

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0005-04

内质网——肿瘤治疗的新靶点

蔡真(浙江大学医学院附属第一医院血液科、骨髓移植中心,杭州 310003)

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是组成细胞内膜系统的膜性细胞器之一^[1],也是细胞内膜系统的发源地。内质网在真核生物细胞中不仅具有蛋白质合成、脂质合成、物质运输、信息储存及传递功能,还具有机械支持、糖类代谢和解毒作用。研究内质网膜系统的结构与功能及生物学行为对了解正常细胞生理功能和肿瘤细胞的病理机理有重要意义,也为肿瘤治疗提供新的思路。

1 内质网的结构和功能

不同细胞中以及同一细胞的不同时期内质网结构有所差异。经高锰酸钾技术处理的 CV-1 细胞的内质网膜系统在扫描电镜下呈现由线状细管和微型扁囊连接的网状膜结构^[2]。细胞核周围的内质网较其他部位的稠密并构筑成网状的三维结构,在包绕细胞核的核膜处可清楚地观察到内质网与外核膜的连接。遍布于细胞质内的内质网虽较细胞核周围的松散,但也呈立体构像。细胞质中的内质网一般均铺展至细胞边缘,并伸展到伪足和突起中。

在透射电镜下可观察到两种类型的内质网,粗面内质网和滑面内质网^[1]。粗面内质网又叫做颗粒型内质网,常见于蛋白质合成旺盛的细胞中。粗面内质网大多为扁平的囊,少数为球形或管泡状的囊。在靠近核的部分,囊泡可以与核的外膜连接。粗面内质网既是新合成的蛋白质的运输通道,又是核糖体附着的支架。粗面内质网的表面所附着的核糖体(也叫核糖核蛋白体)是合成蛋白质的场所,新合成的蛋白质就进入内质网的囊腔内。滑面内质网的囊壁表面光滑,没有核糖体附着。滑面内质网的形状基本上都是分支小管及小囊,有时小管排列得非常紧密,以同心圆形式围绕在分泌颗粒和线粒体的周围。滑面内质网与蛋白质的合成无关,可是它的功能却更为复杂。它可能参与糖元和脂质的合成、类固醇激素的合成以及具有分泌等功能。在肝细胞中,滑面内质网上与糖原代谢有关的葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-PA)是内质网的标志酶,参与糖原异生代谢,对维持血糖有重要意义;内质网腔内的水解酶使药物解毒。在肌细胞内它与Ca²⁺的摄取和释放有关,这是由滑面内质网膜上的钙泵完成的。在肾

上腺皮质细胞中,滑面内质网代谢类固醇产生类固醇激素。在内质网膜上粗面内质网和滑面内质网互相连续,并与细胞内的其他膜性结构共同组成细胞内动态膜系统,将细胞内部分隔成各个特殊区域,使细胞的不同代谢过程得以在特定的环境内高效率进行。

2 内质网生物学行为

内质网是细胞内最大器官之一,它的持续性膜结构从胞膜延伸到核膜。所有的分泌蛋白和膜蛋白都是在翻译过程中或翻译后被转运到内质网腔内,然后进行修饰,折叠,正确装配,再被运送到高尔基复合体的^[3]。内质网为蛋白质折叠提供了专门的氧化环境。内质网分子伴侣如:蛋白质二硫化异构酶(PDI)催化蛋白质折叠反应,并加快它们最后装配成型的速度。分子伴侣BIP(GRP94)并不直接催化蛋白质折叠反应,而是维持蛋白质的折叠状态,防止蛋白质聚合。Calnexin(CNX) Calreticulin(CRT)能识别天冬氨酸低聚糖中的葡萄糖- α (1,3)-甘露糖糖苷键,在转运到高尔基复合体之前,包含有Glc3Man9GlcNAc2的14-低聚糖核心Asn-X-Ser/Thr,随后葡萄糖残端被葡萄糖苷酶-I剪切,剩余的两个葡萄糖残基被葡萄糖苷酶II剪切,然后在CNX/CRT,Erp57(蛋白质二硫化酶)的作用下正确折叠。错误折叠或未装配的蛋白质被UDP葡萄糖:葡萄糖基转移酶(UGT)重新糖基化,然后CNX/CRT再结合上去保持未折叠状态,并通过“质量控制程序”将其运送到顺式-高尔基体中。

