

## • 药理学 •

# ABC 转运蛋白与肿瘤多药耐药

王彦<sup>1</sup>, 刁亚英<sup>2</sup>, 姜远英<sup>1</sup> (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 第二军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433)

**摘要** 目的: 介绍 ABC 转运蛋白与肿瘤多药耐药的研究进展, 阐述 ABC 转运蛋白高表达是多药耐药的重要机制之一。方法: 检索国内外大量文献资料进行汇总、综述。结果: ABC 转运蛋白是具有 ATP 结合区的单向底物外排泵。P-糖蛋白高表达是肿瘤细胞产生多药耐药的经典路径, 多药耐药相关蛋白高表达能导致非 P-糖蛋白介导的多药耐药。结论: 开发多药耐药蛋白抑制剂有广阔的应用价值, 但注重其药理作用的同时还应对其潜在的毒副作用保持高度警惕。

**关键词** ABC 转运蛋白; 多药耐药; 肿瘤

中图分类号: R979.1 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2003)01-0028-04

化疗是肿瘤治疗的有效方法之一, 而多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 一直是化疗成功的最主要障碍。肿瘤多药耐药是指肿瘤细胞对某一抗肿瘤药物产生耐药性的同时, 对其它结构和作用机制不同的抗肿瘤药物也产生交叉耐药性。MDR 大多针对天然药物, 如生物碱类: 秋水仙碱、长春新碱、长春碱、紫杉醇等; 萜环类: 阿霉素、柔红霉素等; 还有依托泊苷、替尼泊苷、鬼臼毒素和泰素。引起 MDR 的抗癌药物称为 MDR 药物, 这类药物在结构上有两个共同之处: 一是分子为两性分子, 既有水溶性部分又有脂溶性部分; 二是中性 pH 条件下分子带正电荷。

肿瘤多药耐药的机制复杂, 主要有以下几个方面: ①药物吸收减少; ②细胞内药物泵出增多; ③细胞凋亡的抑制; ④药物活性作用减弱; ⑤细胞解毒作用增强; ⑥抗肿瘤药物的代偿性代谢增强; ⑦DNA 损伤修复能力增强; ⑧靶分子的改变。以上因素可能相互影响甚至互为因果。细胞内药物泵出增多的机制一般是由膜转运蛋白介导的。最大的膜转运蛋白基因家族是 ATP 结合盒式结构超家族 (ATP binding cassette transporter superfamily, ABC transporter superfamily), ABC 超家族中有许多成员参与肿瘤多药耐药<sup>[1-5]</sup>。

### 1 ABC 转运蛋白的共性

ABC 转运蛋白可看作是具有 ATP 结合区域的单向底物外排泵, 以主动转运方式完成多种分子的跨膜转运。转运通过的膜结构可以是细胞膜、内质网(ER)、微粒体过氧化物酶体和线粒体膜。ATP 结合区域就是能结合核苷酸的蛋白折叠区域 (nu-

cleotide binding folds, NBF)。NBF 包括 3 个保留区域: walker A、B 区域 (这两个区域存在于所有的 ATP 结合蛋白中) 和 signature (C) 结构 (位于 walker B 区的上游)。各种 ABC 转运蛋白的 C 区彼此不同, 具有互异性。另一重要的共性结构是跨膜区域 (transmembrane domain, TMD) TMD 可能是两组或三组, 每一组都有数个跨膜的  $\alpha$  螺旋, 数次横跨质膜, 是潜在的转移膜区域<sup>[4,6]</sup>。

以下着重对 P-糖蛋白 (P-gp) 和多药耐药相关蛋白 (MRP) 多基因家族作一概述。

### 2 P-糖蛋白 (P-gp)

P-gp 高表达是肿瘤细胞产生多药耐药的经典路径, 也是目前研究最广泛和深入的耐药机制<sup>[3]</sup>。

#### 2.1 P-gp 的结构

1976 年, Juliano RL 与 Ling V 在抗秋水仙碱的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞株的质膜上发现了 P-gp 的过度表达。此耐药细胞的药物摄入无明显变化, 药物外排能力却明显提高。P-gp 由 1280 个氨基酸残基组成, 分子量为 170kd, 其中肽链 140kd, 糖链 30kd。氨基端 (N 端) 与羧基端 (C 端) 形成相似的两部分结构, 氨基酸序列有高度的同源性。每一部分都有 6 个潜在的跨膜位点 (TMD) 和一个高度保守的 ATP 结合盒式结构 (NBF)。第一部分的 TMD 在 50~350 个氨基酸残基之间, NBF 位点在氨基酸的 426~433/541~551 位, 第二部分的 TMD 在 700~1000 个氨基酸残基之间, NBF 位点在氨基酸的 1068~1075/1184~1196 位。P-gp 有 8 个 N 糖基化位点, 分别位于第 14, 73, 91, 96, 103, 702, 887, 998 位氨基酸残基上, 糖链较集中于氨基端<sup>[6]</sup>。

