

MRP2 蛋白在食管鳞癌中的表达及其与化疗耐药的相关性

甘思远¹ 区增冠² 孙艳芹¹ 陈娟³ 陈莉熔²

(1 广东医学院病理学教研室 广东 湛江 524023 2 佛山市高明区中医院外科 广东 佛山 528511;

3 武警广东总队医院肿瘤科 广东 广州 510507)

摘要 目的:探讨 MRP2 蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与食管癌化疗耐药的关系。方法:收集原发性食管鳞癌手术标本 70 例,采用免疫组织化学 Envision 法检测食管鳞癌组织及其癌旁组织中 MRP2 蛋白的表达情况,并采用 MTT 法检测食管鳞癌组织对临床常用化疗药物的敏感性,分析其表达与食管癌化疗耐药的关系。结果:70 例食管鳞癌组织及其癌旁正常组织中的阳性表达率分别为 58.6%及 5.0%。MRP2 蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常食管组织($P<0.01$)。食管鳞癌组织对环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、顺铂、卡铂、阿霉素、长春瑞滨、羟喜树碱等化疗药物的敏感性与其相应癌组织中 MRP2 表达明显相关($P<0.01$)。结论:MRP2 的表达与食管鳞癌对多种化疗药物耐药有较好的相关性,推测食管鳞癌组织中 MRP2 的高表达可能对化疗耐药性的发生发展具有促进作用。

关键词 食管鳞状细胞癌;免疫组织化学;MTT;多药耐药相关蛋白 2

中图分类号 R735.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)25-4863-03

The Expression of MRP2 Protein and its Correlation with the Chemoresistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

GAN Si-yuan¹, OU Zeng-guan², SUN Yan-qin¹, CHEN Juan³, CHEN Li-rong²

(1 Department of Pathology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong, 524023, China;

2 Department of Surgery, Foshan Gaoming Traditional Chinese Medicine Hospital, Foshan, Guangdong, 528511, China;

3 Department of Oncology, Wujing Zongdui Hospital of Guangdong, Guangzhou, Guangdong, 510507, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of MRP2 protein and its correlation with the chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** 70 cases with esophageal squamous cell carcinomas were chosen. The expression of MRP2 in esophageal squamous cell carcinomas and pericarcinoma tissues was detected with immunohistochemical Envision TM plus non-biotin technique. The chemoresistance was assayed by MTT method. **Results:** The positive expression rates of MRP2 protein in esophageal squamous cell carcinomas and pericarcinoma tissues were 58.6% and 5.0% respectively. The positive expression rates of MRP2 protein in esophageal squamous cell carcinomas were significantly higher than that in pericarcinoma tissues ($P<0.01$). The expression of MRP2 was negatively correlated to the chemoresistance, except mitomycin and paclitaxel. **Conclusion:** The MRP2 protein is overexpressed and the chemoresistance of the chemotherapeutics probably correlates with the MRP2 expression in esophageal squamous cell carcinomas.

Key words: Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; MTT; Multidrug resistance protein 2

Chinese Library Classification: R735.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4863-03

前言

随着近年来对恶性肿瘤的发生、发展、生物学行为及化疗耐药分子机制的认识不断加深,已发现多种酶和蛋白表达的异常与肿瘤细胞产生耐药性密切相关^[1-3]。其中多药耐药相关蛋白 2(Multidrug resistance associated protein 2, MRP2)是近年来研究得最多的肿瘤耐药相关蛋白之一^[4,5]。目前已证实 MRP2 参与了多种类型肿瘤细胞的多种化疗药物耐药过程,但其与食管鳞癌耐药的关系研究少见报道。本研究采用 Envision 法检测 70 例食管鳞癌组织中 MRP2 蛋白的表达情况,并检测相应癌组织对临床常用化疗药物的敏感性,旨在探讨食管鳞癌组织中 MRP2 蛋白表达与化疗耐药性产生的相关性,为临床制定个性化的联合化疗方案、提高疗效提供客观的参考依据。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2008 年 1 月-2010 年 4 月高明区中医院外科收治的食管鳞癌患者手术切除标本 70 例,其中男性 62 例,女性 8 例;年龄 36~70 岁,平均年龄(59.03 ± 6.50)岁;按照 2009 年国际抗癌联盟第 7 版食管癌国际 TNM 分期标准进行临床分期:期 5 例,期 36 例,期 29 例。新鲜切除癌组织标本分成两份,一份经 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋;一份用于化疗药物药敏试验。另选择上述食管鳞癌标本中癌旁组织 60 例作为对照组。所有标本的选取均经病理专家检查是否与设计相符。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测及结果判断 EnVision 试剂盒、鼠抗人单克隆抗体 MRP2(即用型)、DAB 显色试剂盒均购自迈新生物技术公司。采用免疫组化 EnVision 法,其具体操作步骤按试剂盒说明书进行。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性反

