

文章编号:1005-6947(2008)08-0812-04

· 简要论著 ·

MRP-1 及 MRP-2 在肝癌患者外周血和肝组织中表达及意义

毕明俊¹, 李琴², 毕冬松³

(1. 山东省荣成市第二人民医院 外二科, 山东 荣成 264309; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 神经内科, 武汉 430030; 3. 山东大学齐鲁医院 普外一科, 山东 济南 250100)

摘要:目的 探讨多药耐药相关蛋白-1(MRP-1)和 MRP-2 在肝细胞性肝癌患者外周血及肝组织中表达的临床意义。方法 36 名肝癌患者按诊断标准分为 3 组: II 期组($n=12$), III 期组($n=15$)和 IV 期组($n=9$), 用 RT-PCR 法分别检测各组患者肝癌组织、近癌组织、远癌组织及外周血 MRP-1, MRP-2 mRNA 的相对含量。结果 肝癌患者的癌组织、近癌组织、远癌组织及外周血中均可检测到 MRP-1 mRNA 免疫阳性带, 以癌组织(77.8%)和外周血(61.1%)为最高。随着肿瘤分级的增加, MRP-1 mRNA 表达水平逐渐增加, 3 组间差异存在显著性($P < 0.05$)。在患者上述组织和血中, 也可检测到 MRP-2 mRNA 的表达, 亦以癌组织最高(72.2%)。在肝癌 III, IV 期组中, MRP-2 mRNA 的表达水平明显升高, 与相同部位 II 期组比较, 有统计学差异($P < 0.05$)。肝癌患者外周血可见 MRP-2 mRNA 阳性反应带, 但 3 组间差异无显著性($P > 0.05$)。结论 随着临床分期的加重, 肝癌多重耐药现象逐渐增加。外周血与活组织 MRP-1 mRNA 和 MRP-2 mRNA 检测可望成为诊断肝癌、病情分级以及预后判断的指标。它们的表达与多重耐药有关, 但外周血中的浓度不能代表肝脏受损的程度。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 812-815]

关键词: 癌, 肝细胞; MRP-1; MRP-2; 基因表达; RT-PCR

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** B

多药耐药现象(multidrug resistance, MDR)是目前影响肿瘤化疗效果和病人生存期的重要原因。多药耐药相关蛋白(MRP)-1 和 MRP-2 是患者产生多药耐药的重要因素, 但它们在肝癌组织和外周血中的表达^[1], 是否与肝癌的病理分期和预后有关, 目前尚不明了。本文通过观察肝癌患者外周血和肝组织中 MRP-1 和 MRP-2 的表达水平, 以期明确两者的临床意义, 为不同时期肝癌的诊断、治疗和预后提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料及分组

36 例患者均为我院 2003 年 5 月—2007 年 12 月收治的肝癌患者, 均经 B 超、CT 或磁共振显

像(MRI)及活组织检查确诊(按日本采用的分期标准)^[2]。将患者分成 3 组: II 期组 12 例, III 期组 15 例, IV 期组 9 例。组织学类型均为肝细胞性肝癌。3 组在年龄、性别组成、体重指数等方面无显著差异($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 3 组患者一般情况的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	性别		年龄(岁)	体重指数(kg/m ²)
		男	女		
II 期	12	7	5	51.9 ± 4.5	23.4 ± 2.6
III 期	15	8	7	50.4 ± 5.1	25.2 ± 4.2
IV 期	9	5	4	52.6 ± 5.6	24.3 ± 3.0
组间比较		$P > 0.05$		$P > 0.05$	$P > 0.05$

1.2 标本采集

对于有外科手术指征者(20 例), 手术时分别在癌肿中心、近癌组织(癌旁 1.0 cm)、远癌组织(癌旁 4.5 cm)中各取 3 块, 每块约 100 mg; 对于

收稿日期:2008-03-13; 修订日期:2008-06-18。

作者简介:毕明俊,男,山东省荣成市第二人民医院主治医师,主要从事肝胆外科基础和临床方面的研究。

通讯作者:毕明俊 E-mail:liqin1015@yahoo.com.cn

无手术指征者(16例),在B超引导下分别在上述部位经皮肝穿刺获取。外周血为术前禁食12h的空腹血样本。

1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测

取肝脏组织(液氮-80℃保存)30mg和外周血2mL用RNA提取试剂盒分别提取总RNA。用分光光度计检测每个样本的A260/A280值(OD值),均在1.7~2.0,证明RNA样本无蛋白质和DNA污染。用两步法进行RT-PCR反应。

