

- [14] Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [J]. *Nature*, 1993, 366(6456):704-707.
- [15] 付国, 吕昌龙. p16 和 p15 基因缺失与白血病[J]. *国外医学·肿瘤学分册*, 1997, 24(1):52-53.
- [16] Watanabe T, Nakamura M, Yonekawa Y, et al. Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p14ARF and p16INK4a genes in oligodendrogliomas [J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101(3):185-189.
- [17] Tung WS, Shevlin DW, Bartsch D, et al. Infrequent CDKN2 mutation in human differentiated thyroid cancers [J]. *Mol Carcinog*, 1996, 15(1):5-10.
- [18] Yane K, Konishi N, Kitahori Y, et al. Lack of p16/CDKN2 alterations in thyroid carcinomas [J]. *Cancer Lett*, 1996, 101(1):85-92.
- [19] 赵雪松, 贾金良, 陈征. 细胞周期调控因子在分化型甲状腺癌中的表达及相关性研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(7):1114-1117.
- [20] Boltze C, Zack S, Quednow C, et al. Hypermethylation of the CDKN2/p16INK4A promoter in thyroid carcinogenesis [J]. *Pathol Res Pract*, 2003, 199(6):399-404.
- [21] 彭正良, 曹仁贤, 文格波, 等. 甲状腺乳头状癌组织中 p16 基因甲基化的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(12):1501-1503.
- [22] Greenblatt MS, Beaudet JG, Gump JR, et al. Detailed computational study of p53 and p16: using evolutionary sequence analysis and disease-associated mutations to predict the functional consequences of allelic variants [J]. *Oncogene*, 2003, 22(8):1150-1163.

[文章编号] 1000-2200(2009)05-0457-03

· 综述 ·

内质网应激对肿瘤发展及化疗反应的影响

杨芬 综述, 蒋志文 审校

[关键词] 内质网; 非折叠蛋白反应; 葡萄糖调节蛋白 78; 细胞凋亡; 肿瘤; 综述

[中国图书资料分类法分类号] R 329.4 [文献标识码] A

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是一种重要的细胞器,是蛋白质合成、翻译后修饰、折叠、寡聚化而形成正确构象及分泌的场所,还参与脂质代谢和类固醇激素的合成、钙的储存等。细胞在缺氧、营养缺乏、糖基化抑制、氧化应激、钙代谢紊乱、突变蛋白质表达等因素作用下,内质网腔非折叠蛋白或错误折叠蛋白聚集,引起 ER 应激。ER 为了减少应激的损害,即启动非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)^[1]。研究表明,UPR 在许多实体瘤模型中被激活,对肿瘤细胞快速增殖具有保护作用,并且能够改变肿瘤的化疗敏感性。本文即结合基础研究与临床研究成果,就 ER 应激对肿瘤生物学及其化疗的影响作一综述。

1 非折叠蛋白反应的激活及其机制

ER 内固有的分子伴侣蛋白及折叠酶可以辅助和调控新合成蛋白质的成熟,这些分子伴侣蛋白和折叠酶结合新合成的蛋白质阻止它们聚集和帮助它们正确折叠^[2]。不能正确折叠的蛋白质被保留在 ER 腔,并最终被重转位至胞质,通过 26S 蛋白酶体降解,此过程需要 ER 和分子伴侣蛋白同时参与^[3]。

ER 环境的变化能够影响新生蛋白质的成熟,ER 腔非折叠或错误折叠蛋白聚集导致 ER 应激^[4]。ER 应激时,细胞通过一系列应激反应信号通路的激活来改变转录和翻译程序,即启动 UPR,UPR 是一种复杂的和多面性的信号转导级

联反应,能够限制非折叠蛋白的累积。它的最初效应是保护 ER 及限制其他细胞器的损害,最终能够通过减少细胞的过度应激而保护机体。但是过度的 UPR 能够启动细胞凋亡进程^[5]。在 ER 应激时,细胞保护反应和细胞凋亡反应之间的平衡点至今还不太清楚。