作者简介:甘思远(1983-)男,硕士,助教,主要研究方向:肿瘤化疗耐药。E-mail:xiyuankam@yahoo.cn

(收稿日期:2012-02-13 接受日期:2012-03-07)

应片作阳性对照。

光镜下观察 染色结果判断 :以癌细胞胞浆出现黄色或棕黄色颗粒状为染色阳性。每张切片随机选取 5 个高倍视野 按阳性细胞比例判断 :无着色或阳性细胞比例 < 10 % 为阴性(-) , 阳性细胞在 10 %~25 % 为弱阳性 (+) , 25 %~75 % 为中度阳性(++) , > 75 % 为强阳性(+++)。

1.2.2 MTT 法检测食管鳞癌组织对临床常用化疗药物的敏感性 将手术切除的新鲜癌组织制成细胞悬液 ,RPMI 1640 培养液将细胞浓度调整到 $5 \times 10^5/\text{mL} \sim 10^6/\text{mL}$ 。设计空白对照组(只加培养液)、肿瘤细胞对照组(不加抗癌药物)和实验组(高浓度组 ,低浓度组) ,每组设 4 个复孔。将调整好的细胞悬液接种于每组各孔 ,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5 % CO_2 培养箱中培养 24 h。选择环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶、吉西他滨、顺铂、卡铂、阿霉素、丝裂霉素、长春瑞滨、紫杉醇、羟喜树碱 10 种常用化疗药物为检测药物 ,按照其临床血浆峰值浓度的 20 倍制成储存液 ,实验组中高浓度组加入 10 μL 储存液 ,低浓度组加入稀释 1 倍后的储存液 10 μL 。培养 48 h 后每孔加入 MTT 试剂(5 mg/mL)20 μL ,继续培养 4 h ,弃上清液 ,每孔加入 DMSO 150 μL ,振荡 5 min ,酶标仪以波长 570 nm 波长测定各孔吸光度值。化疗药物抑制率的计算 :化疗药物的抑制率 (IR)= (肿瘤细胞对照组 OD 值 - 实验组 OD 值)/(肿瘤细胞对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times$ 100 % ,化疗药物耐药性判断标准 :化疗药物的抑制率 $\leq$ 30 % 为耐药 ,31 %~50 % 为低度敏感 ,51 %~70 % 为中度敏感 , $\geq$ 70 % 为高度

敏感。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件对实验结果进行统计学分析。计数资料运用卡方检验法 相关性采用 Spearman 等级相关检验。以 $P < 0.05$ 为差别具有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞癌及癌旁正常食管组织中 MRP2 的表达比较

70 例食管鳞癌组织中 MRP2 表达阳性 41 例 ,其中表达为 (+) 者 21 例 ,表达为 (++) 者 7 例 ,表达为 (+++) 者 13 例 ,阳性表达率为 58.6 % ,而在癌旁正常食管组织中 MRP2 表达阳性 3 例 ,阳性表达率为 5.0 %。MRP2 蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常食管组织 ($P < 0.01$)。

2.2 MRP2 的表达与癌组织对常用化疗药物敏感性检测结果的相关性

食管鳞癌组织对 10 种化疗药物敏感性试验结果与其相应癌组织中 MRP2 的表达情况进行 Spearman 相关分析发现 ,MRP2 的表达高低与相应食管鳞癌组织对环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶、吉西他滨、顺铂、卡铂、阿霉素、长春瑞滨、羟喜树碱的敏感性呈负相关 r 值分别为 0.653、0.627、0.619、0.586、0.608、0.573、0.594 和 0.552 ($P < 0.01$) ,食管鳞癌组织对紫杉醇、丝裂霉素与其相应癌组织中 MRP2 的表达无相关性 ($P > 0.05$) (表 1 和表 2)。

表 1 MRP2 的表达与癌组织对常用化疗药物敏感性检测结果的相关性

Table 1 The relationship between the expression of MRP2 protein and the chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma

MRP2	Cyclophosphamide				5 - fluorouracil				Gemcitabine				Cisplatin				Carboplatin			
	R	L	M	H	R	L	M	H	R	L	M	H	R	L	M	H	R	L	M	H
-	0	5	13	11	0	6	12	11	0	6	13	10	0	4	13	12	0	5	12	12
+	4	10	5	2	3	11	5	2	4	11	5	1	5	12	4	0	6	15	4	0
++	4	2	1	0	2	3	2	0	5	2	1	0	6	1	0	0	5	2	0	0
+++	11	2	0	0	11	2	0	0	12	1	0	0	13	0	0	0	13	0	0	0

Note: R: Drug resistance; L: Low sensitivity; M: Middle sensitivity; H: High sensitivity.

