

耐药表型 P-gp 在骨肉瘤中的表达及其意义

王清 王瑞琳 徐瑾 熊光宜 魏典

作者单位:100095 北京市,北京市老年医院病理科(王清)

300211 天津市,天津医院病理科(王瑞琳 徐瑾 魏典 熊光宜)

通讯作者:王瑞琳,E-mail:wangruilin66@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)在骨肉瘤(osteosarcoma, OS)患者中的表达意义,以及与 OS 多药耐药(multidrug resistant, MDR)机理的联系。方法 收集 87 例 OS 病理标本,参照 2002 年 WHO 软组织和骨肿瘤病理学及遗传学分类进行组织学分型。选用 6 例骨软骨瘤(osteochondroma, OCH)和 5 例正常骨组织标本作对照。采用抗 P-gp 单克隆抗体进行免疫组织化学染色。在光镜下观察、计算每例 OS 中 P-gp 的阳性细胞数占总细胞数的百分比进行等级分组统计学处理。结果 (1) P-gp 在 OS、OCH 和正常骨组织中的阳性表达率分别为 60.92%(53/87)、16.67%(1/6)和 0%(0/5);OS 患者 P-gp 阳性表达率明显高于 OCH 和正常骨组织($P < 0.05$)。(2)P-gp 着色强度和细胞阳性率呈正相关,相关系数 $r_s = 0.940/0.983, P < 0.05$ 。(3)OS 各亚型之间 P-gp 的表达经秩和检验显示差异无统计学意义($P > 0.05$),各亚型两两之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 研究结果表明 P-gp 可能是 OS MDR 的主要作用机制;P-gp 在 OS 着色强度和细胞阳性率呈正相关;OS 各亚型之间 P-gp 的阳性表达率总体分布无统计学意义;由于 OS 中 P-gp 影响 MDR,因此在选择检测 OS 组织细胞 MDR 时,可用免疫组织化学方法检测。

【关键词】 骨肉瘤;P-糖蛋白;抗药性,多药;免疫组织化学

To evaluate the validity of expression of P-glycoprotein in prediction multidrug resistant of osteosarcoma

WANG Qing¹, WANG Rui-lin², XU Jin², et al. ¹Department of Pathology, Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China ²Department of Pathology, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

【Abstract】 Objective To detect the expression of P-gp in osteosarcoma (OS), to evaluate the validity of expression of P-gp in prediction multidrug resistant (MDR) of OS, further, to clarify the mechanism of MDR. **Methods** In this retrospective study immunohistochemical staining for P-gp was performed in 87 cases of OS according to 2002 WHO classification of pathology & genetics of soft tissue and bone tumors. This immunohistochemical staining was also performed in 6 osteochondroma(OCH) and 5 normal bone tissues(NB) as control specimens. Formalin fixed, paraffin embedded tissues in 87 cases of OS were performed using immunohistochemical stain to detect the expression of P-gp. Light microscopes were used to recognize and calculate the percentage of positive cells of P-gp. The correlation among OS, NB and OCH were analyzed with the SPSS (statistical package) using Chi-square Test. The correlation among histological subtypes of OS were analyzed by Kruskal-Wallis Independent Samples Tests. **Results** The positive expression rates of P-gp were OS 60.92% (53/87), OCH 16.67%(1/6) and NB 0%(0/5) respectively. Statistically, the difference between OS and OCH or NB was significant ($P < 0.05$). The positive expression rates of P-gp in OS increased obviously in comparison with those in OCH and NB ($P < 0.05$). The difference of positive expression rates of P-gp between histological subtypes of OS had no statistical significance ($P > 0.05$). Bivariate correlations between positive expression rates of P-gp staining and the intensity of P-gp expression had statistical significance ($r_s = 0.940/0.983, P < 0.05$). **Conclusion** Expression of P-gp may be the chief mechanism of MDR of OS and may be an important parameter to predict the prognosis of patients with OS. The intensity of P-gp is correlative with the positive rates of P-gp. The available evidence showed conclusively that the positive expression rates of P-gp among histological subtypes of OS were not different. A comparison of the histologic subtypes is dispensable when we detected the expression of P-gp in OS. To detect the expression of P-gp should be commended in OS.

