

· 实验研究 ·

术前化疗对乳腺癌组织中谷胱甘肽-s-转移酶- π 、P-糖蛋白和拓扑异构-Ⅱ表达的影响

杨晓文 崔明 莫平

【摘要】 目的 探讨原发性乳腺癌谷胱甘肽-s-转移酶- π (GST- π)、P-糖蛋白(P-gp)和拓扑异构酶-Ⅱ(TOPO-Ⅱ)的表达及其与化疗的关系。**方法** 通过免疫组织化学方法检测了 84 例原发性乳腺癌中 56 例术前未经任何抗肿瘤治疗组和 28 例术前辅助化疗组的肿瘤组织中 GST- π 、P-gp 和 TOPO-Ⅱ的表达情况。同时比较了 28 例术前辅助化疗组化疗前后乳腺癌组织中三者的表达阳性率。成组设计和配对设计的计数资料采用 χ^2 检验。**结果** 乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp 和 TOPO-Ⅱ表达与各病理因素无关($P > 0.050$); 28 例术前化疗组化疗前组织中的 GST- π 、P-gp 和 TOPO-Ⅱ的阳性表达率与 56 例未化疗组标本的阳性率差异无统计学意义(χ^2 值和 P 值分别为 0.45, 0.504; 0.41, 0.532; 1.20, 0.273), 但与化疗后组织中蛋白表达阳性率的差异有统计意义(χ^2 值和 P 值分别为 4.57, 0.033; 3.90, 0.048; 4.98, 0.026), GST- π 和 P-gp 的表达较化疗前明显增多, 但 TOPO-Ⅱ的表达呈下降趋势。**结论** 化疗影响了原发性乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO-Ⅱ的蛋白表达。监测其表达对乳腺癌化疗有一定的指导意义。

【关键词】 GST- π ; P-gp; TOPO-Ⅱ; 乳腺癌; 免疫组织化学; 多药耐药相关蛋白

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Impact of preoperative chemotherapy on the expressions of GST- π , P-gp and TOPO-Ⅱ in breast cancer tissues YANG Xiao-wen, CUI Ming, MO Ping .
Department of Surgery, Kunming General Hospital of Chengdu Command, Kunming 650032, China

【Abstract】 Objective To explore the expressions of GST- π , P-gp and TOPO-II and their correlation with chemotherapy in primary breast cancer. **Methods** By using immunohistochemical S-P method, the expressions of GST- π , P-gp, and TOPO-II were retrospectively compared and detected in 84 primary breast cancer cases: (the untreated group of 56 cases and the preoperative adjunctive chemotherapy group of 28 cases). The expressions of adjunctive pre- and post-chemotherapy of breast cancer in the 28 cases were also investigated. Results were analyzed using Chi square test for the numeration data of group design and paired design. **Results** The expressions of GST- π , P-gp and TOPO-II in breast cancer tissues were not associated with pathological factors ($P > 0.050$). The positive expression rates of GST- π , P-gp and TOPO-II had no statistical significance between the 28 cases with pre-chemotherapy and the 56 cases of untreated primary breast cancer, with the Chi-square value and P value of 0.45 and 0.504, 0.41 and 0.532, and 1.20 and 0.273, respectively; but had significant difference between prechemothrapy and postchemotherapy in the 28 cases, with the Chi-square value and p value of 4.57 and 0.033, 3.90 and 0.048, and 4.98 and 0.026, respectively; the positive expression rates of GST- π and P-gp of postchemotherapy increased significantly compared with pretchemotherapy, but the positive expression rate of TOPO-II showed a decrease trend after chemotherapy. **Conclusion** Chemotherapy can affect the expressions of GST- π , P-gp and TOPO-II in primary breast cancer; monitoring their expressions in breast cancer has an important guiding significance.

