

去除培养液及细胞内 ATP, 转染细胞内的药物积聚又恢复至亲代敏感细胞水平<sup>[23]</sup>, 提示 Pgp 介导的药物转运有 ATP 参与。用纯化 MDR 细胞株的膜成分进行药物聚积试验进一步证明了 Pgp 对 ATP 的依赖性; ATP 类似物 AMP-DNP 能竞争性抑制药物转运; ATPase 抑制剂 Vanadate 非竞争性抑制药物转运<sup>[24]</sup>; ATP 类似物能与 Pgp 结合<sup>[25]</sup>; 纯化的 Pgp 具有 ATPase 活性<sup>[26]</sup>。Pgp 上的两个 ATP 结合位点具有协同作用, ATP 结合位点和 ATP 结合是 Pgp 介导药物外运的必要条件。用 ATP 结合位点突变的 Pgp cDNA 克隆转染药物敏感细胞, 单位点和两位点突变均不能赋予敏感细胞 MDR 表型<sup>[13]</sup>。

Pgp 介导的药物转运的详尽机理目前尚不太清楚。从已获得的资料来看, 转运的药物可能与 Pgp 分子上特定的位点直接结合。秋水仙碱诱导的 MDR KB 细胞突变株的序列分析, 初步确定了 Pgp 分子上的一个药物结合位点<sup>[27]</sup>。野生型细胞及长春新碱 (VCR) 诱导的 MDR KB 细胞株的 Pgp 分子的 N 段第 185 位为甘氨酸, 秋水仙碱诱导的突变株则为缬氨酸。用突变细胞的 Pgp cDNA 转染敏感细胞, 转染细胞的交叉耐药表型发生变化, 对秋水仙碱、VP 16 及阿霉素抗药性增强, 而对 VCR、长春花碱 (VLB) 及放线菌素 D 的耐药性下降。这一发现提示 Pgp N 段第 185 位氨基酸残基可能参与药物结合位点的构成。MDR 细胞突变株的研究将有助于新药物结合位点的发现。

Pgp 分子还能与化疗药物的衍生物及 MDR 逆转剂结合。长春碱酰胺和 Pgp 的结合能被某些化疗药物及逆转剂如柔红霉素、VCR、异博停、利血平、奎宁丁等抑制<sup>[28]</sup>。同样, 某些化疗药物也能抑制异博停等逆转剂和 Pgp 的结合<sup>[29]</sup>。化疗药物和 MDR 逆转剂相互抑制与 Pgp 结合的现象, 提示它们可能竞争性地和 Pgp 上的同一位点结合。逆转剂和药物竞争 Pgp 上的结合位点, 降低 MDR 细胞药物外逸的速度, 增加细胞内药物的累积, 可能使

逆转剂恢复 MDR 细胞对药物的敏感性。

体外诱导的 MDR 细胞株的研究发现, 用不同药物诱导同一亲代细胞所建立的 MDR 细胞株的交叉耐药表型不同<sup>[21]</sup>, 对诱导药物优先产生耐药性。MDR 细胞交叉耐药特征的多样性可能和以下因素有关: (1) 药物对基因表达的诱导作用: 人有一类 Pgp 基因和 MDR 有关, 啮齿类动物有两类 Pgp 基因和 MDR 有关。每类 Pgp 基因又分若干亚类。不同药物可能诱导不同类或亚类的 Pgp 基因表达, 赋予细胞不同的交叉耐药表型<sup>[29]</sup>。(2) Pgp 基因侧翼序列的扩增; MDR 细胞株的 Pgp 基因的扩增常有侧翼序列的扩增<sup>[31,32]</sup>, 不同细胞株伴随扩增的侧翼序列长度不同。这些不同的侧翼扩增序列也可能影响 MDR 细胞的耐药表型。(3) Pgp 翻译后修饰: 用同一 Pgp cDNA 转染不同的药物敏感细胞株, 所获得的 MDR 细胞株的交叉耐药性表型不同<sup>[33,34]</sup>, 提示有其它蛋白质或 Pgp 翻译后修饰参与调节交叉耐药特性的表达。最近发现 Pgp 分子上的丝氨酸及苏氨酸残基有磷酸化现象<sup>[35]</sup>, 推测 Pgp 的磷酸化程度可能和 MDR 细胞交叉耐药表型有关。但是, Pgp 分子的糖基化不影响 MDR 细胞表型的表达, MDR 细胞的糖基化缺失突变株与亲代糖基化细胞株的 MDR 表型无明显差异<sup>[36]</sup>。

