

• 论 著 •

宫颈癌中耐药基因的表达及其临床意义

高 波¹, 李海平¹, 陶建蜀², 张吉才^{1△}, 余宗涛¹, 李 莉¹

(1. 湖北医药学院附属太和医院, 湖北十堰 442000; 2. 贵阳医学院, 贵州 550000)

摘要:目的 探讨多药耐药基因 LRP、GST- π 在宫颈癌中的表达特点及临床意义。方法 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 LRP、GST- π 基因在 10 例正常组织和 52 例宫颈癌组织中的 mRNA 表达情况。结果 在宫颈癌组织中 LRP、GST- π 的阳性率表达分别为 67.3% 和 59.6%。10 例正常组织中 LRP 不表达, GST- π 表达 1 例。宫颈癌组织中 LRP、GST- π 的表达高于正常组织($P < 0.05$)。两者的表达均与患者的淋巴转移、肿瘤分化程度、临床分期无关($P > 0.05$)。LRP、GST- π 之间的表达无相关性。结论 LRP、GST- π 在宫颈癌中较高的阳性率表达可能共同参与宫颈癌对顺铂的固有耐药机制, 为协助临床选择化疗方案可能具有一定的指导意义。

关键词: 宫颈肿瘤; 抗药性, 多药; 聚合酶链反应; 耐药基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)18-2049-02

Expression and clinical significance of drug resistance gene in cervical cancer

Gao Bo¹, Li Hai ping¹, Tao Jianshu², Zhang Jicai^{1△}, Yu Zongtao¹, Li Li¹

(1. Taihe Hospital Affiliated to Hubei Medical University, Shiyan Hubei 442000, China;

2. Guiyang Medical University, Guiyang 550000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of lung resistance protein(LRP) and glutathione-S-transferase- π (GST- π) gene in cervical cancer. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was performed to examine the expression of LRP and GST- π in 52 cases of cervical cancer tissue and 10 cases of normal tissue. **Results** The positive rates of LRP and GST- π expression in cervical cancer tissues were 66.7% and 59.5%, respectively. LRP could not be detected in all normal cervical tissues and GST- π could be observed in 1 case of normal cervical tissue. The expression level of LRP and GST- π in cervical cancer tissues was significantly higher than that in normal cervical tissues($P < 0.05$). The expression of LRP and GST- π were not correlated with lymph node metastasis, tumor differentiation and clinical stage($P > 0.05$). The expression of LRP and GST- π was not correlated with each other. **Conclusion** Expression level of LRP and GST- π might be correlated with intrinsic resistance of cervical cancer, and detection of LRP and GST- π expression could guide the selection of clinical treatment plan and the individualized chemotherapy for patients with cervical cancer.

Key words: uterine cervical neoplasms; drug resistant multiple; polymerase chain reaction; resistance gene

化疗作为宫颈癌综合治疗的重要手段之一, 越来越受到重视, 但是宫颈癌多药耐药性的出现却大大限制了化疗的疗效, 从而导致化疗失败。多药耐药(multidrug resistance, MDR)是造成化疗失败的重要原因, 常常导致化疗效果不理想。目前 MDR 的研究重点放在 MDR 基因的转录调控上。为了解 MDR 基因在宫颈癌耐药中的作用, 本研究采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对 MDR 相关基因, 肺耐药相关蛋白(lung resistance-associated protein, LRP)、胎盘型谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-transferase- π , GST- π)的表达与宫颈癌病理特征之间的关系进行初步的研究, 从基因转录水平探讨宫颈癌耐药的机制, 从而为提高宫颈癌化疗效果提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集湖北医药学院附属太和医院 2009 年 9 月至 2010 年 6 月经病理证实为宫颈癌患者的癌组织标本 52 例。患者年龄 35~64 岁, 平均年龄为 46.4 岁。其中高分化癌 14 例, 中分化癌 16 例, 低分化癌 22 例; 鳞癌 43 例, 腺癌 9 例; 临床分期采用国际妇产科联盟(FIGO)1995 年修订的临床分期标准: I 期 12 例, II 期 24 例, III 期 16 例; 其中 13 例伴盆腔淋巴结转移。宫颈癌患者取材前均未接受过放化疗。另取正

常宫颈组织 10 例, 均为因子宫肌瘤行子宫全切且经病理证实为非宫颈癌组织。标本收集后液氮中保存备用。

1.2 仪器与试剂 Reverse Transcription System A3500、Trizol Reagent(Promega); PCR 试剂(上海生工); PE7500(ABI 公司); G-BOX 紫外凝胶成像系统(Gene 公司); ND-2000 微量核酸定量仪(美国 NanoDrop 公司); DNA mark(上海生工); TG-16WS 台式高速冷冻离心机(日立公司)。

