新辅助化疗对骨肉瘤多药耐药相关蛋白表达的影响

李 晨[1] 岳付桥[1] 徐翠芳[1] 张树桧[2]

(1 安徽阜阳创伤医院 安徽 阜阳 236000；2 郑州大学第二附属医院骨科 河南 郑州 450000)

摘要 目的：探讨不同新辅助化疗方案对多药耐药相关蛋白在骨肉瘤组织中表达的影响。**方法：**采用 RP-PCR 技术以及免疫组化技术检测 48 例骨肉瘤患者在不同新辅助化疗方案实施前后多药耐药相关蛋白在 mRNA 以及蛋白水平的表达变化。**结果：**在同一新辅助化疗方案实施前后以及不同新辅助化疗方案之间，肿瘤组织的多药耐药蛋白的 mRNA 及蛋白表达均无显著性差异。**结论：**不同新辅助化疗方案的实施对骨肉瘤多药耐药蛋白表达的影响有限，其多药耐药性可能主要决定于肿瘤本身，检测多药耐药蛋白的表达有利于制定个体化化疗方案。

关键词：骨肉瘤；多药耐药相关蛋白；新辅助化疗

中图分类号：R738 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)20-3921-03

Influence of Neoadjuvant Chemotherapy on the Expression of Multidrug Resistance-associated Proteins in Osteosarcoma

LI Chen[1], YUE Fu-qiao[1], XU Cui-fang[1], ZHANG Shu-hui[2]

(1 Anhui Fuyang Trauma Hospital, Fuyang, Anhui, 236000, China;

2 The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of different neoadjuvant chemotherapy on the expression of multidrug resistance-associated protein in osteosarcoma. Methods: RP-PCR and immunohistochemical techniques were used to detect the expression of multi-drug resistance-associated protein mRNA and protein in 48 cases of osteosarcoma patients before and after the implementation of neoadjuvant chemotherapy. Results: There was no significant difference in MDR expression between before and after neoadjuvant chemotherapy, and there was no difference between two types of neoadjuvant chemotherapy regimens. Conclusion: The effect of implementation of different neoadjuvant chemotherapies is very limited on expression of multidrug resistance protein in osteosarcoma. The multi-drug resistance of this tumour may be mainly determined by itself. Detection of the multidrug resistance protein expression will facilitate the development of individual chemotherapy.

Key words: Osteosarcoma; Multi-drug resistance-associated proteins; Neoadjuvant chemotherapy

Chinese Library Classification(CLC): R738 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)20-3921-03

前言

骨肉瘤(osteosarcoma)是最常见的原发性骨恶性肿瘤之一，其恶性程度较高，发现时往往已经有微小肺转移，预后普遍较差[1,2]。但随着多学科协作的开展，骨肉瘤的治疗方案在不断改进和优化，其 5 年生存率已经从 30 多年前的不足 20 %提高至现在的 60 %左右，手术保肢率也比以前明显提高[3]。特别是自上世纪八十年代以来，新辅助化疗的开展使得肿瘤切除术后可以评估肿瘤对化疗的反应，进而指导术后辅助化疗方案的制订，并可从一定程度上评估患者的预后[4]。新辅助化疗的广泛应用使骨肉瘤病人的生存率得到明显提高，但是肿瘤组织中多药耐药性(multi-drug resistance，MDR)的存在，严重影响了化疗的效果[5-8]。多药耐药相关蛋白(multi-drug resistance-associated proteins，MRP)在肿瘤中表达是导致肿瘤细胞产生 MDR 的重要原因，影响 MRP 表达的因素十分广泛[9,10]，而不同新辅助化疗方案对骨肉瘤组织中 MRP 表达的影响目前尚未见相关报道。本研究应用 RT-PCR 以及免疫组织化学方法检测不同新辅助化疗实施前后同一患者骨肉瘤组织中 MRP 的表达，为指导临床合理用药以及逆转骨肉瘤的多药耐药性提供实验依据。

