

· 临床研究 ·

P-糖蛋白和肺耐药蛋白在浸润性乳腺癌中的表达及其临床意义

袁凯 付荣湛 孙勇

【摘要】 目的 探讨 P-糖蛋白(P-gp)和肺耐药蛋白(LRP)在浸润性乳腺癌中的表达情况及其临床意义。方法 采用搓网法获取乳腺癌手术切除标本制成的完整单细胞悬液,再用流式细胞技术对 40 例乳腺癌组织及相应癌旁组织中 P-gp、LRP 的表达情况进行定量分析。结果 乳腺癌组织 P-gp、LRP 表达与相应癌旁组织比较,差异均有统计学意义($P\text{-gp}; t = -7.777, \text{LRP}; t = -9.861, P$ 均 <0.050)。在不同年龄、肿瘤大小、病理类型、临床分期、分化程度和雌、孕激素受体状态的患者间,两种耐药相关蛋白的表达差异均无统计学意义($P > 0.050$)。有淋巴结转移组 P-gp 表达与无淋巴结转移组比较,差异无统计学意义($t = 0.102, P = 0.919$)。有淋巴结转移组 LRP 的表达为 $(41.2 \pm 18.5)\%$,无淋巴结转移组为 $(30.1 \pm 15.4)\%$,有淋巴结转移组 LRP 表达显著高于无淋巴结转移组($t = 2.074, P = 0.045$)。乳腺癌组织 P-gp 与 LRP 的表达间存在正相关性($r = 0.698, P < 0.001$)。结论 本研究结果可为寻找浸润性乳腺癌的有效辅助化疗药物提供参考。

【关键词】 乳腺肿瘤;P-糖蛋白;肺耐药蛋白;流式细胞术

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Expressions of P-glycoprotein and lung resistance protein in invasive breast carcinoma tissues and clinical significance YUAN Kai, FU Rong-zhan, SUN Yong. Department of General Surgery, Qianfoshan Hospital of Shandong University, Jinan 250014, China

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of P-glycoprotein(P-gp) and lung resistance protein (LRP) in breast carcinoma tissues and their clinical significance. **Methods** Single-cell suspension with intact cellular membrane taken from breast cancer resection specimens were prepared using rubbing-net technique and flow cytometry (FCM) was used to quantitatively examine the expressions of P-gp and LRP in carcinoma tissues and corresponding peri-carcinoma tissues in 40 breast cancer cases. **Results** The expressions of P-gp and LRP in breast cancer tissues were statistically different from those of the corresponding peri-carcinoma tissues ($P < 0.050$). No statistically significant difference existed in the P-gp and LRP expressions of the tumor cells in age, tumor size, pathological types, clinical stages and cell differentiation degree, and between negative and positive expressions of the estrogen and progesterone receptors of the patients ($P > 0.05$). There was no statistical difference in P-gp expression between the lymph node metastasis negative and positive patients

($t = 0.102$, $P = 0.919$). The expression of LRP was higher in the lymph node metastasis patients (41.2 ± 18.5)% than that in the non-metastasis patients (30.1 ± 15.4)% ($t = 2.074$, $P = 0.045$). There was a positive correlation between the expression of P-gp and the expression of LRP ($r = 0.698$, $P < 0.001$). **Conclusions** The results of this study provides references in looking for effective chemotherapy drugs for invasive breast cancer.

【Key words】 Breast neoplasms; P-glycoprotein; Lung resistance protein; Flow cytometry

乳腺癌中多药耐药现象很普遍。现在认为可能由多种因素引起,主要为:(1)多药耐药相关蛋白及 P-糖蛋白(P-gp)表达增加;(2)多药耐药相关基因及多药耐药相关蛋白表达增加;(3)肺耐药相关基因及肺耐药相关蛋白表达增加等^[1-2]。若能对肿瘤的耐药性进行预测,一是可避免使用多药耐药(multidrug resistance, MDR)型药物导致的获得性多药耐药,二是可针对肿瘤的耐药特点使用逆转剂,这样对肿瘤的化疗能够做到有的放矢,提高疗效。各项实验技术的发展,特别是流式细胞术的应用,为定量分析肿瘤耐药蛋白表达提供了可能。本实验试图利用流式细胞术对 P-gp、肺耐药蛋白(LRP)在浸润性乳腺癌组织和相应癌旁组织的表达情况进行定量检测,并探讨这两种耐药相关蛋白与乳腺癌临床病理因素的关系。

