

[文章编号] 1674-8115(2011)08-1201-04

· 短篇论著 ·

# 多药耐药蛋白 P170 在儿童初发急性白血病患者骨髓中的表达及意义

廖雪莲, 夏 敏, 蒋 慧

(上海市儿童医院 上海交通大学附属儿童医院血液科, 上海 200040)

[摘要] 目的 检测儿童急性白血病初发时骨髓中多药耐药蛋白 P170 的表达, 分析 P170 表达与患儿多药耐药的关系及临床意义。方法 66 例儿童急性白血病患者中男性 40 例, 女性 26 例; 急性淋巴细胞性白血病(ALL)45 例, 急性非淋巴细胞性白血病(ANLL)21 例; 根据疗效分为初治敏感组( $n=40$ )和难治耐药组( $n=26$ )。采用流式细胞术检测骨髓细胞多药耐药蛋白 P170 的相对表达率, 并分析 P170 表达阳性率与耐药性和性别间的关系。结果 难治耐药组的急性白血病患儿 P170 表达阳性率显著高于初治敏感组(65.4% 和 37.5%,  $P < 0.05$ ); 但 ANLL 组与 ALL 组、男性组与女性组的 P170 表达阳性率比较差异均无统计学意义(44.4% 和 57.1%,  $P > 0.05$ ; 45.0% 和 46.2%,  $P > 0.05$ )。结论 儿童急性白血病患者初发时 P170 表达阳性者易产生多药耐药, 预后可能较差; P170 在儿童急性白血病的不同分型和性别间的表达无差异。

[关键词] 儿童急性白血病; 多药耐药; P170

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.08.034

[中国分类号] R733.71

[文献标志码] B

## Expression and significance of multidrug resistance protein P170 in newly diagnosed childhood acute leukemia

LIAO Xue-lian, XIA Min, JIANG Hui

(Department of Hematology, Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

**[Abstract]** Objective To investigate the expression of multidrug resistance protein P170 in newly diagnosed childhood acute leukemia, explore the relationship between the expression of P170 and multidrug resistance and its clinical significance. Methods Sixty-six cases of childhood acute leukemia were collected, among whom 40 were male and 26 were female. Forty-five cases were acute lymphoblastic leukemia (ALL) and 21 cases were acute non-lymphocytic leukemia (ANLL). Patients were divided into complete remission group ( $n=40$ ) and relapse group ( $n=26$ ). The expression of multidrug resistance protein P170 in marrow cells was detected by flow cytometry, and the correlations of the expression of P170 with drug resistance and gender were analysed. Results The expression of P170 in relapse group was significantly higher than that in complete remission group (65.4% vs 37.5%,  $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in the expression of P170 between ANLL group and ALL group (44.4% vs 57.1%,  $P > 0.05$ ) and between male group and female group (45.0% vs 46.2%,  $P > 0.05$ ). Conclusion The expression of P170 in newly diagnosed childhood acute leukemia is likely to result in multidrug resistance and negative prognosis. There is no significant difference in the expression of P170 between different disease types and different genders in childhood acute leukemia.

[Key words] childhood acute leukemia; multidrug resistance; P170

化疗是治疗儿童急性白血病的基本手段, 但耐药仍然是目前治疗失败的主要原因之一。产生多药耐药的机制很复杂, 但已证实其中 MDR-1 基因扩增和过度表达使肿瘤细胞产生多药耐药特性是一个重要机制, MDR-1 基因产物 P - 糖蛋白(P-glycoprotein,

P-gp 或 P170)介导的多药耐药是最早研究并得到临床证实的耐药机制。为了解多药耐药蛋白 P170 在儿童急性白血病中的作用及其与多药耐药的关系, 本研究采用流式细胞术检测了 66 例急性白血病患儿的 P170 表达, 现报道如下。

[基金项目] 上海市儿童医院青年科研基金(2008-02)(Foundation from Children's Hospital of Shanghai, 2008-02)。

[作者简介] 廖雪莲(1978—), 女, 主治医师, 硕士; 电子信箱: liaoxtian@sohu.com。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

