

P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 等多药耐药蛋白 在肝癌中的协同表达研究

王 雷^a, 王煜霞^b, 陈丽平^a, 薛会朝^a, 原志庆^b

(新乡医学院 a. 第一附属医院普外科; b. 基础医学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:目的:探讨多药耐药相关标志物 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 在肝癌细胞中的共表达情况. 方法:以 69 例肝癌患者为本次研究对象,应用免疫组化 SP 法检测多药耐药相关标志物 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 在肝癌组织的共表达情况. 结果:不同分型、不同分期肝癌组织 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 阳性表达率及共表达差异无显著性 ($P>0.05$); 分化程度不同的肝癌组织多药耐药相关标志物 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 阳性表达率及共表达有明显差异 ($P<0.05$). 结论:多药耐药相关标志物 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 在不同分型、不同分期和不同分化程度的肝癌组织中均有明显共表达,在不同分化程度的肝癌组织中阳性表达率及共表达更为明显.

关键词: P-gp; MRP; LRP; GST- π ; 肝癌

中图分类号: Q485

文献标志码: A

我国是乙肝病毒性肝炎感染大国,乙肝患者往往会最终走向肝癌,由此导致肝癌成为我国目前发病率最高的恶性肿瘤之一^[1-2]. 由于肝癌发病隐匿,多数患者已经错过最佳手术时机,必须依靠药物进行保守治疗^[3-4]. 目前常用的化疗药物较易出现耐药性^[5],而最先进的靶向型药物虽然对中晚期肝癌有较好的疗效但其价格昂贵往往不能被大多数患者接受. 因此,了解常用的肝癌化疗药物耐药性产生机制就显得十分重要. 本研究应用免疫组化 SP 法检测多药耐药相关蛋白 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 在肝癌组织的协同表达情况,以期对肝癌的化疗提供一定的理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2012.5~2014.5 新乡医学院第一附属医院普外科手术切除且经病理确诊的肝癌标本 69 例,所有患者术前均未进行任何化疗和放疗. 男性 39 例,女性 30 例;平均年龄 67.5 岁;巨块型 22 例,结节型 42 例,弥漫型 5 例^[6];高分化肝癌 47 例,低分化肝癌 22 例;TNM^[7]分型 I 9 例、II 17 例、III 32 例、IV 11 例.

1.2 方法

所有标本均经 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片. 常规 HE 染色,其余步骤严格按照 SP 免疫组化检测试剂盒(上海研卉生物科技有限公司,货号:95-9641)说明书进行操作. 鼠抗人 P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 单克隆抗体购自 sigma 公司(货号 M7317),DAB 显色试剂盒购自广州安必平医药科技股份有限公司(编号 IPM007),其余耗材由新乡医学院基础医学院机能学实验室提供. 本研究用已确定的肝癌组织切片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗做阴性对照.

1.3 结果评价和统计分析

P-gp, MRP, LRP 和 GST- π 表达均位于细胞膜和/或细胞质,阳性反应为棕黄色颗粒;每张切片随机计

收稿日期:2015-02-08;修回日期:2015-06-10.

基金项目:河南省基础与前沿技术研究计划项目(13A320854)

第 1 作者简介(通信作者):王 雷(1977-),男,河南唐河人,新乡医学院讲师,研究方向为肝癌的耐药机制, E-mail: 3202583385@qq.com.

数十个高倍视野(400 \times),计算阳性率.分4个等级判断肝癌对相关耐药蛋白的耐药性,判断标准^[7]:“-”表示阳性细胞数 $\leq 10\%$,”+”表示 $10\% <$ 阳性细胞数 $\leq 25\%$,”++”表示 $25\% <$ 阳性细胞数 $\leq 75\%$,”+++”表示阳性细胞数 $> 75\%$,将“-”和“+”视为阴性表达,将“++”和“+++”视为阳性表达.

应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,各组间差异采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 多药耐药相关标志物 P-gp,MRP,LRP 和 GST- π 在肝癌的表达情况

如表1、表2所示.不同分型、不同分期肝癌组织P-gp,MRP,LRP和GST- π 表达变化情况差异无显著性($P > 0.05$).低分化肝癌多药耐药相关标志物P-gp,MRP,LRP,GST- π 表达较高分化肝癌明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$).

