

# ABCG2 蛋白的研究现状

许义新(综述)/朱海英\*/胡以平(审校)

(第二军医大学基础部细胞生物学教研室,上海 200433)

**【摘要】** ABCG2 作为一种转运蛋白,在维持细胞自身稳定及机体正常生理功能等方面起着重要作用,其功能发挥受内外环境因素的影响。随着干细胞研究的不断深入,发现它直接参与了干细胞特性——SP 表型的形成,并且与肿瘤干细胞的多药抗性及其发生和临床治疗密切相关,所以 ABCG2 应用于肿瘤治疗的可能性也日益受到关注。

**【关键词】** ABCG2; 干细胞; 肿瘤干细胞; ABC 转运蛋白; SP 表型; 药物抗性

中图分类号: Q25

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)04-0344-03

ABCG2 蛋白 [ATP-binding cassette superfamily G (White) member 2] 是 ABC (ATP-binding cassette) 超家族成员之一,是一种 P-糖蛋白。随着干细胞研究的逐渐深入,肿瘤干细胞学说日益被接受和重视,此学说认为干细胞与肿瘤的发生、转移、治疗密切相关,因此分离和鉴定肿瘤干细胞 (tumor stem cell, CSC) 成为人们寻找肿瘤治疗方法的新突破口。SP (side population) 表型是肿瘤干细胞的特性之一,指细胞可以排除 Hoechst 33342 的特性,将利用该特性分离的细胞称为 SP 细胞 (side population cells)<sup>[1]</sup>,该特性的形成与 ABCG2 蛋白的表达有着密切的关系,所以,ABCG2 蛋白在肿瘤发生、诊断、治疗中潜在的应用前景也受到人们的关注。本文就 ABCG2 蛋白的基因及蛋白质结构、功能及影响因素、临床应用前景等方面的研究现状作一综述。

ABC 蛋白家族其它成员一般具有 2 个高度保守的位于胞质中的亲水的核苷酸结合区,并且至少还有 2 个疏水的与底物结合的跨膜区,但 ABCG 蛋白家族所有成员都只有 1 个位于胞质中的核苷酸结合区域,并且与 P-gp (P-糖蛋白) 和 MRP1/ABCC1 不同的是 ABCG 蛋白家族成员其核苷酸结合区在跨膜区前端 (即更靠近氨基端)。ABCG2 的跨膜区是 1 条肽链通过  $\gamma$  螺旋 6 次穿膜形成,膜外部分还包括 2~3 个糖基化位点<sup>[4]</sup>。核苷酸结合区域都包含 2 个序列基元<sup>[3]</sup>,被称为 Walker A 和 Walker B,其中 Walker A 含有赖氨酸及与之相配对的三磷酸腺苷  $\gamma$  磷酸盐 ( $\gamma$ -phosphate of ATP), Walker B 含有天冬氨酸及与其相互作用的  $Mg^{2+}$ 。在 ABC 蛋白家族的其它成员中还显著表达高度保守序列 Walker C,它们都与 ABC 家族蛋白的转运活性密切相关。

## 1 ABCG2 基因构成及蛋白质结构

ABCG2 基因定位于 4q22,长度大于 66 kb,包含 16 个外显子和 15 个内含子,由多药抗性蛋白 (multidrug resistance protein 1, MDR1) 基因和多药抗性相关蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MAP) 基因编码。除 MDR1 外其他的 MDR 基因被称作 BCRP (Breast Cancer Resistance protein) 基因,ABCG2 蛋白是一个 ABC 半转运蛋白 (half-transporter),与细胞对米托蒽醌 (mitoxantrone) 等药物的抗性相关。在以前的研究中曾经用 BCRP、MXR (mitoxantrone resistance protein) 基因以及胎盘 ABCP1 (ATP-binding cassette protein 1) 来命名该基因,现在人类基因术语委员会建议用 MXR/BCRP/ABCG2 为该基因重新命名<sup>[2]</sup>。

与 ABC 转运蛋白家族其它成员相比,ABCG2 在基因和蛋白质结构上有其自身的特点。从基因结构来看,ABCG2 基因启动子含 TATA 重复序列很少,但很可能含有 Sp1, AP1, AP2 位点以及在 CpG 岛下游区的 CCAAT 盒<sup>[3]</sup>。从蛋白质结构来看,真核生物的