【Key words】 Osteosarcoma; P-glycoprotein; Drug resistance, multiple; Immunohistochemistry

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是一种主要发生于青 少年的原发性恶性骨肿瘤,病死率极高。近 20 余年

来,尽管使用了新辅助化疗,仍有至少 1/3 的 OS 患者死于此病^[1]。究其原因,大多数患者死亡是由于 OS 肿瘤细胞对化疗药物产生多药耐药 (multidrug resistant, MDR) 导致的^[2],其机理仍然不明确。

肿瘤细胞的 MDR 是指肿瘤细胞对结构各异、作用机制各不相同的多种化疗药物的交叉耐受特性^[3]。MDR 现象广泛存在于多种肿瘤细胞中,是肿瘤成功化疗最严重的障碍之一。研究认为在肿瘤细胞中 MDR 的机制和 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)过度表达有关,这一点已经在有关实验和相关临床实践中得到证实^[3]。本研究采用免疫组织化学方法检测 OS 中 P-gp 表达,以探讨 OS MDR 的主要作用机制,并探讨 OS 中 P-gp 与 OS 组织学亚型有无关系,同时也摸索一条有效、经济、可重复和简便的方法来检测 OS 细胞的 MDR,从而为临床新辅助化疗提供可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 标本 选取天津市天津医院 1980-2007 年经病理学确诊的 OS 病例手术切除标本 87 例。OS 患者术前均未接受过化疗。OS 组织学分型参照 2002 年 WHO 骨肿瘤分类标准:其中包括成骨细胞性骨肉瘤(osteoblastic osteosarcoma, ObOS)25 例,成软骨细胞性骨肉瘤(chondroblastic osteo sarcoma, ChOS)28 例,成纤维细胞性骨肉瘤(fibroblastic osteosarcoma, FbOS)13 例,恶性纤维组织细胞瘤型骨肉瘤(malignant fibrous histiocytoma type osteosarcoma, MFHOS)9 例,小细胞瘤性骨肉瘤(small cell osteosarcoma, ScOS)5 例,血管扩张性骨肉瘤(telangiectatic osteosarcoma, TOS)5 例,富含巨细胞型骨肉瘤(giant cell rich osteosarcoma, GcOS)2 例,共计 87 例标本。另外选取 6 例骨软骨瘤(osteochondroma, OCH)和 5 例正常骨组织(normal bone tissues, NB),以及作为免疫组化阳性对照的肾脏组织,均经资深骨病理专家确诊。

1.2 抗体及相关试剂 鼠抗人 P-gp(JBS-1)单克隆抗体工作液、Supervision 抗鼠检测试剂(HRP)均购自上海长岛生物技术有限公司。二氨基联苯胺(DBA)显色试剂盒,购自北京中杉生物技术有限公司。染色相关化学试剂,均为国产分析纯试剂。

1.3 染色方法 标本经 10%福尔马林液固定,梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋,石蜡切片机 5 μm 连续切片,60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 6 h,载玻片涂 APES 防脱片胶处理。免疫组织化学染色采用 SP 法,具体步骤如下:脱蜡至水,Tris 液洗两遍,每次 5 min。0.5%甲

醇-过氧化氢封闭 30 min 以灭活内源性过氧化物酶,Tris 液洗两遍,每次 5 min;枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复,自然冷却,Tris 液洗两遍,每次 5 min。滴加 10%山羊血清室温孵育 30 min,倾去羊血清,滴加鼠抗人 P-gp 单克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。切片恢复室温 30 min,Tris 液中震洗两遍,每次 5 min。滴加 Anti-Mouse-HRP 生物素标记的二抗,室温孵育 30 min,Tris 液洗两次,每次 5 min。加 DAB 显色,镜下观察,Tris 终止显色。苏木精复染、脱水、透明封片,光镜下观察。阳性对照 P-gp 选用肾脏组织,OCH 和 NB 为阴性对照。用 Tris 液代替一抗作为空白对照。

