

- [14] Gupta SP, Nagappa AN. Design and development of integrase inhibitors as anti-HIV agents[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(18):1779-1794.
- [15] Jing NJ, Xiong WJ, Guan YL, et al. Potassium-dependent folding: a key to intracellular delivery of G-quartet oligonucleotides as HIV inhibitors[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(17):5397-5403.
- [16] Tarrago-Litvak L, Andreola ML, Fournier M, et al. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase: classical and emerging therapeutical approaches[J]. *Curr Pharm Des*, 2002, 8(8):595-614.
- [17] de Soultrait VR, Caumont A, Parissi V, et al. A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase [J]. *J Mol Biol*, 2002, 318(1):45-58.
- [18] Mitchell SS, Faulkner DJ, Rubins K, et al. Dolastatin 3 and two novel cyclic peptides from a palauan collection of *Lyngbya majuscula*[J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(2):279-282.
- [19] Parrill AL. HIV-1 integrase inhibition: binding sites, structure activity relationships and future perspectives[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(18):1811-1824.

## 肝豆状核变性基因与肿瘤耐药的研究进展

孙宇萍<sup>1</sup>, 王树滨<sup>1</sup>综述 陈伟<sup>1</sup>, 杨纯正<sup>2</sup>审校

(1. 暨南大学第二附属医院深圳市人民医院肿瘤研究所, 广东 深圳 518020;

2. 中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

**摘要:** 肝豆状核变性基因(ATP7B)定位于13q14.3区,编码一种铜转运P型ATP酶。ATP7B的突变使其蛋白缺乏或丧失转运肝铜的功能,导致肝、肾和脑等组织铜累积过多,表现为慢性肝病和(或)神经损害,ATP7B蛋白对铜的转运机制尚未明了。ATP7B在多种肿瘤细胞中表达对顺铂耐药,研究表明ATP7B除了是铜的转运蛋白外,还可能转运顺铂,但转运位点不清楚。ATP7B可能是一个新的肿瘤化疗耐药指标。

**关键词:** 肝豆状核变性; 顺铂; 多药耐药

**中图分类号:** R979.1; Q343.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)02-0069-04

肝豆状核变性基因铜转运P型三磷酸腺苷酶(copper-transporting P-type adenosine triphosphatase, ATP7B)定位于13q14.3区,因其蛋白产物为一种铜转运ATP酶而得名,cDNA序列长4 233 bp,含有22个外显子,编码1 411个氨基酸,主要存在于肝脏和脑中。

### 1 ATP7B的发现

1993年,Yamaguchi等<sup>[1]</sup>用铜和Menkes致病基因(ATP7A)作为探针,筛选人肝细胞互补DNA文库,经过第三次亚克隆和序列过筛后有65个细胞系呈阳性反应,其中一个细胞系包含一个开放读框,与Menkes蛋白有65%的同源性;Southern印迹法分析表明,该cDNA在肝豆状核变性(Wilson's disease, WD)患者中位于13号染色体上,在这个cDNA上检测到一个7.5 kb的转录产物,此产物存在于缺乏

Menkes转录产物的肝细胞和细胞系中,在WD患者的肝细胞中缺乏。这些数据表明,此cDNA是WD的候选基因,编码的蛋白是P型ATP酶家族中的一份子。随后,Tanzi等<sup>[2]</sup>用连锁不平衡和单倍型分析法确定WD基因位于13q14.3上,连锁图数据提供了ATP7B是WD基因的确切证据。

### 2 ATP7B的结构

ATP7B基因包含22个外显子,它的转录产物约为7.5 kb大小,编码一个主要表达在肝、肾和胎盘的蛋白。ATP7B蛋白属于铜转运P型ATP酶,一般特征含有TGEA基序(磷酸酶结构域)、DKTGT基序(磷酸化结构域)、TGDN基序(ATP结合结构域)和连接ATP结合结构域与跨膜片段的MXGDGXNDXP序列。在它的N端含有6个金属结合基序及膜内区域的CPC基序、SEHPL基序和8个跨膜片段<sup>[3]</sup>,金属结合基序对铜有特异性,它们的突变可以降低蛋白对铜的亲和力<sup>[4]</sup>;CPC和SEHPL基序与金属的跨膜转

收稿日期:2003-07-09

基金项目:深圳市科技计划资助项目(200204018)

