维普资讯 http://www.cqvip.com

第21卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.2
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTAE MEDICINAE CHONGQING 1996

肿瘤细胞耐药性研究进展

儿童医院外科 王 珊 综述 金先庆 审校

中图分类号 R73—361

肿瘤细胞耐药是化疗失败的主要原因，它分为内在耐药性(intrinsin drug resistance)和获得耐药性(acquired drug resistance)两种。前者在化疗前因基因突变而存在化疗耐药，难于用抗癌药物治疗，预后极差。后者在化疗过程中，肿瘤细胞接触抗癌药物后，诱发癌细胞突变成为对药物不敏感的细胞而获得耐药性。Chen等[1]报道，在5至6对数杀伤细胞的药物环境中，这种突变率估计在每细胞群占1.8×10^{-6}。

获得耐药性分两种类型，一种是原药耐药性(Primary drug resistance)，另一种是多药耐药性(Multidrug resistance, MDR)。原药耐药性是指肿瘤细胞克服某一种药物对其代谢途径的干扰而对这种药产生的耐药，特点为在结构不同、作用机理不同的药物间无交叉耐药现象发生，可能的耐药机理包括:①减少药物运输入细胞。②药物活化代谢障碍。③加快药物失活。④增强肿瘤细胞修复机制。⑤改变靶分子结构。⑥改变细胞内核酸池以抗药物代谢，使药物活性降低。⑦补救旁路激活。以上各种药物机理常发生在数次使用抗癌剂后[2]。多药耐药性是指肿瘤细胞一旦对一种抗癌药物产生耐药后，对其它结构、功能相异的抗癌药也产生的交叉耐药现象。这类抗癌药常为天然细胞毒药物例如长春新碱、阿霉素和更生霉素等。具该属性的肿瘤细胞群，称为多药耐受肿瘤细胞。MDR机理主要包括:①Mdr_1基因扩增而使其产物P—糖蛋白 (P—glycoprotein, Pgp)过度产生。有人研究认为蛋白激酶C(PKC)通过调节Mdr_1基因表达和Pgp磷酸化而在MDR发生、发展中起作用。PKC具异质性，各亚型在MDR中作用有所不同。②谷胱甘肽—S—转移酶(GSTπ)的过度表达是导致烷化剂耐药的分子机理之一[3]。因为GST是谷胱甘肽氧化还原循环中的一个组成成份，它主要参与解毒作用。在MDR中的作用可能是对脂质过氧化的产物解毒。因此MDR细胞中GSTπ水平增高可能仅仅是一系列应激诱导的基因上调的反映[4]，而并非由它直接导致MDR。③许多药物能破坏DNA单链或双链结构，耐药肿瘤细胞修复受损DNA机制增强。④拓扑异构酶是细胞增殖的重要细胞核酶类，已发现它是数种化疗药物的靶酶，DNA拓扑异构酶Ⅰα和Ⅱβ(ToPo Ⅰα、ToPoⅡβ)活性降低或含量减少，引起药物亲合力下降而耐药。⑤多药耐药相关蛋白(The multidrug resistance asso ciated protein,MRP)基因的过量表达，使分子量190000MRP含量增多。MRP属膜磷糖蛋白，与Pgp同样为"ATP"能量依赖性运输蛋白。迄今，从体外诱导的细胞系中已研究发现三种类型的MDR:①经典MDR，或Pgp介导的MDR，其特点:细胞毒药物在细胞内的蓄积减少，Pgp过度表达，除烷化剂、铂类和抗代谢药外，对其他抗肿瘤化学药物

维普资讯 http://www.cqvip.com

均耐药。②非典型MDR，其特点为：细胞毒药物在细胞内的蓄积不减少，无Pgp过度表达，ToPo II 活性下降或结构异常，对蒽环类和表鬼臼毒素类药耐药，对生物碱类药物敏感。③非Pgp介导的MDR，其特点与经典MDR相同，但无Pgp过度表达[6]。现已发现其可由MRP过度表达所致[8]。随着机理研究的深入，可能还会发现其他类型的MDR。其中最主要是Mdr_1基因的过量表达引起的经典型MDR。[1,7]，下面就此进行概述。

1 Mdr_1基因及其蛋白质产物

人类Pgp基因家族包含两种高亲源性基因，而小鼠及仓鼠Pgp基因家族包含三种基因。Victor Ling根据这些基因3′端非转译区的序列相似将不同种属的Pgp基因家族成员归类(表1)[8]。

表1 Pgp基因家族成员

种类	类型		
	I	II	III
人类	Mdr_3 *	—	Mdr_2
	Mdr_1 *	—	Mdr_3 * *
小鼠	Mdr_3	Mdr_1 *	Mdr_2 * *
仓鼠	Mgp1 *	Pgp2	Pgp3

