

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00213

• 综述 •

脂筏参与耐药：多药耐药相关 ABC 转运蛋白与脂筏的关系

王琳[△], 贾宇[△], 姜远英*

第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] 脂筏(lipid raft)和细胞的许多功能,如信号转导、蛋白质和脂类的转运等都相关。近来有研究发现,与多药耐药密切相关的 ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)定位于脂筏中,因此推测脂筏可能与耐药性有一定关系。本文综述了 3 种和耐药相关的 ABC 转运蛋白的定位与其功能之间的联系,分别是和肿瘤细胞多药耐药相关的 ABC 转运蛋白 Pgp/ABCB1、MRP1/ABCC1 以及与白假丝酵母菌(白念珠菌)多药耐药相关的 ABC 转运蛋白 Cdr1p;并进一步讨论了脂筏的重要组成部分胆固醇和鞘脂对上述 3 种 ABC 转运蛋白的定位和功能的影响。

[关键词] 脂筏;多药耐药;白假丝酵母菌;ATP 结合盒转运蛋白

[中图分类号] R 962 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0213-03

Lipid raft involved in drug resistance: relationship between multidrug resistance ATP-binding cassette transporters and lipid raft

WANG Lin[△], JIA Yu[△], JIANG Yuan-ying*

Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Lipid rafts have been implicated in many cellular functions, including protein and lipid transport and signal transduction. Recently ATP-binding cassette (ABC) transporters, which are associated with multidrug resistance, have been found in lipid rafts; therefore they might be related to drug resistance. Here we introduce the relationship between the localization and functions of three multi-drug related ABC transporters, including two relevant to multidrug resistance in tumor cells(Pgp/ABCB1 and MRP1/ABCC1) and one relevant to multidrug resistance in *Candida albicans* (Cdr1p). We also discuss the influence of sphingolipids and cholesterol, two major components of lipid rafts, on the localization and function of the above three ABC transporters.

[Key words] lipid raft; multidrug resistance; *Candida albicans*; ATP-binding cassette transporters

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2):213-215]

ABC 转运蛋白家族(ATP-binding cassette transporters)是由一个大的跨膜蛋白家族组成的。它们的功能是转运多种底物,包括磷脂类、甾醇类、胆酸、肽类、代谢产物和多种药物。考虑到 ABC 转运蛋白主要定位在膜上,可以推测,其周围的脂对其功能十分重要。它们中的一些,如 ABCA1 和 ABCB1 能够识别磷脂和胆固醇,参与脂平衡。还有一些在增加多药耐药性方面起到重要作用。它们的一般生物学功能是在转运多种细胞内源性底物的同时排除异物(如药物)。在肿瘤细胞中,延长药物作用时间,可以使 ABC 转运蛋白表达上调导致药物外排增加。转运蛋白 ABCB1、ABCC1 或 ABCG2 上调都可以导致肿瘤细胞耐药。在白假丝酵母菌中已发现约有 10 种 ABCT,但只有 Cdr1p 和 Cdr2p 与抗药性有关。Cdr1p 是近年来研究较多的一种 ABC 家族的多药耐药

基因,它在白假丝酵母菌的抗药性中起到重要的作用。Cdr1p 定位于脂筏区域,任何脂筏成分的不平衡都会导致 CaCdr1p 无法定位到脂筏区。由于脂类的疏水性,药物可以与脂相结合,从而使转运蛋白可以被排出细胞。此外,转运蛋白的膜环境被认为对其功能十分重要,接踵而来的问题就是,在它们能够发挥功能的特定脂环境,脂筏是否参与了 ABC 转运蛋白的定位。

脂筏(lipid raft)的定义:“细胞膜脂筏是小的(10~200 nm)、不均一的、高流动性的、富含甾醇和鞘脂、区分细胞进程的区域。小小的筏区有时却可以稳定地形成很大的蛋白-蛋白和蛋白-脂类相互作用的平台”^[1]。脂筏参与了许多细胞进程:许多受体酪氨酸激酶都集中在脂筏区。在辐射、激素等不同的刺激下,蛋白质会被召集到脂筏区发挥作用^[2-3]。