1.3 LRP mRNA 引物合成^[1] 5'-GTC TTC GGG CCT GAG CTG GTG TCG-3'; 5'-CTT GGC CGT CTC TTG GGG GTC CTT-3'(北京赛百盛公司), 扩增产物 240 bp。

1.4 GST- π mRNA 引物合成^[2] 5'-CCA GAA CCA GGG AGG CAA GA-3'; 5'-GAG GCG CCC CAC ATA TGC T-3'(北京赛百盛公司), 扩增产物 325 bp。

1.5 RNA 提取并逆转录为 cDNA 从液氮中取出组织后, 立即碾碎。严格按照 Trizol 说明书提取组织中 RNA, 提取的 RNA 经微量核酸定量仪测定其浓度和纯度后溶于无 RNA 酶的双蒸水中, 用逆转录试剂盒 A3500 逆转录为 cDNA, 用无 RNA 酶的双蒸水稀释 cDNA 至 100 μ L, 备用。

1.6 PCR 扩增体系 2 mmol/L dNTP 1.5 μ L、25 mmol/L Mg²⁺ 2.4 μ L、5 U/ μ L Taq 0.3 μ L、10 \times Buffer 3 μ L、Sample 5

△ 通讯作者, E-mail: jicaizhang@hotmail.com。

μL、上下游引物各 2 μL、cDNA 5 μL,用无菌水补齐体积共 30 μL。反应条件:94 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;最后一循环为 72 ℃ 8 min。

1.7 结果判断 扩增产物取 10 μL 用 2% 的琼脂糖电泳,溴化乙啶染色。紫外凝胶成像系统观察并照像。在 240、325 bp 处出现目的条带即为阳性。

1.8 统计学处理 用 SPSS 统计学软件进行结果分析。

2 结 果

2.1 LRP、GST-π mRNA 在正常宫颈组织和宫颈癌组织中的表达 LRP 和 GST-π 在宫颈癌组织中的表达分别为 35 (67.3%)、31(59.6%);在正常宫颈组织中的表达分别为 0、1 (10%)。两者在宫颈癌组织中的表达明显高于正常宫颈组织 ($P < 0.05$),差异有统计学意义。见表 1。

表 1 耐药基因在正常组织和癌组织中的表达情况

类别	例数 (n)	LRP		GST-π	
		阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)
宫颈癌组织	52	35	17	31	21
正常宫颈组织	10	0	10	1	9

2.2 LRP、GST-π mRNA 的表达和宫颈癌临床病理特征之间的关系 经统计学处理,LRP、GST-π mRNA 的表达与宫颈癌的组织学分型、FIGO 分期、分化程度、有无淋巴转移等因素无相关性 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 耐药基因在宫颈癌中的表达与临床病理特征的关系

病理特征	例数 (n)	LRP				GST-π			
		阳性	阴性	χ ² 值	P 值	阳性	阴性	χ ² 值	P 值
组织学分型									
鳞癌	43	29	14		26	17			
腺癌	9	6	3	0.002	0.964	5	4	0.075	0.785
FIGO 分期									
I 期	12	6	6		7	5			
II 期	24	16	8		14	10			
III 期	16	13	3	3.052	0.217	10	6	0.080	0.961
分化程度									
高中分化	30	22	8		21	9			
低分化	22	13	9	1.170	0.279	10	12	3.176	0.075
淋巴转移									
有	13	6	7		9	4			
无	39	29	10	3.525	0.060	22	17	0.666	0.415

2.3 耐药基因在宫颈癌中共同表达情况 在所有癌组织标本中,两者共同表达的有 10 例,占 19.2%。但两种耐药基因之间的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

肿瘤的 MDR 是指肿瘤细胞可耐受具有不同结构、功能及杀伤机制的药物作用,是肿瘤化疗中的常见现象,而且一旦产生耐药机制,常可对非同一种类型的多种结构、细胞靶点和作用机制迥然不同的抗肿瘤药物同时产生耐药性,所以 MDR 是导致化疗失败的主要原因^[3]。已知的 MDR 机制与药泵分子的

活性和表达水平、药物解毒功能、DNA 损伤修复能力、细胞的凋亡途径、肿瘤细胞 pH 值等有关。目前 MDR 的研究重点放在 MDR 基因的转录调控上。本研究运用 RT-PCR 技术检测对宫颈癌常用化疗药物(顺铂)容易产生耐药的两种基因(LRP、GST-π)在宫颈癌中的表达,并探讨其在宫颈癌对顺铂原发性耐药中的作用。