作者简介：李晨(1977-)，男，主要研究骨科疾病的临床治疗与处理，E-mail:lzmdlc@126.com

(收稿日期：2012-02-05 接受日期：2012-02-29)

1 材料与方法

1.1 研究对象

2005 年 3 月至 2010 年 3 月在我院经病理确诊的骨肉瘤患者 48 例，其中男性 32 例，女性 16 例，年龄：10~44 岁，平均年龄 28.5 岁；肿瘤大小 5~29 cm，平均大小 10.9 cm；病理切片按组织学 Price 分级：Ⅰ级 7 例、Ⅱ级 23 例、Ⅲ级 18 例；Enneking 外科分期：Ⅰa 期 2 例、Ⅰb 期 3 例、Ⅱa 期 4 例、Ⅱb 期 32 例、Ⅲa 期 4 例、Ⅲb 期 3 例。所有患者均未合并其他肿瘤，在接受新辅助化疗方案前无放、化疗史。根据不同新辅助化疗方案将患者随机分为 MMIA 方案组(25 例)和 DIA 方案组(23 例)，本研究遵循知情自愿等原则，且研究对象签署了知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 主要仪器和试剂 Reverse Transcription System A3500(Promega)，Trizol Reagent(Promega)，Taq DNA Polymerase(TaKaRa)，PCR 仪 BIO-RAD mylyder(BIO-RAD)，凝胶电泳仪 dyy-10c

994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(北京六一),G-BOX 凝胶成像系统(Gene);鼠抗人 MRP 单克隆抗体(Bioscience),免疫组化 EvensionTM 试剂盒(Gene)。

1.2.2 化疗方案 MMIA 方案组:由甲氨蝶呤(MTX)、异环磷酰胺(IFO)及阿霉素(ADM)组成。用药顺序:第 1、2 周每周均给予 MTX、四氢叶酸(CF),间隔 1 周后,再给予 IFO、ADM,为 1 疗程,间隔 2 周给予第 2 疗程化疗。给药剂量:MTX:8～12 g/m²,4～6 h 滴入,6 h 后应用 CF15 mg/m²,6 h/ 次,连用 12 次。IFO:2.0 g/m²,连用 5 d,用药后 6 h 应用美司那 1 200 mg/m²;ADM:30 mg/m²,连用 3 d。全部药物均经静脉给药。一般在活检明确诊断后第 11 周手术。

DIA 方案组:由顺铂(DDP)、异环磷酰胺(IFO)及阿霉素(ADM)组成。用药顺序:首先给予 DDP 化疗,间隔 1 周后,再给予 IFO、ADM,为 1 疗程,间隔 2 周给予第 2 疗程化疗。给药剂量:DDP:120 mg/m²,4～6 h 滴入。IFO 和 ADM 用药同 MMIA 方案。全部药物均经静脉给药。一般在活检明确诊断后第 9 周手术。

1.2.3 指标测定 MRP mRNA 表达检测:分别以新辅助化疗前活检病理组织以及手术时所取肿瘤组织为新鲜组织标本,常规方法抽提组织中的总 RNA,按照 A3500 试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA,已得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,MRP 扩增引物:Sense: CTGTTTTGTTTTCGGGTTCC,Antisense: CCAAGGCCTTCCAAATCTC;扩增片段大小:155 bp。以 GAPDH 为内对照,扩增引物:Sense:CTGTTTTGTTTTCGGGTTCC,Antisense: CCAAGGCCTTCCAAATCTC;增片段大小:226 bp。扩增条件参考文献 11 进行。扩增后通过凝胶成像,以 GAPDH 的 mRNA 为参照,计算 MRP mRNA 的相对表达量。

