

甘草次酸逆转肿瘤多药耐药机制的研究进展

梁亚冰, 苏秀兰^{*}(内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心, 呼和浩特 010050)

摘要: 甘草次酸属五环三萜类化合物, 是中药甘草的重要活性成分, 具有抗炎、抗病毒、抗溃疡、免疫调节等广泛的药理活性, 近年来发现甘草次酸具有广谱的抗肿瘤作用, 其抗肿瘤作用机制也得到了广泛研究。肿瘤多药耐药机制十分复杂, 且目前在肿瘤的临床治疗中, 仍然是化疗所面临的障碍和挑战。甘草次酸具有药理活性好, 低毒性的优点, 已经展现出对肿瘤多药耐药的逆转作用, 具有在多种化疗药物引起的化学抵抗中成为化疗增敏剂的潜力。本文论述了肿瘤多药耐药的发生机制及甘草次酸逆转肿瘤多药耐药机制研究进展。

关键词: 甘草次酸; 逆转; 肿瘤; 多药耐药

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)09-1151-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.026

引用本文: 梁亚冰, 苏秀兰. 甘草次酸逆转肿瘤多药耐药机制的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1151-1154.

Research Progress on Glycyrrhetic Acid Reversal of Multidrug Resistance in Tumor

LIANG Yabing, SU Xiulan^{*}(Clinical Medical Research Center of the Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Huhoot 010050, China)

ABSTRACT: Glycyrrhetic acid(GA) is belong to pentacyclic triterpene which is a major active ingredient in licorice, a famous traditional Chinese medicine. It has the effect of anti-inflammation, anti-virus, anti-ulcer and immune regulation. In recent years, it has been found that GA also has high broad spectrum anti-tumor activity, and its anti-tumor mechanism has attracted a great deal of attention. The mechanism of multidrug resistance(MDR) is very complex, and in current, MDR is still the obstacles and challenges of chemotherapy in clinical treatment of tumors. GA has the advantages of good pharmacological activity and low toxicity. The latest research shows that GA can reverse the multidrug resistance of tumor, but also can become a chemosensitizer in chemical resistance caused by various chemotherapy drugs. This paper discusses the mechanism of MDR, and the research progress of GA in reversing the multidrug resistance is reviewed in this paper.

KEYWORDS: glycyrrhetic acid; reversal; tumor; multidrug resistance

目前肿瘤治疗主要包括化疗、放疗和手术切除, 这 3 个经典的治疗途径在临床上仍然发挥着重要作用, 但是化疗在治疗过程中出现的多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象成为导致化疗失败的主要因素^[1]。MDR 是指肿瘤细胞长期接触某一化疗药物, 不仅能够对此种化疗药物产生耐药性, 而且可对其他结构、作用机制以及作用靶点都不相同的抗肿瘤药物也产生交叉耐药现象。MDR 成为困扰肿瘤治疗的一大难题, 因此开发具有逆转 MDR 作用的药物, 提高药物吸收率在肿瘤治疗中成为亟待解决的关键课题。目前已发现上百种 MDR 逆转剂, 如维拉帕米、环孢菌素、三氟拉嗪、长春新碱等药物, 它们均具有不同程度的

弊端, 如亲和力差、药物相互作用强、引起不良反应等^[2], 从而限制了其临床应用。中草药具有毒性低、多靶点的优势, 对中药及其活性成分与药物相互作用进行研究, 开发临床药品的替代和补充制剂被越来越多的研究者所关注。研究发现中草药或者活性成分具有调节药物转运蛋白和药物代谢酶的活性, 从而影响药物的生物利用度^[3]。研究发现川芎嗪、大黄素、姜黄素、苦参碱等中药单体^[4]及中药活性成分如番荔枝内酯、鸦胆子油、粉防己碱、雷公藤内酯醇等^[5-6]已展现出对 MDR 的逆转作用。

甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)又名甘草亭酸, 是中药甘草中甘草酸的五环三萜类水解产

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660468); 内蒙古医科大学青年创新基金项目(YKD2017QNCX046)

作者简介: 梁亚冰, 女, 硕士 Tel: 15149009099 E-mail: liangyabing9099@163.com ^{*}通信作者: 苏秀兰, 女, 硕士, 教授 Tel: (0471)3451709 E-mail: xlsu@sina.com

物,在自然界分布十分广泛。GA有2种差向异构体,即18 α -甘草次酸(18 α -GA)和18 β -甘草次酸(18 β -GA)。GA具有广泛的药理作用,如抗炎、抗肿瘤^[7]、免疫调节、抗溃疡、抗病毒、抗凝血和盐皮质激素样作用等^[8]。已有的研究显示,GA可以通过调节P-糖蛋白加速毒物外排,发挥解毒或减毒的作用^[9-10],并具有药理活性好、不良反应少的特点。近年来,GA调节MDR相关蛋白的表达而逆转肿瘤MDR的作用也得到进一步关注。

