

肺癌组织中 FHIT 蛋白的表达及其与 MDR1 的关系

杨志慧,刘惠敏*,孙 静,何 金,王良哲,徐 毅

(第二军医大学长征医院病理科,上海 200003)

[摘要] 目的:观察肺癌组织中 FHIT 的表达及其与 MDR1 蛋白的关系,探讨其表达变化的临床意义。方法:免疫组化 S-P 法检测肺癌组织及其癌旁组织($n=60$)中 FHIT 蛋白以及肺癌组织中 MDR1 蛋白的表达,分析在肺癌不同临床病理指标下 FHIT 蛋白的表达情况,并分析其在肺癌组织中 MDR1 表达的关系。结果:FHIT 在癌旁组织中的阳性表达率明显高于癌组织(76.7% vs 50%, $P<0.01$);癌组织中 FHIT 阳性表达率与患者性别、年龄、吸烟状况、大体分型、TNM 分期、组织学分类、淋巴结转移与否等指标均无显著相关性($P>0.05$);FHIT 蛋白阳性表达的癌组织中 MDR1 的阳性率明显高于阴性表达者(83.3% vs 60%, $P<0.01$)。结论:肺癌组织中 FHIT 蛋白表达明显下调;FHIT 蛋白表达与 MDR1 表达有一定的相关性,在应用 FHIT 基因作为基因治疗手段时应考虑到其可能具有的耐药潜能。

[关键词] 肺肿瘤;脆性组氨酸三联体;多药耐药

[中图分类号] R 734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1218-04

Expression of fragile histidine triad protein in lung cancer tissues and its correlation with multidrug resistance protein 1

YANG Zhi-hui, LIU Hui-min*, SUN Jing, HE Jin, WANG Liang-zhe, XU Yi (Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of fragile histidine triad (FHIT) protein in lung carcinoma tissues and its relationship with multidrug resistance protein 1 (MDR1), and to discuss the clinical significance of the changes of FHIT expression. **Methods:** The expression of FHIT protein was detected in the lung cancerous tissues and the adjacent tissues ($n=60$) using S-P staining method. The expression of MDR1 in lung carcinoma tissues was also detected. The expression of FHIT was analyzed in lung cancerous tissues with different clinicopathological parameters and its relationship with MDR1 was analyzed at the same time. **Results:** The expression of FHIT protein in the adjacent tissues was obviously higher than that in the lung cancerous tissues (76.7% vs 50%, $P<0.01$). No correlation was found between FHIT expression and the age, sex, smoking, general type, TNM staging, histological type, and lymph node metastasis in the patients with lung cancer. The expression of MDR1 protein in lung cancerous tissues positive for FHIT was obviously higher than those negative for FHIT (83.3% vs 60%, $P<0.01$). **Conclusion:** The expression of FHIT protein in lung cancer is evidently down regulated and is correlated with the expression of MDR1. Potential multiple drug resistance should be considered in FHIT gene therapy.

[KEY WORDS] lung neoplasms; fragile histidine triad; multiple drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1218-1221]

肺癌的发生、发展涉及多种原癌基因的激活和抑癌基因的失活。最近研究发现,脆性组氨酸三联体(fragile histidine triad, FHIT)基因被认为是一种新的抑癌基因,与多种肿瘤的发生相关^[1]。本研究应用免疫组化观察 60 例肺癌组织中 FHIT 蛋白的表达及其与多药耐药(multiple drug resistance, MDR)相关蛋白表达的关系,探讨其在肺癌发生发展中的可能作用及临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本及试剂来源 收集 2004 年 11 月~2006 年 3 月间在第二军医大学长征医院手术治疗的肺癌患者的肿瘤组织及相应的癌旁组织(肉眼距肿瘤组

织 > 5 cm) 各 60 例。患者临床资料完整,均经病理确诊,男性 40 例,女性 20 例,年龄 32~74 岁,中位年龄 63.5 岁。兔抗多克隆 FHIT 抗体(浓缩型),稀释比例 1:200,购自北京中杉金桥生物技术有限公司,鼠抗单克隆 MDR1 抗体(即用型)、S-P 试剂盒和 DAB 显色液均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 免疫组化染色 采用 S-P 法,10%中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片(厚度 4 μ m),贴于涂有多聚赖氨酸的玻片上,常规脱蜡至水,0.3%过氧化氢甲

