

## · 论著 ·

## ATRA 耐药基因 HA117 相关蛋白在四种恶性肿瘤的表达及临床意义

李昆昆<sup>1</sup> 金先庆<sup>2</sup> 牟廷刚<sup>2</sup> 陈建飞<sup>2</sup> 赵利华<sup>2</sup> 丁雄辉<sup>2</sup> 孙艳辉<sup>2</sup> 王士奇<sup>2</sup>

【摘要】 目的 探讨 ATRA 耐药基因 HA117 相关蛋白在肠腺癌、肺癌、乳腺癌及神经母细胞瘤组织中的表达特点及临床意义。方法 以肠腺癌标本 20 例、肺癌标本 23 例、乳腺癌标本 21 例以及神经母细胞瘤标本 20 例手术切除组织为实验组;以巨结肠手术切除扩张段近切口缘的正常结肠组织 10 例、手术切除的肺癌癌旁组织 9 例、乳腺癌癌旁组织 11 例及神经母细胞瘤旁组织 14 例为对照组;应用免疫组化 S-P 法检测 HA117 蛋白在上述组织切片中的表达,并结合临床资料进行回顾性分析。结果 HA117 在肠腺癌、肺癌、乳腺癌以及神经母细胞瘤组织中阳性表达明显高于非癌组织,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );HA117 蛋白的阳性表达与肠腺癌、肺癌及乳腺癌患者的肿瘤分期、病理分型、淋巴结转移无明显相关性( $P > 0.05$ ),与神经母细胞瘤的病理分型和淋巴结转移有显著相关性( $P < 0.05$ )。结论 HA117 蛋白在肠腺癌、肺癌、乳腺癌以及神经母细胞瘤组织的高表达提示这四种恶性实体肿瘤对 ATRA 具有较强的耐药性。

【关键词】 多药耐药相关蛋白类;基因/HA117;肠肿瘤;肺肿瘤;乳腺肿瘤;神经母细胞瘤;维甲酸;免疫组织化学

**Expression features of ATRA-related resistance protein HA117 in the four malignant tumors and its clinical significance.** LI Kun-kun<sup>1</sup>, JIN Xian-Qing<sup>2</sup>, MU Ting-ang<sup>2</sup>, et al. 1. Daping Hospital and the Research Institute of Surgery of the Third Military Medical University, 2. Department of General Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

【Abstract】 **Objective** To explore the expression features of the protein of ATRA-related resistance gene HA117 in the colorectal adenocarcinoma, lung and breast neoplasms, neuroblastoma and its clinical significance. **Methods** 20 specimens of colorectal adenocarcinoma, 23 specimens of lung neoplasms, 21 specimens of breast neoplasms and 20 specimens of neuroblastoma were randomly selected as experimental group, while 10 specimens of normal colon, 9, 11 and 14 specimens of peritumoral organization of lung neoplasms, breast neoplasms and neuroblastoma as control group correspondingly. Streptavidin-peroxidase immunohistochemistry staining method was employed to detect the expression of protein HA117 in all specimens above and retrospective analysis was conducted combined with their clinical data. **Results** The positive expression rates of HA117 protein in the colorectal adenocarcinoma, lung and breast neoplasms, neuroblastoma were obviously higher than that in non-cancerous tissue ( $P < 0.05$ ), which showed no significant correlation with tumor grades, pathological types, lymph node metastasis in colorectal adenocarcinoma, lung and breast neoplasms ( $P > 0.05$ ). In the neuroblastoma, The positive rate of uFH was significantly higher than that of FH, and the rate was higher in the lymph node metastasis group compared with no lymph node metastasis group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** High levels of HA117 protein expressions in tissue of the colorectal adenocarcinoma, lung and breast neoplasms, neuroblastoma indicate presence of strong resistance to ATRA in these four kinds of cancer.

