

外排型转运体介导的抗肿瘤药物多药耐药的研究进展

雷亚兰, 刘克辛*

大连医科大学, 辽宁 大连 116044

摘要: 多药耐药 (MDR) 是指肿瘤细胞接触一种抗肿瘤药物后, 也对其他多种结构不同、功能不同的抗肿瘤药物产生耐药性, 其中外排型转运体所介导的 MDR 是其中至关重要的一部分。外排型转运体是指位于肿瘤细胞生物膜上的具有将抗肿瘤药物从细胞内外排到细胞外的转运体。已知的具有外排作用的转运体有 P 糖蛋白 (P-gp)、多药耐药相关蛋白 (MRP)、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP) 和肺耐药蛋白 (LRP)。综述这几种外排型转运体的一般性质并着重于阐述逆转这些转运体介导的多药耐药的药物及方法。

关键词: P 糖蛋白; 多药耐药相关蛋白; 乳腺癌耐药蛋白; 肺耐药蛋白

中图分类号: R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 01- 0014 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.002

Advances in research on antineoplastic agents' multidrug resistance mediated by efflux transporters

LEI Yalan, LIU Kexin

Dalian Medical University, Dalian 116044, China

Abstract: Multidrug resistance (MDR) refers to the resistance that the cancer cells will display to multiple structurally dissimilar and functionally diverse drugs after exposing to an anticancer drug and MDR mediated by efflux transporters is one crucial part of MDR. Multidrug resistance (MDR) is defined as the resistance to Efflux transporters, located in the biological membranes, can extrude a variety of structurally diverse drugs from the cell. There are several sorts of known efflux transporters: P-glycoprotein (P-gp), the multidrug resistance proteins (MRPs) 1-5, the breast cancer resistance protein (BCRP) and lung resistant protein. This review concentrates the general properties on those efflux transporters and the review will be more focus on the drugs and methods to reversing MDR.

Key words: P-glycoprotein; the multidrug resistance proteins; the breast cancer resistance protein; lung resistant protein

随着研究的不断进展, 对抗肿瘤药物的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 的了解不断深入, 也揭示了相关外排型转运体在 MDR 中的功能和作用。这些外排型转运体能够将抗肿瘤药物从细胞内排到细胞外, 从而降低了细胞内的药物浓度, 降低了抗肿瘤药物的药效, 使化疗达不到预期的治疗效果。但是, 随着科技的不断进步, 研究者们不仅发现了越来越多的可以用于逆转 MDR 的抑制剂, 还开发了药物传递系统和靶向治疗, 给肿瘤患者带来了曙光。本文就介导抗肿瘤药物 MDR 的外排型转

运体及其逆转药物和逆转 MDR 策略展开综述。

1 P 糖蛋白 (P-gp)

1.1 P-gp 概述

P-gp 首先被 Juliano 和 Ling 在实验中发现^[1], P-gp 是 ATP 结合盒 (ABC) 转运蛋白的成员, 由 1 280 个氨基酸组成, 相对分子质量为 1.7×10^5 , 位于细胞膜上, 由结构相似的两半组成, 每一半都有 1 个由 6 个疏水跨膜螺旋组成的跨膜结构域 (MSD) 和 1 个高度保守的 ATP 结合域 (NBD), 其中第一个细胞外环是 N-糖基化的。其疏水区形成跨膜通

收稿日期: 2017-06-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473280)

第一作者: 雷亚兰 (1994—), 女, 汉族, 本科生, E-mail: 854403886@qq.com

***通信作者:** 刘克辛, 男, 博士, 教授, 博士生导师、享受国务院特殊津贴专家, 研究方向为药物转运体与药理学。

Tel: (0411)86110407 E-mail: kexinliu@dlmedu.edu.cn

道, 从而其转运底物可以通过胞膜脂质双分子层被排出。P-gp 的 2 个 NBD 能与 ATP 结合使 ATP 水解释放能量将细胞内的物质转运出细胞外。有研究表明, 任何一个 ATP 结合位点被抑制了, 那么 P-gp 的外排功能也会受抑制^[2], 这就为临床解决 MDR 提供了思路。

P-gp 具有广泛的底物特异性, 能对不同种的细胞毒性药物产生交叉抗性。P-gp 的底物(抗肿瘤药物类)主要包括: (1) 植物碱类, 如长春新碱、紫杉醇; (2) 烷化剂, 如环磷酰胺; (3) 抗肿瘤抗生素, 如柔红霉素; (4) 蒽环类化疗药, 如阿霉素; (5) 激素类, 如孕激素; 但是有些化疗药物并不是 P-gp 的底物: (1) 抗代谢类, 5-氟尿嘧啶; (2) 铂类化合物, 如顺铂。

1.2 P-gp 介导的 MDR

P-gp 是研究最多的外排型转运体, 几乎所有的肿瘤都过表达了 P-gp, 并且其表达水平与耐药程度有关。P-gp 的表达能够受药物的诱导, 当抗肿瘤药物进入肿瘤细胞之后, 接受这种刺激后出于对细胞的保护机制, P-gp 的 mRNA 水平会增高, 当这种刺激持续一段时间之后 P-gp 的表达会增高。这就说明了这种 MDR 并不能通过减少药量或者更换药物等方法来避免。

