

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0226-03

前列腺癌自杀基因治疗中组织特异性启动子的研究进展

殷 纓 综述; 郝晓柯, 苏明权 审阅 (第四军医大学西京医院检验科临床分子生物学实验室, 西安 710032)

[摘要] 随着自杀基因治疗成为治疗恶性肿瘤的重要方法, 其中组织特异性启动子是目前研究的热门之一。前列腺癌自杀基因治疗常用的组织特异性启动子有 PSA 及 Probasin 等, 其中 PSA, Probasin 为雄激素依赖性, 对于未经雄激素去势治疗的前列腺癌治疗效果较好; 而 PSMA 为雄激素非依赖性, 对于是否经过雄激素去势治疗的前列腺癌均有良好疗效, 适用范围广。

[关键词] 前列腺癌; 自杀基因; 启动子

[中图分类号] R737.25 [文献标识码] A

前列腺癌是男性常见的恶性肿瘤, 居美国男性癌症死亡率第二位, 虽然在我国发病率较低, 但近几年发病率已居泌尿生殖系恶性肿瘤增长的首位。晚期前列腺癌患者的治疗一般采用雄激素去势疗法, 但大多数患者在治疗后期会出现雄激素非依赖现象^[1], 效果较差。自杀基因治疗给前列腺癌提供了一个新的手段。

自杀基因治疗, 主要是依赖肿瘤细胞内特定的酶将无毒的前体药物转为毒性药物。通过这种方法, 使活性药物在空间上局限在转导细胞及其周围的细胞内, 因此在不增加正常组织毒性的情况下实现肿瘤内较高药物浓度。对于这种方法, 载体必须对于肿瘤细胞具有高度特异性来避免正常组织损伤。组织特异性启动子的使用, 进一步增强了肿瘤组织中自杀基因的特异性表达和治疗的安全性。目前, 常用的前列腺组织特异性启动子有以下几类:

1 前列腺特异抗原

前列腺特异抗原 (prostate specific antigen, PSA) 是前列腺上皮细胞分泌的含 237 个氨基酸的丝氨酸蛋白酶, 特异性表达于正常、增生及癌变的前列腺组织中, 以较高浓度被直接分泌于精液并与丝氨酸蛋白酶抑制剂形成复合物存在于血清中。当前列腺发生良性增生或癌变时, PSA 进入循环系统的屏障-基底膜被突破, 引起血浆中 PSA 的显著上升^[2]。由于来源特异, 因此血浆中 PSA 被用来作为前列腺异常的标志物。

PSA 表达由雄激素调节, 与其它核受体家族的调节过程一样, PSA 通过雄激素受体 (androgen receptor, AR) 起作用。雄激素受体通过与相应的 DNA 片段 (GGTACAnnnTGTT/CCT 即雄激素应答元件) 结合来调节转录^[3]。与雄激素结合后, 结合状态的 AR 转入细胞核内, 并且与 PSA 启动子的近端序列及 PSA 基因上游 4.2 kb 的增强子核心区 (AREc) (-4 326 ~ -3 935) 连接, 两者协同作用来调节 PSA 基因的转录。如果 PSA 启动子中的 ARE 缺失, 即使有雄激素存在, PSA 基因也不能转录^[2]。采用 PSA 的启动子作为自杀基因

表达载体的启动子, 则该自杀基因表达载体仅能在前列腺肿瘤细胞中复制、扩增和表达。叶传忠等^[4]将带 PSA 启动子的 *hytk* 基因转入表达 PSA 的人前列腺细胞株 LNCaP 中, 证实该基因在雄激素依赖的 LNCaP 细胞中特异表达, 而在非雄激素依赖的 Du145 细胞无表达。MTT 检测显示联合 GCV 作用后, 对转 *hytk* 基因的 LNCaP 细胞有明显杀伤作用, 提示 PSA 启动子可诱导 *hytk* 在雄激素依赖细胞中的表达。

但也有学者对 PSA 的特异性提出质疑, Akionbu^[5]设计了 5 837 bp 长的 PSA 启动子, 与 TK 基因共同插入腺病毒载体中, 选择雄激素依赖性 LNCaP 细胞和雄激素不依赖性 C4-2 细胞做靶细胞, 并以膀胱癌细胞做对照, 转染细胞并应用 GCV 后, 两种前列腺癌细胞大部分死亡, 而膀胱癌细胞几乎不变化, 说明 TK 基因在前列腺癌细胞中特异性表达。由于临床前列腺癌常为经过去势治疗而疗效差、不依赖于雄激素的肿瘤, 据此, 作者用雄激素不依赖性 C4-2 细胞及去势裸鼠建立皮下瘤模型, 经 TK-GCV 治疗后肿瘤体积明显缩小, 血中 PSA 显著下降, 说明在缺乏雄激素的情况下, PSA 启动子同样发挥作用。另外, Yoshimura 等^[6]将 HSV-TK 转染 LNCaP 细胞, 加入 GCV 培养 7 d 后, LNCaP 细胞的存活率与对照相比为 40%, 而将带 PSA 启动子的 HSV-TK 转染 LNCaP 后, 存活率为 79%, 带 PSA 启动子似乎并没有足够有效地引起细胞毒性, 作者认为原因是其转染效率相对较低 (约 10%)。

