

# ABCG2 mRNA 的表达与乳腺癌蒽环类药物化疗效果的关系研究

徐象威 朱佩祯 张鹏海 陈银巧 奚一源

**【摘要】目的** 分析乳腺癌患者蒽环类药物化疗前后三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ABCG2)mRNA 表达的变化,探讨其与化疗效果的关系。**方法** 选取乳腺癌根治术后接受蒽环类药物化疗的患者 60 例,采用 qRT-PCR 法检测化疗前后 ABCG2 mRNA 表达水平,观察患者化疗效果及预后[分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、无变化(SD)、疾病进展(PD),CR 或 PR 视为化疗高反应,SD 或 PD 视为化疗低反应]。**结果** 60 例患者经过 4 个周期的化疗后,CR 9 例,PR 28 例,SD 18 例,PD 5 例,化疗高反应 37 例、低反应 23 例,治疗有效(CR+PR)率为 61.7%。化疗后,化疗后高反应患者 ABCG2 mRNA 表达水平低于化疗低反应患者( $P<0.05$ )。化疗高反应患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平低于化疗前( $P<0.05$ ),而化疗低反应患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平高于化疗前( $P<0.05$ )。化疗后 ABCG2 mRNA 低表达(表达水平<中位数 1.24)患者疾病无进展生存期长于高表达(表达水平 $\geq$ 中位数 1.24)患者(54 个月 vs 47 个月, $P<0.05$ )。**结论** 乳腺癌患者接受蒽环类药物化疗后,ABCG2 mRNA 低表达患者其肿瘤细胞对蒽环类药物的排出较高表达的患者少,化疗效果较好,且疾病无进展生存时间较长,预后较好。

**【关键词】** 乳腺癌 蒽环类药物 三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 疗效

Association of ABCG2 gene expression with response in response to anthracycline chemotherapy XU Xiangwei, ZHU Peizhen, ZHANG Penghai, et al. Department of Pharmacy, Yongkang First People's Hospital, Yongkang 321300, China

**【Abstract】Objective** To investigate the association of ABCG2 gene expression with response to anthracycline chemotherapy in patients with breast cancer. **Methods** Sixty patients with breast cancer undergoing postoperative adjuvant chemotherapy of anthracyclines were enrolled. Quantitative real-time PCR(qRT-PCR) was used to determine the expression of ABCG2 mRNA before and after chemotherapy. The efficacy of chemotherapy and the prognosis of patients were observed, and the association of ABCG2 expression with chemotherapy response was analyzed. **Results** After 4 cycles of chemotherapy, there were 9 cases of CR, 28 cases of PR, 18 cases of SD and 5 cases of PD in 60 patients with an effective rate (CR+PR) of 61.7%. Compared before chemotherapy, the expression level of ABCG2 mRNA was reduced after chemotherapy in patients with high response to chemotherapy, while it was increased in patients with low chemotherapy response(both  $P<0.05$ ). The expression levels of ABCG2 mRNA after chemotherapy in patients with high response was lower than that with low response ( $P<0.05$ ). Patients with low expression of ABCG2 mRNA (expression level<median 1.24) had a longer progression-free survival than patients with high expression (expression level  $\geq$  median 1.24) (54 months vs 47 months,  $P<0.05$ ). **Conclusion** Breast cancer patients with low expression of ABCG2 mRNA may have better therapeutic response to anthracyclines, and a better progression-free survival.

**【Key words】** Breast cancer Anthracyclines Adenosine triphosphate-binding cassette transporters G2 Curative effect

乳腺癌是女性发病率最高且具有高度特异性、侵袭性的恶性肿瘤。2012 年统计数据显示,全球有近 170 万

女性被诊断为乳腺癌<sup>[1]</sup>。我国尚处于乳腺癌低发地区,是全球乳腺癌发病率最高国家(比利时)的 1/6,但自 1998 至 2007 年我国乳腺癌发病率增长 1.2~2.8 倍,且在过去 30 年中我国乳腺癌死亡率也增长了近 1 倍<sup>[2]</sup>。化疗对于延长乳腺癌尤其是晚期乳腺癌患者生存时间具有重要意义。蒽环类药物是乳腺癌化疗中最常用的药物,但由于个体的差异性,不同患者对蒽环类药物的敏感性与耐