收集上海市儿童医院 2009 年 1 月—2010 年 5 月收治的 66 例初发急性白血病患儿的临床资料,所有患儿均由临床特征结合细胞形态学(morphology)、免疫学(immunology)、细胞遗传学(cytogenetics)及分子生物学(molecular biology)(MICM 分型)确诊,并符合 FAB 诊断标准。其中急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)45 例,急性非淋巴细胞性白血病(acute non-lymphocytic leukemia, ANLL)21 例;男性 40 例,女性 26 例;初发时年龄 9 个月~13 岁,中位年龄 5.8 岁。确诊后的 ALL 患儿常规接受 PVDL(泼尼松+长春新碱+柔红霉素+门冬酰胺酶)方案治疗;ANLL 患者接受 DA(柔红霉素+阿糖胞苷)、HA(三尖杉酯碱+阿糖胞苷)或 MA(米托蒽醌+阿糖胞苷)等方案治疗并观察疗效,按疗效进行分组。初治敏感组( $n=40$ ):通过 MICM 分型确诊患儿经诱导化疗 33 d 内完全缓解者;难治耐药组( $n=26$ ):经诱导化疗 33 d 内未缓解者及经过正规化疗完全缓解后至 2010 年 12 月骨髓中再次出现幼稚细胞且>5% 的复发者。

另选同期在本院进行检查的 3 例无血液系统疾病的儿童(骨科手术患者)和 7 例良性血液病(血小板减少性紫癜或缺铁性贫血等)患儿共 10 例的骨髓标本为对照。

### 1.2 方法

**1.2.1 骨髓标本采集** 在患儿髂后上棘抽取骨髓 0.5 mL,置于 EDTA 抗凝的试管中,室温下保存,24 h 内检测。

**1.2.2 P170 免疫荧光样品的制备** 采用直接免疫

荧光标记法,取 EDTA 抗凝的新鲜骨髓液,先使骨髓中白细胞计数达  $10^5$  个/ $\mu\text{L}$ ,然后取两管,每管置 50  $\mu\text{L}$  骨髓标本,以 CD45 设门标记白血病细胞。实验管  $P_1$  加入 PE 标记的 P170 单抗 20  $\mu\text{L}$ ,阴性对照管  $P_0$  则加入 PE-IgG 单抗 20  $\mu\text{L}$ ,均室温闭光孵育 10 min, PBS 洗涤 2 次,弃上清液后加入溶血素 1 mL;避光放置 10 min 后,再以 PBS 洗涤 2 次,加入 200  $\mu\text{L}$  PBS。

**1.2.3 流式细胞仪检测** 采用 FACS Calibur 流式细胞仪(BD,美国)进行检测,激发波长为 488 nm,测量数据和图形录入 Apple 计算机分析,以实验管  $P_1$  减去阴性对照管  $P_0$  的值,得到骨髓细胞 P170 的表达率。

**1.2.4 P170 阳性标准的判定** 检测 10 例对照儿童的骨髓 P170 表达率,取其平均值 + 2 倍标准差( $3.35\% + 0.02\% \times 2 = 3.39\%$ )作为参考值,并参考文献[1~3],一般以 P170 表达率 > 2% 或 3% 为阳性; $> 8\%$  或  $10\%$  为强阳性;综合判断本实验阳性标准: $> 3\%$  为阳性, $> 8\%$  为强阳性。

