

口腔鳞癌新辅助化疗前后多药耐药相关蛋白的表达及临床疗效分析

邬利波 潘淑婷 邱嘉旋*

(南昌大学第一附属医院口腔颌面外科 江西 南昌 330006)

[摘要] **目的:**观察口腔鳞癌患者新辅助化疗疗效与5年生存率的关系,并探讨P-gp、MRP1、GST- π 与新辅助化疗疗效的关系。**方法:**1)收集南昌大学第一附属医院诊治的口腔鳞癌石蜡标本77例(有效组50例,无效组27例),随访5年生存时间,Envision法检测P-gp、MRP1、GST- π 表达水平;2)收集本单位口腔鳞癌新鲜标本33例(有效组18例,无效组15例),qPCR、WesternBlot法检测P-gp、MRP1、GST- π 表达水平。**结果:**1)Kaplan-Meier显示:有效组5年生存率高于无效组($P < 0.05$)。2)Envision、qPCR、WesternBlot显示:无效组化疗后P-gp、MRP1表达上升量较有效组有显著差异($P < 0.05$),而GST- π 表达上升量无显著差异($P > 0.05$)。**结论:**口腔鳞癌新辅助化疗有效组5年生存率明显高于无效组;化疗疗效与P-gp、MRP1表达相关,表达上升量越高,疗效越差。

[关键词] 口腔鳞癌 新辅助化疗 多药耐药相关蛋白 5年生存率

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-7651(2017)12-1298-04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.12.015

Expression Level and Clinical Efficacy of Multidrug Resistant Proteins before and after Neoadjuvant Chemotherapy in OSCC. WU Li-bo, PAN Shu-ting, QIU Jia-xuan*. Department of Oral & Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China.

[Abstract] **Objective:** To observe the relationship between therapeutic efficacy and 5-year survival rate of OSCC patients after neoadjuvant chemotherapy, and to explore the relationship between P-gp, MRP1, or GST- π and therapeutic efficacy after neoadjuvant chemotherapy. **Methods:** Seventy-seven OSCC paraffin specimens (50 valids and 27 invalids) were collected from the First Affiliated Hospital of Nanchang University. The 5-year survival time was followed up. Envision assay was used to determine the expression level of P-gp, MRP1, and GST- π . Thirty-three OSCC fresh specimens (18 valids and 15 invalids) were collected. qPCR and Western Blot assay were used to detect the expression level of P-gp, MRP1, and GST- π . **Results:** The Kaplan-Meier assay showed that 5-year survival rate of valid group was better than that of invalid group ($P < 0.05$). The results of Envision, qPCR, and Western Blot showed that the increased expression levels of P-gp and MRP1 in valid group were significantly higher than those in invalid group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The 5-year survival rate of valid group was obviously higher than that of invalid group after the neoadjuvant chemotherapy. The expression levels of P-gp and MRP1 were related to therapeutic efficacy. The higher expression levels of P-gp and MRP1 were followed by the inferior therapeutic efficacy.

[Key words] OSCC Neoadjuvant chemotherapy Multidrug Resistant related proteins 5-year survival rate

口腔鳞癌(Oral squamous cell carcinoma, OSCC)晚期病人常需辅助化疗^[1],新辅助化疗(Neoadjuvant Chemotherapy, NACT),即手术或放疗前给予化疗,具有缩小肿瘤体积、消除亚临床病灶等优点

用于临床,但能否提高患者远期生存率,报道不一^[1,2]。化疗易产生多药耐药(Multiple drug resistance, MDR),导致超过90%的患者死亡^[3]。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白1(Multiple resistance protein1, MRP1)、谷胱甘肽S转移酶- π (Glutathione S-transferases- π , GST- π)在口腔鳞癌耐药组织中高表达,导致化疗抵抗^[4]。而OSCC患者NACT疗效与5年生存率及耐药蛋白表达变化量的研究较少,本实验旨在探讨OSCC

基金项目 江西省科技厅自然科学基金重大项目(编号:20152ACB20019)

