

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.02.020

肿瘤细胞致死性人 α -乳清蛋白的抗肿瘤作用及其机制的研究进展

Anti-cancer effect and its mechanism of human α -lactalbumin made lethal to tumor cells: An advance

于海涛^{1,2}, 陈科达², 阎辉² (1. 温州医学院 检验医学院, 浙江 温州 325035; 2. 浙江省医学科学院 病毒病研究所, 浙江 杭州 310013)

[摘要] 肿瘤细胞致死性人 α -乳清蛋白(human α -lactalbumin made lethal to tumor cells, HAMLET)是人 α -乳清蛋白与油酸结合后改变自身三级结构而形成的脂蛋白复合物,能够选择性杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞几乎无影响。HAMLET 杀伤肿瘤细胞的机制目前还未完全明确。早期研究显示, HAMLET 通过细胞凋亡机制杀伤肿瘤细胞;进一步研究发现, HAMLET 并不主要依赖凋亡,而是通过细胞自噬、内质网应激、蛋白酶体、溶酶体、组蛋白和 DAN 等多种途径杀伤肿瘤细胞。HAMLET 对皮肤乳头状瘤、膀胱癌局部用药的抗肿瘤临床试验已取得良好的效果,它很可能成为具有良好应用前景的绿色抗肿瘤新药。

[关键词] 肿瘤;人 α -乳清蛋白;HAMLET;自噬;凋亡

[中图分类号] R979.1; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0220-05

肿瘤已成为目前人类主要的致死性疾病之一。传统的抗肿瘤治疗方法存在诸多局限性,其中最严重的缺陷之一是肿瘤靶向性较差,在临床应用时可导致骨髓抑制等严重不良反应^[1],因而迫切需要更有效、更具靶向性的肿瘤治疗新方法。新的肿瘤治疗方法应该能够特异性杀伤肿瘤细胞,而不影响正常组织细胞的功能。肿瘤细胞致死性人 α -乳清蛋白(human α -lactalbumin made lethal to tumor cells, HAMLET)是人 α -乳清蛋白与油酸结合形成的脂蛋白复合物, HAMLET 的功能是在研究人乳组分对细菌黏附肺癌细胞功能影响过程中偶然发现的^[2]。后续研究^[3]发现, HAMLET 能杀伤肿瘤细胞和癌变前细胞,而不影响正常细胞的功能。HAMLET 导致细胞死亡的形态学改变类似于经典的细胞凋亡,但又与经典的凋亡途径不同^[3]。最新研究显示, HAMLET 可以通过巨自噬^[4]、内质网应激、蛋白酶体^[5]和溶酶体^[6]途径杀伤肿瘤细胞。本文旨在对 HAMLET 的分子结构、杀伤肿瘤细胞机制以及临床应用研究进展进行综述。

1 HAMLET 的分子结构及其形成机制

天然人 α -乳清蛋白含有 123 个氨基酸残基,相对分子质量约 14 000,是人乳中的主要蛋白,在人乳中含量可以达 2 mg/ml(140 μ mol/L),其正常功能是在乳糖合成时作为半乳糖转移酶辅酶^[7]。天然人 α -乳清蛋白并无肿瘤杀伤活性,晶体衍射显示它含有 α 和 β 两个结构域, α 结构域包含 3 个主要的 α 螺旋和 2 个短 310 螺旋, β 结构域包括 3 个反向平行 β 折叠和 2 个短的 310 螺旋,以及 4 个二硫键,

一个高亲和力的钙离子结合位点,属于金属蛋白^[8]。天然的 α -乳清蛋白要维持稳定的三级结构需要与钙离子结合,当 α -乳清蛋白在酸性环境或螯合剂 EDTA 存在时与钙离子解离,继而与油酸(C18:1 Δ 9)结合,就成为具有杀肿瘤细胞活性的 HAMLET(图 1)^[2]。HAMLET 形成所要求的条件恰好与哺乳期婴儿胃内环境一致,乳汁中的 α -乳清蛋白在低 pH 值条件下分子构型发生局部解折叠并与钙离子解离^[9];同时酸敏感的脂肪酶水解乳汁中的甘油三酯释放油酸,该油酸与局部结构解折叠的蛋白结合,从而形成 HAMLET 复合体。HAMLET 可杀死来自胃肠道的病毒转化细胞和癌变前细胞,这可能正是哺乳期婴儿癌症发病率低的原因之一^[10]。

研究不同长度碳链、饱和状态、顺式反式结构的脂肪酸对 HAMLET 形成的影响,结果表明, α -乳清蛋白与脂肪酸的相互作用具有特异性,只有顺式 C18 多不饱和脂肪酸能与局部解折叠的 α -乳清蛋白形成 HAMLET,而饱和脂肪酸、反式 C18 多不饱和脂肪酸以及不同碳链脂肪酸都不能与 α -乳清蛋白形成 HAMLET^[11]。突变牛 α -乳清蛋白的钙结合位点的氨基酸(D87A),使其丧失结合钙离子的能

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30873024);浙江省科技重大专项(No. 2008C13031-1)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30873024), and the Key Science and Technology Project of Zhejiang Province(No. 2008C13031-1)

[作者简介] 于海涛(1983-),男,山东省曲阜市人,硕士,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究工作。E-mail: haitaoyu886@163.com

[通信作者] 阎辉(YAN Hui, corresponding author), E-mail: yanh98@yahoo.com

力,成为局部解折叠的 α -乳清蛋白,突变体不能诱导肿瘤细胞凋亡,但突变体和油酸结合就形成类似 HAMLET 的结构,成为有杀伤肿瘤细胞功能的复合物^[12]。由此可见, HAMLET 特殊的 α -乳清蛋白-油酸结构是其杀肿瘤细胞功能的基础,仅有解离的人 α -乳清蛋白或仅有油酸都不能杀伤肿瘤细胞。

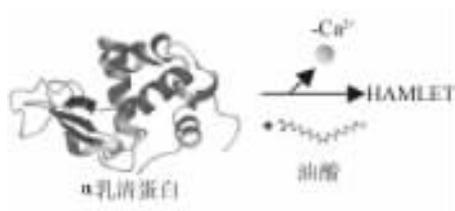


图1 HAMLET 结构形成的分子机制示意图

2 HAMLET 的制备

HAMLET 的制备首先是纯化 α -乳清蛋白,这既可从人乳中提取,亦可通过基因工程大肠杆菌重组表达工艺获得。纯化的 α -乳清蛋白再经钙离子螯合剂 EDTA 处理,去除其结合的钙离子,导致蛋白结构的局部解折叠,再在酸性条件下与油酸结合。最后,通过离子交换柱(经酪蛋白预处理)层析和高浓度盐离子洗脱,纯化出具备肿瘤细胞杀伤活性的 HAMLET 复合物^[13]。去除了钙离子的 α -乳清蛋白容易发生构象变化成为部分解折叠蛋白状态,进而在酸性条件下与油酸相互作用,成为脂蛋白复合物。HAMLET 复合物一旦形成,即具有较强的稳定性,溶液中的钙离子与 α -乳清蛋白分子中钙离子结合位点的饱和状态均不影响复合物的稳定性及其生物活性。Kamijima 等^[14]将 α -乳清蛋白与油酸按一定比例混合,利用热处理直接得到由具有抗肿瘤活性的 HAMLET 复合物。采用不同工艺得到的 HAMLET 复合物中脂肪酸的分子数不同^[15],磁共振分析显示,复合物中蛋白与脂肪酸的分子比在 1:5.1 ~ 1:5.4(蛋白:脂肪酸)之间,脂肪酸数目很可能与 HAMLET 的细胞毒性和肿瘤细胞选择性有关^[13,16]。

3 HAMLET 的抗肿瘤效应

目前肿瘤治疗药物因缺乏选择性而存在很多不良反应,即杀伤肿瘤细胞的同时也损害正常组织。HAMLET 选择性杀伤肿瘤细胞的特征引起了肿瘤治疗学研究者的极大兴趣,迄今为止至少有 40 种肿瘤细胞在体外研究中对 HAMLET 敏感,包括肺癌、喉癌、肾癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、成神经胶质细胞瘤,以及白血病细胞等,其中淋

巴系统肿瘤细胞对 HAMLET 最敏感($LD_{50} = 0.01 \text{ mmol/L}$),HAMLET 对其他组织来源的肿瘤细胞的 LD_{50} 约为 0.02 mmol/L ^[3]。

自从发现 HAMLET 的抗肿瘤效应以来,体内抗肿瘤研究和前期临床试验也已经成功开展。研究者采用裸鼠建立人胶质瘤异种移植颅内模型,将 HAMLET 注入颅内,观察其治疗效果,发现与作为对照的 α -乳清蛋白处理组相比, HAMLET 可以明显抑制肿瘤生长,减小小脑瘤体积,延缓颅内压力症状的出现。TUNEL 分析显示, HAMLET 诱导病灶部位肿瘤细胞广泛凋亡,而未影响邻近的正常脑组织^[17]。

皮肤乳头状瘤是第一个被用作研究 HAMLET 在人体内抗肿瘤效果的模型。Gustafsson 等^[18]采用严格的双盲安慰剂对照试验研究 HAMLET 治疗患者皮肤乳头状瘤的疗效,治疗方案是,病损局部施用 HAMLET,浓度为 0.7 mmol/L ,溶于生理盐水,每天 1 次,连续 3 周;治疗完成后 1 个月内病灶体积缩小 75% 或以上视为有效。结果显示,治疗组有效率 100%(患者数 20/20,瘤体数 88/92),而安慰剂组有效率仅为 15%(3/20,15/74)。后期试验中,让最初作为对照治疗的患者应用 HAMLET 治疗,病灶体积减少了 82%,2 年后随访发现, HAMLET 治疗的患者中瘤体完全消失者占 83%。即使免疫能力较差的皮肤乳头状瘤患者接受 HAMLET 治疗后也无明显的不良反应,表明局部应用 HAMLET 可以有效治疗人皮肤乳头状瘤,而无任何不良反应。

膀胱癌是另一个局部应用 HAMLET 治疗的临床抗肿瘤试验。Aits 等^[19]对 9 例浅表性膀胱癌患者每天 5 次定时向患处滴注 HAMLET,发现膀胱癌细胞脱落并从尿液排出,内镜检查发现其中 8 名患者的膀胱瘤体积减小;TUNEL 检测发现,脱落的癌细胞与病人残留的癌组织细胞都显示出明显的凋亡特征,而癌旁组织中的正常细胞未呈现任何凋亡特征。最近 Mossberg 等^[20]建立鼠膀胱癌细胞系 MB49 的 C57BL/6 小鼠膀胱癌模型,向肿瘤部位局部注射 HAMLET,与对照组相比,应用 HAMLET 组小鼠的肿瘤体积明显减小,并能延缓肿瘤进展。TUNEL 染色发现肿瘤部位细胞出现选择性凋亡效应,而临近健康的膀胱组织细胞正常,表明局部应用 HAMLET 能延缓膀胱癌的发展。

4 HAMLET 的抗肿瘤机制

HAMLET 的抗肿瘤机制目前还未完全明确,最初研究认为 HAMLET 主要通过凋亡机制抗肿瘤细胞;但随着研究的深入,发现 HAMLET 的肿瘤细胞

毒性并不依赖细胞凋亡,而是通过多种形式的细胞死亡通路作用于多个细胞器发挥抗肿瘤效应^[3]。

4.1 HAMLET 在肿瘤细胞中的转运

肿瘤细胞摄取 HAMLET 的机制目前还不明确。最新研究^[21]发现,细胞膜对于不含脂肪酸的部分解折叠 α 乳清蛋白和 HAMLET 的亲合力不同,表明 HAMLET 进入细胞依赖其特殊的蛋白-脂肪酸结构。HAMLET 与细胞膜结合并扰乱膜的完整性,是其发挥抗肿瘤效应的第一步。激光共聚焦显微镜观察到肿瘤细胞和正常细胞均可摄取 HAMLET,但正常细胞摄取量远远低于肿瘤细胞,并且只有肿瘤细胞内的 HAMLET 能转运并累积在细胞核^[22-23],与细胞核的组蛋白和染色质结合。半数致死量浓度的 HAMLET 可在 1 h 内将 90% 转运至肿瘤细胞核,而在正常细胞 HAMLET 仍滞留在胞质^[17]。另外,进入肿瘤细胞和正常细胞胞质的 HAMLET 可形成聚集物,但在肿瘤细胞内聚集程度更为强烈。HAMLET 在肿瘤细胞向核周区转运的过程能被放线菌酮所抑制,说明这一过程还需要合成的蛋白质参与^[24]。

4.2 HAMLET 参与细胞凋亡和巨自噬

早期研究发现, HAMLET 处理的细胞出现类似凋亡特征,即细胞皱缩、核浓缩、DNA 碎裂^[2],以及线粒体损伤、线粒体膜去极化和释放细胞色素 C、caspases 级联反应等^[25],但进一步研究发现,凋亡并不是导致肿瘤细胞死亡的主要原因,因为广谱 caspase 抑制剂 zVAD-fmk 和过表达抗凋亡因子 Bcl-2,尽管能取消 HAMLET 产生的 caspase 反应和小 DNA 片段形成,却并不能阻止 HAMLET 引起的肿瘤细胞死亡。用抗体阻断 FAS/CD95 受体介导的凋亡外源激活信号通路,对 HAMLET 的杀肿瘤效应没有影响^[26-27]。这些证据提示, HAMLET 的杀肿瘤细胞机制可能涉及非凋亡机制。后续研究进一步明确, HAMLET 虽然可触发凋亡反应,但其杀肿瘤机制是不依赖 caspases、Bcl-2 和 p53 信号转导通路的^[28]。由此看来, HAMLET 的抗肿瘤效应可能并不依赖细胞凋亡途径。

自噬是凋亡之外的第二种程序性细胞死亡方式,其分为三种主要方式:巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)^[29]。在巨自噬中,胞质中可溶性蛋白和变性坏死的细胞器被非溶酶体来源的双层膜结构所包裹,即形成自噬体(autophagosome),并由自噬体将其携带到溶酶体中降解、加工,实现再循环(图2)^[30],以维持细胞自身的稳定。巨自噬由磷酸肌醇 3 磷酸激酶(PI3Ks)控制^[31], III

型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶(class III PI3K)与自噬基因 Beclin-1 促进自噬体形成, I 型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶(class I PI3K)/Akt 信号和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路可以抑制巨自噬作用,另外还涉及多个自噬相关蛋白(Atgs)^[32]。HAMLET 可以诱发巨自噬作用, HAMLET 处理的肿瘤细胞呈现典型的巨自噬形态学改变, HAMLET 引起的线粒体损伤、有活性的 mTOR 下降、以及细胞质空泡等将导致双膜包裹的自噬泡的形成。利用 RNA 干扰抑制自噬基因 Beclin-1 和自噬相关蛋白 5(Atg 5),能延长 HAMLET 处理肿瘤细胞株的生存期,降低肿瘤细胞的死亡率^[4]。可见 HAMLET 通过巨自噬途径杀伤肿瘤细胞。



图2 HAMLET 诱导肿瘤细胞巨自噬示意图

4.3 HAMLET 作用于组蛋白和染色体

研究者^[25]从细胞中纯化出具有生物学活性的天然组蛋白,用来研究与 HAMLET 相互作用,结果显示: HAMLET 与组蛋白 H2B、H3 以及 H4 等具有较高亲合力,这种相互作用在表达绿色荧光蛋白标记的组蛋白的 HeLa 细胞内得到证实;共定位显示, HAMLET 与组蛋白相互作用导致整个染色体结构的改变,然后染色质在核周浓缩。HAMLET 可以与各种结构和功能的组蛋白结合,胞质中的 HAMLET 可以与核小体组装蛋白 1(NAP1)等分子伴侣竞争结合新合成的组蛋白,阻碍其向细胞核的转运,从而阻断组蛋白与 DNA 形成核小体,破坏染色质合成^[33]。而在细胞核内的 HAMLET 与染色质中的组蛋白结合,将其与 DNA 分离,导致后者暴露于内切核酸酶类而遭受剪切破坏,或者直接与核小体结合,形成不溶性染色质复合物,干扰其功能。与染色质结合的 HAMLET 又可以导致 DNA 损伤,而染色质合成缺陷亦可导致 DNA 双链破坏,从而激活细胞周期检查点,阻断细胞周期进程。然而 HAMLET 损伤 DNA 的具体机制,还需要进一步研究来阐述。

4.4 HAMLET 诱导内质网应激

内质网应激(ER stress)是由于内质网内解折叠蛋白堆积到一定程度引起的一种真核细胞应激现象,是近年来新发现的重要的凋亡起始机制之一。

当细胞内解折叠蛋白增多时将会干扰内质网的功能,导致应激信号程序激活,除非细胞内解折叠蛋白减少,否则,内质网应激最终将导致细胞程序性死亡^[34]。在 HAMLET 处理肿瘤细胞 30 min 后,参与内质网应激信号程序的磷酸化转录起始因子 eIF2a、激活的转录因子 6 (ATF6)裂解物、X 盒结合蛋白 1 (XBP1)剪接的 mRNA 等分子很快增加,然后内质网应激反应相关的促凋亡转录因子 CHOP 表达明显上调,最终导致内质网应激信号激活的程序性细胞死亡^[5, 35]。

4.5 HAMLET 影响蛋白酶体和溶酶体

蛋白酶体能够降解细胞内解折叠的蛋白质和经泛素修饰的蛋白质,这对维持细胞正常功能非常重要,如内质网相关降解(ERAD)系统从内质网清除的解折叠蛋白最终都要经蛋白酶体分解。大量 HAMLET 结合细胞膜并进入胞质并不被泛素修饰,与降解仅仅解折叠蛋白相比,蛋白酶体酶在降解 HAMLET 时相当低效,藉此机制将 HAMLET 从细胞内清除的过程非常缓慢。有研究^[5]发现, HAMLET 活化的蛋白酶体发生了结构和催化亚单位的降解性改变,导致其在降解 HAMLET 时蛋白酶体活性下降。20S 蛋白酶体可以降解未经泛素修饰的解折叠蛋白,而 HAMLET 结合 20S 蛋白酶体,通过改变不同亚基的分子大小影响其结构,抑制其降解蛋白的活性,使其不能充分发挥降解解折叠蛋白的功能。不过, HAMLET 的细胞毒效应并非由蛋白酶体活性受抑所致,因为传统的蛋白酶体抑制剂减少而不是增强 HAMLET 的细胞毒效应。目前认为,细胞内 HAMLET 的大量导致解折叠蛋白蓄积,从而影响细胞正常的蛋白合成和细胞功能稳定,最终导致细胞死亡。

其他哺乳动物中部分解折叠的 α -乳清蛋白与油酸也可以形成类似 HAMLET 的复合物^[36],并具有相似的生物学功能。研究^[6]发现,利用牛 α -乳清蛋白与油酸形成的 BAMLET 能够快速在肿瘤细胞内的溶酶体蓄积,导致溶酶体内组织蛋白酶类渗漏到细胞质中,组织蛋白酶类物质又能激活促凋亡蛋白 BAX 等。热休克蛋白 70(Hsp70)、Hsp70-2 和晶状体上皮细胞生长因子等三种蛋白能够稳定溶酶体,并能够显著保护细胞免受 BAMLET 诱导的死亡。这一结果表明, BAMLET 能在肿瘤细胞中引发溶酶体细胞死亡通路,并能杀伤凋亡耐受的肿瘤细胞, HAMLET 是否也存在类似机制还有待进一步研究^[16]。

5 结 语

综上所述,源于人 α -乳清蛋白的 HAMLET 就像一个多面杀手,通过多条通路杀伤肿瘤细胞,当其中一条途径被阻断时,另一条途径仍可以发挥作用,这可能是 HAMLET 具有广泛而快速抗肿瘤效应的原因^[37]。体外研究和临床试验证明, HAMLET 具有较理想抗肿瘤效果,并且未发现对正常细胞造成可检测到的毒性作用。随着研究的深入,发现其他哺乳动物部分解折叠的 α -乳清蛋白与油酸也可以形成类似 HAMLET 的复合物,并具有相似的生物学功能,从而为抗癌药物的开发提供了丰富的原料,降低制药成本。目前应用 HAMLET 治疗肿瘤的临床试验研究主要采用局部用药的方式,如皮肤乳头瘤、膀胱癌等,但体内和全身用药的研究较少,可能因其口服将被消化酶降解而不能进入体内发挥作用,这正是其作为抗癌药治疗某些体内肿瘤的瓶颈,如何突破这一瓶颈限制将成为 HAMLET 未来抗肿瘤研究的重点。尽管还需要更多的研究来阐述 HAMLET 对肿瘤细胞选择性杀伤的分子机制,但是可以预见,随着研究的不断深入, HAMLET 很可能成为一种安全有效的新型绿色抗癌药物,并得到广泛应用。

参考文献

- [1] Zhou BB, Zhang H, Damelin M, et al. Tumour-initiating cells: Challenges and opportunities for anticancer drug discovery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(10): 806-823.
- [2] Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, et al. Apoptosis induced by a human milk protein [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(17): 8064-8068.
- [3] Svanborg C, Agerstam H, Aronson A, et al. HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism - cellular, molecular, and therapeutic aspects [J]. Adv Cancer Res, 2003, 88: 1-29.
- [4] Aits S, Gustafsson L, Hallgren O, et al. HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) triggers autophagic tumor cell death [J]. Int J Cancer, 2009, 124(5): 1008-1019.
- [5] Gustafsson L, Aits S, Onnerfjord P, et al. Changes in proteasome structure and function caused by HAMLET in tumor cells [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5229.
- [6] Rammer P, Groth-Pedersen L, Kirkegaard T, et al. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(1): 24-32.
- [7] Stinnakre MG, Vilotte JL, Soulier S, et al. Creation and phenotypic analysis of alpha-lactalbumin-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(14): 6544-6548.
- [8] Acharya KR, Ren JS, Stuart DI, et al. Crystal structure of human alpha-lactalbumin at 1.7 A resolution [J]. J Mol Biol, 1991, 221(2): 571-581.
- [9] Kuwajima K. The molten globule state of alpha-lactalbumin [J].

- Faseb J, 1996, 10(1): 102-109.
- [10] Svensson M, Fast J, Mossberg AK, et al. Alpha-lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) [J]. *Protein Sci*, 2003, 12(12): 2794-2804.
- [11] Svensson M, Mossberg AK, Pettersson J, et al. Lipids as cofactors in protein folding: Stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) [J]. *Protein Sci*, 2003, 12(12): 2805-2814.
- [12] Pettersson-Kastberg J, Mossberg AK, Trulsson M, et al. Alpha-Lactalbumin, engineered to be nonnative and inactive, kills tumor cells when in complex with oleic acid: A new biological function resulting from partial unfolding [J]. *J Mol Biol*, 2009, 394(5): 994-1010.
- [13] Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, et al. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(8): 4221-4226.
- [14] Kamijima T, Ohmura A, Sato T, et al. Heat-treatment method for producing fatty acid-bound alpha-lactalbumin that induces tumor cell death [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(1): 211-214.
- [15] Knyazeva EL, Grishchenko VM, Fadeev RS, et al. Who is Mr. HAMLET? Interaction of human alpha-lactalbumin with monomeric oleic acid [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(49): 13127-13137.
- [16] Mossberg AK, Hun Mok K, Morozova-Roche LA, et al. Structure and function of human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes [J]. *Febs J*, 2010, 277(22): 4614-4625.
- [17] Fischer W, Gustafsson L, Mossberg AK, et al. Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(6): 2105-2112.
- [18] Gustafsson L, Leijonhufvud I, Aronsson A, et al. Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(26): 2663-2672.
- [19] Mossberg AK, Wullt B, Gustafsson L, et al. Bladder cancers respond to intravesical instillation of HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(6): 1352-1359.
- [20] Mossberg AK, Hou Y, Svensson M, et al. HAMLET treatment delays bladder cancer development [J]. *J Urol*, 2010, 183(4): 1590-1597.
- [21] Mossberg AK, Puchades M, Halskau O, et al. HAMLET interacts with lipid membranes and perturbs their structure and integrity [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9384.
- [22] Hakansson A, Andreasson J, Zhivotovsky B, et al. Multimeric alpha-lactalbumin from human milk induces apoptosis through a direct effect on cell nuclei [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 246(2): 451-460.
- [23] Svensson M, Sabharwal H, Hakansson A, et al. Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(10): 6388-6396.
- [24] Durringer C, Hamiche A, Gustafsson L, et al. HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(43): 42131-42135.
- [25] Hallgren O, Gustafsson L, Irjala H, et al. HAMLET triggers apoptosis but tumor cell death is independent of caspases, Bcl-2 and p53 [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(2): 221-233.
- [26] Kohler C, Gogvadze V, Hakansson A, et al. A folding variant of human alpha-lactalbumin induces mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268(1): 186-191.
- [27] Kohler C, Hakansson A, Svanborg C, et al. Protease activation in apoptosis induced by MAL [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 249(2): 260-268.
- [28] Hallgren O, Aits S, Brest P, et al. Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 606: 217-240.
- [29] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 78: 217-245.
- [30] Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Autophagy: An emerging target for cancer therapy [J]. *Autophagy*, 2008, 4(5): 574-580.
- [31] Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 992-998.
- [32] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2): 1542-1552.
- [33] Brest P, Gustafsson M, Mossberg AK, et al. Histone deacetylase inhibitors promote the tumoricidal effect of HAMLET [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11327-11334.
- [34] Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(1): 42-61.
- [35] Pettersson-Kastberg J, Aits S, Gustafsson L, et al. Can misfolded proteins be beneficial? The HAMLET case [J]. *Ann Med*, 2009, 41(3): 162-176.
- [36] Liskova K, Kelly AL, O'Brien N, et al. Effect of denaturation of alpha-lactalbumin on the formation of BAMLET (bovine alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(7): 4421-4427.
- [37] Dwivedi AK, Goel A, Shankhwar SN, et al. Human alpha-lactalbumin made lethal to tumors: Can it be a new intravesical therapy for bladder cancer? [J]. *Indian J Urol*, 2010, 26(3): 464-465.

[收稿日期] 2010-12-20

[修回日期] 2011-02-30

[本文编辑] 王莹