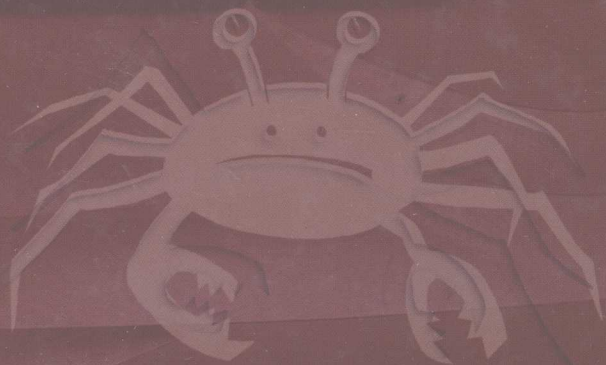


肿瘤研究

前沿

第7卷

樊代明 主编



第四军医大学出版社

6 R73
80
7

肿瘤研究

前沿

第7卷

樊代明 主编

第四军医大学出版社·西安

内容简介

本书是全面介绍肿瘤研究进展的系列著作——《肿瘤研究前沿》的第7卷,主要包含了肿瘤耐药和一些重要信号转导途径的相关内容。本书从PI3K通路、MAPK通路、Ras通路和ATM通路等几个方面详细、系统地介绍了当前肿瘤耐药研究的进展和前沿。本书可作为相关专业研究人员的参考用书,也可供高校、医院的相关人员阅读使用。

图书在版编目(CIP)数据

肿瘤研究前沿(第7卷)/樊代明主编. —西安:第四军医大学出版社,2007.12
ISBN 978-7-81086-432-9

I. 肿… II. 樊… III. 肿瘤-研究 IV. R73

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第197581号

肿瘤研究前沿(第7卷)

主 编 樊代明
责任编辑 富 明
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路17号(邮编:710032)
电 话 029-84776765
传 真 029-84776764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 西安永惠印务有限公司
版 次 2007年12月第1版 2007年12月第1次印刷
开 本 850×1168 1/32
印 张 7.75
字 数 160千字
书 号 ISBN 978-7-81086-432-9/R·348
定 价 38.00元

(版权所有 盗版必究)

编委会

主 编：樊代明

执行主编：潘阳林

编 者：王敬博 刘理礼 刘震雄 吉 清
宋久刚 张发明 张国云 时永全
林 涛 洪 流 贺远龙 夏 琳
郭雪艳 梁 洁 阎 丽 惠晓丽
葛伏林 韩 宇 韩者艺 靳海峰
翟惠虹

主 编 简 介



樊代明，1953 年出生，重庆市人。中国工程院院士。现任第四军医大学校长，西京医院消化内科主任、教授、主任医师，肿瘤生物学国家重点实验室主任，国家临床药理基地主任，中华消化学会主委，中华内科学会副主委，国家教育部长江学者计划特聘教授，西安市科协主席，陕西省科协常委。担任 25 家杂志的编委、主编或副主编。目前担任北京大学等 60 余所大学的客座教授或名誉教授。

长期从事消化系统疾病的基础及临床研究，特别是在胃癌的研究中作出一定成绩，先后承担国家 863、973、国家攻关、国家杰出青年基金、国家自然科学基金等课题。获国家科技进步二、三等奖各 1 项，国家发明三等奖 1 项，主编专著 7 本。发表论文 211 篇，其中在国外杂志发表论文 143 余篇。

序

肿瘤是严重危害人类健康及生命的疾病。尽管国内外已投入大量的人力和财力进行研究,发表的论著也有成千上万,但至今对其病因和发病机制尚不清楚,多数肿瘤在临床诊断、治疗及预防方面也无重大突破。造成这种现状的根本原因除了肿瘤本身的复杂性外,还与各专业的研究者之间沟通较少、“各行其是”,对肿瘤研究的全貌及进展了解不够、顾此失彼,以及各专业在理论及技术上的协作欠佳有关。要解决这个问题,需要有人把各专业对肿瘤研究的重大进展及时地进行整理总结并加以评述,从中找出相互间研究的生长点及解决办法,然后适时地介绍给正在或将要从事肿瘤研究的同事。《肿瘤研究前沿》将会适应这种需求,结合著者自己的科研成果,将目前世界上肿瘤研究的最新进展尽力以最通俗的语言介绍给同行及相关研究人员,每年一卷,各卷介绍的内容有所侧重,连续下去,坚持数年,必有好处。如无特殊情况,直至肿瘤被攻克之日。