## 2 ABCG2 蛋白的功能特性及影响因素

随着对 ABCG2 研究的日益深入,人们发现 ABCG2 的转运功能受到自身结构、机体微环境及性激素等多种因素共同调节。

首先就 ABCG2 蛋白自身而言,它是一种半转运物,必须形成同型二聚体后才具有转运底物的活性,这是否更利于 ABCG2 与 ATP 结合或者与膜定位有关,目前还不是十分清楚,但有推测认为与 ABCG2 仅有 1 个跨膜区有关<sup>[4]</sup>。并且跨膜区 (MSDs) 作为底物结合部位其构象变化还可以通过改变对底物的亲和力从而影响该蛋白的转运活性<sup>[5]</sup>。还有实验证明 ABCG2 蛋白氨基酸序列的第 482、446、557 位对其转运功能起着决定性的作用<sup>[6]</sup>。例如野生型 ABCG2 (其 482 位是精氨酸时) 将不表现出转运荧光染料诺丹明 123 (rhodamine 123) 及柔红霉素 (daunorubicin) 等抗肿瘤药物的能力,但突变型 (其 482 位为甘氨酸或苏氨酸) 可以转运该药物。然而 Hoechst 33342 及米托蒽醌等既可以被突变型转运也可以被野生型转运。这种 ABCG2 对于不同物质的转运情况的差异主

收稿日期: 2006-11-17; 修订日期: 2007-04-09

基金项目: 上海市自然科学基金 (05ZR14147)

作者简介: 许义新 (1986- ) 男,四川人,本科, E-mail: xuyixin241@yahoo.com.cn

\* Correspondence to: ZHU Hai-ying, E-mail: Zimmia69@gmail.com

要由于第 482 位氨基酸位于跨膜区靠近羧基末端的第三段的底物结合的袋状结构内,而氨基酸的改变导致了 ABCG2 与底物的盐桥相互作用以及袋状结构的改变,最终造成 ABCG2 的底物识别的改变。2004 年 Alqawi 等<sup>[7]</sup>证明 BCRP 氨基酸序列的第 482 位对底物的识别作用印证了上面的结论。

2004 年 P. Krishnamurthy<sup>[3]</sup>等证明低氧环境诱导 ABCG2 的高表达,并且不仅在体外培养的干细胞如此,在小静脉的正常低氧细胞环境下也是如此。这主要由于存在 bHLH-PAS 转录因子复合物,该异二聚体 (Hif- $\beta$  and Hif- $\alpha$ ) 又被称为低氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1 HIF-1)。正常情况下 Hif- $\alpha$  通过蛋白酶降解途径灭活,但当环境缺氧时 Hif- $\alpha$  是稳定的,并催化启动因子激活低氧效应元件 (hypoxia response elements HRE) 启动 ABCG2 的相应转录和翻译。2003 年 Doyle LA<sup>[8]</sup>等也发现在人体的心脏、肺以及骨骼肌等脏器中并没有 ABCG2 的转录。这些脏器的正常细胞环境含氧量都较高,是否又从侧面证明了上面的结论呢?另外根据我们以往的了解,人体的心脏、肺以及骨骼肌等脏器的修复和再生能力是很弱的,如果这的确是因为干细胞的活性低或数量少造成的,那么这提示 ABCG2 与脏器的修复,再生及干细胞之间可能存在某种联系。如果以上推论成立的话,在将来的治疗中可能可以尝为损伤脏器营造局部低氧环境来促进再生。

Allikmets R<sup>[9]</sup>等的研究认为 ABCG2 在胎盘的高表达是受到性激素的调节,这就提示我们 ABCG2 在两性机体的表达上很可能存在差异。随后 Jonker JW<sup>[10]</sup>等的研究不仅表明 ABCG2 在小鼠各器官的表达及其药物代谢动力学存在两性差异,还指出该差异与性激素受体表达有关。

此外 ABCG2 的分布还与其介导的内源底物有关,例如当叶酸盐含量过低时,ABCG2 主要分布于细胞内而不是在细胞膜上,这主要是有利于减少叶酸的积聚<sup>[11]</sup>。由于 ABCG2 表达与否、功能状态、组织分布等受诸多因素影响,所以在治疗相关疾病时可以对各种影响因素加以利用,做到趋利避害。

