

多药耐药基因作用的新发现

宋 鹏,段蕴铀,黄友章,吴海波
海军总医院质量管理科,北京 100048

[摘要] 目的:观察被照射的小细胞肺癌细胞系在外照射前后其总 RNA(核糖核酸)、*MDR1* mRNA(多药耐药基因的信使核糖核酸)、药物敏感性和放射敏感性的变化,从而探讨多药耐药基因是否还有其他未被揭示的新作用。方法:采用 GWGP80 型远距离 ^{60}Co 治疗机对进入指数生长期的 NCI-H446 小细胞肺癌细胞系进行分次外照射。用 Trizol 分别提取未照射细胞(S-cell, Sc)和已完成全部外照射剂量的 NCI-H446 细胞(R-cell, Rc)的总 RNA。采用 RT-PCR(逆转录聚合酶链反应)法来确定两组细胞 *MDR1* mRNA 表达的高低。通过加入丝裂霉素和逆转剂维拉帕米后的干扰来分别观察外照射前后 NCI-H446 细胞系存活率的变化。然后对 Sc 和 Rc 再给予不同剂量的外照射,1 周后计算它们各自的集落形成率(PE)和存活率(S)。结果:在相同细胞数和相同体积的条件下,未照射组和照射组细胞总 RNA 的浓度分别为 25.9 mg/L 和 16.6 mg/L;未照射组细胞其 *MDR1* cDNA(多药耐药基因的逆转录脱氧核糖核酸)/ β -actin cDNA 为 1.078,照射组为 1.338。在相同浓度的化疗药丝裂霉素的干扰下,照射组细胞的存活率均明显高于未照射组($P<0.01$);再加入逆转剂维拉帕米后,两组细胞的存活率则变化不大($P>0.05$)。在分别给予 2 Gy 和 4 Gy 的外照射后,照射组细胞的存活率(S)分别为 $(79.67\pm34.48)\%$ 和 $(23.73\pm8.62)\%$,而未照射组的分别为 $(51.24\pm11.88)\%$ 和 $(19.40\pm5.59)\%$,其差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:化疗药以外的损伤因素也可以使多药耐药基因表达增强,而这些损伤因素所引起的多药耐药基因的高表达均可以使细胞对后来的其他损伤因素产生耐受。因此,多药耐药基因应改称耐多种损伤基因似乎更能体现其内涵。

[关键词] 细胞系;小细胞肺癌;外照射;*MDR1* mRNA;药物敏感性;丝裂霉素;逆转作用;维拉帕米;放射敏感性

[中图分类号] R730.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2012)01(a)-005-05

The new findings of multi-drug resistant (MDR) genes's effect

SONG Peng, DUAN Yunyou, HUANG Youzhang, WU Haibo

Department of Quality Control, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

[Abstract] **Objective:** To observe the change of the total RNA and *MDR1* gene, the chemosensitivity and the radio-sensitivity of NCI-H 446 small cell lung cancer cell line, and to explore the other effect of multidrug resistant (MDR) genes.

Methods: NCI-H 446 small cell lung cancer cell line which was exponential phase of growth was explored to ^{60}Co treatment machine (GWGP80 type). The total RNA of the cells that were unirradiated (S-cell, Sc) and irradiated (R-cell, Rc) were isolated from homogenate samples by the acid guanidine thiocyanate-phenol chloroform method. The expression of *MDR1* mRNA was assessed by qualitative RT-PCR assays. The survival rates of NCI-H446 cell line were respectively observed by the interference of different concentration of Mitomycin C and the reversal agent of verapamil before and after fractioned radiation treatment. The two kinds of cells were administered different doses of radiation treatment again. And then the plating efficiency (PE) and the survival rate (S) respectively one week after that treatment were calculated. **Results:** For the unirradiated cells, the concentration of the total RNA was 25.9 mg/L and the ratio of the average value of electrophoresis trip from *MDR1* cDNA/ β -actin cDNA was 1.078; but for the irradiated cells, this two numerical values were 16.6 mg/L and 1.338 respectively. The survival rate of the radiated cells was higher than that of the unirradiated cells under the same concentration of Mitomycin C ($P<0.01$); after adding the reversal agent of Verapamil to the two cell lines, the change of the survival rates of the two cell lines became almost the same level ($P>0.05$). After 2 Gy and 4 Gy radiation treatment, the survival rates of irradiated cells were $(79.67\pm34.48)\%$ and $(23.73\pm8.62)\%$ respectively and that of unirradiated cells were $(51.24\pm11.88)\%$ and $(19.40\pm5.59)\%$ respectively, there were significant differences ($P<0.05$). **Conclusion:** Besides chemotherapy, the other scathing factors can also enhance the expression of its *MDR1* gene. The high expression of the *MDR1* gene by the scathing factors can bring cells to produce endurance toward other subsequent scathing factors. So, it is more appropriate to calling *MDR1* gene the multifold scathing factors-fast gene.

