

# 多药耐药基因在口腔癌组织中的表达与分析研究

张 杰 张建国 赵福运

**摘要** 目的:研究多药耐药基因 *mdr1* 在口腔癌中的表达。方法:26 例未接受任何药物化疗的口腔癌患者标本, Tca8113, Tca8113/V100 和 Tca8113/V200 细胞系(分别耐药 100 nmol 和 200 nmol), 提取总 RNA, 以 *pchp-1* 作探针进行斑点杂交, 根据标准条计算出每个样本的 *mdr1* 拷贝数。结果:26 例口腔癌 *mdr1* 拷贝数范围为每微克  $0.3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$  总 mRNA。其中 9 例为不耐药, 14 例为中等耐药, 3 例高度耐药, 耐药表达为 65%, 与肿瘤大小及病理分级无关。结论:口腔癌表达 *mdr1* 较高, 临床要注意选择化疗方案。

**关键词** 多药耐药 口腔癌 基因

## Expression of *mdr1* in Oral Squamous Cell Carcinoma

Zhang Jie, Zhang Jianguo, Zhao Fuyun

The School of Stomatology, Peking University

### Abstract

**Objective:** The expression of *mdr1* is associated with chemotherapeutic efficacy of cancer, some patients with oral cancer are resistant to chemotherapy, the authors therefore investigated the mRNA expression level of *mdr1* in oral squamous carcinoma. **Methods:** Totally 26 samples were investigated in this study, and the total RNA of oral squamous cell carcinoma each sample were extracted and hybridized with probe *pchp-1*. The level of *mdr1* were compared with the cell line Tca8113, Tca8113/100 and Tca8113/200, which were sensitive, resistant to VCR 100 nmol and 200 nmol respectively. **Results:** The results showed that in the 26 patients, the *mdr1* level ranged from  $0.3 \times 10^5$  to  $5 \times 10^5$ . Among the 26 patients, 9 were drug-sensitive; 14 were low drug-resistant; and the other 3 were highly drug-resistant. The rate of drug resistance was 65%. The expression of *mdr1* was not related with the pathologic differentiation and TNM classification. **Conclusion:** The multi-drug resistance of the malignant tumor to chemotherapy is the important factor of unsatisfied effect of chemotherapy, and this paper systemically studied on the *mdr1* expression of the oral squamous cell carcinoma, and the relation with pathologic differentiation and TNM classification. The result is important for choosing the chemotherapeutic regime for patients.

**Key words:** oral carcinoma multi-drug resistance gene

随着癌症综合治疗的发展,化学治疗已越来越多地应用于口腔癌的治疗,但是同其它肿瘤一样,部分口腔癌患者对化疗不敏感,目前研究发现,肿瘤细胞中存在的一种多药耐药基因(*mdr1*)的表达与化疗疗效有关。该基因在全身许多组织的肿瘤细胞中表达较高,本研究是探讨多药耐药基因在口腔癌中的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

26 例标本来源于北京大学口腔医院住院患者的手术标本,均经病理证实为口腔鳞癌。患者均未接受任何药物治疗,手术切除后 2 h 内将标本于液氮中速冻,于 -70℃ 冷冻储存备用,其中男性 16 例,女性 10 例,年龄由 32 ~ 76 岁,平均年龄为 56 岁。

Tca8113 细胞系来源于人舌癌细胞的传代培养, Tca8113/V100 和 Tca8113/V200 为由其经过持续在培养基加长春新碱而获得的耐药细胞株(分别耐药 100 nmol/L 和 200

nmol/L)。

TNM分类采用UICC 1987年公布的分级标准。

病理分级采用WHO 1984年公布的标准。

## 1.2 实验方法

1.2.1 总RNA提取<sup>1</sup> 将重约1g的T70储存的口腔癌组织标本或处于对数生长期的细胞置匀浆器中,加入异硫氰酸胍变性液(异硫氰酸胍4mol/L,柠檬酸钠25mmol/L,SDS 0.5%, $\beta$ -巯基乙醇0.1mol/L)1.5ml,匀浆约20次,可见液体变为粘稠,转移至5ml离心管中,加入醋酸钠(NaAc)(2mol/L,pH4.0)溶液150 $\mu$ l,混匀,再加入饱和酚、氯仿、异戊醇混合液1.8ml,用力振荡10s后于冰上静置15min后,40000r/min离心20min。吸取上层液体,于另一离心管中加入等体积异丙醇溶液混匀,于-20℃冰箱静置1h后,于40000r/min离心20min。将上清液倒掉,可见少许白色沉淀,将沉淀再次溶于150 $\mu$ l异硫氰酸胍变性液中,摇动使其完全溶解,加入等体积异丙醇溶液于-20℃冰箱1h,40000r/min离心20min。将RNA沉淀用75%冷乙醇洗涤2次后,真空抽干。将RNA溶于适量DEPC水中,于紫外分光光度计测量OD值。取少量总RNA于0.8%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,可见完整的28S、18S两条带。