【Key words】 Multidrug Resistance-associated Proteins; Genes/HA117; Intestinal Neoplasms; Lung Neoplasms; Breast Neoplasms; Neuroblastoma; Tretinoin; Immunohistochemistry

目前在恶性肿瘤的综合治疗措施中,化疗是消除肿瘤、防治肿瘤转移和复发的主要手段。近年来研究表明全反式维甲酸(all trans retinoic acid, ATRA)具有良好的诱导分化作用,临床已将其作为治

疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)的首选诱导药物,但其诱导肿瘤细胞产生对该药及其它化疗药物的耐受现象也引起了国内外学者的关注<sup>[1-2]</sup>。因此,深入了解肿瘤细胞对化疗药物产生耐药的机制,从而改进和优化化疗方案,将有助于延长患者无瘤存活期,提高生存率。前期的研究通过建立多药耐药细胞 HL-60/ATRA,结合抑制消减杂交及基因芯片技术,筛选并克隆出一个多药耐药相关新基因 HA117(基因库登陆号 AY210354)主要表达于儿童恶性肿瘤如白血病细胞中<sup>[3-4]</sup>。本课题组已成功构建携带 HA117 基因的重组腺病毒和其沉默质粒,并验证了 HA117 具有明显的多药耐药功能<sup>[5-7]</sup>。在此基础上,我们成功构建了 HA117 多克隆抗体,并分别对肠腺癌、肺癌、乳腺癌和神经母细胞瘤中 ATRA 耐药基因 HA117 相关蛋白的表达进行分析,并结合临床病理资料,探讨 HA117 介导的耐药机制。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 标本来源:实验组为 2009~2010 年重庆市肿瘤医院手术切除并经病理检查确诊的标本 20 例、肺癌标本 23 例、乳腺癌标本 21 例以及重庆医科大学附属儿童医院 2008~2011 年神经母细胞瘤标本 20 例;对照组为重庆医科大学附属儿童医院普外科巨结肠手术切除扩张段近切口缘的正常结肠组织 10 例,重庆市肿瘤医院手术切除的肺癌癌旁组织 9 例、乳腺癌癌旁组织 11 例及神经母细胞瘤癌旁组织 14 例。

2. 实验材料:HA117 多克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司);KIT-9921 即用型免疫组化,ELiVision™ Super 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司);PBS 液代替第一抗体做为空白对照。

3. 实验设备:组织包埋机,组织切片机,微波炉,4℃冰箱,显微镜等。

### 二、免疫组织化学检测方法

所有标本用 10% 福尔马林溶液固定,石蜡包埋,厚 5 μm 连续切片,贴附于经多聚赖氨酸处理的切片,之后 60℃ 烤片 18 h。切片经脱蜡水化,用 0.01 mol 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)进行微波加热抗原修复,3% 双氧水灭活过氧化物酶,BSA 封闭抗原,以 1:100 比例稀释浓缩型第一抗体,滴加 40 μL 一抗后 4℃ 冰箱过夜。PBS 冲洗后分别滴加生物素标

记的二抗和 SP 复合物放大效应,DAB 显色,镜下控制显色时间中止反应,苏木素复染,脱水透明、封片。

### 三、结果判断

HA117 以细胞质为表达部位,呈棕黄色或棕褐色为阳性,每片观察 5 个 40 倍光镜下视野,用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算阳性细胞数,根据试剂公司提供的判断标准:阳性细胞数 < 10%,肿瘤细胞胞质呈棕黄色为阴性表达(-),10%~25% 为低度表达(+),25%~75% 为中度表达(++),> 75% 为高度表达(+++),中高度表达为强阳性表达,表示肿瘤对该耐药基因所介导的药物具有耐受性。

### 四、统计学分析

使用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,用 Fisher 精确检验(Fisher exact test)统计计数资料, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

