

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00216

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

Expression of drug-resistant protein MRP1 and BCRP in breast cancer and its clinical significance

颜红柱¹, 余宏宇^{2*}, 刘会敏², 沈周¹, 何金², 李玉莉²

1. 堡镇人民医院病理科, 上海 202157

2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨多药耐药相关蛋白 1(MRP1)和乳腺癌耐药蛋白(BCRP)在化疗前浸润性乳腺癌组织中的表达情况及临床病理意义。**方法** 采用免疫组织化学方法检测 81 例乳腺癌[浸润性导管癌(非特殊型)76 例,浸润性小叶癌 5 例]组织中 MRP1 和 BCRP 的表达情况,统计分析其与年龄、肿块最大直径、组织学分级、TNM 分期、淋巴结转移以及雌激素受体(ER)和癌基因 HER2 表达的相关性。**结果** MRP1 阳性表达率为 74.1%(60/81),其表达与肿瘤最大直径($r_s=0.802, P=0.001$)、TNM 分期($r_s=0.804, P=0.001$)、HER2 表达($r_s=0.645, P=0.000$)正相关,与 ER 表达($r_s=-0.362, P=0.001$)负相关,与年龄、组织学分级和淋巴结转移与否无关;BCRP 阳性表达率为 29.6%(24/81),其表达与淋巴结转移($r_s=0.266, P=0.016$)和 HER2 表达($r_s=0.241, P=0.03$)正相关,与组织学分级($r_s=-0.303, P=0.006$)和 ER 表达($r_s=-0.420, P=0.001$)负相关,与年龄、肿瘤最大直径及 TNM 分期无关。而 MRP1 表达与 BCRP 表达间未见相关性。Kaplan-Meier 生存分析显示 MRP1 和 BCRP 表达与无病生存期相关($P<0.05$),与总生存期无关($P>0.05$)。**结论** 在浸润性乳腺癌组织中 MRP1 高表达,BCRP 呈低表达,两者可能参与肿瘤的进展过程,并与 HER2 和 ER 的表达有一定的相关性。

[关键词] 乳腺肿瘤;多药耐药;MRP1;BCRP;免疫组织化学

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0216-04

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是导致乳腺癌化疗及内分泌治疗失败的重要原因,耐药基因的发现及其功能研究对阐明乳腺癌耐药发生机制、寻找新的治疗靶标、提高疗效将有很大的帮助^[1]。近年来,耐药相关基因在化疗耐药方面的作用正日益引起人们的重视,本研究应用免疫组织化学方法检测多药耐药相关蛋白 1(multidrug resistance protein, MRP1)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)在化疗前乳腺癌组织中的表达,并探讨其与乳腺癌临床病理指标及雌激素受体(ER)和癌基因 HER2 表达的相关性,为推测临床预后及选择治疗方案提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集整理新华医院集团崇明堡镇人民医院 1999 年 1 月至 2003 年 12 月间术前未经化疗的全部乳腺癌病例,共 90 例,复习病理切片和有关临床资料。根据 WHO(2003)乳腺肿瘤病理及遗传学分类标准,由 2 名病理医师分别阅片,取得一致意见后重新认定,其中浸润性导管癌(非特殊型)76 例,浸润性小叶癌 5 例,黏液癌 3 例,导管内癌 4 例,实性乳头状癌(含实性神经内分泌癌)2 例。考虑黏液癌、导管内癌和实性乳头状癌预后较好,且病例数较少,故从研究组中剔除,现留下研究病例为 81 例。其中有腋窝淋巴结转移者 43 例,转移率为 53.1%(43/81)。81 例患者中女性 80 例,男性 1 例;年龄 32~88[平均(54.25±10.27)]岁。所有病例临床资料完整,58

例有随访资料,均随访 5 年以上(采用信访或电话随访),随访截止日期为 2008 年 12 月,生存期计算从手术日至随访截止日期或由于复发、转移而死亡的日期为止。

1.2 免疫组织化学染色 所有标本均经 10%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,常规切片(4 μm),采用 MaxVision 二步法,实验步骤按试剂盒说明书进行,DAB 显色,苏木精复染。试剂盒及检测用的一抗 MRP1、HER2 和 ER 均购于福州迈新生物技术开发公司,BCRP 购于美国 Chemicon 公司。并设有阴性和阳性对照。