[Key words] Cell line; Small cell lung cancer; Radiation; *MDR1* mRNA; Chemosensitivity; Mitomycin C; Reversal effect; Verapamil; Radio-sensitivity

在临床上使用一种化疗药对肿瘤患者实施化疗后,治疗后的肿瘤细胞可同时多种不同结构的其他抗癌药也产生耐药性,这种现象称为多药耐药(multi-drug resistance, MDR)。

人类肿瘤细胞多药耐药的经典途径是由多药耐药基因(*MDR1* Gene)转录出 *MDR1* mRNA,再由 *MDR1* mRNA 翻译的糖蛋白(P-gp)介导的^[1]。这种 ATP 酶依赖的跨膜蛋白 P-gp,

有将天然来源的药物泵出细胞的功能,这可使细胞内的药物浓度降低而导致MDR^[2]。临床上有时患者在外照射后对其后的化疗不再敏感,即外照射也表现出了MDR表型。本文主要是观察被照射的小细胞肺癌细胞系在外照射前后其总RNA、MDR1 mRNA、药物敏感性以及放射敏感性的变化,从而探讨多药耐药基因是否还有其他未被揭示的新作用。

1 材料与方法

1.1 材料

上海科学院细胞库购得NCI-H446小细胞肺癌细胞系。该细胞系的生物学性状参见文献[3],其培养条件参见文献[4]。细胞生长进入指数期后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 照射条件 采用中国核动力研究设计院实验工厂生产的GWGP80型远距离⁶⁰Co治疗机,照射条件参见文献[4]。

1.2.2 细胞的外照射 当NCI-H446细胞进入指数生长期后,用0.25%胰酶消化,并将吹匀的细胞悬液移入75 ml的细胞培养瓶中进行培养,等细胞贴壁并汇合后进行外照射,照射剂量为2 Gy/次(戈瑞,辐射吸收剂量单位),中间恢复3 d,总的外照射剂量为50 Gy^[5]。

1.2.3 外照射前后NCI-H446细胞总RNA的提取 分别取照射前后的NCI-H446细胞约1×10⁷个,用PBS将NCI-H446细胞冲洗2遍,离心后弃上清液,各加1 ml Gibco公司生产的Trizol,吹打使NCI-H446细胞溶解,用氯仿液抽提后,加入异丙醇沉淀,用70%乙醇洗涤,然后凉干,最后加0.1%DEPC水溶解总RNA。提取后的总RNA经紫外分光光度计260 nm定量。

1.2.4 RT-PCR RT-PCR的详细过程参见参考文献[4]。

1.3 不同浓度的丝裂霉素(MMC)对外照射前后两组细胞存活率的影响

1.3.1 配制不同血浆峰浓度(PPC)的MMC 配制不同血浆峰浓度(PPC)的MMC的具体方法参见参考文献[6]。丝裂霉素的血浆峰浓度为0.5 μg/ml^[7]。

1.3.2 制备外照射前后两组细胞相同浓度的单细胞悬液 具体方法参见参考文献[6]。

1.3.3 细胞毒性试验 具体方法参见参考文献[6]。

1.3.4 不同浓度丝裂霉素作用下两组细胞的平均存活率 细胞存活率的计算公式^[8]如下:

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{实验组A值} - \text{空白组A值}}{\text{对照组A值} - \text{空白组A值}} \times 100\%$$