20 例肠腺癌中,HA117 阳性表达 15 例(占 75%);10 例正常结肠组织中,HA117 阳性表达 1 例(阳性细胞数占 11.2%),占 10%;23 例肺癌中,HA117 蛋白阳性表达 14 例(占 60.9%),9 例肺癌癌旁组织中阳性表达仅 1 例(占 11.1%);21 例乳腺癌中,HA117 阳性表达率为 57.1%(12/21),11 例乳腺癌癌旁组织中无阳性表达出现[0.0(0/11)]。20 例神经母细胞瘤的阳性表达率为 70%(14/20),瘤旁正常组织的表达率为 21%(3/14),结果有显著差异( $P < 0.05$ )。HA117 在肠腺癌、肺癌、乳腺癌以及神经母细胞瘤组织中的阳性表达明显高于非癌组织,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1、图 1)。

HA117 蛋白的阳性表达与肠腺癌、肺癌及乳腺癌患者的肿瘤分期、病理分型、淋巴结转移无明显相关( $P > 0.05$ ,表 2),与神经母细胞瘤的病理分型和淋巴结转移有显著相关( $P < 0.05$ ,表 2)。

## 讨论

ATRA 是目前国内治疗急性早幼粒细胞性白血病、骨髓异常增生的首选药物,具有很强的诱导肿瘤细胞分化作用;也对各种消化道实体肿瘤具有抑制增殖和诱导分化的作用;是重要的辅助化疗药物,但 ATRA 诱导瘤细胞产生对 ATRA 及其它化疗药物的耐受现象也引起了国内外学者广泛关注<sup>[8-10]</sup>。

表 1 HA117 蛋白在不同组织细胞中的表达情况(例, %)

组别	n	HA117 蛋白在不同组织细胞中的表达				阳性表达
		-	+	++	+++	
对照组						
正常结肠组织	10	9(90.0)	0(0.0)	1(10.0)	0(0.0)	1(10.0)
肺癌癌旁组织	9	7(77.8)	1(11.1)	1(11.1)	0(0.0)	1(11.1)
乳腺癌癌旁组织	11	9(81.8)	2(18.2)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
神经母细胞瘤癌旁组织	14	9(64.2)	2(14.3)	3(21.4)	0(0.0)	3(21.4)
实验组						
肠腺癌	20	3(15.0)	2(10.0)	10(50.0)	5(25.0)	15(75.0) *
肺癌	23	4(17.4)	5(21.7)	10(43.5)	4(17.4)	14(60.9) *
乳腺癌	21	5(23.8)	4(19.0)	11(52.3)	1(4.8)	12(57.1) *
神经母细胞	20	4(20.0)	2(10.0)	6(30.0)	8(40.0)	14(70.0) *

