

文章编号:1005-6947(2005)02-0095-05

· 肝癌专题研究 ·

# 多药耐药相关蛋白基因、肺耐药蛋白基因在肝细胞癌中的表达及临床意义

王百林<sup>1</sup>, 杨海燕<sup>1</sup>, 翟淑萍<sup>1</sup>, 陈孝平<sup>2</sup>, 仲永<sup>3</sup>, 张庆业<sup>1</sup>, 孟磊<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院 三外科, 广东 广州 510405; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉 430030; 3. 昆明医学院第二附属医院 普通外科, 云南 昆明 650000)

**摘要:**目的 研究多药耐药相关蛋白基因(MRP)和肺耐药蛋白基因(LRP)在肝细胞癌(HCC)中的表达及其与临床的关系。方法 采用SP免疫组化和PCR技术检测54例HCC和24例癌旁组织及12例肝炎后肝硬化组织中的两种基因表达。结果 MRP和LRP在3种组织中均有表达,HCC组织中其基因表达显著高于其他组织( $P < 0.05$ )。HCC中两种基因表达呈正相关( $r = 0.312, P < 0.05$ ;  $r = 0.328, P < 0.05$ );其表达与HCC的分化程度有关( $P < 0.05$ )。并且其表达阳性组患者化疗后AFP有效率和平均生存期分别高于和长于阴性组( $P < 0.05$ ),但LRP与平均生存期无关( $P > 0.05$ )。结论 HCC多药耐药(MDR)与两种基因表达有关,起源于内源性耐药;检测其表达对预测化疗耐药具有指导意义;MRP可能与预后有关。

**关键词:**肝肿瘤/病理学;肝细胞瘤/病理学;基因表达;多药耐药相关蛋白基因;肺耐药蛋白基因

中图分类号:R735.7; R730.261

文献标识码:A

## Expressions and clinical significance of multidrug resistance associated protein gene (MRP) and lung resistance protein gene (LRP) in hepatocellular carcinoma (HCC)

WANG Bai-lin<sup>1</sup>, YANG Hai-yan<sup>1</sup>, ZHAI Shu-ping<sup>1</sup>, CHEN Xiao-ping<sup>2</sup>, ZHONG Yong<sup>3</sup>, ZHANG Qing-ye<sup>1</sup>, MENG Lei<sup>1</sup>

(1. Third Department of Surgery, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Hepatic Center, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 4430030, China; 3. General Department of Surgery, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650000, China.)

**Abstract: Objective** To study the expressions and significance of MRP and LRP in HCC. **Methods** The expressions of two genes were examined in three tissues (54 cases of HCC, 24 para-cancer and 12 posthepatitis cirrhosis tissues) by SP immunohistochemical and PCR techniques. **Results** MRP and LRP were expressed in three tissues, with significantly higher rates in HCC than others ( $P < 0.05$ ). The MRP expression positively correlated with the LRP expression in HCC ( $r = 0.312, P < 0.05$ ;  $r = 0.328, P < 0.05$ ), and was related to the degree of HCC differentiation ( $P < 0.05$ ). In the patients with positive gene expression, the AFP decreasing rate was higher and the average survival after chemotherapy was longer than the negative expression group ( $P < 0.05$ ), but there was no relationship between LRP expressions and the average survival time. **Conclusions** Multidrug resistance (MDR) of HCC is related to MRP, LRP expressions, and is initiated by intrinsic MDR. Monitoring of MRP and LRP may help to prospectively evaluate drug resistance. MRP may be relates to the prognosis of HCC patients.

**Key words:** LIVER NEOPLASMS/pathol; HEPATOMA/pathol; GENES EXPRESSION; MULTIDRUG RESISTANCE; ASSOCIATED PROTEIN GENE; LUNG RESISTANCE PROTEIN GENE

