

骨肉瘤直接抑制化疗药物疗效的分子机制

符策岗, 赵红卫, 刘 扬, 陈海丹

(三峡大学第一临床医学院 宜昌市中心人民医院脊柱外科, 湖北 宜昌 443000)

【摘要】 骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是一种发病率在儿童和青少年恶性肿瘤中居首位的肿瘤,目前临床治疗方式以外科手术联合药物化疗为主。骨肉瘤对化疗药物的耐药性是影响临床骨肉瘤治疗效果的重要原因之一,了解骨肉瘤细胞的耐药机制,从而研发新的化疗药物对提高骨肉瘤的治疗效果具有重要意义。OS可以通过直接抑制化疗药物或增强自身抗药性等两种方式达到耐药的目的。本综述侧重介绍骨肉瘤直接影化疗药物疗效的3种分子机制:骨肉瘤细胞阻滞化疗药物进入胞内、骨肉瘤细胞排出胞内的化疗药物以及促使化疗药物失活。

【关键词】 骨肉瘤;耐药性;分子机制

【中图分类号】 R738.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)01—0070—04

Molecular mechanisms of osteosarcoma inhibiting chemotherapeutical efficacy directly. FU Ce-gang, ZHAO Hong-wei, LIU Yang, CHEN Hai-dan. Department of Spinal Surgery, the First College of Clinical Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, CHINA

【Abstract】 Osteosarcoma (OS) is the most common malignant primary bone tumor in children and adolescents. Currently, the combination of surgical resection and chemotherapy is the chief method for treating OS. OS resistance to the anti-OS drugs plays an important role in decreasing the chemotherapeutical efficacy. Therefore, elucidation of the mechanisms of chemoresistance and implementation of strategies to overcome chemoresistance will definitely play a pivotal role in developing novel chemotherapeutics and improving the survival rate of OS patients. There are two major mechanisms contribute to drug resistance of OS: osteosarcoma inhibiting chemotherapeutical efficacy directly and improving the cell ability to resistance chemotherapeutics. This article reviewed three methods of osteosarcoma inhibiting chemotherapeutical efficacy directly: inhibiting chemotherapeutics transport into cell, removal of chemotherapeutics from tumor cells and promoting chemotherapeutics inactivation.

【Key words】 Osteosarcoma; Chemoresistance; Molecular mechanisms

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)好发于15~25岁的青少年,并以男性患者居多,其发病率在儿童和青少年恶性肿瘤中居首位。OS好发于长骨干骺端、股骨远端和胫骨近端^[1],具有很强的侵蚀性,多见肺部转移^[2]。视网膜细胞瘤和p53基因突变的患者更容易罹患OS,表明相关基因可能介入了OS的发病。OS主要是梭形细胞的恶性增殖,也存在软骨母细胞和成纤维细胞等亚型,这些肉瘤细胞只要在骨组织内被发现即可确诊OS^[3]。临床方面,OS患者的主要临床症状是疼痛和软组织肿胀,并且高达20%~25%患者发现有肺部转移灶,给予OS患者及时有效的治疗能缓解病情的发展。OS患者仅行手术切除的存活率不足20%,但与化学治疗联用后,局部病变OS患者存活率增加了70%,这说明了化学治疗的有效性和重要性^[4]。目前国内外以顺铂、多柔比星和甲氨蝶呤(Methotrexate,

MTX)为基础抗化疗药物治疗OS。由于骨肉瘤对化疗药物的耐药性存在,使得OS患者存活率在过去的30年里没有发生变化^[5]。探索骨肉瘤抗化学治疗的分子机制并找到相应的克服方式,对提高OS患者的生存率具有重要价值。OS可以通过直接抑制化疗药物疗效和增强自身耐药性等两种主要方式产生对化疗药物的耐药性,本文将对OS如何直接抑制化疗药物的分子机制做一简要综述。

1 阻滞化疗药物进入细胞内

目前尚不清楚肿瘤细胞吸收化疗药物的分子机制。据了解,二氢叶酸还原酶抑制剂MTX常被用于治疗OS,实验发现,MTX转入细胞需要通过细胞膜上的还原型叶酸载体(Reduced folate carrier, RFC),减少细胞膜上RFC能抑制MTX转运入细胞内,从而降低MTX在细胞内的浓度,这一现象在OS细胞内普遍

基金项目:国家自然科学基金(编号:81302346)