运有关。Hung 等<sup>[5]</sup>认为,ATP7B 的 CPC 区域的突变阻止了依赖此蛋白进行的铜转运。

### 3 ATP7B 的表达

ATP7B 由肝细胞系中的一个 163 ku 的单链细胞内膜蛋白合成。在脑中发现有缺乏第 6,7,8 和 12 号外显子的 WD mRNA 存在,编码一种缺少第一跨膜区域的 WD 蛋白。体外研究表明,一般条件下 ATP7B 位于肝胚细胞瘤细胞的高尔基体内,并有转运铜的功能,铜的暴露可导致 ATP7B 从高尔基体快速移动到尚未明确的外周小囊状区域,也有关于铜使 ATP7A(Menkes 病蛋白)从高尔基体到浆膜的快速转运的报道<sup>[5]</sup>,关于铜导致蛋白转运的生理学意义有待进一步明确。

### 4 ATP7B 的生物学特性和功能

#### 4.1 ATP7B 与铜离子的转运

铜依靠它的氧化还原特性来实现部分酶的生理功能,然而,铜在体内过量蓄积是有毒的。因此,机体的重要防御机制之一就是部分细胞内过量的铜离子泵到细胞外环境。ATP7B 蛋白在肝脏内起着转运铜的作用,主要通过两种途径:(1)通过合成血清铜蓝蛋白,将铜排入入血浆;(2)通过胆汁排泄。后一途径中铜以囊泡状转运到溶酶体进而传送到细胞膜上的细管<sup>[6]</sup>。Hung 等<sup>[5]</sup>将 ATP7B cDNA 导入一个缺乏内在转运蛋白 Ccc2 的酵母菌株内进行铜转运蛋白的重构,为 ATP7B 在铜转运和血清铜蓝蛋白生物合成中的作用提供了依据。为了更进一步明确体内 ATP7B 在铜转运和血清铜蓝蛋白生物合成中的作用,Terada 等<sup>[7]</sup>将 ATP7B cDNA 导入一种 WD 动物模型——朗-伊文思肉桂(Long-Evans cinnamon, LEC)大鼠,这种模型缺乏 ATP7B 的鼠性同系物 *atp7b* 的表达。ATP7B 在 LEC 大鼠肝细胞的高尔基体内表达,用负载 ATP7B cDNA 的腺病毒重组体感染后可检测到铜蓝蛋白的排泄、铜的结合和蛋白的活性形式,这些数据表明,ATP7B 在铜转运和铜蓝蛋白合成中的功能可能发生在高尔基体内。另外,导入 ATP7B 后可观察到肝细胞溶酶体部分的含铜量有所增加,表明以 ATP7B 作为铜的排泄通道需要通过溶酶体,所有这些数据都为 ATP7B 转运铜到高尔基体和溶酶体胆道排泄途径的理论提供了有力的依据,由此可见 ATP7B 在肝细胞中调节铜的代谢平衡<sup>[8]</sup>。

#### 4.2 ATP7B 与 WD

WD 是一种铜转运障碍的常染色体隐性遗传性疾病,它的特征是胆道铜排泄缺陷和铜代谢紊乱导致的慢性多发性神经病变,体内铜累积过多,主要在肝,此外还有脑、肾<sup>[9]</sup>。已经证实 ATP7B 即为该病的致病基因。正常情况下,铜被浆膜中的转运蛋白摄入肝细胞,形成铜-配体复合物并被 ATP7B 转运到高尔基体,继而与  $\alpha 2$  球蛋白合成铜蓝蛋白分泌入血。在 WD 中,由于 ATP7B 基因的突变导致其蛋白功能的缺陷,妨碍铜进入高尔基体合成铜蓝蛋白,导致血清铜蓝蛋白含量减少和胆汁中铜排泄量降低,过量的游离铜沉积在肝、脑、肾和骨中,引起肝、脑、肾等组织的损害。已有近 200 种 ATP7B 的特异性突变被鉴别出来<sup>[10]</sup>,这些突变包括单一碱基对突变、缺失、移码、连接错误甚至替代 ATP7B mRNA 上游非编码区域,最常见的突变是 H1069Q,位于临界的 SEHPL 基序<sup>[5]</sup>。ATP7B 结构和功能的研究要求从体内和体外一起分析该蛋白在肝铜代谢稳定中的作用,为未来 WD 治疗的研究提供重要的信息。

