

- [17] Westfall SD, Skinner MK. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(11): 1764-1771.
- [18] Wolf JK, Bodurka DC, Gano JB, et al. A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(2): 442-448.
- [19] Kmet LM, Cook LS, Magliocco AM. A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors [J]. *Cancer*, 2003, 97(2): 389-404.
- [20] Tang HJ, Jin X, Wang S, et al. A small molecule compound inhibits AKT pathway in ovarian cancer cell lines [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(2): 308-317.

## 卵巢癌化疗耐药相关基因与预后的研究进展

复旦大学附属妇产科医院(200011) 张雯碧综述 鹿欣审校

**摘要** 卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤,死亡率居妇科之首。化疗是目前治疗卵巢癌的重要手段之一。化疗耐药是影响晚期卵巢癌患者预后的主要原因。卵巢癌化疗耐药是多基因多因素共同参与的结果。近年来卵巢癌化疗耐药相关基因成为监测预后的指标。主要从细胞内有效药物浓度的降低(MDR基因,MRP,LRP,GST),药物作用的靶点异常(微管蛋白基因),DNA损伤修复功能异常(MMR,BRCA1基因)及细胞凋亡异常(p53,bcl-2基因、caspase,survivin基因)这四个方面对卵巢癌化疗耐药相关基因及其与预后作一综述。

**关键词** 卵巢癌 耐药机制 基因 预后

卵巢癌是当前死亡率最高的妇科恶性肿瘤之一。手术辅以化疗是其主要的治疗原则。然而化疗耐药严重影响了卵巢癌患者的化疗效果和生存质量,使患者5年生存率大大下降。卵巢癌化疗耐药机制包括很多,其中耐药相关基因的表达异常是一个重要因素。近年来卵巢癌化疗耐药相关基因成为监测预后的指标。既往研究表明,细胞内有效药物浓度的降低,药物作用的靶点异常,DNA分子损伤修复系统的改变,细胞凋亡调控的异常等均可引起耐药。本文从这几方面对化疗耐药相关基因与预后的研究进展作一综述。

影响细胞内有效药物浓度

### 一、多药耐药(MDR)基因

MDR基因是卵巢癌耐药中发现较早的基因。最近研究表明,MDR1和MDR3与耐药有关<sup>[1]</sup>。MDR1编码的蛋白产物P-gp,是依赖ATP的跨膜离子转运泵,当化疗药物进入细胞后,P-gp与之结合,通过ATP供能将药物排出细胞外。阿霉素、铂类等抗肿瘤药诱导细胞MDR1表达是导致卵巢癌治疗失败的主要原因。因此检测MDR1/P-gp表达水平可以预测耐药,调整化疗方案<sup>[2]</sup>。通过抑制MDR1的功能,可以逆转耐药。Ludwig等<sup>[3]</sup>发现,选择性地应用缩氨基硫脲的衍生物(NSC73306),可以作为减少MDR1表达阳性的肿瘤患者耐药的一种新途径。该剂并非通过传统地抑制P-gp去减少耐药,而是通过

激发P-gp产生细胞毒性,此细胞毒性与MDR1功能相关,从而减少细胞的MDR。近年来随着研究不断深入,又出现一些新的争论。Luan等建立了耐顺铂,卡铂和紫杉醇的细胞系SKOV3和A2780,发现不同的耐药细胞,其MDR1的表达存在差异。在不同的耐药细胞中,MDR1基因在mRNA和蛋白水平上的表达改变不确定,有升高也有降低。因此其作为耐药的预测价值有所降低。

二、多药耐药相关蛋白(MRP)与肺耐药相关蛋白(LRP)

MRP基因定位于16号染色体p13.3-13.12,编码1531个氨基酸。在正常组织中转运内源性物质和毒物的谷胱甘肽巯基复合物,主要转运负电荷分子,当正电荷药物进入细胞代谢变为负电荷后,即被MRP结合并排出细胞外。LRP与MRP基因相邻,定位于16号染色体p13.1-11.2,编码2688个氨基酸。其作用机制是通过阻止药物进入胞核或使入胞质的药物进入运输囊泡,以胞吐方式排出到胞外。两者都是通过降低细胞内药物浓度而致耐药。研究表明,卵巢癌耐药细胞MRP-1与LRP-1的表达较其非耐药细胞高<sup>[4]</sup>。因此其可以作为耐药的间接预测指标。但Katsaros等对115例卵巢癌病例研究后认为,MRP,LRP的表达不能用来预测化疗疗效和患者生存率。Materna等<sup>[5]</sup>观察了18例期卵巢癌患者发现,其总生存期与MRP2的表达无相关。