MRP 蛋白表达检测:分别将新辅助化疗前后肿瘤组织石蜡标本切片,裱片于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,免疫组化染色采用 Envision 法,染色步骤参照试剂盒说明书进行。结果判定标准按照阳性细胞数比例分为四级:阴性(-)无棕色反应,细胞背景一致不着色或阳性细胞数小于 5 %;弱阳性(+):5 %～25 %的癌细胞胞浆着淡黄色或浅棕色;中阳性(++):25 %～50 %的癌细胞胞浆着棕色;强阳性(+++):50 %以上的癌细胞胞浆着深棕色。所有的染色切片均由两名有经验的病理医师分别独立阅片,如有分歧再请第三位医师加入后讨论决定,最终结果记录将中阳性及强阳性标本记录为 MRP 蛋白表达阳性,计算阳性率。

1.3 统计学分析

所得计量数据均采用均数± 标准差($\bar{X}$± S)表示,用 SPSS15.0 软件处理数据,组间均数比较用 t 检验,计数资料采用 X^2 检验。检验水准 α=0.05,当 P<0.05 时认为有统计学意义。

2 结果

2.1 新辅助化疗对 MRP mRNA 表达的影响

实施新辅助化疗前后,不同化疗方案两组患者肿瘤组织中 MRP 的 mRNA RT-PCR 检测结果(图 1 与表 1)。无论 MMIA 方案组或 DIA 方案组患者,在实施化疗后 MRP 的 mRNA 表达较化疗前有所增加,但差异无统计学意义。两组不同新辅助化疗方案组之间 MRP 的 mRNA 表达差异也无统计学意义。

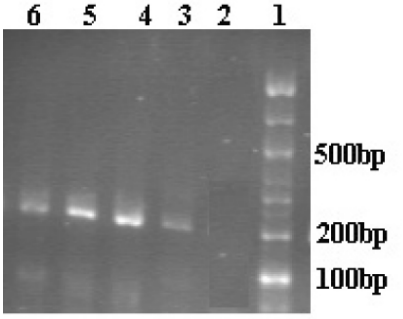

图 1 RT-PCR 检测 MRP mRNA 电泳结果图

Fig.1 RT-PCR detection of the MRP mRNA expression: Line 1: marker; line2: negative control; line 3: GAPDH; line 4~6: MRP

2.2 新辅助化疗对 MRP 蛋白表达的影响

表 1 两组化疗前后 MRP mRNA 表达情况

Table 1 The expression of MRP mRNA before and after chemotherapy in the two groups

Groups	Cases	before chemotherap	After chemotherap
MMIA group	25	0.48± 0.13	0.52± 0.14
DIA group	23	0.51± 0.17	0.54± 0.12

实施新辅助化疗前后,不同化疗方案两组患者肿瘤组织中 MRP 蛋白的表达情况见表 2。MMIA 方案组化疗前 MRP 阳性率为 80.0 %,化疗后阳性率为 84.0 %;DIA 方案组化疗前 MRP 阳性率为 82.6 %,化疗后阳性率仍为 82.6 %。通过 X^2 检验发现,不论是同一方案化疗前后相比较,还是不同化疗方案组间比较 P 值均大于 0.05,说明组内和组间差异均无统计学意义。

3 讨论

表 2 两组化疗前后 MRP 蛋白的表达情况

Table 2 The expression of MRP protein before and after chemotherapy in the two groups

Groups	Cases	Before chemotherap				After chemotherap			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
MMIA group	25	5	8	9	3	4	7	10	4
DIA group	23	4	7	10	2	4	5	10	4

