

• 专 论 •

ATP 结合盒转运体介导的肝癌多药耐药研究进展

霍晓奎, 刘克辛*

大连医科大学药学院 临床药理教研室, 辽宁 大连 116044

摘 要: ATP 结合盒转运体 (ABC 转运体) 介导的多药耐药 (MDR) 是肝癌化疗失败的主要原因, 研究确定天然的及获得性 MDR 的产生机制, 有利于提出更有效的治疗措施。针对 ATP 结合盒转运体的肿瘤 MDR 逆转策略, 对于肝癌化疗效果的提高具有重要意义。此外, ATP 结合盒转运体可能参与了肿瘤生物学的一些重要过程, 发挥药物外排泵以外的作用, 为肿瘤的治疗提供了新的研究方向。

关键词: ATP 结合盒转运体; 肝癌; 多药耐药; 肿瘤生物学

中图分类号: R735.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)01-0001-05

Advances in studies on ATP-binding cassette transporter-mediated multidrug resistance in liver cancer

HUO Xiao-kui, LIU Ke-xin

Department of Clinical Pharmacology, College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: The failure of chemotherapy in liver cancer treatment often occurs as a result of multidrug resistance (MDR) mediated by ATP-binding cassette (ABC) transporters and the development of more effective therapies depends on identifying the mechanisms of intrinsic or acquired MDR. Strategies focused on ABC transporters to overcome MDR have a lot of benefits on the chemotherapy of liver cancer. Furthermore, considerable evidence suggests that the ABC transporters play a fundamental role in tumor biology beyond the efflux of cytotoxic drugs, which indicates a new way of study on cancer therapy.

Key words: ATP-binding cassette (ABC) transporters; liver cancer; multidrug resistance (MDR); tumor biology

原发性肝细胞癌多采取以手术切除为主的综合治疗措施, 但是肝癌在我国发病率高, 早期诊断率低, 病情发展快, 大部分患者在确诊时已经失去了手术机会, 只能采取药物治疗, 而化疗效果有限。多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是导致肿瘤化疗失败的主要原因。ATP 结合盒转运体 (ATP-binding cassette transporter, ABC 转运体) 能够改变化疗药的体内处置, 转运化疗药物至胞外, 降低胞内药物浓度, 其在肝癌细胞的过度表达是肝癌 MDR 的主要机制^[1]。研究确定天然的及获得性 MDR 的产生机制, 对于更有效治疗措施的提出具有重要意义。因此 ATP 结合盒转运体介导的肝癌 MDR 研究成为热点。

1 ATP 结合盒转运体

ATP 结合盒转运体是一类通过 ATP 依赖的药物外排从而使肿瘤细胞产生耐药性的转运蛋白超家族, 其中研究较深入的有 P-糖蛋白 (P-glycoprotein/P-gp、MDR1、ABCB1)、MDR 相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein/MRP、ABCC)、肺耐药相关蛋白 (lung resistance-related protein、LRP) 和乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein/BCRP、ABCG2)。

ATP 结合盒转运体因其特有的 ATP 结合盒结构域而得名, 包含两个跨膜域 (TMDs) 和两个 ATP 结合域 (NBDs), 仅有一半结构 (一个 TMD 和一个 NBD) 的 BCRP 以二聚体的形式发挥作用。人类

收稿日期: 2011-11-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072694, 30873118)

作者简介: 霍晓奎 (1989—), 男, 河南人, 硕士研究生, 研究方向为药物转运体与药代动力学。Tel: (0411)86110415 E-mail: huoxiaokui@163.com

*通讯作者 刘克辛, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物转运体与药代动力学。Tel: (0411)86110407 E-mail: liukexin89@163.com

编码 ATP 结合盒转运体的基因组含有 48 个基因, 分为 7 个亚群 (A~G)^[2]。尽管超家族的几个成员具有特异的底物转运功能, 但是 ATP 结合盒转运体介导机体抵御异物和脱毒的核心功能还要依赖其复杂的生理网络共同发挥作用^[3]。

2 MDR

MDR 是指肿瘤细胞对多种结构无关的化疗药物产生交叉耐药的现象。MDR 产生后, 增大化疗药剂量也不能提高疗效, 严重影响了肿瘤化疗的效果。临床上抗药性的产生是多因素的, 涉及药物靶点的改变、药物的失活/脱毒、药物摄取的减少、药物外排增加、细胞凋亡途径的调节异常等^[4]。在众多机制中, ATP 结合盒转运体介导的细胞毒性药物的外排是确立最早、研究最充分的“经典 MDR”途径, 此类转运体能将已进入细胞内的外源性物质从胞内泵出胞外, 被认为是肿瘤细胞 MDR 的主要原因, 其基因表达水平与细胞内药物浓度和耐药程度密切相关。