三、谷胱甘肽转移酶(GST)

GST家族在基因型上表现为多态性,其中

基金项目:上海市科委基础研究重点项目(编号:05JC14012)

收稿日期:2006-08-03 修回日期:2006-10-11

GSTM1, GSTT1 和 GSTP1 在卵巢癌中对铂类、烷化剂等抗癌化疗药物产生耐药性方面发生重要作用。其主要通过 GST 自身与亲脂性药物结合增加其水溶性, 促进外排而降低抗肿瘤药物的细胞毒作用。GST 在许多化疗耐药的肿瘤组织中出现中、高度表达, 其高表达在一定程度上预示着卵巢癌复发, 病程进展。Surowiak 等<sup>[6]</sup>发现, 在初次手术后的卵巢癌患者中, 高 GST 表达的患者, 其对顺铂耐药的可能性大, 预后不良。当抑制 GST 表达, 则肿瘤细胞对药物的敏感性增高。Zhang 等建立了耐顺铂的细胞株 COC1/DDP 和 SKOV3/DDP, 发现当耐药细胞中引入靶向干扰 GST 表达的 RNA 时, GST 表达下降, 耐药细胞对药物的敏感性有所增加。Beeghly 等<sup>[7]</sup>最近对 215 例卵巢癌患者研究亦发现, 通过抑制 GST 的功能可以提高卵巢癌患者术后化疗的敏感性及生存率。因此测定 GST 可预测卵巢癌患者的预后。

#### 药物作用靶点异常

细胞内的药物作用靶点及靶点与药物的亲和力改变可能也是卵巢癌耐药的机制之一。紫杉醇抗肿瘤机理是其能与细胞微管蛋白结合, 促进微管蛋白聚合, 抑制解聚, 阻断有丝分裂, 从而抑制肿瘤生长。既往研究认为紫杉醇的耐药主要与微管蛋白浓度减低、突变的和微管蛋白基因及微管蛋白亚型的表达改变等有关。在对紫杉醇的敏感性测试中发现, 微管蛋白基因突变与无突变患者中位生存期有显著差异<sup>[8]</sup>, 这说明微管蛋白在耐药中起重要作用。Mozzetti 等<sup>[9]</sup>研究了 41 例进展期卵巢癌患者, 结果发现在耐药细胞中未检测到突变的微管蛋白, 却发现了型微管蛋白在 mRNA 和蛋白水平上的表达增高, 且差异有显著性。这提示型微管蛋白可能是紫杉醇耐药的一个重要机制。

#### DNA 损伤修复异常

##### 一、DNA 错配修复基因(MMR)

已知人类 MMR 系统主要包括 hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH5, hPMS1 和 hPMS2 基因。MMR 在 DNA 损伤修复过程中发挥着重要的作用, 参与识别 DNA 错配、小的插入及缺失, 药物引起的 DNA 损伤等。当药物引起肿瘤细胞损伤后, 若错配修复基因发生修复作用, 则导致细胞不能被杀死, 从而导致耐药。hMLH1 是近年来研究较多的耐药相关基因。Scartozzi 等<sup>[10]</sup>为了研究 hMLH1 基因的表达与临床预后的关系, 给予 34 例卵巢癌患者铂类为主的联合化疗并检测 hMLH1 基因。根据 hMLH1 基因是否表达分成 A 和 B 两组, 两组患者临床特征、对药物

的反应以及疾病分期相似。19 例 (56%) hMLH1 基因无表达 (A 组), 15 例 (44%) 基因正常表达 (B 组)。结果发现 A 组患者平均存活 55 个月, B 组为 12 个月 ( $P=0.014$ ), 提示 hMLH1 基因丢失可使细胞修复作用减弱, 利于化疗药物作用, 减少卵巢癌细胞耐药, 从而改善卵巢癌患者存活时间。