P-gp 是具有外排作用的转运体, P-gp 对于人体具有两面性。(1) 在正常组织中, P-gp 对于机体有保护作用, 阻止外来的有害于人体的物质进入机体。P-gp 广泛分布于正常组织中, 如脑、肝、肾、肠、胰等具有分泌与排泄功能的组织, 并且在血脑屏障、血睾屏障和血胎屏障中发挥重要的屏障作用; (2) 在肿瘤组织中, P-gp 导致了 MDR 的产生。P-gp 在许多肿瘤细胞中的过表达, 能将抗肿瘤药物泵出细胞从而使肿瘤细胞内的药物浓度降低达不到治疗效果。

有许多细胞毒性药物是通过促进肿瘤细胞的凋亡来杀死肿瘤细胞, 除了将这些细胞毒性药物排出肿瘤细胞之外, P-gp 还可以通过调节内源性与外源性凋亡途径抑制肿瘤细胞的凋亡, 降低药效。内源性途径主要取决于线粒体中促凋亡因子的释放, 在 GC 细胞系 AGS 和 MKN-28 中, P-gp 位于与 Bcl-xL 共定位的质膜和线粒体上。此亚细胞分布表明, P-gp 可以经由线粒体途径参与细胞凋亡的调控, 并且通过 siRNA 的 P-gp 选择性沉默导致暴露于氧化应激的两个 GC 细胞系中细胞凋亡指数的显著升

高^[3]。TRAIL 是通过外源性凋亡途径杀死肿瘤细胞的 TNF 家族成员。在含有四环素抑制性质粒系统的 HeLa 细胞中, P-gp 的表达是关闭的, 阻断了 P-gp 转运活性结果使肿瘤细胞对 TRAIL 更加敏感, P-gp 的表达是赋予 TRAIL 抗药性的重要因素^[4]。

1.3 逆转 P-gp 介导 MDR 的策略

1.3.1 P-gp 抑制剂

1981 年, 首次发现钙离子通道阻滞剂维拉帕米能有效逆转小鼠耐药细胞株 P388/VCRP 中 P-gp 介导的对长春新碱和长春碱的耐药性^[5], 激发了大家针对新靶点 P-gp 的研究热情, 开发了许多通过抑制 P-gp 的功能来逆转 MDR 的药物, 也就是 P-gp 抑制剂。

第一代 P-gp 抑制剂并不是新研发出来的药物, 而是老药新用。第一代 P-gp 抑制剂是一批以钙离子通道抑制剂维拉帕米和免疫抑制剂环孢菌素 A 为代表的口服药物。这批药物还有: 普罗帕酮、奎尼丁、红霉素、氯丙嗪、咖啡因、利血平、育亨宾和他莫昔芬等等。基于人空肠切片做实验, 发现奎尼丁、环孢菌素 A 和维拉帕米增加了空肠中罗丹明 123 的累积, 即这 3 种药物使罗丹明 123 的 AUC 增加了, 并且罗丹明 123 的累积量的增加呈浓度相关性^[6]。但是在进行体内试验时发现, 使用安全剂量时, 这些药物通常有自己的药物效应动力学, 这使得血药浓度远远达不到能抑制 P-gp 作用的药物浓度。维拉帕米达到抑制 P-gp 效果时的浓度会导致预期外的心脏毒性^[7]。而且, 大部分第一代 P-gp 抑制剂同时也是 CYP3A 的底物^[8]。

于是人们研发了第二代 P-gp 抑制剂, 这些药物是已发现的逆转剂的衍生物, 其中的代表药有 SDZ PSC833 (环孢菌素 A 的类似物) 和右维拉帕米 (维拉帕米 R 型同分异构体)。PSC833 的安全范围较第一代抑制剂大得多, 在体内能达到较高并且安全的血药浓度来达到治疗浓度^[9]。同时 PSC833 与 P-gp 有很高的亲和力, 它被 P-gp 以很慢的转运速率转运, 占据了 P-gp 的跨膜通道, 所以能起抑制 P-gp 的作用^[10]。但 PSC833 是 CYP3A4 的抑制剂, 当使用 PSC833 代替环孢素与紫杉醇联用时, 需要紫杉醇剂量减少 50%^[11]。

已经达到临床试验阶段的第三代抑制剂包括 Tariquidar (XR9576)、Zosuquidar (LY335979)、Laniquidar (R101933)、Elacridar (F12091)、Mitotane (NSC-38721)、Annamycin 和 R101933。这些抑制剂具有高选择性、与 P-gp 的高亲和力, 同时有更高

的逆转活性。尽管 tariquidar 已经在临床试验中作为有效的 P-gp 抑制剂,但是最近研究发现 tariquidar 的体内特异性取决于浓度和 P-gp 与 BCRP 的相对密度和容量^[12]。使用 3D-QSAR (三维定量结构-活性关系)和等高线图分析发现了还存在有比 tariquidar 更高的效力和更好的稳定性的几种 tariquidar 类似物^[13]。

1.3.2 具有逆转 MDR 功能的天然化合物 在研发新 P-gp 抑制剂的同时,也有许多研究者选择了天然化合物。人们发现许多种类的中药成分能够通过下调 P-gp 的表达,抑制 P-gp 的外排作用或者其他途径来达到逆转 MDR 的目的,然而具体的机制十分复杂,还未得到阐明。丹酚酸 B (一种从丹参中提取的水溶性酚类化合物)以剂量相关的方式降低 P-gp 的表达^[14]。有研究者使用蛋白质印迹分析来检测茶多酚的有效提取物 (EGCG) 治疗后 MCF-7Tam 细胞中 P-gp 的含量,结果表明 P-gp 表达显著降低^[15]。这个现象部分是由于蛋白酶体降解诱导 P-gp 表达下降,还有可能是在蛋白质合成的过程中 EGCG 与 ATP 结合位点的紧密结合导致 P-gp 表达下降。

