

晚期鼻咽癌患者基因治疗前后 TS 和 GST- π 及 Topo II 的表达变化及其与预后的关系

张 政, 翁敬锦, 韦海明, 兰桂萍, 覃 颖, 覃扬达, 孙金杰, 司勇锋

基金项目: 广西卫生厅重点科研课题(编号:重 200721)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院耳鼻咽喉头颈肿瘤科(张 政, 翁敬锦, 兰桂萍, 覃 颖, 覃扬达, 孙金杰, 司勇锋), 病理科(韦海明)

作者简介: 张 政(1965 -), 男, 大学本科, 医学学士, 副主任医师, 研究方向: 鼻咽癌的基础和临床研究。E-mail: zhangzheng86499@yahoo. com. cn

通讯作者: 司勇锋(1957 -), 男, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 头颈肿瘤诊治。E-mail: syfklxf@yahoo. com. cn

[摘要] **目的** 初步探讨重组人 p53 腺病毒(rAd-p53)鼻咽部瘤内注射前后的鼻咽癌原发灶中胸苷酸合成酶(TS)、谷胱甘肽 S-转移酶 π (GST- π)和拓扑异构酶 II (Topo II)的表达变化及其临床意义。**方法** 采用免疫组化法检测 80 例晚期鼻咽癌患者治疗前后肿瘤组织中 TS、GST- π 和 Topo II 的表达情况。**结果** 常规放疗化疗组在治疗后其 TS、GST- π 和 Topo II 的表达明显升高(P 分别为 0.01、0.01、0.00), 基因治疗组和单纯放疗组其治疗后 TS、GST- π 和 Topo II 的表达未见明显改变($P > 0.05$)。三组间的复发率和转移率差异无统计学意义($P = 0.95$)。疗前 GST- π 阴性患者其复发率和转移率明显低于阳性患者(8.93% vs 54.17%, $P = 0.00$)。**结论** GST- π 蛋白的异常表达与晚期鼻咽癌治疗后复发转移有关。基因治疗晚期鼻咽癌可能通过抑制 TS、GST- π 、Topo II 蛋白表达进而逆转鼻咽癌化疗耐药。

[关键词] p53 基因治疗; 化疗耐药; TS; GST- π ; Topo II

[中图分类号] R 739.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)12-1126-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.12.09

The expression of TS, GST- π , Topo II in advanced nasopharyngeal carcinoma patients treated with gene therapy and its influence on prognosis ZHANG Zheng, WENG Jing-jin, WEI Hai-ming, et al. Department of Otolaryngology Head and Neck Oncology, the People's Hospital Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of thymidylate synthase (TS), glutathione S-transferase enzyme π (GST- π) and topoisomerase II (Topo II) protein before and after the recombinant human p53 adenovirus (rAd-p53) intratumoral injection and its significance. **Methods** Eighty patients with advanced nasopharyngeal carcinoma were randomly divided into 3 groups: the gene therapy group (30 cases); rAd-p53 intratumoral injection and concurrent chemo-radiotherapy, the conventional chemoradiotherapy group (30 cases) and the radiotherapy group (20 cases). Clinical data and the nasopharyngeal tumor tissues which were intratumoral injection with rAd-p53 were collected. The two-step immunohistochemical was done to detect the TS, GST- π and Topo II protein expression in the primary tumor tissue of nasopharyngeal carcinoma. **Results** The expression TS, GST- π and Topo II in conventional chemoradiotherapy group was significantly higher than that before treatment (P values were 0.01, 0.01, 0.00). In gene treatment group, the expression TS, GST- π and Topo II did not change significantly ($P > 0.05$). There were no significant difference in the expression of TS, GST- π and Topo II before and after radiotherapy alone ($P > 0.05$). Among the three groups, the recurrence rate and metastasis rate were not significantly different ($P = 0.95$). The recurrence rate in GST- π negative patients was significantly lower than that in positive patients (8.93% vs. 54.17%, $P = 0.00$). **Conclusion** GST- π protein expression is positively correlated with recurrence and metastasis in pa-

tients with advanced nasopharyngeal carcinoma after treatment. The rAd-p53 intratumoral injection can reverse chemoresistance of nasopharyngeal carcinoma by inhibition of GST- π , Topo II protein, which might be its mechanism of NPC treatment.

