

[文章编号 1000-1182(2004)02-0115-02]

唾液腺粘液表皮样癌组织 P-gp 单克隆抗体 JSB-1 及 GST- 抗体的检测

何 嘉¹,王大章²,郑光勇¹,冯 戈¹

(1. 四川大学教育部口腔生物医学工程教育部重点实验室,四川 成都 610041;

2. 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科教研室,四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨唾液腺粘液表皮样癌耐药性产生的机制,以便有针对性地采取逆转措施提高综合治疗中化疗的效果。方法 选取四川大学华西口腔医院口腔颌面外科 1995~2000 年 40 例术前未经任何治疗的唾液腺粘液表皮样癌标本,采用免疫组化 ABC 法,进行 P-gp 单克隆抗体 JSB-1 的检测,同时对其中 10 例进行了 GST- 的检测。结果 JSB-1 表达阳性率为 67.5 % (27/40),与分化程度相关,高分化组和中分化组均高于低分化组 ($P < 0.05$),高分化组和中分化组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。GST- 表达阳性率为 90 % (9/10)。两种抗体的表达在唾液腺粘液表皮样癌组织中的表达无统计学差异,亦无相关性。结论 JSB-1 及 GST- 与唾液腺粘液表皮样癌产生耐药的机制有关,为开展其耐药性的研究提供了靶标。

[关键词] 多药耐药; P 糖蛋白; 谷胱甘肽-S 转移酶; 粘液表皮样癌

[中图分类号] R 782 [文献标识码] A

Detection of P-glycoprotein and Glutathione S-transferase in Mucoepidermoid Carcinoma of Salivary Gland HE Jia¹, WANG Da-zhang², ZHENG Guang-yong¹, FENG Ge¹. (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to investigate the mechanism(MDR) of multidrug resistance(MDR) of mucoepidermoid carcinoma in salivary gland. **Methods** 40 cases of mucoepidermoid carcinoma in salivary gland were examined the MDR gene product P-glycoprotein using a monoclonal antibody JSB-1. And 10 of them were also investigated by detecting the expression of GST-. All the cases had not been accepted any therapy before the samples were collected. **Results** Positive expression of JSB-1 was observed in 27 of the 40 specimens. The positive expression was related not only with clinical stage, but also with differentiation degree. The GST- positive expression was found in 9 of 10 cases. There was no significant different between the positive expression of JSB-1 and GST-. **Conclusion** JSB-1 and GST- play an important role in MDR of mucoepidermoid carcinoma.

[Key words] multidrug resistance; P-glycoprotein; glutathione; mucoepidermoid carcinoma

包括粘液表皮样癌的唾液腺恶性肿瘤的最佳治疗方案是尽可能将局部癌灶完全切除,术后选择性放疗。而合理的联合化疗方案虽能最大限度发挥细胞毒性作用,但因多药耐药(multidrug-resistance,MDR)的出现而宣告失败。在各种已知的耐药性产生的过程中,由 *mdr1* 基因编码的 P 糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)的过度表达¹ 和谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione S-transferase,GST-)的超表达² 是重要机制。本研究采用免疫组化 ABC 的方法,检测唾液腺粘液表皮样癌组织石蜡切片中 P-gp 单克隆抗体 JSB-1 及 GST- 表达的水平,从而了解其耐药性产生的机制,以期提高

唾液腺粘液表皮样癌综合治疗中化疗的效果。

1 材料和方法

1.1 P-gp 单抗 JSB-1 的检测

1.1.1 研究对象 选择四川大学华西口腔医院口腔颌面外科 1995~2000 年唾液腺粘液表皮样癌 40 例,年龄 9~76 岁,其中男性 17 例,女性 23 例,高分化者 19 例,中分化者 15 例,低分化者 6 例。经病理证实 4 例有颈部淋巴结转移,肺部 CT 及 X 线片显示 1 例有双肺转移。依 UICC(1987 年)标准分期,I 期 18 例,II 期 11 例,III 期 8 例,IV 期 3 例。所有病例在术前均未采取任何治疗措施。以上病例的组织标本常规制成 5 μ m 的石蜡切片。