1.2.2 斑点杂交 标准条制备:将mdr1 cDNA质粒pchp1(由北京大学人民医院中心实验室惠赠),稀释为每100 $\mu$ l 100pg、50pg、20pg、10pg、5pg、2pg、1pg,第8管为阴性对照,将其用点膜器于硝酸纤维素膜上,负压抽干,80℃烤箱放置2h。RNA斑点杂交:将标本RNA用37%甲醛20 $\mu$ l,20 $\times$ SSC 30 $\mu$ l稀释,使得RNA含量分别为10 $\mu$ g、3 $\mu$ g、1 $\mu$ g、0.3 $\mu$ g,混匀。58℃水浴15min后,迅速置于冰浴中冷却5min。安置点膜器,依次加入稀释后的RNA样品,负压抽干。将膜放入6 $\times$ SSC溶液中漂洗2min,室温晾干,80℃2h。探针预备:取质粒pchp-1 1 $\mu$ l 100ng稀释成10 $\mu$ l,100 $\times$ 水浴5min,立即置于0~5min。加入与探针等体积的酶标复合物,混匀,再加入同样体积的戊二醛。37℃水浴15~30min,立即使用。杂交:将标准条与样品RNA制备的硝酸纤维素膜分别封入塑料袋中,加入杂交液约3ml(内含3%阻断剂),42℃2h进行预杂交。然后加入制备好的探针,42℃摇动过夜。洗膜:从袋中取出膜,放入预热的第一洗膜液中,于42℃摇动漂洗20min,共2次。将膜再放入2 $\times$ SSC中,室温下漂洗10min,共2次。发光及显影:将发光试剂盒中的A液与B液等体积混匀后,把膜放入其中1min,取出膜,用保鲜膜包裹放入暗盒,将X线胶片置于其上。压片1min,洗片。根据显影强弱再压片5~10min。然后取出显影,定影。测光密度:用灰度扫描仪扫描各点的光密度值。

## 2 结果

本实验通过斑点杂交共检测了26例未接受过

治疗的口腔鳞癌mdr1 mRNA表达,通过与质粒标准条计算,其表达范围为每微克 $0.3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 总mRNA。笔者同时检测了Tca8113细胞系及由其经过持续在培养基加长春新碱而获得的耐药细胞株Tca8113/V100和Tca8113/V200,其表达mdr1 mRNA为每毫克 $0.3 \times 10^5$ 、 $1.5 \times 10^5$ 及 $5 \times 10^5$ 。以其为标准可分别将26例分为敏感、中度耐药和高度耐药3类。其中9例为不耐药,14例为中等耐药,3例高度耐药,耐药表达为65%。

本次实验中发现11位病理分级I级患者中,mdr1 mRNA平均拷贝数为每微克 $2.15 \times 10^5$ ,而II级患者中为 $1.27 \times 10^5$ 。二者无显著性差异。

在按肿瘤大小分级中发现,T2平均表达mdr1 mRNA为每微克 $2.15 \times 10^5$ ,T3:每微克 $2.2 \times 10^5$ ,T4:每微克 $1.49 \times 10^5$ 。经过统计学处理,无显著性差异。

## 3 讨论

多药耐药现象是目前发现的肿瘤细胞免受化疗药物攻击的最重要的细胞防御机制。它指肿瘤细胞长期接触某一化疗药物,不仅可对此种化疗药物产生抗药性,而且可对其它结构和功能不同的多种药物产生交叉耐药性。mdr1是与耐药相关的基因,它编码170kD的糖蛋白P-gp在细胞膜上,P-gp作为一种能量依赖的药物泵,将细胞内有毒物质及药物泵出细胞,从而降低了细胞内药物的浓度,使得细胞对化疗药物不再敏感<sup>2</sup>。

本研究通过斑点杂交,按照耐药细胞株分级,得出耐药基因在口腔鳞癌中的表达为65.4%。国内外研究关于头颈部鳞癌耐药基因表达甚少。Pavelic等<sup>3</sup>用P-gp单克隆抗体JSB-1来研究认为,23例口腔癌标本中43%耐药基因表达阳性,Keith等<sup>4</sup>用斑点杂交检测14例未治疗鳞癌(头部),2例高表达,6例中低表达,占57.1%。Goldstein等<sup>5</sup>认为头颈癌为不表达mdr1的肿瘤。各学者研究的结论有差异,可能与研究中所采用的方法、探针及取材等有关。

