

Histone Acetylation and Its Roles in Transcriptional Regulation. REN Qinghu, TONG Tanjun (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Histone acetylation has profound effects on chromatin structure, and it is directly

linked to the gene activation of specific domains on genomic DNA. Histone acetylation is one of the most important ways in transcriptional regulation, functioning in the processes of cellular proliferation, differentiation and senescence.

Key words histone, acetylation, transcriptional regulation

MRP 基因与肿瘤的多药耐药性

毕 锋 张学庸 樊代明

(第四军医大学西京医院, 西安 710032)

摘要 在人肿瘤非典型性多药耐药机制的研究中发现了一个新的基因——多药耐药相关蛋白基因 (*MRP*)。该基因位于人 16 号染色体 P13: 3, 编码 1 531 个氨基酸。其产物为多药耐药相关蛋白 (*MRP*), 分子质量 190 ku, 故又名 p190。MRP 属 ABC 超家族成员, 主要分布在细胞的质膜上。MRP 的功能可能是在能量依赖的外排系统中发挥作用。除了一些肿瘤细胞系外, *MRP* 基因的高表达还见于一些血液系肿瘤及乳腺癌等。*MRP* 基因的高表达还可能与某些肿瘤的复发和预后有关。

关键词 多药耐药相关蛋白, 肿瘤, 抗药性, *MRP* 基因

肿瘤细胞的多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 一直是影响肿瘤化疗疗效的重要因素。近些年来, 肿瘤 MDR 发生机理的研究从以往单纯的细胞生物学机制的研究逐步发展到分子生物学机制的探讨, 特别是分子水平的研究进展较快。自 MDR1 基因的发现及分离成功后^[1], 又发现了许多与 MDR 相关的蛋白和基因。多药耐药相关蛋白 (multidrug resistant associated protein, *MRP*) 及其编码基因即是其中较重要的一个。

1 MRP 基因

尽管不少耐药的肿瘤细胞系和肿瘤患者有 P-糖蛋白 (由 *MDR1* 编码) 的高表达, 但仍有许多耐药的肿瘤细胞系无此现象。*MDR1* 在肿瘤患者中的表达也并不十分常见。这些均提示 P-糖蛋白的高表达显然不是肿瘤 MDR 的唯一因素, 肿瘤细胞的耐药机制还远未阐明。

1989 年, McGrath^[2] 在两株耐药细胞系 HL60/VCR 和 HL60/ADR 中发现, 尽管两者

胞内均有抗肿瘤药物浓度的减少, 但前者有 P-糖蛋白的表达, 后者却没有。维拉帕米又均能使两者细胞内药物的蓄积增加, 用 AZ ATP32 标记法发现在 HL60/ADR 的细胞膜上有一种亲本细胞中不存在的蛋白质, 分子质量为 190 ku。据此, 他们认为发现了一种新的耐药相关蛋白——p190, 并推测其功能可能是在能量依赖的外排系统中发挥作用。

Cole 等^[3] 在用阿霉素筛选的具有多药耐药性的小细胞肺癌细胞系 H69AR 发现: a. H69AR 无 *MDR1* mRNA 及其产物 P-糖蛋白的高表达; b. H69AR 中蓄积的阿霉素无明显外排现象; c. 环孢菌素 A 等化疗增敏剂可使 H69AR 的耐药逆转。因此他们开始寻找引起 H69AR 耐药的蛋白质。通过随机引物法建立 H69AR 的 cDNA 文库并经差式杂交进行筛选, 经用一个 2.8 kb 的 cDNA 进行杂交, 在 H69AR 中发现了一个强阳性克隆, 其浓度比

H69 高 100~200 倍, 约 7.8~8.2 kb. 其 mRNA 在 H69PR (部分逆转的 H69AR 细胞系) 中为 H69AR 的 1/10, DNA 印迹显示主要为基因扩增所致. 在阿霉素选择的 HeLa 细胞中, 这种 mRNA 亦比亲本细胞高 12~15 倍. 这些现象均提示该 mRNA 的增高与 MDR 密切相关.

经基因克隆及序列分析已证实 *MRP* 基因的 cDNA 为 5 011 bp, 位于 16 号染色体的 p13:1, 编码 1 531 个氨基酸^[3,4].