## 2.2 表达 P-gp 的 MDR 基因家族

人类 MDR 基因家族含有两个基因 MDR1 和 MDR2,而在啮齿类则含有 *mdr1*, *mdr2*, *mdr3*。只有 MDR1、*mdr1*、*mdr3* 能赋予细胞多药耐药的特性。MDR 的 cDNA 含有 4669 个碱基对,第 179 ~ 3840 碱基对为可读区,起始密码为 ATG,共编码 1280 个氨基酸多肽。

MDR1 基因种属间同源性较高,人 MDR1 基因与鼠 *mdr1* 间的同源性为 81%,二者内含子-外含子结构相似,启动子区的同源性为 70%,MDR 基因与细菌的膜转运蛋白基因同源性很高(尤其 ATP 结合位点是保守区域),可推断二者从同一古老基因进化而来<sup>[7]</sup>。

## 2.3 P-gp 的功能

P-gp 具有较复杂的膜转运功能,利用 ATP 水解提供的能量将药物泵出到细胞外。它对天然的疏水性药物有较强的外排作用,包括长春碱、蒽环类、依托泊苷、紫杉醇等<sup>[8-15]</sup>。

大多数人认为,单分子 P-gp 就是一个功能单位,但 Weinstein 等认为,P-gp 在膜内是以二聚体和四聚体方式存在的,以形成一个畅通的药物通道。Rothenberg 等报道,纯化的 P-gp 无结合长春新碱的能力,而膜中的 P-gp 却有此能力,这表明 P-gp 结合抗癌药物依赖于膜的其它成分。

P-gp 在人体正常组织中也有不同程度的表达,在肾上腺组织 MDR1 基因表达很高,在肺、胃肠、胰、肾表达中等,而在卵巢、胸腺、骨髓则表达很低甚至无表达。MDR1 基因编码的 P-gp 主要分布于有分泌功能的上皮细胞中,如肾上腺皮质细胞、大小肠上皮细胞、肾近曲小管细胞、肝细胞的胆管面、胎盘滋养细胞及大脑毛细血管内皮细胞等。P-gp 的正常生理功能除与内分泌有关还与解毒有关,它作为细胞防御系统,将异己物质泵出胞外,同时还可能与细胞色素 P450 的解毒存在协同作用。

表 1 P-gp 介导的 MDR 细胞的生化特征

特 征	表 现
细胞膜脂流动性	增加/减少
ATP 消耗	增加
胞质 pH 值	升高
细胞 Ca <sup>2+</sup> 浓度	增加
维拉帕米、蛋白激酶 C 对 P-gp 磷酸化作用	增加
药物及调节剂与 P-gp 结合	竞争性结合
药物的亚细胞分布有改变(胞核/胞质)	减少
VRP 可调节药物亚细胞分布(胞核/胞质)	增加

P-gp 介导的多药耐药有一些明显的生化特征,具体见表 1。

P-gp 的功能很可能是通过磷酸化进行调节的,维拉帕米等逆转 MDR 的同时也能提高 P-gp 磷酸化水平。糖基化对 P-gp 生物活性不是必需的。用衣霉素阻断蛋白的糖基化或用链霉蛋白酶处理,去除细胞表面的糖基,都不能改变细胞的耐药性<sup>[7]</sup>。

## 2.4 P-gp 的表达调控

1993 年 Madden 等从人基因组 DNA 文库中首先克隆了 MDR1 基因含有启动子结构的 5' 端 DNA 序列,以氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 编码基因作为报道基因,构建了重组表达载体,以 CAT 表达的高低确定启动子的活性,结果由 MDR1 启动子控制的 CAT 表达活性与病毒基因启动子的控制表达活性相似。进一步的研究证实 MDR1 基础性转录活性的序列位于转录起始位点附近,即-134~+286 核苷酸之间。有趣的是 MDR1 基因转录起始位点下游的核苷酸序列与 MDR1 基因的转录起始过程有关,是体内 MDR1 转录表达的重要结构基础。