[Key words] p53 gene therapy; Resistance to chemotherapy; TS; GST- π ; Topo II

鼻咽癌(NPC)是我国常见的恶性肿瘤,放射治疗是主要治疗方法,目前对于中晚期鼻咽癌主要采用采用同期放化疗。肿瘤化疗失败的主要原因是多药耐药(MDR)的产生。随着肿瘤发病分子机制的逐步揭示和分子生物学技术的发展,肿瘤基因及其治疗已成为研究热点。研究发现 p53 基因突变影响肿瘤细胞对化疗的敏感^[1,2]。有关 p53 基因导入对鼻咽癌化疗耐药的影

响的研究不多。本研究通过免疫组化方法检测鼻咽癌组织中三种耐药蛋白胸苷酸合成酶(thymidylate synthase,TS)、谷胱甘肽 S-转移酶(π (Glutathione S-transferase π ,GST- π)和拓扑异构酶 II (Topoisomerase II ,Topo II)的表达,以初步了

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广西壮族自治区人民医院 2007-02 ~ 2010-12 收治的 80 例中、晚期鼻咽癌患者,其中男 66 例,女 14 例,年龄 20 ~ 60 岁,中位年龄 44 岁。采用配对随机分组方法将患者分为基因治疗组(rAd-p53 瘤内注射 + 同步放化疗, Gene 组 30 例);同步放化组(CCRT 组 30 例);单纯放疗组(RT 组 20 例)。三组患者的性别、年龄、T 分期、N 分期、临床分期间差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表 1。

表 1 三组患者一般资料比较(n)

组 别	性别		年龄(岁)		T 分期			N 分期				临床分期	
	男	女	≤44	>44	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3	Ⅲ期	Ⅳ期
基因治疗组	25	5	16	14	5	13	12	11	9	6	4	16	14
同步放化组	25	5	19	11	5	18	7	6	11	10	3	20	10
单纯放疗组	16	4	10	10	8	8	4	5	2	5	8	9	11
χ^2	0.115		0.033		7.063			12.331				2.455	
P	0.944		0.597		0.133			0.055				0.293	

1.2 病例选择方法

1.2.1 病例纳入条件 (1)经病理诊断为鼻咽部未分化非角化性癌,未行抗癌治疗;(2)按 UICC (1997)鼻咽癌分期方案分期的Ⅲ、Ⅳ期鼻咽癌患者;(3)年龄在 20 ~ 60 岁之间;(4)卡氏评分≥70 分;(5)自愿参加并签署知情同意书。

1.2.2 病例排除条件 (1)研究期间需要增加任何其他抗肿瘤伴随治疗;(2)有精神、神经系统严重病变者;(3)有出血倾向性疾病者;(4)有较严重的肝肾功能损伤者;(5)鼻咽癌复发患者。

1.2.3 病例剔除条件 (1)研究中途要求退出本研究者;(2)在用药期间发生了严重不良事件患者;(3)经研究者判断不适于继续参加本研究者。

1.3 治疗方法 (1)同步放化组:直线加速器常规体外照射,联合卡铂 + 5-Fu 化疗。(2)基因治疗组:rAd-p53 瘤内注射 + 同步放化疗,重组人 p53 腺病毒注射液(rAd-p53,中国深圳赛百诺公司生产)在鼻内窥镜直视下行鼻咽部原发灶瘤体内注射,1 × 10¹²

VP/次,每周 1 次,共 6 次。(3)单纯放疗组:按常规放疗方案。

1.4 试剂及检测方法

1.4.1 试剂 采用免疫组化的 ElivisionTM plus 二步法试剂盒、TS、GST- π 和 Topo II 蛋白均购自福州迈新生物工程技术公司。DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司。