2 *MRP* 及其功能

如上所述, *MRP* 由 1 531 个氨基酸组成, 一级结构分析揭示为转运系统的 ABC (ATP binding cassette) 超家族^[3]. 该家族包括真核细胞和原核细胞的许多能量依赖性跨膜转运蛋白 (P-糖蛋白亦属于这一家族), 主要包括两组: 一组有 *MRP*, 利什曼原虫糖蛋白相关分子和囊性纤维化跨膜传导调节因子. 另一组有 P-糖蛋白, 5 类主要组织相容性复合物相连的肽转运泵, 细菌外排泵, 异囊分化蛋白, 疟原虫转运泵, 酵母菌结合因子转运泵等. 从 ABC 超家族的“家谱”上可以看出, *MRP* 为 ABC 超家族的“远亲”^[3].

与 P-糖蛋白 (主要分布在分泌性器管和组织) 不同, *MRP* 在外周血单个核细胞, 肺和睾丸中容易检测到; 但在胎盘、脑、肾、唾液腺却不易测到^[3]. 一般认为 *MRP* 主要存在于细胞的内质网和浆膜^[5,6], 其功能不甚清楚. 初步的研究结果显示可能与 P-糖蛋白相似, 主要是在依赖能量的外排系统中发挥作用, 但作用机制不同^[7,8]. Krishnamachary^[9] 用蛋白质杂交发现 HL60/ADR 细胞的浆膜和内质网上 *MRP* 比敏感细胞明显增高, 但其耐药性经药物逆转后 *MRP* 又大大下降.

3 *MRP* 基因与肿瘤耐药

Cole^[8] 将两个带有 *MRP* cDNA 的真核表达载体转入 HeLa 细胞后, 该细胞出现了明显的 MDR 表型: 对阿霉素 (ADM)、多那霉素

(DNR)、长春新碱 (VCR)、etoposide (VP-16) 的抗性增强了 5~10 倍. 细胞内 VCR 的蓄积减少了 45%, 除去 ATP 后 VCR 的水平恢复, 维拉帕米可呈剂量依赖地增强 VCR 和 ADM 对转染细胞的毒性, 而环孢菌素 A 仅对 VCR 有增强作用. 不过, 这两种药物的化疗增敏作用也出现在单用空载体转染的细胞中. 提示此作用的机理可能与 *MRP* 的表达无关. 总之, 转染 *MRP* cDNA 的耐药细胞具有部分但不是全部 *MRP* 高表达细胞系的特征.

神经胶质瘤是中枢神经系统的一种难治性恶性肿瘤, Abe^[10] 发现该肿瘤的两株亚系 IN500 和 T986 的 *MRP* mRNA 水平明显增高, 对 VP-16、VCR、ADM 高度耐药, 该肿瘤的其余五系对化疗药的敏感程度与其 *MRP* mRNA 水平明显相关, 他们由此认为 *MRP* 是自发人胶质瘤耐药的原因.

临床上检测 *MRP* 表达的研究刚刚开始, 研究最多的是白血病. Berger^[11] 用定量 RNA 酶保护法对 80 例慢性 B 淋巴细胞恶性疾病的检测显示, 32 例慢性 B 淋巴细胞性白血病 (B-CLL, 18 例化疗后, 14 例未化疗) 中, 20 例表达增高, 占 63%, 并且化疗后和未经化疗两组比较 *MRP* 的表达无显著性差异. 在 10 例前 B 淋巴细胞性白血病 (B-PLL) 中, 有 4 例表达增高, 占 40%. 其余 7 例毛细胞白血病、13 例非何杰金氏病和 18 例多发性骨髓瘤中, *MRP* 的 mRNA 水平均较低. DNA 印迹分析表明, 在 *MRP* mRNA 表达增高的病例中, 均未见 *MRP* 基因扩增. 他们认为, B-PLL 和 B-CLL 中 *MRP* mRNA 表达的增高可能是由于该基因转录激活或该基因 mRNA 的稳定性增加的缘故.

自 *MRP* 发现以来, 人们一直关心它与 *MDR1* 的关系, 但这方面的研究甚少. Beck^[12] 对 11 例慢性淋巴细胞性白血病的研究显示, *MRP* 和 *mdr1* 在化疗病人中的表达有相关性, 其中有两例病人化疗后的随访显示两者的表达随着病程进展均有增加.

4 MRP 与 MDR 的机理

确切地讲, *MRP* 与 *MDR* 的关系还不十分清楚, 迄今的研究主要在两者的表面关系上. 大多数研究者发现 *MRP* 高表达的耐药细胞系中有抗肿瘤药物外流的现象, 加之与 *P*-糖蛋白属同一家族, 因此推测 *MRP* 可能和 *P*-糖蛋白一样, 是一种存在于细胞膜上的外排泵.