* 基因转染显示引起MDR

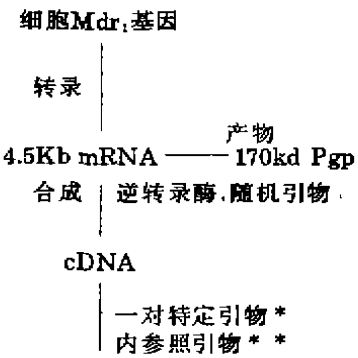
* * 基因转染显示未引起MDR

与MDR相关的Mdr_1基因位于第7号染色体长臂的q21.1带[9]，用基因克隆及核酸分析技术已揭示了Mdr_1基因全序列[10]。Roninson报道人类Mdr_1基因包含28个外显子。其所有的内含子－外显子 (intron－exon)结构很相似，Mdr_1基因转录为4.5 Kb mRNA，Mdr_1 cDNA编码分子量为170KD的Pgp。

Pgp由1280个氨基酸排列成两同源部份构成，每部份具有6个跨膜区和1个核苷酸结合位点，共有12个潜在的跨膜区和2个核苷酸结合位点[11]，其氨基酸序列和结构相似于很多膜交联运输蛋白。Pgp的结构区具能量介导和药物特异性。基因转染系统和体外诱变试验已用于研究Pgp作为药物输出泵的分子机理。Pgp cDNA序列在不同类型细胞的转染和表达均导致MDR表型产生。Igor Roninson利用人类Mdr_1基因cDNA序列转染研究，他们诱变、调节Mdr_1基因的ATP交联位点，在433或1076ATP交联位点上，以蛋氨酸残基代替赖氨酸，结果这种结构的基因产物Pgp虽然仍然能交联ATP，但表达MDR表型能力几乎完全丧失。ATP交联位点的调节，使Pgp分子结构失活。这似乎是Pgp分子两部分结构的相互作用和两部分结构都具备的功能。这些研究证实Pgp是引起MDR的分子基础[8]。

肿瘤细胞长期接触抗癌药物，Mdr_1基因被诱导扩增几十甚至上百倍，Pgp大量表达，

表2 RT－PCR反应原理图



PCR扩增该Mdr_1特异cDNA序列，30个PCR循环的每细胞扩增拷贝数反应细胞Mdr_1基因的Mdr_1 mRNA表达水平

* Mdr_1特异引物：正义链 CCATCATTGCAATAGCAGG
反义链 GTTCAAACTTCTGCTCCTCA
扩增片段长度为 157bp.

* * β_2－微球蛋白引物：正义链 ACCCCCACTGAAAAAGATGA
反义链 ATCTTCAAACCTCCATGATG
扩增片段长度为 114bp

维普资讯 http://www.cqvip.com

后者具有"药泵"功能，除结合药物分子外，同时其核苷酸结合位点连上ATP，ATP水解后释放的能量使药物转移到细胞外，使细胞内药物浓度始终维持在较低水平，肿瘤细胞由此获得耐药性。Pgp在一些正常人体细胞也有表达，例如肾上腺、肝胆小管内皮细胞、妊娠子宫、脑和睾丸毛细血管内皮细胞等[12]。因此有人认为Mdr_1基因及其产物是细胞的正常防御系统，可将进入细胞的一些有害物质排出胞外，保护细胞免遭伤害。

Mdr_3基因产物也是一种糖蛋白，其功能与耐药性无关。

2 Mdr_1基因表达及其产物的检测

2.1 逆转录－多聚酶链反应(reverse transcriptase－polymerase Chainreaction, RT－PCR)技术检测Mdr_1基因mRNA表达水平。

Noonan等[13]采用RT－PCR法，并以$\beta 2$－微球蛋白基因作为内参照，检测了正常人体组织、300多例临床肿瘤标本和肿瘤细胞株，证实此方法为RNA水平上检测基因表达的一种新型而十分有效的方法，克服了Northern blot、Slot blot等传统检测Mdr_1基因表达方法不够灵敏，不能检测出极低水平Mdr_1表达的特点，具有快速、灵敏度高、特异性强、定量、无假阴性或假阳性的优点，特别适用于极其微量样品中RNA的检测，用未经纯化的细胞质RNA同样能得到很好的结果(表2)。

某结果显示Mdr_1表达水平从高到低分别为：①正常组织依次为肾上腺、肾脏、结肠、肝脏、肺脏、食管、脾脏、胃、肌肉、膀胱、乳腺、脂肪、骨髓。②肿瘤细胞株依次为结肠癌、小细胞肺癌、类癌瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、白血病。③肿瘤组织依次为骨肉瘤、卵巢癌、软组织肉瘤、急性非淋巴细胞性白血病、成釉细胞瘤、软骨肉瘤、其它良性肿瘤。尤文氏瘤无表达。刘炳仁等[14]用RT－PCR检测25例急性血病患者骨髓细胞中Mdr_1基因的表达。发现复发和未缓解患者中Mdr_1表达增高者占90.9%，而初治患者中仅为21.4%，Mdr_1表达增高者临床观察化疗效果差。认为此检测可作为判断MDR的指标，可以检出化疗后微小残留的MDR细胞，对临床选择化疗方案和估计预后有参考价值。杨骅等[15]用RT－PCR检测以长春新碱诱导的耐药细胞K562和阿霉素诱导的耐药细胞K562及敏感细胞K562，经30个循环扩增，耐药细胞检测出Mdr_1和$\beta 2$－微球蛋白基因的扩增产物，而敏感细胞无Mdr_1基因扩增产物。结果提示，本方法可用以区分耐药和敏感细胞。可成为临床个体化疗敏感性预测的重要指标。