[收稿日期] 2010-06-07 **[接受日期]** 2010-12-22

[基金项目] 国家杰出青年科学基金(30825041)。Supported by National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30825041)。

[作者简介] 王琳,博士。E-mail: musics@sina.com.cn; 贾宇,博士。E-mail: jiayu0538@hotmail.com

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding author)。Tel:021-81871357, E-mail:jiangyy@smmu.edu.cn

脂筏也可以看成是细胞的“通道”,用来连接内吞途径。一些病毒、细菌、毒素通过这些区域进入细胞或者与细胞发生相互作用。而细胞也可以通过这些区域来控制胞吞作用^[4-5]。脂筏可以作为一个信号平台;当刺激发生时,相同或者不同脂筏中的受体、偶联因子、效应酶、底物会融合在一起^[6]。在酿酒酵母、白假丝酵母菌中也存在着脂筏。它参与了交配、胞质分裂、菌丝形成和耐药^[7]等重要的进程。

在脂筏中,鞘脂的酰基链相对较长而且高度饱和。这种特性使脂质大量堆积,溶解温度升高,导致有序流动相包含在大量的无序流动磷脂中。最常见的分离脂筏的方法是根据它的以下特性:膜区域能够抵抗冷的非离子去垢剂的抽提,这些去垢剂不溶的膜悬浮物在蔗糖密度梯度离心的5%/35%交界处。我们把这些膜区域叫做 detergent-resistant membranes (DRMs)。经典的抗 Triton 的 DRMs 可以用1% Triton X-100 作为去垢剂来分离。还有很多其他的去垢剂,包括 BRIJ 96、CHAPS、Lubrol WX 和 Tween 也被用来分离脂筏。脂筏中的脂和蛋白的富集程度自然会随着去垢剂的选择不同而有所变化。在这方面 Triton X-100 和 CHAPS 是最常被选择的,而 Lubrol WX 和 Tween 则是最少用的。有研究指出抗 Triton 和抗 Lubrol 的脂筏都是富含胆固醇和鞘脂的。尽管抗 Lubrol 的脂筏中鞘脂含量比抗 Triton 中的少,但是,其蛋白和磷脂的含量是抗 Triton 脂筏的至少2倍,同时其脑磷脂和丝氨酸磷脂的含量都相对较多^[8]。

本文主要综述了具有多药耐药功能的 ABC 转运蛋白 (ABCA1, ABCB1 和 Cdrlp) 在脂筏区的定位和功能以及筏区脂(鞘脂和胆固醇)的调节效力,从而通过这几个主要的多药耐药基因分析脂筏与耐药性之间的关系。

1 ABCB1 和脂筏

1.1 ABCB1 在脂筏中的定位

ABCB1 是一个完全的 ABC 转运子,在多药耐药的癌细胞中高表达。在健康个体中,它表达在肝脏、肾脏、肠黏膜、脑的毛细血管内皮。它可以转运细胞溶解的药物、中级两性的、中性的、阳离子的分子,包括脂质。ABCB1 和脂筏之间的相互关系似乎高度可变,和细胞的种类及采用的去垢剂种类有关。尽管如此,有一个普遍的趋势:ABCB1 和 Triton X-100 提取的脂筏相互关联不大,但与去垢剂 Lubrol 或 BRIJ96 提取的脂筏相互关联却很强烈。除此之外,采用不含有去垢剂的方法,在碳酸盐缓冲液中采用超声提取的脂筏部分和 ABCB1 也有强烈的相互关联^[9]。

