·临床检验研究论著·

非小细胞肺癌中肺耐药蛋白的表达及与临床病理特征的关系

余宗涛[1]，高 琼[2]，高 波[1]，吕 军[1]，张吉才[1△]

（湖北医药学院附属太和医院：1. 检验部；2. 呼吸内科，湖北十堰 42000）

摘 要：目的 探讨肺耐药蛋白（LRP）在非小细胞肺癌（NSCLC）中的表达及与临床病理特征的关系。**方法** 运用荧光定量-聚合酶链反应（FQ-PCR）检测 47 例肺癌组织和 14 例正常组织 LRP mRNA 的表达。**结果** LRP mRNA 在癌组织、正常组织中表达阳性率分别为 74.5%（35/47）、14.3%（2/14），正常组织中 LRP mRNA 表达值为 0.19±0.17，癌组织中为 0.58±0.24，癌组织中 LRP mRNA 表达明显高于正常组织，差异有统计学意义（$t=5.72$，$P=0.001$）；LRP mRNA 表达与患者年龄、性别、组织学分型、淋巴转移及临床分期无关（$P>0.05$），而与肿瘤分化程度有关（$P=0.001$）。**结论** NSCLC 中存在原发性耐药现象，LRP mRNA 高表达在 NSCLC 对顺铂的原发性耐药中可能起重要作用。

关键词：聚合酶链反应； 癌，非小细胞肺； 抗药性，多药

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.008 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-4130(2012)09-1042-03

Relationship between lung resistance protein and clinicopathologic characteristics of nonsmall-cell lung cancer

Yu Zongtao[1], *Gao Qiong*[2], *Gao Bo*[1], *Lv Jun*[1], *Zhang Jicai*[1△]

(1. *Department of Laboratory Medicine*; 2. *Department of Respiratory Medicine*, *Taihe Hospital*, *Hubei Medical University*, *Shiyan*, *Hubei* 442000, *China*)

Abstract: Objective To investigate the expression of lung resistance protein(LRP) in nonsmall-cell lung cancer(NSCLC) and its relationship with clinicopathologic characteristics. **Methods** Fluorescent quantitation-polymerases chain reaction(FQ-PCR) was used to detect the expression levels of LRP mRNA in 47 cases of NSCLC tissues and 14 cases of normal tissues. **Results** The positive rates of LRP in NSCLC and normal tissues were 74.5%(35/47) and 14.3%(2/14) respectively. The expression level was significantly higher in NSCLC tissues(0.58±0.24) than that in normal issues(0.19±0.17)($t=5.72$, $P<0.001$). The expression level of LRP was not correlated with age, sex, histological types, lymph node metastasis and clinical stage($P>0.05$), but was correlated with differentiation of cancer tissues($P=0.001$). **Conclusion** There might be primary drug-resistance in NSCLC. Higher expression of LRP could play a major role in the intrinsic multi-drug resistance of NSCLC.

Key words: polymerase chain reaction; carcinoma, non-small-cell lung; drug resistance, multiple

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一，其中非小细胞肺癌（non-small cell lung cancer，NSCLC）占绝大部分。近年来肺癌发病率和死亡率在全世界范围内均有较大幅度增长，手术治疗仍是首选，但大部分患者确诊时已属中、晚期，失去了手术机会。化疗是治疗该阶段肺癌患者的主要手段，其治疗效果往往不尽人意。多药耐药（multidrug resistance，MDR）的出现是肺癌化疗失败的重要原因之一，严重影响了化疗的疗效。目前 MDR 研究的重点主要放在耐药基因的转录调控上，为了解耐药基因——肺耐药蛋白（lung resistance protein，LRP）在 NSCLC 耐药现象中的作用，本研究采用荧光定量-聚合酶链反应（fluorescence quantitative-PCR，FQ-PCR）对 LRP 的表达与 NSCLC 病理特征之间的关系进行初步探讨，从基因转录水平探讨肺癌耐药机制，为提高肺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 收集本院 2010 年 4 月至 2011 年 6 月 NSCLC 的新鲜癌组织标本 47 例，14 例正常肺组织（取自同次手术肺切缘组织）作为对照，均经病理检查证实。所有患者临床资料完整。其中男 31 名，女 16 名；年龄 47～72 岁，平均 51.7岁，≥50 岁 33 例，<50 岁 14 例；鳞癌 19 例，腺癌 28 例；临床分期：Ⅰ期 25 例，Ⅱ期 18 例，Ⅲ期 4 例（因Ⅳ期患者失去手术机会，故未收集）；分化程度：高分化 26 例，中分化 10 例，低分化 11 例；淋巴转移 30 例，无淋巴转移 17 例。所有患者术前均未接受放、化疗。