细胞的平均存活率是每组6个样本的细胞存活率的平均数,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。在相同的条件下细胞的存活率高,提示相对耐药;反之,则相对敏感。

1.4 加逆转剂维拉帕米后不同浓度丝裂霉素(MMC)对外照射前后两组细胞存活率的影响

1.4.1 配制不同血浆峰浓度(PPC)的MMC 方法同本文的“1.3.1”,但不用生理盐水稀释,而用细胞培养液1640溶解。

1.4.2 逆转剂维拉帕米的配制 取12.45 ml的1640培养液加50 μl的5 mg/ml的维拉帕米即可制成浓度为20 μg/ml的维拉帕米溶液^[9]。

1.4.3 制备外照射前后两组细胞的单细胞悬液 方法同本文

的“1.3.2”。

1.4.4 细胞耐药性的逆转实验 具体方法参见参考文献[6]。

1.4.5 计算不同浓度丝裂霉素作用下和加入逆转剂维拉帕米后两组细胞的平均存活率 见“1.3.4”所述。

1.5 外照射前后NCI-H446细胞放射敏感性的变化

1.5.1 外照射前后NCI-H446细胞存活率(S)的变化 实验分Sc组和Rc组,每组各取3.5 cm的细胞培养皿18个。每个培养皿加入细胞300个,再加入1640应用液1.5~2.0 ml,每组细胞的18个培养皿再分成6小组,每组3个皿。分别给予0、2、4、6、8和10 Gy 6个不同剂量的外照射。1周后计算两组细胞的集落形成率(PE)和每小组细胞的存活率(S),并比较两组细胞的PE和在相同剂量外照射条件下的存活率。同时取原本细胞组的存活率最接近50%的外照射剂量作为下一步实验的外照射剂量。PE和S的计算公式如下:

$$PE = \frac{\text{未照射组形成的集落数}}{\text{未照射组接种的细胞数}} \times 100\%$$

$$S = \frac{\text{照射后细胞形成的集落数}}{\text{接种细胞} \times \text{未照射细胞的集落形成率(PE)}} \times 100\%$$

1.5.2 两组细胞生长状况和细胞死亡率的差别^[10-11] 取Sc和Rc各5组,每组3个培养皿,每个皿中加入指数生长期细胞1×10⁴个,培养2~3 d,使其贴壁并进入指数生长期,按步骤“1.5.1”确定的2 Gy放射剂量作为测试两组细胞放射敏感性的外照射剂量。使用这个外照射剂量同时一次性照射两组共30个培养皿的细胞。照射后分别于第2、4、6、8和10天各取1组共6个皿进行细胞计数,取每组3个皿细胞的平均数作为最后结果。每次将做完细胞计数的剩余单细胞悬液加入离心管,以1 500 r/min的转速离心5 min,然后弃上清液,加入0.5%台盼蓝2~3滴将细胞染色,染色后的细胞点滴在血球计数板上,分别计数活细胞(白色)和死亡细胞(蓝色),算出细胞死亡率(P)。细胞死亡率的计算公式如下:

$$P = \frac{\text{死亡细胞数}}{\text{活细胞数} + \text{死亡细胞数}} \times 100\%$$

1.6 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行数据分析。计量资料数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本间均数比较采用独立样本的t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外照射前后NCI-H446细胞的总RNA浓度

在相同细胞数和相同体积的前提下,照射前后NCI-H446细胞总RNA的浓度分别为25.9 mg/L和16.6 mg/L。

2.2 外照射前后NCI-H446细胞MDR1 mRNA的RT-PCR结果

外照射前后NCI-H446细胞MDR1 mRNA的RT-PCR的结果见图1。除最上面的条带Mr(DL2000)外,从上至下可见四条带,它们依次为未照射细胞的β-actin cDNA(简称为β-actin cDNA)、照射细胞的β-actin cDNA(简称为P-β-actin cDNA)、未照射细胞的MDR1 cDNA(简称为MDR1 cDNA)和照射细胞的MDR1 cDNA(简称为P-MDR1 cDNA)。这四条带经Gelbase电脑软件进行光密度扫描所得的平均光密

