

氯乙基亚硝基脲耐药机制及其抑制剂的研究进展*

薛清翠, 钟儒刚

(北京工业大学生命科学与生物工程学院, 100022)

[摘要] 氯乙基亚硝基脲(CENUs)类化疗药物在治疗白血病和各种实体肿瘤方面有一定的疗效。然而,肿瘤细胞对CENUs的耐药性限制了药物的临床效果,是临床所面临的重要问题。耐药抑制剂能够增强肿瘤细胞对CENUs的敏感性,提高药物疗效,对改善化疗效果有着重要的意义。

[关键词] 氯乙基亚硝基脲;耐药机制;耐药抑制剂

[中图分类号] R979.11

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)09-1050-03

氯乙基亚硝基脲(CENUs)化疗药物是一类作用很强的烷化剂,也是少数能够通过血-脑脊液屏障的抗癌药物之一^[1]。目前具有代表性的CENUs临床药物主要有卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、司莫司汀(Me-CCNU)、福莫司汀(FM)、尼莫司汀(ACNU)等。这些药物在治疗白血病和各种实体肿瘤,包括脑瘤、恶性黑色素瘤。恶性淋巴瘤时有较好的疗效^[2]。

在生理条件下,CENUs水解产生亲电子基团,如氯乙基和羟乙基正离子,这些具有反应活性的中间体能够导致DNA碱基不同位点的烷基化。研究表明CENUs与小牛胸腺DNA作用后的烷化产物主要包括N⁷-氯乙基鸟嘌呤、N¹-羟乙基鸟嘌呤、O⁶-氯乙基鸟嘌呤等烷化单加合物以及二元股间加合物dG-dC和dG-dG,其中最值得关注的是鸟嘌呤O⁶位^[3]。O⁶-氯乙基鸟嘌呤经过分子内重排形成N¹,O⁶乙醇基鸟嘌呤,环化的C-O键发生断裂,与DNA另一条互补单链上胞嘧啶N³位发生反应,导致N³C-N¹G二元股间加合物的形成^[4]。DNA股间交联能够干扰DNA的复制与转录,并可能导致基因的移码突变,因此,大多数研究者认为股间交联的形成是抗癌的决定性因素。尽管CENUs在一定程度上改善了患者的预后,然而耐药性的产生限制了药物的临床效果,成为化疗过程中最常见和最难克服的问题之一。耐药抑制剂与CENUs的联合使用能够增强肿瘤细胞对药物的敏感性,使肿瘤的耐药性发生逆转,在改善化疗效果方面有着重要的意义。

1 CENUs的耐药机制

肿瘤细胞对CENUs的耐药过程是多种因素参与的结果,当前人们最为关注的是O⁶-烷化鸟嘌呤-DNA-烷化转移酶(mgMT)与化疗关系的研究。此外,谷胱甘肽相关酶,DNA自身修复机制以及p53蛋白也在耐药过程中发挥着重要的调节作用。

1.1 mgMT的修复作用 对CENUs产生耐药作用有重要贡献的是mgMT,该酶由mgMT基因所编码。mgMT是一种关键的DNA修复蛋白,其生理学作用是保护细胞免受环境致癌物的突变作用,表现为一种自杀性酶。与其他修复蛋白有两点不同之处:①mgMT是唯一在修复过程中自我失活的蛋白;②mgMT

在修复过程中单独发生作用,而不依赖有序的细胞修复途径^[5,6]。mgMT能够将O⁶-位致突变和具有细胞毒性的氯乙基以及其他DNA烷化加合物的烷基基团转移到自身145位的半胱氨酸残基上,导致蛋白质的失活并迅速降解,DNA则恢复初始状态,阻碍了致死性的股间交联的形成。通常,含有高水平mgMT的肿瘤(Mer⁺)能够耐受CENUs,而含有较低水平mgMT的肿瘤即mgMT表型缺陷细胞(Mer⁻)对CENUs非常敏感。人类肿瘤细胞系中约有25%为Mer⁻,是由于细胞中编码该蛋白的mgMT mRNA水平严重减少而造成的。