1.2 ABCB1 和胆固醇

几乎在所有的研究中,采用甲基 β 环糊精孵育细胞,导致脂筏的成分之一胆固醇的缺失,ABCB1 的功能都减弱了。用甲基 β 环糊精孵育细胞可能是通过使膜的流动性增强,来影响 ABCB1 的功能。近来的一个研究指出,用甲基 β 环糊精去除胆固醇或者富集胆固醇改变人的多药耐药 T 淋巴细胞细胞膜的流动性^[10],ABCB1 的功能都减弱了。在对照组细胞中,ABCB1 定位在 Triton 提取的脂筏中;而在胆固醇去除的细胞中,ABCB1 移动到了非脂筏区域;当胆固醇富集时,ABCB1 仍然出现在脂筏区,但是和对照组细胞相比它出现在脂筏中更高密度的区域。这说明 ABCB1 的功能不仅仅依赖于它在脂筏中的定位,还和构成脂

筏成分的比例有关。但是胆固醇对 ABCB1 的影响仍然存在着争议,因为用胆固醇氧化酶氧化胆固醇对 ABCB1 的功能并没有影响。

1.3 ABCB1 和糖脂

糖脂对 ABCB1 的影响众说纷纭;从清晰(在白血病细胞中,糖脂通过调节 ABCB1 的磷酸化来影响 ABCB1 的功能)^[11]到中立(在 HepG2 肝癌细胞中,糖脂对 ABCB1 功能的影响不是很大)^[12]到没有作用^[13]。在这些研究中都没有考察 ABCB1 是否和脂筏相关联。脂类、ABCB1 和脂筏这三者的关系还不清晰。

2 ABCC1 和脂筏

2.1 ABCC1 在脂筏中的定位及胆固醇对 ABCC1 的影响

ABCC1 是一个完全的 ABC 转运子,有3个跨膜区和2个 ATP 结合区。它可以在肿瘤细胞中导致多药耐药^[14]。用不含有去垢剂的方案在碳酸盐缓冲液中用声裂法从 ABCC1 高表达的小肺癌 (GLC4) 细胞中提取脂筏,发现 ABCC1 只是和细胞膜中低密度的 L0 相细胞膜微域相互作用。用甲基 β 环糊精破坏细胞膜微域,只有当胆固醇的水平下降到40%以下 ABCC1 才会部分移动到高密度膜区域,并伴随着外排功能的减弱^[15]。用不含有去垢剂的方案在碳酸盐缓冲液中用声裂法从鼠成神经细胞瘤细胞和 ABCC1 高表达的幼小鼠肾细胞中提取脂筏,ABCC1 部分定位并且高度富集在不含有去垢剂的脂筏中。用甲基 β 环糊精孵育细胞,ABCC1 移出脂筏区域,并伴随着外排功能的减弱。但是用胆固醇氧化酶孵育细胞,对 ABCC1 在脂筏中的定位和外排功能并没有影响。

2.2 ABCC1 和糖脂

在 HT29 人结肠肿瘤细胞株中,用秋水仙碱诱导细胞会导致细胞耐药^[16]。可以观察到 ABCC1 和糖脂同时上调。采用 Lubrol WX 作为去垢剂提取脂筏,ABCC1 和糖脂都富集在脂筏中。ABCC1 和糖脂的上调都会反映到脂筏中,这暗示糖脂可能与 ABCC1 功能以及在脂筏中的定位有关。但是用葡萄糖基转移酶抑制剂 PDMP 去除糖脂,ABCC1 的功能并不受影响^[17]。在人成神经细胞瘤细胞株 SK-N-AS 中,ABCC1 富集在 Lubrol 提取的脂筏中,去除糖脂不会影响 ABCC1 的定位和功能^[13]。在鼠成神经细胞株 Neuro-2a 以及仓鼠 BHK/MRP1 细胞株中,ABCC1 富集在 Lubrol 和非离子去垢剂提取的脂筏中。用丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂 SP-1 抑制鞘脂的合成,ABCC1 在脂筏中的定位和功能并没有受到影响^[18]。这说明鞘脂并不是影响 ABCC1 功能和在脂筏中的定位的主要因素。