[作者简介] 杨志慧,女,硕士生。E-mail: feiyany@sina.com

*Corresponding author. E-mail: liuhui5510@163.com

醇溶液灭活内源性过氧化物酶, 高温高压修复抗原, 其余步骤按试剂盒说明操作, PBS 代替一抗作阴性对照, FHIT、MDR1 用已知阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判定 FHIT 以细胞核/质出现棕黄或棕褐色颗粒为阳性细胞。参照王国付等^[2]的染色强度和阳性率相结合的方法首先对阳性细胞染色强度进行评分(无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分), 再对阳性细胞所占百分比进行评分(1 分为阳性细胞 $\leq 5\%$, 2 分阳性细胞占 $5\% \sim 50\%$, 3 分为阳性细胞 $> 50\%$)。结果取两者评分之乘积, 染色强度与阳性细胞百分比的乘积 > 3 分为阳性, 乘积为 $0 \sim 3$ 分为阴性。MDR1 以细胞质/膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 阳性细胞数 $\geq 5\%$ 为阳

性, $< 5\%$ 为阴性。

1.4 统计学处理 应用 SAS 软件进行分析, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 FHIT、MDR1 蛋白的免疫组化染色情况

FHIT 蛋白的阳性颗粒在腺癌组织中主要分布于细胞质(图 1A), 鳞状细胞癌组织中主要分布于细胞核(图 1B), 癌旁组织在肺泡细胞、支气管上皮和腺体组织中主要分布于细胞质和(或)核(图 1C、1D), 在支气管上皮增生/鳞化组织中则分布于胞核和(或)胞质(图 1D、1E)。MDR1 阳性颗粒在癌组织主要分布于细胞膜(图 1F)。

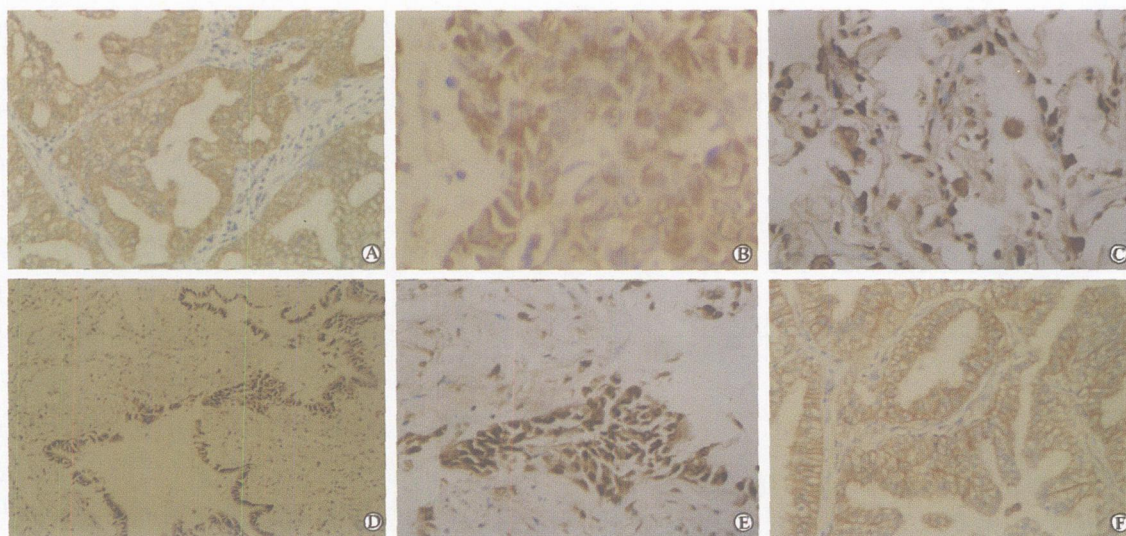


图 1 FHIT、MDR1 蛋白在肺组织中的表达

Fig 1 Expression of FHIT and MDR1 in lung tissues

A: The expression of FHIT protein in cytoplasm of adenocarcinoma ($\times 100$); B: The expression of FHIT protein in nucleus of squamous carcinoma ($\times 100$); C, D: The expression of FHIT protein in nucleus and/or cytoplasm of normal alveolar and bronch epithelium (C, $\times 400$; D, $\times 100$); D, E: The expression of FHIT protein in nucleus and/or cytoplasm of hyperplasia bronch epithelium (D, $\times 100$; E, $\times 400$); F: The expression of MDR1 protein in cell membrane in lung carcinoma ($\times 100$)

2.2 FHIT 蛋白在肺癌及癌旁组织中的表达

FHIT 蛋白在癌组织中的阳性率为 50% ($30/60$), 在癌旁组织中的阳性率为 76.7% ($46/60$), 二者存在显著差别 ($P < 0.01$); FHIT 蛋白在伴有支气管上皮增生/鳞化的癌旁组织中阳性表达率为 63.6% ($21/33$), 不伴增生/鳞化的阳性率为 92.6% ($25/27$), 二者比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.3 肺癌组织中 FHIT 蛋白表达与临床病理相关因素的分析 FHIT 蛋白的阳性表达率在不同性别、不同年龄段 (< 55 , 55)、吸烟与否、不同大体分型、不同组织学分类、有无淋巴结转移及不同 TNM

