

- 115;50.
- [15] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. *Blood*, 2005, 105:1815.
- [16] Ramaswamy R, Fazekasoz H, Lam EW, et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle[J]. *Transplantation*, 2007, 83:71.
- [17] Garidad M, Ted JH, Roberta M, et al. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2; a novel surface maker for the identification of MSOs[J]. *Blood*, 2007, 109:4245.
- [18] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions[J]. *Blood*, 2006, 107(1):367.
- [19] Sadaki A, Shin I, Kevin F, et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation[J]. *Experimental Hematology*, 2009, 37:604.
- [20] Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms, Exp [J]. *Cell Res*, 2005, 305:33.
- [21] Grazia MS, Heba A, Flavio B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer cell proliferation, cytotoxicity and cytokine production; role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2[J]. *Abstracts*, 2009, 3:133.
- [22] Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation[J]. *Blood*, 2006, 107(4):1484.
- [23] 董毅, 李庆生, 夏瑞祥, 等. 人骨髓间充质干细胞对再生障碍性贫血患者 T 细胞增殖影响的体外实验[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25):4807.
- [24] 杜优优, 周胜华, 周滔, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后炎性细胞因子表达的调节[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(8):1440.
- [25] 赵然尊, 石蓓, 许官学, 等. rhG-CSF 和间充质干细胞移植治疗心肌梗死的比较研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(23):2667.

(收稿日期:2009-07-01 修回日期:2009-08-07)

· 综 述 ·

Clusterin 与肿瘤的放射敏感性

黄 铎¹综述, 吴永忠²审校

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科 400016; 2. 重庆市肿瘤研究所 400030)

关键词: Clusterin; 放射敏感性; 肿瘤; RNA 干扰

中图分类号: R730.55

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)04-0491-03

Clusterin(CLU)又名聚集素,由 Blaschuk 等^[1]于 1983 年首次从山羊睾丸网液(ram fete testis fluid)中分离出来,因其介导支持细胞聚集而得名。由于其在细胞凋亡、周期调节、DNA 损伤、修复等中起重要作用而逐渐受到人们重视,大量研究表明其表达情况与肿瘤的放射敏感性存在重要相关性。

1 CLU 的理化性质

人类 CLU 的主要表达形式是一种异二聚体硫酸化糖蛋白,由 TRPM-2 单拷贝基因表达,该基因定位于含有 9 个外显子的 8p12-p21 上,由 13 750 对碱基组成,最终形成一条由 1 651 个核苷酸编码的 449 个氨基酸所组成的多肽链。由于其在细胞内通过选择性剪接形成糖基化和非糖基化两种蛋白质亚型而区分为分泌型 CLU(sCLU)和核型 CLU(nCLU)^[2],目前人们主要认同它们在细胞存活、凋亡中发挥着相互矛盾的重要作用。

1.1 sCLU 在大多数细胞中是一种细胞保护作用因子。sCLU 蛋白表达是由全长 CLU mRNA 的第一个 AUG 密码子开始翻译,首先形成一条多肽前体蛋白,该蛋白前体逐次通过加工、转运、糖基化、剪切最终形成 80ku 的分泌型糖蛋白,最后通过分泌和非调控途径分泌到体液中^[3]。有研究认为 sCLU 主要通过与活化 Bax 相互作用进而参与到肿瘤细胞的抗凋亡反应中,通过抑制细胞色素 C 的释放来达到保护细胞的功能^[4];也有研究认为 CLU 在体外主要是以一种对抗细胞

毒素因子而起作用^[5]。但目前认可较多的是 sCLU 是在细胞受到各种刺激时产生,并进而发挥其抗凋亡作用的。但具体机制目前仍不十分清楚,有待进一步深入研究。

1.2 nCLU 该型蛋白是以全长 CLU mRNA 第二个起始密码进行翻译,最终形成的一条经过选择性剪接的前体 CLU。进一步研究显示该前体 CLU 具有外显子 II 缺乏和 N'末端截短的特点,该前体 CLU 由其所含的靶向细胞核的核定位信号区(nuclear localization signals, NLSs)而定位于细胞核内。正常情况下,无活性的前体 nCLU 定位于胞浆,由于其 C 端具有能与 KU70 结合的螺旋-螺旋结构域及其 NLS 而发挥其凋亡功能。当细胞遭受严重损伤时,如辐照,无活性的前体 nCLU 发生翻译后修饰,形成 55ku 的前凋亡蛋白(nCLU),移入受损细胞的胞核内,进而诱导其凋亡^[3]。有研究表明 nCLU 的这种促凋亡功能必须具有一个 C 端螺旋-螺旋结构域和至少一个 NLS,并且任何一个相关结构发生突变或变异都会影响其功能的发挥^[6]。但这种翻译后的具体修饰过程尚不十分清楚。