BODELL^[7]研究发现,3种小鼠神经胶质瘤细胞系9L、9L-2、BTRC-19经CENUs处理后生成的DNA烷化加合物水平有所差异,与9L细胞比较,N¹-羟乙基鸟嘌呤和dG-dG在9L-2细胞中略有下降,但在BTRC-19细胞中显著减少。分析表明,N¹-羟乙基鸟嘌呤的减少是由于其前体O⁶-氯乙基鸟嘌呤被mgMT修复所致。另外,WU等^[8]通过MTS试验、^[3H]胸腺嘧啶结合试验、克隆形成试验等方法发现肺细胞中mgMT高水平表达引起BCNU毒性的减少,mgMT对细胞免受BCNU毒性有重要的保护作用。

1.2 谷胱甘肽相关酶所介导的耐药 细胞内在机制如谷胱甘肽所介导的BCNU解毒作用也是非常重要的。一些研究表明,GSH能够降低BCNU等亚硝基脲化合物的敏感性,谷胱甘肽-S-转移酶(π (GST π))参与了催化亚硝基脲的脱毒过程,肿瘤细胞系中GST π 的表达与CENUs的耐药过程高度相关。ANDA等^[9]采用免疫组织化学的方法检测了18种胶质胚胎细胞瘤中mgMT和GST π 的表达,同时与经ACNU化疗后患者的存活率进行了比较,与早期文献报道的有所不同,结果表明GST π 的表达并不是一个预后指标,其表达与患者存活率无明显的相关性。GST π 在CENUs耐药过程中的作用有待于进一步的研究和探讨。

与谷胱甘肽相关的另一种酶是一氧化氮合酶(NOS2),C6胶质神经瘤细胞中过度表达可诱导的NOS2对BCNU和CENU衍生物所导致的氨甲酰化作用也表现出化学耐药。NOS2的这种效果是通过S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)所介导的。GSNO来自于NO和谷胱甘肽的相互作用,是一种有效的抗氧化剂,对保护神经胶质瘤细胞免受BCNU毒性有较好的效果^[10]。

1.3 DNA自身修复机制的保护作用 DNA自身修复与耐药过程密切相关,这些修复机制主要包括:碱基切除修复(BER),核

[收稿日期] 2006-10-24

[基金项目] *北京市高校人才强教计划资助项目(基金编号:ILES-5351)。

[作者简介] 薛清翠(1982-),女,黑龙江萝北人,硕士,研究方向:生物化学。电话:010-67391667,E-mail:lifesci@bjut.edu.cn。

苷酸切除修复 (NER) 和 DNA 错配修复 (MMR) 机制^[11]。

BER 机制发挥作用是一系列酶促反应的结果,最重要的是烷化腺嘌呤 DNA 糖基酶。在细菌中该酶能够识别并切除错配碱基,但在人体内可能需要另外一种激活因子的激活或是经历其他某种机制而不是直接的糖基化对细胞提供保护^[12]。研究发现载体介导的 FPG 和 hOGG1 基因转移到人的肺细胞中,导致 N⁷ 烷化鸟嘌呤咪唑环的断裂,启动了 BER 过程, DNA 修复蛋白得以稳定表达,这种表达明显减弱了 BCNU 所导致的 DNA 损伤和细胞毒性^[13]。

CHEN 等^[14] 在研究人肿瘤细胞系紫外光敏感性和 BCNU 细胞毒性的关系中发现,NER 也是 mgMT 介导 CENUs 耐药的重要调节因素,尤其是在高度耐药的细胞系中。NER 系统能够修复 N 位点和 O 位点烷化加合物的损伤,也能够识别和修复 mgMT 所不能修复的 DNA 股间交联,因此,一旦 DNA 股间交联形成,NER 可能会启动修复机制而对细胞起到保护作用。另有研究表明,MMR 缺陷型 HeLa 细胞和 CHO 细胞对 CCNU 的敏感程度是对照细胞的 2~5 倍,MMR 的缺陷使细胞不能识别和修复 DNA 损伤,MMR 也可能参与了股间交联的修复过程^[15]。