在缺少雄激素的情况下, 由 PSA 启动子介导的转录水平很低, 这就限制了该方法在雄激素去势治疗患者中的应用。对此, Suzuki 等^[7]将 PSA 启动子/增强子首先用 ARf (partial androgen receptor) 处理激活, 这样可提高 PSA 启动子/增强子的活性, 然后构建 ARf-PSA-HSV-TK/GCV 系统, 尽管实验动物行去势手术, 雄激素浓度很低, 但却有效抑制前列腺癌细胞的生长。Yoshimura 等^[6]将由细菌噬菌体 PI 诱导的 Cre-loxp 系统与 PSA 启动子连接, 实验发现其活性比仅有 PSA 的作用提高 3 倍, 在有雄激素作用的前提下, 其活性能进一步提高 7 倍。在缺少雄激素的条件下, 由 PSA/Cre-loxp 结合物

诱导的启动子活性超出了有雄激素存在而仅有 PSA 启动子的活性。

2 前列腺特异性膜抗原

PSMA (prostate specific membrane antigen, PSMA) 是一种 II 型跨膜蛋白, 含有 750 个氨基酸残基, 分子量为 100 ~ 120 kD。其氨基酸位于细胞膜内, 膜内段、跨膜段和膜外段分别含有 19, 24, 707 个氨基酸。膜内段和膜外段含有多个表位, 可以与多种单克隆抗体如 7E11-C₅ 结合。它具有 N-乙酰基- α -连接二肽酶底物水解酶 (NAAG) 活性及叶酸水解酶活性^[2]。在前列腺癌血浆中 PSMA 的含量比良性前列腺增生或正常前列腺要高得多, 因此 PSMA 的增高可作为前列腺癌的病程进展指标。此外, 由于 PSMA 的水平是由雄激素负调节, 经过雄激素去势治疗的病人, 其血浆中 PSMA 表达增高。

PSMA 的表达是由两个特征性的调控元件控制的, 编码 PSMA 基因的上游启动子 (FOLH1) 大约 1.2 kb。最近有研究发现 PSMA 增强子 (PSME) 位于 FOLH1 的第三个内含子中^[8], 大约 2 kb, 至少有 2 个特异结构促进 PSMA 在前列腺的特异表达, 且前列腺特异表达的最佳结构为 1 648 bp 长^[9]。Uchida 等^[10]将 PSMA 启动子/增强子与 CD 基因连接, 给予前体药物 5-FC 后, 自杀基因系统对前列腺癌细胞的靶向性明显提高, 且基因在前列腺癌细胞中表达增强, 实验还发现在不表达 PSMA 的正常前列腺细胞对转染不明显。可见, 前列腺癌的自杀基因治疗应用 PSMA 启动子不但增强靶向性, 而且不受雄激素的影响, 适用范围广, 安全性高。O'Keefe 等^[9]研究发现, 把全长的增强子连接到 PSMA 启动子上, 表达量提高了大约 100 倍。这表明当增强子位于基因下游时, 其活性被完全保留。存在于 PC-3 细胞中的 PSMA 启动子的活性比在 LNCaP 和 C4-2 细胞中活性高。PC-3 细胞不表达 PSMA, PC-3 细胞中存在着促使启动子表达所必需的转录因子, 同时, 这些细胞的 PSMA 中有些缺陷, 可能导致 PC-3 细胞中 PSMA 启动子的纯合子删除或甲基化。在增强子区域中至少有两个独特的正调控区, 表达时用其最小的结构 (501 bp) 比只用启动子表达要高 50 倍。然而, 最有活性的结构存在于 1 648 bp 和 1 290 bp 的片段中, 它比单独使用 PSMA 启动子表达要高 175 倍, 甚至高于 200 倍。由于它的表达量超过了整个增强子, 由此作者推测在通常意义的增强子区域的 1 648 与 1 913 nt 之间有负调节因子。

3 Probasin (PB)

Probasin 是一种自大鼠背外侧叶前列腺细胞核中分离出的蛋白质, 氨基酸序列分析表明它属于 lipocalin 超家族 (一种配体转运蛋白)。免疫组织化学研究表明这种蛋白质位于前列腺上皮细胞内和前列腺分泌液中^[11]。Probasin 的表达受雄激素的调控并且具有前列腺组织特异性。人们已用含有 Probasin 基因启动子驱动 SV40 大 T 抗原的载体转入小鼠胚胎细胞, 成功地建立了前列腺癌动物模型 (TRAMP)。Zhang 等^[12]研究发现, PB 启动子 (-426 ~ +28) 能在转基因

鼠中介导雄激素依赖的前列腺特异表达, 其中 PB 启动子中的长片段 (-1 0806 ~ +28, LBP) 起关键作用。PB 基因的最佳转录依赖于近端启动子的增强子区上游, 其上的雄激素依赖性增强子中, 有 2 个特异的雄激素受体连接位点 (ARBS-3, ARBS-4), 其中一个位点是存在于 LNCaP 和 MCF-7 细胞中的弱的类固醇应答元件 (SRE), 另一个位点是强的类固醇应答元件 (SRE), 对雄激素优先应答。这 2 个位点在雄激素应答区域 (ARR, -244 ~ -96) 中协同作用, 而 ARR 包含了 ARBS-1, ARBS-2 和 2 个短的有亲合力的雄激素受体连接位点。因此, -750 ~ +28 的 PB 启动子, 除了通常意义上的雄激素应答元件之外, 还包含了第二个雄激素应答区 Probasin 增强元件 (PBE, -705 ~ -426)。由此可知, PB 启动子是以 6 个雄激素连接位点协同作用为机制的。