内质网不仅是装配和运送蛋白质的器官,也是脂质双分子层的合成和装配器官,因此内质网控制着整个细胞内膜系统的容量和范围。作为细胞内Ca²⁺的主要储存库,内质网还传递细胞内释放Ca²⁺的信号,所以内质网的动态平衡是细胞功能和生存的关键。内质网是胞内钙离子主要储存器官,钙在内质网内以离子或结合蛋白(如calreticulin)的形式存在,calreticulin也与蛋白质折叠及修饰有关^[4]。内质网内的钙离子浓度保持高度的动态平衡:游离钙离子浓度在0.2~2

[作者简介] 蔡真(1962-),女,上海人,教授,博士生导师,主要从事恶性血液病的临床和基础研究

mmol/L 之间^[5]。内质网同时也是不同钙信号传递通路的组成部分。在钙离子传递信号的过程中,内质网能释放钙离子,迅速地改变腔内钙离子的含量。腔内高浓度游离钙离子也是决定内质网合成和处理蛋白质以及防止钙离子紊乱而触发内质网应激反应的关键因素^[5]。内质网的钙占胞内总钙的 14%,作为钙库维持胞内钙的平衡;钙离子通过内质网膜上的 IP₃ 通道从内质网释放到胞质中,而通过 Ca²⁺ ATP 酶从胞质中被摄入到内质网内。

内环境紊乱(包括 Ca²⁺ 储存紊乱、内质网内氧化或糖基化异常、蛋白质折叠能力下降)都会导致内质网内未折叠蛋白质聚集。内质网内蛋白质折叠装配和运送的能力失调会引起内质网应激^[6]。内质网应激主要激活 3 条信号通路:未折叠蛋白反应(UPR),内质网超负荷反应(endoplasmic reticulum overload response, EOR)和固醇调节级联反应。前两者均是蛋白质加工紊乱所致,后者则是在内质网表面合成的胆固醇损耗所致。内质网应激反应维持细胞内环境的稳定。UPR 和细胞内钙库耗竭均可引起内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress),其膜上的 3 个跨膜蛋白(IRE1, PERK, ATF6)起着转导应激信号的作用。IRE1 和 PERK 是内质网膜上的跨膜蛋白激酶,是 UPR 的近端感受器,在稳定状态下,它们的 N 端腔域部份由于与 Bip 相连形成复合物而不能磷酸化。当未折叠蛋白增多, Bip 与它们解离时,IRE1 和 PERK 通过跨膜磷酸化而转导内质网应激反应信号。内质网应激可促进内质网对蓄积在网腔内的错误折叠或未折叠蛋白质的处理,从而有利于维持细胞的正常功能并使之存活;但是,时间过长的内质网应激可引起细胞凋亡。

当内质网中未折叠或错误折叠的蛋白增多时,应激信号能通过内质网膜传递到细胞核中,继而引起一系列特定的靶基因转录上调和蛋白质翻译水平下调,以使细胞能继续存活,这种反应就是未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。UPR 的效应因子包括 3 种蛋白: Ire1p, 感受内质网腔中未折叠蛋白的聚集,并将此信号传递出内质网膜; Hac1p, 直接激活 UPR 靶基因的转录;和 Rlg1p(tRNA 连接酶), Hac1p 在活化的 Ire1 作用后需要此酶的连接作用。大量证据表明, Ire1p 在内质网应激中是一种细胞凋亡前期信号。UPR 时, Ire1p 激酶区能与 JNK/SAPK 的结合器蛋白 TRAF2(tumor necrosis factory receptor-associated factor 2)相互作用,进而激活 c-Jun 氨基酸末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)或应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK),然后这两种活化蛋白磷酸化 c-Jun,从而启动细胞凋亡。另一方面,UPR 也与

CHOP/GADD153(C/EBP-homologous protein/growth arrest and DNA damage inducible)介导的细胞凋亡有关^[9]。在正常情况下,CHOP 在细胞中并不表达,但 UPR 却能激活转录因子 CHOP/GADD153 和它下游靶基因的表达。哺乳动物细胞的 UPR 既有细胞保护作用,又有细胞毒性作用(促进前期凋亡)。因而 UPR 活化会产生两种结果:通过凋亡效应因子激活细胞死亡通路或通过促进编码分子伴侣等靶基因的转录使细胞在应激状态下存活^[7]。