MDR1 基因表达水平的高低主要受转录水平的调控。蛋白激酶 C(PKC) 激活因子可诱导 MDR1 基因的表达。对于某些细胞系原癌基因 *ras* 的表达产物对 MDR1 基因的启动子具有显著的激活作用,但 *ras* 癌基因蛋白对 MDR1 基因表达的调节作用因细胞类型而异。对有的细胞系甚至有 MDR1 基因表达抑制作用。Kramer 等的研究提示 c-Ha-ras 癌基因的表达产物对 MDR1 的启动子活性也有一定的调节作用。

MDR1 基因启动子基因区有一种高度保守的热休克元件序列结构,可与热休克蛋白(HSP) 结合。受到热休克刺激时 MDR1 mRNA 转录水平升高。Kioda 等的研究结果表明在 MDR1 基因启动子序列中,60 个核苷酸的范围内就存在两段热休克应答元件,MDR1 基因的表不仅受到热休克应答刺激的调节,还具有精细的分子生物学调节机制。

MDR1 的表达活性还受到细胞因子的调节。TNF $\alpha$  的转基因表达对人胶质母细胞瘤细胞的 P-gp 表达具有促进作用。IFN $\alpha$  处理中国仓鼠卵巢细胞 ChRC5,其细胞膜上 P-gp 表达升高,但 MDR1 基因拷贝数不变,说明 IFN $\alpha$  使 MDR1 基因的表达水平升高。

肿瘤抑制基因 p53 及其突变体对 MDR1 基因

的表达也有一定的调节作用,但是促进或是抑制因细胞种类而异,而且其调节作用与 *c-Ha-ras* 原癌基因的调节相互独立。

人的 *MDR1* 基因启动的调节机制与病毒启动子的调节机制有很大差别, *MDR1* 启动子结构区中还有血清饥饿应答元件,通过对启动子活性的调节影响 *MDR1* 的表达。人的 *MDR1* 启动子结构中,血清饥饿应答元件位于-258~+121 核苷酸之间,当撤除人肾上腺细胞系 *sw-13* 培养基中的血清成分时,启动子活性升高,而小鼠肾上腺细胞系 *Y-1* 对撤除血清不敏感。血清饥饿对启动子的调节具有种属特异性<sup>[16~17]</sup>。

### 3 多药耐药相关蛋白(MRP)

MRP 高表达能导致非 *P-gp* 介导的多药耐药。

#### 3.1 MRP 的结构

以 *MRP1* 为例, *MRP1* 分子量 190kd, 与 *P-gp* 仅有 15% 的同源性。 *MRP1* 含有 3 个跨膜结构域(TMD), 羧基端(C 端)前两个 TMD 在细胞膜内侧各形成一个 ATP 结合位点。第 1 个 TMD 含有 6 个或 4 个跨膜位点, 末端位于细胞膜内侧, 第 2 个 TMD 含有 5 个或 6 个跨膜位点, 末端位于细胞膜外侧。两个 TMD 由位于细胞膜内侧的接头相互连接, 组成 MDR 样核心结构, 并通过接头( $L_0$ ) 连接 N 末端膜结合区(TMD<sub>0</sub>)。TMD<sub>0</sub> 含 5 个跨膜位点, N 末端在细胞膜外。TMD<sub>0</sub> 区(氨基酸 1~203) 与 *MRP1* 的转运功能无关, 失去此区域 *MRP1* 仍具有野生型 *MRP1* 的功能。而胞浆内  $L_0$  链接区氨基酸(204~281) 则可能是一个共转运功能结构域, 为 *MRP1* 转运底物所必需。

#### 3.2 MRP 基因

1992 年 Cole 等在耐阿霉素小细胞肺癌细胞株 H19/AR 的研究中发现了多药耐药相关蛋白(multidrug resistance related protein, MRP), 也属于 ABC 超家族成员。此后的研究发现人类 *MRP* 基因家族至少有 6 个成员, 它们分别是 *MRP1* 编码的多药耐药蛋白, *MRP2* (或 cMOAT, canalicular multispecific organic anion transporter) 编码的管状多特异性有机阴离子转运蛋白及其它 4 个同系物, *MRP3*、*MRP4*、*MRP5* 和 *MRP6*。 *MRP3* 与 *MRP1* 的同源性最高为 58%。 *MRP1*、*MRP2* 和 *MRP3* 都是有机阴离子和多种药物的转运蛋白<sup>[18~20]</sup>。