表 2 MRP2 的表达与癌组织对常用化疗药物敏感性检测结果的相关性

Table 2 The relationship between the expression of MRP2 protein and the chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma

MRP2	Doxorubicin				Mitomycin				Changchun vinorelbine				Paclitaxel				Hydroxycamptothecin			
	R	L	M	H	R	L	M	H	R	L	M	H	R	L	M	H	R	L	M	H
-	0	6	14	9	2	5	10	12	0	7	14	8	0	5	13	11	0	7	12	10
+	3	10	4	4	6	4	7	4	4	9	3	5	5	5	6	5	4	8	5	4
++	3	2	2	0	0	2	4	1	3	3	1	0	0	1	4	2	2	3	3	0
+++	9	4	0	0	0	0	6	7	7	5	1	0	0	0	8	5	8	5	0	0

Note: R: Drug resistance; L: Low sensitivity; M: Middle sensitivity; H: High sensitivity.

3 讨论

近年来食管鳞癌发病率和死亡率在国内均呈增长趋势 ,多数患者确诊时已属中、晚期 ,临床主要采用以手术切除结合术后放化疗为主的多学科综合性治疗 [6] ,但患者化疗有效率和化

疗后中位生存时间仍然很低 ,其中化疗药物的耐药性是导致食管鳞癌患者预后不良的重要原因之一 [7-10]。耐药的产生主要是由于多药耐药现象 (multidrug resistance ,MDR) [11-14]。MRP2 是与 MDR 密切相关的 ABC 转运蛋白家族 (ATP binding cassette) 的重要成员之一。MRP2 定位于细胞膜 ,是一类能量依赖性跨膜糖蛋白 ,主要转运疏水性、不带电荷分子或水溶性阴离子化合

物^[15]。研究表明 MRP2 具有的膜转运功能参与了多药耐药,它通过减少还原型谷胱甘肽的协同转运机制,调控胞浆及细胞器的 pH 值而降低药物到达作用部位的数量,并逆浓度梯度减少胞内药物浓度而导致耐药的发生^[16]。目前在多种组织中都进行了由 MRP2 介导的药物耐药性研究,已证实了 MRP2 在多种恶性肿瘤细胞对抗化疗药物从而形成耐药现象方面起着重要的作用^[17-20]。但 MRP2 在食管癌中的表达与耐药相关性尚未见报道。

本研究运用免疫组化检测食管鳞癌及癌旁正常食管组织中的 MRP2 表达情况,结果发现 70 例食管鳞癌组织中 MRP2 表达阳性有 41 例,阳性表达率为 58.6%,而在癌旁正常食管组织中 MRP2 表达阳性 3 例,阳性表达率为 5.0%。MRP2 蛋白在食管鳞癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁正常食管组织。提示在食管鳞癌组织中 MRP2 蛋白呈过表达,这种表达异常可能在食管鳞癌的发生过程中起一定的生物学作用。