身体各个部位的肿瘤表达mdr1/P-gp的程度不一,Goldstein通过大量的研究认为可将其分为高表达、中表达、低或不表达。高表达的肿瘤有结肠癌、肾癌、肝癌、肾上腺皮质癌等,其表达率超过50%。低表达的有胆囊癌、慢性粒细胞白血病、胃癌、卵

巢癌、黑色素瘤及肉瘤等,其表达率一般均小于5%,或即使表达率稍高也是表达水平很低。而中度表达的一般为小于50%,包括非何杰金氏淋巴瘤、成神经细胞瘤等<sup>3</sup>。按照表达率这一标准来衡量口腔癌表达mdr1/P-gp的程度,大多数研究为40%~60%,笔者的研究为65.4%,因而口腔癌mdr1/P-gp表达率较高,应该认为是中高度表达。

人体肿瘤mdr1(P-gp)表达与病理分级关系不一,在人成神经细胞瘤、肾癌、结肠癌、胃癌、卵巢癌中,分化越高,mdr1表达越高。而在胆囊癌中,却低分化表达最高<sup>6~9</sup>。关于口腔癌mdr1的表达与病理分级未见报道,本实验中可确认病理分级的共22例,Ⅰ、Ⅱ级均为11例,其中均有5例表达阳性,未表现出明显差异,尚需大样本进一步研究。

在临床治疗的过程中,通过检测口腔癌mdr1的表达,可以推测其对化疗药物的敏感性,预测化疗的疗效,并及时加用增敏剂或采用放疗等其他辅助疗法。

参考文献

1 王申五主编. 基因诊断技术. 北京: 联合出版社, 1993: 132~135

2 Biedler JL. Genetic aspects of multidrug resistance. *Cancer*, 1992, 70(6): 1779~1809

3 Pavelic ZP, Reising J, Pavelic L, et al. Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1993, 119(7): 753~757

4 Keith WN, Stallard S, Brown R. Expression of mdr1 and gst- (in human breast tumors: comparison to in vitro chemosensitivity. *Br J Cancer*, 1990, 61(5): 712~716

5 Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, et al. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst*, 1989, 81(2): 116~124

6 Clifford SC, Thomas DJ, Neal DE, et al. Increased mdr1 gene transcript levels in high-grade carcinoma of the bladder determined by quantitative PCR-based assay. *Br J Cancer*, 1994, 69(4): 680~686

7 Arao S, Suwa H, Mandai M, et al. Expression of multidrug resistance gene and localization of P-glycoprotein in human primary ovarian cancer. *Cancer Res*, 1994, 54(5): 1355~1359

8 Mizoguchi T, Yamada K, Furukawa T, et al. Expression of the Mdr1 gene in human gastric and colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(21): 1679~1683

9 Bates SE, Shieh CY, Tsokos M. Expression of mdr-1/P-glycoprotein in human neuroblastoma. *Am J Pathol*, 1991, 139(2): 305~315

(2000-12-01 收稿)

(本文编辑 王 晴)

病例报告 ·

舌系带过短致颌下腺导管口炎一例

刘胜利 郭梅凤

患者,男,11岁,因右颌下区反复肿胀3个月,于2001年3月3日来山东省无棣县人民医院口腔科求治。检查:右颌下区肿胀较左颌下区明显,无按压痛,质软,边界不清,双侧颌下腺导管开口部位紧贴于舌系带两侧,且开口红肿。舌系带过短,舌上抬不能抵上腭,向外伸舌时,舌系带可进入1-1牙间隙。有涎液自右颌下腺导管口内间断喷出,呈柱状,高约10cm。X线片及B超检查双侧颌下腺均未见结石。诊断:双侧颌下腺导管口炎,舌系带过短。

处置:局麻下行舌系带延长术,术后全身抗感染治疗

3d。1周后复诊,右颌下腺未见肿胀,双侧颌下腺导管口未见红肿。

讨论 单纯颌下腺导管口炎临床并不多见。作者认为,该患者可能由于舌系带过短,伸舌时,舌系带进入1-1牙间隙,使紧贴于舌系带两侧的导管开口摩擦受损致颌下腺导管口炎。右颌下腺导管开口红肿、狭窄,使涎液排出受阻,腺体肿胀,开口及伸舌时,口底肌肉收缩,挤压腺体,使涎液冲破未完全闭锁的导管口呈柱状喷出。

(2001-07-03 收稿)

(本文编辑 邹玲莹)