1.3 结果判定 无背景着色情况下以细胞出现黄色颗粒为阳性。MRP1 和 BCRP 阳性表达定位于肿瘤细胞膜和(或)胞质,综合考虑染色强度和阳性细胞数,采用半定量积分法判定免疫组化染色结果:计数阳性细胞百分数并赋予分值,≤5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分;观察着色强度并赋予分值,无着色为 0 分,浅黄着色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。两者相乘,0 分为(-),1~4 分为(+),5~8 分为(++),9~12 分为(+++)。ER 阳性判断定位于细胞核,阳性瘤细胞 10%~25%为(+),25%~50%为(++),>50%为(+++),<10%判断为阴性。HER2 阳性表达定位于肿瘤细胞膜上,HER2 阳性判断采用美国肿瘤学会及《乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)》推荐的判断标准^[2-3],胞质着色不计,只评定浸润癌部分,0:瘤细胞无着色;+:任何比例的浸润癌细胞呈现微弱、

[收稿日期] 2010-08-03 **[接受日期]** 2010-12-02

[作者简介] 颜红柱,主治医师。E-mail: mm_001586@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81886122, E-mail: yuhongyu795@hotmail.com

不完整的细胞膜着色; ++: 大于 10% 的浸润癌细胞呈现弱至中等强度、完整但不均匀的细胞膜棕黄色着色或小于 30% 的癌细胞呈现强且完整的细胞膜棕褐色着色; +++: 大于 30% 的浸润癌细胞呈现强且完整的细胞膜棕褐色着色。对于 ++ 的病例, 重复免疫组化, 并进一步行 FISH 检测判断有无 HER2 扩增。所有染色切片均由 2 名富有经验的病理医师分别进行判读, 取其平均值作为该病例的最终评分。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件包处理。各组资料的比较采用 χ^2 检验, 相关性采用 Spearman 秩

相关分析, 对生存数据采用 Kaplan-Meier 分析, 并绘制生存曲线, 应用 Log-rank 检验差异性。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 MRP1、BCRP、ER 和 HER2 在浸润性乳腺癌中的表达 MRP1、BCRP、ER 和 HER2 在浸润性乳腺癌中的免疫组化形态特点见图 1, 表达阳性率分别为 74.1% (60/81)、29.6% (24/81)、48.1% (39/81) 和 63.0% (51/81), 其中 HER2 过表达率为 37.0% (30/81)。

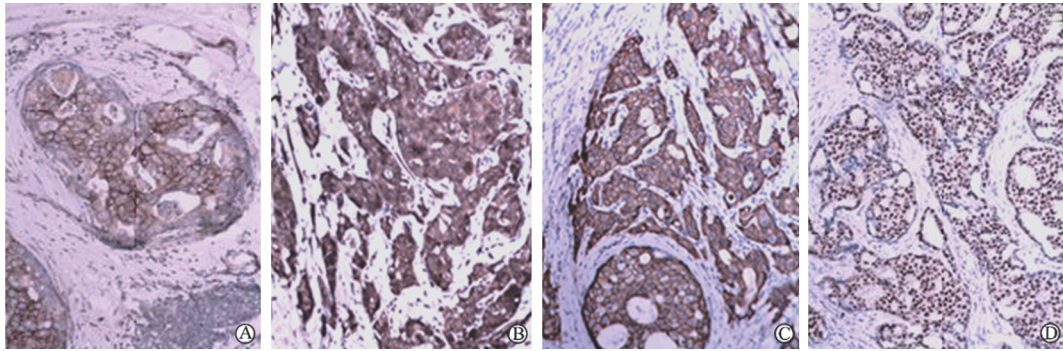


图 1 MRP1、BCRP、HER2 和 ER 在浸润性乳腺癌中免疫组化检测 (MaxVision)

A: MRP1; B: BCRP; C: HER2; D: ER. Original magnification: $\times 100$

2.2 MRP1 和 BCRP 表达与浸润性乳腺癌临床病理参数的关系 χ^2 检验显示, 在浸润性乳腺癌中, MRP1 表达在不同肿瘤最大直径组间 ($P=0.001$) 和不同 TNM 分期组间 ($P=0.001$) 的差异均具有统计学意义, 而在不同年龄组间、不同组织学分级组间以及是否有淋巴结转移组间差异均无统计学意义; 而 BCRP 表达在是否有淋巴结转移组间 ($P=0.019$)、不同组织学分级组间 ($P=0.029$) 的差异均具有统计学意义, 在不同年龄组间、不同肿瘤最大直径组间及不同

TNM 分期组间差异均无统计学意义 (表 1)。进一步的 Spearman 秩相关分析提示, MRP1 表达与肿瘤最大直径 ($r_s=0.802, P=0.001$) 和 TNM 分期 ($r_s=0.804, P=0.001$) 均正相关, 与年龄、组织学分级、淋巴结是否转移无关; BCRP 表达与淋巴结转移 ($r_s=0.266, P=0.016$) 正相关, 而与组织学分级 ($r_s=-0.303, P=0.006$) 负相关, 与年龄、肿瘤最大直径、TNM 分期无关。