【 Key words 】 GST- π ; P-gp; TOPO-II; Breast neoplasms;
Immunohistochemistry; Multidrug resistance-associated proteins

化疗是乳腺癌的重要治疗方法之一,而肿瘤细胞产生的多药耐药(multidrug resistance, MDR)是乳腺癌临床化疗的一大障碍。MDR是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物出现抗药性的同时对其他结构不同、作用靶位各异的抗肿瘤药物也产生抗药性^[1]。近年的研究表明,胎盘型谷胱甘肽-s-转移酶- π (GST- π)、P-糖蛋白(P-gp)和DNA拓扑异构酶II(TOPO-II)等多种细胞内物质是肿瘤细胞产生MDR的物质基础^[2-4]。本文在此主要探讨原发性乳腺癌组织中GST- π 、P-gp和TOPO-II的蛋白表达及其与化疗的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

所有乳腺癌标本均来自2005年10月至2007年10月在本院手术治疗的

乳腺癌患者,共 84 例,年龄 28 ~ 72 岁,平均(43 ± 12.5)岁。年龄大于或等于 50 岁者 48 例,小于 50 岁者 36 例。所有术前标本均取自病理诊断时穿刺活检标本。应用 WHO 乳腺肿瘤组织学分类,浸润性导管癌 68 例,导管内癌伴早期浸润 16 例;组织学分级 I 级(G1) 22 例、II 级(G2) 41 例、III 级(G3) 21 例;肿瘤 ≤ 5 cm 63 例, > 5 cm 21 例;按 1997 年 UICC 临床分期标准:I ~ II 期 69 例,III 期 15 例;无淋巴结转移 45 例,有淋巴转移 39 例。其中 28 例行术前辅助化疗,均接受过常规化疗方案 CAF(环磷酰胺、阿霉素、氟脲嘧啶)或 CMF(环磷酰胺、氨甲蝶呤、氟脲嘧啶)3 ~ 6 个疗程。

1.2 试剂及仪器

主要试剂包括 GST- π 、P-gp 和 TOPO-II 的单克隆抗体,DAB KIT 及免疫组织化学试剂盒皆购自中杉金桥。

1.3 免疫组织化学检测方法

按免疫组织化学二步法进行检测,一抗均为鼠抗人单克隆抗体,抗体滴度均为 1:500。按试剂盒说明书操作,用 PBS 代替一抗作阴性对照。石蜡切片经脱蜡至水化,经 3% H_2O_2 消化内源性过氧化物酶,于高温 pH9.0 EDTA 抗原修复液中修复 15 min 后,充分暴露抗原,经一抗、二抗作用后,行 DAB 法显色,苏木素复染后脱水透明,中性树胶封片,镜下观察。

1.4 结果判定

GST- π 染色部位定位于细胞核与细胞质上,P-gp 定位于细胞质或细胞膜上,Topo-II 定位于细胞核。根据阳性细胞所占百分比及肿瘤细胞的染色程度进行综合评分^[5]:阳性细胞 $< 10\%$ 且染色极浅为阴性(-);阳性细胞 $\geq 10\%$ 且 $< 25\%$,染色呈淡黄色为阳性(+);阳性细胞 $\geq 25\%$ 、 $< 50\%$,染色呈棕黄色为(++);阳性细胞 $> 50\%$,染色呈棕褐色为(+++)。

1.5 统计学分析

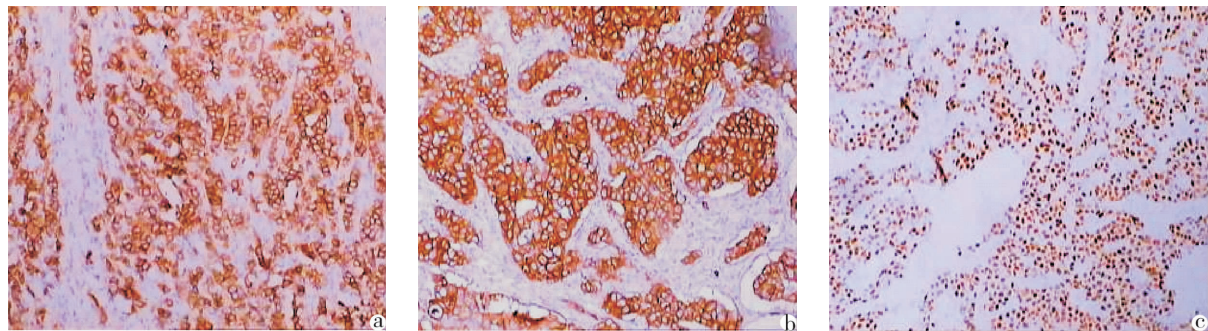
56 例未化疗组与 28 例化疗组比较采用成组设计,28 例化疗组化疗前后比较采用配对设计,结果行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。数据处理选择 SPSS13.0 统计软件包进行。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO-II 的表达

