

- [18] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells[J]. Nature, 2010, 468(7325): 824-828.
- [19] Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium [J]. Nature, 2010, 468(7325): 829-833.
- [20] Scully S, Francescone R, Faibish M, et al. Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas [J]. J Neurosci, 2012, 32(37): 12950-12960.
- [21] Paulis YW, Soetekouw PM, Verheul HM, et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1806(1): 18-28.
- [22] Páez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis [J]. Cancer Cell, 2009, 5(3): 220-231.

(收稿日期: 2013-12-04)

• 综 述 •

葡萄糖神经酰胺合成酶在肿瘤多药耐药中的研究进展^{*}

王 倩 综述, 谢 平[△] 审校

(南京医科大学附属无锡人民医院中心实验室, 江苏无锡 214023)

关键词: 葡萄糖神经酰胺合成酶; 抗药性, 多药; 神经酰胺

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 05. 035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)05-0589-03

多药耐药(MDR)是指对基于不同药理学机制的抗肿瘤药物产生的交叉耐药。MDR 广泛存在于肿瘤细胞, 成为临床抗癌治疗的重大难题。研究发现葡萄糖神经酰胺合成酶(GCS)与 MDR 关系紧密, 其在耐药细胞中高表达, 调节促凋亡的神经酰胺(Cer)与抗凋亡葡萄糖神经酰胺(GlcCer)之间的平衡, 影响细胞对抗肿瘤药物的敏感性。

1 GCS 的结构与功能

GCS 几乎见于所有真核生物, 在上百种鞘糖脂的合成中发挥重要作用。人 GCS 基因位于 9q31 染色体, 全长 32 kbp, 包含 9 个外显子和 8 个内含子, 启动子区 TATA 及 CAAT 盒缺失, 含有富含 GC 碱基序列的高度保守 Sp1 结合位点。GCS 一般由 394 个氨基酸组成, 是包含两个 38-kDa 单体的异源二聚体糖蛋白, 同时也是顺式高尔基复合体的跨膜蛋白, 其 N-端为信号锚定区, C-端为酶催化活性域, 位于高尔基复合体胞质面, 抗原决定簇则埋于高尔基复合体内部^[1]。由于 GCS 与高尔基体紧密结合, 成为膜结构的一部分较难分离, 因而限制了 GCS 结构的研究进展^[2]。

GCS 为 Cer D-glucose 转移酶, 催化尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-glucose)的糖基转移至 Cer 的伯羟基位形成 GlcCer, 其催化活性受组织 UDP-glucose 水平的调节, 在 UDP-glucose 缺乏的情况下热稳定性较差^[3]。此外睾酮、Cer 也可上调 GCS 表达。

2 GCS 介导肿瘤多药耐药

研究发现, GCS 介导肿瘤多药耐药, 几乎所有耐药株 GCS 表达都呈增高状态^[2]。外源 GCS 基因导入敏感细胞后, 酶产物增加, 细胞获得性耐药, 成功模拟了该耐药机制。如乳腺癌细胞 MCF-7 转染 GCS 基因后, 阿霉素和 Cer 耐药分别增加了 11 和 5 倍, 当再次行 GCS 反义转染时耐药可被完全逆转^[4]。现已发现的 GCS 介导的耐药机制有以下几个方面。

2.1 GCS 通过下调 Cer 抑制肿瘤细胞凋亡 Cer 调控细胞凋亡, 被认为是介导细胞周期阻滞和凋亡重要的第二信使^[5]。

Cer 在实体瘤细胞较之于周围正常组织表达降低, 且患者生存率与 Cer 水平呈正相关^[2]。近年来研究发现多种抗癌疗效亦是上调内源性 Cer 得以实现: 吉西他滨和多柔比星通过上调 Cer 抑制肿瘤生长和恶化从而治疗头颈部上皮癌^[6]。

GCS 最直接的功能是将细胞内的 Cer 糖基化, 为形成高级鞘糖脂脑苷脂和神经节苷脂提供合成前体。GCS 表达增高可明显降低胞内 Cer 水平, 从而抑制细胞凋亡。抑制 GCS 后 Cer 上调, 细胞凋亡增多且使 p53 突变体细胞野生型肿瘤抑制子 p53 功能恢复。GCS 下调内源性 Cer 致细胞凋亡减少在 CHP-100 人成神经细胞瘤中也已得到证实。细胞热休克应激反应是 Cer 上调时细胞的特征性反应, NIH WT-3T3 细胞中的 αB-晶体蛋白——一种热休克蛋白在 GCS 被抑制时表达增高。经证实该晶体蛋白的高表达亦是源于 GCS 抑制后 Cer 水平的增高^[7]。

