

# 外放射对鼻咽鳞癌 P 糖蛋白的影响

刘宇<sup>1</sup>, 张幸平<sup>1</sup>, 陈鸿雁<sup>2</sup>, 邓红彬<sup>1</sup>, 徐曼<sup>3</sup>, 李圆圆<sup>3</sup>

Effect of Radiation on p-glycoprotein Expression in Nasopharyngeal Squamous Carcinoma

LIU Yu<sup>1</sup>, ZHANG Xing-ping<sup>1</sup>, CHEN Hong-yan<sup>2</sup>, DENG Hong-bin<sup>1</sup>, XU Man<sup>3</sup>, LI Yuan-yuan<sup>3</sup>

1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China (Present address: Department of Radiotherapy, Shanghai Pulmonary Hospital); 2. E. N. T. Department, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 3. Department of Pathology, Chongqing Medical University

**Abstract :Objective** To investigate preliminarily the expression of p-glycoprotein (P-gp) in patients with nasopharyngeal squamous carcinoma (NPSC) pre- and post-radiotherapy. **Methods** The immunohistochemistry with one monoclonal antibody JSB-1 staining was performed to test the expression of p-gp in pre- and post-radiotherapy NPSC specimens from 48 patients. **Results** The positive rate of P-gp expression in the patients with NPSC pre-radiotherapy was 18.75% (9/48). Among them, the positive expression rate was 17.65% (6/34) and 21.43% (3/14) in low grade differentiation squamous cell carcinoma and mid-high grade differentiation squamous cell carcinoma, respectively. The positive expression rate of post-radiotherapy was 75.00% (36/48) and among them, the positive expression rate was 79.41% (27/34), 64.29% (9/14) in low grade differentiation squamous cell carcinoma and mid-high grade differentiation squamous cell carcinoma, respectively. P-gp expression rate post-radiotherapy was significantly higher than that of pre-radiotherapy ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Our study indicates that p-gp expression in NPSC was significantly induced by radiation and increases the overexpression of P-gp. Therefore, irradiation may be one of the reasons of crossed resistance to chemotherapy and radiotherapy.

**Key words**: Nasopharyngeal neoplasms; Radiotherapy; Multi-drug resistance; P-glycoprotein; Immunohistochemistry

**摘要**:目的 初步探讨放射治疗前、后鼻咽鳞癌组织 P 糖蛋白 (P-gp) 的表达及变化特点。方法 应用免疫组织化学 SP 法检测了 48 例初治鼻咽鳞癌患者放射治疗前、后 P-gp 的表达。结果 48 例初治鼻咽鳞癌组织 P-gp 阳性表达率放射治疗前为 18.75% (9 例/48 例), 其中低分化鳞癌和中分化鳞癌分别为 17.65% (6 例/34 例) 和 21.43% (3 例/14 例); 放射治疗后 P-gp 阳性表达率为 75.00% (36 例/48 例), 其中低分化鳞癌和中分化鳞癌分别为 79.41% (27 例/34 例) 和 64.29% (9 例/14 例)。放射治疗后 P-gp 阳性表达率较放射治疗前呈增高趋势, 放射治疗后 P-gp 阳性率和放射治疗前相比有显著性差异 ( $P < 0.001$ )。结论 放射治疗可诱导和加强鼻咽鳞癌组织中 P-gp 表达, 这可能是引起放、化疗交叉耐药的原因之一。

**关键词**: 鼻咽肿瘤; 放射治疗; 多药耐药性; P-糖蛋白; 免疫组织化学

中图分类号: R739.63; R730.55 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)08-0470-03

## 0 引言

鼻咽癌是我国南方各省常见的头颈部恶性肿瘤之一, 临床多采用以放射治疗为主化疗为辅的综合治疗。近年来有关多药耐药基因-1 (multi-drug resistance gene-1, mdr-1) 表达 P 糖蛋白 (p-glycoprotein, P-gp) 增高所介导的多药耐药性 (multi-drug resistance, MDR) 受到高度重视。大量研究已经证明化疗可以诱导肿瘤细胞 mdr-1 过表达而产生耐药