度(OD)值分别为 59.49、49.76、64.14 和 66.60。这样 P-*MDR1* cDNA/P- β -actin cDNA 为 1.388, 而 *MDR1* cDNA/ β -actin cDNA 为 1.078。

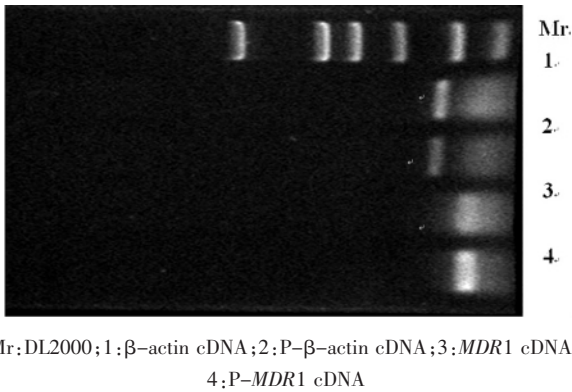


图 1 小细胞肺癌细胞系外照射前后其多药耐药基因表达的变化

2.3 外照射前后两组细胞在不同浓度丝裂霉素作用下其存活率的变化
结果见表 1 和图 2。

表 1 两组细胞在不同浓度丝裂霉素作用下其平均存活率的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0.1 PPC	1 PPC	10 PPC	20 PPC
Rc 组	0.842 0 $\pm$ 0.103 8	0.693 5 $\pm$ 0.001 7	0.551 8 $\pm$ 0.002 0	0.424 0 $\pm$ 0.001 8
Sc 组	0.708 2 $\pm$ 0.003 4	0.523 2 $\pm$ 0.022 1	0.344 5 $\pm$ 0.002 4	0.302 5 $\pm$ 0.000 5
t 值	2.570 6	2.570 6	2.570 5	2.570 6
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

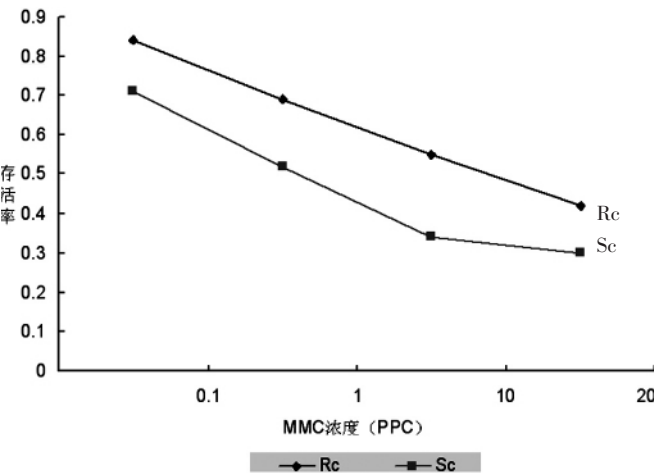


图 2 两组细胞在不同浓度丝裂霉素的干扰下其平均存活率的变化

2.4 外照射前后两组细胞在加入逆转剂维拉帕米后,其不同浓度丝裂霉素作用下存活率的变化
结果见表 2。

2.5 两组细胞在不同剂量外照射下的集落形成数、集落形成率和存活率的结果
结果见表 3。

表 2 细胞在加入逆转剂后,其不同浓度丝裂霉素作用下平均存活率的变化 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	0.1 PPC	1 PPC	10 PPC	20 PPC
Rc 组	0.934 0 $\pm$ 0.089 5	0.809 0 $\pm$ 0.035 8	0.110 0 $\pm$ 0.053 9	0.064 0 $\pm$ 0.006 9
Sc 组	0.973 0 $\pm$ 0.038 0 ^a	0.943 0 $\pm$ 0.042 0 ^b	0.125 0 $\pm$ 0.023 0 ^a	0.055 0 $\pm$ 0.012 0 ^b

注:与 Rc 组比较,^a*P*>0.05,^b*P*<0.01

表 3 两组细胞在不同剂量外照射条件下平均集落形成数(X_s, X_R) (300 个细胞/皿)和平均存活率(S_s, S_R) ($\bar{x} \pm s$)