1.4 阳性结果判定 P-gp 阳性产物呈棕黄色细颗粒状,主要定位于细胞膜,部分胞质中亦可见阳性产物,细胞膜或细胞浆内出现棕黄色颗粒判定为 P-gp 阳性细胞。按照半定量方法,每例随机观察 5 个高倍视野($\times 400$),判断标准以“+”号表示,计算阳性细胞表达数占总细胞数的百分率:< 10%为阴性;11%~25%为(+);26%~75%为(++); $\geq 76\%$ 为(+++)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计分析,OS 组与 OCH 组和 NB 组的比较采用 χ^2 检验。OS 各亚型之间 P-gp 的总体分布差异性选用多个独立样本比较的秩和检验,又将各亚型两两比较采用秩和检验。P-gp 着色强度和细胞阳性率的关系选用多元相关性分析。

2 结果

2.1 P-gp 在 OS、OCH 和 NB 中的表达 P-gp 阳性细胞镜下可见其表达产物呈棕黄色细颗粒状,轮廓清楚,主要定位于 OS 肿瘤细胞膜,部分肿瘤细胞的细胞膜和细胞浆内均出现棕黄色颗粒。P-gp 阳性细胞部分呈弥散性分布,部分呈灶性分布(见图 1-4)。

在 87 例 OS 中 P-gp 的阳性表达共 53 例为 60.92%(53/87)。其中,低表达率(+)19 例为 21.84%(19/87),中表达率(++)20 例为 22.99%(20/87),高表达率(+++)14 例为 16.09%(14/87);在 6 例 OCH 中仅有 1 例 P-gp 的表达呈阳性,为 16.67%;在 5 例正常骨组织中 P-gp 的表达均为阴性。

经 χ^2 检验结果显示 OS 中 P-gp 的表达率与 OCH、NB 比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),P-gp 表达率均高于 OCH 和 NB。详见表 1。

2.2 P-gp 在 OS 各亚型中的表达 为了进一步明确 OS 中 ObOS、ChOS、FbOS、MFHOS、TOS、ScOS、GcOS 各亚型 P-gp 表达有无差异,经多个独立样本比较的秩和检验,结果显示 OS 各亚型之间 P-gp 的总体分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 2。

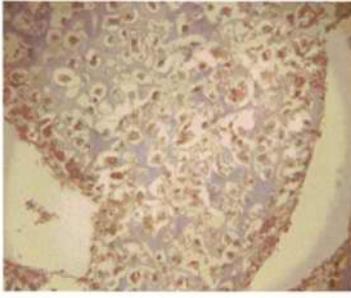
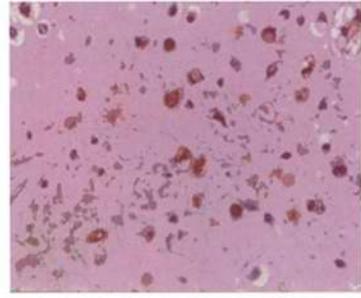
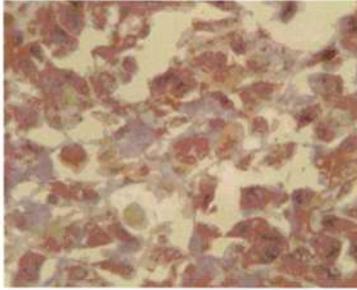
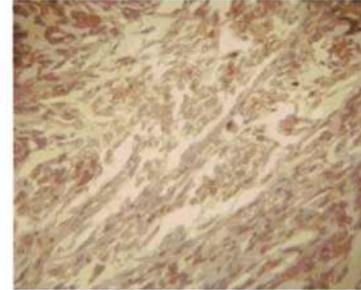
图 1 OS(成骨细胞性)细胞 P-gp 阳性表达($\times 200$)图 3 OS(成软骨细胞性)细胞 P-gp 阳性表达($\times 400$)图 2 OS(成骨细胞性)细胞 P-gp 阳性表达($\times 400$)图 4 OS(成纤维细胞性)细胞 P-gp 阳性表达($\times 200$)

