

文章编号:1005-6947(2008)08-0809-03

· 文献综述 ·

肿瘤干细胞耐药机制及逆转策略

王吉明 综述 程勇 审校

(重庆医科大学附属一院 胃肠外科, 重庆 400016)

摘要: Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China **摘要:** 肿瘤干细胞可能是肿瘤细胞多药耐药的罪魁祸首,它通过高表达 ABC 转运蛋白、抗凋亡蛋白等多种机制产生多药耐药性。与之相反,通过多种策略也可以逆转肿瘤干细胞的多药耐药性,杀死更多的肿瘤细胞。笔者就肿瘤干细胞的耐药机制及其逆转策略的近年研究做一综述。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 809-811]

关键词: 肿瘤干细胞; 耐药性; ABC 转运蛋白; 综述文献

中图分类号: R 730.5

文献标识码: A

白血病和很多实体肿瘤中肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs) 的发现,为研究肿瘤的发生、发展、治疗开拓了一个新的视野。CSCs 虽然只占肿瘤细胞的一少部分,却具有无限的自我更新能力,其增殖形成与亲代完全相同的肿瘤。根据 CSCs 理论,如果治疗上不能根除 CSCs,便可能导致治疗失败,虽然杀死大多数肿瘤细胞后肿瘤体积明显缩小,但不能阻止肿瘤的复发和远处转移^[1]。目前, CSCs 来源有两种假设:一为正常干细胞经过突变的积累或分化障碍形成 CSCs;另一为已经开始分化的原始细胞或分化细胞去分化形成 CSCs^[2]。研究显示, CSCs 和正常干细胞一样可通过多种机制产生多药耐药 (multidrug resistance, MDR)^[3]。CSCs 可能是化疗后肿瘤不能根除复发的罪魁祸首,逆转肿瘤耐药是今后肿瘤治疗的重要方向。本文仅就 CSCs 的耐药机制及其对策作一综述。

1 CSCs 的多药耐药性

CSCs 对作用于其本身的药物产生耐药性为原药耐药 (primary resistance, PDR),并且对其他多种结构和作用机制迥异的抗癌药物产生交叉耐药称为 MDR。根据肿瘤细胞形成 MDR 的机制,亦可将 MDR 分为两种:一为先天性耐药 (natural resistance), CSCs 一般处于静止期,具有 DNA 自我修复能力和 APC 转运蛋白而获得的与生俱来的耐药性;二为获得性耐药 (acquired resistance),长期暴露于辐射和/或致癌物后, CSCs 与它相近的子代细胞可通过与正常干细胞积累突变的同样机制 (点突变、基因激活、基因扩增) 等出现新的耐药性^[2]。CSCs 与它相近的子代细胞亦可在许多化疗后肿瘤复发的患者体内增殖形成 MDR 细胞群。

2 CSCs 耐药的机制

2.1 CSCs 处于 G0 期

细胞周期 (时相) 特异性药物 (cell cycle specific agents, CCSA) 是仅对增殖周期的某些时相敏感而对 G0 期细胞不敏感的药物,如抗代谢类药物氟尿嘧啶,作用于 S 期的阿糖胞苷、羟基脲,作用于 M 期的长春新碱。CSCs 如经常处于静止期,很少进行分裂增殖,则对很多抗肿瘤药物不敏感。体内功能测定结果显示,约 96% 的白血病患者白血病干细胞 (leukemic stem cells, LSC) 处于 G0

期;这也是造成白血病对标准化疗方案效果差的一个重要原因。

2.2 ABC 转运蛋白的药泵作用

ABC 转运蛋白是一类跨膜蛋白,在体内分布广泛,可转运肽类、内源性脂质、核苷酸、代谢性药物、酶素等。目前与耐药有关的 ABC 转运蛋白主要有 P-糖蛋白 (P-gp/ABCB1)、多药耐药相关蛋白 (MRP/ABCC1)、乳腺癌耐药蛋白 (BCRP/ABCG2), 分别有 ABCB1, ABCC1 和 ABCG2 基因编码。