通过Genbank基因数据库查找人的MRP-1,MRP-2和 β -actin基因的mRNA的全基因序列。根据其序列应用Primer 5.0软件进行引物设计

(表2)。引物设计后,由TakaRa生物工程(大连)有限公司合成。

RT-PCR反应结束后,2%琼脂糖电泳40min,应用凝胶成像系统摄取各样本在同一凝胶上的电泳图,通过成像分析scion软件得出每一泳道中PCR产物条带的OD值,计算MRP-1,-2与 β -actin的RT-PCR产物条带的OD的相对比值,通过比较各样本的MRP-cDNA的相对值,最终获得MRP在肝组织及外周血中mRNA表达的相对含量。

1.4 统计学处理

采用SPSS11.0软件进行统计学分析。组间比较采用t检验或 χ^2 检验。

表2 各基因引物序列及PCR产物长度

检测基因	上游引物	下游引物	PCR产物长度
MRP-1	5'-ATGGACTACACAAGGGTGAT-3'	5'-TTCGCATCTCTGTCTCTCC-3'	337 bp
MRP-2	5'-CATTGGGCTCCACGACCTC-3'	3'-CTTCAGAAAACACCGGTCCG-5'	164 bp
β -actin	5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'	3'-CTGCACCTGTAGCGTTTC-5'	381 bp

2 结果

2.1 肝癌患者肝组织和外周血中MRP-1 mRNA的表达

36例肝癌患者的癌组织、近癌组织、远癌组织(其中有肝硬化背景者13例,36.11%)及外周血中均可检测到MRP-1 mRNA免疫阳性带,但不同部位检测的阳性率明显不同,癌组织中24例(66.67%),外周血中有22例(61.11%),两者的阳性率最高,其次为近癌组织(9例,25.00%)。外周血MRP-1阳性率虽然略低于癌肿组织,但两者之间无统计学差异($P > 0.05$)(表3)。远癌组织仅3例,阳性率最低(8.33%)。与远癌组织相比,癌组织、近癌组织和外周血中MRP-1 mRNA的阳性率有显著增高($P < 0.05$)。与近癌组织相比,癌组织和外周血中MRP-1 mRNA的阳性率也显著增高($P < 0.05$)。

肝癌II期患者近癌组织和癌组织中的MRP-1

mRNA灰度值明显升高,与正常组织相比,有显著性差别($P < 0.05$)。III期和IV期组,无论近癌组织、远癌组织或癌组织,MRP-1 mRNA的表达水平明显升高,与II期组相同部位相比,差异均有显著性($P < 0.05$)(图1)。患者外周血中可见MRP-1 mRNA阳性反应带,随着肝癌分级的增加,灰度值逐渐加深,III期组和IV期组均显著高于II期组,差异有显著性($P < 0.05$)(表4)。III期与IV期相比,差异也有显著性($P < 0.05$)。

表3 肝癌患者MRP-1 mRNA在癌组织和外周血表达的关系($n = 36$)

肝癌组织	外周血		合计(例,%)
	阳性(%)	阴性(%)	
阳性	14(38.89)	10(27.78)	24(66.67)
阴性	8(22.22)	4(11.11)	12(33.33)
合计	22(61.11)	14(38.89)	36(100)

注:两种组织MRP-1的表达阳性率比较, $\chi^2 = 0.0556, P > 0.05$

表4 各期患者癌组织、近癌组织、远癌组织及外周血中 MRP-1, -2 mRNA 的表达

组别		n	癌组织	近癌组织	远癌组织	外周血
Ⅱ期	MRP-1	12	0.56 ± 0.07 ²⁾	0.40 ± 0.11	0.25 ± 0.09	0.33 ± 0.10
	MRP-2	12	0.48 ± 0.12 ²⁾	0.36 ± 0.12	0.18 ± 0.10	0.25 ± 0.09
Ⅲ期	MRP-1	15	0.65 ± 0.10 ^{1,2)}	0.50 ± 0.13 ¹⁾	0.28 ± 0.11	0.41 ± 0.07 ¹⁾
	MRP-2	15	0.60 ± 0.13 ^{1,2)}	0.44 ± 0.12	0.21 ± 0.07	0.28 ± 0.11
Ⅳ期	MRP-1	9	0.80 ± 0.13 ^{1,2)}	0.61 ± 0.09 ¹⁾	0.33 ± 0.06 ¹⁾	0.49 ± 0.13 ¹⁾
	MRP-2	9	0.64 ± 0.12 ^{1,2)}	0.51 ± 0.10 ¹⁾	0.23 ± 0.12	0.29 ± 0.12

