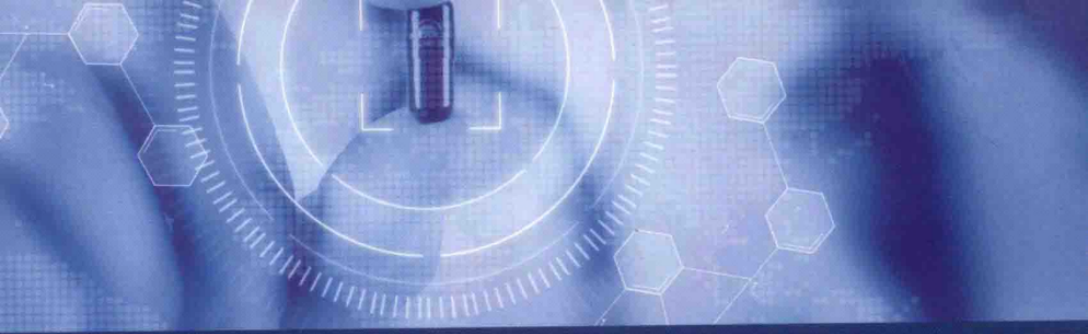


结直肠癌化疗药物顺铂的耐药机制

张 军 主编

JIEZHICHANG'AI HUALIAO YAOWU
SHUNBO DE NAIYAO JIZHI

華中科技大學出版社
http://www.hustp.com

需要全本请访问 www.ertongbook.com

图书在版编目(CIP)数据

结直肠癌化疗药物顺铂的耐药机制/张军主编. —武汉：华中科技大学出版社，2021.12
ISBN 978-7-5680-7880-1

Ⅰ. ①结… Ⅱ. ①张… Ⅲ. ①结肠癌-药物疗法-抗药性-研究 ②直肠癌-药物疗法-抗药性-研究 Ⅳ. ①R735.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2021)第 269922 号

结直肠癌化疗药物顺铂的耐药机制 张 军 主编

Jiezhichang'ai Hualiao Yaowu Shunbo de Naiyao Jizhi

策划编辑：史燕丽
责任编辑：曾奇峰
封面设计：原色设计
责任校对：刘小雨
责任监印：徐 露
出版发行：华中科技大学出版社(中国·武汉) 电话：(027)81321913
武汉市东湖新技术开发区华工科技园 邮编：430223
录 排：华中科技大学惠友文印中心
印 刷：武汉开心印印刷有限公司
开 本：710mm×1000mm 1/16
印 张：7.25
字 数：92 千字
版 次：2021 年 12 月第 1 版第 1 次印刷
定 价：49.80 元

本书若有印装质量问题，请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线：400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

内容简介

结直肠癌是常见的消化系统疾病之一，其发病率和死亡率均较高。本书探讨了临床上结直肠癌化疗药物实践中的棘手方向，即化疗药物的毒副作用及导致化疗失败的原因——耐药性，从理论基础和实验研究两个方面全面分析了结直肠癌化疗药物的耐药机制。书中还介绍了增强化疗药物敏感性的最新研究进展，以期使读者既能知晓该领域的研究现状，又能领略到最新的前沿技术。

本书可作为各级医院从事消化内科诊疗工作的医生的临床指导用书，也可作为相关专业研究生、规培学员等的辅导用书。

网络增值服务

使用说明

欢迎使用华中科技大学出版社医学资源网 yixue.hustp.com

1 教师使用流程

（1）登录网址：**http://yixue.hustp.com**（注册时请选择教师用户）

注册 → 登录 → 完善个人信息 → 等待审核

（2）审核通过后，您可以在网站使用以下功能：



2 学员使用流程

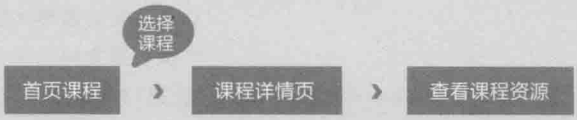
（建议学员在PC端完成注册、登录、完善个人信息的操作。）

（1）PC 端操作步骤

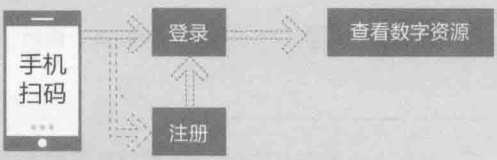
① 登录网址：http://yixue.hustp.com（注册时请选择普通用户）