表 1 P-gp 在 OS、OCH 和 NB 中的表达

组别	例数	P-gp			$\chi^2(P)$ 值
		+	-	阳性率(%)	
OS 组	87	53	34	60.92	6.106 ^① (0.013)
OCH 组	6	1	5	16.67	
NB 组	5	0	5	0	7.219 ^② (0.007)
合计	98	54	44		

注：^{①②}分别代表 P-gp 在 OS 中的表达与 OCH、NB 比较的 χ^2 值，括号内为相应的 P 值(下表均同)

表 2 87 例 OS 中各亚型 P-gp 表达的等级比较

等级	例数	ChOS	FbOS	MFHOS	ScOS	TOS	GcOS	ObOS	$\chi^2(P)$ 值
-	34	10	4	5	2	2	0	11	8.89 (0.18)
+	19	5	4	1	1	0	0	8	
++	20	7	3	2	1	3	1	3	
+++	14	6	2	1	1	0	1	3	
合计	87	28	13	9	5	5	2	25	

为了明确 OS 中 ObOS、ChOS、FbOS、MFHOS、TOS、ScOS、GcOS 各亚型两两之间 P-gp 表达有无差异,经两两比较秩和检验,结果显示各亚型两两之间 P-gp 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 3。

2.3 P-gp 构成比分析 在 OS 阳性构成比中 P-gp 强阳性(+++)表达例数为 14 例,占构成比 16.1% (14/87);阴性表达例数 34 例,占构成比 39.1% (34/

87)。

P-gp 着色强度与细胞阳性率的关系,经多元相关分析,结果显示 P-gp 着色强度与细胞阳性率呈正相关(相关系数 $r_s = 0.940/0.983, P < 0.05$)。

3 讨论

OS 是一种主要发生于青少年的原发性恶性肿瘤,1970 年以前标准治疗主要是截肢术,但 5 年生存率在 10%左右。自 1970 年代首创大剂量氮甲

喋呤等新辅助化疗治疗 OS 以来,5 年生存率已达到 60%。但 80% 的患者在确诊时已有微小转移,有近一半患者在 2~3 年内死于肺转移。Bruheim 等^[1]研究 OS 耐药细胞株时,认为化疗联合外科手术是控制 OS 的有效方法,但是尽管使用了新辅助化疗,仍有至少 1/3 的 OS 患者死于此病。究其原因,大多数患者死亡是由于 OS 肿瘤细胞对化疗药物产生 MDR 导致的^[2]。

MDR 一词是由 Biedler 等^[3]于 1970 年提出的,他们用化疗药物逐级诱导建立了 MDR 细胞株,在体外发现了 MDR 现象。肿瘤细胞的 MDR 是指肿瘤细胞对结构各异、作用机制各不相同的多种化疗药物的交叉耐受特性。哺乳动物的 MDR 基因是一个小家族,在人类由 MDR1 和 MDR3 组成。研究^[4]表明:仅 MDR1 基因及其产物决定细胞的 MDR 表型,MDR3 和胆汁盐的转运有关。人的 MDR1 基因组定位在(7q21.1),含 28 个外显子,转录 4.5 Kb 的 mRNA,编码由 1280 个氨基酸组成的蛋白质。MDR1 基因的表达产物定位于细胞膜,是一种相对分子质量为 170×10^3 的浆膜糖蛋白,故称 P-170 蛋白或 P-gp,是转运蛋白中的一种。不仅在各种肿瘤细胞表达,也在正常组织表达,这与人体组织防御系统的生理功能有关。

