

# 儿童急性白血病初治患者 LRP 和 MRP 的表达及其临床意义

张剑白, 孙媛, 董娟, 刘丽晓, 宁芳

## Expression of Lung Resistance Protein and Multidrug Resistance-associated Protein in Naive Childhood Acute Leukemia and Their Clinical Significance

ZHANG Jian-Bai, SUN Yuan, DONG Juan, LIU Li-Xiao, NING Fang

哈尔滨医科大学  
附属第一临床医学院  
儿科,  
黑龙江 哈尔滨 150001

Department of Pediatrics,  
The First Affiliated Hospital,  
Harbin Medical University,  
Harbin, Heilongjiang, 150001,  
P. R. China

通讯作者:张剑白

Correspondence to:ZHANG Jian-Bai  
Tel:86-451-86969696  
E-mail:zjbhmu@yahoo.com.cn

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(No. 9725);哈尔滨市科技攻关课题(No. 0114211135-4)

Grants: Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. 9725); Sci-Tech Project Foundation of Harbin City (No. 0114211135-4)

收稿日期:2004-09-02  
修回日期:2004-12-21

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** Previous studies revealed that lung resistance protein (LRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) relate to drug resistance of childhood leukemia, which is not caused by only one mechanism. This study was to evaluate the expression of LRP and MRP genes in childhood leukemia and their correlation. **METHODS:** The expression of LRP and MRP in 38 children with acute leukemia and 6 healthy children were measured with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); their clinical significance was analyzed according to complete remission (CR) rate of the patients after chemotherapy. **RESULTS:** CR rate of the 38 patients was 68.4%. LRP was expressed in 11 of the 38 patients, and didn't express in healthy controls; CR rate was significantly lower in LRP-positive patients than in LRP-negative patients (27.3% vs. 85.2%,  $P < 0.05$ ). MRP was overexpressed in 21 of the 38 patients; CR rate was significantly lower in MRP-positive patients than in MRP-negative patients (47.6% vs. 94.1%,  $P < 0.05$ ). The positive rate of LRP was significantly lower in acute lymphoblastic leukemia (ALL) than in acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) [18.5% (5/27) vs. 45.5% (6/11),  $P < 0.05$ ]; however, the positive rate of MRP was 59.3% (16/27) in ALL, and 45.5% (5/11) in ANLL ( $P > 0.05$ ). The positive rate of MRP was 28.6% in LRP-positive patients, and 29.4% in LRP-negative patients; there was no correlation between LRP and MRP. **CONCLUSION:** Childhood acute leukemia patients with overexpression of LRP and MRP suffer severe disease and achieve low remission rate; lower remission rate of childhood ANLL patients may relate to LRP expression. **KEYWORDS:** Leukemia/drug therapy; Lung resistance protein; Multidrug resistance-associated protein; Predictor; Effectiveness; Children

**【摘要】** 背景与目的:有研究发现肺耐药相关蛋白(lung resistance protein, LRP)和多药耐药相关蛋白(multidrug resistance-associated porotein, MRP)的表达与白血病患儿耐药有关,而且患儿耐药不是由于一种耐药机制引起的。本研究旨在观察 LRP 和 MRP 在不同类型小儿白血病初治时的表达情况及其与临床疗效的关系。方法:应用逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)检测 38 例不同类型儿童急性白血病[27 例急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic, ALL),11 例急性非淋巴细胞白血病(acute nonlymphocytic leukemia, ANLL)]及 6 名正常儿童 LRP、MRP 基因的表达,结合患儿化疗后的完全缓解(CR)率分析两种基因表达的意义。结果:38 例患儿化疗后 CR 26 例(68.4%)。38 例患儿中 LRP 基因表达阳性 11 例(28.9%),表达阴性 27 例(71.1%),6 例正常对照儿童 LRP 基因阴性。LRP 基因阳性患儿的 CR 率低于阴性者(分别为 27.3%和 85.2%, $P < 0.05$ )。MRP 阳性者 21 例,6 例正常对照儿童 MRP 基因阴性。MRP 基因阳性者的 CR 率低于阴性者(分别为 47.6%和 94.1%, $P < 0.05$ )。27 例 ALL 患儿中 LRP 阳性 5 例,11 例 ANLL 患儿中 LRP 阳性 6