吕英谦等^[13]利用 DNA 重组技术将 Probasin 基因启动子和在前列腺癌细胞中高表达成纤维细胞生长因子 (FGF) 8b 反义 cDNA 克隆到逆转录病毒载体中, 经转染包装细胞 PT-67 后将产生的复制缺陷型逆转录病毒体外感染 PC-3 细胞并整合到基因组 DNA 中, 感染后的前列腺癌细胞生长增殖速度减慢, 体外侵袭能力下降。研究发现, Probasin 启动子在前列腺癌中的活性高于其他组织的肿瘤细胞。Yu 等^[14]构建了包含 Probasin 的 CV787 载体, 促使腺病毒 Ad5 的 EIA 基因表达, CV787 在 PSA 阳性的细胞中复制比在 PSA 阴性的细胞中, 其复制水平及其杀伤率均高 10 000 倍。对荷瘤 (LNCaP) 裸鼠进行尾静脉注射, 在四周内 300 mm³ 的肿瘤被消除。

Rosetta 等^[15]将大肠杆菌酶 (嘌呤核苷酸磷酸化酶 PNP) 通过注射复制缺陷的人类 5 型腺病毒而直接注入 PC-3 肿瘤中, 表达的 PNP 使前体药物 bMPDR 转变为有毒嘌呤 6MP, 导致细胞死亡。通过雄激素依赖的前列腺特异性鼠 Pb 基因的启动子, 控制 PNP 的表达, 以提高重组腺病毒载体的特异性。为了增强活性, 将连接了 SV40 增强子 (SVPb) 并包含了受 SVPb 控制的报告基因的质粒共同转染 PC-3 细胞, 在前列腺癌细胞中, 质粒的表达比其它细胞中高 20 多倍, 而 SVPb 兼具雄激素非依赖性又具前列腺特异性。将转染了 Ad5-SVPb-PNP 载体的前列腺癌细胞系, 放入 6PDR 中培养 6 d, 其死亡率比在肝、肺细胞中高 5 ~ 10 倍。在动物实验中, 在瘤体内注射 1 次 Ad5-SVPb-PNP (4 × 10⁸ pfu), 随后用 6PDR 注射 6 d, 每天 2 次, 与对照组相比, 明显抑制了裸鼠体内人前列腺肿瘤的生长, 并延长了存活期。

经过世界范围内的学者共同努力, 自杀基因治疗前列腺癌不断取得进展并已用于临床, 疗效可观, 潜力巨大。但在高效、准确等方面, 仍有许多工作要做, 随着基础研究和基因治疗技术的协同发展, 这项肿瘤治疗方法必将显示强大优势。

[参考文献]

- [1] Yoshimura I, Ikegami S, Suzuki S, *et al.* Adenovirus mediated prostate specific enzyme prodrug gene therapy using prostate specific antigen promoter enhanced by the cre-lox system [J]. *J Urology*, 2002, 168: 2659-2664.

[2] Lee SJ, Kim HS, Yu R, *et al.* Novel prostate-specific promoter derived from PSA and PSMA enhancers[J]. *Mol Ther*, 2002, 6: 415-421.

[3] Schuur ER, Henderson GA, Kmetec LA, *et al.* Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 7043-7051.

[4] 叶传忠, 俞 纓, 苏 兵, 等. 带 PSA 启动子的 htk 基因在前列腺癌细胞中的表达[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 10: 625-627

[5] Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN [J]. *Cell*, 1998, 95: 29-39.

[6] Yoshimura I, Suzuki S, Tadakuma T, *et al.* Suicide gene therapy on LNCaP human prostate cancer cells[J]. *Inter J Urolo*, 2001, 8: S5-S8.

[7] Klee GG, Goodmanson MK, Jacobsen SJ, *et al.* Highly sensitive automated chemiluminometric assay for measuring free human glandular kallikrein-2[J]. *Clin Chem*, 1999, 45: 800-8069.

[8] Watt F, Martorana A, Brookes DE, *et al.* A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1[J]. *Genomics*, 2001, 73: 243-254.

[9] O'Keefe DS, Uchida A, Bacich DJ, *et al.* Prostate-specific suicide gene therapy using the prostate-specific membrane antigen promoter and enhancer[J]. *Prostate*, 2000, 45: 149-157.

[10] Lilja H, Haese A, Bjork T, *et al.* Significance and metabolism of complexed and noncomplexed prostate specific antigen forms, and human glandular kallikrein 2 in clinically localized prostate cancer before and after radical prostatectomy[J]. *J Urolo*, 1999, 162: 2029-2034.

[11] Spence AM, Sheppard PC, Davie J R, *et al.* Regulation of a bi-functional mRNA results in synthesis of secreted and nuclear probasin[J]. *Proce Nat Acad Sci U S A*, 1989, 86: 7843-7847.