注册 → 登录 → 完善个人信息

② 查看课程资源：（如有学习码，请在个人中心－学习码验证中先验证，再进行操作。）



（2）手机端扫码操作步骤



前 言

结直肠癌是常见的消化系统疾病之一，其发病率和死亡率均较高。每年有超过60万例患者死于结直肠癌。其发病率有显著的地区差异，且与生活方式有密切联系。另外，还有很多危险因素值得注意，如结直肠癌家族史、炎症性肠病、吸烟和过量饮酒等。这些风险因素中以结直肠癌家族史和炎症性肠病与结直肠癌的关系较为密切。虽然其他的风险因素在理论上可以避免，但在现实生活中它们尤为常见，并在结直肠癌发病史中扮演了非常重要的角色。一些临床医生对该病的思维方式目前仍停留在理论研究水平，或者仅停留在对疾病的治疗上，难以形成全面系统的认识，缺乏实际指导性。临床医生对该病诊治水平的提高，有利于早期发现结直肠癌，降低患者死亡率，减轻患者的医疗费用负担及其家庭负担。

本书探讨了临床上结直肠癌化疗药物实践中的棘手方向，即化疗药物的毒副作用及导致化疗失败的原因——耐药性。肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性的过程较复杂。本书全面详细地分析了在化疗过程中，肿瘤细胞如何对结构不同的化疗药物产生抵抗力，从而使化疗药物很难清除所有的肿瘤细胞，而残余的肿瘤细胞则导致结直肠癌的复发。不仅如此，书中还介绍了增强肿瘤细胞对化疗药物敏感性的最新研究进展，以期使读者既能知晓该领域的研究现状，又能领

需要全本请访问 www.ertongbook.com

略到最新的前沿技术。本书将肿瘤细胞对化疗药物耐药的机制分析得十分详细，引人入胜，通俗易懂，即使刚入消化内科的医生亦能明白。本书将理论知识与临床实践相结合，期望能帮助临床医生快速提高诊疗水平。

总之，本书具有较强的临床实践指导意义和科学性，有助于提高临床医生对化疗药物耐药性的认识，可作为各级医院从事消化内科诊疗工作的医生的临床指导用书，也可作为相关专业研究生、规培学员等的辅导用书。

在实际临床工作中，读者在借鉴书中涉及的耐药性产生机制时，要结合患者的实际情况以制订更合理的治疗方案，切不可一叶障目，生搬硬套。临床工作中具体用药还必须遵从药物说明书、相关药典及指南。诚然，受到编者临床水平及思维等诸多因素的限制，书中难免会有错误及不足之处，恳请广大读者提出宝贵意见。