1 资料和方法

1.1 病例选择及分组

选取 2008 年 7 月至 2009 年 1 月山东大学附属千佛山医院普外中心手术切除、并经病理学证实的乳腺癌患者 40 例,年龄 32~61 岁(45 ± 6.8 岁),均为女性,行乳腺癌改良根治术治疗,具有完整的临床病理学资料。肿瘤直径均 >1.5 cm,术中在无菌条件下留取癌组织和距癌边缘 1 cm 以上的癌旁腺体组织,30 min 内置 -80 °C 冰箱保存。所取标本均经病理证实且患者术前未接受任何治疗。组织学分类按照 WHO (2003 年)的标准,包括浸润性导管癌 28 例,其他类型 12 例(浸润性小叶癌 6 例、浸润性导管-小叶癌 3 例,富于脂质癌 1 例、大汗腺癌 1 例,鳞状细胞癌 1 例)。临床分期根据 UICC (1997 年)标准: I、II 期 30 例, III 期 10 例。有腋窝淋巴结转移 19 例,无腋窝淋巴结转移 21 例。

1.2 试剂和抗体

抗体均购自 NeoMarkers For Lab Vision Corporation;固定液、破膜剂购自北京市晶美基因谷科技有限公司;FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;PBS 溶液等均由山东大学附属千佛山医院普外中心重点实验室提供。

1.3 方法及步骤

1.3.1 搓网法实体瘤组织单细胞悬液的制备^[3]:(1)取冰冻乳腺癌组织、癌旁组织标本各 0.2~1 g,分别置于冰上缓慢解冻后置于重叠的 100 目铜网和 200 目尼龙网上,以眼科剪剪成约 1 mm 的碎块,再以眼科镊夹持组织在铜网上轻搓,边搓边以磷酸盐缓冲液(PBS)将搓下的细胞洗入网下的平面皿内,直至组织搓完。(2)将细胞收入 10 ml 试管内离心(1500 r/min,10 min,离心机半径为16 cm),弃去上清液再以 PBS 2 ml 漂洗,同前述方法离心2次,均弃上清液,备用。

将上述单细胞悬液均调整细胞数在 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 左右(可用 PBS 作为细胞浓度调节剂),4 °C 保存时间不应超过 48 h。

1.3.2 P-gp、LRP 免疫标记:P-gp 免疫标记步骤 (1)设 a、b、c、d 管,每管加细胞悬液 100 μl 。其中 a、c 管分别用于为乳腺癌组织、癌旁组织与抗体的非特异结合检测,b 管为乳腺癌组织的 P-gp 检测管,d 管为癌旁组织的 P-gp 检测管。(2)固定液处理。4 管均加入 500 μl 预冷(4 °C)4%多聚甲醛固定液,室温孵育 15 min,5 ml 试管内离心(1500 r/min,5 min),弃上清液,加入 2 ml PBS 漂洗,同前述方法离心,弃上清液,备用。(3)细胞染色。a、c 管分别加羊抗鼠 IgG(一抗)工作液 10 μl ,b、d 管加鼠抗人 P-gp 单抗(1 : 10)10 μl 。室温避光反应 30 min 后,PBS 2 ml 洗涤 1 次(1500 r/min,5 min)。a、b、c、d 管分别再加入 FITC-IgG1(1 : 10)5 μl ,室温避光反应 30 min 后,PBS 洗涤 1 次(1500 r/min,5 min),加入 500 μl PBS 待检。(4)取少许细胞悬液涂片,在荧光显微镜下可见 P-gp 阳性细胞光点位于细胞膜上。LRP 免疫标记步骤 P-gp 相同。

1.3.3 流式细胞仪检测 P-gp 和 LRP 的表达:采用 B-D 公司 FACS Calibur 型流式细胞仪进行检测。上机前先以标准荧光微球调整仪器,使变异系数在 2% 以内。前向角散射光(forward scatter, FSC)/侧向角散射光(side scatter, SSC)设门获取门内 8000~10 000 个细胞。荧光强度以对数放大,光散射数据存软盘,测试完后在 Macintosh 650 型计算机上用 Cell Quest Plot 软件(美国 BD 公司生产)分析数据。