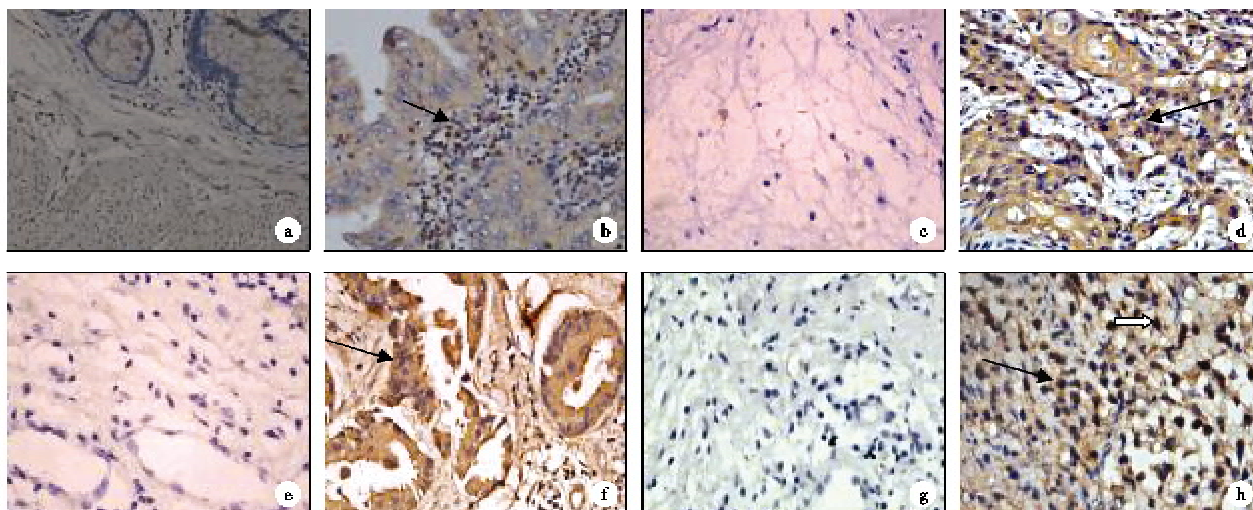
注: \* 与对照组的相应组织比较,  $P < 0.05$ 

图 1 HA117 蛋白在正常结肠组织(a)、结肠癌组织(b)、肺癌癌旁组织(c)、肺癌组织(d)、乳腺癌癌旁组织(e)、乳腺癌组织(f)、神经母细胞瘤癌旁组织(g)以及神经母细胞瘤组织(h)中的表达情况 (SP ×400)

表 2 HA117 蛋白在 4 种恶性肿瘤组织中的表达及与临床表现的相关性(例, %)

组别	分期				病理分型						淋巴结转移	
	I	II	III	IV	中央型	周围型	非浸润性	浸润性	分化型	未分型	无	有
肠腺癌	2	9	3	1	/	/	/	/	/	/	8	7
肺癌	2	7	5	/	10	4	/	/	/	/	7	7
乳腺癌	1	7	4	/	/	/	2	10	/	/	8	4
神经母细胞瘤	/	/	/	/	/	/	/	/	5	6	3	11

肿瘤细胞多药耐药的产生是多基因参与调控的复杂过程,如经典的多药耐药基因 *mdrl*、乳腺癌多药耐药相关基因 *bcrp*、抗凋亡基因 *survivin* 等均参与调控肿瘤细胞多药耐药的产生<sup>[11-13]</sup>。但这些基因并不足以完全阐明肿瘤细胞多药耐药产生的机制。新基因 HA117 的发现,完善了肿瘤多药耐药机制的基因谱,进一步研究发现该基因定位于 14 号染色体上,并编码一由 365 个氨基酸组成的碱性蛋白,该蛋白含有 4 个与蛋白激酶磷酸化有关的功能位

点,其功能结构域与新近发现的参与调控细胞凋亡的重要基序 - “PYRIN”同源<sup>[5,14,15]</sup>。通过电子表达谱分析,我们已经获知新基因 HA117 主要表达于各种肿瘤组织,并具有使肿瘤细胞对化疗药物耐受性增强的功能<sup>[8]</sup>。但在其它实体瘤组织中表达情况及其耐药机制目前尚不清楚。