1.4.2 检测方法 全部标本经 4% 甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片(4 μ m),HE 染色,光镜检查。采用 ElivisionTM plus 二步法(根据试剂说明书操作)进行 TS、GST- π 和 Topo II 蛋白检测。用已知的 TS、GST- π 和 Topo II 蛋白阳性切片作对照,用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。免疫组化结果判断:在显微镜下观察,Topo II 以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性;TS 和 GST- π 均以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。

1.5 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计数资料组间比较和关联性分析采用 χ^2 检

验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组治疗前 TS、GST- π 和 Topo II 的表达情况
治疗前基因治疗组、同步放化组和单纯放疗组 TS、GST- π 和 Topo II 的阳性表达率分别为 33.33%、46.67%、25%；30%、36.7%、20%；30%、36.67%、30%；三组间表达差异无统计学意义 (P 值分别为

表 2 TS、GST- π 和 Topo II 与鼻咽癌各临床病理指标之间的关系 (n)

组 别	性别				年龄(岁)				T 分期					N 分期					临床分期					
	男	女	χ^2	P	≤44	>44	χ^2	P	T2	T3	T4	χ^2	P	N0	N1	N2	N3	χ^2	P	Ⅲ期	Ⅳ期	χ^2	P	
TS 表达	(-)	43	8	0.32	0.57	27	24	0.63	0.43	15	25	11	5.51	0.06	16	11	15	9	3.19	0.36	33	18	4.09	0.04
	(+)	23	6			18	11			3	14	12			6	11	6	6			12	17		
GST-π 表达	(-)	47	9	0.26	0.61	31	25	0.06	0.81	12	28	16	0.16	0.92	14	16	14	12	1.33	0.72	31	25	0.06	0.81
	(+)	19	5			14	10			6	11	7			8	6	7	3			14	10		
TopoⅡ表达	(-)	46	8	0.83	0.36	35	19	4.95	0.03	10	29	15	2.06	0.36	17	17	12	8	4.32	0.23	34	20	3.04	0.08
	(+)	20	6			10	16			8	10	8			5	5	9	7			11	15		

2.3 三组患者耐药蛋白表达治疗前后的比较
同步放化组 TS、GST- π 和 Topo II 的表达较治疗前明显升高 (P 值分别为 0.01, 0.01, 0.00), 基因治疗组和单纯放疗组治疗前后 TS、GST- π 和 Topo II 的表达未见明显改变 ($P \geq 0.05$)。见表 3。

表 3 三组患者耐药蛋白表达治疗前后的比较 [$n(\%)$]

组 别	耐药蛋白表达	治疗前	治疗后	χ^2	P
基因治疗组 ($n=30$)	TS	(+) 20(66.67)	14(46.67)	2.44	0.12
		(-) 10(33.33)	16(53.33)		
	GST- π	(+) 21(70.00)	17(56.67)	1.15	0.28
		(-) 9(30.00)	13(43.33)		
	TopoII	(+) 21(70.00)	20(66.67)	0.08	0.78
		(-) 9(30.00)	10(33.33)		
同步放化组 ($n=30$)	TS	(+) 16(53.33)	6(20.00)	7.18	0.01
		(-) 14(46.67)	24(80.00)		
	GST- π	(+) 19(63.33)	9(30.00)	6.69	0.01
		(-) 11(36.67)	21(70.00)		
	TopoII	(+) 19(63.33)	6(20.00)	11.27	0.00
		(-) 11(36.67)	24(80.00)		
单纯放疗组 ($n=20$)	TS	(+) 15(75.00)	14(70.00)	0.13	0.72
		(-) 5(25.00)	6(30.00)		
	GST- π	(+) 16(80.00)	15(75.00)	0.14	0.71
		(-) 4(20.00)	5(25.00)		
	TOPOII	(+) 14(70.00)	13(65.00)	0.11	0.74
		(-) 6(30.00)	7(35.00)		