#### 3.3 MRP 的功能

*MRP1* 介导的药物外排与 GSH 有关, GSH 可调节 *MRP1* 介导的药物转运, *MRP1* 可能是通过促

进药物与谷胱甘肽的结合物的外排而致多药耐药。目前已知的由 *MRP1* 引起的 MDR 肿瘤包括白血病、多发性骨髓瘤、胃癌、食道癌、乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、纤维肉瘤、神经母细胞瘤和宫颈癌等。 *MRP* 除了有药物外排泵的作用, 还可能通过改变细胞内的药物分布产生耐药性。有研究发现 *MRP* 高表达的细胞, 葱环类化合物主要集聚于细胞核周围区域和胞质囊泡中, 细胞核中很少。 *MRP1* 本身也是在正常人体中有着广泛表达的 GS-X 泵, 主要分布在细胞浆中, 少量表达在细胞膜上。 Flens 等证实, 除甲状腺、外周神经、肾上腺间质、脑实质、脾脏的外缘区、卵巢的生发细胞和卵泡细胞、乳腺小叶、肾小球、肺细胞、胆管及唾液腺腺泡之外, *MRP1* 在 41 种人体组织或组织的亚结构中均有表达, *MRP1* 高表达于支气管上皮细胞、心肌细胞和巨噬细胞中。

*MRP2* 负责对铂类的抗药, 主要表达于有细管肝细胞, 也表达于肾近曲小管的上皮细胞等极性细胞的顶膜。 *MRP2* 能介导多种有机阴离子的肝胆分泌。 *MRP2* 可能主要作用于有机阴离子, 如利尿剂和抗生素。在耐药的肿瘤细胞中, 其调节机制和 *MRP1* 可能并不相同, 因为 *MRP2* 转运的许多底物是 *MRP1* ATP 酶的抑制因子。

*MRP3*, 主要表达于肝、结肠、小肠和肾上腺组织中, 在其它一些组织中也有低水平表达。在肝组织中, *MRP3* 主要集中表达于胆管上皮细胞内, 在肝细胞内呈中等水平表达。 *MRP3* 转运的特异性底物与 *MRP1* 和 *MRP2* 不同, 转运谷胱甘肽共轭物的能力差, 不引起 GSH 外排增多, 却能转运所有胆盐, *MRP3* 可能在胆盐的肝胆循环中起重要作用。

### 4 多药耐药蛋白抑制剂

一个理想的多药耐药蛋白抑制剂一般要求有以下特点: ① 是可口服的小分子。 ② 有一定的脂溶性, 以便能通过细胞膜。 ③ 剂量有一定的耐受性, 能重复给药以保持所需的药物浓度。 ④ 能够完全逆转 MDR 而且副作用小。目前对多药耐药蛋白抑制剂的设计及活性筛选主要以 PG-170 为模板。虽然有一些多药耐药蛋白抑制剂已进入 II/III 期临床研究, 但要发现理想的逆转 MDR 的药物仍需一段时间。

自从发现维拉帕米能够逆转 MDR 后, 又相继发现了一些药物能够不同程度地逆转 MDR。这些药物包括 ① 钙离子拮抗剂维拉帕米、尼卡地平 and 尼非地平; ② 钙调蛋白抑制剂三氟拉嗪; ③ 抗心率失

常药奎尼丁、胺碘酮和普罗帕酮; ④抗疟药奎宁和氯奎; ⑤抗菌药二氟沙星; ⑥、雌激素拮抗剂三苯氧胺; 免疫抑制剂环孢菌素 A 等。这些药物的特点是本身已作为治疗药物用于临床, 药理作用广泛, 化学结构多样化, 目前一般称为化疗增敏剂( chemosensitizers)。

维拉帕米等化疗增敏剂一般被称为第 1 代多药耐药蛋白抑制剂, 由于其广泛的药理作用, 临床上应用受到局限。第 2 代多药耐药蛋白抑制剂主要分为两类: 一类是第 1 代多药耐药蛋白抑制剂的类似物, 但是它们没有第一代药物所具有的药理作用, 例如维拉帕米的对映异构体之一右旋维拉帕米、环孢菌素的类似物 SDZ PSC833、奎尼丁的类似物 MS-209、奎宁的脱甲氧基类似物辛可宁等; 另一类第 2 代多药耐药蛋白抑制剂是新结构类型的化合物, 例如 S-9788、GF-120918 和 VX-710 等<sup>[20-23]</sup>。