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.10.2018-2930

基金项目:永康市科技计划项目(201611)

作者单位:321300 永康市第一人民医院药剂科(徐象威、奚一源),肿瘤内科(朱佩祯、张鹏海、陈银巧)

通信作者:朱佩祯,E-mail:523130761@qq.com

药性不同,临床疗效亦不同<sup>[3]</sup>。近年来肿瘤个体化治疗成为医学界关注的热点,如能预测患者对蒽环类药物化疗的敏感性,选择合适的化疗方案,或可提高肿瘤治疗的临床效果。研究发现,三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2 (ABCG2)与肿瘤化疗耐药、放疗抵抗、激素治疗不敏感等存在明显关系<sup>[4-5]</sup>。ABCG2 是多数化疗药物(拓扑异构酶抑制剂、蒽环类、喜树碱类似物、酪氨酸激酶抑制剂及抗代谢药物)的底物,可加速药物从细胞内泵出,降低肿瘤细胞中有效药物浓度<sup>[6]</sup>。基于此,本研究通过分析乳腺癌患者蒽环类药物化疗前后 ABCG2 mRNA 的表达情况,探讨其与化疗效果的关系,现报道如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

选取 2012 年 6 月至 2013 年 12 月本院肿瘤内科收治的乳腺癌根治术后接受蒽环类药物化疗的患者 60 例。纳入标准:(1)经手术与病理学检查确诊为乳腺癌浸润性导管癌者,经 CT、MRI 证实具有 1 处或 1 处以上可测量的肿瘤病灶,根据国际抗癌联盟 TNM 分期进行分期;(2)心电图和(或)左心室射血分数(LVEF)测定评分达标;(3)患者肝肾功能检查正常,均能达到化疗的基本要求,患者的身体状况评分(ECOG 评分)0~2 分;(4)预计生存期>3 个月,功能状态评分(KPS 评分)≥60 分;(5)初始治疗方案为以蒽环类药物为主的联合化疗,且至少化疗 4 个周期。排除标准:(1)合并 2 种及以上原发恶性肿瘤;(2)妊娠期女性;(3)存在严重内分泌代谢及免疫疾病者。60 例患者均为女性;其中年龄>45 岁 36 例,≤45 岁 24 例;处于绝经状态 33 例,未绝经状态 27 例;临床分期 I~II 期 25 例,III 期 21 例,IV 期 14 例;一般健康状况评分(PS 评分)0~1 分 25 例,2 分 35 例。本研究经永康市第一人民医院医学伦理会审查且批准,患者均签署书面知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 化疗方法与疗效评判

患者入院后均给予标准的含蒽环类药物联合化疗方案。包括:多西他赛/多柔比星/环磷酰胺(TAC)、多柔比星/环磷酰胺(AC)、多西他赛/环磷酰胺(TC)等。患者接受 4 个周期化疗后,通过肿瘤标志物、B 超、胸部 CT 或 MRI 等检查评判化疗效果。疗效评判标准参照实体肿瘤疗效评判标准<sup>[7]</sup>,分为完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、无变化(SD)、疾病进展(PD)。有效率= $[(CR+PR)/(CR+PR+SD+PD)] \times 100\%$ ,稳定率= $[(CR+PR+SD)/(CR+PR+SD+PD)] \times 100\%$ 。根据肿瘤对含蒽环类药物联合化疗的反应,将患者分为化疗高反应患者与化疗低反应患者。患者表现为经蒽环类药物化疗