表1 不同病理特征肝癌中多药耐药相关蛋白 P-gp,MRP,LRP 和 GST- π 的阳性表达

病理特征	n	P-gp				MRP				LRP				GST- π				
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
分型	巨块型	22	1	5	7	9	3	4	8	7	2	3	10	7	1	1	10	10
	结节型	42	6	4	17	15	5	8	15	14	4	14	10	12	2	6	18	16
	弥漫型	5	0	1	2	2	0	0	2	3	0	2	1	2	0	1	1	3
分期	I期	10	1	3	4	2	2	2	4	2	1	2	4	3	2	2	3	3
	II期	12	2	3	5	2	1	4	4	3	1	3	5	3	2	2	5	3
	III期	32	1	4	15	12	1	3	13	14	1	4	11	16	1	3	13	15
	IV期	15	0	1	5	9	0	2	6	7	0	1	7	7	0	0	6	9
分化程度	高分化	27	6	9	5	7	4	10	4	9	3	9	7	8	5	9	6	7
	低分化	42	0	5	16	21	0	2	17	23	0	0	20	22	0	3	20	19

表2 不同病理特征肝癌中多药耐药相关蛋白 P-gp,MRP,LRP 和 GST- π 阳性表达率

病理特征	n	P-gp/%	MRP/%	LRP/%	GST- π /%	
分型	巨块型	22	16(72.7)	15(68.1)	17(77.2)	20(90.1)
	结节型	42	32(76.1)	29(69.0)	24(57.1)	34(81.0)
	弥漫型	5	4(80.0)	5(100)	3(60.0)	4(80.0)
分期	I期	10	6(60.0)	6(60.0)	7(70.0)	6(60.0)
	II期	12	7(58.3)	7(58.3)	8(66.7)	8(66.7)
	III期	32	27(84.3)	27(84.3)	27(84.4)	28(87.5)
	IV期	15	14(93.3)	13(86.7)	14(93.3)	15(100)
分化程度	高分化	27	12(44.4)	13(51.9)	15(55.6)	13(48.1)
	低分化	42	37(88.1)	40(95.2)	42(100)	39(92.6)

2.2 不同病理特征肝癌多药耐药相关标志物 P-gp,MRP,LRP 和 GST- π 共表达情况

经统计分析可知,不同分型、不同分期肝癌组织多药耐药相关蛋白P-gp-MRP-LRP和GST- π 共表达差异无显著性($P > 0.05$).低分化肝癌多药耐药相关标志物P-gp,MRP,LRP,GST- π 共表达较高分化肝癌明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$).如表3所示.

3 讨论

多药耐药即一种药物作用于肿瘤产生耐药性后,该肿瘤对未接触过的、结构不同、作用靶点不同的抗肿瘤药物也具有耐药性^[8].肝癌先天性表达多药耐药基因^[9],且各种多药耐药基因具有同源性,如P-gp和MRP均为跨膜转运蛋白,同属于ATP结合盒(ATP-bindingcassette,ABC)转运蛋白^[10],他们都采用泵出化疗药物的方式减少癌细胞内药物浓度,这是导致多药耐药蛋白共表达的基础.

有研究表明,不同的多药耐药相关标志物具有不同的耐药基础,常见的集中耐药基础为化疗药物泵,化疗药物包裹和化疗药物减毒作用(见图1).P-gp曾被研究人员戏称为药物泵,它通过消耗ATP等能量将肝

癌细胞内的化疗药物转移到细胞外,导致细胞内药物浓度降低,达不到有效治疗浓度,由此获得耐药性^[11-13].它还可促使药物在细胞内再分布,积聚于与药物作用无关的细胞器内,进一步降低作用于靶点部位的药物浓度,导致耐药^[14].MRP多数位于胞质内,发挥与P-gp相同的泵作用,另有少数的胞质内的MRP的耐药机制和LRP相似即包围化疗药物^[15].