3 ATP 结合盒转运体和肝癌 MDR

3.1 ATP 结合盒转运体介导的肝癌 MDR

MDR1 是 ATP 结合盒转运体家族中研究最为深入的转运体, 人体正常组织器官也有不同程度的 MDR1 基因表达, 主要分布在消化道、肝和肾等吸收、代谢及排泄器官中, 以及体内一些具有保护作用的屏障结构(血-脑屏障、血-脑脊液屏障、血-睾屏障、胎盘屏障)中。临床观察表明 MDR1 表达水平较高的正常组织器官如肾上腺、直肠、肝脏和肺脏所发生的肿瘤, 对化疗不敏感或疗效差。这一现象提示, MDR1 基因的表达水平与肝肿瘤的原发性耐药有关。

MRP3 是多药耐药相关蛋白家族的成员之一, 在肝、十二指肠、结肠、肾上腺及胰腺中呈高表达。有报道指出肝癌耐药细胞中 MRP3 的表达水平明显高于正常肝细胞和肝癌细胞, 而反义链 MRP3 cDNA 可使表达 MRP3 的细胞株恢复对阿霉素的敏感性^[5], 因此 MRP3 可能参与了肝癌耐药机制的形成。此外, 肝癌介入治疗后 MRP1、MRP3 和 MRP5 基因的表达水平比治疗前明显上调, 但是 MRP2 的表达水平没有明显变化, 因此推测肝癌的获得性 MDR 可能与 MRP1、MRP3、MRP5 基因的表达有关, 而 MRP2 为内源性耐药的主要靶点^[6]。

BCRP 是近年发现的与肿瘤 MDR 有关的新的药物排出泵, 最早在由阿霉素诱导的乳腺癌 MDR

细胞株中发现。临床研究发现, BCRP 在肝细胞性肝癌组织中的表达阳性率要显著高于癌旁肝硬化组织^[7], 表明 BCRP 在肝细胞性肝癌的发生发展过程中可能起着非常重要的作用, 有可能成为临床治疗肝细胞性肝癌的分子靶标。

LRP 能够介导对顺铂、卡铂、烷化剂等药物的外排转运, 可能主要通过核靶点屏蔽机制引起 MDR。临床观察结果表明, 肝癌细胞中 LRP 表达水平显著高于癌旁组织和肝炎后肝硬化组织, 且与肝癌的分化程度相关^[8]。

3.2 ATP 结合盒转运体介导的肝癌 MDR 的逆转

肝癌 MDR 严重制约了化疗效果和预后, ATP 结合盒转运体在此过程中发挥了重要作用。因此产生了针对 ATP 结合盒转运体的肝癌 MDR 逆转策略。

抑制 ATP 结合盒转运体介导的药物外排作用是逆转其引起 MDR 的最简便和直接的途径, 研究者已开发设计了多种化学药物逆转剂。目前化学药物逆转剂共有 3 代, 其中绝大多数是 MDR1 竞争性抑制剂。如钙通道阻滞剂维拉帕米可在 mRNA 水平上抑制 MDR1 合成及其活性, 同时竞争 MDR1 结合位点, 从而逆转耐药^[9]。第一代 MDR 逆转剂有抗疟疾药奎尼丁、免疫抑制剂环孢素 A 等^[10], 由于此类药物本身的药理作用, 往往未达到逆转浓度就已产生严重的不良反应, 因此限制了临床的广泛应用。为降低毒副作用, 提高逆转效果, 研究者开发了第二代 MDR 逆转剂, 例如伐司朴达。然而第二代逆转剂依然不能达到临床应用标准。如近期开展的一项 III 期临床研究中, 卵巢癌或腹膜癌患者给予紫杉酚和卡铂治疗, 联用伐司朴达并不能提高疗效^[11]。尽管改善了前期逆转剂的许多不足, 第三代逆转剂的临床应用依然不尽如人意。近期开展的一项 II 期临床研究中, 合用 zosuquidar 不能延长转移性或原位乳腺癌妇女的生存期^[12]。