##### 二、乳腺癌易感基因(BRCA1)

人 BRCA1 基因组 DNA 全长约 100kb, 约 5.6kb 的编码序列, 共 22 个编码外显子, 与家族遗传性乳腺癌和卵巢癌的发生发展相关。BRCA1 被认为是基因组的看护者, 在 DNA 修复中起重要作用, 维持基因组的完整。在耐药的卵巢癌细胞中, BRCA1 的高表达使细胞的修复能力增强, 从而使细胞不易被化疗药物杀死, 导致耐药。Husain 等发现, 在 MCF-7 与 SKOV-3 的顺铂耐药细胞株中 BRCA1 蛋白呈现高表达, 且 SKOV-3 细胞株中细胞修复在耐药中起了重要作用。Zhou 等<sup>[11]</sup>建立了 SNU-251 细胞株, 其携带了突变的 BRCA1 基因 (在编码第 1815 个氨基酸的密码子中从 G 突变为 A), 此突变不影响 BRCA1 的表达, 却可抑制 p53 基因激活转录 P21 蛋白, 使得受损细胞无法停滞于 G2/M 期, 从而抑制了 BRCA1 的修复损伤功能, 增强了肿瘤细胞对紫杉醇等化疗药物的敏感性。这说明 BRCA1 高表达可导致耐药, 而突变的 BRCA1 可用于增强紫杉醇化疗的有效性。

#### 凋亡相关基因

##### 一、p53

抑癌基因 p53 分为野生型 (wt) p53 和突变型 (mt) p53。正常细胞中以 (wt) p53 存在, 具有调控细胞周期和诱导细胞凋亡的作用。已知顺铂等多种抗癌药物主要通过诱导细胞凋亡发挥作用。当药物作用于肿瘤细胞后, 体内 p53 表达增加, 其转录激活 bax 蛋白产物与抑制凋亡的 bcl-2 结合, 促使肿瘤细胞凋亡。当 (wt) p53 表达阴性, 细胞表现为对化疗的耐药, 提示预后差。Petty 等对 59 例卵巢癌患者以 (wt) p53 表达阳性和阴性为标准分成两组给予顺铂化疗, 在化疗的第 6, 12 和 18 个月这 3 个阶段对患者病情进行统一评估。结果发现, 在 (wt) p53 阴性的患者中, 25% 的患者在第 6 个月发展为进展期, 在第 12 个月有 80%, 第 18 个月为 89%。相反, 在 (wt) p53 阳性的患者中, 其比例依次为 23%, 50%, 67%。这说明 (wt) p53 的不表达可导致细胞耐药, 从而使化疗缓解率与生存率降低。当 p53 突变为 (mt) p53 时, 细胞不能进入 p53 介导的凋亡途径, 并且激活 MDR

基因的表达,亦可导致细胞耐药。Metzinger 等<sup>[12]</sup>发现,从 c 期卵巢癌患者分离的肿瘤细胞,经过顺铂与紫杉醇的化疗后,化疗耐药的细胞内突变的 p53 比对照组明显升高。这说明了卵巢癌化疗耐药与 p53 的突变相关。因此 p53 可以作为预测化疗疗效的一个指标<sup>[13]</sup>。

## 二、bcl-2 基因

bcl-2 基因是重要的抗凋亡调控基因。正常情况下, p53 激活转录的 bax 基因产物与 bcl-2 蛋白结合,阻止了 bcl-2 抑制凋亡的作用,从而使细胞正常凋亡。但在耐药细胞里, bcl-2 基因表达增加,抗凋亡作用增强,使细胞凋亡受到抑制,从而使肿瘤细胞不死或死亡数目减少而导致耐药。研究表明,通过 bcl-2 低表达顺铂可诱导卵巢癌细胞凋亡, bcl-2 过度表达则抑制细胞凋亡,导致细胞对顺铂耐药,提示预后差<sup>[14]</sup>。但另一方面,有学者认为在卵巢癌耐药细胞 bcl-2 表达下调。Ferlini 等<sup>[15]</sup>建立了耐紫杉醇的 A2780 细胞系和耐紫杉醇和环孢素 A 的细胞系 A2780TC。发现随着用药剂量的增加,两种细胞系的 bcl-2 表达均下调。当 A2780TC 细胞系转染 bcl-2 后,其对紫杉醇的敏感性有部分恢复。这表明在卵巢癌耐药中 bcl-2 的低表达起了一定作用。bcl-2 高表达是预后良好的标志。现已有利用 bcl-2 反义核酸作为化疗增敏剂的临床研究<sup>[16]</sup>。

