

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.06.15

肺耐药蛋白基因表达与肺癌临床病理生理特征的关系

张予辉 王辰 庞宝森 张洪玉 刘敬忠 肖白

【摘要】 目的 探讨肺耐药蛋白(LRP)基因表达与肺癌临床病理生理特征的关系。方法 采用逆转录—多聚酶链反应(RT-PCR)方法检测49例肺癌组织和相应的41例癌旁肺组织中LRP基因表达水平。结果 肺癌与癌旁肺组织中均有LRP基因表达,两者的阳性率分别为63.3%(31/49)和21.9%(9/41),具有显著性差异($P < 0.01$)。非小细胞肺癌LRP表达阳性率(70.7%,29/41)高于小细胞肺癌(25%,2/8)($P < 0.05$)。腺癌(91.7%,11/12)表达阳性率高于鳞癌(50%,11/22)($P < 0.05$)。吸烟患者的LRP基因表达(74.3%,26/35)显著高于非吸烟患者(35.7%,5/14)($P < 0.05$)。结论 LRP基因表达与肺癌耐药有关,吸烟可导致LRP基因表达增加。

【关键词】 肺肿瘤 抗药性 基因表达 肺耐药蛋白

【中图分类号】 R734.2

Relationship between expression of lung resistance protein gene and clinical pathophysiological characteristics of lung cancer ZHANG Yuhui, WANG Chen, PANG Baosen, ZHANG Hongyu, LIU Jinzhong, XIAO Bai. Respiratory Disease Research Center, Beijing Red-Cross Chaoyang Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100020, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the relationship between lung resistance protein gene(LRP) expression and clinical pathophysiological characteristics of lung cancer. **Methods** Expression of LRP gene was determined in 49 lung cancer samples and 41 corresponding paracancerous tissues by RT-PCR. **Results** LRP was expressed in lung cancers and corresponding paracancerous tissues. The positive expression rate was 63.3%(31/49)in cancer tissues and 21.9%(9/41) in corresponding paracancerous tissues respectively($P < 0.01$). The positive rate in NSCLC(29/41,70.7%)was significantly higher than that in SCLC(2/8,25%)($P < 0.05$), and the positive rate in adenocarcinoma(11/12,91.7%)was also remarkably higher than that in squamous cell carcinoma(11/22,50%)($P < 0.05$). In addition,LRP expression in the smokers(26/35,74.3%)was significantly higher than that in the non-smokers(5/14,35.7%)($P < 0.05$). **Conclusion**

The expression of LRP may be related to drug resistance of lung cancer, and smoking may increase LRP gene expression.

【Key words】 Lung neoplasms Drug resistance Gene expression Lung resistance protein

研究表明,肺癌的耐药机制非常复杂,与耐药基因MDR1、MRP、拓扑异构酶Ⅱ质和量的改变,谷胱甘肽转移酶 π 与硫蛋白等多因素有关。吸烟与肺癌发生有关,但与肺癌耐药的的关系鲜有报道。近年从肺癌耐药细胞株中发现一新的基因,肺耐药蛋白基因(lung resistance protein,LRP),初步研究表明其与肿瘤耐药有关^[1]。我们应用RT-PCR方法检测49例人肺癌组织及相应的41例癌旁肺组织中LRP基因表达,探讨其在人肺癌组织中的表达及与肺癌临床病理生理特征的关系。

系。

1 材料与方法

1.1 临床资料 49例原发性肺癌组织及相应的远离癌组织的正常肺组织,均经病理学确诊。手术后1~3小时获得,-70℃冰箱保存。其中男35例,女14例,年龄为36~71岁,平均年龄53.5岁。吸烟者35例,且吸烟指数(每日吸烟支数×吸烟年数)均>200,不吸烟者14例。术前均未作过放疗和化疗。

1.2 RNA的提取和鉴定 取200mg肺组织,采用异硫氰酸胍一步法抽提总RNA,紫外分光光度计检测260nm和280nm下的光密度值(OD),若 $OD_{260}/OD_{280} > 2$,说明所提取RNA无蛋白质和DNA污染,0.7%琼脂

作者单位:100020 北京,首都医科大学附属北京红十字朝阳医院呼吸疾病研究中心(张予辉、王辰、庞宝森、张洪玉),基础中心(刘敬忠、肖白)