总的来说,ABCC1 是和 Lubrol 提取的脂筏以及用不含有去垢剂的方案提取的脂筏相互关联。ABCC1 定位到用 Lubrol 提取的脂筏中有利于其发挥功能。用 Lubrol 提取的脂筏中富集了丝氨酸磷脂、乙醇酸磷脂、氨基酸磷脂,有利于 ABC 转运子 ABCC1 ATP 酶活性的发挥。甲基 β 环糊精可以破坏 ABCC1 在不含有去垢剂的脂筏中的定位,并且影响其功能。但是这并不是因为胆固醇的缺失,因为胆固醇氧化酶对 ABCC1 并没有影响。胆固醇的水平对 ABCC1 的功能和在脂筏中的定位没有直接的联系。糖脂并不是影响 ABCC1 功能和在脂筏中的定位的主要因素。

3 Cdr1p 和脂筏

3.1 Cdr1p 在脂筏中的定位 在白假丝酵母菌中约有 10 种 ABCT, 但只有 Cdr1p 和 Cdr2p 与多药耐药有关。其中 Cdr2p 与脂筏的相关功能研究未见报道。研究主要集中在 Cdr1p 与脂筏的关系上。在白假丝酵母菌中 Cdr1p 定位在用 Triton X-100 提取的脂筏中。

3.2 Cdr1p 和麦角甾醇的关系 白假丝酵母菌的脂筏主要由鞘脂和麦角甾醇构成。敲除白假丝酵母菌麦角甾醇的生物合成相关基因(erg24, erg16, erg6, erg4, erg2, erg1)^[7,19-21], 抑制麦角甾醇的生物合成, 绿色荧光蛋白标记的 Cdr1p 在细胞膜的定位受到影响, 从脂筏区移动到非筏区。Cdr1p 无法正确定位到细胞膜导致对罗丹明 6G 和氟康唑的外排减少, 细胞对特比萘酚、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑等药物的敏感性增加。虽然 erg24, erg16, erg6, erg4, erg2, erg1 基因缺失菌株的细胞膜流动性和被动扩散能力增加了, 但这些改变并不会影响菌株对药物的敏感性。因为通过苯甲醇处理, 使细胞膜的流动性增加 12%, 菌株对药物的敏感性并没有改变^[19]。

3.3 Cdr1p 和鞘脂的关系 鞘脂是白假丝酵母菌脂筏的另一重要成分。敲除鞘脂的生物合成相关基因(sur4, fen1, ipt1)或者采用烟曲霉素 B1 作用细胞, 抑制鞘脂的生物合成, 绿色荧光蛋白标记的 Cdr1p 在细胞膜的定位受到影响, 从脂筏区移动到非筏区。Cdr1p 无法正确定位到细胞膜导致对罗丹明 6G 和氟康唑的外排减少, 细胞对特比萘酚、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑等药物的敏感性增加^[7,19-21]。

在白假丝酵母菌中 Cdr1p 定位在 Triton X-100 提取的脂筏中。脂筏的组成成分鞘脂和麦角甾醇的改变, 都会导致 Cdr1p 的定位从脂筏区移动到非筏区。Cdr1p 无法正确定位到细胞膜导致对罗丹明 6G 和氟康唑的外排减少, 细胞对药物的敏感性增加。

目前, 对于脂筏功能的研究已经成为一个热点。对耐药相关 ABC 转运蛋白的功能研究表明: ABC 转运蛋白无法定位到脂筏中会导致其功能的缺失。我们可以通过破坏脂筏的主要组成成分使耐药基因失去功能。这为抗菌和抗肿瘤的治疗提供了新的方案, 为新药研发和联合用药提供线索和理论依据。

[参考文献]

[1] Pike L J. Rafts defined; a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function[J]. J Lipid Res, 2006, 47: 1597-1598.
 [2] Hanzal Bayer M F, Hancock J F. Lipid rafts and membrane traffic[J]. FEBS Lett, 2007, 581: 2098-2104.
 [3] Daquinag A, Fadri M, Jung S Y, Qin J, Kunz J. The yeast pH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27: 633-650.
 [4] Lajoie P, Nabi I R. Regulation of raft-dependent endocytosis[J]. J Cell Mol, 2007, 11: 644-653.
 [5] Knorr R, Karacsonyi C, Lindner R. Endocytosis of MHC molecules by distinct membrane rafts[J]. J Cell Sci, 2009, 122: 1584-1594.
 [6] Lajoie P, Goetz J G, Dennis J W, Nabi I R. Lattices, rafts, and scaffolds; domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane[J]. J Cell Biol, 2009, 185: 381-385.