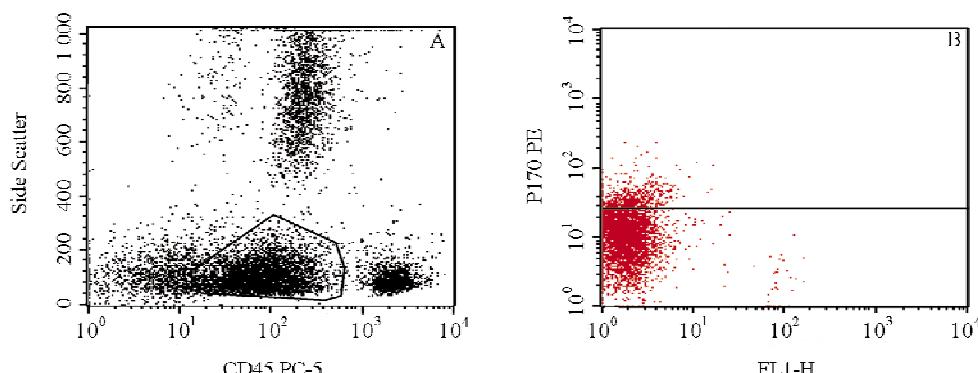
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计数资料以百分比表示,率的比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 初发急性白血病患儿的 P170 表达

66 例初发急性白血病患儿的 P170 相对表达率为 0.58%~9.78%,平均 3.35%;其中 32 例 P170 蛋白表达阳性,阳性率为 48.48%。图 1 为其中 1 例 P170 蛋白表达阳性患儿的流式细胞术检测结果,P170 相对表达率为 9.87%。



注: A. 以 CD45 设门标记白血病细胞; B. 检测左上象限中 P170 阳性表达率。

图 1 流式细胞术检测 P170 的表达

Fig 1 Expression of P170 detected by flow cytometry

## 2.2 P170 表达与耐药性的关系

40 例初治敏感组中 15 例患儿 P170 表达阳性, 阳性率为 37.5%; 26 例难治耐药组中 17 例患儿的 P170 表达阳性, 阳性率为 65.4%, 难治耐药组的 P170 阳性率高于初治敏感组, 差异有统计学意义 ( $P = 0.027$ )。其中 P170 表达强阳性的患儿共 4 例, 其中难治耐药组 3 例, 初治敏感组 1 例; ALL 和 ANLL 各 2 例; 男性 3 例, 女性 1 例。

## 2.3 P170 表达与患儿白血病类型及性别间的关系

21 例 ANLL 患儿中 12 例 P170 表达阳性, 阳性率为 57.1%; 45 例 ALL 患儿中 20 例 P170 表达阳性, 阳性率为 44.4%, 两组 P170 阳性率比较差异无统计学意义 ( $P = 0.336$ )。40 例男性患儿中 18 例 P170 表达阳性, 阳性率为 45.0%; 26 例女性患儿中 12 例 P170 表达阳性, 阳性率为 46.2%, 两组 P170 阳性率比较差异也无统计学意义 ( $P = 0.927$ )。

## 3 讨 论

1970 年 Riedler 和 Reihm 提出多药耐药概念, 即肿瘤细胞一旦对某种药物产生耐受性, 同时对另外一些结构和功能上完全不同的药物也产生耐受。产生多药耐药的原因是多因素的, 但其中 MDR-1 基因编码的 P170 过度表达是其中一个重要的机制。P170 是一能量依赖性外排泵, 是已产生多药耐药的肿瘤细胞膜上的高表达蛋白, 相对分子质量为 170 000; 该糖蛋白是一种 ATP 转运酶, 能够对抗肿瘤药物主动跨膜转运, 其表达水平与细胞膜的通透性、细胞内药物浓度以及耐药程度有关, 通过影响细胞内的药物聚积使肿瘤细胞对各种疏水性细胞毒药物产生耐药。

对成年人白血病的研究<sup>[1,4]</sup>结果也表明复发难治组 P170 表达高于初治敏感组。老年急性髓系白血病患者存在原发耐药<sup>[2]</sup>, 其 P170 阳性表达者预后较差。血液系统以外的其他实体肿瘤(如结直肠癌)组织也具有多药耐药性, 流式细胞术检测 P170 蛋白在肿瘤组织表达高于正常组织, 对于定量评价多药耐药水平具有一定的临床指导意义<sup>[5]</sup>。还有研究<sup>[6]</sup>结果显示: 小儿神经母细胞瘤、淋巴瘤和卵黄囊瘤的所有化疗患儿外周血 MDR-1 表达量与同期手术切除的肿瘤组织 MDR-1 表达量存在正相关, 且随着化疗次数的增加, MDR-1 表达量也增加。但儿童白血病耐药方面的研究相对较少。随着对多药耐药研究的不断深入, 其在儿童白血病中的临床价值越来越显