本书像专著,因为它含有著者的研究成果;它像综述,因为它介绍世界文献的最新进展;它像述评,因为它给出著者的观点及见解;它也像科普读物,因为它力求以最普通的文字面对读者。它以包容性、先进性、焦点争论为特色。这就是它既像什么又不完全是什么的缘故,这就是肿瘤研究的现状,也就是本书追逐的肿瘤研究的前沿。

樊代明

2001.8

目 录

第一章 PI3K 通路与肿瘤耐药	(1)
一、PI3K/Akt 信号通路	(1)
二、PI3K/Akt 与肿瘤耐药	(18)
三、PI3K 通路相关分子与肿瘤耐药	(25)
参考文献	(44)
第二章 MAPK 通路与肿瘤耐药	(69)
一、MAPK 信号转导通路简介	(69)
二、MAPK 与肿瘤耐药	(77)
三、c - Jun/c - Fos 与肿瘤耐药	(80)
参考文献	(86)
第三章 p53 通路与肿瘤耐药	(94)
一、p53 通路简介	(94)
二、p53 与肿瘤耐药	(100)
三、p53 通路相关分子与肿瘤耐药	(107)
参考文献	(125)

第四章 Ras 通路与肿瘤耐药 (142)

一、Ras/Raf 与肿瘤耐药 (142)

二、NF κ B /IKK 与肿瘤耐药 (152)

三、Rho 家族分子与肿瘤耐药 (159)

参考文献 (168)

第五章 ATM 通路与肿瘤耐药 (178)

一、ATM 通路简介 (178)

二、ATM 及相关分子与肿瘤耐药 (187)

参考文献 (212)

第六章 核糖体蛋白与肿瘤多药耐药的关系 (225)

一、核糖体的结构与功能 (225)

二、核糖体蛋白与多药耐药的关系 (227)

三、核糖体蛋白与肿瘤多药耐药的关系 (228)

参考文献 (234)

缩略词表 (237)

第一章

PI3K 通路 与 肿瘤 耐药

一、PI3K/Akt 信号通路

PI3K/Akt 信号通路参与了细胞外(丝裂原生长因子、胰岛素、应激信号等)及细胞内信号(酪氨酸受体激酶、Ras 和 Src)介导的多种细胞行为。这些信号使 Akt 通过 PH 结构域与 PI3K 的产物结合而活化,这个过程受肿瘤抑制因子 PTEN 负性调节。目前已确定的 Akt 底物分子有 30 余个,这些分子的磷酸化广泛参与了细胞存活、生长、分化、迁移、代谢以及血管生成等多种事件。已发现,PI3K/Akt 信号通路在许多肿瘤中发生了变化,Akt 的过表达可致细胞恶性转化和耐药。因此,PI3K/Akt 信号通路已成为研发抗肿瘤药物的重要靶向。

(一)PI3K

PI3K 是由脂类激酶组成的能够磷酸化磷脂酰肌醇的一类分子,最早由 Cantley 研究组报道。PI3K 家族由 3 类异构体组成。I 类 PI3K 根据功能和结构又进一步分为 Ia 和 Ib 两个亚类。PI3K 由 p110 催化亚基和 p85 接头调节亚基组成。Ia 类 PI3K 调节亚基由 α 、 β 和 γ 三个剪接变异体基因中的一个基因编码。p85 α 编码一个接头样的蛋白,含有 2 个 SH2 结构域和 1 个内 SH2 结构