[7] Pasrija R, Panwar S L, Prasad R. Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* display different lipid specificities: both ergosterol and sphingolipids are essential for targeting of CaCdr1p to membrane rafts[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52: 694-704.
 [8] Hinrichs J W, Klappe K, Van Riezen M, Kok J W. Drug resistance associated changes in sphingolipids and ABC transporters occur in different regions of membrane domains[J]. J Lipid Res, 2005, 46: 2367-2376.
 [9] Orlowksi S, Martin S, Escargueil A. P-glycoprotein and lipid rafts: some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance)[J]? Cell Mol Life Sci, 2006, 63: 1038-1059.
 [10] Dos Santos S M, Weber C C, Franke C, Müller W E, Eckert G P. Cholesterol: coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354: 216-221.
 [11] Plo I, Lehne G, Beckstrom K J, Maestre N, Bettaieb A, Laurent G, et al. Influence of ceramide metabolism on P-glycoprotein function in immature acute myeloid leukemia KG1a cells[J]. Mol Pharmacol, 2002, 62: 304-312.
 [12] di Bartolomeo S, Spinedi A. Differential hemo-sensitizing effect of two glucosylceramide synthase inhibitors in hepatoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288: 269-274.
 [13] Dijkhuis A J, Klappe K, Kamps W, Sietsma H, Kok J W. Gangliosides do not affect ABC transporter function in human neuroblastoma cell[J]. J Lipid Res, 2006, 47: 1187-1195.
 [14] Bakos E, Homolya L. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines[J]. Pflugers Arch, 2007, 453: 621-641.
 [15] Marbeuf-Gueye C, Stierle V, Sudwan P, Salerno M, Garnier-Suillerot A. Perturbation of membrane microdomains in GLC4 multidrug-resistant lung cancer cells—modification of ABCC1 (MRP1) localization and functionality[J]. FEBS J, 2007, 274: 1470-1480.
 [16] Kok J W, Veldman R J, Klappe K, Koning H, Filipeanu C M, Müller M. Differential expression of sphingolipids in MRP1 overexpressing HT29 cells[J]. Int J Cancer, 2000, 87: 172-178.
 [17] Klappe K, Hinrichs J W, Kroesen B J, Sietsma H, Kok J W. MRP1 and glucosylceramide are coordinately over expressed and enriched in rafts during multidrug resistance acquisition in colon cancer cells[J]. Int J Cancer, 2004, 110: 511-522.
 [18] Klappe K, Dijkhuis A J, Hummel I, van Dam A, Ivanova P T, Milne S B, et al. Extensive sphingolipid depletion does not affect lipid raft integrity or lipid raft localization and efflux function of the ABC transporter MRP1[J]. Biochem J, 2010, 430: 519-529.
 [19] Mukhopadhyay K, Prasad T, Saini P, Pucadyil T J, Chattopadhyay A, Prasad R. Membrane sphingolipid-ergosterol interactions are important determinants of multidrug resistance in *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 1778-1787.
 [20] Pasrija R, Prasad T, Prasad R. Membrane raft lipid constituents affect drug susceptibilities of *Candida albicans*[J]. Biochem Soc Transact, 2005, 33: 1219-1223.
 [21] Prasad T, Saini P, Gaur N A, Vishwakarma R A, Khan L A, Haq Q M, et al. Functional analysis of CaIPT1, a sphingolipid biosynthetic gene involved in multidrug resistance and morphogenesis of *Candida albicans*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 3442-3452.