994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

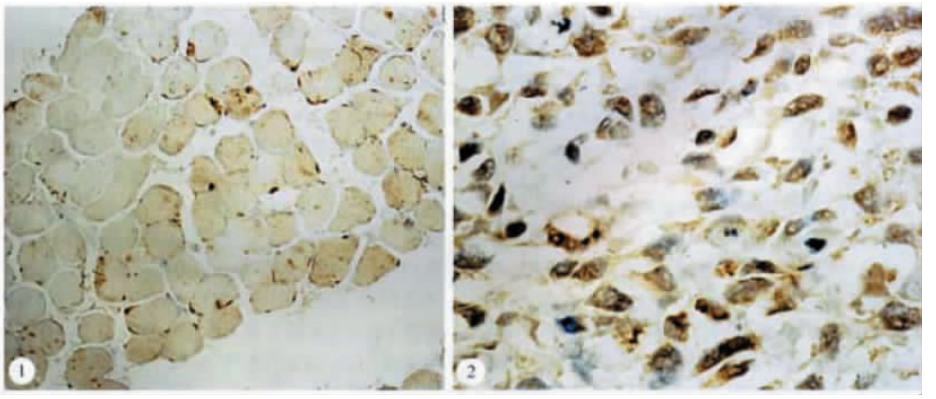

图 2 免疫组化检测 MRP 蛋白表达结果 × 400

Fig.2 The immunohistochemical results of MRP × 400 ①: positive control, MRP expression in skeletal muscle; ②: MRP expression in osteosarcoma

化疗仍然是临床治疗骨肉瘤的重要手段之一，化疗敏感性是决定化疗效果以及化疗方案的决定性因素。而肿瘤多药耐药是导致肿瘤化疗失败的主要原因。MDR 是指将某种化疗药物应用于肿瘤治疗并产生耐药性之后，该肿瘤对从未接触过的其他化疗药出现的交叉耐药性。而且产生耐药的药物之间往往结构无关，作用机制也不相同[12-14]。根据耐药性的获得方式，肿瘤细胞耐药性可分为内在性（未接触药物时原已存在）以及获得性（接触药物后产生的）两大类。一般而言，肿瘤对某种药物产生耐药之后，会对结构和功能相似的药物产生交叉耐药性，但对其他非同类型药物则仍敏感。然而近年也有研究表明，培养中接触某种化疗药物而产生耐药的细胞株对其他结构和机制完全不同的药物也产生了耐药性[15]。耐药性的机制比较复杂，主要包括以下几方面：①药物的转运或摄取障碍；②药物的活化障碍；③靶酶质和量的改变；④增加利用内替的代谢途径；⑤分解酶的增加；⑥修复机制增加；⑦由于特殊的膜糖蛋白的增加，使细胞排出的药物增多；⑧DNA 链间或链内交联减少等[16,17]。而这些作用的实现依赖于肿瘤组织内多药耐药相关蛋白的表达，MRP 是一类 ATP 能量依赖性跨膜转运蛋白，广泛分布于正常组织中，但其表达水平较低，而在肿瘤组织尤其是恶性程度高的肿瘤组织中呈高水平表达[18]。MRP 不仅能够转运大量的外源和内源性物质，介导肿瘤的多药耐药，在正常情况下也担负着细胞内解毒、氧化应激反应、炎症反应、物质的运输等生理功能。

我们的研究结果显示，在骨肉瘤组织内，MRP 的 mRNA 及蛋白表达均较强，这与恶性肿瘤的生物学特征相一致。但我们的结果同时显示，在新辅助化疗的实施前后，瘤组织中的 MRP 表达没有明显变化；使用不同的新辅助化疗方案治疗，瘤组织中 MRP 的表达也没有差异。这提示我们，骨肉瘤 MRP 的表达变化与化疗的实施与否、化疗的方案选择无关，可能主要决定于肿瘤本身的组织学特点。因此在选择化疗方案之前如能了解肿瘤的 MRP 表达的情况，则可在一定程度上预测肿瘤对相应化疗方案的敏感性，更好地指导临床用药，提高化疗的治疗效果。

此外，由于本次研究的样本量不够大，检测 mRNA 表达的 RT-PCR 结果也是相对定量的方法，因此要确证骨肉瘤中 MRP 的表达与化疗实施以及化疗方案之间的关系还需要进一步进行大样本、高精度试验调查。