随着分子生物学和相关学科的飞速发展, 人们会发现更多的可导致多药耐药的 ABC 转运蛋白。我们在研究其导致耐药的机制的同时应注意到多药耐药蛋白本身还有着广泛的正常生理功能, 在开发多药耐药蛋白抑制剂的过程中不但要注重其药理学作用还应对其潜在的毒副作用保持高度的警惕性。

参考文献:

[1] Tan B, Pivnicka-Worms D, Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation [J]. *Curr Opin Oncol*, 2000, 12(5): 450.

[2] Chauncey TR. Drug resistance mechanisms in acute leukemia [J]. *Curr Opin Oncol*, 2001, 13(1): 21.

[3] Nishio K, Nakamura T, Koh Y, et al. Drug resistance in lung cancer[J]. *Curr Opin Oncol*, 1999, 11(2): 109.

[4] Shtil, - A- A Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms as targets for prevention of emergence of multidrug resistance in human cancer cells [J]. *Curr - Drug- Targets*, 2001, 2(1): 57.

[5] Kerb, - R; Hoffmeyer, - S; Brinkmann, - U. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in *MDR1*, *MRP1* and *MRP2*[J]. *Pharmacogenomics*, 2001, 2(1): 51.

[6] Dean, - M; Hamon, - Y; Chimini, - G The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. *J- Lipid-Res*, 2001, 42(7): 1007.

[7] zhu L, Lang JH. P- glycoprotein and multidrug resistance, [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 1998, 33(6): 381.

[8] Campling BG, Young LC, Baer KA, et al. Expression of the *MRP* and *MDR1* multidrug resistance genes in small- cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 1996, 16(4A): 2079.

[9] Sonneveld P, List AF. Chemotherapy resistance in acute myeloid leukaemia [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2001, 14

(1): 211.

[10] Demeule M, Shedid D, Beaulieu E, et al. Expression of multidrug- resistance P- glycoprotein (*MDR1*) in human brain tumors [J]. *Int J Cancer*, 2001, 93(1): 62.

[11] Varadi A, Szakacs G, Bakos E, et al. P glycoprotein and the mechanism of multidrug resistance [J]. *Novartis Found Symp*, 2002; 243: 54- 65; discussion 65- 8, 180.

[12] Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug resistance (*MDR1*) gene: correlation with P glycoprotein expression and activity in vivo [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 243: 207 discussion 210.

[13] Oudard S, Levalois C, Andrieu JM, et al. Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(1A): 121.

[14] Roman RM, Lomri N, Braunstein G, et al. Evidence for multidrug resistance- 1 P- glycoprotein- dependent regulation of cellular ATP permeability [J]. *J Membr Biol*, 2001, 183(3): 165.

[15] Luker GD, Flagg TP, Sha Q, et al. *MDR1* P- glycoprotein reduces influx of substrates without affecting membrane potential [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(52): 49053.

[16] Labialle S, Gayet L, Marthinet E, et al. Transcriptional Regulation of the Human *MDR1* Gene at the Level of the Inverted *MED- 1* Promoter Region [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 973: 468.

[17] Gill PK, Gescher A, Gant TW. Regulation of *MDR1* promoter activity in human breast carcinoma cells by protein kinase C isozymes alpha and theta [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(15): 4151.

[18] Wijnholds J. Drug resistance caused by multidrug resistance- associated proteins [J]. *Novartis Found Symp*, 2002, 243: 69- 79; discussion 80- 2, 180- 5.

[19] Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, et al. Expression of multidrug resistance- related transporters in human breast carcinoma [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92(4): 452.

[20] Hegedus T, Orfi L, Seprodi A, et al. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, *MDR1* and *MRP1* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1587(2-3): 318.

[21] Avendano C, Menendez JC. Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (*MDR*) [J]. *Curr Med Chem*, 2002, 9(2): 159.

[22] Fu J, Chen Z, Cen J, Ruan C. Expression of the human multidrug resistance gene *mdr1* in leukemic cells and its application in studying P- glycoprotein antagonists [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2000, 113(3): 228.

[23] Shiraga K, Sakaguchi K, Senoh T, et al. Modulation of doxorubicin sensitivity by cyclosporine A in hepatocellular carcinoma cells and their doxorubicin- resistant sublines [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16(4): 460.