ABCB1 (MDR1) 基因,位于人类 7 号染色体长臂 2 区 1 带 1 亚带 (7q-21.1),全长 330 kb^[4]。P-gp 相对分子质量为 170 000,含有 1 280 个氨基酸,由 2 个单一多肽链相连接的相似部分组成,每部分包括 6 个跨膜螺旋区和 1 个 ATP 结合域。三维结构分析表明,当转运蛋白的底物如抗肿瘤药与跨膜结构域结合后,药泵的 2 个 ATP 结合位点靠近并与 ATP 结合, P-gp 构象发生变化,在其中部形成通道,可使中性或阳离子疏水性药物直接通过并排出细胞外^[5]。MRP 亚家族的基本结构与 P-gp 类似,其特异性的转运底物是胞内与还原型谷胱甘肽 (GSH) 共轭结合的化疗药物,如依托泊苷、柔红霉素、顺铂、米托蒽醌等^[6];因其可将这些底物泵出细胞外,故又称为“GS-X 泵”^[7]。BCRP 是一种磷酸化蛋白,属于半转运蛋白,仅有 6 个 α 螺旋和 1 个 ATP 结合位点,多在细胞膜上以同源二聚

收稿日期:2008-02-21;

修订日期:2008-04-10。

作者简介: 王吉明,男,重庆医科大学附一院硕士研究生,主要从事胃肠肿瘤基础与临床方面的研究。

通讯作者: 程勇 E-mail: chengyongcq@yahoo.com.cn

体的形式发挥作用^[8]。

Al-Hajj M 等^[9]发现, CD34-CD38 + 白血病患者对柔红霉素的敏感性明显强于 CD34 + CD38-肿瘤细胞, 白血病患者 LSC 对阿糖胞苷的抵抗力强于其他白血病患者, 这些现象都暗示 LSC 可能存在多种 ABC 转运蛋白。尔后, De Jonge-Peeters SD 等^[10]在急性髓性白血病 (AML) 中证实, LSC 可高表达多种 ABC 转运蛋白, 这与临床上 AML 治疗效果不佳有关。此外, 侧群细胞 (SP) 指的是通过流式细胞仪分离出的能把 Hoechst33342 排出细胞外的细胞。虽然它们只占整个细胞群的一小部分, 但其具有 CSCs 样的性质, 可能富集 CSCs, 可高水平表达许多 ABC 转运蛋白家族成员, 如 MDR1 和 BCRP, 这与侧群细胞的耐药性有关^[11]。很多证据显示, CD133 是恶性胶质瘤和 LSC 亚群的标记物; 恶性胶质瘤 CD133 + 细胞对化疗有很强的耐药性, 可能归因于它们可高表达 BCRP1 和 O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT), 也高表达抗凋亡蛋白和凋亡蛋白抑制物的缘故^[12]。

2.3 凋亡抑制

诱导细胞凋亡是众多化疗药物杀伤肿瘤细胞的共同机制^[13]; 如果凋亡受到抑制可能导致肿瘤细胞耐药。研究表明, 参与细胞凋亡的, 如 Bcl-2 基因、核转录因子 κB (NF- κB)、突变 p53 基因及 c-myc 基因等都参与了肿瘤细胞耐药。

哺乳动物细胞中 Bcl-2 基因家族至少有 15 个成员, 按其凋亡的调节功能可分为抑制凋亡基因 (如 bcl-2, bcl-x, bcl-w, Mcl-1, AL/Bfl-1 等) 和促进凋亡基因 (bax, bcl-xS, Bad, Bak, Bid 等)。Bcl-2 基因家族即能抑制又能促进细胞凋亡, 其生物效应取决于该成员间的相互作用。Eisele 等^[14]将阿糖胞苷和蒽环类抗生素治疗 14 例 AML 患者发现 7 例完全缓解 (CR), 7 例病情持续 (BP)。通过基因鉴定, 发现 CR 组与 BP 组的凋亡相关指标 (BAX, BCL2A1, BNIP3L 等) 差异有统计学意义; 并发现 CD34 + 细胞在 CR 组两倍于 BP 组。说明 LSC 细胞可能通过高表达抑制凋亡基因、低表达促进凋亡基因而产生耐药, 抵抗化疗。

2.4 DNA 修复能力增强

DNA 是很多抗癌药物的靶点, 如烷化剂和铂类化合物。当肿瘤细胞

DNA 受损时, 直接影响其复制和转录功能, 严重时引起细胞死亡。但肿瘤细胞内存在抗 DNA 损伤修复机制, 主要由核酸内切酶、DNA 聚合酶、DNA 连接酶等参与完成。当肿瘤细胞中这些酶蛋白合成增加时, DNA 修复机制加强。DNA 修复增强的可能机制还包括: DNA 错配修复 (MMR)、核苷酸切除修复、O6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 修复等^[15]。肿瘤细胞高效率的 DNA 修复是化疗和放疗抵抗的重要机制。目前发现, 与人类 DNA 修复有关的基因已发现多达 130 个。因此, DNA 修复有关的酶活性增高, DNA 损伤修复能力的增强, 可能也是肿瘤干细胞对化疗药物产生抗性的一个重要原因。