后呈 CR 或 PR 视为高反应,而化疗后 SD 或 PD 视为低反应。

#### 1.2.2 ABCG2 mRNA 表达水平检测

(1)样本采集:采集患者初次化疗前、化疗 4 个周期后的肘静脉血 5ml,标注患者信息与采血时间。(2)采用 RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒(天根生化有限公司,批号:Q5704)提取总 RNA,严格按照试剂盒说明书进行操作。(3)将提取出的总 RNA 通过逆转录试剂盒(Thermo Fermentas 公司,批号:00314956)合成 cDNA 产物,置于-20℃保存待测。(4)取上述所获得的 cDNA,采用实时定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测化疗前后 ABCG2 mRNA 表达水平。提取出的 cDNA 通过引物(上游:5'-GCG-CAAGCTTATGTCTTCCAGTAATGTCGAA-3';下游:5'-GCGCTCTAGATTAAGGGGAAATTTAAGAATA-3')扩增目的基因。此后按照 KAPA SYBR<sup>®</sup>FAST Real-time PCR Kit(KAPA 公司,批号:KK4601)的反应体系加入试剂在 ABI 7300 qPCR 仪进行实时荧光定量完成 ABCG2 mRNA 表达水平检测。以  $\beta$ -actin 为内参,采用相对定量法( $\Delta\Delta Ct$ )对实时荧光定量 PCR 产物进行比较。 $\Delta Ct=Ct$  均值(目的基因)- $Ct$  均值(管家基因); $\Delta\Delta Ct$ =实验组  $\Delta Ct$ -对照组  $\Delta Ct$ ;以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 mRNA 表达水平的差异。

#### 1.2.3 预后情况观察

患者均进行为期 5 年的随访,主要通过电话随访、门诊或住院病历系统查询等方式,统计预后情况。主要观察终点为疾病无进展生存,疾病无进展生存期指自首次化疗后至随访终止或疾病复发或转移的时间,主要通过医院信息系统或患者直系亲属电话确认,末次随访时间截止 2018 年 12 月。患者在化疗疗程结束后每 2 个月随访 1 次以评估生存期。

#### 1.3 观察指标

(1)观察患者化疗效果;(2)比较化疗高反应患者与化疗低反应患者临床特征,包括年龄、月经状况、临床分期、PS 评分等;(3)比较化疗高反应患者与化疗低反应患者化疗前后 ABCG2 mRNA 表达水平;(4)分析乳腺癌患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平与疾病无进展生存期的关系。以患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平中位数为界,分为 ABCG2 mRNA 高表达(表达水平≥中位数)患者与低表达(表达水平<中位数)患者,比较 ABCG2 mRNA 高表达患者与低表达患者疾病无进展期。

#### 1.4 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用两独立样本  $t$  检验,组内化疗前后比较采用配对  $t$  检验;计数资料以频数和构成比表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;采用 Kaplan-Meier 法绘制疾病无进展生存曲线,疾病无进展生存期的比较采用

Wilcoxon 秩和检验;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 患者化疗效果 60 例患者经过 4 个周期的化疗后, CR 9 例, PR 28 例, SD 18 例, PD 5 例; 治疗有效率

为 61.7%, 稳定率为 91.7%。化疗高反应患者 37 例、低反应患者 23 例。

2.2 化疗高反应患者与化疗低反应患者临床特征比较 见表 1。

表 1 化疗高反应患者与化疗低反应患者临床特征比较[例(%)]

组别	n	年龄		月经状况		临床分期			PS 评分	
		>45 岁	≤45 岁	绝经	未绝经	I~II 期	III 期	IV 期	0~1 分	2 分
化疗高反应患者	37	21(56.8)	16(43.2)	20(54.1)	17(45.9)	17(46.0)	13(35.1)	7(18.9)	16(43.2)	21(56.8)
化疗低反应患者	23	15(65.2)	8(34.8)	13(56.5)	10(43.5)	8(34.8)	8(34.8)	7(30.4)	9(39.1)	14(60.9)
P 值		>0.05		>0.05		>0.05			>0.05	

由表 1 可见, 化疗高反应患者与化疗低反应患者年龄、月经状况、临床分期、PS 评分等比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。

2.3 化疗高反应患者与化疗低反应患者化疗前后 ABCG2 mRNA 表达水平比较 见表 2。

表 2 化疗高反应患者与化疗低反应患者化疗前后 ABCG2 mRNA 表达水平比较

组别	n	化疗前	化疗后	P 值
化疗高反应患者	37	1.30 ± 0.33	1.15 ± 0.29	<0.05
化疗低反应患者	23	1.18 ± 0.29	1.42 ± 0.31	<0.05
P 值		>0.05	<0.05	

由表 2 可见, 组间比较, 化疗前, 化疗高反应患者与化疗低反应患者 ABCG2 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 化疗后, 化疗后高反应患者 ABCG2 mRNA 表达水平低于化疗低反应患者( $P < 0.05$ )。组内比较, 化疗高反应患者化疗后 ABCG2 mRNA 低于化疗前 ( $P < 0.05$ ), 而化疗低反应患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平高于化疗前( $P < 0.05$ )。