例 (分别为 18.5%和 54.5%, $P < 0.05$ )。27 例 ALL 患儿中 MRP 阳性 16 例;11 例 ANLL 患儿 MRP 阳性 5 例 (分别为 59.3%和 45.5%, $P > 0.05$ ),ALL 和 ANLL 中 MRP 的表达无显著性差异。LRP 基因阳性患者的 MRP 阳性率与 LRP 阴性者 MRP 阳性率无显著性差异 (分别为 28.6%和 29.4%, $P > 0.05$ ),说明 LRP 基因与 MRP 基因之间无相关性。结论:LRP 基因及 MRP 基因阳性儿童急性白血病患者病情重、化疗缓解率低,儿童 ANLL 相对于 ALL 化疗缓解率低可能与 LRP 的表达有关。

**关键词:**白血病/药物治疗;LRP 基因;MRP 基因;预测指标;疗效;儿童

**中图分类号:**R733.71 **文献标识码:**A

**文章编号:**1000-467X(2005)08-1015-03

白血病多药耐药(multidrug resistance, MDR)是指白血病细胞对结构和功能不同的多种化疗药物产生耐药,是导致白血病化疗失败、影响预后的重要因素之一<sup>[1]</sup>。目前,国内外关于成人 MDR 的研究比较多,而研究儿童 MDR 机制的相对较少,特别是同时对儿童急性白血病患者 LRP、MRP 的研究更少。本实验采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 LRP 基因及 MRP 基因在儿童急性白血病患者中的表达,结合临床完全缓解情况探讨这两种基因在儿童急性白血病耐药中的作用及机制,研究其与耐药、复发、预后等的关系,以期对临床药物选择及评价预后提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

38 例患儿为 2001 年 9 月至 2003 年 9 月于哈尔滨医科大学附属第一医院儿科、血液科住院患儿。男性 22 例、女性 16 例,年龄 1~14 岁,中位年龄 5 岁,均符合 FAB 诊断标准。38 例中急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)27 例,急性非淋巴细胞白血病(acute nonlymphoblastic leukemia, ANLL)11 例,均为初治病例。另取 6 名健康志愿儿童外周血作为正常对照组,其中男性 3 例,女性 3 例,年龄 1~14 岁,中位年龄 6 岁。

### 1.2 检测方法

**1.2.1 单核细胞的制备** 取 38 例白血病患者治疗前静脉血和正常对照组儿童静脉血 2~5 ml,肝素(100 u/ml)沉淀,生理盐水稀释 3~4 倍,将其缓慢加至 4 ml 的 Ficoll 淋巴细胞分离液中(相对密度 1.077),以 2 000 r/min 离心 15 min。取界面层单核细胞,生理盐水洗 3 次。-80℃冰箱保存备用或直接提取 RNA。

**1.2.2 细胞总 RNA 的提取** 采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,-80℃保存或直接进行 RT-PCR 反应。

**1.2.3 一步法 RT-PCR 反应** 反应体系 50  $\mu$ l,内含 AMV/Tfi 5 $\times$ 反应缓冲液 10  $\mu$ l,dNTP 混合物 1  $\mu$ l,25 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l,AMV 反转录酶 1  $\mu$ l,Tfi DNA 聚合酶 1  $\mu$ l,RNA 样品 2  $\mu$ l,上游引物及下游引物各 3.3  $\mu$ l,无核酸水加至 50  $\mu$ l。