P-gp 表达以阳性细胞百分率表示,计算方法^[3]为:P-gp 阳性表达率(%) = P-gp 阳性细胞数 / (P-gp 阳性细胞数 + P-gp 阴性细胞数) $\times 100\%$ - 非特异结合细胞(%)。LRP 表达的计算方法同前。

1.4 统计学分析

应用 SPSS13.0 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。耐药相关蛋白表达与临床病理学资料的关系用两独立样本 *t* 检验及配对样本 *t* 检验。耐药相关蛋白 P-gp、LRP 的相关性采用 pearson 相关分析。取 $\alpha=0.05$,若 $P < 0.05$,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多药耐药相关蛋白 P-gp、LRP 的表达

乳腺癌组织 P-gp 表达为 $(23.5 \pm 13.9)\%$, 相应癌旁组织 P-gp 表达为 $(5.1 \pm 5.0)\%$, 二者间差异有统计学意义 ($t = -7.777, P < 0.050$, 图 1~3)。乳腺癌组织 LRP 表达为 $(35.4 \pm 17.8)\%$, 相应癌旁组织 LRP 表达为 $(6.8 \pm 6.5)\%$, 二者间差异也有统计学意义 ($t = -9.861, P < 0.050$, 图 4~6)。

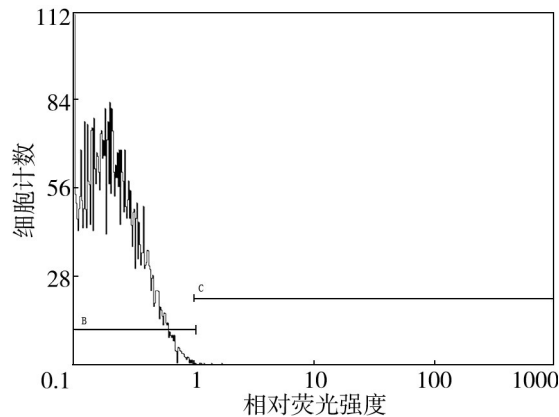


图 1 乳腺癌组织 P-糖蛋白非特异性染色细胞表达

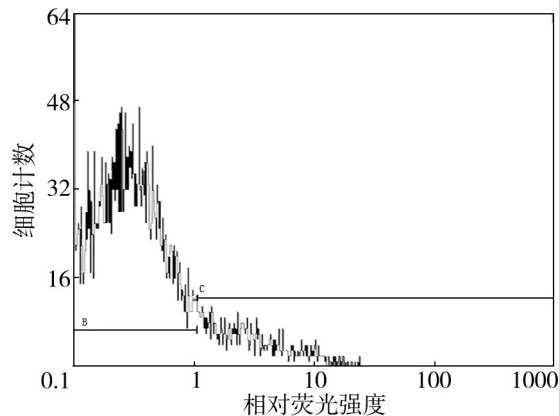


图 2 乳腺癌组织 P-糖蛋白低度表达

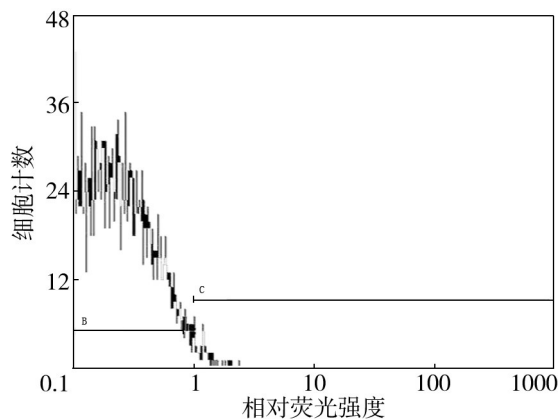


图 3 乳腺癌旁组织 P-糖蛋白低度表达

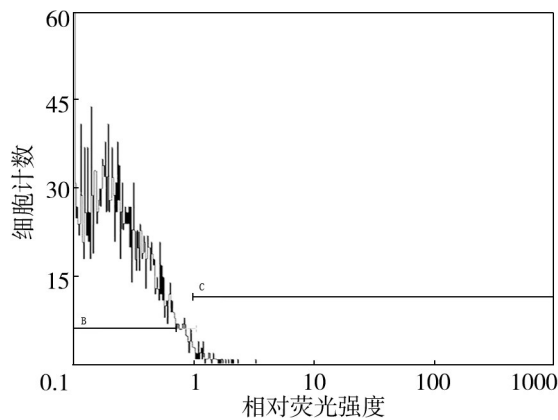


图4 乳腺癌组织肺耐药蛋白非特异性染色细胞表达

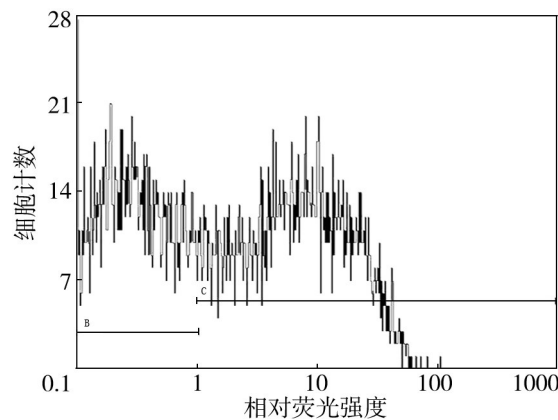


图5 乳腺癌组织肺耐药蛋白中度表达

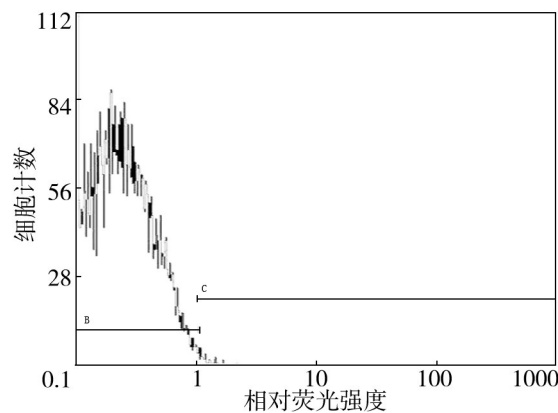


图6 乳腺癌旁组织肺耐药蛋白低度表达

2.2 耐药相关蛋白表达与乳腺癌临床病理特征的关系