哺乳动物的 UPR 由 3 种跨膜蛋白启动,分别是 ATF6 (activating transcription factor 6)、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) 和 PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase)。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 端腔域部分与葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 相连形成复合物而不能磷酸化。当非折叠蛋白增多,GRP78 与它们解离时,IRE1 和 PERK 通过跨膜磷酸化而转导 ER 应激反应信号。PERK 的活化导致翻译起始因子 eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) 的 α 亚基磷酸化,使蛋白合成受抑;IRE1 通过活化的 IRE1p 的核酸内切酶切割 XBP1 (X-box binding protein 1) mRNA 前体,形成有活性的 XBP1 mRNA 调节蛋白转录。在膜的细胞质面,ATF6 被剪切形成 p50ATF6,后者移位到细胞核并激活包含有 ER 应激反应元件(ERSE)的 ER 伴侣基因的转录^[6]。

2 UPR 的激活与肿瘤的发展

已有研究报道 UPR 在不同肿瘤中激活的证据。在乳腺癌的原代细胞中发现,上游原件 XBP1 和 ATF6 被激活,下游靶点 C/EBP 同源性蛋白质 (C/EBP homologous protein, CHOP) 及 ER 分子伴侣 GRP78、GRP94、GRP170 被激活^[7],以上结果也同时在肝癌^[8]、胃癌^[9]、食管腺癌^[10]、黑色素瘤^[11] 中被发现。课题组过去研究证明,GRP78 在雌激素受体阴性肿瘤中的表达高于在雌激素受体阳性肿瘤中的表达,呈赖生

[收稿日期] 2008-09-05

[基金项目] 安徽省人才开发资金资助项目 (No2002Z023)

[作者单位] 蚌埠医学院 药理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 杨芬(1980-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 蒋志文,研究生导师,教授,研究方向:肿瘤药理学。

长状态、赖细胞密度和赖恶性程度性暴发性合成^[12],这表明UPR的激活与临床上侵袭能力强的肿瘤关系密切。因此推测UPR可能保护肿瘤细胞避免凋亡的命运。

尽管控制肿瘤休眠与侵略性生长的直接原因还不清楚,但已有数据显示两种丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员——ERK1/2和p38能够影响肿瘤的增殖^[13]。ERK通常被增殖的信号分子激活并且与细胞生长相联系。相反,p38的激活通常在死亡受体、caspases前体和DNA损伤信号的下游。与p38比较,较高比例激活ERK1/2与活体内肿瘤的侵略性生长相关,而高水平的p38活性有助于原位肿瘤细胞进入生长停滞状态。在生长停滞细胞的高水平p38激活与UPR的诱导相关,而高水平ERK1/2激活的侵略性生长细胞并没有UPR激活的迹象^[14],这表明ER应激在促进肿瘤休眠中具有重要作用,但是p38在ER应激中的激活地位还不清楚。

癌细胞的突变经常可以使它们失去凋亡潜在性,肿瘤细胞持续的UPR激活能够促进细胞周期阻滞、休眠而避免凋亡。因此,肿瘤发展的早期ER应激要么通过增加血管生成有益于肿瘤生长,要么诱导肿瘤休眠有益于宿主。另一方面,诱导的休眠状态也保护肿瘤细胞免受凋亡,并允许它们在条件变化时有第二次生长的机会。

3 ER应激反应性细胞凋亡

ER应激途径的细胞凋亡既有别于经典的线粒体途径和死亡受体途径的凋亡,又与这两种凋亡途径之间存在紧密联系,3种凋亡途径最终都通过caspases级联反应诱导细胞凋亡。caspases是一组由无活性的酶原合成的半胱氨酸蛋白酶,可以反应体内外信号,通过上游caspases前体的裂解而激活,引起一级级联反应,从而导致凋亡的细胞死亡^[15]。