GST- π 主要定位于细胞质内,但细胞核内也可呈阳性表达(图 1a)。P-gp 主要定位于肿瘤细胞膜上,细胞质内也有少量表达(图 1b)。TOPO-II 阳性表

达均定位于细胞核内,核呈棕黄色颗粒状,分裂期瘤细胞核阳性表达特别强(图 1c)。



a: GST- π (++) (×400); b: P-gp (++) (×400); c: TOPO- II (++) (×200)

图 1 原发性乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 的免疫组织化学检测结果(S-P 染色)

2.2 乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 的表达与临床病理因素之间的关系

84 例原发性乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 的阳性表达率与患者年龄、淋巴结转移与否、ER、PR 状况无关($P>0.050$,表 1)。

表 1 84 例乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 蛋白表达与临床病理因素的关系

因素	例数	GST- π		P-gp		TOPO- II	
		阳性(例)	<i>P</i> 值	阳性(例)	<i>P</i> 值	阳性(例)	<i>P</i> 值
年龄			0.683		0.403		0.842
>50 岁	48	14		12		28	
<50 岁	36	12		12		21	
淋巴结转移			0.973		0.945		0.579
有转移	39	12		11		24	
无转移	45	14		13		25	
ER			0.285		0.832		0.089
+	33	8		9		23	
-	51	18		15		26	
PR			0.725		0.773		0.248
+	54	16		16		29	
-	30	10		8		20	
临床分期			0.692		0.857		0.470
I ~ II 期	69	22		20		39	
III 期	15	4		4		10	
组织学分级			0.943		0.855		0.666
I 级(G1)	22	7		6		12	
II 级(G2)	41	12		11		23	
III 级(G3)	21	7		7		14	

2.3 56 例术前未化疗组与 28 例术前化疗组的生物学特征比较

通过对比两组的一般资料可见,两者生物学特征相似,差异无统计学意义($P > 0.050$,表 2)。

2.4 56 例术前未化疗组与 28 例术前化疗组原发性乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 的表达

两组原发性乳腺癌组织中的 GST- π 、P-gp、TOPO- II 阳性表达率比较,差异无统计学意义($P > 0.050$,表 3)。

表 2 56 例未经化疗者与 28 例术前化疗者一般资料比较

因素	化疗组(例) ($n = 56$)	未化疗组(例) ($n = 28$)	P 值
年龄			1.000
> 50 岁	32	16	
< 50 岁	24	12	
淋巴结转移			0.063
有转移	30	9	
无转移	26	19	
ER			0.343
+	24	9	
-	32	19	
PR			1.000
+	36	18	
-	20	10	
临床分期			0.070
I ~ II 期	43	26	
III 期	13	2	
组织学分级			0.737
I 级(G1)	14	8	
II 级(G2)	29	12	
III 级(G3)	13	8	

表 3 84 例原发性乳腺癌化疗前组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 蛋白阳性表达率比较

组别	例数	GST- π		P-gp		TOPO- II	
		阳性 (例)	阳性率/ %	阳性 (例)	阳性率/ %	阳性 (例)	阳性率/ %
术前未化疗	56	16	28.57	18	32.14	35	62.50
术前化疗	28	10	35.71 ^a	6	21.43 ^a	14	50.00 ^a

a: $P > 0.05$,与术前未经化疗组比较

2.5 28 例术前辅助化疗前后乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp 和 TOPO- II 表达的对比分析