3 CSCs 耐药的处理对策

3.1 诱导分化

CSCs 可能起源于正常干细胞的异常突变, 而肿瘤又起源于 CSCs 的自我更新和分化。干细胞的异常突变可能与所处的微环境 (niche) 有关。那么也许可能通过设法改变微环境从而诱导 CSCs 向正常细胞分化。Jin 等^[16]报道, 针对黏附分子 CD44 + 的单克隆抗体可显著减少人 AML 小鼠模型体内白血病患者细胞的增殖, 其可能机制是通过改变维持干细胞特性的微环境而诱导 LSC 分化; 也可以通过药物或细胞因子等促使 CSCs 分化, 然后加用增殖期化疗药物杀死肿瘤细胞。临床上治疗急性早幼粒白血病, 先用维甲类化合物诱导 LSC 分化, 然后进一步化疗。另外, Altundag 等^[17]在治疗乳腺癌时, 发现粒细胞集落刺激因子不但能刺激造血干细胞 (HSC), 还可以诱导乳腺 CSCs, 促使其进入细胞周期, 提高乳腺 CSCs 对化疗药物的敏感性。

3.2 ABC 转运蛋白抑制剂

临床研究试图通过 ABC 转运蛋白抑制剂联合化疗药物克服 CSCs 的耐药性, 消灭大多数耐药的 CSCs。但事实证明 ABCB1 抑制剂并非那么完美, 临床实验效果甚微。这可能由以下原因造成: (1) ABCB1 抑制剂与其他化疗药物相互作用影响了其药动学。(2) 所试验的 ABC 抑制剂有可能并不能有效地杀伤 CSCs。(3) 目前临床判断 ABC 抑制剂有效率的标准是肿瘤体积缩小多少。但因 ABC 抑制剂主要针对肿瘤细胞群体中为数极少的那部分干细胞而不能

立即缩小肿瘤的体积。因此宜用某些指标, 诸如肿瘤复发的频率和时间判断这类药物是否有效。(4) 肿瘤细胞表达其余的转运体, 如 ABCG1 及 ABCG2。故认为, 开发新的针对 CSCs 且无毒副作用疗效高的 ABC 转运蛋白抑制剂应得到重视。zosuquidar trihydrochloride (LY335979) 是一种 P-gp 高度特异性的抑制剂, 但其并非 P-gp 的底物, 在体外每个细胞培养系统中, 只需 50 ~ 100 nmol zosuquidar 浓聚物即能防止 P-gp 介导的耐药性。更为重要的是在用鼠和犬做的初步临床试验证明, LY335979 对同时服用的 P-gp 底物 (阿霉素、紫杉醇) 未观察到明显药物代谢动力学影响^[18]。I 期临床研究表明, LY335979 也能够增加长春瑞滨 (vinorelbine) 对高度恶性肿瘤的敏感性, 并且一定程度上减轻该药的体内清除^[19]。tariquidar (XR9576) 是邻氨基甲酸的新型衍生物, 也是目前被认为很有希望的治疗肿瘤的非竞争性 P-gp 抑制剂; 它能阻止底物的结合和/或 ATP 的水解从而抑制 P-gp 的 ATP 酶的活性^[20]。众多实体肿瘤内试验亦表明, XR9576 能显著增加阿霉素、长春新碱及紫杉醇等药物对肿瘤细胞的杀伤作用, 一定程度上逆转了肿瘤细胞的耐药性, 而且不影响这些药物的药代动力学^[21]。这两种药物将有可能更好地用于协助化疗药物杀死 CSCs。

值得注意的是, ABC 转运蛋白有着非常重要的生理功能, 在血脑屏障, 睾丸及胎盘中高度表达以保护重要的细胞不受血液中毒性物质的影响; 而正常干细胞同样也表达具有自我保护功能的 ABC 转运蛋白。因此, ABC 蛋白转运抑制剂是把“双刃剑”, 可能需要很好的针对靶靶的运载系统才能特异地杀伤 CSCs 而避免对正常干细胞的毒害。

3.3 促进凋亡

目前已有针对 CSCs 进行肿瘤治疗的研究。MG132 是一种蛋白酶抑制剂。Guzman 等^[22]将 MG132 和蒽环类抗生素去甲柔红霉素合用治疗 AML; 体内体外实验表明二者具有协同作用, 能迅速而广泛地诱导 LSC 凋亡而对正常的造血干细胞无影响。其机制可能是 MG132 阻止 NF- κB 负性调节蛋白 I κB 降解, 结果诱导 NF- κB 下调, 导致 LSC 大面积凋亡。此外, 部分 p53 基因和 p53 介导的基因