域,后者仅与 p110 亚基结合。另外两个剪接变异体 p55 α 和 p50 α 不含 N 端 SH3 结构域和 BCR 结构域。这两个结构域对 p110 亚基有负性调节作用,因此 p55 α 和 p50 α 对 p110 的激活较 p85 α 更有效。p85 调节亚基既可通过 SH2 结构域直接与活化的含有 YXXM 基序的酪氨酸激酶结合;又可通过其他磷酸化的蛋白介导,如胰岛素受体底物 IRS1 和 IRS2,间接与酪氨酸激酶结合。p110 亚基也由 3 个基因编码(α 、 β 和 δ),所有的基因产物结构相同,包括与 p85 和 Ras 结合的结构域、负责膜锚定的 C2 结构域和 1 个激酶结构域。

在正常细胞中,PI3K 的活性是受到严密调控的。在静止细胞中,p85-p110 复合物以前体形式定位于胞浆中,胞外信号激活跨膜受体-酪氨酸激酶受体(RTK)或 G 蛋白耦联受体,通过与 SH2 结构域分别将 I a 或 I b 类 PI3K 募集到胞膜附近磷酸化而激活。PI3K 的活化有两个前提条件:① p110 亚基与细胞膜脂质的距离足够近;② RTK 与 p85 结合解除了 p85 对 p110 的抑制作用。另外,RTK 也可通过 Ras 直接激活 p110。目前 PI3K 的失活机制仍不清楚。有假说认为,p85-p110 被募集至细胞膜后,p85 发生酪氨酸磷酸化,负性调控 p110 亚基的催化活性。

PI3K 活化后使细胞膜上的 PI(4,5)P₂ 磷酸化生成 PI(3,4,5)P₃。PIP₃ 可作为细胞内第二信使与 PI3K 下游的分子结合并调控它们的功能。PH 结构域是 PIP₃ 与部分靶蛋白特异性结合的结构基础。

(二)Akt/PKB 家族

1. Akt 基因的克隆

PI3K 最重要的下游分子是丝/苏氨酸激酶 Akt(homologue of the viral oncogene v-akt),又称 PKB。1977 年,Akt-8 逆转录病毒从 AKR/J 小鼠胸腺瘤(thymoma)中分离,感染该病毒的小鼠自发性淋

巴瘤发病率增高。此种病毒可使貂肺上皮细胞系 CCL-64 发生恶性转化,提示该病毒包含某种未知癌基因。1988 年,Staal 等从 Akt-8 感染的貂肺上皮细胞中分离出一段源自人细胞的癌基因片段,命名为 Akt。Staal 等发现 Akt-8 可诱发裸鼠自发胸腺淋巴瘤,进一步证实 Akt 具有癌基因特性。1991 年,三个独立的研究小组分别报道了 PKB/Akt 基因。第一个研究小组报道 Akt 基因编码一个丝/苏氨酸激酶,并将该分子命名为 RAC,随后又命名为 PKBa/Akt1,该小组经体外试验证实 Akt 以组蛋白 H1 为底物。Bellacosa 等随后报道了 v-Akt 的克隆,该基因为一融合基因,包含病毒 Gag 和 PKBa/Akt1 两部分。他们发现 v-Akt 与 PKC 高度同源,并指出 v-Akt 在 SDS-PAGE 中泳动滞后可能是磷酸化造成的。后来 Coffey 和 Woodgett 用 PCR 筛选的方法得到一条与 PKA 和 PKC 高度同源的 cDNA 并命名为 PKB。同年,采用同源性克隆方法克隆到 PKB β /Akt2 基因,不久又克隆到 PKB γ /Akt3 基因。

2. Akt 的结构特点

Akt 家族分子有 Akt 1,2,3 三种亚型。从氨基酸序列分析,Akt 2,3 分别与 Akt1 有 81% 和 83% 的同源性。Akt 含有三个主要的结构域:第一个是 N 端的 PH 结构域,介导蛋白与蛋白、蛋白与脂质的相互作用,3-磷酸肌醇便是其中一个重要的结合分子;第二个是与 PH 结构域相邻的激酶结构域,该结构域与 PKA、PKC 高度同源,含有一个重要的苏氨酸残基,另一个结构域是 C 端的疏水性调节结构域,含有 Akt 丝氨酸磷酸化调控位点(图 1-1)。