28 例术前化疗组化疗前后乳腺癌组织中的 GST- π 、P-gp、TOPO- II 蛋白表达阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.050$), GST π 和 P-gp 的表达率较化疗前明显增高,但 TOPO- II 的表达呈下降趋势($P < 0.050$,表 4)。

表 4 28 例化疗前后乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO- II 蛋白表达阳性率比较

组别	例数	GST - π		P - gp		TOPO - II	
		阳性 (例)	阳性率 (%)	阳性 (例)	阳性率 (%)	阳性 (例)	阳性率 (%)
化疗前	28	10	35.71	6	21.43	14	50.00
化疗后	28	18	64.29 ^a	13	46.43 ^a	6	21.43 ^a

a: $P < 0.05$,与化疗前组相比

3 讨论

乳腺癌是对化疗比较敏感的实体瘤之一。化疗在乳腺癌的综合治疗中起着不可替代的作用,辅助化疗的价值已得到肯定,能明显降低乳腺癌的术后复发率,使患者的 10 年生存率提高约 10%^[6]。然而乳腺癌化疗时出现的多药耐药现象仍然是临床化疗亟待解决的难题,肿瘤细胞的耐药既可表现为化疗前的原发性耐药,又可出现化疗过程中不断的获得性耐药,如有的乳腺癌初治时对化疗敏感,而经过一段时间化疗后产生抗药性。目前研究认为有多种蛋白酶参与介导 MDR 的产生,如耐药相关蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶、谷胱甘肽、拓扑异构酶等。其中 GST- π 是从胎盘纯化分离出来的肿瘤标志物^[8],通过催化谷胱甘肽和各种亲电子化合物(包括致癌剂和抗癌剂)结合的方式降解药物以减弱化疗药物对肿瘤的杀伤作用,造成癌细胞耐药。GST- π 阳性表达的肿瘤对顺铂及烷化剂具有耐受性,它的高表达可能是多药耐药的标志之一。P-gp^[7] 是 MDR1 基因的蛋白产物,其耐药机制是通过消耗 ATP 将药物从细胞内泵出到细胞外,从而降低肿瘤细胞内药物的浓度,导致多药耐药。检测 P-gp 的表达可预测乳腺癌对一些化疗药物的内源性耐药性,其高表达的肿瘤对长春新碱、长春花碱、阿霉素等高度耐药。TOPO- II^[9] 是机体重要的核酶,是许多化疗药物的靶目标,细胞内 TOPO- II 水平直接影响 TOPO- II 抑制剂的抗肿瘤活性,TOPO- II 表达的下调或性质改变都会影响 DNA 酶易解离复合物的形成,降低化疗药物的敏感性。TOPO- II 阴性表达的肿瘤可能对拓扑异构酶抑制剂类药物不敏感,这与 P-gp、GST- π 耐药机制明显不同。此外,P-gp、GST- π 、

TOPO-Ⅱ蛋白已被实验证实参与了介导肿瘤 MDR 的产生,并且 GST- π 、P-gp 高表达和 TOPO-Ⅱ低表达多与肿瘤转移潜能高、化疗疗效差、缓解率低、复发率高、生存期短等有关,可作为肿瘤患者预后的评价指标之一^[10-12]。