张 军

目　录

第一章　引言 …… 1

第二章　细胞信号通路的组成及途径 …… 3

第一节　细胞信号分子生物学基础 …… 3

第二节　细胞信号转导途径 …… 4

第三章　结直肠癌的发生和发展通路简介 …… 8

第一节　结直肠癌发生和发展的分子生物学基础 …… 8

第二节　结直肠癌发生和发展的通路 …… 11

第四章　信号转导抑制剂与结直肠癌治疗 …… 14

第一节　JAK-STAT 信号通路 …… 14

第二节　STAT3 抑制剂与结直肠癌 …… 21

第五章　结直肠癌化疗药物耐药机制 …… 25

第一节　顺铂诱导 ROS 产生及顺铂联合 NAC 对结肠癌细胞增殖抑制与凋亡作用的研究 …… 28

第二节　顺铂联合 NAC 调控 AKT 表达作用机制的研究 …… 37

第三节　顺铂与 NAC 联合应用对结肠癌细胞体内成瘤作用的研究 …… 57

第六章　综述——增强化疗药物敏感性的研究进展 …… 77

第一章　引言

结直肠癌(colorectal cancer,CRC)在我国是比较常见的恶性肿瘤,WHO 国际癌症研究机构的 GLOBOCAN 项目评估,2018 年全球范围内 CRC 新发病人数约为 180 万人,其中死亡人数约为 88 万人,其发病率和死亡率均较高。结直肠腺瘤(colorectal adenoma,CRA)是 CRC 最主要的癌前疾病。通常认为结直肠肿瘤包括 CRC 和 CRA。国内外学者非常重视结直肠肿瘤的早期诊断,但是由于结直肠肿瘤标志物的实验室血清学诊断缺乏敏感性和特异性,其临床应用受到限制,例如,CEA、CA125 和 CA19-9 等传统标志物的血清学检测操作比较简单,但特异性和敏感性均较低。新开发的分析外周血端粒酶活性和某些 miRNA 等的新技术,由于操作较为复杂,临床应用价值有待进一步评估验证。粪便 DNA 和转铁蛋白的检测对结直肠肿瘤的诊断意义有限,但可应用于结直肠肿瘤的筛查等。

时至今日,治疗肿瘤的方法不断发展与更新,新的抗癌药物层出不穷,但顺铂仍是临床上较常用的化疗药物,尤其是其在应用剂量较大时对肿瘤细胞杀伤作用显著,但因严重的毒副作用及耐药性而限制了其广泛应用。

顺铂是一个中性、平面正方形的无机复合物,其与 DNA 发生反应而产生特有的生物学效应,从而发挥修复 DNA 损伤的作用,进而促使细胞启动不可逆的凋亡程序,导致细胞发生凋亡。顺铂与 DNA 的相互作用,主要通过一系列自发水合反应来完成。这种单水化的

形式被确认为具有高反应性，但这种形式的形成率往往受许多内源性亲核物质限制，如谷胱甘肽(GSH)、甲硫氨酸、金属硫蛋白和蛋白质等。因此，顺铂进入细胞时，它易受到这些物质的影响而导致细胞灭活。顺铂主要与亲核 DNA 中的嘌呤碱基 N7 位点发生反应，从而形成 DNA-蛋白质、DNA-DNA 链间和链内交联等复合物形式。有证据表明，形成的链内加合物可以诱导细胞毒作用的发生。另外，有研究在培养的细胞中发现了一个类似链内交联 DACH-硫酸根-铂的复合物，此复合物与链内加合物相比主要的 DNA 碱基对数量不同。此复合物的发现为清除对顺铂产生耐药性的肿瘤细胞提供了新的临床思路。由于形成的链内加合物可使大量顺铂诱导细胞核损伤，因此，顺铂与 DNA 结合的总的水平和程度决定了顺铂所产生的细胞毒性的严重程度。虽然顺铂影响 DNA 复制，但其影响 DNA 合成与细胞毒性的产生之间不存在相关性。因此，每一个识别蛋白可能会启动一个或多个特定的生物信号应激源，从而使 DNA 损伤呈现出看似无关的生物学效应，此与顺铂破坏 DNA 的复制和转录过程是一致的，但这样的生物学效应不一定直接导致细胞死亡。对于顺铂作用的细胞来讲，其生存和促凋亡信号同时被激活，并激活和整合下游的信号分子，最终产生不同的生物学效应，并导致顺铂耐药性的产生。目前有实验表明 AKT 表达异常可能与顺铂耐药性的产生有关，但顺铂通过何种信号通路来调控 AKT 的表达目前较少有研究涉及，因此，临床上要想克服应用顺铂治疗肿瘤而产生的耐药性，仍需要开展大量的系统性实验。

第二章　细胞信号通路的组成及途径

第一节　细胞信号分子生物学基础

生物体是由大量具有特殊结构和功能的细胞组成的复杂有机体，其内的细胞器、组织器官等彼此之间隔离，且绝大部分不与外界因素直接关联，故外界的刺激需要通过细胞间的信号通路来进行分级传递，从而调控机体的生理功能。细胞信号为细胞之间相互传递信息的相关载体，其是信号分子与细胞膜上或细胞膜内的受体相结合的反映。生物过程通常涉及众多细胞信号分子之间复杂的相互作用。而这其中，细胞感知正确并响应其微环境的能力是保证组织修复及组织动态平衡的基础。信号相互作用和细胞信息处理错误则可能导致肿瘤及相关疾病的发生。

生物体细胞之间的信号转导（signal transduction）是指细胞通过细胞膜或细胞内受体感受信号分子的刺激（通过相邻细胞的直接接触或彼此之间的间隙连接来实现），并经细胞内信号通路进行转换，从而调控细胞生物学功能的过程。外源性生物学信号可引起各种分子活性的变化，这种变化依次传递至下游效应分子，进而改变细胞的功能。信号转导的最终目的是使机体在整体上对外界环境的变化产生最为适宜的反应。有研究发现，细胞内存在着复杂的信