注:1)与Ⅱ期组比较, $t=2.12 \sim 5.46, P < 0.05$; 2)与同组近癌组织比较, $t=3.35 \sim 10.23, P < 0.05$

2.2 肝癌患者肝组织和血中 MRP-2 mRNA 的表达

36例肝癌患者的癌组织、近癌组织、远癌组织和外周血中均可检出 MRP-2 mRNA, 以癌组织最高(26例, 72.2%), 近癌组织19例(52.6%), 远癌组织9例(25.0%), 外周血16例(44.4%)。外周血 MRP-2 阳性率明显低于癌组织, 两者比较差异有显著性($P < 0.05$) (表5)。各组间的两两比较, 差异也有显著性($P < 0.05$)。

肝癌Ⅱ期组患者远癌组织中可见 MRP-2 mRNA 阳性带, 但灰度值极低, 而近癌组织和癌组织均 MRP-2 mRNA 阳性反应带的其灰度值略有升高, 与远癌组织之间存在统计学差别($P < 0.05$) (图1)。肝癌Ⅲ期和Ⅳ期组, 无论远癌组织、近癌组织还是癌组织, 均可见 MRP-2 mRNA 阳性带, 与相同部位肝癌Ⅱ期组相比, 其灰度值均明

显升高($P < 0.05$), 但Ⅲ期和Ⅳ期组差别无统计学意义($P > 0.05$)。3组患者外周血中均可见 MRP-2 mRNA 阳性反应带; 随着肿瘤分级的增加, 灰度值有逐渐加深的趋势, 但3组间差异无显著性($P > 0.05$) (表4)。

表5 肝癌患者 MRP-2 mRNA 在癌组织和外周血表达的关系 ($n=36$)

肝癌组织	外周血		合计(例, %)
	阳性(%)	阴性(%)	
阳性	13(36.11)	13(36.11)	26(72.22)
阴性	3(8.33)	7(19.44)	10(27.78)
合计	16(44.44)	20(55.56)	36(100)

注:两种组织 MRP-2 的表达阳性率比较, $\chi^2=5.0625, P < 0.05$

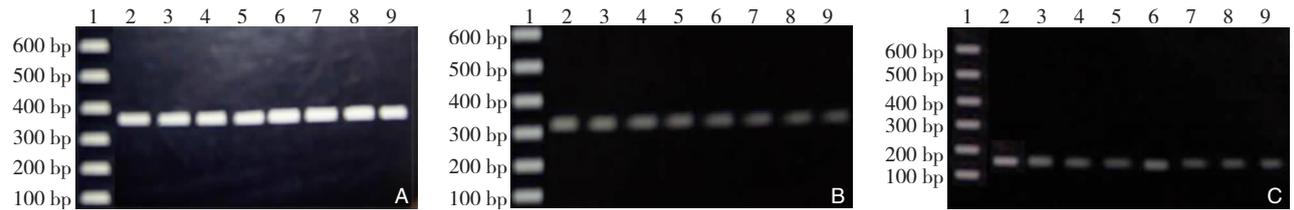


图1 肝癌患者 β -actin mRNA (A), MRP-1 mRNA (B), MRP-2 mRNA (C) 在肝组织及外周血中的表达 1: 分子 Marker; 2: Ⅳ期组癌组织; 3: Ⅳ期组癌旁组织; 4: Ⅳ期组周围正常组织; 5: Ⅳ期组外周血; 6: Ⅱ期组癌组织; 7: Ⅱ期组癌旁组织; 8: Ⅱ期组周围正常组织; 9: Ⅱ期组外周血

3 讨论

MRP-1 属于 ATP 结合超家族成员, 广泛分布于多种正常组织的上皮细胞, 如消化道、泌尿生殖道、呼吸道、内分泌腺和造血系统; 其在很多肿瘤组织如慢性淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌、

食管鳞癌等也有表达, 但水平不一。主要定位于细胞质, 如内质网、高尔基体和细胞质运输囊泡等内膜系统上, 少数位于细胞膜, 但在肿瘤细胞中则主要定位于细胞膜上^[3]。MRP-1 在正常组织中与细胞内解毒、氧化应激反应、炎症反应等有关, 还可调节内源性离子通道和其他载体、参与