Akt 三种亚型组织分布和功能有所不同:

(1) Akt1 在正常组织中分布较为广泛,而 Akt 2,3 主要分布于脑、心脏、肾脏、睾丸、肺脏和骨骼肌等组织。

(2) 过表达野生型 Akt 2,而非 Akt 1,3,可使 NIH-3T3 细胞转化,诱导乳腺癌细胞和卵巢癌细胞发生侵袭和转移。

(3) 尽管在多种肿瘤中检测到了三者在激酶水平和蛋白水平

的变化,但在肿瘤中常发生基因扩增的分子主要是 Akt2,而非 Akt1,3。

(4)Akt2,而非 Akt1,在骨骼肌发育中发挥了特有的作用。

(5)三者基因敲除小鼠表型不同: Akt1^{-/-}小鼠器官体积相对同品系正常小鼠小; Akt2^{-/-}小鼠出生时无明显特殊表型,随生长发育出现外周胰岛素耐受和顽固性肝脏糖异生增强,类似人类2型糖尿病; Akt3^{-/-}小鼠全大脑体积缩小,提示 Akt3 可能与后天大脑发育有关。

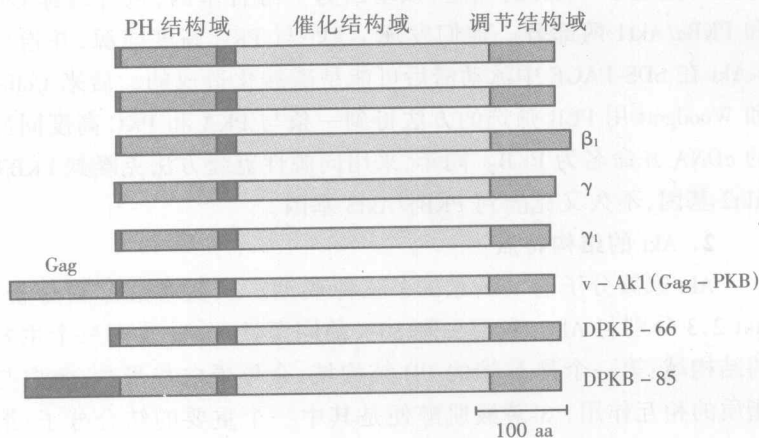


图 1-1 Akt 的结构域示意图

3. Akt 的磷酸化和去磷酸化

Akt 属 AGC 激酶家族,该家族活化的一个共同特点是需要催化中心附近的柔性多肽环(a flexible peptide loop, T-loop)的磷酸化。当处于非磷酸化状态时,活化环(activation loop)发挥抑制激酶的作用,而磷酸化后,该环发生修饰等作用,使分子更易于结合 ATP 及激酶底物。

Akt 以 PI3K 依赖的方式活化,其活化有赖于 PH 结构域的完整性。RTK 和 GPCR 活化使该结构域与 PI3K 的产物 PtdIns-3,4-P₂ 和 PtdIns-3,4,5-P₃ 结合, Akt 转位、并定位于细胞浆膜。Akt 含有两个磷酸化活化位点,其一是活性区的苏氨酸残基 (Akt1 T308, Akt2 T309, Akt3 T305), 另一个是 C 端的丝氨酸残基 (Akt1 S473, Akt2 S474, Akt3 S472)。在 PDK1、ILK 或 DNA-PK 的作用下,两个磷酸化位点先后或单独磷酸化。

有研究报道, Akt 还存在 S124 和 T450 两个磷酸化位点。但是这两个位点并不能调控 Akt 的活性, 在受到刺激后, 两位点的磷酸化状态也不发生改变。

最近有证据表明, Akt 的活化需要活化环中两个酪氨酸残基 (Y315 和 Y326) 磷酸化。这种修饰主要依赖于 Src 家族的酪氨酸激酶的作用。体内、体外研究显示, c-Src 可通过 SH3 结构域与 Akt C 端的 YXXP 基序以 EGF 依赖的方式相互作用。