作者简介 邬利波(1984~),女,江西萍乡人,硕士,主治医师,口腔颌面外科。

* 通讯作者 邱嘉旋, E-mail: qiujiaxuan@163.com

患者 NACT 疗效与 5 年生存率的关系,及化疗疗效与多药耐药相关蛋白 P-gp、MRP1、GST- π 表达变化量的关系。

1 材料与方法

1.1 病例来源 按纳入标准收集本单位 2000~2011 年石蜡 77 例及 2013~2016 年新鲜标本 33 例(经本院伦理委员会批准、患者知情同意),见表 1。

表 1 临床资料

Table 1 The chart of related clinical files

临床特征	石蜡标本		新鲜标本	
	有效组	无效组	有效组	无效组
年龄/岁				
≤50	11	6	6	3
>50	39	21	12	12
性别				
女	13	11	8	6
男	37	16	10	9
部位				
舌	34	16	13	9
牙龈	4	3	3	2
颊	4	—	1	1
口底	4	2	1	1
上腭	2	2	—	1
上颌窦	2	4	—	1
临床分期				
III 期	34	15	10	8
IV 期	16	12	8	7
病理分级				
高分化	18	5	6	5
中分化	26	15	8	7
低分化	6	7	4	3
淋巴结转移				
无	20	8	9	7
有	30	19	9	8

1.2 纳入标准 1)未经治疗的初诊;2)顺铂+5-氟尿嘧啶(PF)化疗 1 疗程,1~2 周后手术(第 1 天顺铂 100 mg/m² 加入 2.5%氯化钠液 500 mL 静脉滴注;第 1~5 天,每天 5-氟尿嘧啶 375 mg/m² 加入 5%葡萄糖液 250 mL 静脉滴注);3)病理为口腔鳞癌;4)资料完整。

1.3 按 WHO 通用标准行近期疗效评价^[5] 完全缓解(肿瘤消失),部分缓解(肿瘤缩小>50%),稳定(肿瘤缩小<50%),恶化(肿瘤增大至少 25%或出现新病变)。完全缓解和部分缓解为有效,稳定和恶化为无效。

1.4 实验试剂 P-gp、MRP1 一抗(abcam 公司),GST- π 一抗(Life 公司), β -actin 一抗、山羊抗兔/鼠二抗(康为世纪公司)。MaxVisionTM 试剂(MXB 公司)。DNA 逆转录、扩增试剂盒(TRAN 公司)。

1.5 检测方法

1.5.1 Envision 检测 切片、脱蜡、抗原修复、孵一二抗、染色、封片。计数^[4],P-gp、MRP1 阳性细胞为细胞膜/质棕染,GST- π 为细胞质/核棕染,阳性细胞<5%为(-),>5%为(+).

1.5.2 实时定量 PCR(qPCR)检测 液氮运输组织、Tirzol 法提取总 RNA、1%琼脂糖凝胶电泳、反转录、染料法 PCR 扩增。

1.5.3 WesternBlot 检测 液氮运输组织、提蛋白、电泳、湿转、封闭、孵一二抗、曝光。

1.6 统计 SPSS18.0 分析,累计生存率用 Kaplan-Meier;组间比较采用两独立样本 t 检验;P<0.05 有统计学意义。

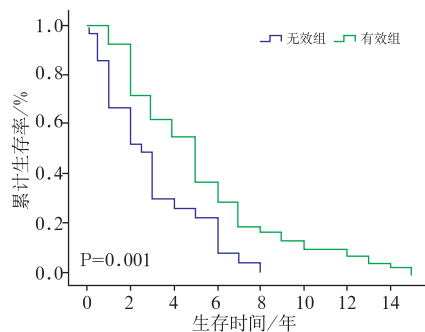


图 1 Kaplan-Meier 分析化疗有效、无效组生存时间

Fig. 1 Kaplan-Meier survival curve was used to analyze the survival time of valid and invalid group

2 结果

2.1 5 年生存率随访 生存时间按手术治疗至死亡或最后随访时间计算(随访率 100%)Kaplan-Meier 生存曲线从纵轴生存率为 0.5 处画平行于横轴的直线,与生存率曲线相交,自交点画垂线与横轴相交,交点为中位生存时间。经统计,77 例石蜡标本,有效组中位生存时间为 5 年,无效组为 2.5 年(P=0.001)。有效组 5 年生存率为 54.0%,优于无效组 25.9%(P=0.018),见图 1、表 2。