表3 不同病理特征肝癌中多药耐药相关蛋白P-gp,MRP,LRP和GST- π 共表达情况

病理特征	n	均不表达/%	表达1种/%	协同表达2种及以上/%	
巨块型	22	1(4.5)	4(18.2)	17(77.3)	
分型	结节型	2(4.8)	2(4.8)	38(90.5)	
	弥漫型	5	4(20.0)	1(39.2)	
				3(60.0)	
分期	I期	0(0)	2(20.0)	8(80.0)	
	II期	12	1(8.3)	10(83.3)	
	III期	32	0(0.0)	1(3.1)	31(96.9)
	IV期	15	0(0)	0(0)	15(100)
分化程度	高分化	27	2(7.4)	8(18.5)	17(63.0)
	低分化	42	0(0)	0(0)	42(100)

LRP存在于细胞质内,可以阻止药物进入细胞核,降低药物分布的核质比例,还可通过调节细胞质内的囊泡运输而介导耐药^[16].当细胞内化疗药物含量增加时可以将药物包裹起来,从而将药物浓度进一步降低,同时LRP还可隐匿细胞核药物作用靶点,从一定程度上减轻了化疗药物的作用.

GST- π 是一种II期解毒酶,主要表达于参与解毒、排毒的人体正常组织细胞的胞质中,如泌尿系统、消化系统、呼吸系统等,在恶性肿瘤组织中其表达常增高^[17].GST- π 主要介导烷化剂、铂类、丝裂霉素类等药物的耐药.耐药作用表现在^[18]:①催化烷化剂与GSH结合,使有毒化合物水溶性增加、毒性减小;②与亲脂性细胞毒药物结合,促进其代谢,降低抗癌药物的细胞毒作用;③还原抗癌药物产生的过氧化物,使其转变为无毒物质;④抑制烷化剂等亲电性化疗药物引起的癌细胞DNA交联,降低化疗药物对细胞的杀伤作用.

本研究结果显示不同分型、不同分期、不同分化程度肝癌组织均有多药耐药相关标志物P-gp,MRP,LRP和GST- π 的阳性表达(见表1和表2),但不同分型、不同分期的肝癌组织多药耐药相关标志物P-gp,MRP,LRP和GST- π 的阳性表达差异无统计学意义($P>0.05$),也即多药耐药相关标志物P-gp,MRP,LRP和GST- π 的阳性表达与肝癌

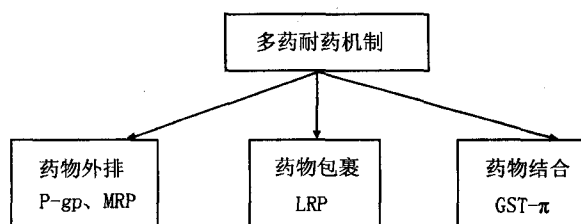


图1 多药耐药机制

分型及分期无明显相关性.而高分化肝癌和低分化肝癌多药耐药相关蛋白P-gp,MRP,LRP和GST- π 的表达差异性显著($P<0.05$),即肝癌分化程度越低,多药耐药越严重,此结果与临床治疗中的实际相一致:肝癌分化程度越低,对化疗药物越不敏感,越容易出现耐药性,也与张凡等^[19]的研究结果相符.

进一步研究肝癌多药耐药相关标志物共表达情况,结果表明多药耐药相关标志物共表达具有普遍性,不同分型、不同分期及不同分化程度的肝癌组织均有明显的多药耐药相关蛋白共表达,低分化肝癌组织共表达更加突出(100%)(见表3).

综上所述,不同分型、不同分期及癌细胞分化程度不同的肝癌均有一定程度的多药耐药相关蛋白P-gp,MRP,LRP,GST- π 的阳性表达,且这些表达具有各自不同的作用机制,同时还进行协同性表达.在未来的肝癌治疗中通过检测P-gp,MRP,LRP和GST- π 共表达情况选择化疗药物有利于降低肝癌细胞的化疗耐药性,提高临床疗效.