表 1 81 例乳腺癌组织中 MRP1、BCRP 表达与临床病理参数的关系

参数	n	MRP1				阳性率 (%)	χ^2/P	BCRP				阳性率 (%)	χ^2/P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
年龄 (岁)													
<50	21	4	11	3	3	81.0	$\chi^2=4.001$	14	3	3	1	33.3	$\chi^2=1.378$
≥ 50	60	17	17	14	12	71.7	$P>0.05$	43	8	4	5	28.3	$P>0.05$
肿瘤最大直径 l/cm													
<2	26	20	5	0	1	23.1	$\chi^2=89.812$	17	2	3	4	34.6	$\chi^2=6.214$
2~5	35	1	21	12	1	97.1	$P<0.01$	24	7	3	1	31.4	$P>0.05$
>5	20	0	2	5	13	100		16	2	1	1	20	
组织学分级													
I~II	60	13	21	15	11	78.3	$\chi^2=3.411$	37	11	7	5	38.3	$\chi^2=9.059$
III	21	8	7	2	4	61.9	$P>0.05$	20	0	0	1	4.76	$P<0.05$
TNM 分期													
I	16	14	2	0	0	12.5	$\chi^2=76.316$	13	2	1	0	18.8	4.014
II	38	7	23	7	1	81.6	$P<0.01$	27	5	2	4	28.9	$P>0.05$
III	27	0	3	10	14	100		17	4	4	2	37.0	
淋巴结转移													
否	38	7	16	9	6	81.6	$\chi^2=3.267$	31	6	0	1	18.4	9.925
是	43	14	12	8	9	67.4	$P>0.05$	26	5	7	5	39.5	$P<0.05$

2.3 浸润性乳腺癌中 MRP1、BCRP 与 ER、HER2 表达的相互关系 Spearman 相关分析显示, MRP1 表达与 ER 表达负相关($r_s = -0.362, P = 0.001$),与 HER2 表达正相关($r_s = 0.645, P = 0.000$); BCRP 表达与 ER 表达负相关($r_s = -0.420, P = 0.001$),与 HER2 表达正相关($r_s = 0.241, P = 0.03$)。

2.4 浸润性乳腺癌中 MRP1 与 BCRP 表达的相互关系 Spearman 秩相关分析显示,在浸润性乳腺癌中 MRP1 表达与 BCRP 表达间未见相关性($r_s = 0.1, P = 0.752$)。