表 2 新辅助化疗有效组、无效组生存情况

Table 2 The survival of valid and invalid group after neoadjuvant chemotherapy

分组	样本量/例	平均生存时间/年	中位生存时间/年	5 年生存率/%
有效组	50	5.23	5.00	27(54.0%)
无效组	27	2.97	2.50	7(25.9%)
卡方值		10.225		5.604
P 值		0.001		0.018

2.2 Envision 检测石蜡标本(有效组 50 例,无效组 27 例)P-gp、MRP1、GST- π 的表达 新辅助化疗后无效组 P-gp 阳性表达上升 22.2%,有效组表达上升 4.0%,两组比较有统计学意义(P=0.035);无

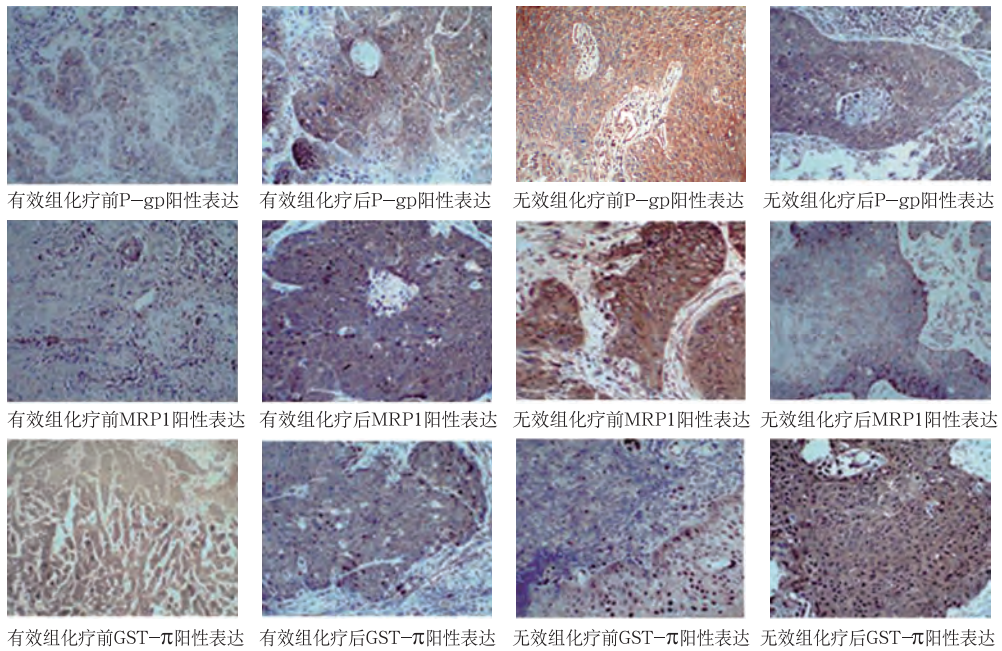


图 2 口腔鳞癌化疗前后 P-gp、MRP1、GST-π 阳性表达(×200)

Fig. 2 The positive expression of P-gp, MRP1, and GST-π before and after chemotherapy in OSCC (×200)

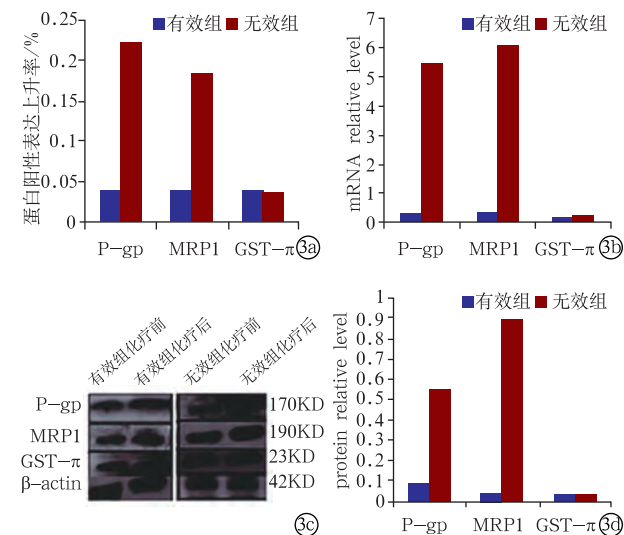


图 3 3a:有效组、无效组化疗后 P-gp、MRP1、GST-π 阳性表达变化;3b:有效组、无效组化疗后 P-gp、MRP1、GST-π mRNA 表达变化;3c:有效组、无效组化疗前后 P-gp、MRP1、GST-π 表达;3d:有效组、无效组化疗后 P-gp、MRP1、GST-π 蛋白表达变化