0.59, 0.09, 0.53)。

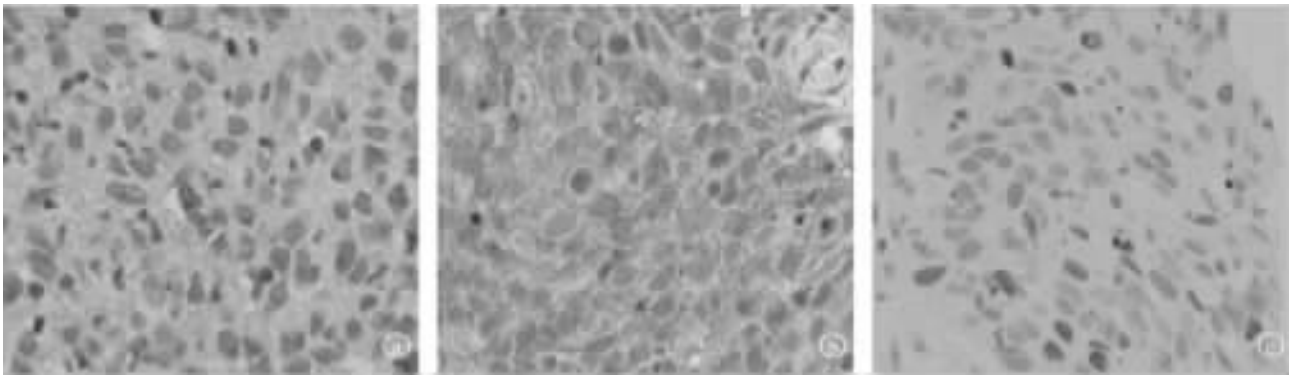
2.2 TS、GST- π 和 Topo II 与鼻咽癌各临床病理指标之间的关系
Ⅳ期患者 TS 阳性表达率较Ⅲ期高 (48.57% vs 26.67%, $P=0.04$)；中老年患者其 Topo II 阳性表达明显高于中青年患者 (45.71% vs 22.22%, $P=0.03$)；余各组间 TS、GST- π 和 Topo II 表达差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见表 2。

2.4 三组治疗后复发和转移情况比较
基因治疗组、同步放化组及单纯放疗组患者治疗后分别有 5 例、7 例、4 例出现复发和(或)转移, 三组比较差异无统计学意义 ($P=0.95$)。

2.5 治疗前后耐药蛋白表达与肿瘤复发和(或)转移的关系
治疗前及治疗后 TS 和 Topo II 蛋白表达均与肿瘤的复发和(或)转移无关 (均 $P > 0.05$)。治疗前和治疗后 GST- π 蛋白表达均与肿瘤的复发和(或)转移有关 (均 $P < 0.05$)。见表 4。

表 4 治疗前后耐药蛋白表达与肿瘤复发和(或)转移的关系 [$n(\%)$]

时 点	耐药蛋白表达	例数	肿瘤复发和转移		χ^2	P
			无	有		
治疗前	TS(-)	51	41(80.39)	10(19.61)	0.01	0.91
	TS(+)	29	23(79.31)	6(20.69)		
治疗后	TS(-)	34	29(85.29)	5(14.71)	1.04	0.31
	TS(+)	46	35(76.08)	11(23.92)		
治疗前	GST- π (-)	56	51(91.07)	5(8.93)	14.30	0.00
	GST- π (+)	24	13(54.16)	11(45.84)		
治疗后	GST- π (-)	41	38(92.68)	3(7.32)	8.46	0.01
	GST- π (+)	39	26(66.66)	13(33.34)		
治疗前	TopoII(-)	54	43(79.62)	11(20.38)	0.01	0.91
	TopoII(+)	26	21(80.76)	5(19.24)		
治疗后	TopoII(-)	39	31(79.48)	8(20.54)	0.01	0.91
	TopoII(+)	41	33(80.48)	8(19.52)		



①: TS 在鼻咽癌细胞质的表达;②: GST- π 在鼻咽癌细胞质的表达;③: Topo II 在鼻咽癌细胞核的表达
图 1 TS、GST- π 、Topo II 在鼻咽癌组织中的阳性表达 (ElivisionTM plus 二步法 $\times 40$)