1.2 主要试剂与仪器 Trizol Reagent（Promega）、Reverse Transcription System A3500、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）、SYBR Green Ⅰ染料（Gene 公司）、PCR 试剂及 100 bp DNA Mark（上海生工）、TG-16WS 台式高速冷冻离心机（日立公司）等。

1.3 方法

1.3.1 引物合成 根据参考文献[1]设计 LRP mRNA 引物：5′-GTC TTC GGG CCT GAG CTG GTG TCG-3′，5′-CTT GGC CGT CTC TTG GGG GTC CTT-3′，扩增产物 240 bp；GAPDH：5′-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3′，5′- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3′，扩增产物 226 bp。

1.3.2 RNA 的提取和逆转录 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浓度和纯度后溶于无 RNA 酶双蒸水中，A3500 逆转 RNA 为 cDNA，逆转录体系为：总 RNA 2 μL，逆转录 10 倍 Buffer 2 μL，10 mmol/L dNTP 混合液 2 μL，AMV 逆转录酶 0.6 μL，Recombi-

△ 通讯作者，Tel：(0719)8801192；E-mail：jicaizhang@hotmail.com。

nant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 0.5 μL, Oligo(dT)引物 1 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μL, 用无核酸酶双蒸水补齐体积至 20 μL。瞬时离心后置于 PCR 仪, 42 ℃ 15 min, 95 ℃ 5 min。逆转的 cDNA 用无 RNA 酶双蒸水稀释 cDNA 至 100 μL 备用。

1.3.3 PCR 扩增　扩增体系设置为 2 mmol/L dNTP 1.5 μL、5 U/μL Taq 0.3 μL、25 mmol/L Mg^{2+} 2.5 μL、10×Buffer 3 μL, 以及上、下游引物各 2 μL, cDNA 5 μL, 10×SYBR-Green Ⅰ 1.5 μL, 用无菌水补齐体积至 30 μL。反应条件: 94 ℃ 预变性 4 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环; 最后 1 个循环于 72 ℃ 8 min。

1.3.4 结果判断　琼脂糖电泳与基因相对定量: 取 5 μL PCR 扩增产物 2%琼脂糖凝胶电泳后在紫外凝胶成像系统中照相并分析结果, 在 240、226 处出现特异性目的条带。利用检测得到循环阈值(Ct)和计算得到扩增效率(E), 以 GAPDH mRNA 量为参照, 计算耐药基因 mRNA 相对表达量。LRP mRNA/GAPDH mRNA=(1+EGAPDH)Ct(GAPDH)/(1+ELRP1)Ct(LRP)。

1.4 统计学处理　应用 SPSS13.0 统计软件进行结果分析, 所有计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用两独立样本 t 检验, 所有计数资料用率表示, 采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 LRP mRNA 在癌组织和正常组织中的表达　LRP mRNA 在癌组织和正常组织中的表达阳性率分别为 74.5%(35/47)、14.3%(2/14), 2 例在正常组织中表达阳性标本均在相对应癌组织中有表达; LRP mRNA 在癌组织中为相对高表达状态, 相对定量表达值为 0.58±0.24; 在正常组织中为相对低表达状态, 相对定量表达值为 0.19±0.17。在癌组织中 LRP mRNA 表达明显高于正常组织, 差异有统计学意义($t=5.72$, $P=0.001$)。

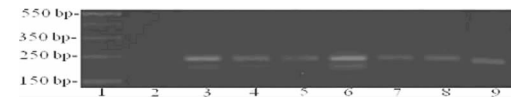
2.2 LRP mRNA 表达与 NSCLC 临床病理因素的关系　癌组织中 LRP mRNA 表达与年龄、性别、临床分期、淋巴转移等无关, 而与肿瘤分化程度有关($P=0.001$), 见表 1。