1.4 p53 蛋白对耐药的调节作用 细胞内应激反应也能够影响 DNA 损伤细胞的存活,这些反应包括细胞周期的阻滞和细胞凋亡,p53 蛋白密切参与了这种调控。神经胶质瘤 U87GM 细胞对 BCNU 的耐药作用与 p53 蛋白的正向调节有关,p53 蛋白的上调延迟了 p21 的感应,使细胞周期阻滞在 S 期,提高了 DNA 的修复能力。p53 蛋白功能缺陷的 U87GM 不能够修复 BCNU 诱导的 DNA 损伤^[16]。

然而,近年来一些关于 p53 蛋白与 mgMT 表达关系的研究提供了不相一致的结果。在研究人肿瘤细胞野生型 p53 蛋白对 mgMT 表达的直接影响中发现,p53 蛋白的积累导致了 mgMT mRNA 逐渐大量的缺失而形成 mgMT 表型缺陷细胞,表明 p53 蛋白对 mgMT 基因表达起到负调节作用并且在人的肿瘤细胞中能够创造一个 mgMT 耗尽的状态,增强了肿瘤细胞对 CENUs 等烷化剂的敏感性^[17]。另有研究表明 p53 蛋白是以一种剂量依赖型的方式提高了 mgMT 的活性,在星形胶质细胞中 p53 蛋白存在时 mgMT 的活力显著增强,这种 p53 蛋白依赖型的耐药可能是由非 mgMT 机制所介导^[18]。野生型 p53 星形胶质细胞可以被保护免受相对高剂量的 BCNU 损伤,表明 mgMT 在低剂量而非高剂量的 BCNU 耐药中起到更主要的作用。这些不同的结论可能是由于不同肿瘤细胞系中 p53 蛋白功能的差异,也可能是 mgMT 在不同肿瘤细胞系中表达水平的差异所致,其相互关系还需进一步阐明。

2 耐药抑制剂及基因技术的应用

为了降低肿瘤细胞的耐药性以提高 CENUs 的化疗效果,人们正努力寻找有效的耐药抑制剂,针对如何降低 mgMT 的活性和通过基因表达来控制 mgMT 在胞内的含量等方法而使肿瘤细胞的耐药性发生逆转。目前研究报道的主要包括 O⁶-苄基鸟嘌呤 (O⁶-BG),含有 O⁶-BG 的寡聚核苷酸及 O⁶-BG 类似物,甲氧胺和锤头核酸酶等。

2.1 O⁶-BG O⁶-BG 是一种 mgMT 酶底物类似物,能够有效的

抑制 mgMT 的活性,显著恢复 CENUs 药物在人脑瘤及异种移植植物中的细胞毒性,目前已经进入 I 期临床试验^[19,20]。O⁶-BG 本身并没有毒性,与 mgMT 结合后将其苄基部分转移到半胱氨酸的活性位点,导致酶活力的完全丧失,反应过程非常迅速,阻碍了 CENUs 所引起的 O⁶-位氯乙基损伤的修复。表达 mgMT 的乳腺癌细胞,中枢神经系统以及结肠癌细胞对添加 O⁶-BG 或 BG 衍生物的 CENUs 有较强的敏感性。研究表明,亚硝基胍与 O⁶-BG 联合用药时所需最大剂量约是单独用药时的 25%。O⁶-BG 的 9 位取代衍生物 O⁶-苄基-2-脱氧鸟嘌呤 (dBG) 在人的中枢神经系统肿瘤异种移植植物中同样有效增强 BCNU 效果的作用^[21]。