表达上调也在一定程度上参与 LSC 的凋亡过程。有研究利用突变型 p53 基因的反义基因或向细胞内导入野生型 p53 基因逆转肿瘤 MDR 并取得一定的效果^[23]。

3.4 抗 ABC 转运蛋白抗体

针对 ABCG2 或其他干细胞标志物的抗体有助于杀死 CSCs, 这些抗体可以帮助运送毒素或放射性同位素^[2]。研究证明, 用抗 P-gp 抗体及抗 MRP 抗体逆转肿瘤 MDR 有肯定作用。它们针对癌细胞表面抗原, 可以避开 ABC 转运蛋白外排作用而克服耐药性, 并且结合其他化疗有增加疗效的作用。机体内针对 P-gp 的自身抗体也可能发挥逆转肿瘤耐药的作用。研究发现, 将人工合成的 P-gp 源性多肽注射入小鼠体内, 第 3 次免疫激发后 IgG1 型抗体成为主要效应抗体, 小鼠未出现自身免疫症状或免疫毒性, 处理后的小鼠增加了阿霉素和长春碱对 P388R 耐药细胞的杀伤作用, 小鼠血清亦能在体外降低耐药细胞对阿霉素和长春新碱的抵抗^[24]。

总之, CSCs 的耐药是由多种因素引起的, 克服 CSCs 的耐药也具有多种策略。每种实体肿瘤的干细胞的耐药机制不同, 因此对它们的耐药治疗策略也应有所区别。在对肿瘤患者进行化疗时, 应具体研究每种肿瘤的干细胞的耐药机制, 并发现新的与肿瘤耐药有关的因素, 采取有效的治疗措施, 以期增加化疗效果, 提高患者生活质量, 延长其生存时间。

参考文献:

[1] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts [J]. *Annu Rev Med*, 2007, 58(1): 267 - 284.

[2] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(4): 275 - 284.

[3] Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1357 - 1360.

[4] Takara K, Sakaeda T, Okumura K. An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(3): 273 - 286.

[5] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 48 - 58.

[6] Morrow CS, Pecklak-Scott C, Bishwokarma B, et al. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69(4): 1499 - 1505.

[7] Van Zanden JJ, Geraets L, Wortelboer HM, et al. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(8): 1607 - 1617.

[8] Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(1): 3 - 29.

[9] Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, et al. Therapeutic implication of cancer stem cells [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, 14(1): 43 - 47.

[10] De Jonge-Peters SD, Kuiper F, De Vries EG, et al. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 62(3): 214 - 226.

[11] Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(19): 3701 - 3710.

[12] Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133 + cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5(1): 67.

[13] Kuo PL, Hsu YL, Kuo YC, et al. The anti-proliferative inhibition of ellipticine in human breast mda-mb-231 cancer cells is through cell cycle arrest and apoptosis induction [J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(7): 789 - 795.

[14] Eisele L, Klein-Hitpass L, Chatzimanolis N, et al. Differential expression of drug-resistance-related genes between sensitive and resistant blasts in acute myeloid leukemia [J]. *Acta Haematol*, 2007, 117(1): 8 - 15.

[15] Karran P. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs

[J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(12): 1931 - 1937.

[16] Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells [J]. *Nat Med*, 2006, 12(10): 1167 - 1174.

[17] Altundag K, Altundag O, Elkiran ET, et al. Addition of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) to adjuvant treatment may increase survival in patients with operable breast cancer cells: interaction of G-CSF with dormant micrometastatic breast cancer cells [J]. *Med Hypotheses*, 2004, 63(1): 56 - 58.

[18] Sandler A, Gordon M, De Alwis DP, et al. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(10): 3265 - 3272.

[19] Lê LH, Moore MJ, Siu LL, et al. Phase I study of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar administered in combination with vinorelbine in patients with advanced solid tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56(2): 154 - 160.

[20] Fox E, Bates SE. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007, 7(4): 447 - 459.

[21] Di Nicolantonio F, Knight LA, Glaysher S, et al. Ex vivo reversal chemo-resistance by tariquidar (XR9576) [J]. *Anticancer Drugs*, 2004, 15(9): 861 - 869.

[22] Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, et al. Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(25): 16220 - 16225.

[23] Ikeda K, Sakai K, Yamamoto R, et al. Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13(6): 776 - 784.

[24] Madoulet C, Perrin L, Tosi PF, et al. Anti-tumor immunotherapy against multidrug resistance [J]. *Ann Pharm Fr*, 2006, 64(2): 87 - 96.