[12] Zhang J, Gao N, Kasper S, *et al.* An androgen dependent upstream enhancer is essential for high levels of Probasin gene expression[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(1): 134-148.

[13] 吕英谦, 毛泽斌, 周艳艳, 等. 组织特异性启动子介导的反义 FGF8bRNA 对前列腺癌细胞生长增殖能力的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18: 755-761.

[14] Yu DC, Chen Y, Seng M, *et al.* The Addition of Adenovirus Type 5 Region E₃ Enables Calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 4200-4203.

[15] Rosetta MW, Tania T, Peter R, *et al.* Transcription-targeted gene therapy for androgen-independent prostate cancer[J]. *Cancer Ther*, 2002, 9: 443-452.

[收稿日期] 2003 - 10 - 13 [修回日期] 2004 - 01 - 15

《中国航天医药杂志》更名启事

《中国航天医药杂志》创刊五年来得到医学界有关专家及广大作者、读者的支持和好评,经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准,于2004年8月25日正式更名为《中国现代医药杂志》。国内刊号变更为CN11-5248/R,国际刊号ISSN 1671-4261。双月刊,大十六开,80页,逢双月25日出版,国内外公开发行。是中国科技核心期刊(遴选)期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊。

更名后的《中国现代医药杂志》更加注重论文的实用性和创新性,主要栏目有论著、临床经验、病例报告、综述、急诊经验、误诊误治、讲座、专家论坛、会议(座谈)纪要、临床病理(病例)讨论、数学查房、国内外学术动态及基础医学、预防医学、药学、护理、医技、医院管理等。

本刊除特邀专家撰稿外,真诚欢迎医学院校附属医院、省市级医院、地县级医院、国家部委医院、厂矿企业医院、军队武警公安医院及其他基层医务人员踊跃投稿。本刊刊登周期短、时效快。稿件请寄至北京市9200信箱25分箱《中国现代医药杂志》编辑部,邮编100076。

欢迎各图书馆、医疗单位及医护人员积极订阅,国内邮发代82-958,全国各地邮局均可订阅,全年订阅费(含邮资)36元。

联系电话:(010)6838759,88531748; 手机:13501101672

传 真:(010)88533963

E-mail: Bixiangz2002@263.net。

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0229-04

乏氧诱导因子-1 与肿瘤乏氧的研究进展

柳永蕾¹, 宋现让¹综述; 于金明²审阅 (1. 山东省肿瘤医院基础研究中心, 济南 250117; 2. 山东省肿瘤医院放疗科, 济南 250117)

[摘要] 乏氧是实体肿瘤发展过程中的普遍现象, 它能诱导肿瘤细胞发生一系列基因表达的改变以适应环境。乏氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是其调控核心。一方面, HIF-1 通过与靶基因启动子序列中的 HRE 结合调控其表达, 增加肿瘤新血管和红细胞生成、改变能量代谢途径等, 以增加氧的利用率、减少氧的消耗, 同时通过调控细胞周期调节蛋白、凋亡相关基因的表达改变细胞周期、抑制细胞凋亡; 另一方面, HIF-1 的表达受多种基因产物的调控, 如 VHL, PTEN 等。HIF-1 有多种生物学功能, 如促进红细胞生成、肿瘤血管形成、促进肿瘤的转移和侵袭等。通过药物或基因治疗的方式抑制 HIF-1 的活性是治疗肿瘤的一种新途径。

[关键词] 肿瘤; 乏氧; 乏氧诱导因子-1; 乏氧反应元件

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

乏氧是实体肿瘤发展过程中的普遍现象。引起肿瘤乏氧的原因很多, 如肿瘤无限制生长而引起耗氧量增加; 淋巴回流不良导致组织间隙高压、血供不足及 PH 值低; 富氧血液分流入肿瘤组织中不完整的血管等, 但具体机制尚未完全阐明。乏氧通常在距离功能性血管 100 ~ 150 μm 处发生, 肿瘤组织氧分压为 0 ~ 20 mmHg (1 mmHg = 133.322 Pa), 大部分肿瘤组织的氧分压低于 2.5 mmHg, 而正常组织为 24 ~ 66 mmHg^[1]。为增加氧的利用和减少氧的消耗, 肿瘤细胞的很多基因转录活性发生改变, 其基因产物引起了乏氧肿瘤细胞的一系列生物学行为改变, 如刺激新血管生成红细胞生长和改变细胞的糖代谢途径等^[2]。这些乏氧诱导的基因其启动子多含有约 50 bp 的乏氧反应元件(hypoxia response element, HRE), 乏氧激活的转录因子通过与 HRE 结合而达到调控基因的目的。现已发现的转录因子包括: 乏氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、核转录因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB)、激活蛋白因子 1(activator protein-1, AP-1)等^[2], 其中研究最多功能比较明确的是 HIF-1, 现就其研究进展做一综述。