2.2 含有 O⁶-BG 的寡聚核苷酸及 O⁶-BG 类似物 LUU 等^[22] 检测了人的 mgMT 与含有若干 O⁶-BG 的寡聚核苷酸的反应,结果证实了 mgMT 能够识别单链核苷酸的极性,O⁶-BG 在与 5'-末端相邻的位置时是 mgMT 的最优底物,在 mgMT 蛋白浓度较低时可作为抑制性的“假底物”将蛋白钝化,该发现对新的 mgMT 抑制剂的设计有所帮助。近年来,人们还合成了 O⁶-2-氟哌啶鸟嘌呤 (O⁶-FPG),O⁶-3-碘苄基鸟嘌呤 (O⁶-IBG) 和 O⁶-4-溴噻吩甲基鸟嘌呤 (O⁶-BTG) 等 mgMT 抑制剂,并将这些物质通过 C8 连接物与 β-D-葡萄糖 (β-D-glu) 相连接,分别在体内和体外对 mgMT 的抑制进行了比较^[23]。结果表明所有与葡萄糖连接的抑制剂比相应非连接的抑制剂对 mgMT 的抑制效果弱 3~5 倍。这些新的葡萄糖连接的抑制剂中 O⁶-BTG-C8-β-D-glu 是最有效的,在浓度为 0.1 μmol·L⁻¹ 时能够完全抑制胞内 mgMT 的活力,有力的加强了福莫司汀的杀伤效果。

2.3 甲氧胺 (methoxyamine, MX) 研究报道, MX 能够增强人肿瘤异种移植植物模型中 BCNU 的抗肿瘤疗效,但并非通过抑制 mgMT 的活性来实现^[24]。这种增强作用归因于甲氧胺与 DNA 上脱嘌呤/嘧啶 (AP) 位点的活性,该位点是 DNA 糖基化酶移除受损的 DNA 加合物所形成的。甲氧胺结合的 AP 位点不能够进一步进行碱基切除修复,从而导致细胞的死亡。因此,甲氧胺也是一种很好的提高亚硝基胍抗癌活性的物质。

2.4 锤头核酸酶 利用锤头核酸酶来降解长期存在的 mgMT mRNA 是一种新的分子策略^[25],通过抑制 mgMT 蛋白的合成来耗尽肿瘤细胞内的 mgMT 系统。核酸酶是一种包括所有 RNA 编码功能的单链 RNA 分子,能够催化目标 mRNA 中磷酸二酯骨架的断裂。锤头核酸酶在各种烷化剂包括 CENUs 的基因治疗中应用越来越广泛。

3 展望

CENUs 的耐药现象是多种机制参与的过程,各种机制之间的相互关系并未明确,耐药机制的阐明对癌症的治疗有重要指导意义。与此同时,耐药的逆转已成为人们亟待解决的问题。在开发抑制剂方面,涌现出了多种新的化合物,但对于胞内错综复杂的修复机制来讲,每种抑制剂都存在一定的局限性,耐药现象并不能完全消除。随着基因技术的不断成熟,在基因水平上对耐药的调节有可能开辟出一条新的途径。有效的耐药抑制剂和新药的开发仍然是人们在今后研究中更加关注的问题。CENUs 联合用药以及不同癌症治疗方法的联合使用也将是人们在与癌症的对抗中努力的方向。

[参考文献]

