

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01171

## 耐药蛋白 P-gp、BCRP 及 LRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中表达的比较

刘新兰<sup>1\*</sup>, 黄英<sup>2</sup>, 李云霞<sup>1</sup>, 段瑜<sup>2</sup>

1. 宁夏医科大学附属医院肿瘤内科, 银川 750004

2. 宁夏医科大学临床医学院肿瘤学系, 银川 750004

**[摘要]** **目的** 研究 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer drug resistance protein, BCRP)和肺耐药蛋白(pulmonary resistance protein, LRP)在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中表达的差异。**方法** 采用免疫组织化学染色法检测 126 例乳腺癌患者的原发灶和 66 例腋淋巴结转移灶中 P-gp、BCRP、LRP 的表达。**结果** (1)P-gp、BCRP 及 LRP 在乳腺癌原发灶中的阳性表达率分别为 41.27%(52/126)、38.89%(49/126)、65.87%(83/126), 在腋淋巴结转移灶中阳性表达率分别为 59.09%(39/66)、63.64%(42/66)、60.61%(40/66)。P-gp、BCRP 在乳腺癌淋巴结转移灶中的表达高于原发灶( $P<0.05$ ), LRP 在原发灶和淋巴结转移灶之间的表达差异无统计学意义。(2)P-gp、BCRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中表达差异没有统计学意义( $P<0.01$ ), Kappa 值分别为 0.276、0.356; LRP 在原发灶和淋巴结转移灶中的表达差异没有统计学意义( $P>0.05$ )。(3)乳腺癌原发灶中 2 个耐药蛋白共表达率为 35.71%(45/126), 3 个耐药蛋白同时表达的阳性率为 15.08%(19/126), 有 2 个或 3 个耐药蛋白共表达率为 50.79%(64/126), 高于单独阳性表达率 33.33%(42/126,  $P<0.05$ )。腋淋巴结转移灶中 2 个耐药蛋白共表达率为 53.03%(35/66), 高于单独阳性表达率(27.27% [18/66],  $P<0.05$ ); 3 个耐药蛋白同时表达的阳性率为 16.67%(11/66), 有 2 个或 3 个耐药蛋白共表达率为 69.70%(46/66), 高于单独阳性表达率( $P<0.01$ )。腋淋巴结转移灶中 2 个耐药蛋白共表达率及 2 个或 3 个耐药蛋白共表达率均高于乳腺癌原发灶中的表达( $P<0.05$ )。(4)Kaplan-Meier 生存分析结果表明, 乳腺癌腋淋巴结转移灶中 P-gp、BCRP 及 LRP 阳性表达者 5 年总生存期较原发灶耐药蛋白阳性者低( $P<0.05$ )。**结论** 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中的 P-gp、BCRP 表达差异有统计学意义, LRP 表达则没有明显差异; 多个耐药蛋白共表达协同作用为耐药的主要特征, 腋淋巴结转移灶中可能具有更强的耐药性。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; 腋淋巴结转移灶; P 糖蛋白; 乳腺癌耐药蛋白; 肺耐药蛋白

**[中图分类号]** R 737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1171-05

### Expressions of resistance proteins P-gp, BCRP and LRP: a comparison between primary and metastatic breast carcinoma

LIU Xin-lan<sup>1\*</sup>, HUANG Ying<sup>2</sup>, LI Yun-xia<sup>1</sup>, DUAN Yu<sup>2</sup>

1. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

2. Department of Oncology, Clinical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the differences in expressions of P-glycoprotein (P-gp), breast cancer drug resistance protein (BCRP) and pulmonary resistance protein (LRP) between primary breast carcinoma and metastatic lymph nodes. **Methods** The expressions of P-gp, BCRP and LRP in breast cancer tissues, including 126 primary carcinoma and 66 metastasis lymph nodes, were determined immunohistochemically on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sections. **Results** (1)The positive expression rates of P-gp, BCRP and LRP were 41.27%(52/126), 38.89%(49/126), and 65.87%(83/126) in primary breast carcinoma, and were 59.09%(39/66), 63.64%(42/66), and 60.61%(40/66) in metastatic lymph nodes, respectively. The positive rates of P-gp and BCRP in the metastatic lymph nodes were significantly higher than those in primary cancer tissue( $P<0.05$ ); there was no significant difference in expression of LRP ( $P>0.05$ ). (2) There was a poor consistency in P-gp and BCRP expression between the primary and metastatic sites( $P<0.01$ , Kappa value were 0.276 and 0.356); there was a consistency in LRP expression between the primary and metastatic sites( $P>0.05$ ). (3) The co-expression rate of two resistance proteins in primary breast carcinoma was 35.71%(45/126), of three resistance proteins was 15.08%(19/