近来研究发现, 一些作用于 MDR1 的化合物显示直接的抗肿瘤作用, 如 KNG-I-322 (desmosmumotin B 的一种降解产物), 在 MDR1 过表达的肝癌细胞系 Hep3B/VIN 中能选择性地抗细胞增殖, 并诱导凋亡。但是在 MDR1 缺失的 Hep3B 细胞系中, 却无此作用。其作用机制可能跟 MDR1 介导的 mTOR 通路的抑制和 GRP78 的下调相关^[13]。另外, 吡喹酮(一种非甾体抗炎药)和 SC236(一种 COX-2 选择性抑制剂)增强多柔比星在肝细胞癌细胞系 HepG2 及其耐药细胞系 R-HepG2 中的细胞毒性,

部分逆转多柔比星诱导的 R-HepG2 细胞 MDR1 和 MRP1 的过表达,可能会改善 MDR 肿瘤的化疗效果^[14]。这些研究结果表明 ATP 结合盒转运体可以作为抗肿瘤治疗的直接靶点发挥作用,逆转肝癌 MDR,提高化疗效果。

此外,肝癌 MDR 的逆转方法还有免疫治疗逆转、基因逆转、生长抑素及其类似物逆转以及中草药逆转^[15]。

目前,抑制 ATP 结合盒转运体的功能和过表达成为肝癌 MDR 逆转的主要策略,但是多局限于体外肝癌细胞系和动物模型等基础性研究,鲜有成功应用于临床的报道。几个复杂因素限制了 MDR 逆转剂在临床的成功应用^[16]。最主要的原因是它改变了抗癌药物的药动力学,减少了系统清除,可能会导致不良反应增多。不论 MDR 逆转剂专属性多高,这个影响都存在,例如采用基因阻断的方法也能提高多个组织中的药物含量。在今后开发 ATP 结合盒转运体抑制剂的任何尝试中,都必须考虑这个因素。

4 ATP 结合盒转运体在肝癌研究中的新进展

除了关注 ATP 结合盒转运体介导细胞毒性药物外排的作用外,更多的研究者还注意到了 ATP 结合盒转运体在肝肿瘤细胞中发挥的其他生物学功能,如 ATP 结合盒转运体与肝癌细胞分化程度的相关性、对肿瘤细胞演化的促进以及对脂类信号通路的影响。

4.1 ATP 结合盒转运体和肝癌显型的相关性

ATP 结合盒转运体在正常组织中分布广泛,疾病状态或者组织恶变产生肿瘤时^[17],转运体分布和表达水平的改变具有一定的临床诊断意义。

对于实体瘤,分化类型或级别能特定反映肿瘤的恶性程度,越是低分化的肿瘤,增殖潜能越高,侵略性越强。ATP 结合盒转运体大量表达于低分化的肿瘤亚型或区域。在未经治疗的肝癌细胞中,MRP1 表达水平和肿瘤细胞的分化级别、肿瘤类型以及微血管侵入程度相关^[18]。该研究还发现,MRP1 在肝脏祖细胞上表达,肝细胞分化成熟后则不表达;肝癌特别是预后差的类型中,MRP1 显著上调。

一项针对复发前未接受过术后治疗的 162 名手术切除肝癌患者的研究表明,MRP1-1666GG 基因型代表了不良预后,是肝癌患者低存活率的一个指标^[19]。在肝细胞发生恶性病变转化为肝癌细胞后,6 种主要的 ATP 结合盒转运蛋白分子在几株肝癌细胞系中均有不同程度的表达,MRP2 的表达水平最

高^[1]。在肝癌形成的不同阶段中,大鼠肝细胞 MRP2 表达水平持续变化,肝硬化和结节增生阶段先上调,在早期肝癌到中等分化过程中又减少^[20]。这些结果提示 MRP2 可能在肝细胞癌变过程发挥作用。一项 31 名肝癌患者参与的考察细胞毒性 T 细胞 (CTLs) 识别的肿瘤相关抗体 (TTAs) 的研究发现,MRP3 作为一种 TTAs 能够被 CTLs 识别,而且能够在肝癌患者体内产生特异 CTLs,提示 MRP3 可能成为肝癌免疫治疗的免疫原性靶点^[21]。