### 三、Pgp 在正常组织及肿瘤中的表达

随着 Pgp 的细胞和分子生物学研究的进展, 特异性抗体和核酸探针已用于 Pgp 基因在正常组织的表达的研究。结果显示 Pgp 表达具有组织特异性, 在肠、肝、肾、肾上腺皮质、孕子宫及某些骨骼肌中表达最强<sup>[37-39]</sup>。用免疫组织化学染色发现, Pgp 位于大、小肠粘膜细胞、胆、胰管细胞和肾近曲小管细胞的腔面以及肝细胞的微胆管面<sup>[40]</sup>。Pgp 在这些组织中的生理功能尚不清楚, 其管腔面的分布特征提示 Pgp 可能参与这些组织的分泌和毒物排泄功能<sup>[17]</sup>。肾上腺皮质细胞的 Pgp 可能参与

皮质类固醇的分泌转运<sup>[43]</sup>。大鼠肝部分切除后残留的再生肝细胞,化学致癌剂诱导的太鼠肝的癌前结节及癌性结节中,其 Pgp 的水平升高,提示 Pgp 表达可能是机体细胞对毒物及代谢压力的特异性反应所致<sup>[41,42]</sup>。由此可见,在正常组织中 Pgp 可能作为一个广谱特异性转运分子(broad-specific transport molecule),参与机体的内、外分泌功能及内外源性毒物的清除<sup>[17]</sup>,与在 MDR 细胞介导药物外逸功能一致。

用特异性基因探针分析不同类的 Pgp 在组织中的分布,每种组织常表达多种 Pgp。I 类 Pgp 在肠道表达水平最高,心、脑及肾脏次之;II 类在小鼠妊娠子宫及肾上腺水平最高,心、肾次之;III 类 Pgp 在肝、肾上腺、脾、心及少许骨骼肌呈中等水平表达。用基因特异性单克隆抗体进行免疫组化定位观察到, I 类 Pgp 主要分布于大肠上皮细胞的腔面; II 类 Pgp 主要分布于肾上腺皮质细胞,少量骨骼肌细胞表达 III 类 Pgp<sup>[43]</sup>。不同类 Pgp 的组织分布特异性的生理意义尚不清楚。

Pgp 的研究最初限于体外细胞系及动物组织和肿瘤,人类肿瘤与 Pgp 的关系如何呢?用 RNA 原位及斑点杂交,免疫组织化学及 PCR 技术研究 Pgp 在人类肿瘤中的表达证明,人类癌、肉瘤、淋巴瘤和白血病等各种肿瘤的 Pgp 表达水平均升高<sup>[44]</sup>。在某些肿瘤化疗后其表达水平往往高于化疗前,提示肿瘤细胞在化疗过程中有可能获得 MDR 表型。有研究报道,肿瘤中 Pgp 的存在与否和肿瘤的化疗反应相关<sup>[45]</sup>,但肿瘤细胞 Pgp 过度表达的临床意义及其 Pgp 表达水平能否作为肿瘤对化疗反应性的指标,有待于进一步探讨。

某些 Pgp 表达水平较高的组织如肝、肾、肾上腺及肠来源的肿瘤,常对化疗药物表现天然耐受,其细胞表面的 Pgp 水平较高<sup>[39]</sup>。未经药物诱导的肾癌细胞株具有 MDR 表型,并能被奎宁丁、异博停逆转。对某些药物抗药性的细胞,其 MDR 表型可能和细胞表面固有的

较高水平的 Pgp 表达有关。

#### 四、临床应用前景

大量资料表明,从体外培养细胞获得 MDR 表型是由于 Pgp 过度表达所致,这可能与人类肿瘤的化疗反应有关。抑制 Pgp 基因扩增,转录及转录后的表达,阻止药物和 Pgp 结合及抑制 Pgp 分子 ATPase 活性等均有可能使 MDR 表型逆转。某些药物奎宁丁、异博停等能抑制药物和 Pgp 结合,体外实验提示:这些药物在一定浓度下能逆转体外培养细胞株的 MDR 表型。临床上业已开始探讨 MDR 逆转药物剂量以提高化疗效果的可能性,初步结果令人鼓舞。用异博停和化疗药物联合应用,治疗联合化疗失败的多发性骨髓瘤,明显提高骨髓瘤的反应性。这可能是由于化疗药物的长期应用,诱导 Pgp 高度表达肿瘤细胞获得 MDR 表型。异博停竞争性地抑制药物和 Pgp 结合,减少细胞内药物的外流,从而提高肿瘤对药物的反应性。低毒、高效 Pgp 与化疗药物结合抑制剂的选择,能更有效地促进癌细胞内化疗药物的积聚,提高化疗药物的杀伤作用。MDR 逆转剂和化疗药物的联合应用为提高肿瘤化疗效果展示了广阔的前景。