树突状细胞向淋巴结迁移的调节等。当受到有害物质侵袭时,MRP-1对机体起积极的保护作用。实验证实,耐药细胞株高表达MRP-1的根本原因是MRP-1基因扩增,不仅高表达MRP-1的细胞具有耐药性,而且一旦转染并表达了MRP-1基因,细胞即获得耐药性,从而确认MRP-1是细胞出现MDR的原因^[4]。其主要作用机制是将进入细胞内的药物泵出或通过改变细胞内药物的分布,导致作用位点的药物浓度降低,以致产生耐药。

本研究结果显示,肝癌患者无论是在癌组织、近癌组织、远癌组织,还是外周血中,均可检测到MRP-1 mRNA免疫阳性带;随着肿瘤分级的增加,灰度值逐渐加深。说明尽管MRP-1 mRNA是肿瘤产生MDR的重要原因,但在肝癌各期均可发生MDR现象,而且随着临床分期的增加,多重耐药现象可能逐渐增加。也就是说,MRP-1 mRNA可能从某种程度上提示病情的严重程度。此结果与Legrand等^[5]的结果略有差异,但与Yoh等^[6]报道相似。这可能是选择对象不同、检测方法和部位不一所致。虽然外周血MRP-1 mRNA检测的阳性率略低于癌组织,但二者相比无统计学差异。提示外周血与活组织MRP-1 mRNA检测具有同等重要的意义,都可能成为诊断肿瘤、病情分级以及预后判断的指标。

人类MRP-2蛋白的49%的氨基酸与人类MRP-1蛋白的氨基酸相同,其二级结构与MRP-1相似,具有MDR核心结构^[7]。大量研究表明:人MRP-2(和鼠同源基因MRP-2)大部分在肝细胞上并严格分布在肝细胞膜的胆管侧^[8],也表达在肾近曲小管的上皮细胞等极性细胞的顶膜。在肝脏,主要介导二价胆盐和非胆盐有机阴离子分泌进入胆汁。在用内毒素诱导的肝内胆汁淤积和用结扎胆道形成肝外胆汁淤积的鼠实验模型中,肝细胞胆管膜内的MRP-2稳定状态的mRNA及蛋白水平都明显下降。这不仅解释了许多胆汁淤积的生化特征(如直接高胆红素血症),而且可能是通过间接导致胆酸非依赖性小管胆流的减少而成为肝内胆汁淤积发病机制的一个主要原因^[9]。

本实验结果显示在肝癌患者的癌组织、近癌组织、远癌组织和外周血中均可检测到MRP-2 mRNA免疫阳性带。说明肝癌患者均可出现胆汁代谢异常。随着临床分级的增加,肝细胞受损愈加严重,这种代谢异常表现得愈加明显。虽然外周血也能检获MRP-2 mRNA阳性表达,但其阳性率远远低于癌组织。提示尽管MRP-2基因编码的转运子介导有机阴离子(包括二价胆盐)分泌进入胆汁,具有保持非依赖胆盐的胆汁流的重要驱动作用,且与多重耐药有关。本结果显示外周血中的浓度并不能代表肝脏受损的程度,其表达过程与肝脏功能及胆囊胆固醇的关系尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王晓波,余少鸿,严律南,等. 包载反义MRP重组腺病毒微粒球肝动脉注射治疗肝癌的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 13-15.
- [2] TNM. Classification for hepatocellular carcinoma by liver cancer study group of Japan[J]. World Surg, 1989, 13(8): 212-217.
- [3] 王光海,江涛. MRP1与肺癌耐药[J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(3): 367-402.
- [4] 王颖超,徐学聚,白松婷,等. MRP-1与VEGF在儿童急性白血病的表达及临床相关研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2007, 12(1): 13-16.
- [5] Legrand O, Zompi S, Perrot JY, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein-1 activity in 132 acute myeloid leukemias according to FAB subtypes and cytogenetics risk groups[J]. Haematologica, 2004, 89(1): 34-41.
- [6] Yoh K, Ishii G, Yokose T, et al. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(5): 1691-1697.
- [7] Tsujii H, Konig J, Rost D, et al. Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3): 653-660.
- [8] Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport[J]. Biochimica Biophysica Acta, 2000, 1486(1): 128-144.
- [9] Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, et al. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat[J]. Gastroenterology, 2000, 118(1): 163-172.