性。但在肿瘤治疗中广泛采用的放射治疗对 mdr-1 有何影响, 很少有报道。尤其是在鼻咽鳞癌治疗中, 放射治疗对 mdr-1 及其产物 P-gp 的影响尚不明确。体外实验已经证实放射治疗可诱导肿瘤细胞株的 mdr-1 基因过表达<sup>[1-4]</sup>。本研究应用免疫组织化学 SP 法检测了 48 例初治鼻咽鳞癌患者放射治疗前、后鼻咽部活检癌组织标本中 P-gp 表达, 旨在初步探讨外放射对鼻咽鳞癌 MDR 的影响。

## 1 材料和方法

1.1 标本来源 选择重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 2001 年 3 月 ~ 2002 年 8 月门诊或住院初治

收稿日期: 2004-10-08; 修回日期: 2005-04-27

作者单位: 1. 400016 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 (现单位: 200433 上海市肺科医院放疗科); 2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科; 3. 重庆医科大学病理学教研室



鼻咽鳞癌患者 48 例,其中男性 37 例,女性 11 例,中位年龄 48 岁(26 ~ 70 岁)。诊断标准参照 WHO1994 年病理分级标准,低分化鳞癌 34 例,中分化鳞癌 14 例。另取鼻咽部慢性炎症组织 10 例作为对照。患者均给予根治性全程放射治疗,放射至 2/3 根治剂量时(大约为 4 600 ~ 4 800c Gy)行第二次鼻咽部活检,两次癌组织标本均经免疫组织化学对 P-gp 表达进行检测。

1.2 放射治疗方法 选用<sup>60</sup>Co 射线或 6MV - X 射线。48 例均给予常规分割放射治疗,2 Gy/次,5 次/周,肿瘤原发灶 D<sub>T</sub>: 6 400 ~ 7 400c Gy/6.4 ~ 7.4 周;颈部及锁骨上区行预防性放射治疗 D<sub>T</sub>: 5 000 ~ 5 400c Gy/5 ~ 5.4 周,如果有颈淋巴结转移则在局部缩野加量至根治剂量。

1.3 免疫组织化学染色(SP 法) 所有癌组织标本均经 10% 甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋。5μm 连续切片,切片贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,60℃ 烘片一周,分别行 HE 染色及 P-gp 免疫组化染色。实验步骤参照试剂盒说明书进行。鼠抗 P-gp 单克隆抗体 JSB-1 和 SP 超敏试剂盒均为即用型(购自福州迈新生物技术有限公司)。高温高压、柠檬酸缓冲液修复抗原,DAB 显色。用已知染色阳性的结肠腺癌组织切片作阳性对照(阳性对照片购自福州迈新生物技术有限公司),阴性对照为标本除以 PBS 代替 P-gp 单抗外,其它步骤与待检标本相同。

1.4 结果判断<sup>[5]</sup> 光镜下以细胞浆/膜出现浅黄色、棕黄色颗粒为阳性染色,细胞核无着色。高倍镜下随机选择 5 个视野,每个视野计数至少 1 000 个细胞,根据镜下阳性细胞的百分比分为阳性和阴性。阳性细胞数 10% 者为 P-gp 表达阳性,< 10% 者为 P-gp 表达阴性。

1.5 近期疗效评价 于放射治疗结束 3 月后进行。包括复查间接鼻咽喉镜或纤维鼻咽喉镜、鼻咽及颅底 CT 检查等。按实体瘤的疗效标准,近期疗效分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)及无明显变化(NC)。

1.6 统计学处理 采用 SAS 系统分析软件进行分析,所有数据均采用 Fisher's 精确概率法检验。

## 2 结果

2.1 病理学形态观察 鼻咽鳞癌组织 HE 切片显示,放射治疗前低分化鳞癌呈条索状排列,癌细胞呈明显的异型性,一般不见角化株和细胞间桥。中分化鳞癌的癌呈团块状,癌细胞呈中度异型性,角化株少见。高分化鳞癌呈明显的巢状,癌细胞体积大,胞