2.5 MRP1 和 BCRP 表达与生存期的关系 Kaplan-Meier 生存分析显示: MRP1 和 BCRP 与无病生存期相关($P < 0.05$),与总生存期无关($P > 0.05$),见图 2。

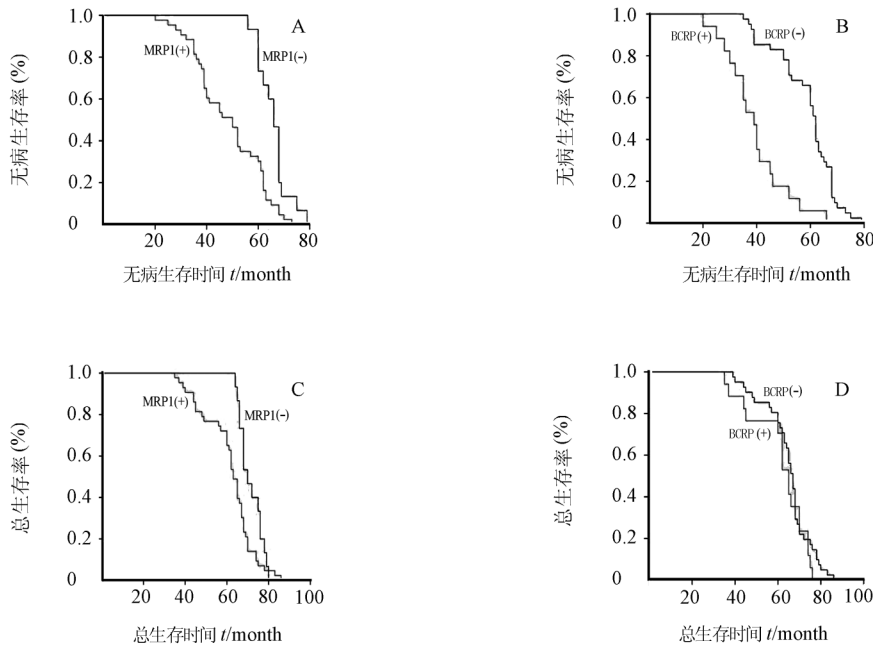


图 2 MRP1 和 BCRP 表达与生存期的关系

A: MRP1 表达与无病生存期的关系; B: BCRP 表达与无病生存期的关系; C: MRP1 表达与总生存期的关系; D: BCRP 表达与总生存期的关系

3 讨论

MRP1 是多药耐药蛋白家族的成员之一,属于 ATP 膜转运蛋白,它可以通过细胞膜转运多种抗肿瘤药,从而限制这些抗肿瘤药进入细胞^[4],广泛分布在各种正常组织和肿瘤组织中。多项研究发现 MRP1 在乳腺癌中阳性表达率增高,但以中低表达为主,与乳腺癌对化疗的敏感性负相关^[5-6]。本研究也检测到 MRP1 在乳腺癌中阳性表达率增高(74.1%,60/81),高表达只有 18.5%(15/81),与文献报道相符。我们的资料显示 MRP1 在乳腺癌中的表达水平与患者年龄状况、是否有淋巴结转移、肿瘤病理分级无关,但也有报道 MRP1 与淋巴结转移密切相关^[7],这说明 MRP1 与肿瘤侵袭转移相关。本研究未发现 MRP1 与淋巴结转移有相关性,可能是由于病例数较少的缘故。MRP1 阳性表达与 TNM 分期密切相关($r_s = 0.804, P = 0.001$),在 TNM 分期 I、II、III 期中,MRP1 阳性率分别为 12.5%(2/16)、81.6%(31/38)和 100%(27/27),提示 MRP1 表达与乳腺癌的进展有关。同时研究发现肿块的大小也与 MRP1 的表达密切相关($r_s = 0.802, P = 0.001$),在 <2 cm、2~5 cm 和 >5 cm 病例中,MRP1 阳性率分别为 23.1%(6/26)、97.1%(34/35)和 100%(20/20),表明 MRP1 阳性肿瘤具有更强的局部生长活性。因此 MRP1 有可能作为乳腺癌预后的一个重要指标,在制定

化疗方案中有一定的指导意义。生存分析也显示 MRP1 与患者无病生存期明显相关($P < 0.05$),与总生存期无关,可作为复发或转移的相关指标。在与 HER2 和 ER 比较中,我们发现 MRP1 与 HER2 正相关($r_s = 0.645, P = 0.000$),与 ER 负相关($r_s = -0.362, P = 0.001$),这与有关文献报道^[8]相符。特别在 MRP1 强阳性表达的 15 例病例中,HER2 的表达都是(++)提示乳腺癌 HER2 表达的缺失常伴有 MRP1 的丢失。与 ER 比较中我们发现,在 MRP1 阳性的病例中 ER 的阳性率只有 38.3%(23/60),而在 MRP1 阴性的病例中 ER 的阳性率却为 76.2%(16/21),提示 MRP1 过度表达可能使癌细胞内 ER 结构和功能出现某些缺陷,使其表达受抑制^[8]。

BCRP 是在乳腺癌细胞系 MCF/Adrnp 中发现的耐药蛋白,BCRP mRNA 在胎盘和肝脏及小肠黏膜中表达较高,在结肠、胃、卵巢、肾脏及乳腺中均可检测到 BCRP,一般呈弱阳性表达^[9]。大量研究证明 BCRP 在白血病^[10]、肺癌^[11]等许多恶性肿瘤的多药耐药中扮演着重要角色。本研究发现在术前未经化疗的乳腺癌中 BCRP 的表达率为 29.6%(24/81),高于癌旁正常乳腺组织。统计结果显示 BCRP 与是否有淋巴结转移、组织学分级有关。在淋巴结转移病例中 BCRP 阳性率明显增加,为 39.5%(17/43),在无淋巴结转移病例阳性率为 18.4%(7/38),这可能提示 BCRP 与肿瘤侵袭性有关。而在组织学分级为 I~II 级的病例中 BCRP 阳性