号转导途径，而各种信号转导途径间又存在着多个层次的交叉调控。信号转导参与调控细胞所有的生命活动：细胞代谢，细胞分裂，细胞分化，细胞功能活动及细胞死亡。细胞识别周围环境中存在的各种信号，或识别与之相接触的细胞，细胞内各种分子生物学功能相应发生变化，从而改变细胞内的代谢过程，进而影响细胞的生长速度，甚至诱导细胞死亡。另外，在某些情况下，为了维护生物集体利益，或是为了维护生物种系的核心利益，在局部范围内一部分细胞会发生利他性凋亡。因此，阐明细胞信号转导的机制就意味着认清细胞在整个生命过程中的增殖、分化、代谢及死亡等诸多方面的表现和调控方式，进而理解机体代谢的调控机制。

第二节　细胞信号转导途径

丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）是一系列丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，可磷酸化细胞质内的其他蛋白质，并促使其转移至细胞核内而调节转录因子的活性。它主要分为 4 个亚族：细胞外信号调节蛋白激酶（ERK），c-Jun 氨基末端激酶（JNK），p38 和 ERK5/大丝裂素活化蛋白激酶 1。所有 MAPK 家族成员均通过苏氨酸/酪氨酸残基羟基侧链的双重磷酸化被激活，苏氨酸与酪氨酸残基之间有一个三肽基序形成的氨基酸间隔。对于 JNK 而言，这一间隔的氨基酸是脯氨酸；而 p38 中这一间隔的氨基酸为甘氨酸。JNK、p38 都具有一个较小的氨基末端结构域和一个较大的羧基末端结构域，二者由一个交叉区连接在一起。其中羧基末端结构域以 α 螺旋为主，氨基末端结构域以 β 折叠为主。两个结构域交界处形成一个裂隙，为 ATP 结合位点。MAPK 的激活是细胞内磷酸化的级联反应，包括三种蛋白激酶活化的序贯磷酸化：始发于 MAP3K 的激活；激活后的 MAP3K

需要全本请访问 www.ertongbook.com

可以磷酸化并激活 MAP2K；随后 MAP2K 通过邻近的苏氨酸和酪氨酸的双重磷酸化而激活 MAPK。不同的细胞外刺激活化不同的 MAPK 信号通路，作用于不同的底物，引起特定的细胞生理反应。近来有研究显示活性氧(ROS)作用于相关的 MAP3K 的下游时，有两个特异性 MAP2K 可以激活 JNK，其中 MKK4 激活 JNK 和 p38、MKK7 激活 JNK。

JNK 是一种重要的应激活化蛋白激酶，是 MAPK 的一个亚族。它由 3 个基因编码：JNK1 和 JNK2 在全身广泛表达，而 JNK3 仅见于脑、心脏和睾丸。它包括 11 个结构域：氨基端为Ⅰ～Ⅳ结构域；蛋白激酶激活环状结构位于Ⅶ～Ⅷ结构域保守性氨基酸 DFG 和 APE 基序之间，环状结构包含苏氨酸和酪氨酸。当激酶被激活时该处两个氨基酸将被磷酸化；羧基端为Ⅴ～Ⅺ结构域。在未受刺激的细胞中，JNK 主要存在于细胞质内，但细胞核内也有一定的分布。在受到刺激后，JNK 迅速而显著地聚积于细胞核内，进而导致相应基因表达发生改变。JNK 通过选择性剪接而产生 10 种 JNK 形式，JNK 基因编码的蛋白质具有或无—COOH 末端，结果产生大小分别为 46 kD 和 54 kD 的两种蛋白质。还有一种剪接方式是选择性编码 JNK 功能区两个外显子中的一个，但该方式只限于 JNK1 和 JNK2 基因。不同组织发出不同指令，通过选择性剪接，JNK 改变停泊位点与底物的结合能力，从而决定作用底物的特异性。