有很多日常蔬菜植物里的提取物也具有逆转 MDR 的作用。有研究通过钙黄绿素 (AM) 吸收测定法测定 β -胡萝卜素对人 P-gp 转运功能的影响,结果表明 β -胡萝卜素以浓度相关性方式显著抑制人类 P-gp 外排功能,而不改变 ABCB1 mRNA 表达^[16]。除此之外,还有栀子苷 (从植物栀子的干燥成熟果实中提取)^[17]、虫草素 (从一种膳食蘑菇内提取)^[18] 也属于此类特点的化合物。

1.3.3 药用辅料 研究发现有些辅料成分可以作为 P-gp 的抑制剂。药物辅料对人体无毒或者低毒,并且无药理活性,它几乎不被人体吸收并且只对胃肠道上皮细胞的 P-gp 发挥抑制作用。所以药物辅料是很好的选择,它通过减少药物的外排来增加肿瘤细胞内的药物浓度。

药用辅料分为以下 3 种: (1) 非离子表面活性剂,如聚山梨酯。有研究者在体外在 Caco-2 细胞中进行了研究,并且通过将聚山梨酯-20 与多柔比星联合给予雄性 SD 大鼠口服。0.025%聚山梨酯-20 增加多柔比星的体外肠道吸收渗透性。此外,多柔比星外排比也降低了^[19]。这说明了聚山梨酯-20 是一种很好的能抑制 P-gp 功能的辅药,但是这种情况能不能复制到体内,具体机制还需要进一步研究。

(2) 聚合物,包括聚乙二醇 (PEG) 和壳聚糖硫酸盐等。有研究采用合成的还原敏感型 mPEG-PLGA-SS-DTX 缀合物负载 P-gp 抑制剂维拉帕米 (VRP),制备多西紫杉醇 (DTX) 和 VRP 共同递送的 mPEG-PLGA-SS-DTX/VRP (PP-SS-DTX/VRP) 多功能胶束。胶束具有高的药物负载量,并且对于 DTX 和 VRP 都显示出明显的敏感性降低的释放特性。此外,体外抗肿瘤试验显示,胶束显著抑制 p-gp 的外排活性和加速细胞凋亡,导致药物的抗肿瘤活性增强和 MDR 逆转^[20]。(3) 脂质,这一类的辅药能增加脂溶性药物的溶解度。

1.3.4 药物传递系统 (DDS) 为了使 P-gp 以更高的效率和特异性不将抗肿瘤药物排出肿瘤细胞,开发了用于全身和/或局部的药物传递系统 (DDS)。载体、抗肿瘤药物和 P-gp 逆转剂组装在一起的 DDS 可以通过协同对抗不同的生物信号途径达到更好的治疗效果,同时允许患者用低剂量的多种化合物联合治疗。此外,共同递送的多种药物靶向相同的细胞途径,可以获得更大的治疗效果和更好的选择性。

树状大分子 聚酰胺 (PAMAM) 树枝状大分子是高度枝化的合成聚合物的家族,其作为有效递送载体已经引起了研究者很大的兴趣。实验设计了 h-R3-siRNA-PAMAM 复合物 (HSPC),这是通过将 siRNA-PAMAM 复合物 (SPC) 静电吸附到带负电荷的 h-R3 上组装而成的。首先, HSPCs 可以通过 h-R3 与 MCF-7/ADR 肿瘤细胞表面上的 EGFR 受体结合进入细胞。然后, siRNA 从复合物分离并释放到细胞质中。h-R3 介导的 MDR1 siRNA 递送系统可以实现下调 MDR1 基因,降低 P-gp 表达,从而增加 MCF-7/ADR 细胞中多柔比星的积累^[21]。

脂质体 为了改善给药,研究者研发了脂质体 LP (XR, PCT),这是将 tariquidar (XR) 与紫杉醇 (PCT) 联合包被于脂质体中。LP (XR, PCT) 能协同抑制细胞活力,阻断增殖,并引起过表达 P-gp 的紫杉醇抗性 SKOV3-TR 和 HeyA8-MDR 细胞系中的 G2-M 阻滞^[22]。

混合胶束体系 靶点均为线粒体的 Pluronic L61 单体和姜黄素共配制成 pH 敏感性胶束可以通过抑制线粒体信号通路、降低 P-gp 的表达和功能,显著改善多柔比星 (DOX) 对 MCF-7/ADR 细胞的细胞毒性、细胞摄取和凋亡作用^[23]。

纳米药物载体 纳米载体可以预防药物分子被外排泵如 P-gp 识别,并且在细胞内释放药物可以使

外排型转运体外排药物的速率最小化^[24]。应用于解决 MDR 的纳米载体包括以下: 纳米颗粒、磁性纳米颗粒、纳米金、纳米凝胶、聚合物-药物偶联物等。研究发现在卵巢癌的治疗中, 含有紫杉醇和姜黄素的 PLGA-磷脂纳米颗粒不仅溶解性和稳定性增加了, 而且缓释效果也改善了^[25]。

自乳化的药物传递系统 (SEDSS) SEDSS 由表面活性剂、油、辅助表面活性剂和/或助溶剂组成, 它能够溶解 P-gp 抑制剂以及疏水药物。由 SEDSS 递送他莫昔芬 (TMX) 降低了肝脏首关效应, 增加了肠壁对药物的摄取和促进了肠道淋巴通路对药物吸收, 从而增加了他莫昔芬对乳腺癌细胞的杀伤作用, 增加了疗效^[26]。