LRP 是 1993 年在 1 株无 P-糖蛋白表达的多种药物耐药的肺癌细胞株中发现的一种与多药耐药有关的蛋白,因在肺癌中首先被发现,故命名为肺耐药蛋白^[4]。LRP 表达的增加能使肿瘤细胞对传统化疗药物(如阿霉素、顺铂、长春新碱、丝裂霉素等)耐药,并主要介导癌细胞对顺铂的耐药^[5]。

谷胱甘肽(GSH)系统是细胞内关键的解毒部分,肿瘤细胞借助谷胱甘肽 S 转移酶(GST)催化抗肿瘤药物与 GSH 结合,然后由名为 GX-X 的转运蛋白将其排除细胞外,从而保护细胞免受抗肿瘤药物引起的损伤。GST 包括 α、μ、π、ε、θ 5 种同工酶,其中 GST-π 的活性占 90%,是活性表达最高的一种,与肿瘤细胞的 MDR 现象也最为密切。其表达的增加主要介导烷化剂、铂类、丝裂霉素类等药物的耐药^[6-7]。

本研究采用 RT-PCR 检测了正常组织和癌组织中耐药基因的表达水平,结果显示 LRP mRNA 和 GST-π mRNA 在癌组织中的表达明显高于正常组织,在癌组织中是呈高表达的状态,并且所有患者未进行放疗和化疗,说明 LRP、GST-π 可能共同参与了宫颈癌的固有耐药过程。因为两者的高表达都可以介导肿瘤细胞对顺铂的耐药,且顺铂是宫颈癌化疗常用药物,提示宫颈癌对顺铂的原发性耐药可能与 LRP、GST-π 的过表达有关。这与阮永华等^[8]认为 LRP 可作为宫颈鳞癌对铂类化疗药物的耐药标志物的观点相似。并且 LRP、GST-π 的表达与宫颈癌的组织学分型、临床分期、分化程度及淋巴转移无明显相关,提示 LRP、GST-π 的过表达是独立于宫颈癌病理特征之外的因素,临床病理因素的相关指标可能只代表宫颈癌的恶性程度,而并不能反映其对化疗药物的耐受能力,并且可能需与其他因素共同作用才能引起肿瘤细胞对某些化疗药物产生耐药。

部分正常组织中也存在 GST-π 的表达,说明其表达在正常宫颈组织中可能起一种自我保护的功能。人体正常组织耐药基因应为不表达或很少表达。所以患者在运用以顺铂为主要化疗药物治疗前若出现 LRP 和(或)GST-π 基因的高表达,应尽量避免铂类药物或考虑联合使用方案(如放疗、热疗等)。若在化疗过程中出现 LRP 和(或)GST-π 基因的高表达,则应该及时更换化疗方案。张凡等^[9]认为 GST-π 的表达可作为宫颈癌患者的一项独立的预后指标,并且其阳性表达预示着预后不良。而 Konishi 等^[10]在分析了 GST-π 的表达与宫颈癌的化疗反应后,发现其表达与宫颈癌的化疗反应无关。所以 GST-π 与宫颈癌的获得性耐药及与预后的关系仍需进一步研究。LRP、GST-π 基因在宫颈癌中存在着 19.0% 的共表达,提示两种耐药基因的表达可能受某些共同因子的调控,但机制也需要进一步的研究。

既然耐药基因的过度表达是引起肿瘤对化疗药物耐药的根本原因,那么降低机体内耐药基因的表达,从而逆转耐药的发生就成为了可能。楼江燕等^[11]用靶向 MDR1 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)转染癌细胞后 24 h 可以观察到 MDR1 基因的 mRNA 和蛋白表达产物 P-gp 均显著降低。高国兰等^[12]在体外实验中发现,运用 RNA 干扰技术能够有效逆转卵巢癌细胞的耐药。这些研究为实(下转第 2054 页)