**[收稿日期]** 2011-07-14

**[接受日期]** 2011-10-09

**[基金项目]** 宁夏高等学校科学研究项目(2006014). Supported by Higher Institution Research Project of Ningxia(2006014).

**[作者简介]** 刘新兰, 教授、主任医师, 硕士生导师. E-mail: huangying403@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0951-6743471, E-mail: liuxinlan@csc.org.cn

126), and of two or three resistance proteins was 50.79% (64/126), being significantly higher than that of a single protein 33.33% (42/126,  $P < 0.05$ ). The co-expression rate of two resistance proteins in metastasis lymph nodes was 53.03% (35/66), which was significantly higher than that of a single protein 27.27% (18/66,  $P < 0.05$ ). The co-expression rate of three resistance proteins was 16.67% (11/66), two or three resistance proteins was 69.70% (46/66), which was significantly higher than that of a single protein ( $P < 0.01$ ). Both the co-expression levels of two resistance proteins and two or three resistance proteins in metastatic lymph nodes were significantly higher than those in primary cancer ( $P < 0.05$ ). (4) Kaplan-Meier analyses revealed that patients with P-gp, BCRP and LRP expressed in the metastatic lymph nodes had a lower 5-year survival rate compared with patients whose primary breast cancer being positive for them. **Conclusion** The expression of P-gp and BCRP is different between the primary and metastatic breast cancer sites, and there is no significant difference in LRP expression. Coordination of multi-protein expression is a major feature of resistance. Metastasis lymph nodes may have a stronger resistance.

**[Key words]** breast neoplasms; metastatic lymph nodes; P-glycoprotein; breast cancer drug resistance protein; pulmonary resistance protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11): 1171-1175]

导致乳腺癌患者死亡的最主要原因是侵袭和转移,术后辅助治疗的目的是清除微小转移灶。化学药物治疗在乳腺癌的综合治疗中占有重要地位,但目前化疗在肿瘤治疗中的有效率仅为 40%~80%<sup>[1]</sup>,这与肿瘤的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)有关。1970年, Biedler 和 Riehm<sup>[2]</sup>首先发现了 MDR 现象。肿瘤细胞耐药是导致化学治疗失败的一个主要原因。国内外学者对于肿瘤原发灶的耐药基因及其蛋白进行了研究,但对于腋淋巴结转移灶的研究报道较少,且转移灶是否与原发灶癌具有相同的耐药蛋白的表达目前还不清楚。本研究采用免疫组织化学法同时检测 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer drug resistance protein, BCRP)和肺耐药蛋白(pulmonary resistance protein, LRP)在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶的表达,分析它们表达的差异,为乳腺癌化疗方案的制定和侵袭转移的评估提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 临床资料 选取 2002 年 1 月至 2007 年 12 月在宁夏医科大学附属医院进行手术治疗并经病理证实的女性乳腺癌患者 126 例,其中 66 例伴有腋淋巴结转移。全部患者术前均未经任何药物或者其他辅助方法抗肿瘤治疗。年龄 27~73 岁,中位年龄 47.5 岁。依据 WHO 乳腺肿瘤组织学分类标准进行分类,其中浸润性乳腺癌为 103 例、非浸润性乳腺癌为 23 例;根据国际抗癌联盟联合制定的 TNM 标准分期进行分类, I 期为 24 例、II 期为 69 例、III 期为 24 例、IV 期为 9 例。

