

本文引用:王雷,王煜霞,薛会朝.多药耐药相关蛋白在原发性肝癌患者外周血淋巴细胞及癌组织中的表达[J].
新乡医学院学报,2017,34(6):538-541. DOI:10.7683/xyxyxb.2017.06.024.

【临床研究】

多药耐药相关蛋白在原发性肝癌患者外周血淋巴细胞及癌组织中的表达

王雷¹,王煜霞²,薛会朝¹

(1.新乡医学院第一附属医院普外科,河南卫辉 453100;2.新乡医学院基础医学院病理生理学教研室,河南新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨多药耐药相关蛋白 P-糖蛋白(P-gp)、肺耐药蛋白(LRP)和谷胱甘肽巯基转移酶- π (GST- π)在原发性肝癌(HCC)患者外周血淋巴细胞及癌组织中的表达。**方法** 选择2014年1月至2015年1月在新乡医学院第一附属医院经影像学检查及病理学确诊的HCC患者69例(HCC组),采用免疫组织化学染色检测3种耐药相关蛋白P-gp、LRP和GST- π 在HCC患者外周血淋巴细胞及癌组织中的表达水平;另选择40例健康人作为对照组,检测外周血淋巴细胞中P-gp、LRP和GST- π 表达水平。**结果** P-gp、LRP及GST- π 在HCC组患者外周血淋巴细胞中的阳性表达率均高于对照组($P < 0.05$)。P-gp、LRP及GST- π 在外周血淋巴细胞和癌组织中的阳性表达率比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。不同TNM分期HCC患者外周血淋巴细胞与癌组织中P-gp、LRP及GST- π 阳性表达率比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 多药耐药相关蛋白P-gp、LRP和GST- π 在HCC患者外周血淋巴细胞及癌组织中的表达一致,可以使用外周血淋巴细胞检测多药耐药相关蛋白。

关键词: 原发性肝癌;外周血淋巴细胞;多药耐药蛋白;P-糖蛋白;肺耐药蛋白;谷胱甘肽巯基转移酶- π

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)06-0538-04

Expression of multidrug resistance related proteins of P-glycoprotein, lung resistance protein and glutathione S-transferase- π in peripheral blood lymphocytes and cancer tissues in patients with hepatocellular carcinoma

WANG Lei¹, WANG Yu-xia², XUE Hui-chao¹

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 2. Department of Pathophysiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of multidrug resistance related proteins of P-glycoprotein (P-gp), lung resistance protein (LRP), and glutathione S-transferase- π (GST- π) in peripheral blood lymphocytes and cancer tissues in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Sixty-nine HCC patients who were diagnosed by imaging detection and pathology in the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from January 2014 to January 2015 were selected. The expression levels of P-gp, LRP, and GST- π in peripheral blood lymphocytes and cancer tissues were detected by immunohistochemical staining method. Forty healthy people were chosen as control group, and the expression levels of P-gp, LRP and GST- π in peripheral blood lymphocytes were detected. **Results** The positive expression rates of P-gp, LRP and GST- π in peripheral blood lymphocytes of patients in the HCC group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the positive expression rates of P-gp, LRP and GST- π between peripheral blood lymphocytes and cancer tissues of patients in HCC group ($P > 0.05$). There was no significant difference in positive expression rates of P-gp, LRP and GST- π between peripheral blood lymphocytes and cancer tissues of HCC patients with different TNM stage ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression of multidrug resistance related protein of P-gp, LRP and GST- π in peripheral blood lymphocytes and cancer tissues in patients with HCC is consistent. The peripheral blood lymphocytes can be used to detect the expression of multidrug resistance related protein.

Key words: hepatocellular carcinoma; peripheral blood lymphocytes; multidrug resistance protein; P-glycoprotein; lung resistance protein; glutathione S-transferase- π