糖凝胶电泳鉴定,可见清晰的 18S 和 28S 两条带型,说明 RNA 未降解。

1.3 cDNA 的合成 20 μ l 逆转录反应体系,含 10 μ g 待测 RNA,200 u M-MLV 逆转录酶,10 mmol/L NTPs 200 ng 6 nt 随机引物等,37 $^{\circ}$ C 1 小时,97 $^{\circ}$ C 7 分钟灭活 M-MLV,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 PCR 扩增 LRP 引物序列参见文献 2,即 5'-TTCTGGATTGCTGGACGC-3' 和 5'-ACTTCTCTCC-CTTGACCAC-3'。

30 μ l PCR 反应体系,加入 LRP 与内参 β_2 -MG 上、下游引物各 25 pmol,1 U Tag 酶 2 μ l cDNA 等。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 分钟,94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟,55 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟,得到 LRP 285 bp 和 β_2 -MG 120 bp 的扩增产物。

1.5 cDNA 的电泳、照相、定量 取扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳 40 分钟,紫外灯下照相,然后行光密度

扫描,以 β_2 -MG 为内参,以 LRP cDNA/ β_2 -MG cDNA 的比值来表示 LRP mRNA 的表达水平。

1.6 随访分析 对每个患者建立随访登记表,随访时间从肺癌手术后第 1 日开始,定期随访患者生存状况,并记录死亡时间、死亡原因及失访时间。

1.7 统计学处理 采用 χ^2 检验,确切概率法。应用 SPSS 软件(7.0)行 Kaplan-Meier 生存率计算及 Log-rank 检验。

2 结果

2.1 LRP-mRNA 表达与肺癌临床病理和吸烟的关系

LRP 基因在肺癌组织与癌旁肺组织中均有表达,两者的表达阳性率分别为 63.3%(31/49)与 21.9%(9/41),LRP/ β_2 -MG 平均值分别为 0.55 ± 0.45 和 0.25 ± 0.42 ,具有显著性差异($P < 0.01$)。LRP-mRNA 表达与肺癌组织学类型、病理分级、临床分期及吸烟的关系见表 1。

表 1 LRP-mRNA 表达与肺癌临床病理生理特征的关系

Tab 1 The relation between LRP-mRNA expression and clinical pathophysiological characteristics of lung cancer

Characteristics	No. of cases	No. of cases with LRP expression	LRP expression level ($\bar{x} \pm s$)
Histology			
Non-small cell lung cancer	41	29	0.57 ± 0.45
Adenocarcinoma	12	11	0.64 ± 0.45
Squamous cell carcinoma	22	11	0.46 ± 0.50
Adenosquamous carcinoma	3	3	0.57 ± 0.40
Alveolar carcinoma	4	4	0.95 ± 0.46
Small cell lung cancer	8	2	0.27 ± 0.48
Pathologic Grade			
High Differentiation	8	6	0.56 ± 0.41
Middle and low differentiation	41	25	0.56 ± 0.50
Clinical stage			
Stage I	17	13	0.53 ± 0.46
Stage II	12	9	0.50 ± 0.42
Stage III	20	9	0.56 ± 0.54
Smoking			
Smokers	35	26	0.69 ± 0.42
Non-smoker	14	5	0.31 ± 0.45

注:腺癌与鳞癌的 LRP 表达水平比较,小细胞肺癌与非小细胞肺癌比较,吸烟者与非吸烟者比较, P 值均 < 0.05 。

Note: The LRP expression level was calculated by the optical density ratio between LRP cDNA and β_2 -MG cDNA. The significant difference of LRP expression level was observed between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and smokers and non-smokers ($P < 0.05$).

2.2 LRP-mRNA 表达与肺癌复发和预后的关系 随访两年,肺癌复发者有 33 例,其中 LRP 阳性者为 23 例,占 69.7%;16 例无复发者中 LRP 阳性 8 例,占 50%,两组间的差异无显著性($P > 0.05$)。LRP-mRNA 表达与肺癌预后的关系见表 2,虽然 LRP 阴性组的生存率较阳性组有升高趋势,但 Log-rank 检验显示无显著性差异($P > 0.05$) (图 1)。

表 2 LRP-mRNA 表达与肺癌预后的关系

Tab 2 The relation between LRP-mRNA expression and prognosis of lung cancer

LRP expression	No. of cases	Accumulative survival		P value
		1-year	2-year	
Negative	18	71.7%	49.1%	> 0.05
Positive	31	51.7%	30.7%	