率为 38.3%(23/60),分化差的组织学分级为Ⅲ级的病例中 BCRP 表达率却明显下降为 4.76%(1/21)。Faneyte 等^[12]研究也发现恶性程度较高的乳腺癌 BCRP 表达下降,对化疗药物敏感,提示 BCRP 可能是细胞分化指标。在与患者年龄、肿块大小、临床分期及总生存期比较中我们发现,BCRP 的表达与它们没有相关性,但与无病生存期密切相关($P < 0.05$)。与 MRP1 相似,BCRP 的表达与 ER 负相关($r_s = -0.420$, $P = 0.001$),在 BCRP 阳性病例中 ER 的阳性率只有 16.7%(4/24),而在 BCRP 阴性病例中 ER 阳性率却为 61.4%(35/57)。Mutoh 等^[13]研究发现,ER 阳性的细胞株中,雌激素能够降低内源性 BCRP 的表达,但在 ER 阴性的乳腺癌细胞中却无此作用;Wakabayashi 等^[14]发现 ER α 阳性的乳腺癌细胞株,雌二醇可以下调 BCRP 的表达。然而也有相反的报道^[15]。Ee 等^[16]在 ER 阳性的乳腺癌细胞株上研究发现雌激素可以诱导 BCRP mRNA 表达增强。因此乳腺癌 BCRP 表达水平有可能受雌激素-雌激素受体信号转导通路的影响,但具体机制比较复杂,还存在不少争议。在乳腺癌中有近 1/3 的患者 HER2 呈高表达,本实验 HER2 高表达率为 37.0%(30/81),HER2 是表皮生长因子受体家族中的一员,HER2 在乳腺癌的表达水平已经作为评价预后、观测化疗效果和内分泌治疗、分子靶向治疗反应的一项重要临床病理指标。Spearman 秩相关分析显示 BCRP 表达与 HER2 正相关($r_s = 0.241$, $P = 0.03$),提示 HER2 表达有可能促进了 BCRP 表达的上调,从而进一步导致乳腺癌患者对化疗药物更易产生耐药性。

肿瘤的耐药是一种多因素多机制调节的复杂过程,BCRP 与 MRP1 作为参与乳腺癌多药耐药的重要分子,阐明他们的调控机制,对逆转肿瘤化疗的多药耐药、改善临床化疗疗效具有重要意义。在本研究中我们没有发现它们之间具有相关性,但两者均与 HER2 正相关,与 ER 负相关,提示两者与表皮生长因子受体和雌激素受体表达有一定的关系,可以作为一个切入点,深入研究 MRP1 和 BCRP 的调控机制。

[参考文献]

- [1] Lehnert M. Chemotherapy resistance in breast cancer[J]. *Anti-cancer Res*, 1998, 18(3C): 2225-2226.
- [2] Wolff A C, Hammond M E, Schwartz J N, Hagerty K L, Allred D C, Cote R J, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2007, 131: 18-43.
- [3] 乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版)[J]. *中华病理学杂志*, 2009, 38: 836-840.
- [4] Toyoda Y, Hagiya Y, Adachi T, Hoshijima K, Kuo M T, Ishika-

- wa T. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(7-8): 833-862.
- [5] Abaan O D, Mutlu P K, Baran Y, Atalay C, Gunduz U. Multi-drug resistance mediated by MRP1 gene overexpression in breast cancer patients[J]. *Cancer Invest*, 2009, 27: 201-205.
- [6] Rudas M, Filipits M, Taucher S, Stranzl T, Steger G G, Jakesz R, et al. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 81: 149-157.
- [7] 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.
- [8] 陈前军,司徒红林,李淑艳,张蓉,任黎萍,徐颺,等. 乳腺浸润性导管癌 MRP、LRP 表达及其与临床因子的相关分析[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27: 115-116.
- [9] Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg M F, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. *Curr Drug Metab*, 2010, 11: 603-617.
- [10] van der Kolk D M, de Vries E G, Müller M, Vellenga E. The role of drug efflux pumps in acute myeloid leukemia[J]. *Leuk Lymphoma*, 2002, 43: 685-701.
- [11] Li X Q, Li J, Shi S B, Chen P, Yu L C, Bao Q L. Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy[J]. *Int J Biol Markers*, 2009, 24: 230-237.
- [12] Faneyte I F, Kristel P M, Maliepaard M, Scheffer G L, Schepers R J, Schellens J H, et al. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 1068-1074.
- [13] Mutoh K, Tsukahara S, Mitsuhashi J, Katayama K, Sugimoto Y. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of P-glycoprotein in MDR1-transduced human breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97: 1198-1204.
- [14] Wakabayashi K, Tamura A, Ishikawa T. Genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2; Porphyria risk and ER quality control [J]. *Seikagaku*, 2007, 79: 151-157.
- [15] 王麟,魏敏杰,金锋,杨栋,任婕,姜越,等. 乳腺癌耐药相关蛋白在乳腺癌的表达及与临床病理参数相关性[J]. *解剖科学进展*, 2008, 14: 133-136.
- [16] Ee P L, Kamalakaran S, Tonetti D, He X, Ross D D, Beck W T. Identification of a novel estrogen response element in the breast cancer resistance protein (ABCG2) gene [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1247-1251.

[本文编辑] 孙岩