ER应激诱导的凋亡涉及caspase-2、caspase-3、caspase-4、caspase-7、caspase-8、caspase-9及caspase-12。caspase-12是关键调节者,因为缺乏caspase-12的鼠细胞对ER应激诱导的凋亡部分抵抗。然而,caspase-12仅在啮齿类动物中表达,它的人类同系物在进化过程中由于变异而沉默。在人类的神经母细胞瘤及HeLa细胞研究中发现,caspase-4履行caspase-12的功能,在ER应激诱导的凋亡中起了重要作用^[16-18]。研究显示,MAPK/MEK/ERK的激活是多数实体瘤细胞对死亡受体介导及线粒体介导的细胞凋亡抵抗的共同原因^[19,20]。抑制MEK/ERK信号通路可以增强黑色素瘤细胞对ER应激诱导凋亡的敏感性,并且证明是由caspase-4激活介导的。同时提出抑制MEK/ERK信号通路可以下调GRP78的表达和阻断它在UPR时的诱导,这在提高细胞对ER应激诱导凋亡中具有重要作用^[21]。

此外,c-Jun氨基末端激酶(JNK)、CHOP、Bcl-2的下调以及凋亡蛋白家族成员抑制剂在ER应激诱导的凋亡中都起到重要作用^[22-24]。CHOP^{-/-}动物的小鼠胚胎成纤维细胞和肾的管状上皮细胞对衣霉素(tunicamycin, TM)诱导的凋亡率较低,说明CHOP在UPR相关的细胞死亡中具有重要作用^[25]。用siRNA抑制CHOP的表达可以减少TM介导的DR5的诱导,从而抑制细胞凋亡^[26]。CHOP促进凋亡的机制似乎与它降低抗凋亡蛋白Bcl-2而同时升高细胞内活性氧簇(ROS)水平的能力有关,这两方面都有利于细胞色素C从线粒体腔的

释放^[27]。释放的细胞色素C激活细胞溶质的凋亡蛋白酶激活因子1(apoptotic protease activating factors 1, APAF1),然后激活下游caspase-9和caspase-3依赖的级联反应^[15]。

同时,UPR激活也能引起胞质和线粒体的Ca²⁺水平升高,胞质内Ca²⁺水平的升高引起BCL-2家族成员BAD磷酸化,并易位至线粒体膜发挥它的促凋亡功能^[28]。胞质Ca²⁺的升高也能引起钙蛋白酶的激活,从而诱导caspase-12前体的裂解^[29]。在ER应激时,caspase-12一旦被激活,其催化亚单位就会释放到胞质,在胞质内以一个不依赖细胞色素C的方式激活caspase-9级联反应而启动凋亡^[30]。

4 ER应激改变肿瘤化疗敏感性的作用

GRP78是热休克蛋白70家族中的一员,是ER功能的中心调节者,具有协助蛋白折叠、集合、非折叠蛋白降解、结合ER/Ca²⁺和控制跨膜ER应激感受器激活的作用。在ER应激时表达明显升高,因此常作为ER应激的生物标记^[31]。另外,由于它的抗凋亡性质,GRP78的应激诱导表现了UPR的存活保护作用。已经知道GRP78在大量的癌细胞及活组织中被诱导,然而GRP78抑制ER应激诱导的细胞凋亡机制和这种作用在过度ER应激导致细胞死亡中被逆转的机制目前还不清楚。Rao等^[32]研究表明,GRP78抑制凋亡信号部分是由于抑制caspases的激活。

近来,应用过表达和siRNA敲除的方法确定GRP78有助于肿瘤生长和改变癌细胞对药物的敏感性。研究表明,GRP78的表达水平可能是乳腺癌病人对阿霉素(ADM)为基础的化疗方案疗效评判的预报因子。GRP78参与细胞对ADM和依托泊苷(VP-16)诱导凋亡的抵抗,其机制可能是通过BAX的抑制和caspase-7的激活。紫杉烷类通过干扰ER结构和抑制GRP78的转录改变GRP78和UPR保护通路的功能,例如翻译的抑制和非折叠蛋白的降解^[31]。

体外培养的细胞给药处理可以改变ER的微环境和激活UPR,这样一方面可以帮助这些细胞抵抗拓扑异构酶II(topoisomerase II, Topo II)的毒性,另一方面增强它们对DNA交联剂的敏感性,如顺铂。与以Topo II为靶点的药物不同,ER应激可以增强各种实体瘤对顺铂诱导的凋亡性细胞死亡的敏感性^[33]。因此,UPR的激活能够协同或者阻碍各种抗癌药物的效应,当然对药物的种类和作用方式是有选择的。