### 3 ABCG2 的功能及临床应用

#### 3.1 维持干细胞及多种组织细胞的稳定性

人们发现 ABCG2 参与 SP 表型形成,Zhou S<sup>[1]</sup>等在 ABCG2 基因敲除小鼠的研究中发现,骨髓细胞 SP 表型完全丢失,由此证明在骨髓细胞中 ABCG2 是唯一参与其 SP 表型形成的因素。研究发现多种干细胞表达 ABCG2 (但并不是所有的干细胞都有此特性,因此这也为 SP 表型与干细胞相关性研究带来了更多的问题和空间),这很可能与保护其免遭外源及内源毒素的侵害以维持干细胞的稳定性有关<sup>[12]</sup>。在低氧情况下,通过比较 ABCG2<sup>+/+</sup> 和 ABCG2<sup>-/-</sup> 祖细胞发现,ABCG2 表达明显升高,可通过减少比咯紫质 (porphyrin) 的大量聚集以维持低氧条件下干(祖)细胞的稳定<sup>[3]</sup>,很显然祖细胞表达 ABCG2 有利于其抵抗低氧环境的侵害。而小鼠体内的干细胞高表达 BCRP1,这可防止其受到有毒物质的侵害,有助于维持干细胞自身稳定<sup>[14]</sup>,所以有人假设 ABCG2 在干细胞中的作用相当于一种抵抗内外源毒素的保护剂。ABCG2 虽然是一种膜转运蛋白,但却有研究证明它可以直接对干细胞的功能产生影响,例如 Zhou S<sup>[1]</sup>等证明 ABCG2 在原始的小鼠造血干细胞里高水平表达,随着分化的进行 ABCG2 的表达显著下降,更重

要的是利用体外实验和体内移植试验证明强制表达该蛋白可以阻止造血系统的发育,后来的实验中发现将过表达 ABCG2 的骨髓细胞导入到受致死剂量辐射照射的小鼠体内,结果仅发现少量成熟的造血细胞,这说明 ABCG2 可以转运出促进细胞分化的关键底物以维持祖细胞的未分化状态<sup>[14]</sup>。

正常的组织器官也能表达 BCRP,例如在小肠和结肠的上皮顶膜细胞,肝细胞都有明显的表达<sup>[15]</sup>,其主要作用是通过逆转运的方式调节器官组织从环境中摄取酶作用底物。但更重要的是 ABCG2 还高表达于脑细胞,通过增强转运和排除的方式限制异生物及其类似物穿透、进入血脑屏障,以保护脑实质免受侵害<sup>[16]</sup>,这对人体有着十分重要的保护作用。而 ABCG2 在生殖系统,如前列腺,子宫及睾丸的高表达对维持遗传的稳定性更是不可缺少的<sup>[17]</sup>,这一作用也主要通过其转运和排除外源及内源有害物质以保证生殖细胞的稳定性来实现。更值得一提的是 Maliepaard M<sup>[15]</sup>等用两种单克隆抗体 BXP-21 和 BXP-34 定位 ABCG2 在人体中的分布时发现,人体胚盘合体滋养层 (placental syncytiotrophoblasts) 的 ABCG2 表达最高。虽然其原因现在还不十分清楚,但十分引人注意的是胚泡与子宫内膜的遗传构成完全不同,通常异体细胞植入体内会发生免疫排斥,而子宫内膜非但不排斥胚泡,反而容纳并促进胚泡发育,提示存在免疫屏障与免疫耐受作用。这种作用是否确实与胚盘合体滋养层的 ABCG2 高表达有关还有待于进一步实验的证实,但若这一结论成立则能提示 ABCG2 对维持胚胎发育过程的正常进行可能具有重要作用。

#### 3.2 参与肿瘤干细胞多药抗性的形成

根据肿瘤干细胞学说,肿瘤组织是由分化程度不同的细胞构成的,但只有肿瘤干细胞具有形成肿瘤的能力,并且越来越多的研究证明 SP (Side population) 表型已逐渐成为分离肿瘤干细胞的候选标志<sup>[18]</sup>。同时 C. Hirshmann-Jax<sup>[19]</sup>等也指出只有部分细胞具有 SP 表型表达 ABCG2, non-SP 细胞对常用的抗癌药物敏感性要大于 SP 细胞,这是细胞的 SP 表型导致其对药物敏感性的下降的直接证据。由 ABCG2 表达与 SP 表型的直接相关性可知细胞对药物敏感性的下降是 ABCG2 的表达造成的。在使 BCRP cDNA 表达于不同类型细胞的转染实验中<sup>[8,20]</sup>,均发现具有多种抗肿瘤因子抗性,而且药物在细胞内的积聚明显减少了。所以我们推测恶性肿瘤难以根除的原因之一是癌干细胞或肿瘤中的 SP 细胞表达 ABCG2 而形成多药抗性,造成治疗效果不理想。