有研究显示，JNK 发生磷酸化后可与线粒体外膜蛋白 Sab 结合，进而导致线粒体内膜蛋白 DOK4 的活性增强，其随后与 P-Src 发生作用，导致 P-Src 失活并抑制线粒体电子转运，促使 ROS 释放增加，最终引起肝细胞发生坏死。而这个过程中最为关键的是维持 JNK 的活性，该途径被称为 JNK-Sab-ROS 活化环。JNK 介导的 ROS 的产生增强了 APAP 的毒性作用，导致线粒体通透性转换(MPT)增加，进而引起肝细胞的坏死。在肿瘤坏死因子/半乳糖胺

(TNF/galactosamine)诱导的肝细胞凋亡的研究中发现,持续的JNK激活对调控Bcl家族成员活性至关重要,而该家族成员控制线粒体外膜通透性,决定细胞色素c和其他凋亡蛋白的释放。总结这一系列研究发现Sab发挥着重要的作用,它是一种线粒体外膜蛋白,靶向点为JNK,并且是JNK的底物,当JNK磷酸化Sab后,线粒体的呼吸链受到损伤,ROS的产生增加,从而进一步损害线粒体的功能。

Sab(SH3BP5)是新发现的一种可以与JNK发生作用的蛋白质,它起初是由科学家Wiltshire等通过蛋白质-蛋白质相互作用筛查发现的。该蛋白质的N端部分形成延伸的卷曲螺旋结构,该结构包含SH3结构域,与BTK发生相互作用,并与肌球蛋白重链的结构域具有部分相同的序列。C端部分除具有激酶相互作用基序(kinase interaction motif,KIM)和磷酸受体位点外,没有任何可识别的特征,也没有任何特征与其他已知的蛋白质相似。卷曲螺旋结构域经常涉及二聚化或其他蛋白质-蛋白质相互作用,因此,Sab有可能存在其他类型的结合方式。

参考文献

[1] Vernia S, Cavanagh-Kyros J, Garcia-Haro L, et al. The PPARα-FGF21 hormone axis contributes to metabolic regulation by the hepatic JNK signaling pathway[J]. Cell Metab, 2014, 20(32): 512-525.

[2] Czaja M J. JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome[J]. Trends Endocrinol Metab, 2010, 21(12): 707-713.

[3] Du K, Xie C, McGill M R, et al. Pathophysiological significance of c-jun N-terminal kinase in acetaminophen

hepatotoxicity[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol,2015,11(11):1769-1779.

[4] Win S,Than T A,Han D,et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor(TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice[J]. J Biol Chem,2011,286(40):35071-35078.

[5] Sharma M, Urano F, Jaeschke A. Cdc42 and Rac1 are major contributors to the saturated fatty acid-stimulated JNK pathway in hepatocytes[J]. J Hepatol,2012,56(1):192-198.

[6] Win S, Than T A, Fernandez-Checa J C, et al. JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death[J]. Cell Death Dis,2014,5(1):e989.

[7] Tarloff J B, Khairallah E A, Cohen S D, et al. Sex- and age-dependent acetaminophen hepato- and nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats: role of tissue accumulation, nonprotein sulfhydryl depletion, and covalent binding[J]. Fundam Appl Toxicol,1996,30(1):13-22.

第三章　结直肠癌的发生和发展通路简介

结直肠癌是指穿透黏膜肌层且浸润至黏膜下层及其以下组织的上皮性肿瘤，包括腺癌、腺鳞癌、鳞状细胞癌、梭形细胞癌和未分化癌。腺癌包括锯齿状型、黏液型、髓样型、微乳头型、粉刺型及印戒细胞样6种分型。在进行组织病理学观察时应特别注意转移与侵袭的征象。结直肠癌发病是遗传学和表观遗传学相继发生改变的多步骤、多基因参与的过程。该肿瘤发生和发展的分子生物学机制较为复杂，其中较为重要的分子生物学改变包括三种：①染色体的不稳定性；②微卫星不稳定性；③CpG岛甲基化表型。以下就目前结直肠癌发病的主要的分子生物学机制及发生和发展通路做一简要介绍。

第一节　结直肠癌发生和发展的分子生物学基础

（一）染色体的不稳定性

染色体的不稳定性（chromosomal instability，CIN）是指染色体的全部或大部分不断增加或丢失的现象，从而导致细胞核型产生变异。该现象涉及的基因变化主要包括APC、TP53、18qLOH等抑癌