除了 RTK 和 GPCR, Akt 还可被多种类型的细胞应激激活。这些细胞应激包括热休克、紫外线照射、缺血、缺氧、高血糖及氧应激等。细胞应激活化 Akt 可能是细胞为逃避死亡而产生的一种具有普遍性的代偿保护机制。细胞也可能将化疗药物作为一种细胞刺激, 因为许多化疗药物是通过产生活性氧来发挥毒性作用的 (表 1-1)。

表 1-1 刺激 Akt 活化的分子

磷酸酶抑制剂
钒酸盐
Okadaic acid

酪氨酸激酶
血管生成素 1
抗 CD28 抗体
表皮生长因子
碱性成纤维细胞生长因子

续表

纤连蛋白
Gas6
抗整合素抗体
白介素 2,3,4,5,8
胰岛素
胰岛素样生长因子
抗杀伤细胞抑制性受体抗体
白血病抑制因子
神经生长因子
N-甲基-D-天(门)冬氨酸
血小板衍生生长因子
干细胞因子
血管内皮生长因子
应激调节的 G 蛋白耦联受体
Bradykinin
C5a
卡巴胆碱
内皮素
生长相关癌基因 α
fMet-Leu-Phe
uOpioids
血小板活化因子
RANTES (regulated on activation, normal
T-cell expressed and secreted)
其他活化因子
百日咳毒素
锌
Sphingosine 1-phosphate
低氧
Sodium nitroprusside
兴奋状态
双氧水
热休克
Fluid shear
肿瘤坏死因子 α
Cadmium

理论上讲,细胞中 Akt 的活化状态处于动态平衡之中,这个平

衡有赖于因 PIP3 水平增高提供的激活信号和致使 Akt 去磷酸化的抑制信号的相互作用的消长。有证据提示, Akt 活化和失活两个环节可能均有 Akt 磷酸酶参与。用丝苏氨酸磷酸酶抑制剂如 okadaic acid 处理细胞可活化 Akt, 而且这种活化作用在 PI3K 受抑制的情况下仍存在, 因此推测蛋白磷酸酶, 可能是磷酸酶 2A, 在静止细胞中维持 Akt 处于失活状态。

抑制 PI3K 活性可使 S473 快速去磷酸化, 使 T308 相对较慢的去磷酸化, 同时伴有 Akt 失活, 提示 PIP3 在激活 PDK1 的同时限制磷酸酶的活性。神经酰胺和渗透压变化可通过 okadaic acid 依赖的磷酸酶使 S473 去磷酸化, 而 T308 去磷酸化的机制不清, 其中一种假设认为 PDK1 以某种未知的机制参与 T308 去磷酸化。

4. 参与调节 Akt 的上游分子

(1) 激活 Akt 的上游分子

能够激活 Akt 的上游信号, 绝大部分是参与正向调控细胞生长或者能够促进肿瘤发生、转移的分子, 比如: 胰岛素、EGFR、PDGF、Ras、Her2/neu 等。除了已经介绍的 PI3K/PIP3/PDK1, Akt 还可受到以下分子的正性调控。

1) HSP

HSP 家族分子作为分子伴侣可在外界应激的作用下促进蛋白的折叠和稳定或失稳。至今已发现两种 HSP 可与 Akt 结合。HSP27 可在不同的应激条件下特异地结合不同的 Akt 亚型。研究发现 HSP 与 Akt 结合可使 Akt 活化, 保护中性粒细胞免受凋亡。HSP90 可与 Akt 激酶结构域的中心区域结合。HSP90 与 Akt 解离不仅使 Akt 对蛋白磷酸酶 2A 的敏感性增强, 而且会使 Akt 发生泛素化降解。

2) Grb10

Grb10 是 Grb 家族分子。在干细胞因子作用下, Grb10 与 Akt 组成性结合形成复合物通过 c-kit 配体与 c-kit 受体酪氨酸激酶相

互作用。Grb10 可激活 Akt,此作用有赖于 c-kit 的活性及 SH2 和 Grb10 PH 结构域的存在。提示 Grb10 可能在 c-kit 活化后将 Akt 募集至胞膜。