正常细胞也表达 ABCG2 给肿瘤治疗带来了一个严重的问题,我们希望通过诱导癌干细胞分化或抑制其干细胞状态以除去肿瘤干细胞或使恶性肿瘤转为良性<sup>[21]</sup>,可是如果我们单一的使用 Tryprostatin A<sup>[22]</sup>, GF120918<sup>[23]</sup>等阻断 ABCG2 的表达或转运作用,也极可能破坏人体正常生理功能,这无疑更不利于肿瘤病人的健康。如何使有关 ABCG2 表达和功能的抑制因子靶向的作用于肿瘤组织,而不影响正常组织成了急需解决的首要问题。现已发现去甲氧柔红霉素和一种蛋白酶抑制剂联合使用可专门杀死急性髓系白血病干细胞,而对正常的造血干细胞无损伤<sup>[24]</sup>。同时,也发现表鬼白毒吡喃葡萄糖苷,争光霉素等能有效杀死睾丸精母细胞癌中未分化的肿瘤细胞,而保留足够的精原细胞干细胞,保证了病人的生育能力<sup>[25]</sup>,这都为肿瘤的治疗带来了新的曙光。总之,对比正常细胞与肿瘤细胞中 ABCG2 表达状态和功能状态,找出



不同点,以寻求合适的药物靶向作用于肿瘤细胞及肿瘤干细胞,而不对正常细胞产生影响,可能会成为肿瘤治疗的新的研究方向。

### 参考文献:

- [1] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, *et al.* The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype [J]. *Nat Med*, 2001,7(9):1028-1034.
- [2] Min Kim, Turnquist H, Jackson J, *et al.* The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells[J]. *Clin Can Res*, 2002,8(1):22-28.
- [3] Krishnamurthy P, Schuetz JD. Role of ABCG2/BCRP in Biology[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006,46:381-410.
- [4] Qingcheng Mao, Jashvant D, Unadkat. Role of the cancer resistance protein(ABCG2) in drug transport[J]. *The AAPS Journal*, 2005,7(1):118-134.
- [5] Zhang W, Mojsilovic-Petrovic J, Andrade MF, *et al.* The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels[J]. *FASEB J*, 2003, 17(14):2085-2087.
- [6] Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, *et al.* Mutations at amino acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity[J]. *Br J Cancer*, 2003,89(10):1971-1978.
- [7] Alqawi O, Bates S, Georges E, *et al.* Arginine482 to threonine mutation in the breast cancer resistance protein ABCG2 inhibits rhodamine 123 transport while increasing binding[J]. *Biochem J*, 2004,382(Pt 2):711-716.
- [8] Doyle LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) [J]. *Oncogene*, 2003, 22(47):7340-7358.
- [9] Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, *et al.* A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance [J]. *Cancer Res*, 1998,58(23):5337-5339.
- [10] Merino G, van Herwaarden AE, Wagenaar E, *et al.* Sex-dependent expression and activity of the ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein(BCRP/ABCG2) in liver[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(5):1765-1771.
- [11] Ifergan I, Shafran A, Jansen G, *et al.* Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression. A role for BCRP in cellular folate homeostasis[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(24):25527-25534.
- [12] Loo TW, Clarke DM. Mutations to amino acids located in predicted transmembrane segment 6 (TM6) modulate the activity and substrate specificity of human P-glycoprotein[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(47):14049-14057.
- [13] Wadkins RM, Hyatt JL, Yoon KJ, *et al.* Discovery of novel selective inhibitors of human intestinal carboxylesterase for the amelioration of irinotecan-induced diarrhea: synthesis, quantitative structure-activity relationship analysis, and biological activity[J]. *Mol Pharmacol*, 2004.65(6):1336-1343.
- [14] Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, *et al.* Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cell in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells *in vivo* [J]. *PNAS*, 2002,99(19):12339-12344.
- [15] Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, *et al.* Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(8):3458-3464.
- [16] Isterino S, Mercier C, Bourasset F, *et al.* Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(9):3296-3301.
- [17] Fetsch PA, Abati A, Litman T, *et al.* Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues[J]. *Cancer Lett*, 2006,235(1):84-92.
- [18] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, *et al.* Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6207-6220.
- [19] Hirshmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells[J]. *PNAS*, 2004,101(39):14228-14233.
- [20] Bates SE, Robey R, Miyake K, *et al.* The role of half-transporters in multidrug resistance[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2001, 33(6):503-511.
- [21] Pierce GB, Speers WC. Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation[J]. *Cancer Res*, 1988,48(8):1996-2004.
- [22] Woeckle H, Osada H, Hermann A, *et al.* Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A[J]. *Int J Cancer*, 2003,107(5):721-728.
- [23] Bruin M, Miyake K, Litman T, *et al.* Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR[J]. *Cancer Lett*, 1999, 146(2):117-126.
- [24] Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, *et al.* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells [J]. *PNAS*, 2002, 99(25):16220-16225.
- [25] Stephenson WT, Poirier SM, Rubin L, *et al.* Evaluation of reproductive capacity in germ cell tumor patients following treatment with cisplatin, etoposide, and bleomycin[J]. *J Clin Oncol*, 1995,13(9):2278-2280.