谷胱甘肽-S-外排泵 (glutathione S-conjugate export carrier) 可呈能量依赖地促进哺乳类动物二价阴离子结合物向细胞外的排泄, 它在清除结合后的生物异物 (conjugated xenobiotics) 中起着重要作用. Muller 等^[13]发现 *MRP* 高表达的肿瘤细胞质膜上谷胱甘肽-S-外排泵的活性明显增强, 提示 *MRP* 可能是通过促进对抗肿瘤药物修饰产物的外排而引起 *MDR* 的. 这似乎与以往认为 *MDR* 与谷胱甘肽或谷胱甘肽转移酶相关的观点一致.

罗丹明 (Rhodamine 123, Rh123) 是一种可进入细胞线粒体的荧光染料. 常被作为 *P*-糖蛋白作用的底物而广泛应用于 *MDR* 的研究. Twentyman^[14]在研究小鼠腹腔肿瘤耐药细胞系 EMT6/AR1.0 (*P*-糖蛋白高表达细胞系) 时发现, 其对 Rh123 的抗性增强了 10 倍, 细胞内 Rh123 的蓄积也明显减少, 但在降低温度或用环孢菌素 A (5 g/L) 可使其抗性逆转. 相比之下, 人肺癌系 COR-L23/P 及其 *MRP* 高表达 (但无 *P*-糖蛋白表达) 耐药细胞系 COR-L23/R 摄取 Rh123 的速度虽在前 30 min 相似, 可以后逐渐出现差别, 到达 180 min 时, COR-L23/R 中只有 COR-L23/P 70% 的 Rh123. 共聚焦荧光显微境观察发现两种细胞中 Rh123 的分布相似. 在以后的 180 min 里, COR-L23/P 的 Rh123 无外流, 而 COR-L23/R 中 70% 的 Rh123 被排至细胞外, 降低温度虽可抑制 Rh123 的外排, 但环孢菌素 A 的抑制效果甚微. Versantvoort^[15]发现人小细胞肺癌耐药细胞系 GLC4/ADR (高表达 *MRP* 但无 *P*-糖蛋白表达) 中 DNR 比其来源的亲本细胞明显减少, 这种细胞中 DNR 的外

流是可饱和性的主动转运过程, 其 K_m 为 (1.4 ± 0.4) mmol/L, Genistein 可使此 K_m 值增加, 抑制 DNR 的外流, 提示它是 DNR 转运竞争性的抑制剂. 他们的研究还表明, GLC4/ADR 细胞中 DNR 的转运是一个蛋白质介导的过程, 该过程是能量依赖性的, 用叠氮钠或 D 型脱氧葡萄糖将细胞内 ATP 浓度降低至 2 mmol/L 时, DNR 的外流即被抑制. Genistein 亦可呈剂量依赖地降低细胞内 ATP 的浓度, 这可能也是它抑制 DNR 外流的原因之一, 由于 ATP 的浓度减少即可影响 DNR 的转运, 提示限制 ATP 供应可能是研究 *MDR* 逆转新的方向. Lorico^[16]也在小鼠白血病细胞系 WEHI-3B/NOVO 中发现了鼠的 *MRP* 基因. 该细胞系中 VP-16 浓度比亲本细胞低 3~4 倍, 由于 VP-16 是拓扑酶 II 的抑制剂, 故认为, *MRP* 先是减少了 VP-16 在细胞内的浓度, 从而减少了 VP-16 与拓扑酶 II 的共价结合物, 最终使其细胞毒性下降.

5 MRP 与肿瘤复发

除与肿瘤的 *MDR* 相关外, 有些学者也发现 *MRP* 与肿瘤的复发相关, 迄今为止的研究主要在血液系肿瘤. Schneida^[17]用定量反转录 PCR 分别检测了 *MDR1* 和 *MRP* 在急性髓系白血病 (AML) 和正常骨髓细胞中的表达, 发现两者的 mRNA 水平无明显差异. 而复发性 AML 患者 *MRP* mRNA 水平比正常人骨髓细胞高 2 倍 ($P < 0.01$), 配对分析表明 80% 复发者 *MRP* mRNA 增高而 *MDR1* mRNA 并不升高. 结果提示 *MRP* 表达增高与 AML 复发密切相关. Hart^[18]用反转录 PCR 分析了 105 例急性白血病患者 *MRP* 的 mRNA 水平, 结果表明比 AML 明显高; 复发者比初发者高. 而 *MDR1* 正常, 化疗对 *MRP* 的表达无明显影响. 他们认为 *MRP* 表达增高对白血病患者有预后意义.