3 内质网介导的细胞凋亡

内质网介导的细胞凋亡是不同于受体介导(TNFR, Fas)或线粒体介导 DNA 损伤的另一种新的细胞凋亡途径。caspase 12 作为凋亡起始因子发挥了关键作用。内质网与细胞凋亡相联系表现在两个方面;一是内质网对 Ca²⁺ 的调控^[7],二是内质网应激反应。Ca²⁺ 是细胞内重要的信号转导因子,它的稳态平衡在细胞正常生理活动中起着举足轻重的作用。作为细胞内重要的钙库,内质网对胞质中 Ca²⁺ 浓度的精确调控可以影响细胞凋亡的发生。大量实验表明,很多细胞在凋亡早期会出现胞质内 Ca²⁺ 浓度迅速持续的升高,这种浓度升高来源于细胞外 Ca²⁺ 的内流及胞内钙库(如内质网)的释放。相对高浓度的 Ca²⁺ 一方面可以激活胞质中的钙依赖性蛋白酶(如 calpain),另一方面可以作用于线粒体,影响其通透性的改变,进而促进凋亡。位于内质网上的抑凋亡蛋白 Bcl-2 则可以调节内质网腔中的游离 Ca²⁺ 浓度,使胞质中的 Ca²⁺ 维持在合适的中等浓度水平,从而起到抑制凋亡的作用^[8]。

当细胞接受诱导因子刺激后,将信息传入细胞核,启动自身遗传机制,按一系列精确的反应程序,形成级联放大的信号转导和基因表达,最终导致细胞生理性死亡,这是内质网应激反应诱导细胞凋亡的途径^[9]。有研究显示内质网内钙失衡诱导应激反应时,激活钙蛋白激酶。活化钙蛋白激酶切割内质网膜上的 caspase 12,产生活性 caspase 12 片断;并且钙蛋白激酶还可切割 bcl-XL,使其失活。将 caspase 12 前体与钙蛋白激酶一起在体外孵育,产生 caspase 12 活性片断;将活性的 caspase 12 导入细胞,细胞出现凋亡。Nobuhiro 等将去除线粒体的小鼠成纤维细胞经 Thapsigargin 处理诱导内质网应激反应,其结果显示:内质网反应诱导细胞凋亡时, caspase 12 活化启动 caspase 级联反应; caspase 9 前体是 caspase 12 的底物,并且 caspase 9 的活化不需线粒体释放细胞色素 C;细胞凋亡信号从 caspase 12 传到 caspase 9 再到 caspase 3, caspase 3 是效应分子^[10]。上述途径可被抗 caspase 12 或抗 caspase 9 的抗体阻滞,但不被抗细

胞色素 C 抗体阻滞。在 Apaf 1 缺陷细胞中,上述内质网应激诱导细胞凋亡不受影响,提示这是与线粒体介导的不同的凋亡途径^[11]。

内质网应激也可引起细胞质内 caspase 7 移位至内质网表面,在 caspase 7 存在的条件下,位于内质网上的 caspase 12 可被内质网应激所激活,然后引发细胞凋亡。有机氧化剂叔丁基过氧化氢(TBHP)能够引起氧化应激和细胞内 Ca^{2+} 含量的上升。用 TBHP 处理肾脏上皮细胞导致的前期内质网应激可诱导内质网应激蛋白质 GRP78, GRP94 以及内质网伴侣蛋白 calreticulin 的表达,使细胞能够抵抗 TBHP 引起 Ca^{2+} 升高后出现的细胞损伤^[12]。CHOP(CEBP homologous protein) 基因也参与内质网应激反应诱导细胞凋亡。CHOP 广泛表达在哺乳动物细胞,其编码的蛋白质属于 CCAAT 增强子相连蛋白的转录因子 CEBP 家族,与各种细胞活动如能量代谢、增殖、分化、凋亡相关。在正常情况下,CHOP 在细胞中并不表达,但 UPR 却能激活转录因子 CHOP/GADD153 和它下游靶基因的表达。CHOP 阻滞细胞分裂周期可诱导细胞凋亡^[13]。

4 肿瘤治疗新靶点

内质网应激与机体多种疾病的发生密切相关,这主要与内质网应激导致细胞凋亡有关。因此可通过应用一些细胞毒性药物诱发内质网应激,加速癌细胞的凋亡来治疗癌症^[14],也可以应用一些药物或者细胞因子来阻断疾病或者毒物诱导的靶细胞出现异常的内质网应激反应,减少甚至逆转细胞的凋亡,达到保护人群健康,治疗疾病的目的。