1.1.2 对照组 实验设阴性对照,即用上述肿瘤组织切片,与实验组同时实验,以 PBS 缓冲液代替第一抗体。

[收稿日期 2003-07-04; 修回日期 2003-11-25]

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(0112444);四川大学优秀博士学位论文奖励基金资助项目(40305505010)

[作者简介]何 嘉(1976-),男,四川人,博士

[通讯作者]何 嘉,Tel.:028-89040661

1.1.3 主要试剂 鼠 P-gp 单克隆抗体 JSB-1(中山公司产品),工作浓度为 1:50;Biotin-第二抗体(中山公司产品),工作浓度为 1:200;Streptavidin(中山公司产品),工作浓度为 1:200。抗原修复液是将枸橼酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,分析纯)21 g 用蒸馏水 1 000 ml 完全溶解后用 HCl 调节 pH 值至 6.0。

1.1.4 实验步骤 采用 ABC 法进行免疫组化染色。对照组用 PBS 缓冲液代替第一抗体,其余同实验组。

1.2 GST- 抗体的检测

从以上病例组织切片中选取 10 例,其中高分化者 4 例,中分化者 4 例,低分化者 2 例,进行 GST- 抗体的检测。实验方法同 P-gp 单抗 JSB-1 的检测,第一抗体为兔 GST- 抗体(DAKO 公司,美国),工作浓度为 1:200。

1.3 结果判定

实验切片在高倍显微镜下观察,随机选取 3 个视野,各记数 100 个肿瘤细胞,阳性细胞大于或等于 10 %者定为阳性(+)。并采用 χ^2 检验对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 P-gp 单抗 JSB-1 检测结果

40 例唾液腺粘液表皮样癌石蜡切片中 P-gp 单抗 JSB-1 染色呈阳性者 27 例,阳性率为 67.5 %,阳性细胞常聚集成团,可见整个癌巢染色,亦有单个分布阳性细胞。阳性细胞呈棕黄色,染色位于表皮样细胞和中间细胞的细胞膜和细胞浆,粘液细胞未见着色,细胞核均无染色;阴性对照组均未见阳性着色(图 1)。

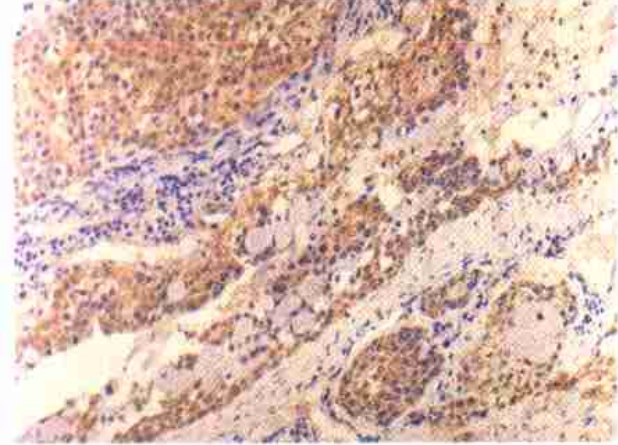


图 1 P-gp 在粘液表皮样癌表皮样细胞和中间细胞呈棕色阳性表达 ABC ×200

Fig1 The positive expression of P-gp in epidermoid cells and intermediate of mucoepidermoid carcinoma cells are umber ABC ×200

表 1 为不同分化程度的粘液表皮样癌 P-gp 单抗 JSB-1 表达情况,经统计学处理,发现 JSB-1 的表达与分化程度有关($P < 0.05$)。再作组间 χ^2 检验,高分化

组与中分化组 JSB-1 表达无统计学差异($P > 0.05$);高分化组与中分化组 JSB-1 表达均高于低分化组,且差别有显著性($P < 0.05$)。

表 1 不同分化程度的粘液表皮样癌 P-gp 单抗 JSB-1 的表达

Tab 1 The expression of JSB-1 in different degrees of differentiation of mucoepidermoid carcinoma of salivary gland

分化程度	例数	阳性	阴性
高分化	19	14	5
中分化	15	12	3
低分化	6	1	5

表 2 为不同临床分期的粘液表皮样癌中 JSB-1 的表达情况,经统计学分析,各组间差异无显著性($P < 0.05$)。4 例有颈淋巴结转移的病例中,有 2 例 JSB-1 表达阳性;1 例双肺转移染色结果为阴性。