2 MRP

2.1 MRP 概述

MRP 也是 ATP 结合盒转运蛋白。迄今为止已经发现了 9 个 MRP 基因, 使 MRP 成为一个家族。研究发现用 MRP1~5 转染的肿瘤细胞都发生了多药耐药, 在这里仅仅介绍 MRP1~5。其中 MRP1 是现在研究最多的多药耐药相关蛋白。

MRP 的基础结构是由跨膜结构域 (MSD) 和三磷酸腺苷 (ATP) 结合域 (NBD) 相间排列而成的。其中 MRP4 和 MRP5 的结构与 P-gp 非常相似, 大体结构如 $\text{NH}_2\text{-MSD-NBD-MSD-NBD-COOH}$, 每个 MSD 同样是由 6 个跨膜螺旋构成。MRP1、MRP2 和 MRP3 的结构与 MRP4、MRP5 略有不同, 它们在 N 末端多了一个 MSD0 (MSD0 是由 5 个跨膜螺旋构成的), 组成了 $\text{NH}_2\text{-MSD0-MSD-NBD-MSD-NBD-COOH}$ 的结构, 这就导致了它们的 N 末端位于细胞外。

MRP1~5 (除 MRP2 外) 主要在上皮细胞的基底膜侧表达, MRP2 主要在管腔膜侧表达。MRP 在机体中分布广泛, 在多种正常组织中表现为低水平表达。MRP 的生理功能主要是细胞内解毒、参与炎症反应、氧化应激反应以及物质运输、介导机体潜在的和外源性有害物质的排泄, 保护机体免受毒性反应。

但是, 在肺癌、卵巢癌和前列腺癌等实体肿瘤和血液性肿瘤中, MRP 的表达是显著上调的。研究采用免疫组化法检测了 64 例人脑胶质瘤中的 MRP 的表达量, 结果是观察组阳性率为 78.1% (对照组为 8.3%), 表明了 MRP1 在人脑胶质瘤中的显著过表达^[27]。MRP1 的过表达还与非小细胞肺癌^[28]、黏

液表皮样癌^[29]和卵巢癌^[30]不良预后和存活相关。

2.2 MRP 介导的 MDR

MRP1 具有像 P-gp 一样的外排抗肿瘤药物的能力, MRP1 与 ATP 结合并水解 ATP 之后将胞质内的抗肿瘤药物外排出细胞, 从而降低肿瘤细胞内的药物浓度, 削减药效。这就是 MRP 介导的 MDR。这里着重介绍 MRP1 以及 MRP2。

MRP1 是两亲性有机阴离子的共转运蛋白, 可运输疏水性药物/复合物 (这些物质往往能与离子三肽 GSH、葡萄糖醛酸、硫酸盐络合) 和炎症介质白三烯。在抗肿瘤药物中, 以下几类是 MRP1 的底物: (1) 鬼臼毒素; (2) 长春花生物碱, 如长春新碱; (3) 蒽环类, 如多柔霉素; (4) 喜树碱, 如托泊替康、伊立替康; (5) 蒽二酮, 如米托蒽醌; (6) 重金属阴离子, 如砷化物和三价锑; (7) 甲氨蝶呤。

但是对其中的一些抗癌药物如长春新碱、鬼臼乙叉苷、甲氨蝶呤、阿霉素、盐酸米托蒽醌等, 只有在谷胱甘肽 (GSH) 存在时, 才可以检测到 MRP1 对这些药物的外排作用。换句话说, GSH 的存在是 MRP1 介导 MDR 的必要条件。

MRP2 是有机阴离子转运蛋白, 在抗肿瘤药物中, 它的底物与 MRP1 的底物有很大的重叠性, 主要有以下几类: (1) 长春花生物碱, 如长春新碱; (2) 蒽环类, 如多柔霉素; (3) 喜树碱, 如伊立替康; (4) 蒽二酮, 如米托蒽醌; (5) 甲氨蝶呤; (6) 顺铂。

2.3 逆转 MRP 介导 MDR 的策略

到目前为止, 找到良好的并且能在完整细胞中起作用的 MRP 小分子抑制剂比 P-gp 要困难得多。研究发现尽管 MRP 的底物与 P-gp 的底物相似性较大, 但是 P-gp 抑制剂并不能作为 MRP 抑制剂, 这可能与 MRP 以阴离子化合物作为底物和抑制剂有关。许多 MRP 抑制剂已经被报导了, 种类如下。

2.3.1 有机阴离子转运蛋白抑制剂 磺吡酮、苯溴马隆和丙磺舒对 MRP 外排抗肿瘤药物也有抑制作用^[31]。研究发现, 丙磺舒和 MK571 的联合效应以及丙磺舒和环孢素 A 联合使用对 CFDA (一种荧光染料) 摄取的影响均强于单独的丙磺舒作用^[32]。

2.3.2 白三烯受体拮抗剂 白三烯受体拮抗剂 MK571 同时也是白三烯类似物, MK571 能够有效地阻断肿瘤细胞对柔红霉素 (DNR) 和谷胱甘肽 (GSH) 的外排^[33]。同时, MK571 对多种 MRP 都有抑制作用, 被广泛的用于科学研究。