## 三、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)

caspase 家族介导凋亡蛋白酶联反应过程。caspase-3 是该家族中最重要的凋亡执行者。caspase-3 在 p53 的调节下,促使细胞色素 C 释放,使凋亡最终得以完成。促凋亡基因 bax, bak 和 bad 能诱导诱导线粒体释放细胞色素 C, 而抗凋亡基因 bcl-2, bcl-xl 等则抑制细胞色素 C 的释放。研究表明,在卵巢癌耐顺铂 A2780/DDP 和 COC1/DDP 细胞系中, caspase-3 的活性明显低于敏感卵巢癌细胞系 A2780 和 COC1。这可能是由于细胞受顺铂刺激后,在耐药细胞株中,过度表达的 bcl-xl 和 bcl-2 抑制了线粒体将细胞色素 C 释放至胞质,从而阻止特异性 caspase-3 依赖的信号传递,抑制凋亡的发生而产生耐药。通过增强 caspase 的活性,可部分恢复耐药细胞对顺铂的敏感性<sup>[17]</sup>。

## 四、survivin 基因

该基因是近年新发现的一种抗凋亡基因,位于 17q25。在卵巢癌组织中, survivin 的高表达与紫杉醇的耐药密切相关。目前认为, survivin 主要通过 caspase 依赖的途径实现其对细胞凋亡的抑制。研究

发现,在耐紫杉醇卵巢癌细胞中 survivin 过度表达,抑制细胞凋亡<sup>[18]</sup>。若使其 mRNA 和蛋白生成减少, caspase-3 和 caspase-9 的活性相应提高,则可以有效诱导细胞凋亡而恢复细胞对紫杉醇的敏感性。另有其他学者从细胞周期角度提出不同的见解<sup>[19]</sup>。认为紫杉醇主要作用在微管蛋白上,阻断细胞分裂的周期,诱发凋亡。由于微管蛋白的突变,即使有足够紫杉醇量诱发凋亡,还是存在对紫杉醇耐药的卵巢癌细胞,表现为在细胞分裂期对紫杉醇反应的缺陷。这个对细胞分裂期反应缺陷的表型与 p53 无关,而与细胞分裂的调控者 survivin 相关。研究发现,在对紫杉醇耐药的卵巢癌细胞中, survivin 是下调的。与那些敏感细胞相比,在耐药细胞中,紫杉醇无法诱导 survivin 及其磷酸化,使得细胞在分裂期对紫杉醇无反应,从而导致耐药。外源野生型 survivin 的表达可以恢复耐药细胞对紫杉醇的反应。相反,如果在药物敏感的卵巢癌细胞中引入 survivin 阴性的外源基因片段,可使敏感细胞对紫杉醇无反应。这说明 survivin 基因的表达可以提高细胞对紫杉醇的敏感性。虽然目前学者对 survivin 基因在卵巢癌耐药的作用机制看法仍不一致,但都认为 survivin 基因在卵巢癌化疗耐药中起重要作用。

除以上与卵巢癌耐药有关的基因外,还有很多因素参与耐药,如与药物转运相关的 P 型转运腺苷三磷酸酶(ATP7B),与 DNA 基因修复相关的拓扑异构酶,与凋亡信号调控相关的 PKC, PKA 等,其通过不同的机制与途径参与卵巢恶性肿瘤化疗的耐药。这说明肿瘤细胞的耐药现象是一个多基因、多因素、多水平共同参与的结果。因此研究卵巢癌化疗耐药的机制,可以利用其来预测临床化疗的效果,并为研制逆转其耐药的新药物及探索有效的靶基因治疗提供理论指导,最终改善卵巢癌患者的预后。

## 参 考 文 献

- [1] Duan Z, Brakora KA, Seiden MV. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(7): 833-838.
- [2] Krasznai ZT, Friedlander E, Nagy A, et al. Quantitative and functional assay of MDR1/P170-mediated MDR in ascites cells of patients with ovarian cancer [J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(2A): 1187-1192.
- [3] Ludwig JA, Szakacs G, Martin SE, et al. Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4808-4815.
- [4] Horvath V, Blarova O, Sihalikova-Sindlerova L, et al. Platinum (IV) complex with adamantylamine overcomes intrinsic resistance to cisplatin in ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 102(1): 32-40.
- [5] Materna V, Pleger J, Hoffmann U, et al. RNA expression of MDR1/