本研究结果显示肠腺癌、肺癌、乳腺癌和神经母细胞瘤组织中,ATRA 相关耐药蛋白 HA117 的表达明显高于非癌组织,表明 HA117 参与了上述 4 种恶

性肿瘤的耐药。通过检测患者体内 HA117 的表达情况,可以更客观地评价患者癌组织对 ATRA 的耐药情况。

比较 HA117 在各临床资料组间的阳性表达率,发现肠腺癌、肺癌、乳腺癌组织中,HA117 阳性表达与患者肿瘤分期、病理分型无明显相关性( $P > 0.05$ );提示不同病理分级的肿瘤组织均可发生较强的 ATRA 耐药,临床上不能将 HA117 表达测量值作为判断肿瘤恶性程度的标准。HA117 阳性表达在有无淋巴结转移及不同年龄组间比较虽无明显差异,但存在肿瘤淋巴结转移或年龄较大的患者癌组织中 HA117 阳性表达率增加的趋势,推测 ATRA 相关肿瘤耐药除了与肿瘤细胞本身特性有关外,尚与肿瘤其它生物学特性有关。HA117 介导的 ATRA 相关肿瘤耐药与淋巴结转移以及发病年龄的关系尚需大样本实验进一步证实。而在神经母细胞瘤组织中,相对于分化型(FH)神经母细胞瘤,未分化型(uFH)神经母细胞瘤中 HA117 表达明显增高,结果有显著差异。表明 uFH 型神经母细胞瘤更具有耐药性,可以考虑在化疗前进行 ATRA 诱导,以取得更好的化疗效果。有淋巴结及远处转移组较无转移组 HA117 表达率明显增高,提示发生转移的肿瘤细胞对化疗敏感性低,可能发生耐药,所以要选择敏感性高的药物。

HA117 在肠腺癌、肺癌、乳腺癌和神经母细胞瘤组织的显著性表达,说明 HA117 参与了肿瘤的耐药产生机制,通过检测患者 HA117 的表达情况可以评价其癌组织耐药情况,为临床化疗个体化用药提供相应指导,也许经过深入的研究,HA117 可作为肿瘤在使用 ATRA 化疗前评估的重要指标;本实验结果有助于探索化疗药物在恶性肿瘤治疗和防复发中的新途径。

## 参考文献

- De Stefano V, Teofili L, Sica S, et al. Effect of all-trans retinoic acid on procoagulant and fibrinolytic activities of cultured blast cells from patients with acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1995, 86: 3535-3541.
- Candoni A, Damiani D, Michelutti A, et al. Clinical characteristics, prognostic factors and multidrug-resistance related protein expression in 36 adult patients with acute promyelocytic leukemia[J]. Eur J Haematol, 2003, 71: 1-8.
- Komura N, Ikeda Y, Masuda N, et al. Designed ATRA analogue active against ATRA-resistant acute promyelocytic leukemia cells having a single nucleotide substitution in their retinoic acid receptor[J]. Leuk Res, 2007, 31: 301-313.
- Che Y, Xu YH, Zheng GH, et al. Clinical significance of HA117 expression in children with acute leukemia[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2009, 40(5): 873-876.
- Zheng GH, Fu JR, Xu YH, et al. Screening and cloning of multi-drug resistant genes in HL-60/MDR cells[J]. Leuk Res, 2009, 33: 1120-1123.
- Guo Yu-xia, Luo Qing, Xu You-hua. Cloning of human HA117 gene and preparation of its recombinant adenovirus vector[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2008, 33(6): 641-644.
- Zheng Gai-huan, Jin Xian-qing, Guo Yu-xia, et al. Study on the related function of a novel gene HA117 in the multi-drug resistance of lymphoma Raji cell[J]. TUMOR, 2009, 29(4): 315-318.
- Tsai WH, Hsu HC, Lin CC, et al. Role of interleukin-8 and growth-regulated oncogene- $\alpha$  in the chemotactic migration of all-trans retinoic acid-treated promyelocytic leukemia cells toward alveolar epithelial cells[J]. Crit Care Med, 2007, 35: 879-885.
- Dokmanovic M, Chang BD, Fang J, et al. Retinoid-induced growth arrest of breast carcinoma cells involves co-activation of multiple growth-inhibitory genes[J]. Cancer Biol Ther, 2002, 1: 24-27.
- Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, et al. Retinoids in cancer chemoprevention[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004, 4: 285-298.
- Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target[J]. Mol Interv, 2001, 1: 117-125.
- Allen JD, Schinkel AH. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1: 427-434.
- Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions[J]. Carcinogenesis, 2007, 28: 1133-1139.
- Manji GA, Wang L, Geddes BJ, et al. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 11570-11575.
- Wu GQ, Liao YJ, Qin ZQ, et al. PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma[J]. Plasmid, 2010, 64: 41-50.