将有反应体系的 PCR 管加入 PCR 仪。48℃ 45 min 1 个循环;94℃ 2 min 1 个循环;94℃ 30 s,60℃ 1 min,68℃ 2 min 40 个循环,68℃ 7 min 1 个循环。引物由 TaKaRa 公司合成。

引物及反应条件参照文献[2]设计。LRP 上游引物为 5'-AGTCAGAAGCCGAGAAAG-3',下游引物为 5'-CCCAGCCACAGCAAGGT-3',扩增片段长度为 340 bp。MRP 上游引物 5'-GGACCTGGACTTG GTTCTCA-3',下游引物为 5'-GCCTACTTCTTCAGACCTGC-3',扩增片段长度为 292 bp。以  $\beta$ -actin 作为内对照,其上游引物为 5'-ACCCCTACTGAAAAA GATGA-3',下游引物为 5'-ATCTTCAAACCTCCATG ATG -3',扩增片段长度为 114 bp。

**1.2.4 凝胶制备及电泳观察** 取 10  $\mu$ l 扩增产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳(70 V,40 min),溴酚蓝染色,紫外透射仪下观察结果。

### 1.3 临床治疗方案

ALL 采用 VDP(长春新碱、柔红霉素、泼尼松)或 VCDP(长春新碱、环磷酰胺、柔红霉素、泼尼松)方案;ANLL 采用 DA(柔红霉素、阿糖胞苷)或 HA(三尖杉酯碱、阿糖胞苷)方案进行诱导缓解。

### 1.4 临床缓解标准

依据实用儿科学第 6 版“白血病的缓解标准”,ALL 6 周末达到完全缓解(complete response, CR)为难治组,ANLL 经两个疗程化疗不缓解(no response,NR)为难治型。

### 1.5 统计学处理

由于研究对象只有 38 例,采用 Fisher 确切概率法进行样本率的比较。

## 2 结果

### 2.1 38 例白血病患者化疗 CR 率

38 例白血病患者化疗后获 CR 的 26 例(68.4%);化疗后未获得缓解的 12 例(31.6%)。

### 2.2 38 例白血病患者 LRP、MRP 表达情况

38 例白血病患者中 11 例 LRP 阳性,27 例阴

性。27 例 ALL 患儿中 5 例阳性,22 例阴性;11 例 ANLL 患儿中 6 例阳性,5 例阴性。6 名正常儿童外周血中未检测到 LRP。

38 例白血病患者中,21 例 MRP 阳性,17 例阴性。27 例 ALL 患儿中 16 例阳性,11 例阴性;11 例 ANLL 患儿中 5 例阳性,6 例阴性。6 名正常儿童外周血中未检测到 MRP。

### 2.3 LRP、MRP 基因表达与完全缓解率的关系

11 例 LRP 阳性患儿中 CR 3 例,CR 率为 27.3%;27 例阴性患儿中 CR 23 例,CR 率为 85.2%。两组有显著性差异( $P < 0.05$ )。

21 例 MRP 阳性患儿中 CR 10 例,CR 率为 47.6%;17 例阴性患儿中 CR 16 例,CR 率为 94.1%。两组有显著性差异( $P < 0.05$ )。

LRP 阳性患儿 MRP 阳性率没有明显高于 LRP 阴性患儿(分别为 28.6%和 29.4%, $P > 0.05$ ),分析表明 LRP 与 MRP 无相关性。

### 2.4 LRP、MRP 基因在不同类型白血病中的表达

27 例 ALL 患儿样本中 LRP 阳性 5 例,阳性率为 18.5%;11 例 ANLL 中 LRP 阳性 6 例,阳性率为 54.5%,两者差异有显著性( $P < 0.05$ )。

27 例 ALL 患儿样本中 MRP 阳性 16 例,阳性率为 59.3%;11 例 ANLL 中 MRP 阳性 5 例,阳性率为 45.5%,两者差异无显著性( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