这些研究表明,恶性程度高、低分化、未治疗的多种类型肿瘤都高表达 ATP 结合盒转运体基因,对转运体种类和表达水平的检测有利于肿瘤发现和诊断。

4.2 ATP 结合盒转运体和肝癌干细胞

干细胞是一类具有自我复制和多向分化能力的细胞,基因突变会导致干细胞癌变,可能会产生肿瘤,被称为肿瘤干细胞。近年来,肿瘤干细胞理论发展迅速,肿瘤干(样)细胞或肿瘤初始细胞存在于多种癌症中。研究已经证实肝肿瘤中存在肝癌干细胞^[22]。

肿瘤干细胞通过几个 ATP 结合盒超家族转运蛋白的高表达,提升 DNA 修复能力以及抗凋亡能力,从而具有更强的抵抗药物和毒素攻击的能力。有报道指出肝祖细胞和肝肿瘤细胞能表达多种 ATP 结合盒转运体^[23],包括 MDR1、MRP1、MRP3 和 BCRP。基于这点利用流式细胞术可以分离出肝癌干细胞,由于这些细胞在流式细胞仪上分布于边缘区域,又称为侧群(side population, SP)细胞。对肝癌 SP 细胞的研究发现,SP 细胞具有更高的体外克隆能力,在体内则具有更强的成瘤性,其基因表达水平明显异于非 SP 细胞。有报道指出肝癌细胞系 Huh7 SP 细胞中 ABCG1 和 ABCF2,以及 PLC/PRF/5 细胞系中 ABCB1、ABCB2、ABCC7 和 ABCA5 相较于非 SP 细胞均有不同程度上调^[24]。此外,通过分离特定分子表型的肿瘤细胞也能得到肿瘤干细胞,这种方法比流式细胞术分离法具有更高的特异性。有报道指出 CD133⁺、CD44⁺的肝癌细胞可能代表了肝癌干细胞亚群,该亚群肝癌细胞 MDR1、MRP1 及 BCRP 表达水平高于其他亚群肿瘤细胞,并显示出更强的小鼠体内成瘤能力^[25]。

肿瘤干细胞的存在使肿瘤治疗更加困难,由于高表达 ATP 结合盒转运体,肿瘤干细胞对化疗药物天然耐药,其自我复制和多向分化能力使肿瘤不断

增殖恶化,抵抗抗肿瘤治疗。

4.3 ATP 结合盒转运体和脂类信号通路

COX-2/PGE2 通路通过自分泌或旁分泌,激活 G 蛋白偶联受体,使肿瘤组织产生一系列生理反应:促进肿瘤细胞演化(增殖、迁移、侵袭、转移),逃避免疫组织监视,自分泌生长因子,促进血管发生和转移等。COX-2/PGE2 通路参与肿瘤细胞发生、维持和发展以及转移扩散的整个过程,是肿瘤细胞中重要的信号系统。有报道指出肝癌早期 COX-2 表达水平上调,但随着肿瘤的发展,表达水平下调,提示 COX-2 水平的变化在一定程度上调节肝癌细胞的生长^[26]。

信号通路作用的发挥依赖于信号分子的转运,MRP 转运体家族能够有效地外排前列腺素,特别是 ATP 结合盒转运体高表达的肿瘤细胞中,这可能是主要的外排方法。研究表明,多种前列腺素类信号分子(包括 PGE₂、PGD₂ 以及 PGF_{2α})都是 ATP 结合盒家族转运体(MRP1、MRP2 和 MRP4)的底物^[27-28]。此外,ATP 结合盒转运体还参与白三烯信号分子以及细胞内 1-磷酸鞘氨醇(S1P)的转运^[29],促进细胞存活、增殖、侵袭等生理效应。

脂类信号通路在肿瘤演化过程中扮演了重要角色,而多种 ATP 结合盒转运体参与了这些信号分子的输送,但是 ATP 结合盒转运体对肿瘤细胞演化的直接作用尚不清楚,对其机制的进一步研究,为肿瘤的治疗提供了新的研究方向。

5 结语

ATP 结合盒转运体介导的化疗药物的外排转运,是肝癌多药耐药产生的主要机制。针对这一机制,研究者开发了多种 MDR 逆转剂,虽然其临床应用还有待观察,但对于肝癌的治疗也有一定指导意义。此外,ATP 结合盒转运体可能参与了肿瘤生物学的一些重要过程,包括促进肿瘤细胞的增殖、分化和转移。因此,肝癌细胞以及其他肿瘤细胞中,ATP 结合盒转运体不仅是一个发挥保护作用的外排泵,它对肿瘤演化的促进作用有可能成为今后肿瘤治疗的新靶点。

参考文献

[1] Hu C, Li H, Li J J, *et al.* Analysis of ABCG2 expression and side population identifies intrinsic drug efflux in the HCC cell line MHCC-97L and its modulation by Akt signaling [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(12): 2289-2297.
[2] Huang Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane

transporters in cancer chemotherapy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(1): 183-201.