参考文献(References)

[1] Dai X, Ma W, He X, et al. Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(8): 177-190

[2] Hameed M, Dorfman H. Primary malignant bone tumors-recent developments[J]. Semin Diagn Pathol, 2011, 28(1):86-101

[3] Ta HT, Dass CR, Choong PFM, et al. Osteosarcoma treatment: state of the art[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2009, 28(1): 247-263

[4] D'Adamo DR. Appraising the current role of chemotherapy for the treatment of sarcoma[J]. Semin Oncol, 2011, 38 (3):19-29

[5] Melguizo C, Prados J, Rama AR, et al. Multidrug resistance and rhabdomyosarcoma[J]. Oncol Rep, 2011, 26(4): 755-761

[6] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters[J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(1): 48-58

[7] Lv Xi-fang, Wang Ying-hong. The multidrug resistance gene product in cervical carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10 (9): 1794-1797

[8] 李文婷, 王英红. 多药耐药基因与子宫颈癌化疗 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(7): 1385-1388
Li Wen-ting, Wang Ying-hong. The multidrug resistance gene and cervical cancer[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(7): 1385-1388

[9] He Ling, Zhu Fu-fan, Liu Yi-zhi. Study on the relationship between hypoxia and tumor chemotherapy resistance[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(5): 409-414

[10] Zhu Shao-hui, Li Ze-xin, Wang Jian-guo. Hepatocellular carcinoma multidrug resistance [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10 (8):1586-1588

[11] Ishikawa Y, Nagai J, Okada Y, et al. Function and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured human Y79 retinoblastoma cells[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2010, 33(3): 504-511

[12] Fallica B, Makin G, Zaman MH. Bioengineering approaches to study multidrug resistance in tumor cells [J]. Integr Biol (Camb), 2011, 3 (5): 529-539

[13] Chen ZS, Tiwari AK. Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases [J]. FEBS J, 2011, 278 (18): 3226-3245

(下转第 3927 页)

994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

brain metastases of malignant melanoma [J]. Cancer, 2011, 15;117 (8):1697-1703

[18] Oppido PA, Fiorindi A, Benvenuti L, et al. Neuroendoscopic biopsy of ventricular tumors: a multicentric experience[J]. Neurosurg Focus, 2011, 30(4):E2

[19] Yang HC, Kano H, Lunsford LD, et al. What factors predict the response of larger brain metastases to radiosurgery?[J]. Neurosurgery, 2011, 68(3):682-690

[20] Lal LS, Byfield SD, Chang EL, et al. Cost-effectiveness analysis of a randomized study comparing radiosurgery with radiosurgery and whole brain radiation therapy in patients with 1 to 3 brain metastases. Am[J]. Clin Oncol, 2012,35(1):45-50

[21] Bernad DM, Sperduto PW, Souhami L, et al. Stereotactic radiosurgery in the management of brain metastases from primary thyroid cancer[J]. Neurooncol, 2010,98(2):249-252

[22] Jagannathan J, Bourne TD, Schlesinger D, et al. Clinical and pathological characteristics of brain metastasis resected after failed radiosurgery[J]. Neurosurgery, 2010, 66(1):208-217

(上接第 3923 页)

[14] Slot AJ, Molinski SV, Cole SP. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs) [J]. Essays Biochem, 2011, 50(1): 179-207

[15] Dizdarevic S, Peters AM. Imaging of multidrug resistance in cancer [J]. Cancer Imaging, 2011, 11:1-8

[16] Baguley BC. Multidrug resistance in cancer [J]. Methods Mol Biol, 2010, 596:1-14

[17] Wu CP, Ohnuma S, Ambudkar SV. Discovering natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer chemotherapy[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2011,12(4):609-620

[18] Pajic M, Norris MD, Cohn SL, et al. The role of the multidrug resistance-associated protein1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1-2): 241-246

994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net