著。本研究的 66 例初诊白血病患儿中有 32 例 P170 阳性, 其中 4 例为强阳性, 经随访 4 例中有 3 例化疗后未获缓解, 说明部分患者存在原发耐药。难治耐药组患儿的 P170 阳性表达率明显高于初治敏感组, 说明 P170 阳性者耐药性强, 与有关报道<sup>[7-9]</sup>相符。

本实验结果显示 ALL 与 ANLL 患儿的 P170 表达阳性率比较差异无统计学意义; 但也有些实验表明不同类型白血病 P170 表达有所不同<sup>[3]</sup>, ALL 的 P170 阳性率高于或低于 ANLL 患者, 在 ANLL 各亚型中从 M<sub>1</sub> ~ M<sub>6</sub> 均有不同程度表达, 以 M<sub>4</sub>、M<sub>5</sub> 及 M<sub>6</sub> 型表达偏高, M<sub>3</sub> 型表达偏低, 这可能与儿童的 ANLL 发病率相对较低及统计例数多少有关。

转染 MDR-1 基因的 shRNA 干扰表达质粒可有效抑制相应基因的表达, 可逆转 K562/A02 细胞对阿霉素的耐药性<sup>[10]</sup>。有实验<sup>[11]</sup>证明: CD19 的单克隆抗体可以抑制 CD19 和 P170 的相互作用, 可导致淋巴瘤的多药耐药逆转。这些都证明多药耐药基因与耐药性关系密切, 同时也启发了我们在儿童白血病研究领域开展一些新的工作, 譬如反义寡核苷酸技术和 RNA 干扰技术等也可应用于儿童白血病的多药耐药研究中。然而肿瘤细胞的多药耐药机制是复杂的, 存在多药耐药现象的肿瘤细胞中出现 P170 过表达的也仅有 40%<sup>[12,13]</sup>。许多抗肿瘤药物是通过激活内源性通路诱发细胞凋亡而达到杀伤肿瘤细胞的目的。细胞凋亡受到抑制可使肿瘤细胞对化疗敏感性降低; 因此, 凋亡受抑也成为最常见的耐药机制之一。凋亡抑制基因 bcl-2 基因家族 (bcl-2、bcl-x、bax、bak、mcl-1 和 A1)、p53、ras、c-myc、Fas/APO-1、bcr/abl、c-erbB-2/neu、Survivin 等基因的表达失控, 也可能导致白血病细胞对化疗药物产生耐受<sup>[14]</sup>。这促使我们探索与多药耐药相关的其他机制, 如凋亡相关基因可能也参与了白血病的耐药机制, 可成为我们今后研究的方向。

## [参考文献]

- [1] 赵瑜,于力,楼方定,等. 急性白血病患者 MRP、P26 和 P170 表达与多药耐药关系的分析 [J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(1): 40~41.
- [2] 张云普,邹典斌. 老年急性髓系白血病 P170 的表达与预后关系的研究 [J]. 医药论坛杂志, 2004, 25(19): 19~20.
- [3] 王祥财,张庭龙,李海亮,等. 急性白血病 P170 蛋白检测在其治疗中的临床意义 [J]. 赣南医学院学报, 2004, 24(2): 130~131.
- [4] 上海白血病协作组. 急性白血病患者 Pgp、mdrl、MRP 和 Top II