2.3.3 非甾体类抗炎药物 COX-2-PGE2-前列腺素E受体信号通路的活性增强可上调MDR1/P-gp、MRP1和BCRP的表达。在联合塞来昔布(50和100 $\mu\text{mol/L}$)、顺铂(10 $\mu\text{g/mL}$)给药48 h处理的细胞中发现,与单独使用任何一种药物的对照组相比MDR1、MRP1和BCRP mRNA表达下调^[34]。MRP1高表达的肿瘤细胞对硫化舒林酸具有极高的敏感性,这说明硫化舒林酸对肿瘤细胞的细胞毒作用很强^[35]。

2.3.4 自然植物的提取物 在胶质母细胞瘤细胞系G62细胞中,黄酮类化合物芹菜素、柚皮素、水黄皮素都降低长春新碱的 IC_{50} ,其中在相同剂量的条件下,水黄皮素有最强的降低效果^[36]。

3 BCRP

3.1 BCRP概述

第三个发现的外排型转运体BCRP是ATP结合盒转运蛋白超家族成员。BCRP是一个由655个氨基酸构成分子大小为 7.2×10^4 的膜蛋白,它的结构与上述讨论的转运蛋白不同,BCRP是一个半转运蛋白,仅由单个N末端的细胞内ATP结合位点和其后的6个跨膜螺旋构成。最后的细胞外环很可能是N-糖基化的。通过观察BCRP突变体对耐药性的部分显性负效应,发现BCRP是以同型二聚体的形式存在的,这样的由二硫键连接的结构有利于BCRP稳定性的维持和功能的实施^[37],这也提供了一种策略:可以通过抑制BCRP二聚体的形成逆转抗肿瘤药物的MDR。

有研究者通过用RNA水平上的免疫组化分析来测量BCRP在体内的分布。结果发现BCRP在胎盘合体滋养层细胞的含量是最高的^[38]。对于消化系统,在胆小管、小肠和大肠的绒毛上皮细胞的腔膜面也发现了BCRP的存在,这与P-gp的分布重合了。随后又有研究发现在全身的静脉和毛细血管的内皮细胞中几乎都有BCRP的分布,但是动脉中却没有^[39],这可能与毛细血管物质交换和静脉运送代谢产物的功能有关。BCRP在造血期间表达,但是仅仅在初代骨髓干细胞群体中具有最高水平。随着分化程度的提高,BCRP的表达水平迅速降低,表明BCRP在维持骨髓干细胞未分化形状和保护其不受外源性物质或者其他毒素的破坏方面起重要作用^[40]。BCRP在正常组织中的表达和分布模式意味着它必须具有一些基本的生理功能,如作为机体防御系统的第一道防线保护生物体。

3.2 BCRP介导的MDR

实验证明那些具有高选择性的耐米托蒽醌、喜树碱衍生物、甲氨蝶呤的细胞系中都高表达了BCRP/Bcrp,这就说明了这些药物的外排也有BCRP和Bcrp的功劳。高表达BCRP的细胞耐药谱中并不包括长春新碱、紫杉醇和顺铂。过表达BCRP的细胞系对柔红霉素、表柔比星、9-氨基喜树碱的交叉耐药表现为多样性。通过用各种BSO处理BCRP过表达细胞系来消耗细胞中的GSH并不影响蒽环类或拓扑替康的外排。这表明BCRP外排抗肿瘤药物不需要GSH的参与。具体BCRP的底物(抗肿瘤药类)如下:(1)蒽环类,如米托蒽醌、柔红霉素;(2)喜树碱类似物,如拓扑替康、伊文替康、SN-38;(3)甲氨蝶呤;(4)酪氨酸激酶抑制剂(TKIs),如伊马替尼。

3.3 逆转BCRP介导MDR的策略

有几种办法可用来逆转BCRP介导的MDR:(1)从DNA水平,可以通过促进BCRP启动子的甲基化来抑制MDR;(2)从转录的水平,可以通过调节转录因子来抑制MDR;(3)从翻译水平,有些microRNA可以抑制mRNA的翻译从而抑制MDR;(4)从抑制BCRP的功能,有些药物可以通过抑制BCRP的外排作用来增加抗肿瘤药物的生物利用度,这就是BCRP逆转剂。

3.3.1 促进BCRP启动子的甲基化 褪黑激素和化疗药物(包括治疗恶性胶质瘤的替莫唑胺)的组合对BTSCs和A172恶性胶质瘤细胞具有协同毒性作用。这种效应与ABC转运蛋白BCRP的表达和功能的下调相关。褪黑激素增加了BCRP启动子的甲基化水平,并且褪黑激素与DNA甲基转移酶抑制剂预培养可以消减对ABCG2/BCRP表达和功能的影响。BCRP功能下调与褪黑激素和化疗药物的协同毒性作用之间可能存在相关性,这说明褪黑激素有望克服多药耐药性来治疗胶质母细胞瘤^[41]。

3.3.2 调节转录因子 许多转录因子涉及调节ABCG2表达,如雌激素受体 α (ER α)、缺氧诱导因子1(HIF-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ 或格列酮受体)、孕激素受体(PGR、NR3C3或核受体亚家族3)、抗氧化转录因子和芳基烃受体(AHR)等。当抗氧化转录因子NRF2在HCT116中表达沉默时,P-gp和BCRP表达下调,多柔比星耐药性下降。这个结果表明,NRF2的活化上调了外排型转运体的表达,从而增强了肿瘤干细胞的

MDR^[42]。

Sp1 和 Sp3 转录因子是激活 ABCG2 基因转录的主要决定因素,抑制 Sp1 依赖性的 BCRP 表达导致肿瘤细胞对抗癌药物顺铂的化学敏感性增加^[43]。所以 Sp1 和 Sp3 的抑制剂也能一定程度上逆转 MDR。