2.2 GCS 通过增加 GlcCer 诱导肿瘤细胞耐药 鞘糖脂代谢异常导致肿瘤细胞耐药, 胞膜上的鞘糖脂更是帮助肿瘤粘附和侵袭。研究发现: 经 GCS 催化形成 GlcCer 是这类耐药的主要机制^[8]。

Cer 在 GCS 的作用下与 UDP-2-glucose 的糖基结合形成 GlcCer。GlcCer 不仅是膜上重要的脂质成分, 而且参与调控细胞增殖、细胞癌性转化、肿瘤侵袭等。此外, 肿瘤细胞耐药亦与 GlcCer 密切相关。早在 1996 年, 研究人员首次观察到 MCF-7 阿霉素耐药伴随 GlcCer 水平增加。之后, GlcCer 与肿瘤耐药的关系在诸如恶性黑色素瘤、白血病、神经母细胞瘤等多种肿瘤耐药模型中得到证实^[9], 且能通过 cSrc 和 β-catenin 通路上调 MDR1 基因, 诱导耐药亚型的产生^[10]。研究发现耐药株中的 GlcCer 增高, 尤其是在 MCF-7-AdrR 中, 主要与 GCS 酶促活性增强有关, 与 GlcCer 消除减少关系不大。深入研究发现他莫昔芬通过 P-糖蛋白逆转耐药也是由 GCS 抑制、GlcCer 降低介导, 亦证实 GCS 通过上调 GlcCer 诱导肿瘤细胞耐药。

2.3 GCS 通过 MDR1/P-gp 介导肿瘤细胞耐药 GCS 致肿瘤

^{*} 基金项目: 无锡市科技发展指令性计划(CSEY1N1101)。 作者简介: 王倩, 女, 检验技师, 主要从事肿瘤耐药机制的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: xieping1115@163.com。

耐药还与多药耐药基因 1(MDR1)及其编码的 P-糖蛋白(P-gp)介导的经典耐药途径有关。P-gp 是 ATP 依赖性转运排出泵,通过水解 ATP 将进入细胞的药物泵出,降低药物浓度,从而诱发细胞耐药。在白血病、恶性黑色素瘤、大肠癌、乳腺癌等耐药株中均发现 GCS 上调 P-gp^[2]。当抑制 GCS 基因表达,MDR1 mRNA 水平下降;转染针对 MDR1 的 siRNA 对 GCS mRNA 没有影响。本实验室研究进一步证实抑制 GCS 能够逆转 MDR,并且可通过 GCS-P-ERK-NF- κ B 信号通路下调 MDR1 mRNA 和 P-gp 的表达及其功能活性。不仅如此,体内试验也证明 GCS 被抑制后 P-gp 下调,进而阻止黑色素瘤的恶性进程。然而 Gerrard 等^[11]对 17 名慢粒患者的外周血行 GCS 抑制剂处理后发现,细胞对化疗药物的敏感性增强,对 P-gp 功能活性没有影响。故两者之间的关系存有争议。关于 P-gp 与 GCS 在肿瘤耐药中的关系,亦有报道称抑制 P-gp 可下调 GCS 活性,可能与 P-gp 通过转运 GlcCer 从而调节 GCS 活性有关^[11]。由此可见,MDR1/P-gp 与 GCS 之间是相互影响,协调发挥作用的。

2.4 GCS 上调 Bcl-2 等信号通路分子介导肿瘤耐药 GCS 上调凋亡抑制因子 Bcl-2。耐阿霉素 K562/A02 较野生株 Bcl-2 水平增高,当 GCS 被抑制,Bcl-2 基因表达降低^[12]。此外,GCS 致大肠癌、宫颈癌、乳腺癌等肿瘤耐受多柔比星还涉及 β -catenin 和 cSrc 信号通路。OVCAR-8 细胞中 GCS 使 β -catenin 和 cSrc 水平增加伴随细胞内紫杉酚的下降,说明 GCS 影响 cSrc、 β -catenin 的同时还调控着 P-gp 的活性。反之,下调 GCS、P-gp 和上述信号分子亦可下调^[8]。近有报道称在 p53 等位基因突变细胞中,GCS 抑制 p53 磷酸化从而抑制其介导的 Puma、p21Waf1/Cip1 和 Bax 凋亡基因活化,导致细胞凋亡受阻^[13]。