CLC number: R735.7; R730.261

Document code: A

收稿日期:2004-01-02; 修订日期:2004-09-06。

作者简介:王百林(1966-),男,山东济宁人,广州中医药大学第一附属医院主治医师,博士,主要从事肝脏外科方面的研究。

通讯作者:王百林 电话:020-88530169; E-mail:wangbailin888@sina.com。

笔者采用 SP 免疫组化方法和原位多聚酶链反应 (PCR) 技术检测多药耐药蛋白基因 (MRP)、肺耐药蛋白基因 (LRP) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达, 并进行临床化学药物治疗 (化疗), 旨在了解 MRP 和 LRP 表达与 HCC 临床病理学特征的关系, 以及对术后化疗患者甲胎蛋白 (AFP) 的影响, 与预后的关系, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集我院及武汉同济医院 1995 ~ 1997 年 54 例 HCC 患者。手术切除的 HCC 组织和 24 例癌旁组织及 12 例肝炎后肝硬化活检组织存档石蜡包埋切片组织标本。所有标本均经 HE 染色和病理学检查确诊。I 组中男 46 例, 女 8 例; 年龄 21 ~ 72 (平均 44) 岁。其中 AFP 阳性 38 例, 阴性 16 例; 46 例行肝癌局部切除术, 8 例行术中冷冻治疗 (癌灶多于 2 个)。术后 2 周有 24 例 AFP 仍为阳性。所有 I 组患者术前均未化疗, 术后均采用经皮下肝动脉置泵化疗。化疗方案为 5-FU 1 000 mg, DDP 40 mg 及 MMC 20 mg, 每月 1 次为 1 个疗程, 平均 2 ~ 3 个疗程。化疗有效标准以 AFP 下降到原值的 50% 以上或 AFP 转为阴性为有效, 术后随访。II 组的癌旁组织均取自距肝癌 2 ~ 5 cm 范围内的组织。III 组: 男 8 例, 女 4 例。年龄 21 ~ 50 (平均 36) 岁。均为乙型病毒性肝炎后肝硬化患者。

### 1.2 主要试剂

SP 免疫试剂盒、MRP 及 LRP 抗体均购自北京中山公司; dNTP, Rnasin, 鸟髓母细胞多症病毒逆转录酶 (AMV), Taq 酶和 DNA 酶均购自 Sigma 公司; 蛋白酶 K, 3-氨基-9-乙基吡啶 (AEC) 和 3', 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 染色剂购自华美生物制品公司。

引物及探针采用 PCGEN 软件设计出以下基因引物和探针序列并作同源比较。MRP 引物序列: 上游为 5'-agccagtgaagcaagata-3'; 下游为 5'-tttggatgag-gcttgetgta-3'。探针: 5'-atttagtgatcttcttcc-3'。MRP 长度为 331 个 bp。LRP 引物序列为上游: 5'-gag-cagttcacagtgttctcc-3'; 下游为 5'-gcgtgacagacagaacgaaa-3'。探针: 5'-cgatgaactccataagaactcagc-3'。LRP 长度为 321 个 bp。

以上引物和探针均由上海生物公司合成。

### 1.3 SP 免疫组化染色

具体步骤参照免疫试剂盒说明。染色采用 DAB 显色, 苏木素轻度复染细胞核。用已知阳性胃癌标本作阳性对照, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替 MRP 和 LRP 抗体作阴性对照。

### 1.4 原位 PCR

常规标本脱蜡; 蛋白酶 K 消化; 盐酸酸化; 无 RNA 酶的 DNA 酶处理标本室温过夜。反转录反应: 将反转录液 30  $\mu$ l 滴加于切片组织上, 置湿盒内 52 $^{\circ}$ C 1h。30  $\mu$ L 反转录液含  $1 \times 10^6$  U/L, AMV 反转录酶 3  $\mu$ L,  $1 \times 10^6$  U/L Rnasin 0.75  $\mu$ L, 1 mol/L 的下游引物 3  $\mu$ L; 250 U 的 dNTPs 6  $\mu$ L, 缓冲液 6  $\mu$ L 及焦 DEPC 水 19.35  $\mu$ L, 乙醇脱水。原位扩增: 将 60  $\mu$ L 扩增液加于每份切片上置于原位 PCR 仪内 (60  $\mu$ L 扩增液包括: 1 mol/L 上、下游引物各 6  $\mu$ L, 4 U / 50  $\mu$ L Taq 酶 1.2  $\mu$ L, 250 mol/L 的 dNTPs 1.2  $\mu$ L, 2.5 mol/L 的  $Mg^{2+}$  6  $\mu$ L, PCR 缓冲液 6  $\mu$ L,  $3 \times 10^3$  g/L 的小牛血清 2.4  $\mu$ L 及去离子水 43  $\mu$ L)。94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后按下列条件进行循环: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 55 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 90s。35 次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。原位杂交: 切片置于 PBS 中, 水浴 80 $^{\circ}$ C 10 min, 冰浴, 加含有生物素标记 MRP 及 LRP 探针杂交液, 52 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交液的探针浓度为 2.5 mg/L。杂交后洗涤: 将切片置于  $2 \times$  SSC, 50% 甲酰胺溶液中 37 $^{\circ}$ C 15 min  $\times$  2 次, 依次加入  $1 \times$  SSC,  $0.5 \times$  SSC,  $0.2 \times$  SSC 各 5 min  $\times$  2 次。杂交后检测: PBS 冲洗标本, 用生物素标记的第二抗体和酶标第三抗体 37 $^{\circ}$ C 各 20 min。AEC 镜下显色, 封片。实验设阴性对照组。