蛋白质是生命活动的基础,内质网合成的蛋白质需按照不同的方式分别运输到达细胞的特定部位而发挥作用。已知膜性细胞器间的大分子运输是由有被小泡介导的囊泡转运,从内质网到高尔基体之间的运输属于自发的、无分选及浓缩过程的膜流方式运输。药物 Brefedlin A(BFA)可抑制蛋白由内质网向高尔基体的运输,导致高尔基体的广泛吸收并与内质网融合,进而阻断了有被小泡的出芽,阻断蛋白质的运输,促进细胞的死亡。SCN3B(内源性钠通道亚单位 β_3)蛋白位于内质网,将 SCN3B 基因转入 T98G 和 Saos2 细胞能显著抑制克隆形成。抗癌药物和 P53 的过度表达可以上调 SCN3B 的水平。进一步研究发现,腺病毒介导的 SCN3B 转染合用抗癌药物能诱导凋亡。提示 SCN3B 介导的 p53-依赖性凋亡途径可能是抗癌药物联合基因治疗的新靶点^[15]。另有研究发现 Thapsigargin, 内质网 Ca^{2+} -ATP 酶抑制剂,能抑制 Ca^{2+} 释放,通过调节 TRAIL-R2 启动子上调 TRAIL-R2 的表达,促进细胞凋

亡^[16]。提示可以通过上调启动子来治疗肿瘤。

目前的胞内抗体肿瘤基因治疗研究采用的策略是:针对内质网内的某一特异性肿瘤相关蛋白,使胞内抗体在内质网内分泌并与之结合,阻断其功能活性。胞内抗体多为单链抗体(scFv)。为了使 scFv 滞留于内质网,通常在单链抗体的氨基端融合一段导肽或在其羧基端引入一段内质网滞留信号。内质网是多种生物活性蛋白加工、分泌的通路,将抗体滞留于内质网管腔或内质网内膜上大大增加了抗体与靶蛋白相互作用的机会;内质网本身也是天然抗体组装的场所,其管腔内存在有利于抗体形成活性构象所需的辅助因素。此外,内质网滞留型抗体的生物活性半衰期要长于细胞浆中的胞内抗体。EGFR 和肿瘤的发生发展有关,有报道用胞内抗体技术使哺乳动物细胞 cDNAs 编码 cFv-225 和 scFv-FRP5,使它们在内质网腔内和人 EGFR 及 ErbB-2 高亲和力结合,特异性抑制这些受体在细胞外膜表面的表达,从而抑制肿瘤的发展^[17]。浸润和转移是癌细胞的重要特征,其中 IV 型胶原酶(MMP2, MMP9)起着重要的作用。最新研究报告,使 PG 细胞内质网表达抗 IV 型胶原酶 scFv M97 抗体,抑制 IV 型胶原酶的分泌^[18],从而显著抑制肿瘤的浸润和转移。这些结果显示胞内抗体技术可以在蛋白加工、分泌这一关键步骤从根本上抑制 IV 型胶原酶的活性,在肿瘤基因治疗中具有重要的应用价值^[18]。

5 结 语

内质网是组成细胞内膜系统的膜性细胞器,是细胞内膜系统的发源地。研究内质网膜系统的结构与功能对了解正常细胞生理功能和癌细胞的病理机理有重要意义。内质网与凋亡的关系的研究也是近年研究的热点,为肿瘤的治疗开辟新的思路,值得进一步深入研究。

[关键词] 内质网;肿瘤;治疗

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] C

[参考文献]

- [1] Alberts. Endoplasmic Reticulum: Structure and function molecular biology of the Cell[J]. Garland Publishing, 1994: 577-616.
- [2] 黄集前, 宋今丹. 培养细胞整装内质网三维结构的多态性[J]. 解剖学报, 1996, 27(3): 269-272.
- [3] Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, et al. The endoplasmic reticulum: Integration of protein folding, quality control, signaling and degradation[J]. Curr Opin Struct Biol, 2001, 11(1): 120-124.
- [4] Michael C, Alexei V, Tepikin, et al. ER calcium and the functions of intracellular organelles[J]. Cell Dev Bio, 2001, 12(1): 11-17.
- [5] Verkhratsky A, Petersen OH. The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: From neuronal signalling to neuronal death[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 447(2-3): 141-154.

[6] Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response-a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum[J]. J Chem Neuroanat, 2004, 28(1-2): 79-92.

[7] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 381-389.

[8] Groenendyk J, Lynch J, Michalak M. C alreticulin, Ca²⁺, and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum[J]. Mol Cells, 2004, 17(3): 383-389.

[9] Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program[J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 372-380.

[10] Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(11): E255-E263.

[11] Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, *et al.* An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 34287-34294.

[12] Michalk M, Robert J M, Opas M, *et al.* Ca²⁺ signaling and calcium binding chapwrones of the endoplasmic reticulum [J]. Cell Calcium, 2002, 32(5): 269-278.

[13] Houweling M, Van Goldel M, Vaandrager AB, *et al.* Inhibitional of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplas-

mic reticulum stress and apoptosis related protein CCAAT enhancer binding proten homologous protein (CHOP/GADD153)[J]. Bio Chem, 2003, 369(3): 643-650.