在不同年龄、肿瘤大小、病理类型、临床分期、肿瘤分化程度和不同雌、孕激素受体状态的患者间, P-gp 与 LRP 表达的差异均无统计学意义 ($P > 0.050$, 表 1)。有淋巴结转移组患者 P-gp 表达与无淋巴结转移组患者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 LRP 表达在有淋巴结转移组患者显著高于无淋巴结转移组患者 ($P < 0.05$, 表 1)。

表1 P-糖蛋白、肺耐药蛋白的表达与临床病理资料的关系

病理因素	例数	P-糖蛋白			肺耐药蛋白		
		阳性表达率(%)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	阳性表达率(%)	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄							
≥45岁	24	25.1±12.9	0.915	0.366	36.2±19.2	0.195	0.847
<45岁	16	21.3±15.4			34.1±16.7		
肿瘤大小							
≥2cm	31	24.7±14.3	1.053	0.299	37.9±17.3	0.430	0.669
<2cm	9	19.6±12.3			36.7±17.5		
病理分型							
浸润性导管癌	28	23.2±13.6	-0.184	0.855	35.3±19.0	0.099	0.922
其他类型	12	24.3±15.1			35.5±15.4		
TNM分期							
I+II	30	22.0±11.9	-1.126	0.267	32.2±14.9	-0.942	0.352
III+IV	10	27.7±18.1			38.3±22.3		
肿瘤分化程度							
I+II	35	23.4±13.1	-1.234	0.225	36.0±16.5	0.609	0.546
III	5	30.4±18.5			31.2±24.4		
淋巴结转移							
是	19	23.5±16.7	0.102	0.919	41.2±18.5	2.074	0.045
否	21	23.5±11.1			30.1±15.4		
雌激素受体							
阳性	21	21.2±14.8	-1.134	0.264	32.8±18.0	0.865	0.392
阴性	19	26.1±12.6			38.2±17.4		
孕激素受体							
阳性	22	23.8±15.1	0.144	0.886	36.1±18.4	0.406	0.687
阴性	18	23.3±12.6			34.4±17.4		