表 2 不同临床分期的粘液表皮样癌 P-gp 单抗 JSB-1 的表达

Tab 2 The expression of JSB-1 in different clinical stagings of mucoepidermoid carcinoma of salivary gland

临床分期	例数	阳性	阴性
I 期	18	13	5
II 期	11	7	4
III 期	8	6	2
IV 期	3	1	2

2.2 GST- 抗体检测结果

10 例 GST- 抗体染色除 1 例低分化者为阴性外,其余均为阳性,阳性率 90 %。阳性细胞亦为肿瘤细胞中的表皮样细胞和中间细胞,着色部位为细胞浆及细胞核,以细胞浆为主(图 2)。10 例粘液表皮样癌中,GST- 和 JSB-1 皆阳性表达 5 例,GST- 和 JSB-1 皆阴性表达 1 例,GST- 阳性和 JSB-1 阴性 4 例,经统计学分析,两种抗体的表达程度无显著性差异。

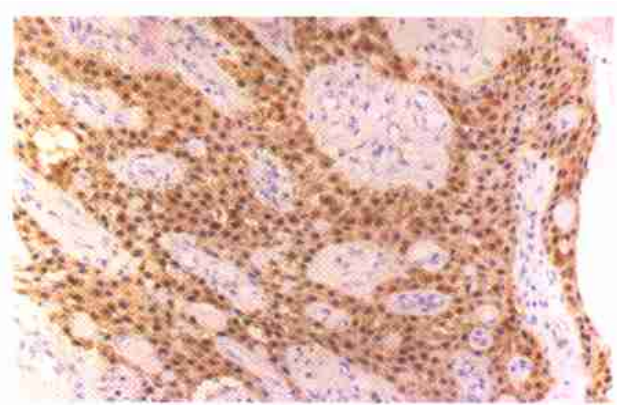


图 2 GST- 在粘液表皮样癌表皮样细胞和中间细胞呈棕色阳性表达 ABC ×200

Fig 2 The positive expression of GST- in epidermoid cells and intermediate cells mucoepidermoid carcinoma are umber ABC ×200

(下转第 151 页)

入的 PABA 浓度的增高,变链菌细胞表面疏水性随之逐渐降低。提示,PABA 除了通过影响特异性的粘结素受体机制,还可能通过降低细菌非特异性疏水作用而抑制变链菌对唾液包被羟磷灰石表面的粘附。作用机制可能是:含有一级氨基基团化合物 PABA 通过氨基的甲酰化作用与表面蛋白抗原作用或改变其构型,从而影响细胞表面疏水性的强弱;微生物利用 PABA 合成四氢叶酸成为辅酶,催化肽类和某些-氨基酸等的合成,从而改变细胞表面疏水性氨基酸或表面蛋白抗原的组成,影响细胞表面疏水性的强弱。

[参考文献]

- 1] LaPolla RJ, Haron JA, Kelly CG, et al. Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus* J. *Infect Immun*, 1991, 59(8): 2677-2685.
- 2] 郭斌,周学东,胡涛,等. 对氨基苯甲酸对变链菌在唾液获得性膜上粘附的影响 J. *华西医科大学学报*, 2001, 32(3): 348-

(上接第 116 页)