DOI:10.7683/xyxyxb.2017.06.024

收稿日期:2016-04-18

基金项目:河南省教育厅自然科学基金资助项目(编号:13A320854)。

作者简介:王雷(1977-),男,河南唐河人,硕士,主治医师,研究方向:肝癌多药耐药。

通信作者:薛会朝(1971-),男,河南滑县人,硕士,副教授,研究方向:消化道肿瘤诊治;E-mail:xuehuichao@126.com。

肝癌是我国常见的消化系统恶性肿瘤,病死率仅次于胃癌和食管癌^[1]。多药耐药是肝癌化学治疗失败、病死率居高不下的主要原因^[2-3]。有关肝癌多药耐药发生机制的研究多采用病理组织标本^[4],针对外周血淋巴细胞的多药耐药相关蛋白检测报道较少。因此,本研究对69例原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者外周血淋巴细胞和癌组织中多药耐药相关蛋白P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)和谷胱甘肽巯基转移酶- π (glutathione S-transferase- π , GST- π)进行检测,探讨多药耐药蛋白P-gp、LRP和GST- π 在外周血淋巴细胞与癌组织中表达的关系,以期为肝癌临床诊断与治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2015年1月至2016年1月在新乡医学院第一附属医院普外科住院的HCC患者69例(HCC组),男39例,女30例,中位年龄47.0岁(22~75岁),术后病理检查均证实为肝细胞癌;TNM分期:I期17例,II期18例,III期20例,IV期14例;肝肾功能及血常规均在正常范围内。随机选择40例体检健康者作为对照组,其中男23例,女17例,中位年龄45.5岁(30~60岁)。2组对象的性别、中位年龄比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 主要试剂及仪器 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)购自北京金桥生物技术有限公司,人外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,人P-gp、LRP和GST- π 酶联免疫吸附试验检测试剂盒购自生工生物工程上海(股份)有限公司,鼠抗人P-gp、LRP和GST- π 单克隆抗体及SP免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色剂试剂盒均购于北京博奥森生物技术有限公司。高速冷冻离心机购自日立(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 提取外周血淋巴细胞 使用一次性抗凝血抽血管(提前加入肝素抗凝)抽取2组受试者外周静脉血5 mL,室温保存。向装有2 mL血样的真空管中加入2 mL PBS混匀,缓慢将混匀的血样PBS混合液加入到装有2 mL淋巴细胞分离液的无菌离心管中(血样混合液尽量位于提取液上层),20℃下

1 500 r·min⁻¹离心15 min。吸去上层血浆,收集上中层液面处白色云雾状狭窄带即为淋巴细胞层。用等量的PBS稀释收集到的淋巴细胞,再次20℃下2 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清液,用微量离心管将底部白色沉淀涂在载玻片上。

1.3.2 免疫组织化学法检测外周血淋巴细胞中P-gp、LRP和GST- π 的表达 载玻片于体积分数3%过氧化氢去离子水中避光浸泡8 min,0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH=7.2)冲洗2次,每次5 min;载玻片放入柠檬酸缓冲液(0.01 mol·L⁻¹, pH=6.0)的水浴锅中修复20 min,冷却至室温,PBS洗2次,每次5 min。体积分数10%正常羊血清封闭,37℃孵育15 min。加入一抗,4℃过夜。PBS洗2次,每次5 min;加入二抗,37℃孵育1 h。PBS洗2次,每次5 min,滴加链霉亲和素辣根过氧化物酶复合物(1:200),37℃孵育50 min;PBS洗2次,每次5 min。DAB显色,镜下观察显色强度,适当终止,流水冲洗。苏木精复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

1.3.3 免疫组织化学法检测HCC组织中P-gp、LRP和GST- π 的表达 HCC组织标本经甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μ m连续切片,梯度乙醇脱蜡水化,其余步骤按照免疫组织化学试剂盒说明书进行,DAB显色,苏木精复染,中性树胶固封。使用已知阳性片做阳性对照,用PBS代替一抗做阴性对照。

1.4 判定标准 P-gp主要表达于细胞膜,细胞核也有弱表达;LRP主要表达于细胞质,GST- π 在细胞膜和细胞质均有表达。每张切片在高倍镜下($\times 400$)随机计数10个视野的癌细胞,根据肿瘤细胞染色程度及阳性细胞所占百分数进行综合评分。判断标准:阳性细胞数<10%且染色极浅为阴性(-),阳性细胞数 $\geq 10\%$ 且染色呈淡黄色、黄色或棕黄色为阳性(+).

1.5 统计学处理 应用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析,计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组受试者外周血淋巴细胞中P-gp、LRP及GST- π 表达比较 结果见表1。HCC组患者外周血淋巴细胞中P-gp、LRP及GST- π 的阳性表达率均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 2 组受试者外周血淋巴细胞中 P-gp、LRP 及 GST-π 表达比较

Tab.1 Comparison of the expression of P-gp, LRP and GST-π in peripheral blood lymphocytes between HCC group and control group

组别	n	P-gp		χ^2	P	LRP		χ^2	P	GST-π		χ^2	P
		- /例(%)	+ /例(%)			- /例(%)	+ /例(%)			- /例(%)	+ /例(%)		
对照组	40	31(77.50)	9(22.50)	14.93	<0.05	35(87.50)	5(12.50)	44.10	<0.05	31(77.50)	9(22.50)	36.20	<0.05
HCC 组	69	27(39.13)	42(60.87)			15(21.74)	54(78.26)			13(18.84)	56(81.16)		