基因的失活，以及原癌基因 K-ras、c-Src、c-Myc 等的激活，是结直肠组织从正常黏膜上皮发展至腺瘤甚至腺癌的组织学过程中的经典分子模式。

1. APC-β-catenin 通路

APC 基因为一种抑癌基因，约 80%的结直肠腺瘤和腺癌患者体内可检测出该基因的突变。这一分子事件的发生要早于 K-ras 和 TP53 基因突变，可能属于散发性结直肠癌发生的始动性基因变化。APC 基因通过负性调控转录因子 β-catenin 蛋白参与 Wnt 信号通路，而 Wnt 信号通路是调控细胞增殖、分化的关键通路之一。当 APC 基因发生突变时其蛋白表达下调，导致 APC 蛋白无法与 β-catenin结合形成三聚体复合物（GSK-3β、APC、Axin），此时 β-catenin被持续激活并大量蓄积在细胞核和细胞质中，进而激活促进细胞增殖基因（如 c-Myc、cyclin D1 等下游基因）的转录，使细胞异常增殖形成肿瘤。

2. K-ras 基因突变

K-ras 基因属于 RAS 家族成员之一，30%～50%的结直肠癌患者存在 K-ras 基因突变。RAS 蛋白是酪氨酸激酶受体的下游效应器，可通过不同途径调控细胞分裂、分化、凋亡等。其中最具代表性的途径就是丝裂原激活蛋白激酶（MAPK）信号转导途径（Ras-Raf-MEK-ERK）。当 K-ras 基因被激活后，其与 GDP 的结合能力降低，此时 GTP 取代 GDP 与 Ras 结合，进而可通过 Raf 激酶磷酸化 MAP2K，后者再激活 MAPK，最后转至细胞核内直接激活转录因子（如 c-Myc 等），促进细胞分裂和增殖。

3. TP53 基因

TP53 基因是细胞增殖的“门卫基因”，其编码的 p53 蛋白作为一种转录因子，在 DNA 损伤或致癌压力下被激活，进一步活化 p21 基因，从而诱导细胞周期阻滞在 G1 期，使 DNA 损伤得以修复。正

常的 p53 蛋白在细胞周期的各个阶段都发挥调节作用以确保 DNA 修复系统正常工作。当 TP53 基因发生突变后，p53 蛋白的功能被抑制，此时 p53 蛋白对细胞周期的负性调控作用降低，导致 DNA 错配及基因突变发生率大大增高，最终引起细胞的恶性增殖。TP53 基因突变和杂合性缺失主要出现在结直肠癌发生过程的后期，是腺瘤转变为腺癌的重要分子事件。

（二）微卫星不稳定性

Miesfeld 于 1981 年从人类基因文库中发现一段长 2～10 nt 的片段，该片段可进行简单而有规律的重复，他将这一小段核苷酸片段称为微卫星。在正常情况下，同一个体内的微卫星的长度和核苷酸排序保持不变，称为微卫星稳定。与其他核苷酸序列相比，微卫星具有更高的突变率，因为 DNA 聚合酶串行在这些序列上时，更容易犯错。在某些因素作用下，微卫星的 DNA 在复制过程中出现双链分子的碱基错配、插入或丢失，引起微卫星的结构发生改变，这种微卫星结构发生重复无规律的改变的现象称为微卫星不稳定性（microsatellite instability，MSI）。正常的错配修复（mismatch repair，MMR）系统可通过切除逃脱 DNA 聚合酶核对功能后产生的错误，纠正错配，辅助维持基因完整性，但当 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS1 等 MMR 系统相关基因的启动子发生获得性甲基化或 MMR 系统相关基因发生点突变时可造成 MMR 系统缺陷和 MSI。MSI 又可导致 BRAF 等重要的原癌基因活化，以及多种抑癌基因如转化生长因子 β 受体 2（TGFBR2）基因和编码 Bax 蛋白的基因失活，从而促进结直肠癌的发生。研究显示，约 15％的结直肠癌患者存在 MMR 系统功能缺失，同时 10％～15％的散发性结直肠癌起因于 MSI。

MSI 通路中，BRAF 基因经常被活化；在散发性 MSI-H 肿瘤

需要全本请访问 www.ertongbook.com