P-gp 由两个等长的同源部分组成,两部分的同源性接近 80%。在其每一部分均含有 6 个疏水的跨膜区和一个 ATP 结合位点。从 P-gp 的结构推测和后来的试验证实,该蛋白是一种能量依赖型细胞膜转运系统蛋白质,起外排泵作用,由 ATP 供能,P-gp 将细胞内化疗药物逆浓度泵至细胞外。其数量增加将导致药物排出增加以及细胞内药物浓度减少,使细胞内化疗药物达不到有效杀伤剂量而产生耐药性。有很多底物如蒽环类抗肿瘤药、长春碱类、抗生素类以及相关非细胞毒素类。人们研究认为在肿瘤细胞中 MDR 的机制和 P-gp 过度表达有关,这一点已经在有关实验和相关临床实践中得到证实^[5,6]。

2008 年 Zeng 等^[7]研究 OS MDR 表型的分化特征过程中发现,P-gp 的表达预示着 OS 向成熟分化,而这一分化状态是多种因素、多种分子生物学行为的结果。

肿瘤细胞 MDR 现象分两类,一类是内在性耐药,肿瘤细胞耐药现象在开始化疗前就存在,即对药物具有抗药性,称内在性耐药或天然耐药。另一类,获得性耐药,表现为肿瘤细胞初始对化疗敏感,但经过数疗程化疗后,肿瘤细胞对化疗药物产生了抗药性,而且除对化疗药物本身产生抗药性外,还对其它结构和作用机理不同的多种药物也同时产生交叉耐药。Lee 等^[8]监测 7 例 OS 患者 MDR1/mRNA,发现肿瘤内不同部位,化疗前后及转移前后 MDR1/mRNA 表达无差异,提示内在性耐药细胞群的存在是 OS 化疗失败的主要原因。

本研究通过免疫组化方法对 87 例 OS 组织标本进行染色,结果显示 OS 患者 P-gp 表达明显高于 NB 和 OCH。由此,可以推测 P-gp 可能是 OS 的主要作用机制。OS 的各亚型之间 P-gp 的表达差异无统计学意义,因此在分析 OS 中 P-gp 的表达时可以不考虑 OS 亚型的因素。

关于着色强度和阳性率哪个更有意义,Beck 等^[9]国际 MDR 合作组织认为目前难分高低。本组结果通过多元相关分析表明 P-gp 着色强度与细胞阳性率呈正相关。沈靖南等^[10]的研究也证明 P-gp 着色强度和 P-gp 阳性率呈等级正相关,和本研究的结果一致。文章还认为部分 OS 病例随访未到 12 个月时,P-gp 着色强度是唯一的与预后呈负相关的指标,但随访期超过 1 年后,P-gp 着色强度和阳性率都显示有统计学意义。

本文的实验结果表明 OS 中 P-gp 阳性表达明显高于 OCH 和 NB,P-gp 可能是 OS MDR 的主要作用机制。研究结果还表明 P-gp 与化疗前的 OS 组织学分型无关,在分析 OS 中 P-gp 的表达时可以不考虑 OS 的亚型。另外化疗前 OS 的 P-gp 在 OS 中的表

表 3 OS 中各亚型 P-gp 表达两两比较 $\chi^2(P)$ 统计结果

亚型	ObOS	ChOS	FbOS	MFHOS	ScOS	TOS
ChOS	3.515(0.06)	-	-	-	-	-
FbOS	1.298(0.255)	0.305(0.581)	-	-	-	-
MFHOS	0.027(0.870)	1.525(0.217)	0.380(0.537)	-	-	-
ScOS	0.256(0.613)	0.003(0.960)	0.250(0.617)	0.793(0.373)	-	-
TOS	1.343(0.247)	0.031(0.859)	0.040(0.842)	0.565(0.452)	0.044(0.834)	-
GcOS	3.754(0.053)	1.474(0.225)	1.893(0.169)	2.471(0.116)	0.611(0.434)	1.35(0.24)