- P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 94(1): 152-160.
- [6] Surowiak P, Materna V, Kaplenko I, et al. Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients [J]. *Virchows Arch*, 2005, 447(3): 626-633.
- [7] Beeghly A, Katsaros D, Chen H, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100(2): 330-337.
- [8] Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, et al. Mechanisms of taxol resistance related to microtubules [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 7280<sup>①</sup> 7295.
- [9] Mozzetti S, Fertini C, Concolino P, et al. Class beta-tubulin over expression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(1): 298-305.
- [10] Scartozzi M, De Nicolis M, Galizia E, et al. Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage ~ ovarian cancer patients [J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(8): 1144-1149.
- [11] Zhou C, Smith JL, Liu J. Role of BRCA1 in cellular resistance to paclitaxel and ionizing radiation in an ovarian cancer cell line carrying a defective BRCA1 [J]. *Oncogene*, 2003, 22(16): 2396-2404.
- [12] Metzinger DS, Taylor DD, Gercel-Taylor C, et al. Induction of p53 and drug resistance following treatment with cisplatin or paclitaxel in ovarian cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2005, 28: 102-108.
- [13] Green JA, Berns EM, Coens C, et al. Alterations in the p53 pathway and prognosis in advanced ovarian cancer: A multi-factorial analysis of the EORTC gynaecological cancer group [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(15): 2539-2548.
- [14] Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, et al. HER-2/neu and bcl-2 in ovarian carcinoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular study in patients with shorter and longer survival [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2006, 14(2): 181-186.
- [15] Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, et al. Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(1): 51-58.
- [16] Kim R, Emi M, Tanabe K, et al. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy [J]. *Tutorial Cancer*, 2004, 101(11): 2491-2502.
- [17] Yang X, Fraser M, Modl UM, et al. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3126-3136.
- [18] Pennati M, Campbell AJ, Curto M, et al. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: a possible role of surviving down-regulation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(9): 1328-1337.
- [19] Zhou J, O'brate A, Zelnak A, et al. Survivin deregulation in beta-tubulin mutant ovarian cancer cells underlies their compromised mitotic response to taxol [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(23): 8708-8714.

## 卵巢癌基因治疗研究与进展

大连市妇产医院(116033) 席勇综述 邓燕杰审校

**摘要** 近年随着基础科学研究的不断深入,卵巢癌基因治疗研究成为热点,有的已进入临床实验阶段,且取得了一些显著的进展。卵巢癌基因治疗策略主要有抑制癌基因表达、恢复抑癌基因的功能、修复表达缺陷的基因、抗肿瘤多药耐药基因治疗、抗肿瘤血管生成基因治疗和基因免疫治疗等。

**关键词** 基因治疗 卵巢癌 癌基因 抑癌基因

卵巢恶性肿瘤是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,由于其组织类型较多,缺乏有效的早期诊断方法,且手术和放化疗疗效不佳,卵巢癌的5年生存率仍较低,成为严重威胁妇科肿瘤患者生命的恶性疾病。对于卵巢癌治疗的最近探索中,基因治疗令人瞩目,在动物实验及一些,和期临床患者研究中取得了一定疗效,成为继手术、化疗、放疗之后全新的一种前景广泛的治疗模式。

### 卵巢癌基因治疗机制

肿瘤发生是多步骤过程,包括了癌基因的激活和/或抑癌基因的失活作用而导致细胞增殖增强与凋亡受到抑制,卵巢癌的发生亦是与细胞增殖分化相关的癌基因、抑癌基因多阶段相互作用的结果。如:erbB, c-myc, k-ras等癌基因的突变与扩增和/或抑癌基因RB, p53, p16等的功能丧失均可导致肿瘤发生。通过基因治疗即把正常基因或重组治疗基因

经分子生物学技术手段转入异常细胞的DNA系统中,以抑制致病基因表达或修复缺陷基因表达,使基因表达产物起到治疗作用。目前,卵巢癌基因治疗方案主要有:自杀疗法;基因表达封闭;恢复抑癌基因的功能;抗肿瘤血管生成;抗肿瘤多药耐药(MDR)基因治疗;免疫学基因治疗。

### 卵巢癌基因治疗策略和技术方法

#### 一、自杀疗法

自杀基因又称为前体药物酶转化基因,其可将无毒的前体药物代谢为细胞毒性药物,可直接杀伤导入自杀基因的肿瘤细胞和旁杀伤周围未转染该基因的肿瘤细胞。目前,研究最多的为单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶核苷激酶基因(HSV-TK)治疗体系,其机制为把HSV-TK基因转染至肿瘤,使肿瘤细胞表达HSV-TK,能将抗病毒药物核苷类似物(GC)磷酸化,这种磷酸化产物可以阻断DNA的合成而使细胞死亡,并存在旁观者效应。经二次肿瘤细胞减灭术的