3 讨论

3.1 鼻咽癌治疗后主要的死亡原因是局部复发和远处转移^[3]。研究发现,影响局部复发和远处转移的因素除了分期等因素外,还与治疗方式有关。化疗可在一定程度上降低局部复发风险,但随着化疗次数的增加,肿瘤细胞对化疗存在耐药。目前众多学者寻找其他有效治疗手段以提高肿瘤控制率。基因治疗在晚期肿瘤治疗方面应用越来越广泛,并已取得了较为满意的效果。基因治疗的原理是将人的正常基因或有治疗作用的基因通过一定方式导入人体靶细胞,以纠正基因缺陷或者发挥治疗作用。至今为止,基因治疗逆转鼻咽癌化疗耐药的确切作用尚不十分明确。我们利用免疫组化方法检测了 TS、GST- π 和 Topo II 蛋白在鼻咽癌 p53 基因治疗前后表达的变化,初步探讨了 p53 基因治疗对化疗耐药的影响及对鼻咽癌预后的影响。

3.2 胸苷酸合成酶为催化尿嘧啶脱氧核苷 (dUMP)、甲基化胸腺嘧啶脱氧核苷 (dTMP) 的反应与 DNA 合成所必需的酶。谷胱甘肽 S-转移酶是一组与机体解毒作用有关的酶类,根据其在细胞内定位的不同,一般可分为 α 、 μ 、 ω 、 π 、 θ 及 ζ 6 种类型; GST- π 与恶性肿瘤关系密切; GST 主要通过将 GSH 藕联到化疗药物上,增加毒性药物的外流而减少细胞毒性^[4]。拓扑异构酶 II 是一种真核生物生存所必需的泛酶,在几乎所有 DNA 代谢过程中发挥重要作用。研究表明 Topo II 既可作为细胞增殖的标志,亦为许多抗癌药物的作用靶点,是一种多药耐药指标^[5]。在常规接受放化疗的患者,TS、GST- π 和 Topo II 蛋白化疗后明显增加,提示与化疗耐药有关。由于化疗前表达不到 50%,常规放化疗后明显增加,这可能与 TS、GST- π 和 Topo II 介导继发耐药有关。耐药是肿瘤复发转移的重要原因之一^[6]。我

们的资料显示, GST- π 增加组其复发转移率较无变化组高,而 TS、Topo II 增加组复发转移率差异不显著,这可能与 GST- π 表达增加,介导较为严重的化疗耐药有关。Schumaker 等^[7]对头颈癌的研究也得出类似结论, GST- π 阳性者预后差;认为化疗前应对头颈癌患者进行 GST- π 检测,从而为患者提供更个体化的治疗。

3.3 接受基因治疗的患者在治疗后 TS、GST- π 和 Topo II 蛋白表达率稍高于治疗前,而同步放化疗组治疗后 TS、GST- π 和 Topo II 蛋白明显增加,提示基因治疗可逆转化疗耐药,但目前机制尚未明确。治疗前 IV 期患者 TS 阳性表达率较 III 期高 (48.57% vs 26.67%),这提示肿瘤大小可能与化疗耐药有关,肿瘤体积大其发生耐药的概率升高;进一步统计发现,接受基因治疗的患者在治疗后其 TS 蛋白表达率增加了 23.08%,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。至于肿瘤体积大小与基因治疗敏感性的关系如何,需进一步加以研究。

3.4 基因组卫士 p53 在 DNA 损伤时能够迅速诱导细胞周期停滞和凋亡,从而防止肿瘤形成^[8]。肿瘤患者在 DNA 出现不同程度损伤时,野生型 p53 转变成突变型 p53,细胞将失去正常静止和凋亡的能力^[9]。细胞不受调控的恶性增生最终导致了肿瘤的复发。前述 GST- π 阳性与肿瘤复发转移相关,本实验发现,接受放化疗联合基因治疗的患者,其治疗后 GST- π 阳性率未见明显增加,提示肿瘤复发受抑可能与基因的治疗作用有关。这可能与基因抑制了野生型 p53 向突变型 p53 转变,从而抑制了细胞的恶性增殖,减少肿瘤复发转移机会有关^[10,11]。