- [3] Fletcher J I, Haber M, Henderson M J, *et al.* ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps [J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2): 147-156.
[4] Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(12): 2903-2909.
[5] 郭晓林, 姜雅秋, 金清龙. 多药耐药相关蛋白 3 表达与肝癌耐药的相关性 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(11): 1539-1540.
[6] 李泽信, 王 霄, 朱绍辉. 肝癌介入治疗对多药耐药相关蛋白基因表达的影响 [J]. 中国现代普通外科进展, 2010, 13(12): 925-928.
[7] 奚 忠, 江春平, 丁义涛. ABCG2 在肝细胞性肝癌组织和肝癌细胞株中的表达及意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(3): 247-252.
[8] 王百林, 杨海燕, 翟淑萍. 多药耐药相关蛋白基因、肺耐药蛋白基因在肝细胞癌中的表达及临床意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(2): 95-99.
[9] Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy [J]. *Ann Med*, 2006, 38(3): 200-211.
[10] 许 茜, 许景峰. 药物转运体介导的肿瘤细胞多药耐药研究进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2010, 4(9): 1643-1645.
[11] Lhomme C, Joly F, Walker J L, *et al.* Phase III study of valspodar (PSC833) combined with paclitaxel and carboplatin compared with paclitaxel and carboplatin alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(16): 2674-2682.
[12] Ruff P, Vorobiof D A, Jordaaneet J P, *et al.* A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zoledronic acid (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64(4): 763-768.
[13] Kuo T C, Chiang P C, Yu C C, *et al.* A unique P-glycoprotein interacting agent displays anticancer activity against hepatocellular carcinoma through inhibition of GRP78 and mTOR pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(9): 1136-1144.
[14] Ye C G, Wu W, Yeung J, *et al.* Indomethacin and SC236 enhance the cytotoxicity of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cells via inhibiting P-glycoprotein and MRP1 expression [J]. *Cancer Lett*, 2011, 304(2): 90-96.

- [15] 魏 莉, 李爱民, 罗荣城. 肝癌多药耐药及逆转的研究进展 [J]. 中国药房, 2009, 20(7): 547-549.
- [16] Szakacs G, Paterson J K, Ludwig J A, *et al.* Targeting multidrug resistance in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(3): 219-234.
- [17] 王 威, 刘克辛. 病理状态对肠寡肽转运体 PEPT1 活性的调节 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 39-43.
- [18] Vander Borcht S, Komutal M, Libbrecht L, *et al.* Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin [J]. *Liver Int*, 2008, 28(10): 1370-1380.
- [19] Zhao J, Yu B Y, Wang D Y, *et al.* Promoter polymorphism of MRP1 associated with reduced survival in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(48): 6104-6110.
- [20] Tsuda N, Harada K, Matsui O. Effect of change in transporter expression on gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced magnetic resonance imaging during hepatocarcinogenesis in rats [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(3): 568-576.
- [21] Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, *et al.* Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 53(4): 1206-1216.
- [22] Yang Z F, Ngai P, Ho D W, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [23] Sukowati C, Rosso N, Crocè L S, *et al.* Hepatic cancer stem cells and drug resistance: Relevance in targeted therapies for hepatocellular carcinoma [J]. *World J Hepatol*, 2010, 2(3): 114-126.
- [24] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.
- [25] Zhu Z, Hao X F, Yan M X, *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133⁺ CD44⁺ population in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(9): 2067-2078.
- [26] Murata H, Tsuji S, Tsujii M, *et al.* Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox-2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Lab Invest*, 2004, 84(8): 1050-1059.
- [27] de Waart D R, Paulusma C C, Kunne C, *et al.* Multidrug resistance associated protein 2 mediates transport of prostaglandin E2 [J]. *Liver Int*, 2006, 26(3): 362-368.
- [28] Rius M, Thon W F, Keppler D, *et al.* Prostanoid transport by multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) localized in tissues of the human urogenital tract [J]. *J Urol*, 2005, 174(6): 2409-2414.
- [29] Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, *et al.* Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes [J]. *J Neurochem*, 2007, 103(6): 2610-2619.