3 GCS 应用于肿瘤治疗

鉴于 GCS 在多种耐药肿瘤中高表达,能通过多种途径、多个信号靶点介导肿瘤细胞多药耐药,通过相应手段下调 GCS 表达或抑制 GCS 功能活性将成为有效逆转耐药的途径之一。

3.1 GCS 化学抑制剂 目前 GCS 化学抑制剂应用于肿瘤治疗的研究相对成熟,其中包括 PPMP、PDMP 及其类似物 PP-PP 等。

PPMP 是一种应用广泛,能在多种类型肿瘤细胞中抑制 GCS 活性的化合物。研究表明,PPMP 能抑制 N-(4-hydroxyphenyl) retinamide(4-HPR)敏感和耐药的急粒细胞株 CCRF-CEM 的 GCS^[14];对 K562/A02 和 MCF-7-AdrR 中的 GCS 亦可抑制^[15]。在这些细胞中,GCS 抑制后长春新碱的摄取量增加,MDR1 基因和 P-gp 的表达水平下降。同样,PPMP 的 GCS 抑制效应在耐长春新碱 KB-V0.01 宫颈癌细胞中也较显著。在人神经母细胞瘤、肺癌、恶性黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌以及前列腺癌细胞中,PPMP 可通过 p53 和 caspase 依赖途径增加 4-HPR 和他莫昔芬的细胞毒性。Adan-Gokbulut 等^[16]报道 PPMP 联合治疗可增加 C6-Cer 对人乳腺癌 MDA-MB-435 的细胞毒性,而其单独使用亦可上调活性氧诱导细胞凋亡。

另一种普遍应用于肿瘤治疗的 GCS 抑制剂为 PDMP。和 PPMP 一样,PDMP 可在多种类型肿瘤中发挥抗癌功效。例如 PDMP 通过抑制 GCS 表达,增加白藜芦醇对 K562^[17]和 HL-60^[18]的毒性和促凋亡作用;能促使 K562-IMA 伊马替尼耐药株重获敏感。再者,PDMP 与尼洛替尼联用在促 K562 凋亡中表现出强烈的协同效应;增加达沙替尼对 K562 和 Meg-01 慢粒细胞的毒性作用^[19]。在 U87-MG 人胶质瘤 p53 阳性细胞

中,PDMP 通过增加 Cer 蓄积激活 caspase 活性。最近一项研究成果显示,PDMP 治疗 CML T3151 耐药突变株可增加该细胞对伊马替尼、尼洛替尼和 GNF-2——一种抑制 BCR/ABL 的药物的敏感性,通过激活 GSK-3 启动细胞凋亡^[20]。PPPP 同样作为 GCS 抑制剂可抑制人神经母细胞瘤的 GCS,但因在其他细胞株中的抑制效率较 PDMP 低,故对 PPPP 的研究甚少。

Genz-123346 是 GCS 抑制剂,同时也是 P-gp 的转运底物。在细胞模型实验中,Genz-123346 可以使结肠癌 HCT-15、肝细胞癌 HepG-2 和宫颈癌 KB3-1 细胞恢复敏感^[21]。

临床上 GCS 抑制剂 NB-DNJ 多用于溶酶体糖脂贮积症如戈谢病等的治疗,近年来研究发现 NB-DNJ 较 PDMP 更具特异性,但 NB-DNJ 用于治疗神经母细胞瘤时虽可抑制 GCS 活性,但只少量上调 Cer,细胞凋亡数量不及 PDMP,癌细胞敏感性亦无明显增强^[21]。抑制剂 OGT2378 作用于黑色素瘤小鼠能成功缩小肿块,药物耐受度好^[21],就目前看来具有良好的实用前景,但仍需进一步的数据支持。