2.3 P-gp、LRP 表达之间的关系

P-gp 与 LRP 表达间呈正相关性关系($r=0.698$, $P<0.05$,图7)。

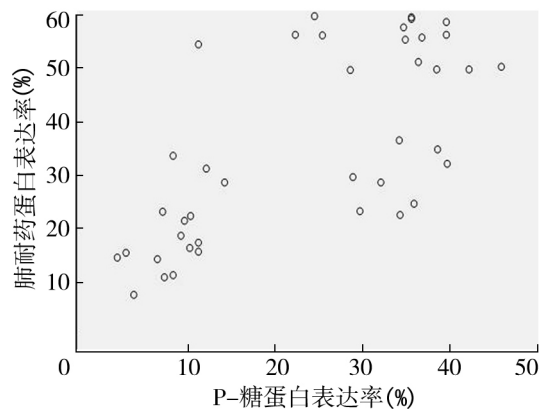


图7 P-糖蛋白与肺耐药蛋白表达相关性的散点图

3 讨论

临床上耐药性是影响恶性肿瘤化疗疗效的重要原因,而多药耐药相关基因的表达又是产生MDR的主要因素。流式细胞术是对单细胞定量分析的一种新技术。随着实体肿瘤单细胞悬液制备技术的不断完善,使应用流式细胞术检测多药耐药相关基因表达产物成为可能。

多种机制参与介导 MDR 的产生,其中 MDR 基因及其表达产物 P-gp 介导的耐药机制最为重要^[4]。人类的 MDR1 基因位于第 7 号染色体。P-gp 是 MDR1 基因的蛋白产物,其耐药机制是通过消耗 ATP 将药物从细胞内泵出到细胞外,从而降低肿瘤细胞内药物的浓度,导致多药耐药^[5]。P-gp 在正常乳腺组织中表达极低(2.5%)^[6],但在乳腺恶性肿瘤中,MDR1 过度表达并非肿瘤细胞的特性,而是在肿瘤组织和瘤周组织中均可见的普遍现象^[7]。此外,有研究表明,无论术前化疗与否,化疗耐药相关基因 P-gp 的表达与局部进展期乳腺癌患者的腋窝淋巴结浸润有关,此研究可能反映了乳腺癌原发性耐药的存在,并有助于判断预后^[8]。

本研究应用流式细胞仪检测乳腺癌及癌旁组织 P-gp 表达的情况,发现两者均有表达,但是癌旁组织中表达水平极低,二者间差异有统计学意义,提示该蛋白表达可能与乳腺癌发生有关。本研究入组的 40 例患者,术前均未行新辅助化疗,故该蛋白表达应属原发性耐药类型。本研究还发现,P-gp 的表达与乳腺癌患者的年龄、病理分型、TNM 分期、肿瘤分级、腋窝淋巴结状态、雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)状况及人表皮生长因子受体情况无明显关系,说明 P-gp 这一多药耐药表型是与乳腺癌恶性表型同时发生的一种内在本质特征,其表达程度不受疾病发展的影响。然而,有关 MDR1/P-gp 的研究结果至今尚不完全一致,结论与上述众多学者应用 IHC 法得出的结论不一致^[6-7]。因此,推断出现结论不一致可能与试验步骤、检测方法、判断标准、统计方法等不同有关。

LRP 作为一种新的肿瘤标志渐为学者们所关注。Pohl 等^[9]检测 99 例乳腺癌冰冻切片,发现 LRP 阳性率为 88%,因此认为在乳腺癌组织中 LRP 介导的非 P-gp 耐药相当普遍。Schneider 等^[10]分析 52 例进展期乳腺癌患者化疗前、后腋窝淋巴结 LRP 的表达情况后,认为 LRP 表达与腋窝淋巴结转移有关。