表 1　LRP mRNA 表达与 NSCLC 临床病理因素的关系($\bar{x}\pm s$)

项目	n	LRP mRNA(表达值)
年龄(岁)		
≥50	33	0.61±0.23
<50	14	0.49±0.25
性别		
男	31	0.63±0.22
女	16	0.49±0.26
组织学分型		
鳞癌	19	0.60±0.28
腺癌	28	0.57±0.21
临床分期(期)		
Ⅰ	25	0.63±0.22
Ⅱ+Ⅲ	22	0.53±0.25
分化程度		
高分化	26	0.68±0.18
中、低分化	21	0.46±0.24*
淋巴转移		
有	30	0.62±0.24
无	17	0.52±0.23

*: $t=3.51$, $P=0.001$, 与高分化比较。

2.3 琼脂糖凝胶电泳结果　见图 1。



1: DNA 相对分子质量标准; 2: 阴性对照; 3～7: 癌组织; 8: 正常组织; 9: 内参对照。

图 1　LRP mRNA 在癌组织和正常组织中的表达

3 讨　论

肿瘤细胞 MDR 基因的高表达是导致肿瘤多药耐药, 甚至化疗失败的重要原因[2]。虽然目前 LRP mRNA 表达在肺癌中的研究较为常见, 但其方法较多为免疫组化法、半定量 RT-PCR 法等, 运用 FQ-PCR 研究其在肺癌中的表达较为少见。本研究运用 FQ-PCR 检测对肺癌常用化疗药物顺铂容易产生耐药的基因 LRP 在肺癌中的表达, 并探讨其在肺癌对顺铂原发性耐药中的作用。

LRP 是人体穹窿蛋白的重要组成部分, 参与卵巢癌[3]、肝癌[4]、乳腺癌[5]、胃癌[6]等多种肿瘤对化疗药物的耐药, 并不是肺癌特异性的耐药基因。LRP mRNA 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[7-8]。故研究 LRP mRNA 表达在肺癌对顺铂原发性耐药中的作用具有重要意义。

本研究中 LRP mRNA 在癌组织和正常组织中的表达阳性率分别为 74.5%和 14.3%, 在癌组织中的表达明显高于正常组织, 并且所有患者术前均未进行过放、化疗, 说明 LRP mRNA 高表达在肺癌的原发性耐药中可能起重要作用, 参与了原发性耐药机制的形成过程。且以铂类为基础的化疗成为目前肺癌特别是 NSCLC 的标准化疗[9-10], 提示肺癌对顺铂的原发性耐药可能与 LRP mRNA 的过表达有关。本研究采用 RT-PCR 结合荧光染料(SYBR GreenⅠ)检测标本中耐药基因的表达, 此法无需合成特异性探针就能对耐药基因的表达进行实时监测, 从而达到实时定量的状态, 也可能正是由于这种检测方法的不同, 本研究中 LRP mRNA 表达阳性率(74.5%)高于刘欣燕等[11]的表达阳性率(67.4%)。在正常肺组织中有 2 例 LRP mRNA 高表达, 并且此 2 例表达阳性标本均在相对应的癌组织中有表达, 可能与正常组织中混有一定的癌组织有关。高分化癌组织中 LRP mRNA 的表达明显高于低、中分化组织, 提示癌组织分化程度越高, 对化疗药物的耐受性越强。而肿瘤患者对化疗药物的耐受性又直接关系到化疗的成败, 故作者认为检测 LRP mRNA 表达也可以作为评价肺癌患者预后的指标[12]。

总之，可以采用 FQ-PCR 对癌组织中 LRP 进行更准确的定量分析。不仅可以了解耐药的原因，也可以指导临床有针对性地制订有效的化疗方案，从而为肿瘤的个体化治疗提供一定的理论基础。LRP mRNA 高表达是肺癌患者对顺铂类药物耐药的主要原因之一，那么降低其表达就有可能逆转耐药，这也可能为以后的研究方向提供了新的思路。

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] 徐建业，李伟道. 多药耐药基因多态性与肿瘤[J]. 国际检验医学杂志，2006，27(8)：736-738.

[3] Lu D, Shi HC, Wang ZX, et al. Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma[J]. Br J Biomed Sci, 2011, 68(2): 69-74.