3 讨论

探讨唾液腺癌的 MDR 机制,对于克服癌细胞的耐药性,提高化疗的敏感性,增强综合治疗中化疗的效果有重要意义。多药耐药是肿瘤化疗疗效难以提高的重要因素,其机制非常复杂,近年来对许多肿瘤的研究结果都表明 P-gp 是耐药的重要机制,但在唾液腺肿瘤中 P-gp 的表达情况罕见报道。实验表明³,在唾液腺腺癌 (adenocarcinoma) 中, P-gp 呈高表达 (37/37),似可说明腺癌的耐药机制。Kelley 等⁴曾采用 P-gp 单抗 UIC₂ 对经其他方法治疗的 53 例头颈部鳞癌进行了检测,阳性率为 69%,且与肿瘤的大小和淋巴结转移无关;但 P-gp 阳性百分率随鳞癌组织分化程度的不同而有差异。本研究中 40 例唾液腺粘液表皮样癌的表达情况看,其表达率为 67.5%,依分化程度不同,阳性率也不同,高分化组 (14/5) 和中分化组 (12/3) 明显高于低分化组 (1/5),但在高分化组和中分化组间则无统计学差异,这与临床上分化较高的肿瘤化疗疗效较差的结论相一致。本研究未发现临床分期与 P-gp 表达的百分率有关,也与 Kelley 等的报道有相似之处。本研究中有 4 例病理证实颈淋巴结转移病例,染色结果 2 例为阳性;1 例双肺转移为阴性,因样本数较少,故其统计分析的结果不应作为结论性的参照。

GST 作为一种肿瘤生物学特性的标志,也被认为与多种肿瘤的耐药性有关。国内张建国等⁵曾报

349.

- 3] 郭斌,周学东,肖晓蓉,等. 共生因子 PABA 实验基础培养基的筛选 J. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(1): 23-25.
- 4] Rosenberg M. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: Water interface J. *Crit Rev Microbiol*, 1991, 18(2): 159-173.
- 5] Dill KA. The meaning of hydrophobicity J. *Science*, 1990, 250(4978): 297-298.
- 6] McBride BC, Song M, Krasse Bo, et al. Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of *Streptococcus mutans* J. *Infect Immun*, 1984, 44(1): 68-75.
- 7] Ohta H, Kato H, Okahashi N, et al. Characterization of a cell-surface protein antigen of hydrophilic *Streptococcus mutans* strain GS-5 J. *J Gen Microbiol*, 1989, 135(Pt4): 981-988.
- 8] Kelly C, Evans P, Ma J K, et al. Sequencing and characterization of the 185 kDa cell surface antigen of *Streptococcus mutans* J. *Arch Oral Biol*, 1990, 35 (Suppl): 33S-38S.
- 9] Carlsson J. Nutritional requirements of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in mixed culture J. *Arch Oral Biol*, 1971, 16(8): 963-965.

(本文编辑 汤亚玲)

道,高分化唾液腺粘液表皮样癌中该酶表达阳性率为 100% (32/32),推测其耐药性与该酶的表达有关。本研究选取了 P-gp 单抗 JSB-1 表达阳性和阴性各 5 例,其中高分化 4 例,中分化 4 例,低分化 2 例,进行了 GST 的检测,结果显示除 1 例低分化者为阴性外,其余 9 例均为阳性。通过统计学分析未发现 JSB-1 与 GST 的表达有显著性差异,因此,唾液腺粘液表皮样癌的耐药性可能与这两种机制均有关系,提示应对该问题作进一步的研究。

关于各种耐药机制临床逆转的研究正在起步⁶,如果能描述唾液腺恶性肿瘤耐药性的机制,并能将这些逆转机制运用于临床研究,则可能对其治疗方法的选择有重要意义。

[参考文献]

- 1] 梁巍,杨纯正. 多药耐药基因的结构、功能及表达调控 J. *国外医学药学分册*, 1997, 24(3): 139-142.
- 2] Mulder TJP. Glutathione S-transferase and glutathione in human head and neck cancer J. *Carcinogenesis*, 1995, 16(5): 619.
- 3] Uematsu T, Hasegawa T, Hiraoka BY, et al. Multidrug resistance gene 1 expression in salivary gland adenocarcinomas and oral squamous-cell carcinomas J. *Int J Cancer*, 2001, 92(2): 187-194.
- 4] Kelley DJ, Pavelic ZP, Capany M, et al. Detection of P-glycoprotein in squamous cell carcinomas of head and neck J. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1993, 119(3): 411-414.
- 5] 张建国,刘浩,章魁华,等. 谷胱甘肽 S 转移酶在唾液腺肿瘤中的表达 J. *现代口腔医学杂志*, 1997, 11(2): 84-86.
- 6] 张萍,王大章,郑光勇,等. 热疗对肿瘤细胞耐药性的影响 J. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(2): 127-129.

(本文编辑 汤亚玲)