达水平与临床抗 MDR 治疗预后和疗效尚需进一步评价。

2003 年 Pakos 等^[11]采用免疫组织化学方法检测 OS 中 P-gp, 结果显示 P-gp 表达与病程进展强相关。2006 年戴闽等^[12]通过研究认为, OS 组织中 P-gp 表达对化疗预后有一定的应用价值。

本文实验结果显示在 OS 中 P-gp 总的阳性表达率 60.92%, 从而可以认为免疫组织化学方法是检测 OS 肿瘤组织 MDR 有效、经济、可重复和简便的方法, 再结合半定量方法, 可为临床化疗及预后评估提供可靠依据。对于 P-gp 与临床的预后和治疗, 以及由此引出的 MDR 逆转录剂等的研究, 还有待进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Bruheim S, Bruland OS, Breistol K, et al. Human osteosarcoma xenografts and their sensitivity to chemotherapy. *Pathol Oncol Res*, 2004, 10:133-141.
- 2 于秀淳, 刘晓平, 周银, 等. 化疗对骨肉瘤患者淋巴瘤 P170 蛋白表达的影响及意义. *中国矫形外科杂志*, 2004, 12:707-709.
- 3 Biedler JL, Riehm H. Cellular resistance to actionmycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance radioautographic and cytogenetic studies. *Cancer Res*, 1970, 30:1174-1184.
- 4 Susa M, Iyer AK, Ryu K, et al. Inhibition of ABCB1(MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma. *PLoS One*, 2010, 5:e10764.

- 5 Okada T, Tanaka K, Nakatani F, et al. Involvement of P-glycoprotein and MRP1 in resistance to cyclic tetrapeptide subfamily of histone deacetylase inhibitors in the drug-resistant osteosarcoma and Ewing's sarcoma cells. *Int J Cancer*, 2006, 118:90-97.
- 6 Matsubara H, Watanabe M, Imai T, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase activation in human osteosarcoma cell resistance to the histone deacetylase inhibitor FK228 [(1S,4S,7Z,10S,16E,21R)-7-ethylidene-4,21-bis (propan-2-yl)-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo[8.7.6]tricos-16-ene-3,6,9,19,22-pentone]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328:839-848.
- 7 Zeng H, Chen AM, Li F, et al. Analysis of differentiation characters in osteosarcoma Mdr sublines. *Zhongguo Gu Shang*, 2008, 21:368-372.
- 8 Lee PD, Nobel-Topham SE, Bell RS, et al. Quantitative analysis of multidrug resistance gene expression in human osteosarcoma. *Br J Cancer*, 1996, 74:1046-1050.
- 9 Beck WT, Gorgan TM, Willman CL, et al. Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res*, 1996, 56:3010-3020.
- 10 沈靖南, 王晋, 韩士英, 等. 骨肉瘤 P-糖蛋白表达水平与肺转移. *中华骨科杂志*, 2000, 20:17-20.
- 11 Pakos EE, Ioannidis JP. The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. *Cancer*, 2003, 98:581-589.
- 12 戴闽, 聂涛, 万细珍, 等. 骨肉瘤中 P-糖蛋白、Survivin 的表达与化疗疗效的关系. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14:687-689.

(收稿日期: 2010-11-05)

(本文编辑: 杨军)

致谢

《实用检验医师杂志》编辑部全体工作人员衷心感谢以下编委/专家对本刊出版的大力支持! (姓名以拼音为序)

- | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 高 硕 | 胡志东 | 焦连亭 | 康熙雄 | 李会强 | 李连青 | 李筱梅 |
| 李玉明 | 刘 蕊 | 刘树业 | 刘运德 | 毛远丽 | 彭 林 | 田亚平 |
| 王瑞琳 | 魏殿军 | 魏 来 | 魏路清 | 徐国宾 | 徐英春 | 鄢盛恺 |
| 张会英 | 张 曼 | 张 鹏 | 郑永刚 | | | |