapy. One mechanism of drug resistance is associated with over expression of multidrug resistance gene (MDR1) and phenotypic expression of a trans-membrane P-glycoprotein, which acts as an efflux pump and resulting in decreased intracellular drug accumulation. In order to improve the therapeutic effect for individual patients, we devised a highly sensitive, specific and quantitative protocol for measuring the levels of MDR1 mRNA in mononuclear cells in peripheral blood or bone marrow of leukemia patients, based on the PCR. Our results demonstrated that the expression of MDR1 seems to be correlated with the response to chemotherapy.

**Key words:** Multidrug resistance; P-glycoprotein; Leukemia chemotherapy; PCR