1 HIF-1 结构

HIF-1 是由 HIF-1 α (HIF-2 α 或 HIF-3 α) 亚基和 HIF-1 β 亚基构成的异二聚体, 因都有二聚化所需的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH) 和 PAS (PER-ARNT-SIM) 结构域, 所以 2 种亚基均属于 bHLH/PAS 家族成员。HIF-1 α 是起关键作用的亚基, 其调控结构除 bHLH 和 PAS 外, 还有: ①氨基端和羧基端的核定位信号(nuclear localization signals, NLS, 分别为 NLS-N, NLS-C)。②脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸富蛋白稳定区(transcriptional inhibitory domain, PSTD)。③氨基和羧基端均有转录激活区(amino- and carboxy-terminal transac-

tivation domains, 分别为 TAN-N、TAD-C)。④转录抑制区(transcriptional inhibitory domain, ID), ID 区可降低转录调节活性, 氧浓度正常时更明显。乏氧条件下, HIF-1 α 水平升高, 其转录激活区活性增加。此外, CREB 结合蛋白(cAMP response element binding protein) 和 P300 是 HIF-1 的辅激活蛋白, 两者与 TAD-C 相互作用, 激活 HIF-1 的转录^[3]。

2 HIF-1 表达的调控

HIF-1 β 蛋白在正常与乏氧条件下均持续表达。HIF-1 发挥作用主要是由 HIF-1 α 亚基的表达和活性决定的。HIF-1 α 蛋白表达和转录活性受细胞内氧浓度的精确调控, 发生在 mRNA、蛋白、核定位及转录激活等不同层次^[3]。

2.1 mRNA 水平的调控

HIF-1 α 的表达受氧浓度的调节, 氧信号转变为氧化还原信号, 激活激酶级联反应和/或直接调节 HIF-1 α ^[4]。许多癌基因能通过 PI3K/AKT/FRAP 信号转导途径增加 HIF-1 α 蛋白表达, 而对 HIF-1 β 无影响, 如 v-src、H-ras 癌基因增加 HIF-1 α mRNA 和蛋白的表达, 及 HIF-1 靶基因的活性^[5]。此途径具有细胞类型的特异性, 并不是肿瘤乏氧中普遍存在的效应途径, 如 PC12 和 HeLa 细胞中 PI3K/AKT 通路被激活, 而 HepG2 细胞中不被激活^[6]。

2.2 蛋白水平的调控

正常氧浓度条件下, HIF-1 α 蛋白广泛存在, 但经泛素酶很快降解, 半衰期约为 5 min。肿瘤抑制因子(von hippel-lindau, VHL)对 HIF-1 α 亚基降解起了关键作用。在 VHL 蛋白协助作用下, pVHL 的 β 区直接与 HIF-1 α 的氧依赖的降解结构域(oxygen-dependent degradation domain, ODD)结合, 在蛋白因子 elonginB, elonginC, cul2 和 Rbx1 共同参与下, 通过泛素途径降解 HIF-1 α ^[1]。正常条件下由于羟化酶的作用 HIF-1 α ODD 402 位和 564 位的脯氨酸是羟基化的, 但乏氧时, 羟

化酶被抑制,激活 HIF-1^[7]。存在 VHL 突变的肾癌、血管瘤 VHL 的实验表明,VHL 突变,对 HIF-1 的负调节作用消失,因此 HIF-1 α 持续表达并保持活性。

正常氧条件下,自然存在的 HIF-1 抑制因子(factor inhibiting HIF-1, FIH-1)可使 HIF-1 α TAD-C 结构域 803 位的 Asn 羟化而阻止 p300 与 HIF-1 α 的相互作用,FIH-1 也与 VHL 相互作用而抑制 HIF-1 的转录激活。乏氧时上述途径受抑制,HIF-1 不被降解^[7-8]。

PTEN(phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten)基因是一个与肿瘤关系密切的抑癌基因。PTEN 在恶性胶质瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、黑色素瘤等中突变或缺失,促进了肿瘤血管形成,加速肿瘤进展^[9]。突变或缺失的 PTEN 通过 PI3K/AKT/FARP 信号传导诱导 HIF-1 α 蛋白水平的升高,HIF-1 α mRNA 水平并不受上述途径的影响^[2]。除此以外,二酰基甘油激酶、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、MAPK 激酶级联反应、COX-2(环氧化酶 2)、GTPase Rac1 和 PI3K/AKT 途径都参与调节 HIF-1 α ^[5]。

此外,HIF-1 α 蛋白的稳定性和活性增强也可不依赖于细胞乏氧。如胰岛素生长因子 2(insulin growth factor 2, IGF2)和 α 转化生长因子(transforming growth factor α , TGF- α)可通过非氧依赖途径引起 HIF-1 α 的增加^[7]。

2.3 核定位及转录激活

乏氧诱导 HIF-1 α 转录, HIF-1 α 通过专一核定位信号,转入核内快速积聚,HIF-1 α 稳定性增加,与核心 DNA 序列 5'-RCGTG-3'结合,HIF-1 α 活化,与 HIF-1 β 通过 HLH 结构形成二聚体,通过 PAS 结构与靶基因的 HREs 结合,激活靶基因转录,从而引起各种反应^[9]。Osada 等^[10]用 NADPH 依赖性酶抑制剂和反义核酸技术研究发现在 Hep3B 细胞和 Hela S3 细胞中黄素蛋白。NADPH-P450 还原酶(NADPH-P450 reductase, NPR),定位于细胞浆膜,能在乏氧条件下调节 HIF-1 活化和转位。