#### 摘 要

近年来,肿瘤细胞 MDR 机制的研究取得了令人鼓舞的成就,Pgp 的发现是 MDR 研究的重大进展。业已阐明,Pgp 是耐药基因 *mdr* 产物,分子量为 170 KD。Pgp 分 3 类, I 类及 II 类与 MDR 表型有关, III 类与 MDR 无关。Pgp 分子有药物结合位点及 ATP 结合位点并具有 ATPase 活性。ATP 降解与药物的转运偶联。Pgp 可能起外逸泵作用,把药物主动排出 MDR 细胞外。另外,Pgp 与细胞及其他真核生物的转运蛋白具有高度同源性,可能属于转运蛋白家族,参与机体分泌功能及清除内外源性有毒物质,构成机体广谱特异性转运系统。但是关于 Pgp 的生理功能、转运机制、Pgp 表

达调节机制与 Pgp 结合专一性等问题有待于深入探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Yanovich S et al., 1989, *Cancer Res.*, 49: 4499.
- [2] Bech-Hanson NT et al., 1976, *J Cell Physiol.*, 88:23.
- [3] Ling V et al., 1973, *J Cell Physiol.*, 83: 103.
- [4] Sirootnak FM et al., 1986, *J Cell Physiol.*, 126: 226.
- [5] Inaba M et al., 1979, *Cancer Res.*, 39: 2200.
- [6] Fairchild CR et al., 1987, *Cancer Res.*, 47: 5241.
- [7] Scotto KW et al., 1985, *Science*, 232: 751.
- [8] Capranico G et al., 1989, *Br J Cancer*, 59: 682.
- [9] Gros PJ et al., 1986, *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 337.
- [10] Gros PY et al., 1986, *Nature*, 323: 728.
- [11] Ng WF et al., 1989, *Mol Cell Biol.*, 9: 1224.
- [12] Groop JM et al., 1988, *J Clin Invest.*, 81: 1303.
- [13] Rothenburg M & Ling V., 1989, *J Natl Cancer Inst.*, 81: 907.
- [14] Mcgrath JP & Varshavsky A., 1989, *Nature*, 340:400.
- [15] Foote SJ et al., 1989, *Cell*, 57:927.
- [16] Scripture JB et al., 1987, *J Mol Biol.*, 197: 37.
- [17] Juranka PF et al., 1989, *The FASEB J.*, 3: 2583.
- [18] Gros JP et al., 1986, *Cell*, 47: 381.
- [19] Higgins G et al. 1986, *Nature*, 323:448
- [20] Gerlach H et al., 1986, *Nature*, 324:485.
- [21] Riordan JR et al., 1985, *Pharmacol Ther.*, 28: 51.
- [22] Gerlach H et al., 1986, *Cancer Surv.*, 5: 25.
- [23] Hammond JR et al., 1989, *Cancer Res.*, 49: 3867.
- [24] Horio M et al., 1988, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 85: 3580.
- [25] Cornwell MM et al., 1987, *The FASEB J.*, 1: 25.
- [26] Karther N et al., 1985, *Nature*, 316:820.
- [27] Choi K et al., 1988, *Cell*, 53: 519.
- [28] Gottesman MM & Passan I., 1988, *Trends Pharmacol Sci.*, 9: 54.
- [29] Hsu SH et al., 1989, *J Biol Chem.*, 264: 12053.
- [30] Safa AR et al., 1988, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 85: 7187.
- [31] Van Der Bliek AM et al., 1986, *Mol Cell Biol.*, 6: 1671.
- [32] De Bruijn MHL et al., 1986, *Mol Cell Biol.*, 6: 4717.
- [33] Gild B et al., 1988, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 85: 1595.
- [34] Ueda K et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 3004.
- [35] Endicott JA et al., 1989, *Annul Rev Biochem.*, 58: 237.
- [36] Ling V et al., 1983, *Cancer Treat Rep.*, 67: 869.
- [37] Bass F & Borst P., 1988, *FEBS Lett.*, 229: 329.
- [38] Groop JM et al., 1989, *Mol Cell Biol.*, 9: 1346.
- [39] Fojo AT et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 256.
- [40] Thiebault F et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 7735.
- [41] Georges E et al., 1990, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 87: 152.
- [42] Thorgeirsson SS et al., 1987, *Science*, 236: 1120.
- [43] Fairchild CR et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 7701.
- [44] Goldstein ZJ et al., 1989, *J Natl Cancer Inst.*, 81: 116.
- [45] Chan HSL et al., 1989, *Proc Am Assoc Cancer Res.*, 30: 510.

本刊代号 4-296, 国内发行, 欢迎读者就近向所在地邮局办理订阅。