- 表达及其预后关系的研究[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(2): 90-93.
- [5] 饶歆, 林从尧, 冯茂辉, 等. 结直肠癌 P170 蛋白表达的检测及意义[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2010, 31(1): 58-60.
- [6] 邓晓斌, 王珊, 邹琳, 等. 小儿恶性肿瘤化疗前后外周血多药耐药基因、多药耐药相关蛋白基因、肺耐药蛋白基因的变化及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(10): 1087-1090.
- [7] Zhou DC, Marie JP, Suberville AM, et al. Relevance of mdr-1 gene expression in acute myeloid leukemia and comparison of different diagnostic methods[J]. Leukemia, 1992, 6(9): 879-885.
- [8] Boekhorst PA, Leeuw K, Schoester M, et al. Predominance of functional multidrug resistance (MDR-1) phenotype in CD34+ acute myeloid leukemia cells[J]. Blood, 1993, 82(10): 3157-3162.
- [9] 叶芳, 乔振华, 苏丽萍, 等. Fas 和 mdr-1 在急性白血病的表达及其相关性研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2004, 12(4): 411-415.
- [10] 余海青, 纪春岩, 马道新. 联合转染 mdr1 和 mol1 基因短发夹 RNA 干扰表达质粒逆转 K562/A02 细胞耐药的实验研究[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(7): 456-460.
- [11] Ghetté MA, Marches R, Kufert S, et al. An anti-CD19 antibody inhibits the interaction between P-glycoprotein (P-gp) and CD19, causes P-gp to translocate out of lipid rafts, and chemosensitizes a multidrug-resistant (MDR) lymphoma cell line[J]. Blood, 2004, 104(1): 178-183.
- [12] 陆游, 孙明杰, 王霆. 肿瘤多药耐药逆转剂 Tariquidar 的开发[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(6): 52-56.
- [13] Pusztai L, Wagner P, Ibrahim N, et al. Phase II study of Tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma[J]. Cancer, 2005, 104(4): 682-691.
- [14] Kim DW, Kim KO, Shin MJ, et al. siRNA-based targeting of anti-apoptotic genes can reverse chemoresistance in P-glycoprotein expressing chondrosarcoma cell[J]. Mol Cancer, 2009, 8(1): 28-38.

[收稿日期] 2011-02-07

[本文编辑] 周珠凤

## (上接第 1200 页)

- [17] Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, et al. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion[J]. Br J Pharmacol, 2010, 160(2): 220-232.
- [18] Ge ZD, Pravdic D, Bienengraeber M, et al. Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. Anesthesiology, 2010, 112(1): 73-85.
- [19] Raphael J, Cozal Y, Navot N, et al. Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(4): 348-357.
- [20] Inamura Y, Miyamae M, Sugioka S, et al. Aprotinin abolishes sevoflurane postconditioning by inhibiting nitric oxide production and phosphorylation of protein kinase C-delta and glycogen synthase kinase 3beta[J]. Anesthesiology, 2009, 111(5): 1036-1043.
- [21] Lemoine S, Zhu L, Beauchef G, et al. Role of 70-kDa ribosomal protein S6 kinase, nitric oxide synthase, glycogen synthase kinase-3 beta, and mitochondrial permeability transition pore in desflurane-induced postconditioning in isolated human right atria[J]. Anesthesiology, 2010, 112(6): 1355-1363.
- [22] Belhomme D, Peynet J, Louzy M, et al. Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery[J]. Circulation, 1999, 100(19 Suppl): II340-344.
- [23] Pouzet B, Lecharny JB, Dehoux M, et al. Is there a place for preconditioning during cardiac operations in humans[J]? Ann Thorac Surg, 2002, 73(3): 843-848.
- [24] De Hert S, ten Broecke PW, Mertens E, et al. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients[J]. Anesthesiology, 2002, 97(1): 42-49.
- [25] De Hert S, Vlasselaers D, Barbé R, et al. A comparison of volatile and non volatile agents for cardioprotection during on-pump coronary surgery[J]. Anaesthesia, 2009, 64(9): 953-960.
- [26] Guaraccino F, Landoni G, Tritapepe L, et al. Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: a multicenter randomized controlled study[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2006, 20(4): 477-483.
- [27] Bignami E, Biondi-Zoccai G, Landoni G, et al. Volatile anesthetics reduce mortality in cardiac surgery[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 23(5): 594-599.

[收稿日期] 2010-12-21

[本文编辑] 朱宝渊