#### 4.3 ATP7B 的耐药机制

国外有些关于 ATP7B 与肿瘤细胞顺铂耐药关系的报道。Komatsu 等<sup>[11]</sup>用 ATP7B cDNA 转染人表皮样瘤 KB-3-1 细胞,转染产物 KB/WD 细胞系可过度表达 ATP7B 蛋白,同时对顺铂(8.9 倍)和铜(2.0 倍)耐药,但对其他的重金属敏感,例如镉、砷酸盐、镉和钴。在 KB/WD 细胞中累积的顺铂含量低于模拟转染的 KB/CV 细胞,当细胞在含有 20, 40 和 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  顺铂的介质中孵育后,KB/WD 细胞内的铂水平分别约为 KB/CV 细胞内的 56%, 61% 和 59%;为了进一步检测 KB/WD 细胞内的顺铂累积量降低是因为流出增加还是吸收减少,将 KB/WD 和 KB/CV 细胞孵育在 500  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  顺铂中 37℃ 下 10 min,然后置于无顺铂环境下 30 min,结果在 KB/WD 细胞中顺铂剩有 81.9%,而 KB/CV 细胞没有顺铂的流出,表明 KB/WD 细胞中顺铂的流出量比 KB/CV 细胞有所增加;2,4-二硝基苯酚能阻止 ADP 磷酸化成 ATP,在流出实验中加入 2,4-二硝基苯酚后 KB/WD 细胞中顺铂累积量有 1.6 倍的提高,而 KB/CV 细胞没有,因此,ATP7B 在 KB/WD 细胞中的表达似乎与转运顺铂并且与它的耐药相关。Katano 等<sup>[12]</sup>观察三对人卵巢癌细胞系中顺铂与铜的关系,每对细胞系中都包含一个亲代细胞和顺铂耐药细胞系。实验发现,1 h 耐药细胞系中顺铂的累积量是亲代细胞的 38% ~ 67%,DNA 与顺铂的结合

率为敏感细胞的 10% ~ 38%, 并且耐药细胞中铜的累积量仅占敏感细胞的 27% ~ 46%, 显示在这些耐药细胞中存在着一个或两个铜转运泵(ATP7A 或 ATP7B)。结果表明, 顺铂在耐药细胞中摄取及转运的过程和途径与铜离子相似, 可能就是通过铜转运泵起作用的。这表明, ATP7B 可能在某些肿瘤中涉及顺铂耐药, 然而其结合顺铂的位点不清楚。这是首次报道一个重金属转运 P 型 ATP 酶家族成员与顺铂耐药有关并且转运顺铂及其代谢物。

#### 4.4 ATP7B 表达在肿瘤患者中的临床意义

通过 ATP7B 对顺铂耐药的体外研究, 有学者提出 ATP7B 基因的表达能增加肿瘤细胞对顺铂耐药的假说, 并推测它的表达对指导治疗十分重要。Nakayama 等<sup>[13]</sup>用 RT-PCR 方法来研究 ATP7B 基因在卵巢癌中的作用并将它的表达与多药耐药(multidrug resistance, MDR)相关的转运蛋白 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白 1(multidrug resistance-associated protein 1, MRP1)、多药耐药相关蛋白 2(MRP2)、低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)和乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)相比较, 试验对象为 82 例手术后以顺铂为基础进行化疗的卵巢癌患者, 试验结果显示, ATP7B 表达与那些 MDR 相关转运蛋白没有明显相关性, ATP7B 的表达水平在以顺铂为基础进行化疗的中/低度分化的卵巢癌患者中明显增高。这些发现表明, ATP7B 可作为一个新的肿瘤化疗耐药指标, 而且 ATP7B 的抑制剂在这些患者中可能有用。随后有学者对 ATP7B 在体内不同肿瘤细胞中的表达进行了一系列研究, 都得出相似的结论, 即 ATP7B 表达在分化较差的肿瘤患者中可能是一个化疗耐药指标<sup>[14,15]</sup>。Higashimoto 等<sup>[16]</sup>研究 ATP7B 在食道癌中的表达时发现, 其与年龄、性别、TNM 分期及病理组织学分级等临床特征无明显相关性。Miyashita 等<sup>[17]</sup>用免疫组织化学方法研究 ATP7B 在口腔鳞状细胞癌中的表达及与预后的关系时发现, ATP7B 阳性患者对以顺铂为基础化疗的反应及生存期明显比 ATP7B 阴性患者差, 这表明 ATP7B 在口腔鳞状细胞癌中的高水平表达与以顺铂为基础进行化疗的该病患者的不良临床预后有关。

## 5 结语

ATP7B 为肝豆状核变性的致病基因。目前,

ATP7B 在肿瘤 MDR 方面引起了人们的关注。随着研究的深入, 更多的问题有待解决: (1) ATP7B 的基因突变; (2) ATP7B 的调控; (3) ATP7B 的基因治疗; (4) ATP7B 的正常生理功能; (5) ATP7B 在正常及肿瘤组织的表达; (6) ATP7B 的逆转及其临床意义; (7) ATP7B 与顺铂耐药机制的关系等。这些研究成果对于指导临床化疗用药、对病情发展和预后的正确评价有着重要的意义。在 WD 方面, 对 ATP7B 突变的研究日渐成熟, 也为以后对 WD 的基因治疗提供了一个有利的途径。