分期均无显著差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

2.4 肺癌组织中 FHIT 蛋白表达与 MDR1 表达的相关性 30 例 FHIT 蛋白阳性表达的癌组织中 MDR1 阳性表达为 25 例 (83.3%), 30 例 FHIT 阴性表达的癌组织中的 MDR1 阳性表达为 18 例 (60.0%), 两组间比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。43 例 MDR1 阳性表达的癌组织中 FHIT 蛋白阳性表达 25 例 (58.1%), 17 例 MDR1 阴性表达的癌组织中 FHIT 蛋白阳性表达 5 例 (29.4%), 两组间比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。二者在肺癌组织中的表达具有一定的相关性。

表 1 肺癌组织中 FHIT 蛋白的表达与临床病理相关因素的关系

Tab 1 Expression of FHIT protein in lung carcinoma and its relationship with clinical pathological index

Index	N	FHIT		P value
		-	+	
Sex				
Male	40	20	20	<i>P</i> = 1.000
Female	20	10	10	
Age				
< 55	17	9	8	<i>P</i> = 0.774
55	43	21	22	
Smoking				
Yes	28	13	15	<i>P</i> = 0.605
No	32	17	15	
General typing				
Central type	18	7	11	<i>P</i> = 0.26
Peripheral	42	23	19	
Histological type				
Squamous carcinoma	24	14	10	<i>P</i> = 0.439
Adenoca	31	13	18	
Small cell carcinoma	5	3	2	
TNM staging				
- stage	38	21	17	<i>P</i> = 0.284
- stage	22	9	13	
Lymph node metastasis				
Yes	22	10	12	<i>P</i> = 0.592
No	38	20	18	

3 讨论

FHIT 基因是 Ohta 等^[3] 1996 年首次发现的一个抑癌基因,位于人染色体 3p14.2 区域 FRA3B 脆性位点,编码系列含组胺酸三联体,其编码的 FHIT 蛋白由 147 个氨基酸组成,定位于细胞质,是一种典型的二腺苷三磷酸水解酶,其异常表达与多种恶性肿瘤的发生发展有关。FHIT 基因抑制肿瘤的作用机制目前尚不十分清楚,可能是通过 caspase 通路诱导细胞凋亡,或者通过细胞周期阻滞抑制肿瘤的生长。FHIT 基因的异常表达常导致其蛋白量发生改变,因此对其蛋白的检测能较准确地反映 FHIT 基因的异常变化。Wali 等^[4] 通过比较 FHIT 基因与蛋白表达之间的关系,证实了两种方法的高度一致性。因此,应用免疫组化方法检测 FHIT 蛋白的原位表达被认为是一种既简单准确、又经济实用的方法。

通常情况下 FHIT 蛋白存在于大多数正常组织中,而多数恶性肿瘤组织中的 FHIT 蛋白则存在频繁地降低或缺失。本实验显示 FHIT 蛋白在癌旁正常组织的表达率是 76.7%,而在肺癌组织的阳性表

达率为 50%,二者有显著差异 ($P < 0.01$)。这证明 FHIT 蛋白表达下调在肺癌发生中是一个频发事件,也表明 FHIT 基因是一种抑癌基因。有研究^[5] 表明 FHIT 基因在支气管上皮基底细胞增生和鳞状上皮化生时就已经发生了蛋白和(或)基因水平的异常表达。在癌旁正常组织中,伴有支气管上皮基底细胞增生和鳞化的组织中 FHIT 阳性表达率明显低于不伴基底细胞增生和鳞化者,提示 FHIT 基因失活在肺癌的发生过程中是一个很早期的事件,可以作为肿瘤发生的潜在危险性标志。也许正如 Toledo 等^[6] 认为的那样,随着基因时代的到来,病理形态学划分癌前病变的现状将受到严重挑战。我们支持 Toledo 等^[6] 认为“FHIT 蛋白阴性表达的基底细胞增生和鳞化与不典型增生一样是一种癌前危险性因素”的观点。

有很多报道认为,吸烟是引起 FHIT 基因下调的主要原因之一。本组实验中 60 例患者无吸烟史的占 53.3%,FHIT 蛋白的阳性表达和吸烟与否无明显关系,这可能和本组中无吸烟史病例占多数有关,或者可能由于 FHIT 基因在吸烟与非吸烟肺癌患者发病机制中所起的作用不同,导致蛋白水平表达不显著;同时也说明虽然吸烟是引起肺癌发生的重要因素,但肺癌的发生最终是多种致瘤因子长期共同作用的结果。也有学者认为 FHIT 蛋白表达与肺癌的组织学类型、临床分期和淋巴结转移与否都有关系,甚至可以作为一种判断预后的指标。但本组实验显示,肺癌的各项临床病理因素(性别、年龄、大体分型、组织学类型、临床分期、淋巴结转移等)与 FHIT 基因的阳性表达均无明显相关 ($P > 0.05$),故不赞成“FHIT 蛋白表达能够作为预后判断指标”的观点,这与 Geradts 等^[7] 的研究结果相一致。