1.2 方法 所有标本均经 10% 中性甲醛溶液固定,

石蜡包埋,连续制成 4  $\mu\text{m}$  厚切片若干张,进行 SP 法染色。每例标本选 4 张切片,1 张用于 H-E 染色,其余 3 张用于 IHC 染色,所加一抗分别为抗 P-gp 抗体、抗 BCRP 抗体和抗 LRP 抗体(3 种抗体均为特异性单克隆抗体)。所有试剂购自福州迈新生物技术开发有限公司和美国 PTGLAB 公司。用已知肿瘤组织阳性片作阳性对照,用正常动物血清代替一抗作阴性对照。实验步骤按试剂盒说明书进行,严格控制实验条件。

1.3 结果判定 由 2 位病理医师采用双盲法独立对染色结果进行评判。依照 Fromowitz 综合计分法<sup>[1]</sup>同时对染色强度及阳性细胞所占百分比进行评分。阳性细胞染色强度评分:无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;阳性细胞所占百分比评分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞  $\leq 25\%$ , 2 分为 26%~50%, 3 分为 51%~75%, 4 分为  $> 75\%$ 。染色强度与阳性细胞百分比的积分相加:0~1 分为(-), 2~3 分为(±), 4~5 分为(+), 6~7 分为(++) ,其中(-)和(±)判为阴性,(+)和(++)判为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件包进行统计分析。原发灶和转移灶中耐药蛋白的表达差异用非参数检验,表达的一致性检验使用 Kappa 检验,用 Kaplan-Meier 法计算生存曲线,并用 Log-rank 法进行显著性检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 P-gp、BCRP 及 LRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中的表达 P-gp 和 LRP 效应产物主要定位于细胞质和细胞膜,BCRP 效应产物主要定位于

细胞核及核膜, 均呈棕黄色颗粒弥漫或散在分布。结果显示 P-gp、BCRP、LRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中均有表达(图 1), 在乳腺癌原发灶中的阳性表达率分别为 41. 27% (52/126)、38. 89% (49/126)、65. 87% (83/126), 在腋淋巴结转移灶中阳性表达率分别为 59. 09% (39/66)、63. 64% (42/66)、60. 61% (40/66)。P-gp、BCRP 在乳腺癌腋淋巴结转移灶中的阳性表达高于原发灶( $\chi^2 = 5. 517, P =$

$0. 019; \chi^2 = 10. 639, P = 0. 001$ ), LRP 在原发灶和腋淋巴结转移灶之间的表达差异无统计学意义( $\chi^2 = 0. 522, P = 0. 470$ )。P-gp 及 BCRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中的表达差异有统计学意义( $P < 0. 01$ ), Kappa 值分别为 0. 276、0. 356。LRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中的表达差异没有统计学意义( $P > 0. 05$ )。

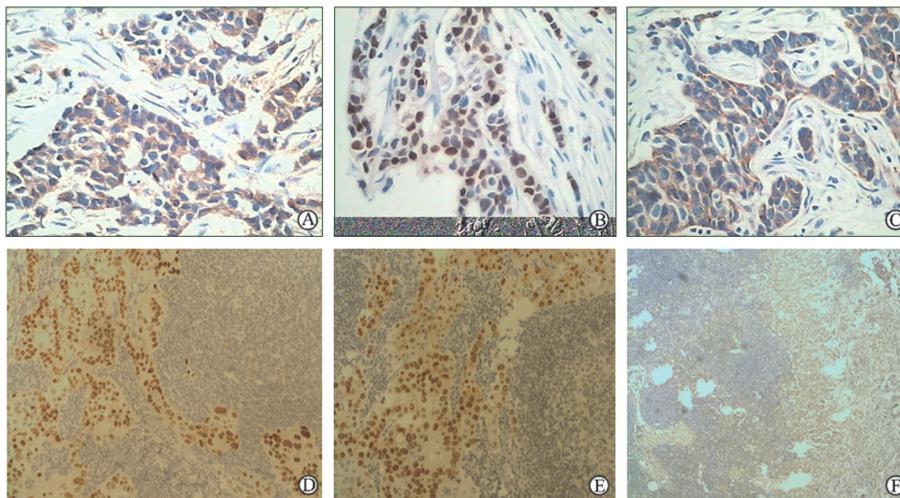


图 1 乳腺癌原发灶(A~C)和腋淋巴结转移灶(D~F)中 P-gp(A、D)、BCRP(B、E)及 LRP(C、F)的表达

Fig 1 Expression of P-gp(A, D), BCRP(B, E) and LRP(C, F) in primary breast carcinoma(A-C) and metastatic lymph nodes(D-F, SP method)