本研究结果显示,LRP 阳性率为(35.4±17.8)%,与癌旁组织的表达差异有统计学意义,但是仍为中低程度表达,比曲延刚^[11]等报道的 80%低,可能与试验方法、评价标准不同相关。本组病例均为未进行新辅助化疗的患者,表明在乳腺癌组织中由 LRP 介导的非 P-糖蛋白 MDR 比较普遍。本研究还发现有淋巴结转移组患者的 LRP 表达显著高于无淋巴结转移组,提示 LRP 高表达的乳腺癌细胞更容易发生淋巴结转移。王文静等^[12]应用流式细胞仪检测乳腺癌组织中 LRP 相对表达情况,发现肺耐药蛋白表达较低,与年龄、肿瘤体积、腋窝淋巴结转移、ER、PR 表达等均无关,认为 LRP 可能未参与乳腺癌的 MDR 机制。结果差异亦可能与试验例数较少、评价标准不一致等有关。

P-gp 与 LRP 共同参与 MDR 已在多种恶性肿瘤中得到证实^[13]。本研究发现,乳腺癌组织 P-gp 与 LRP 的表达具有正性相关关系。虽然本研究病例

数较少,但也可初步提示 P-gp 与 LRP 均与乳腺癌多药耐药的产生相关。

本研究结果还显示, P-gp 与 LRP 在乳腺癌组织中一定程度共表达,且 LRP 与淋巴结转移相关,乳腺癌组织 P-gp、LRP 表达与相应癌旁组织差异均有统计学意义,提示两种蛋白在癌组织中的较高表达可为寻找浸润性乳腺癌的有效辅助化疗药物提供参考。

参考文献

- [1] Kimura Y, Aoki J, Kohno M, et al. P-glycoprotein inhibition by the multidrug resistance-reversing agent MS-209 enhances bioavailability and antitumor efficacy of orally administered paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49 : 322-328.
- [2] Burg D, Filippov DV, Hermanns R, et al. Peptidomimetic glutathione analogues as novel gamma glutamyl cysteine synthase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10 : 195-205.
- [3] 尹格平,孙晓明,陈涌芬. 恶性实体瘤细胞多药耐药基因(MDR1)表达产物流式细胞术检测方法的建立及临床意义. *中国肿瘤临床*, 1998, 25: 489-491.
- [4] Raaijmakers HG, Izquierdo MA, Lokhorst HM, et al. Lung-resistance-related protein expression is a negative predictive factor for response to conventional low but not to intensified dose alkylating chemotherapy in multiple myeloma. *Blood*, 1998, 91: 1029-1036.
- [5] 杨晓文,崔明,莫平. 术前化疗对乳腺癌组织中谷胱甘肽-s-转移酶- π 、P-糖蛋白和拓扑异构-II表达的影响. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2009, 3: 60-67.
- [6] 于萍,肖宁新,陈燕萍. P-糖蛋白与肺耐药蛋白在乳腺癌组织中的表达及其与预后的关系. *癌症*, 2003, 22: 1339-1342.
- [7] 赵菲,姜军. 乳腺癌多药耐药性研究进展. *中国普外基础与临床*, 2004, 11: 36-39.
- [8] Arnal M, Franco N, Fargeot P, et al. Enhancement of mdrl gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 61: 13-20.
- [9] Pohl G, Filipits M, Suchomel RW, et al. Expression of the lung resistance protein (LRP) in primary breast cancer. *Anticancer Res*, 1999, 19: 5051-5055.
- [10] Schneider J, Gonzalez Rocas S, Polan M, et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 2001, 3: 183-191.
- [11] 曲延刚,邵云霞. 乳腺癌 LRP、GST- π 的表达研究. *肿瘤研究与临床*, 2005, 17: 242-243.
- [12] 王文静,王明玉,阎凤霞. LRP 与 MRP 在乳腺癌组织中的表达及意义. *山东医药*, 2007, 47: 4-6.
- [13] 刘海燕. 多药耐药基因联合检测对胃癌预后的判断的意义. *医学研究杂志*, 2008, 37: 66-68.

(收稿日期:2009-03-30)

(本文编辑:罗承丽)

袁凯,付荣湛,孙勇. P-糖蛋白和肺耐药蛋白在浸润性乳腺癌中的表达及其临床意义[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2010, 4(4): 410-417.