3 HIF-1 的生物学作用

3.1 促进红细胞生成

肿瘤乏氧条件下,HIF-1 表达增加,可诱导促红细胞生成素(erythropoiesis, EPO)、EPO 受体表达增加。EPO 是细胞因子超家族的成员之一,在许多组织及细胞包括红细胞、肿瘤细胞等存在,是促红细胞生成的刺激因子。它本身无酪氨酸激酶活性,通过 JAK2 联系激活 START5, Ras, PI3K 多条信号转导途径起作用。HIF-1 诱导 EPO 表达增加可促进红细胞生成,增加血液氧的运输,减轻肿瘤组织缺氧,增强肿瘤细胞的适应性^[11]。

3.2 促进肿瘤血管形成

低氧或基因的改变可使癌基因活化和/或抑癌基因失活,从而促进肿瘤血管的生成。HIF-1 α 表达增加可使肿瘤血管形成相关基因表达升高,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子 β (transforming growth fac-

tor β , TGF- β)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase2, NOS2)、IL-8 等。VEGF 在肿瘤血管的行程中起关键作用,它包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE、胎盘生长因子(placenta growth factor, PLGF)^[2]。现在研究主要集中于 VEGF-A。VEGF-A 的受体 VEGFR-1, VEGFR-2 选择性地表达于内皮细胞,肿瘤细胞也有少量表达。VEGF-A 与受体相互作用,其受体二聚化,自身磷酸化,通过细胞内 MAPK, PI3K, Ras, PLC 级联反应多途径传递信号^[12]。其作用包括①诱导血管内皮细胞增殖,促进新生血管内皮细胞生长,②增加血管通透性,③增加血管外纤维性凝胶而支持肿瘤血管内皮细胞生长,结果使肿瘤血管生成增加,肿瘤得到血液供应而持续生长^[12]。

最近发现,乏氧肿瘤的侵袭转移与 2 种受体有关即 CXCR4 和 c-Met。HIF-1 可使肿瘤细胞趋化因子受体 CXCR4 增加,与细胞因子如生长因子结合后,不仅可以促进肿瘤细胞的转移而且能使其定位于远处特定靶器官,如人乳腺癌细胞就含有大量 CXCR4,这些细胞倾向转移至产生大量细胞因子 SDF-1 α (CXCR4 的结合分子或者配体)的部位,如肺和骨髓^[13]。乏氧诱导的转移也可通过其它信号途径,如 c-Met 受体在乏氧时增加,它不仅能增强细胞活动性也能通过与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)结合而增强细胞的侵袭性^[13]。

3.3 能量代谢

乏氧条件下,细胞不能通过电子呼吸链生成足够的 ATP,代谢转向糖酵解。乏氧组织中,与糖及能量代谢有关的靶基因表达在 HIF-1 的诱导下均升高。这些靶基因包括:腺苷酸激酶 3, α_{1B} 肾上腺素能受体,醛缩酶 A、C,烯醇化酶 1,葡萄糖转运体 1,3,3-磷酸甘油醛脱氢酶,己糖激酶 1,2 等。上述基因表达的变化可使肿瘤组织摄取和利用葡萄糖的能力增强^[1]。Griffiths 等^[4]用核磁共振及其辅助技术监测 HEPA-1 鼠肝癌的代谢改变,发现 HIF-1 β 野生型和 HIF-1 β 缺失型 2 组肿瘤大小一致,血管、血供无显著差别,但野生型肿瘤比缺失型肿瘤的 ATP 含量高 5 倍,说明 HIF-1 能促进细胞合成代谢。

3.4 细胞周期调控

研究结果显示:乏氧细胞可生存但不增殖,处于休眠状态,这与 HIF-1 调节细胞周期有关。HIF-1 α 能延缓细胞进入 S 期,阻止细胞周期中 G1/S 期的转换,这是通过诱导 p21 和 p27 升高来实现的。p21 和 p27 是细胞周期素依赖激酶抑制因子,可抑制细胞周期素-细胞周期素依赖性激酶复合物的激酶活性,使一些细胞增殖所需的蛋白磷酸化受阻,抑制细胞周期中 G1 期向 S 期的转换,使细胞停滞在 G1 期^[14]。

3.5 凋亡

许多实验证实, HIF-1 是凋亡抑制因子。HIF-1 上调 Bcl-2,从而抑制凋亡^[15]。但也有实验结果显示,HIF-1 表达与 Bcl-2 呈负相关^[16]。Piret 等^[17]报道,当细胞处于严重乏氧或长时间处于乏氧条件下,其保护性反应丧失而引起凋亡。细胞死亡因子 Nip3 是凋亡前的一种蛋白,为

bcl-2 家族的成员,因启动子含有 HRE,可以被缺氧或 HIF-1 α 活化,从而诱导凋亡。但后来, Sower 等^[18] 提出 Nip3 引起肿瘤坏死而非凋亡。Tendler 等^[1] 报道 HIF-1 与 IFN 作用引起 iNOS 的增加, NO 产生增多,诱导肿瘤细胞凋亡。p53 可诱导凋亡, HIF-1 α 通过稳定 P53 蛋白促进肿瘤细胞凋亡。低氧选择性地使 p53 突变的瘤细胞凋亡受阻,恶性程度更高。在人乳腺癌 MCF-7 和 IMR-90 细胞中,低氧也诱导 p53 依赖性基因 p21WAF/CIP-1 的表达。在 0.2% 氧浓度下,癌基因转化细胞出现 p53 依赖性细胞凋亡,此时 p53 突变可延长乏氧细胞的生存时间,使之适应不利环境。HIF-1 α 的磷酸化状态也是促进凋亡与否的一个关键因素,去磷酸化而促进凋亡,磷酸化与之相反^[2]。