肺耐药蛋白(LRP 基因)是 Schepers 等 1993 年从小细胞肺癌细胞系筛选出的一株多药耐药细胞中发现的一个新的多药耐药相关蛋白,该株表现为能量依赖性的药物蓄积能力下降。LRP 定位于 16 号染色体短臂上 16P<sup>13.1</sup>~16P<sup>11.2</sup>, 分子量为 110 ku。它通过两种机制引起 MDR,第一可以使从胞核为靶点的药物不能通过核孔进入胞核,即使进入也在发生药效前被泵出核外;第二也可以使胞质中药物进入囊泡,并通过胞吐作用排除细胞外<sup>[3]</sup>。本研究发现 38 例儿童急性白血病患者 LRP 阳性者为 11 例。其中 27 例 ALL 患儿中 LRP 阳性 5 例,阳性率为 18.52%;11 例 ANLL 患儿中 LRP 阳性 6 例,阳性率为 54.5%。说明 LRP 在不同类型白血病患者表达情况不同,ANLL 患儿 LRP 表达明显高于 ALL 患儿( $P < 0.05$ )。据文献报道,LRP 与柔红霉素耐药密切相关<sup>[4,5]</sup>,这也与临床上儿童白血病 ANLL 患儿比 ALL 患儿化疗效果差,缓解率低相一致。另外,本实验 LRP 阳性 11 例患儿中,CR 3 例,CR 率

为 27.3%;LRP 阴性 27 例患儿中,CR 23 例,CR 率为 85.2%。二者有显著性差异( $P < 0.05$ )。说明 LRP 在儿童白血病中可能是导致临床耐药的主要因素之一,其表达可以作为临床儿童急性白血病化疗效果及预测预后的重要因素。

多药耐药相关蛋白(MRP 基因)位于 16 号染色体 P<sup>13.1</sup> 带上,编码 190 ku 的膜表面糖蛋白,MRP 属 ATP 依赖性跨膜转运蛋白类,其耐药机制与细胞膜的转运有关。相关报道认为,MRP 的过度表达可产生 MDR<sup>[4,6]</sup>。我们的实验结果显示 ALL 患儿 MRP 阳性率为 59.3%;ANLL 患儿 MRP 阳性率为 45.5%。说明 MRP 在不同类型白血病患者表达无显著差异。不同类型白血病患者预后的差异可能与 MRP 基因无关,国外也可见相类似的报道<sup>[4]</sup>。另外,本实验 MRP 阳性患儿 CR 率为 47.6%;阴性患儿 CR 率为 94.1%。二者有显著性差异( $P < 0.05$ )。说明 MRP 在儿童白血病中也是影响临床耐药的因素,其表达也可以作为临床儿童急性白血病化疗效果及预后的因素之一。

另外,本实验也显示 LRP 及 MRP 基因二者无相关性,说明二者可能是独立介导的耐药机制。二者均阳性的患儿 6 例,缓解 3 例,缓解率 50%,说明二者共同存在的儿童白血病患者其预后与单一因素作用并无明显差别,因例数较少,无法作统计学分析。

### [参 考 文 献]

- [1] Bhargava M, Therwath A. Indo-French symposium on apoptosis and multidrug resistance [J]. *Leuk Res*, 1997,21(9):899-902.
- [2] Lgrand O, Perrot JY, Simonin G, et al. Adult biphenotypic acute leukemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression [J]. *Br J Haematol*, 1998,100:147-155.
- [3] Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, et al. The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein [J]. *Nat Med*, 1995,1:578-582.
- [4] Den Boer ML, Pieters R, Kazemier KM, et al. Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia [J]. *Blood*, 1998,91(6):2092-2098.
- [5] Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, et al. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sao Paulo Med J*, 2004, 122(4):166-171.
- [6] Michieli M, Damiani D, Ermacora A, et al. P-glycoprotein (PGP), lung resistance-related protein (LRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in acute promyelocytic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2000,108(4):703-709.

[编辑及校对:杨允贵]