Fig. 3 3a: The positive expression variation of P-gp, MRP1, and GST-π after chemotherapy of valid and invalid group. 3b: The expression variation of P-gp, MRP1, and GST-π mRNA after chemotherapy of valid and invalid group. 3c: The expression of P-gp, MRP1, and GST-π protein before and after chemotherapy of valid and invalid group. 3d: The expression variation of P-gp, MRP1, and GST-π protein after chemotherapy of valid and invalid group

效组 MRP1 阳性表达上升 18.5%，有效组表达上升 4.0%，两组比较有统计学意义($P=0.049$)。无效

组 GST-π 阳性表达上升 3.8%，有效组表达上升 4.0%，两组比较无统计学意义($P=0.931$)，见图 2、图 3a。

2.3 qPCR 检测 33 例新鲜标本(有效组 18 例,无效组 15 例)新辅助化疗后 P-gp、MRP1、GST-π mRNA 的表达 化疗后无效组 P-gp mRNA 表达上升 5.46 倍,有效组表达上升 0.32 倍,两组比较有统计学意义($P<0.001$);无效组 MRP1 mRNA 表达上升 6.12 倍,有效组表达上升 0.37 倍,两组比较有统计学意义($P<0.001$)。无效组 GST-π mRNA 表达上升 0.26 倍,有效组表达上升 0.21 倍,两组比较无统计学意义($P=0.673$)，见图 3b。

2.4 WesternBlot 检测 33 例新鲜标本(有效组 18 例,无效组 15 例)新辅助化疗后 P-gp、MRP1、GST-π 的表达 化疗后无效组 P-gp 表达上升 0.55 倍,有效组表达上升 0.09 倍,两组比较有统计学意义($P=0.003$);无效组 MRP1 表达上升 0.89 倍,有效组表达上升 0.04 倍,两组比较有统计学意义($P=0.001$)。无效组 GST-π 表达上升 0.03 倍,有效组表达上升 0.03 倍,两组比较无统计学意义($P=0.731$)，见图 3c、图 3d。

3 讨论

NACT 作用于口腔颌面部已 30 余年,近期疗效得到认可。PF 方案能有效抑制舌癌增殖活性,反应率达 66%~78%，为 NACT 首选^[6]。然而, NACT 是否能提高患者远期生产率,报道不一。早

在 20 世纪 90 年代,我国学者邱蔚六就提出 NACT 适应 T3-T4 期患者,且发现有效组可提高患者远期生存率^[1];有学者提出 NACT 不能提高远期生存率,认为可能与肿瘤复发、多药耐药相关^[3,7]。学者认为,造成以上争议的原因可能与患者选择、化疗方案、生活习惯、情绪等相关^[2,8]。本实验收集 77 例行 PF 新辅助化疗的口腔鳞癌病例(有效组 50 例,无效组 27 例),发现有效组患者中位生存时间达 5 年,明显优于无效组的 2.5 年;且有效组患者 5 年生存率达 54.0%,明显优于无效组 25.9%。为进一步探讨其可能机制,本文对该 77 例石蜡切片行 Envision 检测,同时收集 33 例新鲜口腔鳞癌标本行 qPCR、WesternBlot 检测多药耐药相关蛋白 P-gp、MRP1、GST- π 的表达水平。

MDR 是肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药同时对其它化学结构、作用机制完全不同的抗肿瘤药物也产生交叉耐药的现象,机制包括膜转运蛋白过表达(P-gp、MRP1)、致药物解毒性增加蛋白过表达(GST- π)^[9]、抗癌药物活性形式减少等^[10]。研究表明,P-gp、MRP1、GST- π 在 OSCC 患者 NACT 耐药组织中高表达,导致 MDR^[4],且超过 90% 的患者死于 MDR,严重影响远期生存率^[3]。同样,MDR 已成为 OSCC 化疗疗效欠佳的主要原因^[11]。本实验用 Envision、qPCR、WesternBlot 行有效、无效组 NACT 前后 P-gp、MRP1、GST- π 的检测,发现无效组 NACT 后 P-gp、MRP1 表达上升,且上升量明显高于有效组,即提示化疗疗效与 P-gp、MRP1 表达相关,表达上升量越高,疗效越差。本文亦发现无效组较有效组化疗后 GST- π 表达增加无显著差异,该结果与冷卫东研究较一致^[4]。该学者认为可能与样本量较少相关,本实验认为可能为 GST- π 亚型 GST-pi-1 的减少/缺失所致,因 GST-pi-1 为相关化疗药物活化酶,其表达减少/缺失可使药物活性形式减少/消失,产生耐药^[10],但具体机制需深入研究。