4 HIF-1 与肿瘤治疗

乏氧肿瘤细胞由于一系列的基因表达改变而引起细胞凋亡抑制、细胞周期停滞、恶性程度增高、对放化疗抗拒等。由于 HIF-1 在其中所起的关键作用,决定了以 HIF-1 为靶点的治疗策略具有可行性。其机制包括两类:一类是通过抑制 HIF-1 的表达或活性达到肿瘤治疗的目的,如化学药物、HIF-1 反义核酸药物;另一类是利用 HIF-1 的转录因子活性,设计启动子含有 HRE 序列的表达质粒,使目的基因在乏氧细胞选择性表达,发挥治疗作用。

4.1 化学药物

调控 HIF-1 表达的因子都可以作为治疗的靶点。例如酪氨酸激酶抑制剂 Herceptin, Iressa, Herbimycin; PKC 抑制剂 calphostin C; PI3K 抑制剂 wortmannin, LY294002; MAPK 抑制剂 PD98059; FRAP/mTOR 抑制剂 rapamycin 都能阻断 HIF-1 α 的功能而降低 HIF-1 α 的表达^[1,9]。苯醌及其衍生物 17-AAG(17-allyl-aminogeldanamycin) 均为热休克蛋白(heat shock protein, Hsp90) 特异抑制剂,可在正常与乏氧条件下抑制 HIF-1 α 转录活性并降解 HIF-1 α 蛋白,具有剂量与时间依赖性,这已得到证实^[19]。同样是 Hsp90 抑制剂,radicol 能特别抑制 HRE 与 HIF-1 之间的作用,但对 HIF-1 α 蛋白的核定位及核内的 HIF-1 α 无影响^[20]。YC-1, 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole,原来是血小板凝集和血管收缩的药物,现发现该药物能在体内外抑制 HIF-1 活性, YC-1 能降低 HIF-1 α 水平,荷瘤裸鼠肿瘤体积缩小,肿瘤血管生成减少。YC-1 有望成为针对 HIF-1 α 的抗肿瘤药物。但是它的作用机制还不清楚^[21]。组氨酸脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC) 抑制剂 FK228 能抑制乏氧条件下 HIF-1 的表达和活性,通过抑制其活性而减少肿瘤血管的生成,抑制肿瘤的发展^[5]。此外有人用多肽阻断 HIF-1 α 与 P300/CREB 作用,减少乏氧诱导的基因表达,可使肿瘤增殖降低,血管生成减少^[22]。

4.2 基因治疗

4.2.1 反义核酸技术

采用反义核酸技术可抑制肿瘤细胞 HIF-1 α 基因的表

达。Sun 等^[23] 于肿瘤内注射反义 HIF-1 α 质粒可下调 VEGF,降低肿瘤微血管密度。单独应用反义 HIF-1 α 即可导致完全和持久地缩小肿瘤,而抗血管生成剂通常只能暂时抑制肿瘤的生长。

4.2.2 RNA 干扰技术

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由双链 RNA 引起的 mRNA 特异性降解而引起的基因沉默,可以应用人工合成双链小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA) 或构建载体介导 RNAi。Krishnamachary 等^[24] 发现 HIF-1 能调节人结肠癌细胞 HCT116 编码组织蛋白酶 D、基质金属蛋白酶、uPAR、角蛋白 14、18、19、转化生长因子等的表达,这些基因产物与 HCT116 的基质侵袭转移过程有关,利用 HIF-1 α 特异的 siRNA 能抑制上述基因表达,降低了由于乏氧和/或 HIF-1 α 过表达导致的肿瘤细胞侵袭转移能力。此外,应用载体介导的 RNAi 可以显著抑制 HIF-1 α ,改变了肿瘤乏氧的生物行为,抑制肿瘤的发生发展^[25]。

4.2.3 HIF-1/HRE 基因表达系统

VEGF、EPO 等基因的 5' 或 3' 侧翼区含有能与 HIF-1 结合增强基因表达的 HRE,其核心序列是(A/G)CGT(G/C)C。采用含有 HRE 的 EPO/VEGF 启动子或多个串连的 HRE 结构的启动子构建基因表达系统,使目的基因在乏氧或 HIF-1 过表达的肿瘤细胞中选择性表达达到基因治疗的目的。体外实验证实 HIF-1/HRE 基因表达系统在乏氧条件下报告基因的表达是常氧条件下的 10~80 倍,串连的 HRE 个数与基因表达水平关系密切, HRE 数目越多乏氧条件下的表达越强,乏氧/常氧比越高,即基因表达的靶向性越好,通常 HRE 的数目在 5 个以上即可。HIF-1/HRE 基因表达系统中 HRE 序列的方向并不影响其调控基因的表达,举例如下。