5 结语

尽管已明确ER应激反应在一些实体瘤中能被激活,但是ER应激发生在肿瘤生长的哪一阶段还不清楚。尤其重要的是要明确UPR的激活改变化疗药物的敏感性的潜在作用。如果ER应激反应在大多数肿瘤细胞被激活,那么它将为化疗干涉提供新的靶点。即使肿瘤周围的条件能够充分激活ER应激反应,但是这并不表明这种反应对肿瘤发展是决定性的,所以,批判性地评价UPR在肿瘤中的角色,具有设计小分子抑制剂的潜在可能性,也可以应用UPR通路来提高现有药物的效能,或许还能设计出新药。

【参考文献】

- [1] Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response[J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 739-789.
- [2] Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions[J]. Chem Neuroanat, 2004, 28(1-2): 51-65.

- [3] Jarosch E, Lenk U, Sommer T. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation[J]. *Int Rev Cytol*, 2003, 223:39-81.
- [4] Brodsky JL. An in vitro assay for the selective endoplasmic reticulum associated degradation of an unglycosylated secreted protein[J]. *Methods*, 2005, 35(4):354-359.
- [5] Apostolou A, Shen Y, Liang Y, et al. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death[J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(13):2454-2467.
- [6] Dong D, Ni M, Li J, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2):498-505.
- [7] Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 59(1):15-26.
- [8] Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma; a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2003, 38(5):605-614.
- [9] Song MS, Park YK, Lee JH, et al. Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22):8322-8330.
- [10] Chen X, Ding Y, Liu CG, et al. Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(1):123-130.
- [11] Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21(3):358-367.
- [12] 蒋志文, LeBourhis-Xuefen, Hubert Hondermarck. 肿瘤细胞的进行性增殖和 Bip/ GRP78 的合成[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(1):79-83.
- [13] Aguirre-Chiso JA, Estrada Y, Liu D, et al. ERK (MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38 (SAPK)[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7):1684-1695.
- [14] Aguirre-Chiso JA, Ossowski L, Rosenbaum SK. Green fluorescent protein tagging of extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways reveals novel dynamics of pathway activation during primary and metastatic growth[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(20):7336-7345.
- [15] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(22):2922-2933.
- [16] Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(44):45495-45502.
- [17] Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(3):363-373.
- [18] Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death[J]. *Cell Biol*, 2004, 165(3):347-356.
- [19] Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, et al. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria[J]. *Oncogene*, 2003, 22(19):2869-2881.
- [20] Hersey P, Zhuang L, Zhang XD. Current strategies in overcoming resistance of cancer cells to apoptosis melanoma as a model[J]. *Int Rev Cytol*, 2006, 251:131-158.
- [21] Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, et al. Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(20):9750-9761.
- [22] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4):381-389.
- [23] Hu P, Han Z, Couvillon AD, et al. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(47):49420-49429.
- [24] Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53[J]. *Biol Chem*, 2006, 281(11):7260-7270.
- [25] Marutani T, Yamamoto A, Nagai N, et al. Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP[J]. *Cell Sci*, 2004, 117(Pt 24):5913-5922.
- [26] Shirashi T, Yoshida T, Nakata S, et al. Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6364-6370.
- [27] McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl-2 and perturbing the cellular redox state[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4):1249-1259.
- [28] Brandhorst TT, Gauthier GM, Stein RA, et al. Calcium binding by the essential virulence factor BAD-1 of *Blastomyces dermatitidis*[J]. *Biol Chem*, 2005, 280(51):42156-42163.
- [29] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis[J]. *Cell Biol*, 2000, 150(4):887-894.
- [30] 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]. *Biol Chem*, 2002, 277(37):34287-34294.
- [31] Lee E, Nichols P, Spicer D, et al. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16):7849-7853.
- [32] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78[J]. *FEBS Lett*, 2002, 514(23):122-128.
- [33] Mandic A, Hansson J, Linder S, et al. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(11):9100-9106.