3.3.3 抑制 mRNA 的翻译 与其药物敏感的亲本系相比,肿瘤坏死因子 α 通过抑制 BCRP 的 mRNA 的翻译,在 ABCG2 过表达的乳腺癌细胞中诱导了更强的细胞毒性^[44]。

3.3.4 BCRP 逆转剂 GF120918 是 P-gp 的逆转剂,它同时也能有效地逆转 BCRP。药动学研究表明 GF120918 与拓扑替康的共同给药可以将托泊替康的口服生物利用度从 30% 提高到 90%。

fumitremorgin C (FTC) 是由一种变异真菌产生的烟曲霉毒素,是良好的 BCRP 逆转剂,并且 FTC 对 P-gp 和 MRP 的功能并没有干扰,这说明了 FTC 是具有高度特异性的 BCRP 逆转剂。但是研究发现当 FTC 运用到动物或者人身上时,具有神经毒性。于是研究者们致力于开发无神经毒性的 FTC 类似物,如 FTC 的二酮哌嗪类似物 Ko132 和 Ko134。

Ortataxel 是紫杉烷类药物的一种,它同时是 ABCB1、ABCC1 和 ABCG2 的抑制剂。

酪氨酸激酶抑制剂 (TKIs) 是靶向特异性抗癌药物的新型药物,包括伊马替尼、尼罗替尼和达沙替尼等,TKIs 既是 BCRP 的抑制剂又是 BCRP 的底物,它们通过抑制酪氨酸激酶活化干扰由蛋白磷酸化介导的细胞途径。与传统的化学疗法不同,TKIs 能特异性地攻击癌细胞靶点,不会对正常细胞造成损害,因此具有更加有利的安全性。将 TKIs 与抗肿瘤药物联合使用,能够提高抗肿瘤药物的疗效。在体内研究中,在单独伊立替康或吉非替尼治疗的小鼠中没有观察到体重减轻。然而,伊立替康和吉非替尼的联合治疗在小鼠中展现了杀伤肿瘤细胞的能力,这可能是吉非替尼抑制 BCRP 的外排造成的^[45]。最近研究发现将 TKI 与 TKI 联合使用不仅有杀灭肿瘤细胞的作用而且能作为化疗增敏剂^[46]。

4 LRP

4.1 LRP 概述

LRP 在耐药 NSCLC 细胞株 (sW1573 / R120) 中被首次发现。LRP 不属于 ABC 转运蛋白家族,随着研究进展发现它是人穹窿主蛋白 (MVP)。MVP 是组成穹窿体 (真核生物最大的寡聚核糖核蛋白)

的主要成分。LRP 是分子大小为 1.1×10^5 的由 869 的氨基酸组成的蛋白。

LRP 广泛表达于正常的组织和细胞,如支气管上皮、肠道上皮、肾小管上皮和血管上皮等,并且参与了机体第一道防线的组成。与以上的 ABC 转运蛋白不一样的是,LRP 大部分是位于细胞质中的,小部分位于核膜或者核孔复合体上。

4.2 逆转 LRP 介导MDR 的策略

LRP 也存在于许多肿瘤细胞中,如肺癌、白血病、卵巢癌、直肠癌、胃癌等。在肿瘤的最初阶段,LRP 的表达程度不一,但是随着肿瘤的发展以及对肿瘤的治疗,LRP 的表达出现了上调。研究发现: LRP 在非小细胞腺癌 III、IV 期患者的表达高于 I、II 期,低分化患者中的表达高于高分化和中分化的患者,这也就是说在一些癌症中,LRP 表达水平的高低可以预测患者的预后和存活^[47]。LRP 通过两种方式介导 MDR: (1) 从 LRP 的定位,就能知道 LRP 主要是阻止细胞核靶向药物进入细胞核,导致肿瘤细胞核的药物浓度降低而达不到预想的治疗效果。(2) LRP 能够将胞质内的抗肿瘤药物转运至囊泡,随后囊泡通过胞吐作用将药物转运到细胞外,降低细胞内药物浓度。

因此,LRP 的底物 (抗肿瘤药物类) 主要是一些以 DNA 为靶点来达到治疗目的的药物如紫杉醇、阿霉素、长春新碱、短杆菌肽 D 及顺铂等。

4.3 LRP 介导 MDR

对逆转 LRP 介导的 MDR 的研究并不像对 P-gp 那样热门。针对逆转 LRP 介导的 MDR,现在发展最好的克服 MDR 的主要措施是使用 RNA 干扰技术 (siRNA) 和对纳米材料的开发。

4.3.1 siRNA siRNA 利用 21~23 nt 的 siRNA 与目标 mRNA 的互补序列结合,从而诱导哺乳动物细胞同源基因 mRNA 降解,从而高效特异性地抑制靶基因表达。有研究通过转染 LRP siRNA 成功抑制了 A549/TXL20 中 LRP mRNA 和蛋白的表达,部分逆转了人肺腺癌移植瘤肿瘤的 MDR,为临床逆转人肺腺癌耐药性提供实验基础^[48]。

4.3.2 纳米材料 用于逆转 LRP 介导的 MDR 的纳米材料分为 2 种: (1) 磁性纳米材料,如铁氧化物中纳米 Fe_3O_4 颗粒具备超顺磁性,易实现靶向定位;表面积大,载药量高;制作方法简单、植入体内不良反应少,被生物医学领域常采用。研究发现,与对照组比较,通过流式细胞检查发现