Post 等^[22] 先用来自人 VEGF 或 EPO 的 HREs 构建了一系列含有乏氧反应启动子的哺乳动物表达质粒,能同时调节两侧基因的表达,他们比较了不同 HRE 拷贝数质粒转染人神经胶质瘤细胞 LN229, U251MG 和 U138MG 在常氧(21%)和乏氧(1%, 3%, 5%, 10% 氧浓度)条件下的报告基因的表达,发现乏氧条件下双报告基因的表达与 HRE 拷贝数有关,但与 HRE 的方向性无关。这种表达系统有利于通过报告基因检测反映目的基因的表达水平。后来,他们采用这种双向调节系统构建了一种乏氧/HIF 依赖的腺病毒(hypoxia/HIF-dependent replicative adenovirus, HYPR-Ad) 载体, HYPR-Ad 的复制依赖于 HIF-1 调控的 E1A 基因表达, HYPR-Ad 转染 HIF 高表达的乏氧细胞, HIF 启动 E1A 基因表达病毒复制引起乏氧细胞溶解,常氧细胞由于 E1A 基因不表达而不受影响。利用该载体可以治疗所有乏氧或和有 HIF 活性的肿瘤,而不管他们的组织起源或遗传学改变;可联合放化疗,提高治疗效果^[26]。

5 小结

HIF-1 是乏氧组织一系列基因改变的关键调控因子,针

对 HIF-1 表达调控机制及以 HIF-1 为靶点治疗肿瘤等疾病已成为近期研究热点。相信随着 HIF-1 研究的深入,会更加详尽地认识缺氧机制,进而指导疾病治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(10): 721-732.
- [2] Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells[J]. Mol Cancer, 2003, 2(1): 23.
- [3] Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics[J]. Trends Mol Med, 2002, 8(4 Suppl): S62-67.
- [4] Griffiths JR, McSheehy PM, Robinson SP, *et al.* Metabolic changes detected by *in vivo* magnetic resonance studies of HEPA-1 wild-type tumors and tumors deficient in hypoxia-inducible factor-1beta (HIF-1beta): Evidence of an anabolic role for the HIF-1 pathway [J]. Cancer Res. 2002, 62(3): 688-695.
- [5] Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1 [J]. Cell Growth Differ. 2001, 12(7): 363-369.
- [6] Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragonés J, *et al.* Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension[J]. J Biol Chem, 2002, 277(16): 13508-13517.
- [7] Marx J. Cell biology: How cells endure low oxygen[J]. Science, 2004, 303(5663): 1454-1456.
- [8] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, *et al.* Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: Its protein stability and biological functions[J]. Exp Mol Med, 2004, 36(1): 1-12.
- [9] Hur E, Chang KY, Lee E, *et al.* Mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. Mol Pharmacol, 2001, 59(5): 1216-1224.
- [10] Osada M, Imaoka S, Sugimoto T, *et al.* NADPH-cytochrome P-450 reductase in the plasma membrane modulates the activation of hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Biol Chem, 2002, 277(26): 23367-23373.
- [11] Leyland-Jones B. Evidence for erythropoietin as a molecular targeting agent[J]. Semin Oncol, 2002, 29(3 Suppl 11): 145-154.
- [12] Duffy JP, Eibl G, Reber HA, *et al.* Influence of hypoxia and neo-angiogenesis on the growth of pancreatic cancer[J]. Mol Cancer, 2003, 2(1): 12.
- [13] Bernards R. Cancer: cues for migration[J]. Nature, 2003, 425(6955): 247-248.
- [14] Goda N, Ryan HE, Khadivi B, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 359-369.
- [15] Acs G, Zhang PJ, McGrath CM, *et al.* Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression[J]. Am J Pathol, 2003, 162(6): 1789-1806.
- [16] Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer[J]. Anti-cancer Res, 2000, 20(3A): 1527-1533.
- [17] Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(16): 9082-9087.
- [18] Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, *et al.* HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors[J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6669-6673.
- [19] Mubjeesh NJ, Post DE, Willard MT, *et al.* Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2002, 62(9): 2478-2482.
- [20] Hur E, Kim HH, Choi SM, *et al.* Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1alpha/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol[J]. Mol Pharmacol, 2002, 62(5): 975-982.
- [21] Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, *et al.* YC-1: A potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1 [J]. J Natl Cancer Inst, 2003, 95(7): 516-525.
- [22] Leek RD, Talks KL, Pezzella F, *et al.* Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(5): 1326-1329.
- [23] Sun X, Kanwar JR, Leung E, *et al.* Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy[J]. Gene Ther, 2001, 8(8): 638-645.
- [24] Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, *et al.* Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1 [J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1138-1143.
- [25] Hanze J, Eul BG, Savai R, *et al.* RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312(3): 571-577.
- [26] Post DE, van Meir EG. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy[J]. Oncogene, 2003, 22(14): 2065-2072.

[收稿日期] 2004 - 03 - 04

[修回日期] 2004 - 05 - 19