结果判断: MRP 阳性以镜下观察细胞膜和细胞浆内呈现棕褐色细胞为阳性细胞, LRP 阳性细胞以镜下观察细胞浆内呈现棕褐色细胞为阳性细胞。MRP mRAN 及 LRP mRAN 以细胞浆出现红色颗粒细胞为阳性细胞。根据阳性细胞所占正常细胞或癌细胞的比例分级。每张切片由 2 名医师双盲观察 10 个高倍视野。未见阳性细胞者为阴性 (-); < 10% 细胞着色为弱阳性 (+); 10% ~ 29% 为中度阳性 (++) ; 30% ~ 100% 细胞着色为细胞染色强阳性 (+++)。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS12.0 医学统计学软件进行统计。

## 2 结果

### 2.1 MRP 及 LRP 表达定位、分布及结果

MRP,LRP 分别表达定位在 HCC 和正常肝细胞膜和细胞浆内,呈褐色点灶状分布,小胆管未见表达(图 1,2)。MRP mRNA 和 LRP mRNA 主要位于 HCC 和正常肝细胞浆内,呈片状分布,阳性细胞呈

浓染红色颗粒状(图 3,4)。MRP 及 LRP 表达阳性率 I 组均显著高于 II 组和 III 组( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),II 组与 III 组间差异均无显著性(均  $P > 0.05$ )(表 1)。

DAB 染色细胞膜和细胞浆呈现棕褐色为阳性细胞,染色呈灶状分布,苏木素轻度衬染细胞核

图 1 SP 免疫组化染色检测肝癌细胞 MRP 结果( $\times 200$ )

DAB 染色 HCC 细胞浆呈现棕褐色为阳性细胞(++) ,呈灶状分布,苏木素轻度衬染细胞核

图 2 SP 免疫组化染色检测肝细胞癌 LRP 的表达( $\times 200$ )

AEC 染色,肝细胞癌阳性细胞呈红色颗粒状(+++),染色部位在细胞浆呈片分布;苏木素轻度衬染细胞核

图 3 原位 PCR 检测 HCC MRP mRNA 的表达( $\times 200$ )

AEC 染色肝细胞癌阳性细胞呈红色颗粒状(+++),染色部位在细胞浆,呈片状分布,苏木素轻度衬染细胞核

图 4 原位 PCR 检测 LRP mRNA 在 HCC 中的表达( $\times 200$ )

表 1 肝癌组织、癌旁组织及肝硬化组织中的 MRP 和 LRP 表达阳性率

组织类型 (分组)	n	MRP		LRP		MRPmRNA		LRPmRNA	
		n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)
肝癌(I)	54	31	57.4	33	61.1	39	72.2	41	75.9
癌旁(II)	24	6	25.0 <sup>1)</sup>	8	33.3 <sup>1)</sup>	9	37.5 <sup>1)</sup>	9	37.5 <sup>1)</sup>
肝硬化(III)	12	2	16.7 <sup>2)</sup>	2	16.7 <sup>2)</sup>	4	33.3 <sup>2)</sup>	4	33.3 <sup>2)</sup>

注:1)与 I 组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与 I 组比较,  $P < 0.01$ ;

## 2.2 HCC 组织中 MRP 和 LRP 耐药基因的共表达关系

54 例 HCC 组织中 MRP 和 LRP 阳性表达分别 31

例(57.4%)和 33 例(61.1%),共表达 23 例(42.6%),MRP 与 LRP 表达呈正相关( $r = 0.312$ ,  $P < 0.05$ ); MRP mRNA 和 LRP mRNA 阳性表达分别