2.2 HCC 组患者外周血淋巴细胞与癌组织中 P-gp、LRP 及 GST-π 表达比较 结果见表 2。HCC 患者外周血淋巴细胞和癌组织中 P-gp、LRP 及 GST-

π 的阳性表达率比较差异均无统计学意义 (P > 0.05)。

表 2 HCC 患者外周血淋巴细胞与癌组织中 P-gp、LRP、GST-π 表达比较

Tab.2 Comparison of the expression of P-gp, LRP and GST-π in peripheral blood lymphocytes and cancer tissues in HCC patients

组别	n	P-gp		χ^2	P	LRP		χ^2	P	GST-π		χ^2	P
		- /例(%)	+ /例(%)			- /例(%)	+ /例(%)			- /例(%)	+ /例(%)		
外周血淋巴细胞	69	27(39.13)	42(60.87)	1.15	>0.05	15(21.74)	54(78.26)	2.56	>0.05	13(18.84)	56(81.16)	0.49	>0.05
肝癌组织	69	21(30.43)	48(69.57)			8(11.59)	61(88.41)			12(17.40)	57(82.60)		

2.3 HCC 患者耐药蛋白表达与 TNM 分期的关系 结果见表 3。不同 TNM 分期 HCC 患者外周血淋

巴细胞与癌组织中 P-gp、LRP 及 GST-π 阳性表达率比较差异均无统计学意义 (P > 0.05)。

表 3 HCC 患者耐药耐药蛋白表达与 TNM 分期关系

Tab.3 Correlation of multidrug resistance protein expression with HCC patients in different TNM stages

TNM 分期	n	P-gp		χ^2	P	LRP		χ^2	P	GST-π		χ^2	P
		+ /例(%)	- /例(%)			+ /例(%)	- /例(%)			+ /例(%)	- /例(%)		
I 期	17			0.118	>0.05			1.121	>0.05			0.119	>0.05
外周血淋巴细胞		8(47.06)	9(52.94)			9(52.94)	8(47.06)			10(58.82)	7(41.18)		
肝癌组织		9(52.94)	8(47.06)			12(70.59)	5(29.41)			9(52.94)	8(47.06)		
II 期	18			0.468	>0.05			0.232	>0.05			0.177	>0.05
外周血淋巴细胞		10(55.56)	8(44.44)			16(88.89)	2(11.11)			15(83.33)	3(16.67)		
肝癌组织		12(66.67)	6(33.33)			15(83.33)	3(16.67)			14(77.78)	4(22.22)		
III 期	20			0.125	>0.05			1.111	>0.05			0.229	>0.05
外周血淋巴细胞		14(70.00)	6(30.00)			17(85.00)	3(15.00)			18(90.00)	2(10.00)		
肝癌组织		15(75.00)	5(25.00)			19(95.00)	1(5.00)			17(85.00)	3(15.00)		
IV 期	14			0.848	>0.05			2.154	>0.05			0.373	>0.05
外周血淋巴细胞		10(71.43)	4(28.57)			12(85.71)	2(14.29)			13(92.86)	1(7.14)		
肝癌组织		12(85.71)	2(14.29)			14(100.00)	0(0.00)			12(85.71)	2(14.29)		

3 讨论

肝癌是临床上常见的消化系统恶性肿瘤之一，严重威胁人们的健康。化学治疗主要应用于术后辅助治疗及术后复发、转移或晚期不能切除的姑息治疗，有时化学治疗也作为术前治疗手段以提高手术切除率^[5]。肝癌细胞多药耐药性是肝癌患者化学治疗失败率较高的主要原因^[6]。因此，了解肝癌耐药基因的表达式，对合理选择肝癌患者的化学治疗方案、判断预后及寻找有效逆转肝癌耐药的药物及方法大有裨益。

P-gp、LRP 和 GST-π 是肝癌耐药机制中研究较多的多药耐药相关蛋白^[7]。P-gp 是三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合的盒式转运蛋白超家族成员之一，通过消耗 ATP 将药物从细胞膜泵到细胞间隙，导致细胞内化学治疗药物浓度下降，细胞毒性作用下降或者丧失，最终导致耐药^[8]。LRP 主要位于细胞质，其作用机制类似于穹窿体主蛋白^[9]，LRP 将化学治疗药物转运至细胞质囊泡内，以胞吐方式将抗癌药物排出细胞，导致药物有效浓度下降产生耐药^[10]。LRP 主要介导阿霉素、铂类、柔红霉素、烷化剂等的耐药，参与早期耐药。GST-π 在细胞膜、细