2.4 乳腺癌患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平与疾病无进展生存期的关系分析 本研究 60 例患者化疗后 ABCG2 mRNA 表达水平中位数为 1.24, ABCG2 mRNA 高表达(表达水平  $\geq 1.24$ )患者与低表达(表达水平  $< 1.24$ )患者疾病无进展生存曲线见图 1。

由图 1 可见, ABCG2 mRNA 高表达患者与低表达患者中位疾病无进展生存期分别为 47 个月与 54 个月, ABCG2 mRNA 低表达患者疾病无进展生存期长于高表达患者, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

蒽环类药物作为乳腺癌化疗方案中最常用的药物之一, 无论在乳腺癌术前新辅助治疗、复发转移解救治

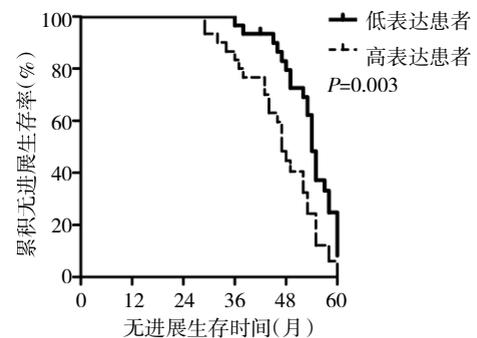


图 1 ABCG2 mRNA 高表达患者与低表达患者疾病无进展生存曲线比较

疗还是在晚期乳腺癌辅助治疗中都有非常重要的作用。但肿瘤细胞对产生化疗药物耐受性是影响化疗效果及患者预后的首要原因, 约 90% 的转移性乳腺癌患者化疗失败归咎于多药耐药(MDR)。研究认为, ABC 转运体在乳腺癌细胞中的过度表达是造成 MDR 最常见的一种机制<sup>[8]</sup>。ABCG2 是 ABC 超家族中 ABC-G 亚家族的第 2 个成员, 因其首先在乳腺癌耐药株(MCF-7/AdrVp)中被发现, 亦称为乳腺癌耐药蛋白(BCRP)<sup>[9]</sup>。ABCG2/BCRP 是一种 ATP 依赖性转运体, 以同源或异源二聚体来发挥 ATP 依赖性药物外排转运体的作用, 利用 ATP 水解产生的能量降低细胞内药物或内源性及外源性细胞毒药物浓度, 产生特殊的药物耐药性<sup>[10]</sup>。

当前有研究报道称, 在乳腺浸润性导管癌、食管癌、纤维肉瘤和多发性骨髓瘤等的耐药细胞株中 ABCG2 均存在过度表达, ABCG2 蛋白在乳腺癌组织中阳性表达率、表达水平均明显高于癌旁组织<sup>[11-12]</sup>。Qu 等<sup>[13]</sup>研究发现, 与化疗前相比, 化疗后的残存乳腺癌细胞膜上 ABCG2 呈高表达, 这说明化疗后乳腺耐药相关蛋白的表达上调。王飞通等<sup>[14]</sup>发现, SW1990 细胞经过吉西他滨处理后, 增殖能力明显受抑制, 呈时间依赖性减弱, 而 SW1990 细胞中 ABCG2 蛋白与 mRNA 的表达成时间依赖性的

升高,表明吉西他滨诱导 ABCG2 基因表达上调是造成肿瘤细胞逃避细胞毒药物杀伤的机制之一。本研究结果显示,化疗高反应患者 ABCG2 mRNA 表达水平较化疗前降低,而化疗低反应患者较化疗前升高。这说明乳腺癌化疗效果与患者 ABCG2 mRNA 表达水平呈负相关。这与 Marzac 等<sup>[15]</sup>的研究结果相似,其对急性髓细胞白血病患者规范化疗后的随访发现,患者高表达 ABCG2 与完全缓解率、耐药率和总生存率有显著的相关性。分析可能原因,肿瘤患者化疗后 ABCG2 基因的表达上调,当达到一定程度时发挥外排泵功能,将进入细胞内的化疗药物逆浓度梯度的转运到细胞膜外,从而降低细胞内药物浓度,促使一些肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性,从而影响化疗效果。