A: P-gp in primary cancer site; B: BCRP in primary cancer site; C: LRP in primary cancer site; D: P-gp in metastatic lymph nodes; E: BCRP in metastatic lymph nodes; F: LRP in metastatic lymph nodes. Original magnification:  $\times 200$

2.2 P-gp、BCRP 及 LRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中的共表达 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中同时检测 3 种耐药蛋白, 均可出现 3 种耐药蛋白表达皆阴性、单一耐药蛋白阳性表达、2 个及 3 个耐药蛋白共表达等 4 种情况。其中乳腺癌原发灶中单独耐药蛋白阳性表达率为 33. 33%, 有 2 个耐药蛋白共表达率为 35. 71%, 两者相比较差异无统计学意义( $P > 0. 05$ ); 3 个耐药蛋白同时表达的阳性率为 15. 08%, 有 2 个或 3 个耐药蛋白共表达率为 50. 79%, 高于单独阳性表达率( $P < 0. 05$ )。腋淋巴结转移灶中 2 个耐药蛋白共表达率为 53. 03%, 高于单独阳性表达率(27. 27%,  $P < 0. 05$ ); 3 个耐药蛋白同时表达的阳性率为 16. 67%, 有 2 个或 3 个耐药蛋白共表达率为 69. 70%, 高于单独阳性表达率( $P < 0. 01$ )。腋淋巴结转移灶中 2 个耐药蛋白共表达率高于原发灶, 差异有统计学意义( $P < 0. 05$ )。腋淋巴结转移灶中 2 个或 3 个耐药蛋白共表达率高于乳腺癌原发灶中的表达, 差异有统计学意义( $P <$

$0. 01$ ), 见表 1。

表 1 P-gp、BCRP 及 LRP 在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中的共表达

Tab 1 Co-expression of resistance protein P-gp, BCRP and LRP in primary and metastatic lymph nodes

Group	Positive expression	
	Primary (N=126)	Metastatic lymph nodes (N=66)
Negative of all	20(15. 87)	2(3. 03)
Single protein	42(33. 33)	18(27. 27)
P-gp+BCRP	14(11. 11) *	13(19. 70) *△
P-gp+LRP	18(14. 29) *	12(18. 18) *△
BCRP+LRP	13(10. 32) *	10(15. 15) *△
P-gp+BCRP+LRP	19(15. 08) **	11(16. 67) **△△

\*  $P < 0. 05$ , \*\*  $P < 0. 01$  vs single protein; △  $P < 0. 05$ , △△  $P < 0. 01$  vs primary

2.3 P-gp、BCRP 及 LRP 在原发灶和腋淋巴结转移灶中表达与乳腺癌患者预后的关系 随访病例 76 例, 伴有腋淋巴结转移 43 例, 不伴有淋巴结转移

33例。Kaplan-Meier生存分析结果(图2)表明,腋淋巴结转移灶中3种耐药蛋白阳性表达者的5年生存率分别为15.2%、14.3%及17.95%,原发灶中3种耐药蛋白阳性表达者的5年生存率分别为28.6%、26.3%及31.6%;转移灶中耐药蛋白阴性

表达者5年生存率分别为21.1%、20.0%及30.0%,原发灶中3种耐药蛋白表达皆阴性者5年生存率分别为40%、31.6%及31.6%,各组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图2。