为进一步探讨 MRP2 表达与癌组织耐药性之间的关系,本研究同时检测了相应食管鳞癌组织的药敏实验,结果食管鳞癌组织对环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、顺铂、卡铂、阿霉素、长春瑞滨、羟喜树碱等化疗药物的敏感性与其相应癌组织中 MRP2 表达明显相关,食管鳞癌组织对紫杉醇、丝裂霉素与其相应癌组织中 MRP2 的表达无相关性。说明 MRP2 表达与食管鳞癌的多种化疗药物耐药有较好的相关性,即 MRP2 的表达高低与环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、顺铂、卡铂、阿霉素、长春瑞滨、羟喜树碱药物敏感性存在负相关性,推测食管鳞癌患者体内癌组织 MRP2 的高表达可能对肿瘤耐药性产生具有促进作用,MRP2 的高表达者,环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、顺铂、卡铂、阿霉素、长春瑞滨、羟喜树碱药物敏感性降低,但其具体作用机制仍有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] 黄关兰,冉志华.多药耐药相关蛋白基因及其在肿瘤耐药中的作用[J]. 胃肠病学,2005,10(4):246-249
Huang Guan-lan, Ran Zhi-hua. Multidrug resistance associated protein gene and its role in multidrug resistance in cancer[J]. Chin J Gastroenterol, 2005,10(4):246-249
- [2] 陈慧玲.肿瘤多药耐药的研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2008,13(5):475-477
Chen Hui-ling. Research of tumor multidrug resistance [J]. Journal of Clinical Oncology, 2008,13(5):475-477
- [3] Oue T, Yoneda A, Uehara S, et al. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies[J]. J Pediatr Surg, 2009,44(2):377-380
- [4] 莫非,王健生,吴文安,等. HO-1 与 MRP2 在原发性胆囊癌组织中的表达和意义[J]. 现代肿瘤医学,2009, 17(10): 1897-1900
Mo Fei, Wang Jian-sheng, Wu Wen-an, et al. Expression and significance of HO-1 and MRP2 in primary gallbladder carcinoma[J]. Modern oncology, 2009,17(10):1897-1900
- [5] Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE, et al. Expression of multidrug resistance-associated protein2(MRP2)in normal human tissues and carcinomas using tissue micrarrays [J]. Histopathology, 2002,41 (1): 65-74
- [6] Homs MY, van der Gaast A, Siersema PD, et al. Withdrawn: Chemotherapy for metastatic carcinoma of the esophagus and gastro-esophageal junction [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2010, 12 (5):CD004063
- [7] Langer R, Specht K, Becker K, et al. Association of pretherapeutic expression of hemo-therapy-related genes with response to neoadjuvant chemotherapy in barrett carcinoma[J]. Chn Cancer Res, 2005,11(20): 7462-7469
- [8] 张志培,王小平,周勇安,等. 食管鳞癌组织中 V-H+-ATPase 的表达及其与化疗药物耐药相关性探讨 [J]. 现代肿瘤医学,2009,17(11): 2126-2129
Zhang Zhi-pei, Wang Xiao-ping, Zhou Yong-an, et al. The expression of vacuolar-H+-ATPase and its correlation with the chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Modern Oncology, 2009,17(11):2126-2129
- [9] 吴智宁.CXCR4 表达与 Eca109 细胞侵袭力的关系及其对食管癌化疗患者预后的影响[J].肿瘤药,2012,2(1): 37-39
Wu Zhi-ning. The influence of CXCR4 expression on the invasion of Eca109 cell lines and the prognosis of the patients with esophageal squamous cell cancer[J]. Anti-Tumor Pharmacy, 2012,2(1):37-39
- [10] 张晓东.食管癌化学治疗现状[J].癌症进展杂志,2007,5(1):13-17
Zhang Xiao-dong. Chemical treatment of esophageal carcinoma [J]. Journal of Cancer Progression, 2007,5(1): 13-17
- [11] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. Curt Pharm Des, 2006,12(3):273-286
- [12] Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance [J]. J Pathol, 2005,205(2):275-292
- [13] Shi H, Lu D, Shu Y, et al. Expression of multidrug resistance related proteins P-glycoprotein,glutathione- s-transferases, Topoisomerase- and lung resistance protein in primary gastric cardiac adenocarcinoma [J]. Cancer Invest, 2008, 26 (4): 344-351
- [14] Depeille P, Cuq P, Passagne I, et al. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance [J]. Br J Cancer, 2005,93 (2): 216-223
- [15] 李建辉,侯东祥,郭党学,等. MRP 和 LRP 的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系 [J]. 西安交通大学学报(医学版),2005, 26(4): 377-379
Li Jian-hui, Hou Dong-xiang, Guo Dang-xue, et al. Relationship between expression of MRP,LRP and clinical pathological features in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2005,26(4):377-379
- [16] 顾琳慧,冯建国,钱丽娟,等.食管鳞癌组织中 ToPo 和 MRP 的表达及临床意义[J].中华危重症医学杂志:电子版,2011,4(1):31-34
Gu Lin-hui, Feng Jian-guo, Qian Li-juan, et al. Expressions and significances of topoisomerase and multidrug resistance-associated protein in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Chin J Crit Care Med(Electronic Edition), 2011,4(1):31-34
- [17] 田文平,郭俊超.多药耐药相关蛋白 MRP 在胰腺癌细胞中的表达及意义[J]. 青海医学院学报,2009, 30(3): 169-172
Tian Wen-ping, Guo Jun-chao. Expression and functional significance of multidrugresistance-associated protein in pancreatic adenocarcinoma cell[J]. Journal of Qinghai medical college, 2009,30(3):169-172
- [18] Smitherman PK, Townsend AJ, Kute TE, Morrow CS. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A 1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004,308:260-267
- [19] Mattila R, Alanen K, Syrjanen S. Immunohistochemical study on topoisomerase alpha, Ki-67 and Cytokeratin-19 in oral lichen planus lesions[J]. Arch Dermatol Res, 2007, 298 (8): 381-388
- [20] Ikuta K, Takemura K, Sasaki K, et al. Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells[J]. Biol Pharm Bull, 2005,28(4):707-712