通讯作者:陈海丹。E-mail:wenquanchd@sina.com

存在(图 1)^[6-7]。研究发现,65%的 OS 病患 RFC 表达减少,并且 RFC 水平越低化疗敏感性越差,这表明 RFC 的表达水平能直接影响化疗药物的作用^[8]。也有研究表明,原发病灶 RFC 的表达水平比转移病灶和复发病灶 RFC 的表达水平都要低,说明 RFC 水平与肿瘤病变程度有关。在此,值得一提的是,伴随肿瘤好转 RFC 表达随之增加,反向验证肿瘤病变程度与 RFC 表达水平的关系^[9-10]。研究发现,变异的 RFC 失去了或者在一定程度上降低了转运 MTX 的能力,一种名为 Leu291Pro 的变异 RFC 蛋白失去了承载底物穿过细胞膜的能力,另外三种变异型 Ser46Asn、Ser4Pro 和 Gly259Trp 的转运能力都有不同程度的下降,说明 RFC 变异会降低 RFC 的转运能力,进而影响化疗药物的转运,最终引起肿瘤对化疗药物耐药^[11]。此外,研究发现,RFC 基因复制在亲本细胞系与 MTX 耐药细胞系内并无不同,表明 RFC 表达的减少并不是因为基因缺失而引起的^[12]。

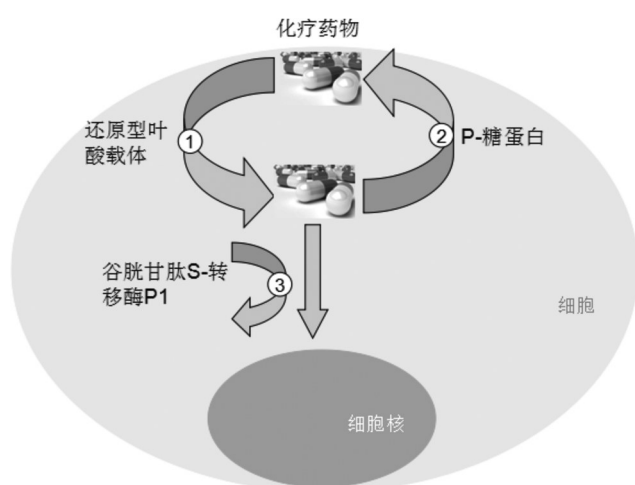


图 1 OS 抗化疗机制

注:1:低水平还原性叶酸载体介导细胞内药物浓度降低;2:P-糖蛋白介导药物外排;3:谷胱甘肽 S-转移酶 P1 介导药物失活。

为了克服 RFC 引起的耐药,目前研发了一种新型的抗叶酸剂三甲曲沙,它最大的优势在于转运入细胞内不需要借助 RFC。目前,三甲曲沙已经被列入恶性或顽固性 OS 患者的 II 期研究中,并取得了一定的成果。此外,目前正在尝试联用三甲曲沙与高剂量 MTX 治疗复发性 OS,这有望提高化疗疗效^[13]。

2 排出细胞内的化疗药物

细胞膜上的膜泵 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-GP)能非特异性的泵出肿瘤细胞内的化疗药物从而降低细胞内药物浓度,从而抑制化疗药物的作用^[14]。P-GP 由人类多重抗药(Multidrug-resistant, MDR)基因 MDR1 所编码,它是一种 70 kD 的 ATP 结合(ATP-bind-

ing cassette, ABC)转运蛋白,也是细胞排出药物的外排泵(图 1)^[15]。研究发现,P-GP 表达增多与 OS 细胞对化疗药物耐药有着密不可分的关系^[16-18]。此外,回顾性研究发现,P-GP 表达增多能促进肿瘤的发展和恶变^[19-20]。

相反的研究发现,P-GP 的表达水平与肿瘤的发展和生存率没有内在联系^[21-22]。类似的研究发现,P-GP mRNA 的表达水平并不能反映肿瘤的发展或恶变程度^[23]。因此综合分析,P-GP 并不影响化疗药物在肿瘤细胞内的作用^[24]。也有研究发现,不能用 P-GP 的表达水平作为指标去预测 OS 患者的化疗效果或存活率^[25]。此外,当 MDR 基因转染进入 OS 细胞系内后,在一种低侵蚀性表型内可发现 P-GP 表达增多,这表明 P-GP 能抑制肿瘤转移^[26]。