- tumor invasion and metastasis[J]. *J Cancer Mol*, 2008, 3(6): 165-168.
- [5] 丁睿, 顾沈阳, 王业华, 等. 膀胱移行细胞癌 VEGF 的表达及其意义[J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(3): 41-43.
- [6] 陈书玲, 张凡, 常永霞, 等. 细胞黏附分子表达与子宫颈上皮内瘤变的关系[J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(4): 137-142.
- [7] Liu YJ, Yan PS, Li J, et al. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer[J]. *World J Gastroenterology*, 2005, 11(42): 6601-6606.
- [8] 仲宁, 郑世营, 陈锁成, 等. CD44v6 在肺癌组织中的表达及意义[J]. *江苏医药*, 2005, 31(3): 164-166.
- [9] Diaz LK, Zhou X, Wright ET, et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(9): 3309-3314.
- [10] Lin Y, Buckhault PJ, Lee JR, et al. Association of the actin-binding protein transgelin with lymph node metastasis in human colorectal cancer[J]. *Neoplasia*, 2009, 11(9): 864-873.
- [11] Qi Y, Chiu JF, Wang L, et al. Comparative proteomic analysis of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Proteomics*, 2005, 5(11): 2960-2971.
- [12] 周焯, 朱慰祺, 师英强. CD44s 和 CD44v6 的 mRNA 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2006, 22(11): 509-511.
- [13] 邵小华, 邵玉峰, 李旭, 等. CD44v6 在原发性肝癌中的表达及其意义[J]. *安徽医学*, 2005, 9(3): 187-188.
- [14] Klatt T, Seligson DB, Rao JY, et al. Absent CD44v6 expression is an independent predictor of poor urothelial bladder cancer outcome[J]. *J Urol*, 2010, 183(6): 2403-2408.
- [15] Miyoshi T, Konda K, Hino H, et al. The expression of the CD44 variant exon6 is associated with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(18): 1289-1297.
- [16] Saito H, Tsujitani S, Katano K, et al. Serum concentration of CD44 variant 6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma[J]. *Cancer*, 1998, 83(6): 1094-1098.
- [17] 徐峰, 刘华, 许春进, 等. CD44v6 和 MMP-9 及 P53 的表达与胃癌患者淋巴转移的关系——附 60 例检测报告[J]. *新医学*, 2005, 35(3): 153-155.
- [18] Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, et al. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlation with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer[J]. *Cancer*, 1998, 79(6): 256-262.
- [19] Li H, Guo L, Li J, et al. Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers; relevance with tumor progression[J]. *Oncol*, 2000, 17(8): 927-932.
- [20] 刘小荣, 张笠, 王勇平. 实时荧光定量 PCR 技术的理论研究及其医学应用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(2): 234-237.
- [21] 王颖智, 杨翠霞, 何怡青. 实时荧光定量 PCR 检测 CD44 和 RHAMN 在胃肠肿瘤中的表达研究[J]. *检验医学*, 2008, 23(44): 509-511.
- [22] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(8): 148-155.

(收稿日期: 2011-03-22)

(上接第 2050 页)

体肿瘤耐药逆转的运用提供了实验依据, 值得进一步的研究。

综上所述, 未经治疗的宫颈癌组织中存在多药耐药基因 (LRP、GST- π) 的高表达和共表达, 可能是导致宫颈癌固有耐药和 MDR 的原因之一。宫颈癌的多药耐药是多基因、多因素共同参与, 并通过多途径来完成的。化疗前联合检测宫颈组织中多药耐药基因的表达情况可以预测肿瘤细胞对化疗的敏感性, 对化疗前药物的选择和临床应用有着积极的指导意义。一方面, 可以预测化疗的疗效和预后的判断; 另一方面, 可依据其耐药机制来指导化疗, 制定有效的个体化疗方案, 并且可根据耐药机制的不同, 运用逆转剂逆转 MDR, 从而强化化疗的疗效, 对延长宫颈癌患者的生存期有一定实用价值。

参考文献

- [1] Huh HJ, Park CJ, Jang S, et al. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia[J]. *Korean Med Sci*, 2006, 21(2): 253-258.
- [2] Shao J, Stapleton PL, Lin YS, et al. Cytochrome p450 and glutathione s-transferase mRNA expression in human fetal liver hematopoietic stem cells[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(1): 168-175.
- [3] Perez TR. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anticancer drug treatment[J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1859-1876.
- [4] Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, et al. Overexpression of a Mr(110,000) vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(22): 1475-1479.
- [5] Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, et al. Vaults: A ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7458-7467.
- [6] 张燕, 金先庆, 赵珍珍, 等. 5 种耐药基因在成人恶性肿瘤中的表达特点[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(10): 1023-1027.
- [7] David J. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010, 75(3): 173-234.
- [8] 阮永华, 魏万里, 梁正南, 等. 宫颈癌化疗前后多药耐药基因产物表达的比较研究[J]. *肿瘤防治杂志*, 2002, 9(4): 398-401.
- [9] 张凡, 常永霞, 张九鸿, 等. 65 例早期宫颈癌耐药基因产物与临床预后关系的初步探讨[J]. *现代妇产科进展*, 2006, 15(4): 261-264.
- [10] Konishi I, Nanbu K, Mandai M, et al. Tumor response to neoadjuvant chemotherapy correlates with the expression of P-glycoprotein and PCNA but not GST-pi in the tumor cells of cervical carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 1998, 70(3): 365.
- [11] 楼江燕, 芝兰, 郑莹, 等. RNA 干扰技术逆转卵巢癌上皮性癌细胞多药耐药的研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2006, 41(6): 413-416.
- [12] 高国兰, 涂开家, 刘福军. 卵巢癌多药耐药基因的表达及其逆转[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2010, 15(10): 870-873.

(收稿日期: 2011-07-21)