本研究表明术前化疗组与术前未行化疗组原发性乳腺癌患者生物学特征相似,具有可比性,乳腺癌组织中 GST- π 、P-gp、TOPO-Ⅱ的表达与患者年龄、淋巴结转移与否、ER、PR 状况以及临床病理分期、组织学分级无关,且 28 例化疗前组织中 GST- π 、P-gp 和 TOPO-Ⅱ的阳性表达率与 56 例原发性乳腺癌组织相似,但与化疗后组织中的蛋白表达阳性率间的差异有统计学意义($P < 0.050$),GST- π 和 P-gp 的表达较化疗前明显增多,TOPO-Ⅱ的表达呈下降趋势。这说明本研究采取的辅助化疗方案可能增强了肿瘤细胞的多药耐药性。因此检测 P-gp、GST- π 及 TOPO-Ⅱ可帮助临床选择合适的化疗药物,判断化疗效果及预后。同时以往的研究表明在多药耐药蛋白中,GST- π 和 P-gp 呈正相关,GST- π 的高表达更容易增强 P-gp 对进入肿瘤细胞化疗药物的外排作用^[13]。因此联合检测乳腺癌组织中多个 MDR 基因产物,一方面可以揭示乳腺癌耐药及复发机制,另一方面可以根据耐药基因产物所表达的固有耐药机制,对乳腺癌患者进行较为准确的个体化分析和评价,采用选择性的化疗方案逆转临床耐药,最终达到提高乳腺癌患者生存率的目的。

监测 GST- π 、P-gp 和 TOPO-Ⅱ的表达对乳腺癌的临床化疗具有重要的指导意义。但是三者的表达在 MDR 导致的原发性乳腺癌辅助化疗失败中是否扮演关键性角色,以及在原发性乳腺癌产生 MDR 的机制中是否存在内部联系仍然需要进一步阐明。

参考文献

- [1] 李海峰,郭健,乔振江,等. 谷胱甘肽转移酶和拓扑异构酶在乳腺癌表达的临床意义. 河北北方学院学报(医学版), 2006,23:7-9.
- [2] Gao P, Zhou G Y, Guo L L. Reversal of drug resistance in breast carcinoma cells by anti-mdr1 ribozyme regulated by the tumor-specific MUC-1 promoter. *Cancer Lett*, 2007, 256:81-89.
- [3] Beser A R, Tuzlali S, Guzey D, *et al.* HER-2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer. *Pathol Oncol Res*, 2007, 13:180-185.
- [4] Vries N A, Zhao J, Kroon E, *et al.* P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin Cancer Res*, 2007, 13:6440-6449.
- [5] 刘新兰,王程,陈萍. 耐药表型乳腺癌组织中多药耐药相关基因产物表达的研究. 宁夏医学院学报, 2008,30: 418-420.
- [6] 章莉,李杰,郭伟剑. 乳腺癌多药耐药机制研究进展. 肿瘤防治杂志,2004,11:199-202.
- [7] Ichihara T, Wanibuchi H, Taniyama T, *et al.* Inhibition of liver glutathione S-transferase placental form positive. foci

- development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori). *Cancer Lett*, 1999, 141: 211 – 218.
- [8] 倪灿荣. 胃癌 GST- π , P-gp, TOPO- II 和 nm23 H1 表达的意义. *世界华人消化杂志*, 2001, 9: 897 – 901.
- [9] 姚学清, 卿三华. 多药耐药基因在进展期大肠癌中检测及意义. *世界华人消化杂志*, 1999, 7: 535 – 536.
- [10] Casale F, D'Angelo V, Addeo R, *et al.* P-glycoprotein 170 expression and function as an adverse independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep*, 2004, 12: 1201 – 1207.
- [11] Surowiak P, Materna V, Matkowski R, *et al.* Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 2005, 7: 862 – 870.
- [12] Chou F P, Chu Y C, Hsu J D, *et al.* Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60: 643 – 650.
- [13] 王高雄, 李新丰, 孙旭日, 等. 耐药相关蛋白 P-gp、GST- π 、Topo II 在原发性肝癌中的表达及其临床意义. *中华消化外科杂志*, 2007, 6: 44 – 47.

(收稿日期: 2007-12-26)

(本文编辑: 范林军)

杨晓文, 崔明, 莫平. 术前化疗对乳腺癌组织中谷胱甘肽-s-转移酶- π 、P-糖蛋白和拓扑异构酶-II 表达的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志: 电子版*, 2009, 3(1): 60 – 67.