虽然目前对于 P-GP 的作用存在争议,但为了克服 P-GP 引起耐药的分子机制,目前正在开发一种新型的药物传递载体,即具备生物溶性和脂溶性的纳米颗粒。前期研究证实,这种纳米颗粒能有效地把化疗药物送入已经产生耐药性的 OS 细胞内,这能提高化疗药物在细胞内的浓度,甚至扭转细胞内药物低浓度的局面^[27-29]。

3 促使化疗药物失活

谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (Glutathione S-transferase P1, GSTP1)是一种细胞质谷胱甘肽 S-转移酶,它属于 II 期解毒酶系,参与灭活一系列外源性化学物质,其中包括诱变剂、抗癌剂以及它们的代谢物(图 1)^[30]。研究表明,GSTP1 表达增多与多种肿瘤抵抗化疗药物的作用有关^[31]。进一步研究证实,GSTP1 表达增多能明显缩短药物的半衰期和存在时间,这能很快降低药物在体内的浓度,进而抑制化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用^[32]。类似的研究发现,随着 GSTP1 表达的增多,化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用随之减弱^[33]。研究发现,化疗药物能刺激 GSTP1 表达增多,而 GSTP1 表达增多会促进肿瘤的发展^[34]。针对性研究发现,OS 耐药细胞系内 GSTP1 表达增多,这表明 GSTP1 表达增多能促进 OS 细胞对化疗药物耐药^[35]。综上所述,GSTP1 在体内能有效灭活化疗药物,这不利于化疗药物发挥药效,从而促进肿瘤继续发展。Windsor 等^[36]研究发现一种变异的 GSTP1 基因(c.313A>G p. Ile(105)Val),它能促进 OS 细胞对化疗药物的耐药性,这说明变异的 GSTP1 也能引起细胞产生化疗耐药性。Zhang 等^[37]研究发现,GSTP1 Val 基因型患者比 GSTP1 Ile 基因型患者生存率要低。但是 Yang 等^[38]却发现,GSTP1 Val 基因型患者对化疗药物更加敏

感。GSTP1 基因的多样性是一种表观遗传学变化,目前对表观遗传学的研究还存在矛盾和不成熟,因此更深入的研究可能会为治疗 OS 带来新的视角。

为了抑制 GSTP1 的解毒作用,并提高化疗药物对 OS 细胞的杀伤作用,近期正在体外测试一种高效的 GSTP1 抑制剂 NBDHEX [6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol]。研究发现,NBDHEX 在化疗药物耐药细胞系内极度活跃^[39]。进一步研究发现,NBDHEX 能诱导 OS 细胞凋亡并能抑制 OS 细胞转移,这表明 NBDHEX 有助于治疗 OS^[40]。蛋白组学研究结果显示,NBDHEX 能通过分解 GSTP1 肿瘤坏死因子受体相关因子(Tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF) 2 复合体恢复 TRAF2/ASK1 信号转导,从而延长 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 P38 的活性,进一步增强 JNK 促进细胞凋亡和 P38 引起 P21 增多而发挥抑癌作用,这最终能促进肿瘤细胞死亡^[41]。这些研究表明,NBDHEX 抑制 GSTP1 后能有助于治疗 OS,这可能是一种有效的新型疗法,并值得进一步去发掘。

4 结论

虽然手术治疗和化疗药物联合治疗 OS 已经在很大程度上提高了 OS 患者的生存率。但从 1980 年至今,局部病变 OS 患者的生存率还停留在 70%,伴随转移和复发的 OS 患者长期生存率依然不足 20%^[42]。了解骨肉瘤细胞的耐药机制,并找到相应的处理方式,能在很大程度上提高骨肉瘤的治疗效果,进而提高 OS 患者生存率。本综述简要介绍了 OS 直接抑制化疗药物的三种分子机制,以及相应的处理方式,但这些研究都尚处于初期。并且还存在着其他机制能引起 OS 细胞的耐药性,例如 APE1 或 ERCC 增强 DNA 修复,干扰 mTOR 或 IGF-IR 信号转导通路,细胞凋亡和细胞自噬相关的抗化疗机制,miRNA 失调和 OSC 介导的抗化疗作用等等。