3.2 GCS RNA 干扰技术 以 GCS 为靶点的 RNA 干扰技术通过抑制 GCS 基因表达亦可增强肿瘤的药物敏感性。Durand 等^[9]通过 UGCG shRNA 质粒转染 HCT-8/VCR 发现 GCS mRNA 抑制的同时,伴随 MDR1 mRNA 的下调、caspase-3 和细胞凋亡的增加。Zhang 等^[22]通过 siRNA 转染 K562/A02 也观察到类似现象,即抑制 GCS 可通过下调 MDR1、降低阿霉素的半数致死剂量。siRNA 在乳腺癌体内实验中被证明同样有效。其他如 GCS 反义寡聚核苷酸纳米微粒增敏 NCI/ADR-RES 细胞;混合骨架寡聚核苷酸选择性抑制 GCS 表达技术使人 NCI/ADR-RES 细胞及鼠 EMT6/AR1 乳腺癌细胞多柔比星敏感。这些寡聚核苷酸可通过升高 C18-Cer 和 caspase、介导细胞凋亡、缩小癌性包块^[23]。综上所述,靶向抑制 GCS 可有效逆转 MDR,以致细胞敏感,最终有望消除肿瘤。

3.3 抑制 GCS 活性的其他药物 其他如 P-gp 抑制剂——维拉帕米、环孢菌素 A、他莫昔芬也具有抑制 GCS 的功能活性,如他莫昔芬与乳铁蛋白联用可增强乳铁蛋白促凋亡效应,导致 Jurkat T 细胞趋于凋亡^[2]。

4 GCS 可作为一项评价肿瘤敏感性的指标应用于临床检测

在化疗之前对肿瘤的药物敏感性进行评估检测具有重大意义,有利于临床制定行之有效的治疗方案,使患者免受不必要的毒性损伤。就 GCS 在耐药细胞中高表达尤其是在白血病、皮肤癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、宫颈癌、子宫癌、结肠癌等耐药癌症细胞中水平升高的现象^[24],可将其作为评价肿瘤敏感性指标应用于相关肿瘤的临床辅助检查。在比较敏感株和耐药株 GCS 表达以及化疗敏感度实验中,如薄层色谱检测乳腺癌、上皮样癌、恶性黑色素瘤耐药株中 GCS 表达水平,较之对应的野生株,GCS 水平显著增高。为进一步明确该项检测指标的临床应用价值,对多份恶性黑色素瘤和一份乳腺癌组织标本的来源患者跟踪临床预后,结果显示:耐药程度与 GCS 表达呈正相关,即 GCS 可在一定程度上反应肿瘤对药物的敏感性。另外用于该项检测的组织样本量要求较少,仅为 0.5 g,更增加了临床检测的可行性^[24]。

5 结 语

MDR 是细胞多基因、多靶点、多环节综合作用的结果,形成机制十分复杂。GCS 在肿瘤多药耐药中的重要作用以及与抗凋亡信号通路的关联成为近来多药耐药研究的新领域,但目前仍没有相关的临床试验公诸于世,针对 GCS 的靶向治疗应

用于临床尚需可靠的动物模型和临床实验支持,攻克肿瘤耐药这一世界性难题仍然任重而道远。

参考文献

[1] Wang J, Lv XW, Du YG. Potential mechanisms involved in ceramide-induced apoptosis in human colon Cancer HT29 cells[J]. Biomed Environ Sci, 2009, 22(1): 76-85.

[2] Kartal Yandim M, Apohan E, Baran Y. Therapeutic potential of targeting ceramide/glucosylceramide pathway in Cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71(1): 13-20.

[3] Ozbayraktar FB, Ulgen KO. Molecular facets of sphingolipids; mediators of diseases[J]. Biotechnol J, 2009, 4(7): 1028-1041.

[4] Messner MC, Cabot MC. Glucosylceramide in humans[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 688(1): 156-164.

[5] Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides[J]. J Biol Chem, 2011, 286(32): 27855-27862.

[6] Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, et al. Sphingolipids and Cancer; ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance[J]. Future Oncol, 2010, 6(10): 1603-1624.

[7] Delgado A, Fabrias G, Bedia C, et al. Sphingolipid modulation: a strategy for Cancer therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2012, 12(4): 285-302.

[8] Ekiz HA, Baran Y. Therapeutic applications of bioactive sphingolipids in hematological malignancies[J]. Int J Cancer, 2010, 127(7): 1497-1506.