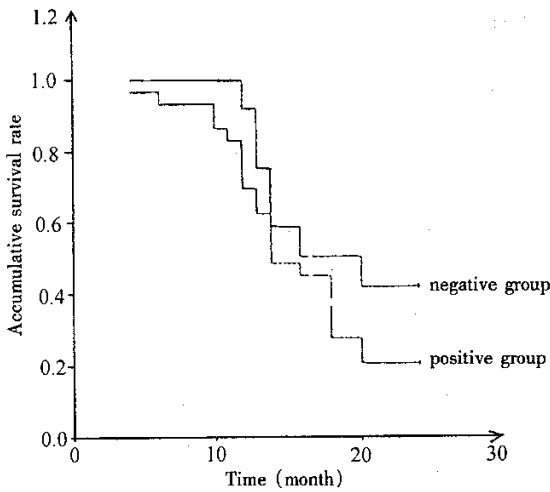


图 1 LRP-mRNA 表达与肺癌预后的关系

Fig 1 The Kaplan-Meier survival curves of patients with lung cancer with different LRP-mRNA expression

3 讨论

LRP 基因是从一株起源于人 NSCLC 耐阿霉素的细胞株 SW1573/2R120 中被克隆的新的基因。该基因定位于 16 号染色体 p13 区 1 带与 p11 区 2 带间, 编码一分子量 110×10^3 u 的蛋白, 该蛋白是人体主要的穹窿蛋白, 与聚泡相关的细胞质微粒体。Scheper 等^[3]应用免疫组化法研究发现, 在肺癌 SW1573/2R120、GLC₄/ADR、纤维肉瘤 HT1080DR4、白血病 8226/MR40 等具有 MDR 表型的细胞株中无 P-gp 表达, 而 LRP 过度表达, 从而推测 LRP 与耐药有关。List 等^[4]研究了 87 例急性白血病患者, 发现 LRP 表达阳性与阴性率分别为 37% 和 63%, 两组化疗缓解率分别为 68% 与 35%, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。应用 Logistic 回归分析表明 LRP 是唯一独立反映患者预后的因素, 提示 LRP 表达与急性白血病化疗耐药有关, 检测 LRP 可预计化疗效果和预后。

我们应用 RT-CPR 方法检测了 49 例术前未经化

疗、放疗肺癌细胞组织与相应的癌旁 5 cm 以远肺组织中 LRP-mRNA 表达, 发现前者的表达阳性率和强度高于后者, 与 Sugawara 等^[2]研究相符。推测 LRP 表达可能是肺癌天然耐药的分子生物学基础。肺泡癌、腺鳞癌的 LRP 表达阳性率均为 100%, 其中肺泡癌的表达强度在 4 种类型的肺癌组织中最强, 但由于肺泡癌、腺鳞癌例数太少, 未作统计分析, 有待进一步探讨。腺癌 LRP 阳性率和强度高于鳞癌, 与临床上鳞癌较腺癌化疗敏感相符, 推测 LRP 表达与肺癌耐药有关。在不同病理分级、不同临床分期的肺癌组织中 LRP-mANA 表达无显著性差异, 推测在不同病理分级与临床分期的肺癌耐药机制中, LRP 基因表达可能不起主导作用, 而另有其他机制。

我们同时发现吸烟组 LRP 阳性率和强度高于不吸烟组, 具有显著性差异, 推测吸烟可导致 LRP 基因表达增加, 与肺癌耐药有关。这提醒我们在制订化疗方案时, 对吸烟的肺癌患者应考虑耐药性存在的可能。

对 49 例患者进行随访, LRP 基因表达阳性组复发率高于阴性组, 1 年和 2 年累计生存率及生存趋势低于阴性组, 但均无显著性差异。提示肺癌预后可能受多因素的影响。

参 考 文 献

- 1 Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 1992, 258 (3): 1650-1654.
- 2 Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, et al. Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett*, 1997, 112(1): 23-31.
- 3 Scheper RJ, Broxterman HT, Scheffer GL, et al. Overexpression of a Mr110,000 vesicular protein in Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*, 1993, 53(4): 1475-1479.
- 4 List AF, Spier CS, Gagan TM, et al. Overexpression of the major vault transportor protein lung resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*, 1996, 87(6): 2464-2469.

(收稿: 1999-11-17 修回 2000-03-29)

(本文编辑 张世雯)

· 启 事 ·

本刊拟在明年开设如下专刊。第一期 肺癌分子生物学; 第二期 肺癌转移研究; 第三期 肺癌化疗; 第四期: 肺癌多学科综合治疗; 第五期 肺癌外科治疗; 第六期 肺癌流行病学与预防(病因学)。欢迎作者踊跃投稿。