外照射剂量(Gy)	平均集落形成数		平均存活率(%)	
	Sc 组	Rc 组	Sc 组	Rc 组
0	134.00 $\pm$ 24.00	39.33 $\pm$ 1.33	44.67 $\pm$ 17.11 [*]	13.11 $\pm$ 0.15 [*]
2	68.66 $\pm$ 21.33	31.33 $\pm$ 5.33	51.24 $\pm$ 11.88 ^a	79.67 $\pm$ 34.48
4	26.00 $\pm$ 8.00	9.33 $\pm$ 1.33	19.40 $\pm$ 5.59 ^a	23.73 $\pm$ 8.62
6	0	5.33 $\pm$ 1.33	2.97 $\pm$ 0.99	24.48 $\pm$ 3.39
8	0	0	0	0
10	0	0	0	0

注:^{*}因无干扰因素,实际上是两组细胞未照射前的集落形成率(PES、PER);与 Rc 组比较,^a*P*<0.05

3 讨论

在临床上,化疗和放疗是治疗肿瘤患者常用的两种方法,但存在的主要问题是化疗后耐药。在临床工作中笔者也发现了另一个现象,即放疗后患者有时也会对其后的化疗和再放疗产生耐受,这个现象引起了笔者的关注,继而探讨放疗是否也会对照射细胞的 *MDR1* gene 有影响,并进而影响其后的药物敏感性和放射敏感性。基于上述原因,笔者设计了本课题,希望通过对体外培养的小细胞肺癌细胞系实施分次外照射,来观察其对照射细胞的总 RNA 和 *MDR1* mRNA 的表达变化以及其对照射细胞的药物敏感性和放射敏感性所产生的影响,为今后的临床工作提供基础医学的根据。

MDR1 mRNA 是细胞总 RNA 的组成部分,笔者很关注对体外培养的细胞在外照射后其总 RNA 的变化。外照射后对细胞总 RNA 的生物合成是有影响的,多数学者认为外照射后细胞总 RNA 的生物合成下降;相反的意见也同样存在。研究者考虑这可能是由于细胞的代谢状况、生长周期和取样时间不同所造成的^[12]。本实验表明,细胞受 50 Gy 的外照射后,其总 RNA 的浓度由 25.9 mg/L 下降到了 16.6 mg/L,生物合成受到明显抑制。

MDR1 mRNA 的表达增强是导致 MDR 的主要原因,因此,探讨细胞受外照射后是否导致其后的化疗呈 MDR 表型也应该首先观察外照射后其 *MDR1* mRNA 的表达变化。本研究通过对小细胞肺癌 NCI-H466 细胞系实施分次外照射建立了完成根治性外照射剂量的小细胞肺癌细胞系模型。从结果中图 1 可见,除最上面的条带 Mr(DL2000)外,从上至下可见四条带,它们依次为未照射细胞的 β -actin cDNA(简称为 β -actin cDNA)、照射细胞的 β -actin cDNA(简称为 P- β -actin cDNA)、未照射细胞的 *MDR1* cDNA(简称为 *MDR1* cDNA)和照射细胞的 *MDR1* cDNA(简称为 P-*MDR1* cDNA)。这四条带经 Gelbase 电脑软件进行光密度扫描所得的平均 OD 值分别为:59.49、49.76、64.14 和 66.60。这样 P-*MDR1* cDNA/P- β -actin cDNA 为 1.388,而 *MDR1* cDNA/ β -actin cDNA 为 1.078。

这两个比值反映了细胞照射以后和未照射前其MDR1 mRNA的相对含量。比值大则反映其MDR1 mRNA的表达强。这样,从结果中可以看出照射后的比值1.388比照射前的比值1.078明显增大,表明NCI-H446小细胞肺癌细胞经体外总剂量为50 Gy的外照射后其MDR1 mRNA的表达增强。这意味着此种细胞很有可能对其后的化疗耐药。