39例(72.2%)和41例(75.9%),共表达33例(61.1%),MRP mRNA与LRP mRNA表达呈正相关( $r = 0.328, P < 0.05$ )。

### 2.3 MRP和LRP表达与HCC的分化关系

Edmondson分级I~II级的28例及III~IV级的26例中,MRP的阳性表达分别为12例(42.9%)和19例(73.1%);MRP mRNA的阳性表达分别为16

例(57.1%)和23例(88.5%);MRP和MRP mRNA表达随肿瘤分化程度的增高而降低(均 $P < 0.05$ )。Edmondson分级I~II级及III~IV级LRP的阳性表达分别为21例(75.0%)和12例(46.2%);LRP mRNA的阳性表达分别为25例(89.3%)和16例(61.5%);LRP和LRP mRNA表达随肿瘤分化程度的增高而提高(均 $P < 0.05$ )(表2)。

表2 MRP和LRP基因表达与HCC分化程度的关系

肿瘤分化总例数 (Edmondson 分级)	MRP		MRPmRNA		LRP		LRPmRNA	
	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)	n	阳性率(%)
I~II(n=28)	12	42.9	16	57.1	21	75.0	25	89.3
III~IV(n=26)	19	73.1	23	88.5	12	46.2	16	61.5
$\chi^2$		5.035		5.123		4.720		4.260
P值		<0.05		<0.05		<0.05		<0.05

### 2.4 MRP和LRP表达与肝癌AFP患者术后化疗效果的关系

肝癌术后AFP阳性者24例。术后经常规皮下肝动脉置泵化疗,结果显示,MRP,MRP mRNA,LRP,LRP mRNA表达阴性组的治疗有效率显著高于阳性组(均 $P < 0.05$ )(表3)。

### 2.5 MRP和LRP表达与HCC患者术后生存期关系

MRP表达阴性组患者术后平均生存期长于阳性组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。LRP表达阴性和阳性组患者术后平均生存期差异无显著性( $P > 0.05$ )(表4)。

表3 HCC中AFP阳性MRP和LRP的表达与术后化疗的关系

基因表达	AFP 阳性 n	术后化疗效果(n,%)		$\chi^2$	P值
		有效	无效		
MRP					
阳性	14	3(21.4)	11(78.6)	5.87	0.015
阴性	10	8(80.0)	2(20.0)		
MRPmRNA					
阳性	17	4(23.5)	13(76.5)	5.54	0.019
阴性	7	6(85.7)	1(14.3)		
LRP					
阳性	15	3(20.0)	12(80.0)	5.53	0.019
阴性	9	7(77.8)	2(22.0)		
LRPmRNA					
阳性	16	4(25.0)	12(75.0)	6.06	0.014
阴性	8	7(87.5)	1(12.5)		

表4 MRP和LRP表达与HCC术后平均生存期关系

基因表达	n	术后平均生存期(月)	P值
MRP			
阳性	31	22.03 ± 9.81	<0.05
阴性	23	59.52 ± 10.93	
MRPmRNA			
阳性	39	24.79 ± 9.22	<0.05
阴性	15	72.35 ± 11.76	
LRP			
阳性	33	35.89 ± 10.05	>0.05
阴性	21	44.65 ± 11.03	
LRPmRNA			
阳性	41	37.71 ± 10.20	>0.05
阴性	13	38.45 ± 10.42	

## 3 讨论

研究<sup>[1]</sup>表明,MRP与HCC的化疗耐药有关,LRP可作为HCC的化疗耐药指标<sup>[2]</sup>。本研究发现,MRP和LRP在HCC、癌旁和肝硬化组织中均有不同程度的表达;在HCC中,MRP和LRP阳性表达率显著高于其他组织( $P < 0.05$ )。另外,笔者还发现,MRP和LRP以及MRP mRNA和LRP mRNA在HCC中共表达阳性率分别为42.6%(23/54)和61.1%(33/54);MRP表达与LRP表达呈正相关( $r = 0.312, P < 0.05; r = 0.328, P < 0.05$ )。上述结果表明,HCC化疗耐药与MRP和LRP表达

有关;所有 HCC 患者术前均未化疗,提示 HCC 耐药可能起源于内源性耐药。MRP 和 LRP 在 HCC 化疗耐药中共同起作用。此结果与国内学者研究基本一致<sup>[3]</sup>。