参 考 文 献

- [1] Cucchetti A, Cescon M, Trevisani F, et al. Current concepts in hepatic resection for hepato-cellular carcinoma in cirrhotic patients[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(44): 6398-6408.
- [2] Ferenci P, Fried M, Labrecque D, et al. Hepatocellular carcinoma(HCC): a global perspective[J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44(4):

- 239-245.
- [3] Qiang L, Huikai L, Butt K, et al. Factors associated with disease survival after surgical resection in Chinese patients with hepatocellular carcinoma[J]. *World J Surg*, 2006, 30(3): 439-445.
- [4] Gu W, Fang F F, Li B, et al. Characterization and resistance mechanisms of a 5-fluorouracil-resistant hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Asian Pac J cancer Prev*, 2012, 13(9): 4807-4814.
- [5] Huang C, Xu D, Xia Q, et al. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance of human hepatic cancer cells by astragaloside II [J]. *Pharm Pharmacol*, 2012, 64(12): 1741-1750.
- [6] Wittekind C h, Grence F L, Hutter V P, et al. Tnm Atlas, illustrated Guide To The Tnm/Ptnm classification of malignant tumors[M]. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, 4th edition, 1997;1-360.
- [7] 于萍,步宏,王华,等.免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究[J]. *生物医学工程学杂志*, 2003, 20(2): 288-290.
- [8] Videira M, Reis R L, Brito M A. Deconstructing breast cancer cell biology and the mechanisms of multidrug resistance[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(2): 312-325.
- [9] 彭磷基,陆大祥.多种方法联合互补治疗无法切除的原发性肝癌[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(3): 628-631
- [10] 李慧楷,李强.肝癌多药耐药机制研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40(16): 1008-1010.
- [11] Ferreira R J, Dos Santos D J, Ferreira M J. P-glycoprotein and membrane roles in multidrug resistance[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(7): 929-946.
- [12] Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(4): 623-631.
- [13] Binkhathlan Z, Lavasanifar A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(3): 326-346.
- [14] Martelli C, Dei S, Lambert C, et al. Inhibition of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance (MDR) by N,N-bis(cyclohexanol)amine aryl esters; further restriction of molecular flexibility maintains high potency and efficacy[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(1): 106-109.
- [15] 朱明明,刘斌,李江.人原发性肝癌中多药耐药相关蛋白MRP的表达、耐药机制及逆转的研究进展[J]. *昆明医科大学学报*, 2012(S1): 202-206.
- [16] Moraes AC, Maranhão CK, Rauber GS, et al. Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy[J]. *J Clin Lab Anal*, 2013, 27(1): 62-71.
- [17] Nish P, Sabarni K, Chatterjee, et al. Rescue of paclitaxel sensitivity by repression of Prohibitin1 in drug-resistant cancer cells[J]. *PNAS*, 2010, 107(6): 2503-2508.
- [18] Federici L, Lo Sterzo C, Pezzola S, et al. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-berzoxadiazol-4-ylthio) hexanol to human glutathione s-transferases[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(20): 8025-8034.
- [19] 张凡,徐颖,张明辉.肝细胞癌中热休克蛋白70、多药耐药相关蛋白和增殖核抗原的表达研究[J]. *临床医学工程*, 2009, 16(12): 50-51.

Co-expressions of Multidrug Resistance Related Proteins of P-gp, MRP, LRP, and GST- π in Hepatocellular Carcinoma

WANG Lei^a, WANG Yuxia^b, CHEN Liping^a, XUE Huichao^a, YUAN Zhiqing^b

(a. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital; b. College of Basic Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective: To investigate the co-expressions of multidrug resistance related markers P-gp, MRP, LRP, and GST- π in hepatocellular carcinoma. Methods: We adopted SP method to detect the expression levels of P-gp, MRP, LRP, and GST- π in 69 cases of hepatocarcinoma tissue. Results: Positive expression rates and co-expressions of P-gp, MRP, LRP and GST- π were no significant difference in the different type and the different TNM of hepatocellular carcinoma ($P > 0.05$). However, in the different degrees of differentiation of hepatocellular carcinoma, there were significant difference both positive expression rates and co-expressions of P-gp, MRP, LRP and GST- π ($P < 0.05$). Conclusion: Multidrug resistance related markers of P-gp, MRP, LRP, and GST- π had significant expression in different types, different stages, and different degrees of hepatocellular carcinoma. What's more, these expressions had coordination. Positive expression rates and co-expression of P-gp, MRP, LRP, and GST- π was more apparent in different degrees of differentiation of hepatocellular carcinoma.

Keywords: P-gp; MRP; LRP; GST- π ; hepatocellular carcinoma