浆丰富,可见细胞间桥,有较多角化的细胞珠。放射治疗至 2/3 根治量时癌组织未全消退,其病理形态学改变主要表现为癌细胞的退行性变、坏死与间质反应两个方面。

2.2 放射治疗前后鼻咽鳞癌组织中 P-gp 表达 见表 1。

表 1 放射治疗前后 P-gp 的表达情况

病理类型	例数	放射治疗前		P	放射治疗后		P
		阳性数	阳性率 (%)		阳性数	阳性率 (%)	
低分化鳞癌	34	6	17.65	1.000 *	27	79.41	0.294 *
中高分化鳞癌	14	3	21.43		9	64.29	
合计	48	9	18.75		36	75.00	<0.001 **

注: \* 低分化与中高分化鳞癌比较; \*\* 放射治疗前、后比较

从表 1 中可以看出,放疗前 P-gp 阳性、阴性与病理组织分化程度无显著性差异( $P > 0.05$ )。放疗后 P-gp 阳性、阴性与病理组织分化程度亦无显著性差异( $P > 0.05$ ),提示鼻咽癌鳞癌细胞的分化程度与 P-gp 的表达无关。但鼻咽鳞癌放疗前 P-gp 表达与放疗后的存在显著性差异( $P < 0.001$ ),即放疗后 P-gp 阳性表达率明显增高。

2.3 P-gp 表达与鼻咽鳞癌近期疗效 见表 2。

表 2 放射治疗前后 P-gp 的表达与近期疗效

近期疗效	例数	放射治疗前		P	放射治疗后		P
		阳性数	阴性数		阳性数	阴性数	
完全缓解	19	5	14	0.450	15	4	0.440
部分缓解	29	4	25		21	8	

从表 2 可看出放疗前、放疗后 P-gp 阳性表达与阴性表达的鼻咽近期疗效(CR 和 PR)均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

P-gp 是 MDR 的主要机制之一。分子生物学的研究表明,P-gp 是一种能量依赖性药物排出泵,一旦与化疗药物结合后,可通过 ATP 供应能量可将药物从细胞内泵出细胞外,导致细胞内化疗药物浓度不断降低,细胞毒性作用减弱,于是逐渐出现耐药现象。化疗药物对多种肿瘤细胞 P-gp 表达的影响已有大量报道,普遍认为肿瘤细胞具有天然耐药性(primary resistance)和接受化疗后产生的获得性耐药性(acquired resistance)<sup>[6]</sup>。放射治疗对肿瘤细胞 mdr-1 基因表达有无影响,目前国内尚少见报道。国外的报道也多限于体外实验,一般认为放射线可以诱导肿瘤细胞 mdr-1 基因过表达 P-gp。McCleans 等<sup>[7]</sup>用中国仓鼠卵巢细胞进行体外 X-线分次放射实验研究,结果发现放射后的细胞 P-gp 表达

明显增加,并且对长春新碱、秋水仙碱和依托泊甙等化疗药物产生耐药性。Hill BT 等<sup>[3]</sup>用两种耐长春新碱和依托泊甙的人卵巢癌细胞株 SK-OV-3 和 JA-T 建立的细胞系进行体外放射实验研究,用单克隆抗体 C219 和 C494 检测,也证实放射后的细胞 P-gp 表达明显增加。随后他们又将一系列哺乳动物细胞株建立的细胞模型用 X-线分次放射,结果也表现出对长春新碱、依托泊甙和顺铂耐药<sup>[4]</sup>。但是放射治疗对鼻咽鳞癌患者 mdr-1 基因表达是否有影响,目前国内外未见报道。本研究表明,当放射至 2/3 根治剂量时复查鼻咽部癌组织 P-gp 表达情况,发现放射治疗后 P-gp 阳性表达率明显增高,并且与放射治疗前相比较,P-gp 表达阳性率有显著性差异( $P < 0.001$ )。因此,笔者认为放射治疗可能诱导 mdr-1 基因表达,这可能是外放射“赋予”了肿瘤细胞耐药表型。