[14] Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy[J]. Blood, 2001, 98(9): 2603-2614.

[15] Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, *et al.* Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene[J]. Oncogene, 2004, 23 (47): 7791 - 7798.

[16] Yoshida T, Sakai T. Promoter of TRAIL-R2 gene[J]. Vitam Horm, 2004, 67: 35-49.

[17] Beerli RR, Wels W, Hynes NE. Inhibition of signaling from Type I receptor tyrosine kinases via intracellular expression of single-chain antibodies[J]. Breast Cancer Res Treat, 1996, 38(1): 11-17.

[18] Shen EY, Wang WG, Li Y, *et al.* Inhibitory effect of endoplasmic reticulum-retained anti-type IV collagenase intrabody on invasion and proliferation of cancer Cell[J]. Chin J Cancer, 2004, 23 (9): 1005-1010.

[收稿日期] 2005 - 03 - 12 [修回日期] 2005 - 03 - 20
 [本文编辑] 韩 丹,王 莹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0008-01

nm23 因子在大肠癌组织中的表达及其临床意义

桂 贤, 刘惠敏, 何 金, 李玉莉, 孙 静 (第二军医大学附属长征医院病理科, 上海 200003)

肿瘤转移是一个复杂的、多步骤的、肿瘤细胞和宿主细胞相互作用的过程,是恶性肿瘤的重要生物学行为,往往是导致病人死亡的直接原因。随着分子生物学的发展,对肿瘤转移抑制的研究已进入分子水平,nm23 基因即是近年来发现并被证实与多种肿瘤的转移有关的较新的肿瘤抑制基因,该基因可能通过影响细胞内微管的聚合/解聚和 G 蛋白介导的信号传导,而参与肿瘤的发生和发展。

本实验收集本院手术切除的术前未做任何化疗、放疗的大肠癌组织标本共 74 例,标本均以石蜡包埋常规切片后,经脱蜡、水化,用 S - P 即用型试剂盒进行染色,用已知染色阳性的大肠癌组织切片作阳性对照,PBS 代替各单抗作阴性对照。结果:74 例大肠癌标本中,nm23 基因阳性表达 60 例,总阳性率 81.08%;且 nm23 的表达与患者的性别、年龄、肿瘤的大小、浸润深度、分化程度淋巴结转移与否均无相关性,而与肿瘤的病理类型密切相关:在腺癌、黏液腺癌、印戒细胞癌中 nm23 的阳性表达率分别为 86%,84%,20%,且印戒细胞癌明显比其他两种类型肿瘤 nm23 的表达率低(*P* < 0.05),但腺癌与黏液腺癌间差别无统计学意义(*P* > 0.05)。

nm23 基因是 Steeg 等从鼠黑色素瘤细胞系的 cDNA 文库中分离并鉴定出的一种与肿瘤转移抑制相关的基因。人类 nm23 基因定位于 17 号染色体长臂上,其蛋白产物具二磷酸核苷激酶(NDPK)活性,参与体内三磷酸核苷的生成,通过

影响微管聚合状态及 G 蛋白介导的信号传导通路而调节细胞代谢。多种啮齿类动物实验性肿瘤的转移能力与 nm23 基因的表达成密切负相关;人类 nm23 基因高表达的乳腺癌腋窝淋巴结转移率低,预后较好;nm23 低表达的黑色素瘤或肝癌较易发生术后复发和转移,表明 nm23 与肿瘤的转移有关,是一种肿瘤转移抑制基因,其蛋白产物作为肿瘤的重要标记物已应用于肿瘤的早期诊断和发生发展机制的研究。但目前对于 nm23 的表达与大肠癌淋巴结转移的关系尚无定论。本组研究与刘也夫等得出类似结论,但黄照权等则得出与我们完全相反的结论,还存在其他一些结论参差的现象。这表明关于 nm23 与大肠癌的关系确实没有定论,肿瘤的转移是一个多基因参与的极其复杂的过程,任何参与这一过程的癌基因和抑癌基因都不可能是决定肿瘤转移的唯一因素。nm23 与肿瘤临床病理相关因素关系复杂,不能作为对肿瘤预后判断的独立依据,这需要我们进一步的研究与探索,将其与其他相关因子联合起来,提高临床参考价值。

[关键词] 结肠直肠肿瘤;肿瘤转移抑制因子;nm23;免疫组织化学

[中图分类号] R735.34 [文献标识码] D

[收稿日期] 2004 - 12 - 27 [修回日期] 2005 - 01 - 10
 [本文编辑] 王 莹,韩 丹