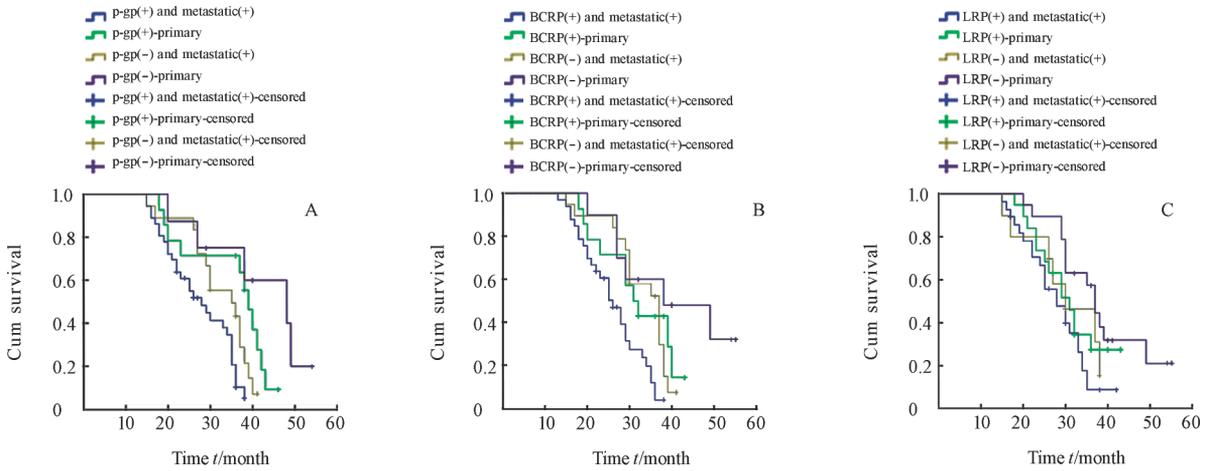


图2 P-gp(A)、BCRP(B)、LRP(C)在原发灶和淋巴结转移灶中不同表达的5年总生存曲线图

Fig 2 Five year overall survival curves of primary and metastasis tissues with different P-gp (A), BCRP (B), and LRP (C) expressions

Log-rank test:  $P = 0.000$  (P-gp);  $P = 0.001$  (BCRP);  $P = 0.048$  (LRP)

### 3 讨论

P-糖蛋白是多药耐药基因编码的产物,它主要分布于细胞膜,含1280个氨基酸残基,相对分子质量为170000。其生物活性具有膜的药泵作用,能主动泵出进入肿瘤细胞内的化疗药物,使肿瘤细胞内抗癌药物蓄积减少,从而产生耐药性。BCRP是Doyle等<sup>[3]</sup>于1998年分离出一种新的ABC转运蛋白,含有633个氨基酸残基,是相对分子质量为72600的跨膜半转运蛋白,也具有将化疗药物如米托蒽醌、多柔比星等从肿瘤细胞“泵出”的作用。LRP由荷兰学者Schepers等<sup>[4]</sup>于1993年首次报道,是一种膜转运糖蛋白,其相对分子质量为110000。本实验结果显示P-gp、BCRP在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中均有表达,且转移灶中的表达率高于原发灶。这预示着乳腺癌P-gp、BCRP阳性表达者,其腋淋巴结转移灶中可能存在更强的耐药性,故化疗的有效率可能更低,其肿瘤的侵袭性可能更强,从而导致患者的预后较差。因此,我们认为P-gp、BCRP阳性表达者,对原发灶敏感的化疗方案对于转移灶的敏感性可能较低,需更换化疗方案或治疗方法以提高疗效。这与文献<sup>[5-9]</sup>报道的结果相符。

我们的前期研究也证实P-gp、BCRP表达与乳腺癌的侵袭转移密切相关<sup>[10]</sup>。另外本实验结果还显示LRP在乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中均有表达,但它们的表达差异无统计学意义,提示化疗方案对原发癌灶敏感者,对转移癌灶亦敏感。这与王文静等<sup>[11]</sup>的研究结果一致。

转移灶和原发灶中耐药蛋白的生物学特性是否一致是人们非常关注的问题。本实验结果显示乳腺癌原发灶和腋淋巴结转移灶中P-gp、BCRP表达的一致性差,这可能意味着肿瘤转移灶中P-gp、BCRP的生物学特性可能发生了某种变化,存在异质性,从而导致乳腺癌腋淋巴结转移灶中耐药蛋白的表达高于原发灶中的表达,提示不能用乳腺原发灶的耐药性来预测腋窝转移灶的耐药性。而原发灶和淋巴结转移灶中LRP的表达无差异性,一致性较好,说明腋淋巴结转移灶中LRP的生物学特性未发生变化,没有表现明显的异质性。