2.2 Pgp的检测

Chan等[16]采用免疫组化法检测儿童软组织肉瘤Pgp表达与预后关系。用Pgp特异鼠单克隆抗体C219和C494，这两种单抗特异地识别存在于细胞膜的Pgp特异抗原决定簇。C494仅对人类Mdr_1和仓鼠Pgp1的1类Pgp异构体具有基因特异性。C219识别一种极保守氨基酸序列，包括在人体种类Ⅰ和Ⅲ(Mdr_1,Mdr_3)，仓鼠种类Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ(Pgp1, Pgp2,Pgp3)和鼠种类Ⅱ和Ⅲ(Mdr_1,Mdr_2)的Pgp异构体，这种免疫组化法测肿瘤标本Pgp水平具有简便、快速、半定量、灵敏等特点。结果显示Pgp有无表达作为判断肿瘤病人耐药性、肿瘤复发的预后因子具有显著统计学意义。汤文英等[17]应用ABC免疫组织化学方法对92例肝细胞肝癌标本进行耐药基因产物Pgp检测。结果术前未治疗的76例肝细胞肝癌中，癌与癌周肝Pgp组化染色阳性率分别为60.5%与69.7%；由导向综合治疗后切除的16例标本中，其癌与癌周肝分别为31.2%与73.3%。表明导向综合治疗有助于克服

维普资讯 http://www.cqvip.com

肝细胞肝癌耐药。

3 小结

肿瘤细胞耐药机理有多种形式，各种机理间有一定联系。Mdr_1基因过量表达研究最多，从常规的Northern blot、slot blot等目前高效的RT－PCR法检测Mdr_1基因表达水平。大量实验研究证实此表达与临床化疗耐药关系确切，使临床检测化疗前、后Mdr_1基因的表达水平作为判断预后指标成为现实，结合Pgp检测，提高了判断化疗疗效、预后情况的可靠性。为克服耐药，依据抗癌药物敏感试验设计给药方案，避免耐药产生的方法已逐渐应用于临床。进一步的研究方向是调控Mdr_1基因表达[19]。目前抑制Mdr_1基因表达产物Pgp功能的药物研究较多，例如维拉帕米等[20,21]。这些药物可与化疗药物竞争Pgp位点，从而使化疗药物作用不受Pgp影响。但由于这类药物的心血管毒性及免疫抑制副作用，临床上难以获得理想抑制作用的剂量，有待于研究发掘新的副作用小的抑制Pgp功能的药物。另一方面，有人试验利用Mdr_1基因转化人骨髓细胞，使骨髓细胞对抗癌药物的耐受性增加，从而克服化疗中骨髓抑制的毒性作用。他们将携带入Mdr_1基因的逆转录病毒导入小鼠骨髓，已得到小鼠骨髓细胞Mdr_1基因稳定、选择性表达及耐受化疗药物骨髓抑制的结果[22]。利用Mdr_1基因保护正常组织，防御化疗毒副作用，增大化疗剂量的基因治疗也是克服耐药的一种方法。

参考文献

1.Chen G. et al. Cancer Res. 1994;54:4980.
2.Curt GA, et al. Cancer Treat Rep. 1984;68:87.
3.MeClean S, et al. Biochim Biophys Acta. 1992;1114:107.
4.Tew KD. Cancer Res. 1994;54:4313.
5. Nooter K, et al. Leuk Res. 1994;18:233.
6. Cole SPC, et al. Science. 1992;258:1650.
7. Johnson SW, et al. Cancer. 1993;71(2):644.
8. Rothenberg M, et al. JNCI. 1989;81:907.
9. Callen DF, et al. Hum Genet. 1987;77:142.
10 Gros P, et al. Nature. 1986;323:728.
11. Lum BL, et al. Cancer. 1993;72:3502.
12. Holzmayer TA, et al. JNCI.1992;84(19):1486.
13. Noonan KE, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990;87:7160.
14. 刘炳仁，等. 中华血液学杂志。1995;16(2):65.
15.杨骅. 等.浙江医科大学学报。1995;24(2):49.
16.Chan HSL, et al. J Clin Oncol. 1990;8(4):689.
17.汤文英、等，上海医科大学学报，1995;22(2):135。
18.Hongo T, et al. Cancer. 1990;65:1263.
19. Ido M, et al. Cancer Res. 1990;50:6554.
20. Miller TP, et al. J Clin Oncol.1991;9(1):17.
21.Kang Y, et al. Cancer Res. 1994;54:2952.
22.Podda S, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992;89:9676.

(收稿日期 1995－07－25)