[9] Durand P, Borrone C. Fucosidosis and mannosidosis, glycoprotein and glucosylceramide storage diseases[J]. Helv Paediatr Acta, 1971, 26(1): 19-27.

[10] Liu YY, Gupta V, Patwardhan GA, et al. Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of Cancer drug resistance through cSrc and beta-catenin signaling[J]. Mol Cancer, 2010, 9(1): 145.

[11] Gerrard G, Butters TD, Ganeshaguru K, et al. Glucosylceramide synthase inhibitors sensitise CLL cells to cytotoxic agents without reversing P-gp functional activity[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 609(1/3): 34-39.

[12] Liu YY, Yu JY, Yin D, et al. A role for ceramide in driving Cancer cell resistance to doxorubicin[J]. FASEB J, 2008, 22(7): 2541-2551.

[13] Liu YY, Patwardhan GA, Bhinge K, et al. Suppression of glucosylceramide synthase restores p53-dependent apoptosis in mu-

tant p53 Cancer cells[J]. Cancer Res, 2011, 71(6): 2276-2285.

[14] Apraiz A, Idkowiak-Baldys JK, Boyano MD, et al. Evaluation of bioactive sphingolipids in 4-HPR-resistant leukemia cells[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 477.

[15] Xie P, Shen YF, Shi YP, et al. Overexpression of glucosylceramide synthase in associated with multidrug resistance of leukemia cells[J]. Leuk Res, 2008, 32(3): 475-480.

[16] Adan-Gokbulut A, Kartal-Yandim M, Iskender G, et al. Novel agents targeting bioactive sphingolipids for the treatment of Cancer[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(1): 108-122.

[17] Kartal M, Saydam G, Sahin F, et al. Resveratrol triggers apoptosis through regulating ceramide metabolizing genes in human K562 chronic myeloid leukemia cells[J]. Nutr Cancer, 2011, 63(4): 637-644.

[18] Cakir Z, Saydam G, Sahin F, et al. The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60; acute myeloid leukemia cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137(2): 279-286.

[19] Gencer EB, Ural AU, Avcu F, et al. A novel mechanism of dasatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia; ceramide synthase and ceramide clearance genes[J]. Ann Hematol, 2011, 90(11): 1265-1275.

[20] Huang WC, Tsai CC, Chen CL, et al. Glucosylceramide synthase inhibitor PDMP sensitizes chronic myeloid leukemia T315I mutant to Bcr-Abl inhibitor and cooperatively induces glycogen synthase kinase-3-regulated apoptosis[J]. FASEB J, 2011, 25(10): 3661-3673.

[21] Chai L, McLaren RP, Byrne A, et al. The chemosensitizing activity of inhibitors of glucosylceramide synthase is mediated primarily through modulation of P-gp function[J]. Int J Oncol, 2011, 38(3): 701-711.

[22] Zhang YY, Xie KM, Yang GQ. The effect of glucosylceramide synthase on P-glycoprotein function in K562/AO2 leukemia drug-resistance cell line[J]. Int J Hematol, 2011, 93(3): 361-367.

[23] Patwardhan GA, Zhang QJ, Yin D, et al. A new mixed-backbone oligonucleotide against glucosylceramide synthase sensitizes multidrug-resistant tumors to apoptosis[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6938.

[24] Ryland LK, Fox TE, Liu X, et al. Dysregulation of sphingolipid metabolism in Cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(2): 138-149.

(收稿日期: 2013-10-18)

• 综述 •

来氟米特的临床应用进展

赵先英¹, 周小霞¹, 张定林¹综述, 张 涛^{2△}审校

(1. 第三军医大学药学院, 重庆 400038; 2. 重庆医药工业研究院有限责任公司, 重庆 400061)

关键词: 来氟米特; 关节炎, 类风湿; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 05. 036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)05-0591-03

来氟米特(LEF)是一个以治疗类风湿关节炎(RA)为主的异噁唑类抗增殖活性的免疫抑制剂, 是美国食品和药物管理局

批准的第一个针对 RA 可改善病程的药物。随着对 LEF 研究的深入, LEF 在临床的应用也越加广泛, 如自身疫性疾病、免

作者简介: 赵先英, 女, 教授, 主要从事微量元素与医学研究。 △ 通讯作者: E-mail: zzhao@qq. com。