目前已经证实三甲曲沙转运入细胞内不需要借助 RFC,但是抗肿瘤作用依然不够理想。因此有必要对三甲曲沙进行改良,这可以从药物的杀伤作用本身着手,也可以着手于化疗药物联用方面,以提高疗效。具备生物溶性和脂溶性的新型纳米颗粒能有效提高药物在肿瘤内传递,有助于扭转 P-GP 药物外排^[43]。在未来,更应该研究纳米颗粒和外排泵抑制剂联合治疗 OS 的效果,这些药物之间的相互作用机制值得进一步研究。GSTP1 能引起化疗药物失活,NBDHEX 能高效的抑制 GSTP1,这表明 NBDHEX 有助于治疗 OS^[40]。研究 NBDHEX 与其他化疗药物联用对提高

骨肉瘤的治疗效果具有重要的意义。目前对这所有机制了解尚浅,进一步的探索骨肉瘤细胞的耐药机制,从而研发新的化疗药物对提高骨肉瘤的治疗效果具有重要意义。

参考文献

- [1] Chou AJ, Gorlick R. Chemotherapy resistance in osteo-sarcoma: current challenges and future directions [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006, 6(7): 1075-1085.
- [2] Longhi A, Errani C, De Paolis M, et al. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: state of the art [J]. *Cancer Treat Rev*, 2006, 32(6): 423-436.
- [3] Chou AJ, Geller DS, Gorlick R. Therapy for osteosarcoma: where do we go from here? [J]. *Paediatr Drugs*, 2008, 10(5): 315-327.
- [4] Eilber FR, Rosen G. Adjuvant chemotherapy for osteo-sarcoma [J]. *Semin Oncol*, 1989, 16(4): 312-322.
- [5] Sakamoto A, Iwamoto Y. Current status and perspectives regarding the treatment of osteo-sarcoma: chemotherapy [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2008, 3(3): 228-231.
- [6] Bertino JR. Karmofsky memorial lecture. Ode to methotrexate [J]. *J Clin Oncol*, 1993, 11(1): 5-14.
- [7] Hattinger CM, Reverter-Branchat G, Remondini D, et al. Genomic imbalances associated with methotrexate resistance in human osteo-sarcoma cell lines detected by comparative genomic hybridization-based techniques [J]. *Eur J Cell Biol*, 2003, 82(9): 483-493.
- [8] Guo W, Healey JH, Meyers PA, et al. Mechanisms of methotrexate resistance in osteo-sarcoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(3): 621-627.
- [9] Patiño-García A, Zalacaín M, Marrodán L, et al. Methotrexate in pediatric osteosarcoma: response and toxicity in relation to genetic polymorphisms and dihydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 expression [J]. *J Pediatr*, 2009, 154(5): 688-693.
- [10] Ifergan I, Meller I, Issakov J, et al. Reduced folate carrier protein expression in osteosarcoma: implications for the prediction of tumor chemosensitivity [J]. *Cancer*, 2003, 98(9): 1958-1966.
- [11] Flintoff WF, Sadlish H, Gorlick R, et al. Functional analysis of altered reduced folate carrier sequence changes identified in osteosarcomas [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1690(2): 110-117.
- [12] Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici D, et al. Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in osteosarcoma cells [J]. *Ann Oncol*, 2004, 15(1): 151-160.
- [13] Trippett T, Meyers P, Gorlick R, et al. High dose trimetrexate with leucovorin protection in recurrent childhood malignancies: a phase II trial [J]. *J Clin Oncol (ASCO Annual Meeting Abstracts)*, 1999, 9: 889.
- [14] Weinstein RS, Kuszak JR, Kluskens LF, et al. P-glycoproteins in pathology: the multidrug resistance gene family in humans [J]. *Hum Pathol*, 1990, 21(1): 34-48.
- [15] Safa AR, Stern RK, Choi K, et al. Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by Gly-185→Val-185 substitution in P-glycoprotein [J]. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 1990, 87(18): 7225-7229.
- [16] Bramwell VH. Osteosarcomas and other cancers of bone [J]. *Curr Opin Oncol*, 2000, 12(4): 330-336.
- [17] Park YB, Kim HS, Oh JH, et al. The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma [J]. *Int Orthop*, 2001, 24(6): 307-310.
- [18] Gomes CM, van Paassen H, Romeo S, et al. Multidrug resistance mediated by ABC transporters in osteosarcoma cell lines: mRNA analysis and functional radiotracer studies [J]. *Nucl Med Biol*, 2006, 33(7): 831-840.
- [19] Serra M, Pasello M, Manara MC, et al. May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(6): 1459-1468.
- [20] Baldini N, Scotlandi K, Serra M, et al. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(5): 629-632.
- [21] Kusuzaki K, Hirata M, Takeshita H, et al. Relationship between P-glycoprotein positivity, doxorubicin binding ability and histologic response to chemotherapy in osteosarcomas [J]. *Cancer Lett*, 1999, 138(1-2): 203-208.