- [1] HUYNH G H, DENN D F, SZOKA F C Jr. Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors [J]. *J Controlled Release*, 2006, 110(2): 236–259.
- [2] ENGELHARD H H. The role of interstitial BCNU chemotherapy in the treatment of malignant glioma [J]. *Surg Neurol*, 2000, 53(5): 458–464.
- [3] CHEN F X, BODELL W J, LIANG G N, *et al.* Reaction of N-(2-chloroethyl)-N-nitrosoureas with DNA: effect of buffers on DNA adduction, cross-linking, and cytotoxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 1996, 9(5): 208–214.
- [4] LUDLUM D B. The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at molecular level [J]. *Cancer Invest*, 1997, 15(6): 588–598.
- [5] MIDDLETON M R, MARGISON G P. Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway [J]. *Lancet Oncol*, 2003, 4(1): 37–44.
- [6] GERSON S L. Clinical relevance of mgMT in the treatment of cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(?): 2388–2399.
- [7] BODELL W J. Repair of DNA alkylation products formed in 9L cell lines treated with 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea [J]. *Mut Res*, 2003, 522(1): 85–92.
- [8] WU M, KELLEY M R, HANSEN W K, *et al.* Reduction of BCNU toxicity to lung cells by high-level expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(4): 755–761.
- [9] ANDA T, SHABANI H K, TSUNODA K, *et al.* Relationship between expression of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, glutathione-S-transferase π in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis [J]. *Neurol Res*, 2003, 25(3): 241–248.
- [10] YANG D I, YIN J H, JU T C, *et al.* Nitric oxide and BCNU chemoresistance in C6 glioma cells: role of S-nitrosoglutathione [J]. *Free Radical Biol Med*, 2004, 36(10): 1317–1328.
- [11] BELJANSKI V, MARZILLI L G, DOETSCH P W. DNA damage-processing pathways involved in the eukaryotic cellular response to anticancer DNA cross-linking drugs [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(6): 1496–1506.
- [12] LI Q, WRIGHT S E, MATIJASEVIC Z, *et al.* The role of human alkyladenine glycosylase in cellular resistance to the chloroethylnitrosoureas [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(3): 589–593.
- [13] HE Y H, XU Y, KOBUNE M, *et al.* Escherichia coli FPG and human OGG1 reduce DNA damage and cytotoxicity by BCNU in human lung cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(1): 50–55.
- [14] CHEN Z P, MALAPETSA A, MCQUILLAN A, *et al.* Evidence for nucleotide excision repair as a modifying factor of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase-mediated innate chloroethylnitrosourea resistance in human tumor cell lines [J]. *Mol Pharmacol*, 1997, 52(5): 815–820.
- [15] AAUILINA G, CECCPTTI S, MARTINELLI S, *et al.* N-(2-chloroethyl)-N-cyclohexyl-N-nitrosourea sensitivity in mismatch repair-defective human cells [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(1): 135–141.
- [16] XU G W, NUTT C L, ZLATESCU M C, *et al.* Inactivation of p53 sensitizes U87 mg glioma cells to 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 4155–4159.
- [17] SRIVENUGOPAL K S, SHOU J, MULLAPUDI S S, *et al.* Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1398–1409.
- [18] NUTT C L, LOKIONNOVA N A, PEGG A E, *et al.* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity, p53 gene status and BCNU resistance in mouse astrocytes [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 20(12): 2361–2365.
- [19] KREKLAU E L, POLLOK K E, BAILEY B J, *et al.* Hematopoietic expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase-P140K allows intensive treatment of human glioma xenografts with combination O⁶-benzylguanine and 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(12): 1321–1329.
- [20] BOBOLA M S, SILBER J R, ELLENBOGEN R G, *et al.* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, O⁶-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2747–2755.
- [21] KOKKINAKIS D M, MOSCHEL R C, PEGG A E, *et al.* Eradication of human medulloblastoma tumor xenografts with a combination of O⁶-benzyl-2-deoxyguanosine and 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(11): 3676–3681.
- [22] LUU K X, KANUGULA S, PEGG A E, *et al.* Repair of oligodeoxyribonucleotides by O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(27): 8689–8697.
- [23] KAINA B, MUHLHAUSEN U, PIEESTAFFA A, *et al.* Inhibition of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors: comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-induced cell death [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311(2): 585–593.
- [24] GULIAEV A B, SINGER B, HANG B. Chloroethylnitrosourea-derived ethano cytosine and adenine adducts are substrates for escherichia coli glycosylases excising analogous etheno adducts [J]. *DNA Repair*, 2004, 3(10): 1311–1321.
- [25] ZHANG Q W, OHANNESIAN D W, ERICKSON L C. Hammerhead ribozyme-mediated sensitization of human tumor cells after treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309(2): 506–514.