如何提高远期生存率,学者提出了行综合序列治疗的观点^[12];其次,多药耐药逆转剂如 P-gp 逆转剂 H6^[13]等的研究;再次,本课题组长期研究的增敏剂白花丹素^[14]等,均已取得一定研究成果。但由于影响 OSCC 患者 NACT 远期疗效的因素众多,故需深入探讨。

综上,OSCC 患者 NACT 产生 MDR,化疗疗效与 P-gp、MRP1 表达有关,表达上升量越高,疗效越差;有效组患者 5 年生存率显著优于无效组。故

提高其敏感性,有利于进一步提高生存率;如何更好的提高化疗敏感性,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 邱蔚六,薛晓帆,刘媛如. 口腔颌面部鳞癌术前辅助化疗的评价[J]. 华西口腔医学杂志,1991,9(3): 167-173
- [2] Sun W, Zhang X, Ding X, et al. Lactate dehydrogenase B is associated with the response to neoadjuvant chemotherapy in oral squamous cell carcinoma [J]. PLoS One,2015,10(5): e125976
- [3] Perez-Sayans M, Somoza-Martin J M, Barros-Angueira F, et al. Multidrug resistance in oral squamous cell carcinoma: The role of vacuolar ATPases [J]. Cancer Lett,2010, 295(2): 135-143
- [4] 冷卫东,王大章,冯戈,等. 肿瘤耐药蛋白在舌鳞癌中的表达及意义[J]. 华西口腔医学杂志,2004,22(1): 23-25
- [5] Aprile G, Fontanella C, Bonotto M, et al. Timing and extent of response in colorectal cancer: critical review of current data and implication for future trials [J]. Oncotarget,2015,6(30): 28716-28730
- [6] 邱嘉旋,魏军水,朱声荣,等. Ki-67、EGFR、p53 及 RAR β 在口腔鳞状细胞癌化疗前后的变化及临床意义评价[J]. 口腔医学研究,2011,27(2): 127-131
- [7] Sano D, Matsuda H, Ishiguro Y, et al. Antitumor effects of IDN5109 on head and neck squamous cell carcinoma [J]. Oncol Rep,2006,15(2): 329-334
- [8] 杨锋. 术前诱导化疗、术后辅助化疗对晚期舌癌患者生存情况影响的对比研究[D]. 广西医科大学,2010
- [9] Pan S T, Li Z L, He Z X, et al. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2016,43(8): 723-737
- [10] Rosario L A, O'Brien M L, Henderson C J, et al. Cellular response to a glutathione S-transferase P1-1 activated prodrug [J]. Mol Pharmacol,2000,58(1): 167-174
- [11] Peng B, Yi S, Gu Y, et al. Purification and biochemical characterization of a novel protein-tongue cancer chemotherapy resistance-associated protein1 (TCRP1) [J]. Protein Expr Purif,2012,82(2): 360-367
- [12] 黄海燕,杨蕾,李秋梨,等. 诱导化疗在局部中晚期口腔鳞癌序贯治疗中功能保留作用的研究[J]. 中华临床医师杂志,2012, 15(6): 4305-4309
- [13] Zhu H, Liu Z, Tang L, et al. Reversal of P-gp and MRP1-mediated multidrug resistance by H6, aglycoside aglycon Gynostemma pentaphyllum, in vincristine-resistant human oral cancer (KB/VCR) cells [J]. Eur J Pharmacol, 2012,696(1-3): 43-53
- [14] Pan S T, Qin Y, Zhou Z W, et al. Plumbagin induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways in human tongue squamous cell carcinoma cells [J]. Drug Des Devel Ther, 2015,9: 1601-1626