FHIT 基因作为一种被逐渐证实了的抑癌基因,除了可以对肺癌发生的危险性作出预测外,作为一种对恶性肿瘤的基因治疗方法,已经越来越受到科研工作者和临床医师的重视。有实验证明将野生型 FHIT 基因转入癌细胞中,肿瘤的生长就会受到抑制^[8],这将为肿瘤的治疗开辟一条崭新的途径。但是目前对肿瘤进行有效治疗的最大的障碍之一就是肿瘤细胞的 MDR 问题。一般来讲成熟程度高、分化好的肿瘤,化疗效果较差,较容易产生 MDR,而 MDR1 是细胞产生 MDR 表型的分子基础,在许多恶性肿瘤患者中天然存在。本实验对 60 例肺癌组

织同时进行了 MDR1 蛋白的标记,试图寻找 FHIT 与 MDR1 间的某种关联,结果显示 FHIT 的表达与 MDR1 表达存在一定的相关性,癌组织中 FHIT 蛋白阳性表达者 MDR1 的阳性率明显高于阴性表达者。我们推测其可能的机制:(1) FHIT 基因能与 MDR1 共同存在;(2) FHIT 基因可能无法抑制或减少 MDR1 的耐药作用;(3) MDR1 可能会在某种机制上干扰 FHIT 基因的抑癌作用,但并不显著影响其蛋白表达。因国内外尚未见相关研究报道,以上推测尚待我们进一步深入探讨。但不管具体作用机制如何,在将 FHIT 基因作为一种肿瘤基因治疗手段时,都必须考虑多药耐药的问题。

[参考文献]

- [1] 张生军,张才全. FHIT 基因结构、功能及其应用研究进展[J]. 重庆医学,2004,33:1411-1413.
- [2] 王国付,沈荣林,刘敬东. 肺癌组织中 FHIT 基因蛋白的表达缺失与吸烟的关系[J]. 肿瘤学杂志,2002,8:73-75.
- [3] Ohta M, Inoue H, Coticelli MG, et al. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-

associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers [J]. Cell,1996,84: 587-597.

- [4] Wali A, Srinivasan R, Shabnam MS, et al. Loss of fragile histidine triad gene expression in advanced lung cancer is consequent to allelic loss at 3p14 locus and promoter methylation [J]. Mol Cancer Res,2006,4:93-99.
- [5] Tseng JE, Kemp BL, Khuri FR, et al. Loss of Fhit is frequent in stage non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers[J]. Cancer Res,1999,59:4798-4803.
- [6] Toledo G, Sola JJ, Lozano MD, et al. Loss of FHIT protein expression is related to high proliferation, low apoptosis and worse prognosis in non-small-cell lung cancer[J]. Mod Pathol, 2004,17:440-448.
- [7] Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, et al. Loss of Fhit expression in non-small-cell lung cancer: correlation with molecular genetic abnormalities and clinicopathological features[J]. Br J Cancer,2000,82: 1191-1197.
- [8] Ji L, Fang B, Yen N, et al. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression [J]. Cancer Res,1999,59: 3333-3339.

[收稿日期] 2006-08-24

[修回日期] 2006-11-06

[本文编辑] 贾泽军,邓晓群

第十届全军战创伤外科学术会议征文通知

全军战创伤外科专业委员会决定于 2007 年 4 月中上旬在福建省福州市举办第十届全军战创伤外科专业学术会议。届时,我国著名战创伤专家王正国院士、程天民院士、卢世壁院士等 30 余位专家莅临会议,并就战创伤外科救治新进展,严重多发伤和重要部位伤的诊治新技术,现代战争条件下的卫勤保障与战伤救治、战创伤急救,以及战创伤基础研究新进展等内容作专题报告。与会者可获军队继续教育学分。

征文要求:凡未曾发表的有关战创伤的基础研究及临床救治的论文均可,论文摘要 800~1 000 字。

来稿请寄:重庆市大坪长江支路 10 号,第三军医大学野战外科研究所,邮编:400042

联系人:尹志勇 教授,E-mail:zyyin@cta.cq.cn 或 zyyin@tom.com

截稿日期:2007 年 2 月 20 日

电话:0801-757885(军线),023-68757885、66193386、13983128386

传真:023-68810837