上面探讨了外照射对NCI-H446小细胞肺癌细胞系MDR1 mRNA的影响,结果表明其表达增强,但该细胞是否对其后的化疗耐药尚需做药敏方面的实验来证实。本文采用了噻唑蓝(MTT)法^[6],实测了两组细胞在不同浓度化疗药物的干扰下,其各自不同的存活率,从而判断其不同的药物敏感性。1983年Mosman^[13]首先将MTT法用于细胞毒试验的检验,目前该法广泛用于体外抗癌药物敏感试验。活细胞(红细胞除外)中线粒体脱氢酶对可溶性MTT分解、转化,产生一种蓝紫色结晶物——甲臜。甲臜溶解于二甲基亚砷(DMSO)中变成紫红色溶液,在600 nm左右波长中测定其颜色的强度,它的颜色和活细胞成正比,因此根据其颜色的强弱可反映活细胞的多少,从而推算出肿瘤细胞在抗癌药物中的存活率。肿瘤细胞的存活率越低,说明此种化疗药物对肿瘤细胞杀伤力越强,即敏感性越高,反之则敏感性越低^[14]。

从本结果中表1和图2可见,外照射后的体外细胞,在不同浓度的丝裂霉素作用下,照射后细胞的存活率均明显高于未照射细胞。此实验结果表明,外照射后NCI-H446细胞的体外化疗药物敏感性已经降低,换句话说即体外耐药性提高。日本富田腾朗和美国Salmon等均研究过体外药物试验和体内临床用药的关系。他们的研究结果是两者的相符合率为90%左右^[8]。这个结论表明体外和体内细胞的耐药性关联性很高。从表1和图2的结果还可以看到,随着干扰药物浓度的提高,两组细胞的存活率平稳地下降,这说明本研究设计的干扰药物浓度较为合适。

上面的结果表明外照射后被照射细胞对其后的化疗产生了耐药性。那么这种耐药性是否也可以被增敏剂所逆转呢?为此,笔者做了如下的实验,即给已经产生了耐药的细胞加入了一种常用的化疗增敏剂维拉帕米,来观察其耐药性是否可以被逆转。从表2可以看到,两组细胞在加入逆转剂维拉帕米后,在化疗药丝裂霉素的浓度分别为0.1、10和20 PPC时,存活率比较差异无统计学意义($P>0.05$),这表明Rc组细胞的耐药已被逆转;而在丝裂霉素的浓度为1 PPC时,Rc组细胞的存活率反而明显低于未照射的Sc组细胞($P<0.01$),这表明Rc组细胞的耐药表现不仅被逆转,且在这种情况下比Sc组细胞更敏感。实验结果说明今后在肺癌化疗时可以考虑同时应用化疗逆转药物。但有的逆转药剂量小时不起太多的作用,而剂量大时其带来的副作用患者又难以忍受,因此,使用受到限制^[15]。为了解决这个问题,临床上曾使用两种逆转药物联用的办法,取得了良好的逆转效果^[9]。

本实验结果表明外照射不仅可以使被照射细胞的MDR1 mRNA表达增强,而且被照射细胞还对其后的化疗药产生了耐药性,并且这种耐药性可以被常规使用的化疗增敏剂所逆转。对外照射后被照射细胞对其后的放疗反应的问题,笔者对Sc和Rc再给予相同剂量的外照射,来观察这两

种细胞对相同条件的外照射的反应。从表3结果可知,首先,Sc与Rc的集落形成率(PE)分别为 $(44.67\pm17.11)\%$ 和 $(13.11\pm0.15)\%$,差异有高度统计学意义($P<0.01$),表明NCI-H446细胞经50 Gy的外照射后,其集落形成能力下降明显;其次,在分别给予2 Gy和4 Gy的外照射后,Rc系的存活率(S)分别为 $(79.67\pm34.48)\%$ 和 $(23.73\pm8.62)\%$,而Sc系的存活率(S)分别为 $(51.24\pm11.88)\%$ 和 $(19.40\pm5.59)\%$,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明在2~4 Gy范围内,Rc系较Sc系对外照射的抵御能力增强明显。提示经过外照射后,肿瘤细胞耐外照射的能力增强。临床上也有这个现象,即在放疗过的部位再放疗时,效果明显降低。Fertil等^[16]认为测定体外细胞的放射敏感性是判定肿瘤放疗反应的一个非常有用的指标。Williams等^[17]也认为测定细胞放射敏感性可预测临床放疗效果;第三,本实验表明,当放疗剂量达8 Gy/次或以上时,两组细胞的存活率(S)均为0。这提示临床上如果单次放射剂量很大时,照射野内的肿瘤细胞有可能被全部杀死,但同时正常细胞可能也难逃厄运。