Fe₃O₄-MNP-DDP 组中肿瘤细胞凋亡速率的增加, 细胞内 DDP 的积累量也增加。并且 Fe₃O₄-MNP 是通过降低细胞中 LRP 的表达来达到效果的^[49]。(2) 聚酰胺-胺形树枝状高分子 (PAMAM), 经多糖透明质酸 (HA) 修饰后的 PAMAM-HA 转染 siRNA 和多柔比星后增加了多柔比星在细胞内的浓度, 加强了多柔比星的细胞毒性作用^[50]。

将纳米材料联合抗肿瘤药物或 siRNA 使用或者三者一起使用逆转 MDR, 现在在动物和临床实验中展示出良好的抗肿瘤特性和安全性。

5 结语

综上所述, 外排型转运体有很多类, 每类转运体也有很多针对性的逆转策略, 但是现在并没有针对转运体的药物被 FDA 批准使用。这可能是因为外排型转运体介导的 MDR 机制太过于复杂, 其中牵涉的方方面面太多。这也有可能是随着抗肿瘤药物越来越多的使用, 外排型转运体也不断地发生变化导致了外排型转运体的功能发生变化。抗肿瘤药物的使用一方面杀死了肿瘤细胞, 另一方面也可能诱导了外排型转运体的表达增加。在外排型转运体与肿瘤细胞的相互作用里, 完全了解所有转运体之间的影响及相互作用、其他药物处理系统 (如摄取载体和药物代谢酶) 的潜在相互作用刻不容缓。希望在不久的将来, 可以逆转外排型转运体介导的 MDR。

参考文献

- [1] Juliano R L, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 455(1): 152-162.
- [2] Senior A E, Bhagat S. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(3): 831-836.
- [3] Rocco A, Compare D, Liguori E, et al. MDR1-P-glycoprotein behaves as an oncofetal protein that promotes cell survival in gastric cancer cells [J]. *Lab Invest*, 2012, 92(10): 1407-1418.
- [4] Galski H, Oved-Gelber T, Simanovsky M, et al. P-glycoprotein-dependent resistance of cancer cells toward the extrinsic TRAIL apoptosis signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(5): 584-596.
- [5] Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil [J]. *Cancer Res*, 1981, 41(5): 1967-1972.
- [6] Li M, de Graaf I A M, de Jager M H, et al. P-gp activity and inhibition in the different regions of human intestine *ex vivo* [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2017, 38(2): 127-138.
- [7] Fojo A T, Shen D W, Mickley L A, et al. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene [J]. *J clin oncol*, 1987, 5(12): 1922-1927.
- [8] Ambudkar S V, Dey S, Hrycyna C A, et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 361-398.
- [9] Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, et al. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833 [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(16): 4226-4233.
- [10] Smith A J, Mayer U, Schinkel A H, et al. Availability of PSC833, a substrate and inhibitor of P-glycoproteins, in various concentrations of serum [J]. *J Nat Cancer Inst*, 1998, 90(15): 1161-1166.
- [11] Fischer V, Rodriguez-Gascon A, Heitz F, et al. The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A. Implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite [J]. *Drug Metab Dispos*, 1998, 26(8): 802-811.
- [12] Kannan P, Telu S, Shukla S, et al. "Specific" P-glycoprotein inhibitor tariquidar is also a substrate and an inhibitor for breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2011, 2(2): 82-89.
- [13] Kakarla P, Inupakutika M, Devireddy A R, et al. 3D-qsar and contour map analysis of tariquidar analogues as multidrug resistance protein-1 (MRP1) inhibitors [J]. *Int J Pharm Sci Res*, 2016, 7(2): 554-572.
- [14] Guo P, Wang S, Liang W, et al. Salvianolic acid B reverses multidrug resistance in HCT-8/VCR human colorectal cancer cells by increasing ROS levels [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 15(2): 724-730.
- [15] Farabegoli F, Papi A, Bartolini G, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates Pg-P and BCRP in a tamoxifen resistant MCF-7 cell line [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(5): 356-362.
- [16] Teng Y N, Sheu M J, Hsieh Y W, et al. β -carotene reverses multidrug resistant cancer cells by selectively modulating human P-glycoprotein function [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(3): 316-323.
- [17] Huang H, Zhang X, Huang Z, et al. Geniposide reverses