肿瘤耐药是多基因、多步骤、多因素综合作用的结果。本实验结果显示在乳腺癌耐药机制中单一蛋白的作用较弱,原发灶和腋淋巴结转移灶均以多个耐药蛋白共表达协同作用为主要特征,且转移灶中2个耐药蛋白共表达、2个或3个共表达率高于原发

灶,提示腋淋巴结转移灶中多药耐药蛋白共表达的协同作用更为显著。Kaplan-Meier 生存分析结果表明,乳腺癌腋淋巴结阳性并伴有耐药蛋白表达者 5 年总生存率较原发灶耐药蛋白阳性者低 ( $P < 0.05$ ),且原发灶不伴有耐药蛋白阳性表达者其 5 年总生存率增加 ( $P < 0.01$ )。因此转移灶中存在更强的耐药性,其化疗的有效率更低、侵袭性更强,从而导致伴有淋巴结转移的患者预后较差、病死率较高。故对于伴有淋巴结转移的患者,需根据其耐药蛋白表达的情况来制定化疗方案,而不是沿用对于其原发灶敏感的化疗方案。因此,联合检测多个耐药蛋白,可为乳腺癌患者判断预后、指导化疗及制定个体化治疗方案提供一定的理论依据。

### [参考文献]

- [1] 邵志敏,沈镇宙. 乳腺肿瘤学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2005:228-234.
- [2] Biedler J L, Riehm H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies[J]. *Cancer Res*, 1970, 30:1174-1184.
- [3] Doyle L A, Yang W, Abruzzo L V, Kroghmann T, Gao Y, Rishi A K, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:15665-15670.
- [4] Scheper R J, Broxterman H J, Scheffer G L, Kaaijk P, Dalton W S, van Heijningen T H, et al. Overexpression of a  $M_r$  110 000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance[J]. *Cancer Res*, 1993, 53:1475-1479.
- [5] 卢列盛,宋科瑛,王瑞涛,虞佩,柯卫峰,李克. 乳腺癌原发灶和淋巴结转移灶 MDR1 mRNA 表达及与临床指标的相关性分析[J]. *中国肿瘤*, 2009, 29:276-279.
- [6] Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S, Purcell R, Moran E, Crown J, et al. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study[J]. *Int J Cancer*, 2004, 112:286-294.
- [7] Rybárová S, Hodorová I, Hajduková M, Schmidtová K, Mojzís J, Kajo K, et al. Expression of MDR proteins in breast cancer and its correlation with some clinical and pathological parameters[J]. *Neoplasma*, 2006, 53:128-135.
- [8] 崔涛,朱祖安,刘莹,杨雪梅. NF- $\kappa$ B、P-gp、c-erbB-2 蛋白在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2008, 48:33-35.
- [9] 颜红柱,余宏宇,刘会敏,沈周,何金,李玉莉. 浸润性乳腺癌中耐药基因蛋白 MRP1 和 BCRP 的表达及临床病理意义[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32:216-219.
- [10] 崔洁,刘新兰,王宁菊. 三种耐药相关基因及其蛋白在乳腺癌组织中的表达和意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 3:1164-1170.
- [11] 王文静,王明玉,阎凤霞. LRP 与 MRP 在乳腺癌组织中的表达及意义[J]. *山东医药*, 2007, 47:4-6.

[本文编辑] 商素芳

## 《军医大学学报(英文版)》征稿、征订启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行人(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的高级药理学综合性英文学术刊物,1986年6月创刊。本刊主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛、基础研究、临床研究、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统,已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)和波兰《哥白尼索引》(IC)等国际知名检索系统收录,期刊全文已进入爱思唯尔(Elsevier)科技出版集团所属的 ScienceDirect 全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>)。

为了弘扬科研创新精神,推动医学事业发展,促进海内外学术交流,本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求:来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和 3~8 个关键词,参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话,编辑部在接到稿件 30 日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期:由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿,对审稿通过的论文 2~6 个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

本刊为双月刊,A4 开本,80 g 铜版纸彩色印刷,每期定价 15 元,全年 90 元。可在当地邮局订阅(邮发代号 4-725),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址:上海市翔殷路 800 号《军医大学学报(英文版)》编辑部,邮编:200433

联系人:徐佳

电话:021-81870788 转 818 分机

E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn