

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0490-03

早期肝细胞癌及癌前病变的分子变异特征

Early hepatocellular carcinoma and precancerous lesion: molecular mutation characteristics

董 辉 综述, 丛文铭* 审阅(第二军医大学 东方肝胆外科医院 病理科, 上海 200438)

[摘 要] 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上发病率和病死率均位于前列的恶性肿瘤, 低度和高度异型增生结节或腺瘤样增生可能是其癌前病变。很多分子变异在肝硬化组织、异型增生结节以及微小 HCC 结节中即已出现, 包括以下 6 个方面: 乙肝病毒整合入宿主基因组引起染色体不稳定性, 进而在很多位点发生杂合性缺失, 或引起插入突变、激活原癌基因等; 丙肝病毒编码产物 NS3P 表达增加引起 c-erbB2 的过表达和 p21waf 的缺失; TSG 和原癌基因甲基化状态的改变; 1p/q、7q、15q、16p、17q 和 20q 等染色体臂上的 DNA 增益以及 3p、4q、9p 和 11q 的缺失等; 1p、4q、6q 和 8p 在癌前病变和早期体积小、分化好的 HCC 中出现杂合性缺失; 特异性表达于异型增生结节和早期肝癌的分子标签等。这些分子变异既是诊断 HCC 的重要依据, 也可用于筛选肿瘤易感人群, 预测这些病变何时向恶性转化, 并对某些异常的基因谱系采取适当的治疗策略, 进而为 HCC 患者的早期诊断、早期治疗和改善预后提供新的思路。

[关键词] 早期肝细胞癌; 癌前病变; 分子变异; 异型增生结节; TSG; 杂合性缺失; 甲基化

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A

原发性肝癌, 主要是肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 是世界上发病率和病死率分别居第 5 位和第 3 位的恶性肿瘤^[1], 其发病率仍有上升趋势。据 2005 年 WHO 的统计, 全世界每年新增肝癌患者 62 万, 每年约 59 万人死于肝癌; 在我国每年有 20 万~30 万人死于肝癌^[2], 大部分未治疗患者死于确诊后 1 年以内^[3]。目前关于 HCC 的分子发病机制研究资料多数来自进展期肝癌, 对异型增生结节等癌前病变及早期小肝癌的分子遗传基础知之不多。HCC 的发生和演进是一个多因素、多基因、多阶段、多途径的复杂过程, 各种内在的和外在的因素作用首先引起癌前病变, 如低度和高度异型增生结节或腺瘤样增生, 随后进展为早期小肝癌和晚期大肝癌。有很多高频出现于肝硬化组织、异型增生结节及微小 HCC 结节中的分子变异可能代表肿瘤发生过程中的早期分子事件, 这些早期分子变异对于早期诊断以及制定新的治疗策略, 如减缓甚至阻断癌前病变进程具有实际意义。本文拟就 HCC 发生发展早期阶段的分子变异特征做一综述。

1 乙肝病毒(HBV)致癌方式

HBV 基因组是环状双链 DNA 分子, 包含 4 个重叠的开放读码框, 编码 PreS/S、PreC/C、P 和 X 蛋白(HBx)。目前知道 HBV 至少通过 3 种不同机制致癌: (1) 病毒 DNA 整合入宿主基因组引起染色体不稳定性, 进而在很多位点发生杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH); (2) HBV 整合入某些特定部位, 引起插入突变激活原癌基因, 包括编码调控细胞增殖和分化的基因以及端粒酶逆转录酶

(hTERT)等, 20% ~ 40% 的 HBV 相关 HCC 涉及插入突变的机制; (3) 表达的病毒蛋白可以调控肝细胞的增殖和活性, 其中最主要的是 HBx。HBx 蛋白作为一种反式作用子, 可上调多种病毒及细胞癌基因, 参与致癌过程^[4]。最近, Barone 等^[5]对 3 个月大 HBV 转基因鼠的基因表达研究表明, 45 个显著差异表达基因(其中 25 个上调, 20 个下调)与 HBV 相关肝癌的早期致癌机制相关, 这些基因参与免疫应答调节、转录、信号转导通路、细胞内钙离子运动、细胞周期和细胞增殖以及凋亡等。例如, 许多上调基因参与免疫功能的调节, 如 Crip1、Cmkor1 等, 表明病毒蛋白在肝细胞内的累积可以引起伴随免疫应答的细胞损伤。此外, 抗凋亡基因 Nupr1 上调从而促进凋亡基因 Bnip3 下调, 凋亡的调控异常使病变细胞免于死亡, 也可能是 HBV 促进 HCC 发生的机制之一。

2 丙肝病毒(HCV)致癌方式

HCV 基因组为正向单链 RNA, 编码产物为多聚蛋白, 与肝癌发生的关系十分密切, 但该病毒基因组并不整合入肝细胞基因组中。Bahnassi 等^[6]研究表明, c-erbB2 的过表达和 p21waf 的缺失与 NS3P 表达增加显著相关, 提示前两者可能为 HCV 患者肝细胞转化早期

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370645)。Supported by the National Natural Science Foundation of China

[作者简介] 董 辉(1976-), 女, 辽宁鞍山人, 博士, 主要从事肝胆肿瘤分子病理学的研究工作

* Corresponding author. E-mail: wmccong@smmu.edu.cn

阶段 NS3P 的靶基因。Baek 等^[7]对含有 HCV 基因组的体外培养肝细胞系的研究证实 NS5A 的过表达可以促进染色体不稳定性并形成异倍体;进一步的研究证实,其作用是通过使有丝分裂的细胞周期失调所致。这些事件表明,尽管体外或组织培养细胞是否可以确切反映体内的机制尚不明了,但是一种或多种 HCV 基因产物促进 HCC 发生的早期改变是毋庸置疑的。

3 甲基化致癌方式

CpG 岛 DNA 甲基化是多种恶性肿瘤中肿瘤抑制基因(tumor suppressor genes, TSGs)表基因失活的可能机制^[8]。大约 50%~60% 的基因与 CpG 岛相关,CpG 岛胞嘧啶甲基化可以阻止基因转录。TSGs 启动子附近 CpG 岛超甲基化伴随的基因不表达,可以促进肿瘤的发生和发展。目前,甲基化在肝癌发生中的作用仍不明了。最近研究表明,印迹结构域的基因组 DNA 甲基化异常可以引起肝癌中印迹基因 DLK1 的上调,通过 RT-PCR 的方法对 82 例 HCC 标本研究表明,60(73.2%)例 DLK1 显著上调。此外免疫组化也已证实 50/88(56.8%)肝癌组织中此基因阳性表达^[9]。编码 Wnt/ β -catenin 信号转导通路拮抗剂 SFRP1 基因启动子甲基化在肝癌中的发生率为 48.2%,在 SFRP1 基因甲基化样本中伴随 SFRP1 表达的下调^[10]。Kondo 等^[11]研究表明,CpG 岛 DNA 甲基化是肝癌发生过程中的早期事件,可能先于甚至导致 LOH。此外,已知基因的转录活性与其甲基化状态呈负相关,在小鼠胚胎的快速复制细胞中甲基基团缺失,提示去甲基化可能参与增强癌基因的转录活性。

4 染色体不稳定性

与随机选择微卫星位点的 PCR-LOH 分析相比,比较基因组杂交可以得出 HCC 中更精确的染色体异常的结果。研究^[12]表明,异型增生结节(dysplastic nodules, DN)基因组变异的频率和类型与肝癌非常接近,包括 1p/q、7q、15q、16p、17q 和 20q 等染色体臂上的 DNA 增益以及 3p、4q、9p 和 11q 的缺失,这些相似的变异提示 DN 可能确实是 HCC 的癌前病变。此外,某些特定染色体区段的缺失和增益与肿瘤的病因和分化相关,10q 的增益主要与 HCV 感染相关,而 11q13 的扩增则主要出现于 HBV 阳性的肿瘤中。Moinzadeh^[13]通过对 31 例 CGH 的 Meta 分析得出结论,肝细胞癌基因组扩增最常发生于 1q(57.1%)、8q(46.6%)、6p(22.3%)和 17q(22.2%),而缺失常发生于 8p(38%)、16q(35.9%)、4q(34.3%)、17p(32.1%)和 13q(26.2%);DNs 中,染色体扩增最常出现于 1q 和

8q,缺失则常发生于 8p、17p、5p、13q、14q 和 16q。

5 肿瘤抑制基因 LOH

HCC 启动及演进阶段,多个位点发生 LOH。已有研究^[14]报道 1p、4q、6q、8p 在癌前病变和早期体积小、分化好的 HCC 中出现 LOH,大部分缺失位于正常情况下抑制肝细胞生长的肿瘤抑制基因附近,少数也发生于参与 DNA 修复、原癌基因代谢或者抗氧化损伤的基因。例如,1p 染色体上包含很多候选肿瘤抑制基因,其中包括 RUNX3,其在 TGF- β 信号转导通路中发挥重要作用,活化的 Smad2 和 Smad3 与 RUNX3 相互作用,诱导核内目的基因的转录活性,在肝癌中 LOH 率为 37.8%^[15]。有研究^[16]已证实,1p36-34 的 LOH 在 HCC 和硬化或异型增生的结节中都存在,表明在肿瘤发生前就存在一个或多个肿瘤抑制基因的缺失。位于 1p36.13-p36.23 的肿瘤抑制基因在 HCC 中经常缺失,其常见的缺失区域恰恰是编码肝细胞负生长调控子。6q26-27 的 LOH 包括 M6P/IGF2 受体的缺失^[17],后者具有激活 TGF- β 1 信号传导(促进凋亡)和降解 IGF2(促进肝细胞生长)的能力,已被确定为肿瘤抑制基因。M6P/IGF2 的突变已在大多数肝脏异型增生灶中检测到,提示其出现于 HCC 发生的早期。4 号染色体短臂的 LOH 在几种类型肿瘤中已有报道, FN 基因位于 4q28,在一些 HCC 早期有缺失。在肿瘤进展过程中,其周围 ECM 的降解可能与此有关。4q 上的等位基因失衡在肝硬化结节中也存在,证实其是肿瘤发展过程中的早期特征。HCC 中 8p21.3-22 已标识出一种候选肿瘤抑制基因,编码一种与鼠 p122RhoGAP 具有 80% 同源性的蛋白质,维持对细胞连接起重要作用的微丝内肌动蛋白张力丝的结构,此缺失可能导致细胞骨架的降解,形成肿瘤^[18]。有研究^[19-20]显示在染色体 8p 上存在多个候选肿瘤抑制基因。最近有报道^[14]称在肝硬化结节中,8p 上存在等位基因失衡,进一步证实了这些改变先于肿瘤发生之前存在。Nagai 等^[21]对显微切割组织的研究显示,大约一半的肝硬化结节在信息性位点发生 LOH,包括 1q、14q、TBP 以及 BRCA1 的等位基因缺失;在 NF1、6q、IGF2R 位点,微小肝癌与肝硬化结节都发生 LOH;而在 p53 和 Rb 位点只有 HCC 发生 LOH,进一步支持 HCC 的发生是多基因多步骤协同作用的结果。

6 基因芯片表达谱变异

目前,从肝细胞增生到异型增生结节再到癌的连续性全基因组改变已经开始研究。cDNA 基因表达谱

的分析表明在 1 152 个检测的基因中,有 50 多个基因在大再生结节(macroregenerative nodules, MRNs)和 DN_s 中调控异常,其中 29 个上调、24 个下调,包括癌基因、TSGs、DNA 修复基因、编码生长因子和细胞因子的基因、编码黏附蛋白的基因、信号转导家族基因、转录因子基因和看家基因等^[22]。Nam 等^[23]利用高通量寡核苷酸微阵列分析,通过聚类分析的方法,筛选出了用于鉴别低度异型增生结节(low grade dysplastic nodule, LGDN)、高度异型增生结节(high grade dysplastic nodule, HGDN)和 G₁ 期 HCC 的 120 个“早期”基因谱以及鉴别 G₁、G₂ 和 G₃ 期 HCC 的“晚期”基因谱。这些结果提示在 HCC 的进展过程中,每个组织分级都有明确不同的分子标签。与病因相关的分子标签也已有所涉及, Llovet 等^[24]应用分子标签来鉴别 HCV 肝硬化患者中 DN_s 和早期 HCC,发现 12 个基因在 HCC 和 DN_s 中差异表达,进一步应用 Logistic 回归分析筛选出包括 GPC3、LYVE1 和 survivin 在内的 3 个基因在早期肝癌中表达显著增加,其分辨准确率可达 94%,并且在前瞻性实验组中得以证实。

7 展望

尽管目前对 HCC 发生和演进过程中的分子机制研究甚广,但多数结果来源于进展期 HCC,而对于癌前病变及早期小肝癌等知之较少,所以今后对于肝癌发生分子机制的探讨需重点放在其发生过程的早期阶段。探索 HCC 的分子发生机制的实验研究,必须增加癌前病变和早期肝癌的临床样本,包括 HCC 患者的肿瘤标本、周边肝组织和血液标本等;同时,必须十分重视寻求简单易取、成本低廉的分子标记。这些分子变异既可用于诊断 HCC 的重要指标,也可用于筛选肿瘤易感人群,预测这些病变何时向恶性转化,并对某些异常的基因谱系采取适当的治疗策略,进而为 HCC 患者的早期诊断、早期治疗和改善预后提供新的思路。

[参考文献]

- Zender L, Xue W, Cordon-Cardo C, *et al.* Generation and analysis of genetically defined liver carcinomas derived from bipotential liver progenitors[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70: 251-261.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, *et al.* Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74-108.
- Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(1): 72-81.
- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator[J]. *J Gastroenterol*, 2001, 36(10): 651-660.
- Barone M, Spano D, D'Apollito M, *et al.* Gene expression analysis in HBV transgenic mouse liver: a model to study early events related to hepatocarcinogenesis[J]. *Mol Med*, 2006, 12(4-6): 115-123.
- Bahnassi AA, Zekri AR, El-Houssini S, *et al.* Hepatitis C virus-NS3P in relation to p53, p21waf, mdm2, p21-ras and c-erbB2 in hepatocarcinogenesis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(11): 1731-1740.
- Baek KH, Park HY, Kang CM, *et al.* Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation[J]. *J Mol Biol*, 2006, 359(1): 22-34.
- Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1999, 32(1): 31-43.
- Huang J, Zhang X, Zhang M, *et al.* Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(5): 1094-1103.
- Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, *et al.* Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2006, 107(3): 579-590.
- Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, *et al.* Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis--A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2000, 32(5): 970-979.
- Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, *et al.* Multiple chromosomal abnormalities in human liver(pre)neoplasia[J]. *J Hepatol*, 2004, 40(4): 660-668.
- Moinedeh P, Breuhahn K, Stutzer H, *et al.* Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade--results of an explorative CGH meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(5): 935-941.
- Yeh SH, Chen PJ, Shau WY, *et al.* Chromosomal allelic imbalance evolving from liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2001, 121(3): 699-709.
- Mori T, Nomoto S, Koshikawa K, *et al.* Decreased expression and frequent allelic inactivation of the RUNX3 gene at 1p36 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2005, 25(2): 380-388.
- Sun M, Eshleman JR, Ferrell LD, *et al.* An early lesion in hepatic carcinogenesis: loss of heterozygosity in human cirrhotic livers and dysplastic nodules at the 1p36-p34 region[J]. *Hepatology*, 2001, 33(6): 1415-1424.
- De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, *et al.* Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors[J]. *Oncogene*, 1995, 10(9): 1725-1729.
- Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, *et al.* Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(22): 6519-6525.
- Park WS, Lee JH, Park JY, *et al.* Genetic analysis of the liver putative tumor suppressor(LPTS) gene in hepatocellular carcinomas[J]. *Cancer Lett*, 2002, 178(2): 199-207.
- Wu X, Jia HL, Wang YF, *et al.* HTPAP gene on chromosome 8p is a candidate metastasis suppressor for human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1832-1840.

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0493-04

人类自然杀伤细胞活化性配体 ULBPs 的表达与调控

Expression and regulation of ULBPs, a human active ligand of NKG2D receptor

商平平¹综述;张彩^{1,2*}审阅(1. 山东省医学科学院基础医学研究所,济南 250062; 2. 山东大学药学院免疫药理与免疫治疗研究所,济南 250012)

[摘要] 人类自然杀伤细胞活化性配体 UL16 结合蛋白(UL16-binding proteins, ULBPs)家族至少由 6 个成员组成,其中 ULBP1、ULBP2、ULBP3(UL16-binding protein 1-3)分子含有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域,通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)与细胞膜相连。ULBP4(UL16-binding protein 4)分子含有跨膜和胞质结构域。正常组织中广泛表达 ULBPs。T 淋巴细胞瘤、结肠癌、卵巢癌等肿瘤细胞表面也有 ULBPs 的高表达。化学药物、细胞因子、细菌和病毒感染等众多因素都可以调控 ULBPs 的表达,其中紫外线辐射、化疗药物等诱发的 DNA 损伤反应可以活化 3-磷脂酰肌醇激酶家族类成员(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)或(ataxia-telangiectasia and Rad3-related, ATR)激酶,进一步活化下游的 Chk1、Chk2 节点激酶和其他的凋亡相关分子,从而诱导 ULBPs 的表达,引起肿瘤细胞的生长周期停滞,诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。另外,ULBP1 启动子中 CRE1 位点活化也是上调 ULBP1 转录和表达的关键因素。对 ULBPs 表达与调控因素的深入探讨将为阐明肿瘤逃逸机制、寻求抗肿瘤有效药物提供新的作用靶点和思路。

[关键词] 人类自然杀伤细胞; ULBPs; 活化性受体; 活化性配体; 抗肿瘤

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

人类自然杀伤(nature killer cells, NK)细胞在早期免疫监视中发挥重要作用,是机体抵御病毒感染的清除肿瘤细胞的第一道防线^[1-2]。NK 细胞杀伤功能的实现受活化性和抑制性信号的平衡调节,其中以活化性受体 NKG2D 与配体 MHC I 类相关分子(MHC class I-related molecules, MICs)和 UL16 结合蛋白(UL16-binding proteins, ULBPs)相互作用所介导的活化信号最为关键。NKG2D 可以在肿瘤细胞表达正常水平 MHC I 类分子的情况下,阻抑抑制性信号的抑制作用,活化 NK 细胞,直接对肿瘤细胞进行杀伤^[3-6]。对 NK 细胞活化性配体 MICs 和 ULBPs 的研究发现,两者在许多病毒感染和恶性肿瘤细胞表面都表达上调,是重要的压力诱导蛋白^[7-8]。许多生物活性因子都可以通过上调细胞表面 ULBPs 分子的表达,增强感染细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性^[9-10]。深入探讨 ULBPs 分子的表达和调控机制将为肿瘤的生物治疗提供新的启示。

1 ULBPs 的结构特点

NK 细胞活化性受体 NKG2D 的配体包括 MHC I 类分子相关蛋白 A/B(major histocompatibility complex class I chain-related protein, MICA/B)和 ULBPs,其中 MICA/B 是最早被发现与 NKG2D 结合的配体。MIC 基因具有高度多态性,其基因座位有 7 个成员基因,其中只有 MICA、MICB 编码、转录和表达产物,但功能尚不清楚。

ULBPs 家族至少由 6 个成员组成,其编码基因位

于人类第 6 号染色体 6q24.2-q25.3 之间^[11-13]。对 ULBPs 进行氨基酸序列分析发现,ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子中有 55%~60% 的氨基酸序列相同,具有很高的同源性。新发现的 ULBP4 分子在氨基酸序列上与 ULBP3 相似,与 ULBP1 和 ULBP2 却有很大差异性。将 ULBPs 与 MICs 比较,两者的同源性较低,但有趣的是在共有的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域中有 20% 的氨基酸残基高度保守。

ULBPs 家族的 ULBP1、ULBP2、ULBP3、ULBP4 分子都含有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域,缺乏 $\alpha 3$ 结构域。ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子不含跨膜结构域,只能通过 GPI 与细胞膜相连。ULBP4 与 MICs 分子相似,两者都含有跨膜和胞质结构域,不同之处在于 ULBP4 分子缺乏 $\alpha 3$ 结构域,因而不能像 MICs 分子那样与 $\beta 2$ 微球蛋白结合^[12]。各 ULBPs 分子与受体 NKG2D 的亲合力不同,ULBP2 与 NKG2D 的亲合力最强,ULBP3 的亲合力最

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30371302, 30471527);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目(No. 2005BS03015);中国博士后基金资助项目(No. 20060390309);山东省博士后基金资助项目(No. 200603071)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30371302, 30471527); the Distinguished Young Scientists Foundation of Shandong Province(No. 2005BS03015); the National Postdoctoral Research Foundation of China(No. 20060390309); the Postdoctoral Research Foundation of Shandong Province(No. 200603071)。

[作者简介] 商平平(1981-),女,山东省烟台市人,硕士,主要从事肿瘤免疫学和天然免疫调节方面的研究

* Corresponding author. E-mail: caizhangsd@yahoo.com.cn

弱。

2 ULBPs 的表达

MICs 家族在大多数正常组织中不表达,只有在肠上皮或病毒感染细胞、肿瘤细胞表面才表达。与 MICs 不同,ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子的转录在许多正常组织中都能够检测到^[12-14]。心肌、脑、肝脏、睾丸、淋巴结、胸腺、扁桃体、骨髓等组织中广泛表达 ULBPs,在胎儿的心肌、脑、肺和肝脏中也有 ULBPs 表达。ULBP4 分子的表达有明显的限制性,它主要分布于皮肤、睾丸、呼吸道气管和小肠的上皮中。此外,不同细胞 ULBPs 的表达水平也并不一致。B 细胞高表达 ULBP1、ULBP2、ULBP3 分子,而 T 细胞和 NK 细胞则不表达这 3 种分子;红细胞不表达 ULBP1、ULBP2、ULBP3;血小板 ULBP2 的表达水平较高,而 ULBP1、ULBP3 的表达较低;单核细胞和粒细胞高表达 ULBP1,低表达 ULBP2。

在肿瘤细胞中,T 淋巴细胞瘤表面高表达 ULBP1 和 ULBP2^[14-15];结肠癌、卵巢癌、宫颈癌等细胞表面高表达 ULBP2 和 ULBP3;黑色素瘤患者淋巴结内成熟的 CD83 阳性树突细胞表面也有 ULBP1 的表达上调^[16]。细胞内 ULBPs 的转录水平与膜蛋白的表达水平并不完全一致,在 Raji 肿瘤细胞中虽然可以检测到高水平的 ULBP mRNA 转录,但在细胞表面却检测不到 ULBPs 分子的表达。

3 影响 ULBPs 表达的因素

化学药物能明显上调 ULBPs 分子的表达。研究发现,肿瘤细胞分化诱导剂维甲酸能够上调鼠 MHC 相关分子 RAE-1 的表达^[17]。为了观察它是否对 ULBPs 表达有影响,将慢性淋巴细胞白血病(B-cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL)患者给予维甲酸处理,发现在处理后 20 min ULBP3 mRNA 的量增加了 2 倍,40 min 后 ULBP3 mRNA 的转录达到最高峰,为原来的 4 倍。但处理前后都没有发现其他 3 种 ULBPs 分子的转录。进一步体外分离 B-CLL 患者的 B 细胞,检测到很低的 ULBP3 表达;反式维甲酸处理后,ULBP3 的表达水平在 2~3 d 内达到最高峰。

细胞因子也参与 ULBPs 分子的表达调控^[9-10]。IFN- γ 是一种重要的细胞因子,它可以明显上调单核细胞和白血病细胞表面 ULBP1 分子的表达。另有研究表明 ULBP2 和 ULBP3 的表达不受 IFN- γ 及 IFN- α 、IL-1 β 、TNF- α 、LPS 等单核细胞活化因子的影响。细菌和病毒感染也能够影响 ULBPs 分子的表达。绿铜假单胞菌的分泌物可以直接刺激人支气

管上皮细胞 NKG2D 配体的表达^[18]。体外实验证明,感染绿铜假单胞菌素 24 h 后,ULBP2 的表达水平明显增加。NK 细胞通过 NKG2D 受体与感染细胞结合杀伤病原体,并通过释放 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、NO 等细胞因子和生物活性剂杀伤感染细胞。这一受体配体介导的杀伤效应并不依赖于巨噬细胞的吞噬作用。当机体感染人巨细胞病毒时,病毒自身编码的糖蛋白 UL16 通过胞外区与 ULBPs 结合,使 UL16 和 ULBPs 组成复合体稳定滞留于内质网和高尔基体中^[19-21],导致 ULBPs 蛋白的转运发生阻滞,不能由内质网转运到细胞内进而表达于感染细胞表面,不能与 NKG2D 结合,发挥 NK 细胞介导的杀伤作用。此外,其他许多病毒也都有逃逸 NK 细胞杀伤作用的机制。人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1)感染患者中 HIV-1 Nef 可以下调 MICA、ULBP1、ULBP2 的表达,对后者的作用更为强大^[22]。实验证明,在 HIV-1 野生型病毒感染细胞表面 NKG2D 配体的表达较 HIV-1 Nef 缺陷型病毒感染细胞明显升高。对 Nef 进行突变分析发现,NKG2D 配体的下调是一种结构性需求,Nef 的表达改变了对 NK 细胞的识别,降低了感染细胞对 NK 细胞的杀伤敏感性,是病毒逃逸机体天然免疫监视的有利途径。

细胞的分化状态也影响 ULBPs 的表达^[23]。ULBPs 的表达量与造血细胞的分化程度呈正相关,分化程度越高 ULBPs 的表达量越大。在正常人类骨髓中,早期 CD43 阳性的骨髓前体细胞不表达 ULBPs,随着细胞的分化成熟,骨髓前体细胞获得 CD33、CD14 分子后开始表达 ULBPs。与此类同,在生长因子诱导的 CD34 阳性的骨髓细胞分化过程中也伴随着 ULBPs 表达的增加。急性淋巴细胞白血病(acute myelogenous leukemia, AML)细胞表面 ULBPs 分子的密度与造血细胞的分化阶段密切相关,在分化较好的单核细胞白血病 M5 型和巨核细胞白血病 M7 型中,表达 ULBPs 的阳性集落较多;而分化较差的 M1-M4 型白血病中,ULBPs 的表达呈阴性或低表达。

4 调控 ULBPs 表达的分子机制

目前已经观察到许多因素可以影响 NKG2D 配体的转录与表达,但一直以来对于调控其表达的分子机制的研究甚少。通过比较各种 NKG2D 配体中启动子区域和 5'UTR 序列的差异,研究者发现,启动子可能在这一转录调控过程中起关键作用^[24]。尽管从整体角度来看,各启动子中转录因子结合位点序列有部分的相似性,但都共有一个相同的碱性核蛋白(BNC)结合

区域,碱性核蛋白是一种广泛存在于复层鳞状上皮细胞的基底层的转录因子,当上皮细胞发生恶变时出现高表达。启动子中其他转录结合位点碱基序列的改变,尤其是那些启动子中位置保守的基因位点的改变会影响蛋白的表达,最终导致功能的改变。例如,热休克蛋白(hot shock protein, HSP)在发生休克时被激活;当内质网中出现较多未折叠的蛋白时活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)位点发生活化,骨髓锌指蛋白1位点(myeloid zinc finger protein 1, MZF1)是一种可以被维甲酸诱导的转录结合位点,对于调节造血系统有重要作用。

最新研究^[25]发现,ULBP_s的最小启动子由一个标准的TATA盒、3个GC盒、1个重叠的GC(4)/AP-2 α 序列、2个CRE样序列CRE1和CRE2及1个NF- κ B结合位点构成。ULBP1转录与最小启动子中CRE1位点的活化密切相关。在Hela和HEK293及其他一些细胞系中,与启动子CRE1位点结合的SP1和SP3转录因子可以明显增强启动子活性,上调ULBP1的表达。

SP1和SP3是细胞内普遍表达的转录活化因子,具有高度保守的DNA结合锌指结构域,其结合位点的突变和缺失严重影响ULBP1分子的转录。同时SP3的过度表达也降低自身对ULBP1启动子的反式激活作用。SP1和SP3与GC盒有相同的亲和力,有人预想两者具有相同的功能属性;利用SP1或SP2敲除鼠,对其进行功能分析发现,这两种活化因子的作用并不完全相同;在SP3中存在抑制性结构域,这就与单纯的活化因子SP1不同,它具有活化或抑制双重作用。

SP3的转录调控机制很复杂,它至少含有4种类似物。其中短类似物因为缺乏反式激活结构域,处于失活或活性较弱状态;而长类似物则是强大的ULBP1转录活化因子,转录活性是ULBP1启动子的500倍。因此,SP3的型别和SP1与SP3的相对水平均直接影响到ULBP1的表达调控。其他因素也可以通过调节SP3的活性间接影响ULBP1分子的转录。通过SUMO化方法对SP3中的抑制性结构域进行处理,导致SP3失活。强大的组蛋白乙酰化活化剂P300可以直接乙酰化SP3,促进它的转录活性。HDAC1和HDAC2则相反,能够使SP3去乙酰化,抑制转录活性。

AP-2 α 是含有保守的DNA结合蛋白结构域螺旋-环-螺旋的转录抑制因子,由AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 组成。AP-2 α 结合于Hela细胞的GC/AP-2位点,这些位点的突变和AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 过度表达将通过DNA依赖或非依赖的方式抑制ULBP1分子的转录。

另外,紫外线辐射、DNA损伤剂、DNA合成抑制剂等诱发的DNA损伤可以激活DNA损伤反应通路^[26-29],对于维持基因的完整性、抑制肿瘤生长、调节

细胞周期起着举足轻重的作用。研究证明,离子辐射、紫外线照射、热休克、缺氧状态、化疗药物等能够明显上调小鼠癌基因转化细胞和肿瘤细胞表面ULBP_s分子的表达^[29],其机制为DNA损伤剂和DNA合成抑制剂诱发的DNA损伤反应能够活化ATM或ATR激酶,进而活化下游的节点激酶Chk2、Chk1和其他的凋亡相关分子P53等,从而诱导ULBP_s的表达,引起肿瘤细胞的生长周期停滞,诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

5 结 语

目前,对NK细胞活化型配体MIC_s的研究较多,已从分子结构、表达、调控机制等多个层面进行了分析。但对ULBP_s的研究还不深入,尤其对调控ULBP_s转录和表达的机制研究甚少,仍有很多问题有待解决。如IL-21可以增强鼠内源性配体H60和RAE-1的表达,是否对人ULBP_s的表达有影响;部分化学药物下调NKG2D配体表达的分子机制是什么?恶性转化细胞形成过程中影响ULBP_s表达的调节因素有哪些?肿瘤细胞ULBP_s转录和表达量不一致的原因是什么?等等。进一步对ULBP_s的结构、表达、调控因素进行探讨,将为阐明肿瘤逃逸机制和寻求抗肿瘤、抗病毒的有效药物提供新的作用靶点和思路。

[参考文献]

- [1] Smyth MJ, Swann J, Cretney E, *et al.* NKG2D function protects the host from tumor initiation[J]. *J Exp Med*, 2005, 202(5): 583-588.
- [2] Radaev S, Kattah M, Zou Z, *et al.* Making sense of the diverse ligand recognition by NKG2D[J]. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6279-6285.
- [3] Vivier E, Tomasello E, Paul P, *et al.* Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition [J]? *Curr Opin Immunol*, 2002, 14(3): 306-311.
- [4] Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, *et al.* UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells[J]. *J Immunol*, 2002, 168(2): 671-679.
- [5] Eleme K, Taner SB, Onfelt B, *et al.* Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D[J]. *J Exp Med*, 2004, 199(7): 1005-1010.
- [6] Maghazachi AA. Insights into seven and single transmembrane-spanning domain receptors and their signaling pathways in human natural killer cells[J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(3): 339-357.
- [7] Long EO, Rajagopalan S. Stress signals activate natural killer cells [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(11): 1399-1402.
- [8] Bahram S, Inoko H, Shiina T, *et al.* MIC and other NKG2D ligands: from none to too many[J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17

- (5): 505-509.
- [9] Takaki R, Hayakawa Y, Nelson A, *et al.* IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism[J]. J Immunol, 2005, 175(4): 2167-2173.
- [10] Bui JD, Carayannopoulos LN, Lanier LL, *et al.* IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors[J]. J Immunol, 2006, 176(2): 905-1013.
- [11] Bacon L, Eagle RA, Meyer M, *et al.* Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D[J]. J Immunol, 2004, 173(2): 1078-1084.
- [12] Chalupny NJ, Sutherland CL, Lawrence WA, *et al.* ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(1): 129-135.
- [13] Cao W, He W. UL16 binding proteins[J]. Immunobiology, 2004, 209(3): 283-290.
- [14] Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, *et al.* NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291(2): L222-231.
- [15] Pende D, Rivera P, Marcenaro S, *et al.* Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity [J]. Cancer Res, 2002, 62(21): 6178-6186.
- [16] Schrama D, Terheyden P, Otto K, *et al.* Expression of the NKG2D ligand UL16 binding protein-1 (ULBP-1) on dendritic cells[J]. Eur J Immunol, 2006, 36(1): 65-72.
- [17] Poggi A, Venturino C, Catellani S, *et al.* Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid[J]. Cancer Res, 2004, 64(24): 9172-9179.
- [18] Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, *et al.* The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of pseudomonas aeruginosa[J]. Infect Immun, 2006, 74(5): 2578-2586.
- [19] Dunn C, Chalupny NJ, Sutherland CL, *et al.* Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity[J]. J Exp Med, 2003, 197(11): 1427-1439.
- [20] Rolle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, *et al.* Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP) 1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein[J]. J Immunol, 2003, 171(2): 902-908.
- [21] Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor[J]. Immunity, 2001, 14(2): 123-133.
- [22] Cerboni C, Neri F, Casartelli N, *et al.* Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity [J]. J Gen Virol, 2007, 88(1): 242-250.
- [23] Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, *et al.* Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias[J]. Blood, 2005, 105(9): 3615-3622.
- [24] Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, *et al.* Regulation of NKG2D ligand gene expression[J]. Hum Immunol, 2006, 67(3): 159-169.
- [25] Lopez-Soto A, Quinones-Lombrana A, Lopez-Arbesu R, *et al.* Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor[J]. J Biol Chem, 2006, 281(41): 30419-30430.
- [26] Kim JY, Son YO, Park SW, *et al.* Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation[J]. Exp Mol Med, 2006, 38(5): 474-484.
- [27] Gasser S, Raulet D. The DNA damage response, immunity and cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2006, 16(5): 344-347.
- [28] Gasser S, Raulet DH. The DNA damage response arouses the immune system[J]. Cancer Res, 2006, 66(8): 3959-3962.
- [29] Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, *et al.* The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor [J]. Nature, 2005, 436(7054): 1186-1190.
- [收稿日期] 2007-06-12 [修回日期] 2007-08-20
[本文编辑] 郁晓路

(上接第492页)

- [21] Nagai H, Emi M, Terada Y, *et al.* DNA alterations during multi-step development of human hepatocellular carcinomas revealed by laser capture microdissection[J]. Hepatol Res, 2003, 26(3): 199-208.
- [22] Anders RA, Yerian LM, Tretiakova M, *et al.* cDNA microarray analysis of macroregenerative and dysplastic nodules in end-stage hepatitis C virus-induced cirrhosis[J]. Am J Pathol, 2003, 162(3): 991-1000.
- [23] Nam SW, Park JY, Ramasamy A, *et al.* Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling[J]. Hepatology, 2005, 42(4): 809-818.
- [24] Llovet JM, Chen Y, Wurmback E, *et al.* A molecular signature to discriminate dysplastic nodules from early hepatocellular carcinoma in HCV cirrhosis[J]. Gastroenterology, 2006, 131(6): 1758-1767.
- [收稿日期] 2007-07-18 [修回日期] 2007-08-26
[本文编辑] 王莹