胞质均有表达,GST- π 通过增加亲电子类药物水溶性加速药物外排、清除药物产生的自由基、隔绝脂质过氧化等作用产生耐药。

本研究发现,健康人外周血淋巴细胞中 P-gp、LRP 和 GST- π 也有阳性表达,但阳性表达率低于 HCC 患者,差异有统计学意义。进一步研究发现,P-gp、LRP、GST- π 在 HCC 患者外周血淋巴细胞和肝癌组织中的阳性表达率比较差异均无统计学意义;不同 TNM 分期 HCC 患者外周血淋巴细胞与肝癌组织中 P-gp、LRP 和 GST- π 阳性表达率比较差异均无统计学意义。以上结果提示多药耐药蛋白 P-gp、LRP、GST- π 在 HCC 患者外周血淋巴细胞和癌组织中的表达具有高度一致性,通过检测 HCC 患者外周血淋巴细胞多药耐药蛋白表达,可辅助医生判断患者对化学治疗药物的敏感程度及相关预后,且方法简便、易行、可重复性好,给患者带来的痛苦小。但本研究样本量较小,还需要临床大样本研究进一步证实组织学和外周血检测多药耐药蛋白的相关性和差异性。

参考文献:

[1] NIU Z S,NIU X J,WANG M. Management of hepatocellular carcinoma:predictive value of immunohistochemical markers for postoperative survival[J]. *World J Hepatol*,2015,7(1):7-27.

[2] 王雷,王煜霞,陈丽平,等. 原发性肝癌中多药耐药蛋白谷胱甘肽转移酶及拓扑异构酶 II 的表达与临床病理指标的相关性

[J]. 新乡医学院学报,2015,32(7):626-628.

[3] 唐尚军. ATP 结合盒转运体在肝癌多药耐药中的研究进展[J]. 医学综述,2014,20(8):1388-1391.

[4] 颜昕,阮雯雯,王效民,等. 多药耐药对肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭活性、耐药机制及丝裂原活化蛋白激酶表达的影响[J]. 肿瘤,2012,32(7):507-515.

[5] 王吉. HBX 蛋白介导的自噬在肝癌多药耐药中的作用及机制研究[D]. 苏州:苏州大学,2012.

[6] CHENG L,LUO S,JIN C, *et al.* FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Cell Death Dis*,2013,4(11):1-10.

[7] HU W Q,PENG C W,LI Y. The expression and significance of P-glycoprotein, lung resistance protein and multidrug resistance-associated protein in gastric cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2009,28(1):144-150.

[8] TROCK B J, LEONESSA F, CLARKE R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance[J]. *J Natl Cancer Inst*,1997,89(13):917-931.

[9] KRISHNAKUMAR S, MALLIKARJUNA K, DESAI N, *et al.* Multidrug resistant proteins: P-glycoprotein and lung resistance protein expression in retinoblastoma[J]. *Br J Ophthalmol*,2004,88(12):1521-1526.

[10] HUANG W, MAO Y, ZHAN Y, *et al.* Prognostic implications of survivin and lung resistance protein in advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy[J]. *Oncol Lett*,2016,11(1):723-730.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 537 页)

[2] 蔡丽群,黄河,池伟,等. 电针治疗功能性肛门直肠痛 35 例[J]. 中国针灸,2016,36(1):41-42.

[3] IHNÁT P,VÁVRA P,GUŇKOVÁ P, *et al.* 3D high resolution anorectal manometry in functional anorectal evaluation [J]. *Rozhl Chir*,2014,93(11):524-529.

[4] 薛雅红,丁曙晴. 功能性肛门直肠痛患者盆底表面肌电的检测及临床意义[J]. 实用医学杂志,2012,28(11):1803-1806.

[5] 李建玉,杨秀环,董文芳,等. 右美托咪定对瑞芬太尼持续输注下腹腔镜胆囊切除术患者机械痛觉阈值的影响[J]. 实用医学杂志,2015,31(21):3574-3577.

[6] 丁康. 针刺结合生物反馈治疗 62 例功能性肛门直肠痛疗效观察[J]. 中医药信息,2013,30(2):78-80.

[7] 欧阳彦,潘晓霞,王朝晖,等. SF-36 量表评估 Fabry 病患者生活质量的研究[J]. 中华肾脏病杂志,2014,30(3):201-205.

[8] ARMAÑANZAS L, ARROYO A, RUIZ-TOVAR J, *et al.* Chronic idiopathic anal pain: results of a diagnostic-therapeutic protocol in a colorectal referral unit[J]. *Cir Esp*,2015,93(1):34-38.

[9] TAKANO S, ARAKAWA H. Bilateral posterior tibial nerve stimulation for functional anorectal pain: short term outcome [J]. *Int J Colorectal Dis*,2016,31(5):1053-1054.

[10] 赵雄碧,徐俊涛. 中西医结合治疗功能性肛门直肠痛 39 例临床观察[J]. 浙江中医杂志,2015,50(8):597.

[11] 柳凯伦,王志民. 骶神经电刺激在治疗肛门直肠疾病中的作用[J]. 中华胃肠外科杂志,2014,17(12):1261-1263.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)