1 肿瘤产生MDR的机制

MDR的发生机制是肿瘤细胞从细胞膜、细胞质、细胞核产生的多种途径综合作用的结果。这些机制包括增加药物排出和/或减少药物摄取来减少细胞内药物的浓度、增加药物诱导的DNA损伤修复、逃避药物诱导的细胞凋亡等。

1.1 转运蛋白介导的MDR

经典的MDR机制主要以耐药蛋白为基础,研究较多的包括ABC膜转运蛋白家族的P-糖蛋白(premiability-glycoprotein, P-gp)、MDR蛋白(multidrug resistance protein, MRP)、乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)以及肺耐药相关蛋白(lung resistance-related protein, LRP)。其中P-gp的过度表达减少肿瘤细胞中药物的积累,是产生MDR的主要机制。

1.2 酶介导的MDR

一些非经典的MDR机制日益引起研究者高度关注,这种耐药机制主要与细胞内特异性酶系活性的改变有关,不伴随P-gp或MRP的高表达,如乙二醛酶(glyoxalase, GLO)I、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、拓扑异构酶II(topoisomerase II, ToPo II)及蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等^[4,11-12]。这些蛋白作为药物外排泵,导致肿瘤细胞内的药物浓度降低,从而对多种化疗药物产生耐药性。

1.3 凋亡相关因子介导的MDR

多数化疗药物通过诱导细胞凋亡对肿瘤细胞发挥杀伤作用,研究已经证实肿瘤细胞抗凋亡或凋亡逃逸是产生MDR的机制之一。一些细胞因子通过调节肿瘤细胞的凋亡通路使凋亡抑制基因过表达介导MDR,如白细胞介素(interleukin, IL)-6和IL-8、核转录因子- κ B(nuclearfactor-kappa B, NF- κ B)、Bcl-2基因家族、突变p53基因、C-myc

基因家族、凋亡抑制基因(survivin)、p38丝裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK)、肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)等都被证实参与肿瘤细胞的MDR机制^[13]。

1.4 MDR相关的信号通路

研究显示一些信号通路也参与肿瘤MDR的形成。如PI3K/Akt信号通路通过促进细胞增殖和抑制凋亡在肿瘤的发生与发展中发挥着重要作用,多种肿瘤细胞中PI3K/Akt信号通路处于持续性活化状态。研究表明,在耐药细胞中存在PI3K/Akt信号通路的激活,如人耐长春新碱胃癌细胞(SGC-7901/VCR)中p-Akt的表达水平明显高于SGC-7901细胞,并且P-gp的表达也显著升高,说明PI3K/Akt信号通路在耐药细胞株中活化并与细胞获得耐药性相关,使用PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002可以增加耐药细胞对长春新碱的敏感性^[14]。此外MAPK/JNK/SAPK信号通路、Wnt信号通路、SHH信号通路、Notch信号通路也参与MDR的产生^[15]。

2 GA逆转肿瘤MDR

2.1 GA通过抑制转运蛋白逆转MDR

2.1.1 P-gp P-gp由MDR基因1(multidrug resistance gene 1, MDR1)编码,属于ABC膜转运蛋白家族的一员,又称ABCB1。虽然P-gp被发现于肿瘤组织中,但研究表明它在许多正常的人体组织中都有广泛表达,包括肾、肝、小肠和大肠,脑、睾丸、肾上腺和胎盘^[1]。P-gp作为研究最多的药物转运蛋白,很多临床常用药物是它的底物,是影响体内药动力学和药物相互作用的重要蛋白。通常情况下,P-gp参与药物及毒素的吸收、分布和排泄,以行使对机体的保护作用。作为能量依赖型(依赖ATP提供能量)的外排泵,P-gp与化疗药物结合后,水解ATP使P-gp逆浓度梯度将抗肿瘤药物转运至细胞外,降低体内药物浓度,减弱抗肿瘤药效果,由此产生MDR^[1]。P-gp抑制剂影响P-gp的表达和功能,主要机制包括影响细胞内钙离子的浓度而影响MDR1基因的表达、竞争结合P-gp上的药物结合位点、抑制P-gp的亲水区ATP酶活性和抑制ATP生成、刺激免疫细胞增殖或诱导产生免疫效应分子抑制P-gp的作用^[16]。

GA对P-gp的ATP酶活性没有影响,然而,GA能够抑制维拉帕米诱导的P-gp ATP酶活性。推测尽管GA不是P-gp的底物,但可能在P-gp的

ATP 水解位点非竞争性地相互作用。在 KB-C2 细胞中存在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 时, P-gp 底物柔红霉素的积累增加。与单独使用长春碱相比, GA 可以增加 KB-C2 和 KB/MRP 细胞对长春碱的敏感性, 这提示 GA 可以抑制 P-gp 对抗肿瘤药物的外排作用, 从而逆转 MDR。