放射治疗是如何诱导 mdr-1 基因表达 P-gp 的机制是合成增加还是降解减少的结果?目前尚不清楚。有作者认为肿瘤化疗和放疗后产生的耐药机制不同<sup>[8]</sup>,也有研究认为某些肿瘤细胞具有相同的抗肿瘤药物、抗放射的机制,还可能与 DNA 拓扑异构酶水平、基因扩增及突变、DNA 修复有关<sup>[9]</sup>。放射治疗的生物学基础是由电离性射线引发的“直接作用”和通过水电离而产生自由基的“间接作用”造成肿瘤细胞关键靶的损伤或死亡。一般认为放射损伤的关键靶是 DNA,由于 DNA 的损伤可能引起肿瘤细胞 DNA 的损伤修复反应,这一过程促使其抗损伤基因表达,MDR 的形成可能正是肿瘤细胞抗损伤的反应之一。P-gp 过度表达是引起放射治疗后化疗交叉耐药的原因之一<sup>[10]</sup>。

关于 P-gp 表达与鼻咽鳞癌患者预后的关系,目前尚无长期随访资料。本研究的初步结论是放射治疗前、后 P-gp 表达状况与患者近期疗效之间无显著

差异。但 P-gp 表达是否可作为鼻咽鳞癌患者独立的预后因素尚需大宗样本、长期随访进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Hill BT. Interaction between antitumor agents and radiation and the expression of resistance [J]. *Cancer Treat Rev*, 1991, 18(3):149-190.
- [2] Mc Clean S, Whelan RDH, Hosking L K, et al. Characterisation of the P-glycoprotein overexpressing drug resistance phenotype exhibited by Chinese hamster ovary cells following their in vitro exposure to fractionated X-irradiation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1177(2):117-126.
- [3] Hill BT, Whelan RD, Hurst HC, et al. Identification of a distinctive P-glycoprotein-mediated resistance phenotype in human ovarian carcinoma cells after their in vitro exposure to fractionated X-irradiation [J]. *Cancer*, 1994, 73(12):2990-2999.
- [4] Hill BT, Moran E, Etievant C, et al. Low-dose twice-daily fractionated X-irradiation of ovarian tumor cells in vitro generates drug-resistant cells overexpressing two multidrug resistance-associated proteins, P-glycoprotein and MRP1 [J]. *Anticancer Drugs*, 2000, 11(3):193-200.
- [5] Leonardo E, Valente G, Cappia S, et al. Immunohistochemical evaluation of P-glycoprotein in human malignancies by monoclonal antibody MC57 [J]. *INT J Cancer*, 1994, 57(6):841-846.
- [6] Tanigaw N, Fujii H. Detection of P-glycoprotein and its clinical significance [J]. *Nippon Rinsho*, 1997, 55(5):1064-1068.
- [7] Mc Clean S, Hosking L K, Hill BT. Dominant expression of multiple drug resistance after in vitro X-irradiation exposure in intraspecific Chinese hamster ovary hybrid cells [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(1):48-53.
- [8] Duchesne GM. Fundamental bases of combined therapy in lung cancer: Cell resistance to chemotherapy and radiotherapy [J]. *Lung Cancer*, 1994, 10(Suppl):S67-S72.
- [9] Zubova SG, Danilov AO, Myshkow AI, Bykova TV, et al. The MDR gene and cellular sensitivity to Various effects [J]. *Vopr Onkol*, 2000, 46(2):199-201.
- [10] 惠延平, 郭国祯, 黄高升, 等. 人宫颈癌放射治疗前后 P-170 的表达 [J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23(6):546-548.

[编辑:贺文]