ABCG2 的表达与患者预后的关系研究已有报道。Ota 等<sup>[16]</sup>发现经铂类药物化疗的非小细胞肺癌患者的生存期较短,这与 ABCG2 的过表达有关,多因素分析显示 ABCG2 的表达是影响疾病无进展生存期的独立因素。何建明等<sup>[17]</sup>发现,三阴性乳腺癌 ABCG2 阳性表达患者的生存期与累计生存率均明显低于 ABCG2 阴性者,ABCG2 阳性表达率越高,其预后越差。本研究结果显示,ABCG2 mRNA 表达水平与乳腺癌患者疾病无进展生存期有关,ABCG2 mRNA 低表达患者疾病无进展生存期高于高表达患者;且化疗高反应患者疾病无进展生存期亦长于化疗低反应患者。

综上所述,乳腺癌患者接受蒽环类药物化疗后,ABCG2 mRNA 低表达患者其外排蒽环类药物能力弱于高表达的患者,可使肿瘤细胞内药物保持在有效治疗浓度,患者化疗效果较好,且疾病无进展生存时间较长,预后较好。蒽环类药物可诱导乳腺癌患者 ABCG2 mRNA 表达的改变,检测其表达水平对于判断乳腺癌患者化疗效果与预后具有一定的参考价值。

#### 4 参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *International Journal of Cancer*, 2015, 136(5):E359-E386.
- [2] 黄哲宙, 陈万青, 吴春晓, 等. 北京、上海、林州和启东地区女性乳腺癌发病及死亡的时间趋势[J]. *肿瘤*, 2012, 32(8):605-608.
- [3] Demichele A, Yee D, Esserman L. Mechanisms of Resistance to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer[J]. *New England Journal of Medicine*, 2017, 377(23):2287-2289.
- [4] Staud F, Pavek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2005, 37(4):720-725.
- [5] 吴娜, 刘安立, 余国行. 乳腺癌耐药蛋白在肿瘤中的研究进展[J]. *医学综述*, 2018(2):295-300.
- [6] Brackman DJ, Giacomini KM. Reverse Translational Research of ABCG2 (BCRP) in Human Disease and Drug Response[J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 103(2):233-242.
- [7] Khokher S, Qureshi MU, Chaudhry NA. Comparison of WHO and RECIST criteria for evaluation of clinical response to chemotherapy in patients with advanced breast cancer[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2012, 13(7):3213-3218.
- [8] Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade[J]. *Cancer Letters*, 2016, 370(1):153-164.
- [9] Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, et al. Structure of the human multidrug transporter ABCG2[J]. *Nature*, 2017, 546(7659):504-509.
- [10] Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)[J]. *Oncogene*, 2003, 22(47):7340-7358.
- [11] Taheri T, Jamialahmadi K, Khadijeh F. Unexpected Lower Expression of Oncoprotein Gankyrin in Drug Resistant ABCG2 Overexpressing Breast Cancer Cell Lines[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2017, 18(12):3413-3418.
- [12] 刘亮, 左静, 赵丽, 等. ABCG2 食管癌耐药细胞系 Eca109/ABCG2 的建立[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(1):32-35.
- [13] Qu H, Fang L, Duan L, et al. [Expression of ABCG2 and p-glycoprotein in residual breast cancer tissue after chemotherapy and their correlation with epithelial-mesenchymal transition][J]. *Chinese journal of pathology*, 2014, 43(4):236-240.
- [14] 王飞通, 周兵, 刘小云, 等. 吉西他滨诱导胰腺癌细胞 ABCG2 表达其化疗耐药的关系研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(3):324-328.
- [15] Marzac C, Garrido E, Tang R, et al. ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients[J]. *Haematologica*, 2011, 96(9):1293-1301.
- [16] Ota S, Ishii G, Goto K, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy[J]. *Lung Cancer*, 2009, 64(1):98-104.
- [17] 何建明, 肖宏卫, 谭丽珊, 等. 三阴性乳腺癌组织 CaSR 和 ABCG2 表达临床意义研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(12):817-822.

(收稿日期:2018-12-19)

(本文编辑:李媚)