3)Karetin K10

Karetin K10 是细胞骨架中间细丝的主要成分,结合并将 Akt 扣押于细胞骨架中,使 Akt 不能发生转位,抑制 Akt 活性,促进细胞凋亡。

4)Tel1

Tel1 为一分子是为 14000 的蛋白,仅存在于 T、B 细胞发育的特定阶段,在 T、B 恶性肿瘤中表达增高。酵母双杂交显示 Tel1 是 Akt 的结合蛋白,但其对 Akt 的作用机制仍有待研究。

(2)抑制 Akt 的上游分子

负向调控 Akt 活化的分子,主要是磷酸酶。

1)PTEN

PTEN 是一种脂类去磷酸化酶,可以通过使 PIP3 去磷酸化而抑制 Akt 的活化。有报道认为 PTEN 可以通过抑制 Akt 的活化,抑制 Mdm2 对 p53 的降解,从而增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。但是,PTEN 在多数肿瘤中突变或缺失,如 40% ~ 50% 的胶质瘤有 PTEN 的缺失,乳腺癌、肺癌等多种肿瘤中也有不同程度的变异,致使这一作用无法发挥。

2)p53

p53 在 DNA 损伤时,如用化疗药物或 γ 射线处理肿瘤细胞时,一方面通过激活 PTEN 启动子,抑制 PI3K/Akt 的活性,杀死肿瘤细胞;另一方面,直接通过抑制 PIK3CA——编码 p110 的基因的转录,在 PTEN 缺失的肿瘤中,抑制 Akt 的活化。

3)SHIP

磷酸酶 SHIP 可使 PIP3 的 5' 端去磷酸化,也是 Akt 的负性调控分子。SHIP 在体内调控 PI3K/Akt 途径的重要性还不清楚。

SHIP 基因敲除小鼠并不发生肿瘤,但寿命明显缩短,也可能是后者使检测肿瘤发生受到了限制。

4)CTMP

除了被磷酸酶抑制,新近发现的分子 Akt 结合蛋白 CTMP 对 Akt 也具有负性调控作用。CTMP 可在胞膜处与 Akt 胞浆区的 C 端结合。过表达 CTMP 对 T308 和 S473 均有抑制作用,致使 IGF-1 或胰岛素不能激活 Akt。而且表达 CTMP 可在体内或体外逆转 V-Akt 转化细胞的瘤性生长。

5)Trb3

Trb3 是哺乳动物 tribbles 同源类似物,在果蝇中是 cdc25 的结合蛋白之一。酵母双杂交显示,Trb3 与 Akt 激酶结构域的中心区域结合。过表达 Trb3 可抑制 Akt 的磷酸化。在绝食的肝脏中,Trb3 高表达。当在小鼠中高表达时,Trb3 可增强禁食-再食造成的低血糖效应,提示 Trb3 从胰岛素信号调控 Akt。

5. Akt 的底物

Akt 活化迅速,通常在刺激后几分钟之内便达到高峰。活化之后,Akt 与膜解离,进入细胞浆或细胞核通过改变下游分子的磷酸化水平来调节细胞功能。最早,人们利用类似组蛋白 2B 的底物、髓磷脂蛋白衍生物、甚至 Akt 本身来研究 Akt 的活化效应。第一个被发现的 Akt 底物是 GSK-3。随后,Alessi 和同事以 GSK-3 磷酸化位点为基础,设计了系列多肽基序,筛选到 Akt 的其他底物。所有 Akt 底物都具有相同的磷酸化基序:Arg-Xaa-Arg-Yaa-Zaa-Ser/Thr-Hyd(其中 Xaa 代表任意氨基酸残基;Yaa 和 Zaa 代表非甘氨酸的氨基酸残基;Hyd 代表大的疏水性氨基酸残基,如苯丙氨酸或亮氨酸残基)。Cantley 小组又在七肽两端分别加上优化或非优化的氨基酸残基,发现这些残基对 Akt 的磷酸化作用具有明显的正性或负性影响。根据这些信息,Yaffe 和 Cantley 整合出一种基序评分运算法则(motif-profile scoring algorithm)。这套法则可评价所有