- multidrug resistance *in vitro* and *in vivo* by inhibiting the efflux function and expression of P-glycoprotein [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(2): 437-442.
- [18] Teng Y N, Chang C S, Hung C C, et al. Cordycepin re-sensitizes multidrug resistance cancer cells to chemotherapeutic agents through modulating P-glycoprotein expression and ATPase function [J]. *J Funct Foods*, 2016: 681-690.
- [19] Al-Saraf A, Holm R, Nielsen C U. Tween 20 increases intestinal transport of doxorubicin *in vitro* but not *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2016, 498(1-2): 66-69.
- [20] Guo Y, He W, Yang S, et al. Co-delivery of docetaxel and verapamil by reduction-sensitive PEG-PLGA-SS-DTX conjugate micelles to reverse the multi-drug resistance of breast cancer [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017: 119-127.
- [21] Li J, Liu J, Guo N, et al. Reversal of multidrug resistance in breast cancer MCF-7/ADR cells by h-R3-siMDR1-PAMAM complexes [J]. *Int J Pharm*, 2016, 511(1): 436-445.
- [22] Zhang Y, Sriraman S K, Kenny H A, et al. Reversal of chemoresistance in ovarian cancer by co-delivery of a P-glycoprotein inhibitor and paclitaxel in a liposomal platform [J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(10): 2282-2293.
- [23] Hong W, Shi H, Qiao M, et al. pH-sensitive micelles for the intracellular co-delivery of curcumin and Pluronic L61 unimers for synergistic reversal effect of multidrug resistance [J]. *Sci Rep*, 2017: 42465.
- [24] Gao Z, Zhang L, Sun Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *Journal of controlled release* [J]. *Off J Contr Rel Soc*, 2012, 162(1): 45-55.
- [25] Liu Z, Zhu Y Y, Li Z Y, et al. Evaluation of the efficacy of paclitaxel with curcumin combination in ovarian cancer cell [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3944-3948.
- [26] Sandhu P S, Kumar R, Beg S, et al. Natural lipids enriched self-nano-emulsifying systems for effective co-delivery of tamoxifen and naringenin: Systematic approach for improved breast cancer therapeutics [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(5): 1703-1713.
- [27] 李 剑, 王建祯. 脑胶质瘤组织中MRP、MGMT蛋白、P-gp的表达观察 [J]. *山东医药*, 2015(47): 62-63.
- [28] Rybarova S, Hodorova I, Mihalik J, et al. MRP1 and GSTp1 expression in non-small cell lung cancer does not correlate with clinicopathological parameters: A Slovakian population study [J]. *Acta Histochemica*, 2014, 116(8): 1390-1398.
- [29] Cai B L, Li Y, Shen L L, et al. Nuclear multidrug resistance-related protein 1 is highly associated with better prognosis of human mucoepidermoid carcinoma through the suppression of cell proliferation, migration and invasion [J]. *PloS One*, 2016, 11(2): e0148223.
- [30] Sedlakova I, Laco J, Caltova K. Clinical significance of the resistance proteins LRP, Pgp, MRP1, MRP3, and MRP5 in epithelial ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2015, 25(2): 236-243.
- [31] Evers R, de Haas M, Sparidans R, et al. Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(3): 375-383.
- [32] Dogan A L, Legrand O, Faussat A M, et al. Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines [J]. *Leukemia Res*, 2004, 28(6): 619-622.
- [33] Salerno M, Loechariyakul P, Saengkhoe C, et al. Relation between the ability of some compounds to modulate the MRP1-mediated efflux of glutathione and to inhibit the MRP1-mediated efflux of daunorubicin [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(11): 2159-2165.
- [34] Liu B, Yan S, Qu L, et al. Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 1.
- [35] Whitt J D, Keeton A B, Gary B D, et al. Sulindac sulfide selectively increases sensitivity of ABCC1 expressing tumor cells to doxorubicin and glutathione depletion [J]. *J Biomed Res*, 2016, 30(2): 120-133.
- [36] Michaelis M, Rothweiler F, Nerreter T, et al. Karanjin interferes with ABCB1, ABCC1, and ABCG2 [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2014, 17(1): 92-105.
- [37] Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, et al. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization [J]. *Int J Cancer*, 2002(5): 626-630.
- [38] Jonker J W, Smit J W, Brinkhuis R F, et al. M.Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(20): 1651-1656.
- [39] Maliepaard M, Scheffer G L, Faneyte I F, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8): 3458-3464.
- [40] Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype [J]. *Nat Med*, 2001, 7(9): 1028-1034.

- [41] Martín V, Sanchez-Sanchez A M, Herrera F, et al. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells [J]. Br J Cancer, 2013, 108(10): 2005-2012.
- [42] Ryoo I-g, Kim G, Choi B-h, et al. Involvement of NRF2 signaling in doxorubicin resistance of cancer stem cell-enriched colonospheres [J]. Biomol Ther, 2016, 24(5): 482-488.
- [43] Yang W J, Song M J, Park E Y, et al. Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate expression of human ABCG2 gene and chemoresistance phenotype [J]. Mol Cells, 2013, 36(4): 368-375.
- [44] Mosaffa F, Kalalinia F, Parhiz B H, et al. Tumor necrosis factor alpha induces stronger cytotoxicity in ABCG2-overexpressing resistant breast cancer cells compared with their drug-sensitive parental line [J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(6): 413-418.
- [45] Yanase K, Tsukahara S, Asada S, et al. Gefitinib reverses breast cancer resistance protein-mediated drug resistance [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(9): 1119-1125.
- [46] D'Cunha R, Bae S, Murry D J. TKI combination therapy: strategy to enhance dasatinib uptake by inhibiting Pgp- and BCRP-mediated efflux [J]. Biopharm Drug Disp, 2016, 37(7): 397-408.
- [47] 李 杰, 龚 民, 崔 永. 肺耐药蛋白 LRP 在肺癌中的表达及意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2014(12): 2875-2879.
- [48] 张善锋, 王志举, 崔景彬, 等. 靶向阻断 LRP 提高肺癌细胞对紫杉醇的敏感性 [J]. 基础医学与临床, 2016(3): 370-374.
- [49] Li K, Chen B, Xu L, et al. Reversal of multidrug resistance by cisplatin-loaded magnetic Fe_3O_4 nanoparticles in A549/DDP lung cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Nanomedicine, 2013(8): 1867-1877.
- [50] Han M, Lv Q, Tang X J, et al. Overcoming drug resistance of MCF-7/ADR cells by altering intracellular distribution of doxorubicin via MVP knockdown with a novel siRNA polyamidoamine-hyaluronic acid complex [J]. J Control Release, 2012, 163(2): 136-144.