研究表明 nm-23H1<sup>[4]</sup>, p16<sup>[5]</sup>, Cyclin E<sup>[6]</sup> 基因及黏附分子 CD54, CD44, E-cadherin 等<sup>[7]</sup> 与 HCC 的转移、复发、疗效和预后有关。但是,对于术后无复发的 HCC 患者,上述生物学指标还缺乏特异性和客观性。AFP 作为 HCC 的相对特异性肿瘤标志物,对 HCC 的转移、具有重要价值<sup>[8~10]</sup>。本研究发现,MRP, MRP mRNA, LRP, LRP mRNA 表达阴性组的术后化疗有效率显著高于表达阳性组(均为  $P < 0.05$ )。基于以上结果,笔者认为检测 MRP 和 LRP 有助于了解 HCC 化疗的耐药程度,预测可能出现的化疗效果,并为 HCC 的化疗耐药逆转提供理论依据。本研究发现,MRP 表达随着肿瘤分化程度的增高而降低, ( $P < 0.05$ ),但 LRP 基因表达随着肿瘤分化程度增高而提高。表明 MRP 和 LRP 表达都与 HCC 的分化程度有关。两者存在差异性的机制有待探讨。

Norris 等<sup>[11]</sup> 通过对神经细胞瘤病例的研究,发现 MRP 可作为神经瘤预后的有效指标。本研究发现 MRP 表达阴性组患者术后平均生存期显著长于阳性组(均为  $P < 0.05$ )。随着 HCC 分化程度的降低 MRP 阳性表达率增高。HCC 分化越差,恶性程度高,预后越差。故认为 MRP 有望作为 HCC 的预后指标。

Arts 等<sup>[12]</sup> 对卵巢癌研究发现 LRP 表达可能仅与肿瘤的耐药性有关,与卵巢癌的发展、转移和复发等预后因素无关。本研究发现 LRP 表达与术后平均生存无关 ( $P > 0.05$ )。提示 LRP 表达可能仅与 HCC 耐药有关而与其预后无关,但尚需进一步证实。

致谢:广州中医药大学流行病学教研室徐谦老师对本文的统计学处理。

#### 参考文献:

[1] Wang BL, Chen XP, Zhai SP, *et al.* Clinical significance of

mrp gene in primary hepatocellular carcinoma [J]. *HBPD Int*, 2003, 2(3), 397 - 403.

- [2] 王百林,陈孝平,翟淑萍. 肺耐药蛋白基因(lrp)与原发性肝细胞癌化疗敏感性研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(9): 568 - 569.
- [3] 刘景丰, 陈孝平. 原发性肝癌多药耐药基因的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(5): 406 - 408.
- [4] 李为民, 郑云, 杜继东, 等. 肝细胞癌中 nm - 23H1 的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(3): 217 - 218.
- [5] 徐吉良, 朱卫东, 黄建华. 肝细胞癌组织中 P16, P27 蛋白的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(9): 708 - 709.
- [6] 周奇, 王广田, 梁力建, 等. Cyclin E 在肝细胞癌中的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(3): 193 - 195.
- [7] 郭琳琅, 郭颖, 曹长安. 原发性肝癌组织中黏附分子 CD54, CD44 及 E - cadherin 的表达及意义[J]. 中国普通外科杂志, 2000, 9(5): 424 - 426.
- [8] 常实, 汤恢焕, 龚学军, 等. 原发性肝癌组织 VEGF 与外周血 AFP mRNA 检测的临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(3): 205 - 208.
- [9] 吴孟超. 肝脏外科学[M]. 第2版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2000. 183 - 187.
- [10] 王梦龙, 徐艳萍.  $\gamma$  - 谷氨酰转移酶同工酶对原发性肝癌疗效与预后判断价值的探讨[J]. 医师进修杂志, 1999, 22(7): 20 - 21.
- [11] Norris MD, Bordow BS, Marshall GM. Expression of the gene for multidrug resistance associated protein and outcome in patients with neuroblastoma [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(4): 231 - 238.
- [12] Arts HJ, Katsaro SD, Devries EG. Drug resistance associated markers P - glycoprotein 1, multidrug resistance associated protein 2 and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(10): 2798 - 2850.