3.5 本研究结果表明,基因治疗晚期鼻咽癌可能通过抑制 TS、GST- π 及 Topo II 蛋白表达进而逆转鼻咽癌化疗耐药。目前基因逆转化疗耐药的确切机制尚

未明了,系当前基因治疗所面临的新问题。

参考文献

- 1 Reles A, Wen WH, Schmider A, et al. Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7 (10): 2984 – 2997.
 - 2 Yamashita H, Toyama T, Nishio M, et al. p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2006, 8 (4): R48.
 - 3 Erkal HS, Serin M, Cakmak A. Nasopharyngeal carcinomas: analysis of patient, tumor and treatment characteristics determining outcome[J]. Radiother Oncol, 2001, 61 (3): 247 – 256.
 - 4 Wang W, Liu G, Zheng J. Human renal UOK130 tumor cells: a drug resistant cell line with highly selective over-expression of glutathione S-transferase-pi isozyme[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 568 (1 – 3): 61 – 67.
 - 5 Tanoguchi K, Sasano H, Yabuki N, et al. Immunohistochemical and two-parameter flow cytometric studies of DNA topoisomerase II alpha in human epithelial ovarian carcinoma and germ cell tumor[J]. Mod Pathol, 1998, 11 (2): 186 – 193.
 - 6 Han BW, Feng DD, Li ZG, et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20 (24): 4903 – 4915.
 - 7 Schumaker L, Nikitakis N, Goloubeva O, et al. Elevated expression of glutathione S-transferase pi and p53 confers poor prognosis in head and neck cancer patients treated with chemoradiotherapy but not radiotherapy alone[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (18): 5877 – 5883.
 - 8 Roth JA, Swisher SG, Meyn RE. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer[J]. Oncology (Williston Park), 1999, 13 (10 Suppl 5): 148 – 154.
 - 9 Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1602 (1): 47 – 59.
 - 10 Jardim BV, Moschetta MG, Gelaleti GB, et al. Glutathione transferase pi (GSTpi) expression in breast cancer: An immunohistochemical and molecular study[J]. Acta Histochem, 2011, 114 (5): 510 – 517.
 - 11 Huang ZH, Hua D, Du X. Polymorphisms in p53, GSTP1 and XRCC1 predict relapse and survival of gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64 (5): 1001 – 1007.
- [收稿日期 2012 – 05 – 08][本文编辑 黄晓红 韦 颖]

博硕论坛·论著

金纳多治疗急性期缺血性脑卒中的临床疗效观察

陆 芳, 郑金瓿

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院神经内科

作者简介: 陆 芳(1988 –), 女, 在读研究生, 研究方向: 癫痫影像学。E-mail: 0506107fangfang@163.com

通讯作者: 郑金瓿(1967 –), 男, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 癫痫的基础与临床研究。E-mail: jio2006@163.com

[摘要] 目的 验证金纳多治疗急性期缺血性脑卒中的疗效及安全性。方法 对 50 例(男 37 例, 女 13 例)急性脑梗死患者在常规治疗基础上加用为期 45 d 的金纳多序贯疗法, 进行自身对照观察。结果 金纳多治疗急性缺血性脑卒中在治疗第 14 天、第 45 天后神经功能缺损程度评分(NFDS)较治疗前明显降低($P < 0.05$), 且治疗第 45 天的 NFDS 较治疗第 14 天明显降低($P < 0.05$)。金纳多治疗急性缺血性脑卒中第 14 天时有效率为 82%, 治疗第 45 天时有效率为 96%。结论 金纳多治疗急性缺血性脑卒中中疗效显著, 安全性好, 已广泛用于急性期缺血性脑卒中的防治。

[关键词] 金纳多; 急性期缺血性脑卒中

[中图分类号] R 741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 – 3806(2012)12 – 1130 – 03

doi:10.3969/j.issn.1674 – 3806.2012.12.10