- [22] Trammell RA, Johnson CB, Barker JR, et al. Multidrug resistance-1 gene expression does not increase during tumor progression in the MGH-OGS murine osteosarcoma tumor model [J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(3): 449-455.
- [23] Wunder JS, Bull SB, Aneliunas V, et al. MDR1 gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(14): 2685-2694.
- [24] Pakos EE, Ioannidis JP. The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis [J]. *Cancer*, 2003, 98(3): 581-589.
- [25] Sorensen FB, Jensen K, Vaeth M, et al. Immunohistochemical estimates of angiogenesis, proliferative activity, p53 expression, and multiple drug resistance have no prognostic impact in osteosarcoma: A comparative clinicopathological investigation [J]. *Sarcoma*, 2008, 2008: 874075.
- [26] Takeshita H, Kusuzaki K, Murata H, et al. Osteoblastic differentiation and P-glycoprotein multidrug resistance in a murine osteosarcoma model [J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(7): 1327-1331.
- [27] Susa M, Iyer AK, Ryu K, et al. Inhibition of ABCB1 (MDR1) expression by an siRNA nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10764.
- [28] Susa M, Iyer AK, Ryu K, et al. Doxorubicin loaded polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 399.
- [29] Kobayashi E, Iyer AK, Hornicek FJ, et al. Lipid-functionalized dextran nanosystems to overcome multidrug resistance in cancer: a pilot study [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2013, 471(3): 915-925.
- [30] Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47): 7369-7375.
- [31] Tew KD. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance [J]. *Cancer Res*, 1994, 54(16): 4313-4320.
- [32] Shoieb A, Hahn K. Detection and significance of glutathione-S-transferase pi in osteogenic tumors of dogs [J]. *Int J Oncol*, 1997, 10(3): 635-639.
- [33] Uozaki H, Horiuchi H, Ishida T, et al. Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase pi, heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma. Relationship with poor prognosis [J]. *Cancer*, 1997, 79(12): 2336-2344.
- [34] Wei L, Song XR, Wang XW, et al. Expression of MDR1 and GST-pi in osteosarcoma and soft tissue sarcoma and their correlation with chemotherapy resistance [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2006, 28(6): 445-448.
- [35] Bruheim S, Bruland OS, Breistol K, et al. Human osteosarcoma xenografts and their sensitivity to chemotherapy [J]. *Pathol Oncol Res*, 2004, 10(3): 133-141.
- [36] Windsor RE, Strauss SJ, Kallis C, et al. Germline genetic polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: a pilot study [J]. *Cancer*, 2012, 118(7): 1856-1867.
- [37] Zhang SL, Mao NF, Sun JY, et al. Predictive potential of glutathione S-transferase polymorphisms for prognosis of osteosarcoma patients on chemotherapy [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6): 2705-2709.
- [38] Yang LM, Li XH and Bao CF. Glutathione S-transferase P1 and DNA polymorphisms influence response to chemotherapy and prognosis of bone tumors [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5883-5886.
- [39] Pasello M, Michelacci F, Scionti I, et al. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(16): 6661-6668.
- [40] Pasello M, Manara MC, Michelacci F, et al. Targeting glutathione-S transferase enzymes in musculoskeletal sarcomas: a promising therapeutic strategy [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2011, 34(3): 131-145.
- [41] Sau A, Filomeni G, Pezzola S, et al. Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines [J]. *Mol Biosyst*, 2012, 8(4): 994-1006.
- [42] Chou AJ, Merola PR, Wexler LH, et al. Treatment of osteosarcoma at first recurrence after contemporary therapy: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience [J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2214-2221.
- [43] Alberts DS, Muggia FM, Carmichael J, et al. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials [J]. *Semin Oncol* 31, 2004, (Suppl 13): S53-S90.

(收稿日期:2014-08-06)