[4] 莫让伟，刘长安. 肝癌相关性基因研究现状[J]. 国际检验医学杂志，2006，27(11)：1023-1025.

[5] 王俊先，李祥春，张开光，等. 胃癌组织 LRP 和 GST-π 及 GCS 表达临床意义的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志，2011，18(11)：859-862.

[6] Hu WQ, Peng CW, 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: 144.

[7] Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, et al. Vaults: A ribonucleoprotein particle involved in drug resistance[J]. Oncogene, 2003, 22(47): 7458-7467.

[8] Jiao JW, Wen F. Tanshinone ⅡA acts via p38 MAPK to induce apoptosis and the down-regulation of ERCC1 and lung-resistance protein in cisplatin-resistant ovarian cancer cells[J]. Oncol Rep, 2011, 25(3): 781-788.

[9] Imaizumi M. Study Group of Adjuvant Chemotherapy for Lung Cancer (Chubu, Japan). Postoperative adjuvant cisplatin, vindesine, plus uracil-tegafur chemotherapy increased survival of patients with completely resected p-stage I non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2005, 49(1): 85-94.

[10] Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, et al. Randomized phase Ⅲ study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan [J]. Ann Oncol, 2007, 18(2): 317-323.

[11] 刘欣燕，张书敏，刑秋月，等. 非小细胞肺癌 P-gp、LRP、MRP 和 GST-π 表达及其临床意义[J]. 现代肿瘤医学，2009，17(8)：1444-1447.

[12] Berger W, Setinek U, Hollaus P, et al. Multidrug resis-tance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(6): 355-363.

（收稿日期：2012-01-08）

（上接第 1041 页）

有一定的鉴别价值，本研究的鉴别数学模型区分 α 珠蛋白生成障碍性贫血合并缺铁与缺铁性贫血效果最好（AUC＝0.95），一致性最高（*Kappa*＝0.813），在大于 0.95（cutoff 值）时，对鉴别缺铁性贫血的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 91.0%、90.5%、91.9%、90.4%，说明本研究自建的鉴别数学模型较国外数学模型更为有效，可能与国外设计数学模型时主要考虑的只是为了筛查珠蛋白生成障碍性贫血或本市人群的红细胞参数水平与国外人群不同有关。但国外的数学模型仍有一定的鉴别意义，其中 Shine and Lal 指数特异度最高（94.7%），而 Green 指数敏感度最高（96.7%）。另外作者观察到 7 种数学模型均不能完全达到确诊或排除，因此在实际分析过程中将各种数学模型综合考虑有益于提高鉴别能力。

总之，数学模型在区分 α 珠蛋白生成障碍性贫血合并缺铁和缺铁性贫血时有较高的鉴别价值，在临床工作中有以下两个方面的意义：一是只需简单的血常规检查就可以起到鉴别的作用，达到降低患者费用的目的；二是各实验室可自行建立本实验室的的鉴别数学模型，特别适合基层等医疗卫生条件较差地区的医院开展。

参考文献：

[1] 滕亚，陈萍. α-地中海贫血实验室诊断技术进展[J]. 中国民族民间医药，2010，10(19)：30-32.

[2] 毛锦江，黄伟媚，甘冰. 脐血蛋白电泳在 α-地中海贫血基因诊断的价值[J]. 中国妇幼健康研究，2011，22(4)：484-487.

[3] 张崇林. 轻型地中海贫血早期诊断中 RBC/MCV 比值的意义[J]. 国际检验医学杂志，2008，29(7)：654.

[4] 周建中. 红细胞参数在缺铁性贫血诊断中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(7)：805-806.

[5] Dinesh A, Amarjeet K, Vinod P, et al. Usefulness of cell counter-based parameters and formulas in detection of β-thalassemia trait in areas of high prevalence[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128: 585-589.

[6] 谢又平，肖奇志，周玉球，等. 逐步回归分析快速鉴别诊断地中海贫血与缺铁性贫血[J]. 南方医科大学学报，2008，28(4)：609-611.

[7] 何雅军，杨小华，马福广，等. 红细胞平均体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志，2005，28(3)：244-246.

[8] 代宏剑，温柏平. 地中海贫血的实验室诊断进展[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(2)：251-252.

（收稿日期：2012-01-08）