综上所述,笔者可以得出如下结论:外放射可以使体外培养的肿瘤细胞的MDR1 mRNA表达增强;这种被照射细胞由于其MDR1 mRNA的表达增强,对其后的化疗药产生了耐药性,并且这种耐药性还可以被化疗增敏剂所逆转;不仅如此,被照射的细胞对其后的放疗也产生了耐受。表明化疗药以外的损伤因素也可以使多药耐药基因表达增强,而这些损伤因素所引起的多药耐药基因的高表达均可以使细胞对后来的其他损伤因素(如放疗等)产生耐受。因此,多药耐药基因应改称耐多种损伤基因似乎更能体现其内涵。

[参考文献]

- [1] Thorgeirsson SS, Huber BE, Sorrell S, et al. Expression of the multidrug-resistant gene in hepatocarcinogenesis and regenerating rat liver [J]. Science, 1987, 236(4805): 1120-1122.
- [2] 章小平, 杨红枚, 鲁功成, 等. 膀胱癌 MRP 亚克隆的建立及其 MDR 表型[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 22(3): 273-275.
- [3] Gazdar AF, Carney DN, Arion M, et al. Characterization of variant sub-classes of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties [J]. Cancer Research, 1985, 45(6): 2924-2930.
- [4] 段蕴铀, 宋鹏, 聂青, 等. 外照射对体外培养的小细胞肺癌细胞系总RNA及多药耐药基因的影响[J]. 北京医学, 2002, 24(4): 254-256.
- [5] Sanchez AM, Barrett JT, Schoenlein PV, et al. Fractionated ionizing radiation accelerates loss of amplified MDR1 genes harbored by extrachromosomal DNA in tumor cells [J]. Cancer Research, 1998, 58(17): 3845-3854.
- [6] 宋鹏, 段蕴铀, 杨建军, 等. 维拉帕米对外照射导致的小细胞肺癌细胞系耐药性的逆转作用[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(4): 365-367.
- [7] 陈历排, 周昊, 李志阳, 等. 用微量板 ATP 生物发光法检测肿瘤细胞对化疗药物的敏感性[J]. 肿瘤, 2000, 20(2): 103.
- [8] 唐伟, 谭体义, 陈在贤, 等. 自体肿瘤细胞药敏检测指导膀胱癌术后化疗[J]. 重庆医学, 1999, 28(2): 94-96.
- [9] 胡江文, 沈振亚, 杨吉成, 等. γ -干扰素与维拉帕米联合逆转人肺癌细胞系的多药耐药[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2003, 23(1): 17.
- [10] 李建人, 赵彼得, 罗沈如, 等. 高热合并化疗放疗对人结肠癌细胞的作用[J]. 中华理疗杂志, 1995, 18(3): 131-133.
- [11] 梁利波, 千新来, 马业伟, 等. EIA 基因对人肺腺癌细胞增殖和细胞周

(下转第24页)

表 2 膀胱移行细胞癌组织中 MMP-9 的表达与临床病理特征的关系

参数	例数	MMP-9(例)				阳性率(%)	χ ² 值	P 值
		-	+	++	+++			
性别	男	58	16	12	21	9	72.4	0.235
	女	34	11	3	10	10	67.6	
年龄	≥60 岁	39	9	6	19	5	76.9	1.284
	<60 岁	53	18	9	12	14	66.0	
组织学分级		11	4	1	4	2	63.6	0.308
		36	10	7	10	9	72.2	
		45	13	7	17	8	71.1	
周围脏器浸润	有	56	12	11	24	9	78.6	4.329
	无	36	15	4	7	10	58.3	
淋巴结转移	有	51	8	13	23	7	84.3	10.301
	无	41	19	2	8	12	53.7	
生存时间	>1 年	28	5	7	10	6	82.1	2.563
	≤1 年	64	22	8	21	13	65.6	