2.1.2 MRP MDR 蛋白(ABCC/MRP)属于 ABC 跨膜转运蛋白超家族, 成员有 MRP1~9, 它们参与细胞内外多种复合物的转运, 在多种癌症中都有表达。MRP 与 P-gp 类似, 它也是能量依赖型(依赖 ATP 提供能量)的药物外排泵。MRP1 和 MRP2 分别由 ABCC1 和 ABCC2 基因编码, 除了在肿瘤细胞上有丰富的表达, 在其他组织也有一定的表达, 如肝脏、肾脏、小肠等^[17]。BCRP(ABCP、ABCG2)由 ABCG2 基因编码, 首先在乳腺癌细胞中发现, 也在人体正常组织中广泛表达。BCRP 的特异性抑制剂有烟曲霉素 C、吡啶二酮哌嗪类化合物、TPS-A、新生霉素等^[18]。这些蛋白参与临床相关药物的转运, 并在介导肿瘤细胞产生耐药过程中具有明确的作用。研究显示在肿瘤细胞发生耐药时, MRP 的表达显著增高, 因而抑制其过表达成为逆转肿瘤耐药的又一有效途径。

Yoshida 等^[19]使用囊内积聚技术, 以可通过 MRP2 和 BCRP 转运的 $[\text{H}] \text{E}_2\text{17}\beta\text{G}$ 作底物, 研究了 GA 对 MRP2 和 BCRP 活性的影响。过表达 MRP2 的 Sf9 细胞和过表达 BCRP 的 LLC-PK1 细胞, 在 GA 处理后, 观察到囊泡中 $[\text{H}] \text{E}_2\text{17}\beta\text{G}$ 的积累大量减少, 提示 GA 能有效抑制 MRP2 和 BCRP 介导的膜转运, 是 MRP2 和 BCRP 的抑制剂, IC_{50} 分别为 20 和 $39 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。体外研究显示, GA 能够单独刺激 MRP1 的基础 ATP 酶活性, 在钙黄绿素(一种 MRP1 底物)存在的情况下, MRP1 的 ATP 水解作用进一步受到 GA 的刺激。这些结果表明 GA 可能是 MRP1 的底物, 并且在 MRP1 的药物结合位点处有竞争性相互作用。与单用阿霉素相比, 在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GA 存在的情况下, KB-C2 和 KB/MRP 细胞更容易受到 MRP1 底物阿霉素的细胞毒性的影响。耐药细胞 KB/MRP 经 GA 处理后 MRP1 蛋白的底物钙黄绿素在细胞内的积累显著增加, 而且细胞内钙黄绿素的积累量与 GA 的施加浓度呈正相关。这一结果表明 GA 具有化学增敏作用, 通过增加细胞内抗肿瘤药物的积累来逆转 MRP1 介导的 MDR。

2.2 GA 作为乙二醛酶 I(GLOI)抑制剂逆转 MDR

GLO I 是含 Zn^{2+} 的同源二聚体金属蛋白酶, 是谷胱甘肽转移酶超级家族成员, 它能催化甲基乙二醛(MG)与谷胱甘肽反应生成 S-D-乳酰谷胱甘肽, 后者经 GLO II 催化转化为谷胱甘肽(GSH)和乳酸^[11]。多项研究显示, GLO I 在许多类型的肿瘤组织中过度表达, 并导致肿瘤出现耐药现象^[11], 说明 GLO I 的异常表达与 MDR 有关。GLOI 抑制剂具有抗肿瘤作用, 同时可以逆转 MDR^[20], 逆转机制可能与对 GLOI 的抑制作用和造成 MG 细胞毒水平的积累而导致的细胞凋亡有关^[21], 因此 GLOI 可作为有效的逆转 MDR 的抑制剂。

2.3 其他

GA 作为肝靶向修饰配体也得到了广泛的研究。正常肝细胞及肝癌细胞膜表面均存在丰富的 GA 受体, 因此以 GA 修饰的纳米粒及脂质体等载药体系也能特异性地靶向作用于肝癌病变部位。利用这一特点, Du 等^[22]对包载阿霉素(DOX)的 GA 修饰低分子量肝素纳米粒(DOX/LMWH-GA)的摄取机制展开研究。研究发现, 在过表达 P-gp 的耐药肝癌细胞 HepG2/ADR 中, DOX/LMWH-GA 可以克服对阿霉素的多药耐药性。由于 GA 介导的内吞作用, 使得 GA 修饰的纳米颗粒(DOX/LMWH-GA)可以在体外持续释放药物并延长 DOX 在体内血液循环中的停留时间。与游离的 DOX 相比, DOX/LMWH-GA 明显增加了 HepG2/ADR 细胞中 DOX 的积累, 从而提高不良反应及诱导细胞凋亡的效应, 表明 DOX/LMWH-GA 与肝癌细胞的亲和力显著提高, 进而达到逆转 MDR 效果。