总之, *MRP* 基因的发现使我们对肿瘤 *MDR* 的认识有了新的提高, 深入研究 *MRP* 及其他耐药相关基因, 将对我们认清肿瘤

MDR 机制, 研制新型化疗增敏剂以消除肿瘤抗药性, 最终消灭肿瘤有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Croop J M, Guild B C, Gros P *et al.* Genetics of multidrug resistance: relationship of a cloned gene to the complete multidrug resistant phenotype. *Cancer Res*, 1987, **47** (22): 5982~ 5988
- 2 McGrath T, Latond C, Arnold S T *et al.* Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells. Analysis of resistance associated membrane proteins and levels of *mdr* gene expression. *Biochem Pharmacol*, 1989, **38** (20): 3611~ 3619
- 3 Cole S P C, Bhardwaj J G, Gerlach J H *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 1992, **258** (5088): 1650~ 1654
- 4 Cole S P C, Deeley R G. Multidrug resistance associated protein: sequence correction. *Science*, 1993, **260** (5110): 879
- 5 Flenc M J, Izquierdo M A, Zaman G J R *et al.* Immunohistochemical detection of the multidrug resistance associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 1994, **54** (17): 4557~ 4562
- 6 Krishnamachary N, Center M S. The MRP gene associated with a non-p-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190 kDa membrane bound glycoprotein. *Cancer Res*, 1993, **53** (16): 3658~ 3661
- 7 Leier I, Jedlitschky G, Cole S P C *et al.* The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J Biol Chem*, 1994, **269** (45): 27807~ 27810
- 8 Cole S P C, Sparks K E, Fraser K *et al.* Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*, 1994, **54** (22): 5902~ 5910
- 9 Krishnamachary N, Ma L, Zheng L *et al.* Analysis of MRP gene expression and function in HL60 cells isolated for resistance to adriamycin. *Oncol Res*, 1994, **6** (3): 119~ 27
- 10 Abe T, Hasegawa S, Taniguchi K *et al.* Possible involvement of multidrug resistance associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. *Int J Cancer*, 1994, **58** (6): 860~ 864
- 11 Burger H, Nooter K, Sonneveld P *et al.* High expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) in chronic and prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 1994, **88** (2): 348~ 356
- 12 Beck J, Niethammer D, Gekeler V. High *mdr1* and *mrp*, but low topoisomerase II α gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemias. *Cancer Lett*, 1994, **86** (1): 135~ 142
- 13 Muller M, Meijer C, Zaman G J *et al.* Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (26): 13033~ 13037
- 14 Twentyman P R, Rhodes T, Rayner S. A comparison of rhodamine 123 accumulation and efflux in cells with P-glycoprotein mediated and MRP-associated multidrug resistance phenotypes. *Eur J Cancer*, 1994, **30A** (9): 1360~ 1369
- 15 Versantvoort C H, Broxterman H J, Lankelma J *et al.* Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 1994, **48** (6): 1129~ 1136
- 16 Lorico A, Rappa G, Srmatkandada S *et al.* Increased rate of adenosine triphosphate dependent etoposide (VP-16) efflux in a murine leukemia cell line overexpressing the multidrug resistance associated protein (MRP) gene. *Cancer Res*, 1995, **55** (19): 4352~ 4360
- 17 Schneider E, Cowan K H, Bader H *et al.* Increased expression of the multidrug resistance associated protein gene in relapsed acute leukemia. *Blood*, 1995, **85** (1): 186~ 193
- 18 Hart S M, Ganeshaguru K, Hoffbrand A V *et al.* Expression of the multidrug resistance associated protein (MRP) in acute leukaemia. *Leukemia*, 1994, **8** (12): 2163~ 2168

MRP Gene and Multidrug Resistance of Cancer. BI Feng, ZHANG Xueyong, FAN Daiming (*Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

Abstract A new gene which called multidrug resistant associated protein gene (MRP) was found in the study of the mechanism of multidrug resistance of cancer. The cognate gene is located on chromosome 16 at band P13: 3. Its mRNA encodes a member of the ATP-binding cassette transmembrane transporter superfamily with a mass of molecular 190 ku (p190). The MRP is mainly located on the plasma membrane and may play a role in the ATP dependent transport system. Further study indicates that apart from some kind of cancer cell lines, MRP overexpression was found in some blood malignancy, breast cancer, lung cancer and so on. The overexpression may be also related to the relapse of cancer.

Key words multidrug resistant associated protein, neoplasm, drug resistance, MRP gene