#### 参 考 文 献

- [1] Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(1):271-277.
- [2] Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene[J]. *Nat Genet*, 1993, 5(4):344-350.
- [3] Lutsenko S, Efremov RG, Tsivkovskii R, et al. Human copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein): biochemical properties and regulation[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2002, 34(5):351-362.
- [4] Huster D, Lutsenko S. The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34):32212-32218.
- [5] Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, et al. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(34):21461-21466.
- [6] Cox DW, Moore SD. Copper transporting P-type ATPases and human disease[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2002, 34(5):333-338.
- [7] Terada K, Nakako T, Yang XL, et al. Restoration of holo-ceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(3):1815-1820.
- [8] Mercer JF, Barnes N, Stevenson J, et al. Copper-induced trafficking of the cU-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis[J]. *Biomaterials*, 2003, 16(1):175-184.
- [9] Harada M. Wilson disease[J]. *Med Electron Microsc*, 2002, 35(2):61-66.
- [10] Kovacevic I, Zekan M. Wilson's disease[J]. *Acta Med*

- Croatica*, 2003, 57(3):227-235.
- [11] Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(5):1312-1316.
- [12] Katano K, Kondo A, Safaei R, *et al.* Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22):6559-6565.
- [13] Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP[J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(5):488-495.
- [14] Nakayama K, Miyazaki K, Kanzaki A, *et al.* Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2001, 8(6):1285-1287.
- [15] Ohbu M, Ogawa K, Konno S, *et al.* Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human gastric carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2003, 189(1):33-38.
- [16] Higashimoto M, Kanzaki A, Shimakawa T, *et al.* Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase in human esophageal carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(3):337-341.
- [17] Miyashita H, Nitta Y, Mori S, *et al.* Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a chemoresistance marker in human oral squamous cell carcinoma treated with cisplatin[J]. *Oral Oncol*, 2003, 39(2):157-162.

## 多发性骨髓瘤治疗的突破

李元敏编译

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:** 多发性骨髓瘤这种预后极差的疾病,近 20 多年来涌现了一些极有前景的疗法,包括沙利度胺及其类似物、蛋白酶体抑制剂、三氧化二砷、自体与异体造血干细胞移植及其为提高疗效而在多方面所做的尝试等。治疗此病继发性骨病损有效的二膦酸类药物,也出现了几种新一代疗效更好的药物。这些进展都为缓解症状、提高生活质量、延长存活期给患者带来了希望。细胞遗传学还发现,此病患者中染色体的数目和结构异常是多见的,而且有些异常与预后密切相关。

**关键词:** 多发性骨髓瘤; 沙利度胺; 二膦酸类; 造血干细胞移植; 细胞遗传学

**中图分类号:** R979.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)02-0072-04

于 1962 年引入美法仑疗法之前多发性骨髓瘤患者的预后极差,出现症状后的中位数存活期仅 17 个月且几乎 100% 死亡。美法仑疗法对存活的增长幅度不大,但却是一个突破。此后 20 年试用了多种化疗药物的伍用,其中由长春新碱、多柔比星和地塞米松组成的 VAD 方案逐渐成为标准疗法,但仍对存活无大影响。

20 世纪 80 年代初期异体和不久后开展的自体骨髓移植成为多发性骨髓瘤的新疗法,使总存活率明显提高。90 年代由于对多发性骨髓瘤的发病机制在分子水平上有了新的认识及一些新药物的使用,致使多发性骨髓瘤的治疗又有了新的突破。下面分别叙述一些有前途的疗法。

### 1 沙利度胺

1994 年两组学者分别报道了沙利度胺的抗血管生成作用对于肿瘤生成的抑制作用,从而启发了以沙利度胺治疗多发性骨髓瘤的研究。此后便开始了一项临床试验观察沙利度胺对于难治性多发性骨髓瘤的疗效:给 84 例先前接受过大剂量化疗的患者开始时口服  $200 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ,每 2 周将日剂量提高 200 mg 直到 800 mg,共治疗 80 d,结果 32% 的患者在治疗 2 个月内其副蛋白水平至少降低 25%。将该项试验扩展到 169 例,37% 的病人副蛋白有大于 25% 的降低,并有 2 例获得完全缓解。这一高危人群的 2 年总存活率为 48%,且无事件(event-free)存活率为 20%。这些令人鼓舞的结果也为其他的临床试验所证实,即复发性多发性骨髓瘤的治疗反应率为