3 总结与展望

作为传统的中药甘草的有效成分, GA 的研究日益深入。特别是 GA 作为 MDR 逆转剂的研究取得长足进步, 其在肿瘤治疗中具有极大的潜力。目前对 GA 逆转 MDR 的研究仍然以体外细胞实验为主, 动物体内实验和临床研究明显不足。未来的重点将在动物耐药模型的构建及体内耐药机制研究, 以及临床前研究工作, 证实 GA 抗耐药功能。MDR 的机制是复杂多途径的, GA 是否能在其他 MDR 逆转机制中发挥作用也是研究的方向之一。此外, 利用 GA 能够靶向肝癌病变部位的优势, 开发具有特异性药物载体的 MDR 逆转剂是值得探索的研究方向。

REFERENCES

- [1] BINKHATHLAN Z, LAVASANIFAR A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(3): 326-346.
- [2] MCDEVITT C A, CALLAGHAN R. How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 113(2): 429-441.
- [3] YANG S S, LIU A L, ZHOU Q, et al. Advances on Chinese materia medica-chemical drug interactions mediated by P-glycoprotein [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2017, 48(15): 3189-3197.
- [4] LIU H Y. Research progress on Chinese materia medica for reversing tumor multidrugresistance [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2015, 46(7): 1096-1102.
- [5] 刘嘉, 曾庆琪. 中药活性成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. *中医药信息*, 2011, 28(5): 112-114.
- [6] WANG H J, ZHANG M Z, LIU X J, et al. Research progress of triptolide's reversal effect on multi-drug resistance [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2016(10): 229-234.
- [7] LALLEMAND B, GELBCKE M, DUBOIS J, et al. Structure-activity relationship analyses of glycyrrhetic acid derivatives as anticancer agents [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(10): 881-887.
- [8] 雍建平, 张毓洪, 赵巍, 等. 甘草次酸及甘草次酸衍生物药理活性研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(12): 3335-3337.
- [9] WANG C, FANG F P, CAI H L. Research progress of ABC membrane transporters and their regulation in tumor drug resistance and new mechanism of detoxification [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2017, 52(22): 1961-1965.
- [10] LI Z H, YAN M, CAO L J, et al. Glycyrrhetic acid accelerates the clearance of triptolide through P-gp *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(7): 1090. Doi: 10.1002/ptr.5831.
- [11] THORNALLEY P, RABBANI N. Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22(3): 318-325.
- [12] 毛俊俊, 张英. COX-2 表达与肿瘤多药耐药相关性的研究进展[J]. *海峡药学*, 2011, 23(6): 22-24.
- [13] SUI H, FAN Z Z, LI Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(2): 426-435.
- [14] XIE X, TANG B, ZHOU J, et al. Inhibition of the PI3K/Akt pathway increases the chemosensitivity of gastric cancer to vincristine [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(2): 773-782.
- [15] XIE L, HUANG G. The relationship between multidrug resistance (MDR) of tumor and anti-apoptosis [J]. *Fudan Univ J Med Sci(复旦学报: 医学版)*, 2012, 39(4): 428-432.
- [16] 何娟, 刘晓磊, 彭文兴. P-糖蛋白介导的肿瘤多药耐药逆转机制研究进展[J]. *中国药房*, 2006, 17(3): 218-220.
- [17] JEMNITZ K, HEREDI S K J, IOJA E, et al. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions [J]. *Drug Metabol Rev*, 2010, 42(3): 402-436.
- [18] JI H, WANG B G. The Research Progress on Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) [J]. *Anti-tumor Pharm(肿瘤预防与治疗)*, 2013(5): 246-250.
- [19] YOSHIDA N, TAKADA T, YAMAMURA Y, et al. Inhibitory effects of terpenoids on multidrug resistance-associated protein 2- and breast cancer resistance protein-mediated transport [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(7): 1206-1211.
- [20] YE X, SHEN Z X. Recent progress in drug-resistance modulating activity of glyoxalase inhibitors [J]. *J Int Oncol(国际肿瘤学杂志)*, 2006, 33(10): 747-750.
- [21] ZHU C Y, LI Z H, WANG F T. An update on progress in glyoxalase I inhibitor as an emerging class of anticancer agents [J]. *Pharm Clin Res(药理学与临床研究)*, 2011, 19(4): 337-342.
- [22] DU H, LIU M, YU A, et al. Insight into the role of dual-ligand modification in low molecular weight heparin based nanocarrier for targeted delivery of doxorubicin [J]. *Int J Pharm*, 2017, 523(1): 427-438.

收稿日期: 2018-08-16

(本文责编: 曹粤锋)