者。MMPs 目前已发现了至少 26 个成员,其中 MMP-9 主要降解明胶从而导致肿瘤细胞向周围组织浸润转移。有资料显示 MMP-9 不仅参与 ECM 的降解,而且还对肿瘤细胞的黏附能力有影响^[7]。通常 MMP-9 以酶原形式在细胞内合成并最终被分泌到细胞外,改变分子构型后被激活,能降解多种细胞外基质成分,其中对 ECM 的降解和破坏是其中最关键的一步。大量研究表明,MMP-9 在多种恶性肿瘤中呈现过度表达,在恶性肿瘤浸润转移过程中扮演着重要角色。本文显示 MMP-9 在 BTCC 中的表达与肿瘤侵犯周围脏器、淋巴结转移有密切关系^[8-9]。本文说明 MMP-9 在 BTCC 的发生发展过程中起重要作用,且 MMP-9 阳性表达可作为 BTCC 浸润转移的重要分子标志之一^[10]。目前关于 HPA 与 MMP-9 关系的研究尚不统一^[11]。本研究同时证实 HPA 与 MMP-9 在 BTCC 浸润转移过程中有明显协同作用。因此,联合检测二者表达不仅可以作为早期发现和判断膀胱移行细胞癌的有效方法,同时还可作为评价膀胱移行细胞癌预后的重要指标。总之,HPA 和 MMP-9 在膀胱移行细胞癌组织中共同表达增高,并均与肿瘤浸润转移过程相关,表明其可作为预测膀胱移行细胞癌的临床联合检测指标。

[参考文献]

[1] 李琨,李明昌,陆永建.乙酰肝素酶基因在 U251 胶质瘤细胞株中的表达[J].实用医学杂志,2007,23(13):1959-1961.
[2] Somiari S B, Somiari R I, Heckman C M, et al. Circulating MMP-2 and MMP-9 in breast cancer-potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories [J]. Int J Cancer,2006,119(6):1403-1411.

(上接第 8 页)

期的影响[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(11):663-665.
[12] 夏寿萱.放射生物学[M].北京:军事医学科学出版社,1998:90-91.
[13] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immuno Meth, 1983,65(1-2):55-63.
[14] Hoff DD, Casper J, Bradier E, et al. Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy [J]. Am J Med,1981,70(5):1027-1041.

[3] Mendes O, Kim H T, Stoica G. Expression of MMP-2, MMP-9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model [J]. Clin Exp Metastasis,2005,22(3):237-246.
[4] 曾轶晖.基因治疗胰腺癌的研究[J].中国医药导报杂志,2009,6(7):156-159.
[5] Gorogh T, Beier UH, Baumken J, et al. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas [J]. Head Neck,2006,28(1): 31-39.
[6] Baraz L, Haupt Y, Elkin M, et al. Tumor suppressor p53 regulates heparanase gene expression [J]. Oncogene,2006,25(28):3939-3947.
[7] Zhang S, Li L, Lin JY, et al. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol,2003,9(5):899-904.
[8] 胡忠良,文继舫,沈明,等.TGIF,MMP9 和蛋 VEGF 白在胃癌中的表达及临床病理联系[J].中南大学学报,2006,31(1):76-80.
[9] Matsumura S, One N, Nakayama H, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol,2005,131(1): 19-25.
[10] O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression [J]. Histopathology,2007,51(6):793-804.
[11] 范钰,王崇强,张振水,等.基质金属蛋白酶 7mRNA 在胰腺癌组织中表达的临床意义[J].齐齐哈尔医学院学报,2008,29(1):4-6.

(收稿日期:2011-05-13)

[15] 王宝成,李志,郭军,等.TAM 对非小细胞肺癌经 NVB-DDP 方案诱导耐药性逆转的临床观察[J].中国肿瘤临床,2003,30(9):656.
[16] Fertl B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,1985,14 (11):1699-1706.
[17] Williams M, Lyu M, Yang Y, et al. IER5, a novel member of the slow kinetics immediate-early genes [J]. Genomics,1999,55(3):327-334.

(收稿日期:2011-08-02)