2 CLU 与肿瘤的相关性

CLU 在多种肿瘤中都存在异常表达,并且其异常表达情况与肿瘤存在密切相关性。目前 CLU 的确切功能尚不十分清楚,研究表明其与介导细胞聚集、参与脂质交换和运输、稳定细胞膜、促进生殖功能、调节补体以及 DNA 修复和凋亡等均密切相关^[7]。

2.1 CLU 与肿瘤的凋亡 近年来已通过多种方法和途径,如 TUNEL、ELISA 和 Caspase 测定及小干扰 RNA(siRNA)等证实 CLU 在多种肿瘤中具有抗细胞凋亡的作用,并发现其抗凋亡的形式与其表达情况及亚型密切相关。

Xie 等^[8]通过上调卵巢癌细胞中 CLU 表达发现卵巢癌中 CLU 的表达与凋亡成反比,认为 CLU 具有明显的抗凋亡作用,并且提出 CLU 可能是决定卵巢癌侵袭性的重要因子之一。Sintich 等^[9]发现 LNCaP 细胞对 CLU 的过度表达可以保护细胞免受细胞毒 TNF 的影响,并且 CLU 表达的阻断可以导致细胞死亡,雄激素依赖的前列腺癌细胞株 LNCaP 对 TNF- α 细胞毒作用非常敏感,但当外源性 CLU 加入培养液时,LNCaP 对 TNF- α 诱导的细胞凋亡产生了耐受。针对该结果主要考虑:(1)CLU 是一种黏附蛋白,通过与 TNF 分子的相互作用使靶细胞无法获得细胞因子;(2)CLU 在 TNF 受体水平发挥作用;(3)CLU 与细胞表面某种分子(如鞘磷脂)相互作用,干涉 TNF 的信号转导。但具体作用机制仍不清楚。

目前 CLU 基因及其蛋白发挥抗凋亡作用的具体机制及结构基础仍不明了,CLU 对肿瘤细胞凋亡关系的研究还有待进一步深入。尽管如此,众多研究仍证实 CLU 在正常组织和肿瘤细胞的重塑及凋亡中都发挥着重要作用。

2.2 CLU 与肿瘤放、化疗 目前肿瘤放、化疗中治疗失败的主要原因是由于肿瘤细胞对治疗的耐受及抗凋亡功能的增强,而 CLU 明确的抗凋亡作用是导致肿瘤放、化疗耐受的一个重要因素。

Miyake 等^[10]发现 CLU 在前列腺癌,尤其是雄激素撤退的肿瘤中表达明显上调,指出细胞内 CLU 的表达上调导致了雄激素撤退肿瘤对抗肿瘤药物的耐受,CLU 在抗毒药物诱导的细胞凋亡过程中发挥了重要作用。Lee 等^[11]研究进一步证实上述结果,并认为其使癌细胞具有较强的侵袭能力。进一步研究表明以 sCLU 主导上述作用,sCLU 的促进细胞聚合的作用在对维持组织正常形态和疾病情况下的组织修复都发挥着重要作用,甚至是必需的。

Yamanaka 等^[12]证实下调膀胱癌中 sCLU 的表达可以增加其放射敏感性,无论在体内外,KoTCC-1 肿瘤细胞的凋亡率均明显增加。另一方面,Chung 等^[13]在对膀胱癌化疗诱导凋亡中的 sCLU 功能分析表明,sCLU 下调表达可以提高膀胱癌细胞对化疗药物的敏感性。

2.3 CLU 与肿瘤的诊断及预后 大量研究证实 CLU 与肿瘤发生、发展存在明确相关性,其中 sCLU 的抗凋亡作用在肿瘤的早期诊治上被认为具有重要意义,有研究认为 sCLU 有望成为恶性肿瘤的早期检测及预后的生物学标记物。Chen 等^[14]认为 sCLU 抗原在鼠和人类肠道肿瘤中是一种敏感而稳定的组织学标记物,因此推测源于 sCLU 的标记物可用作人类大肠癌早期检测指标。Miyake 等^[15]研究发现在膀胱癌中 sCLU 的表达水平与肿瘤分化程度及病理分级密切相关,sCLU 高表达的总体生存率低。大量研究结果显示 CLU 有望成为多种肿瘤的标志物之一。也有研究认为在某些恶性肿瘤中 CLU 表达是下调的,但具体机制及其确实性目前都不甚明了,目前仍需要相关研究进一步的深入证明。另外,不同类型 CLU 的表达与肿瘤细胞的发生、发展及侵袭也不尽相同,并且 CLU 的两种蛋白亚型在某些情况下可以发生转化,当肿瘤向更高恶性度和高转移性发生演进的同时可出现 nCLU 向 sCLU 转化^[16]。

3 CLU 的抑制与肿瘤

放射生物学研究表明,内、外源性活性氧物质(ROS)可导致 DNA 双链断裂(double strand break,DSB)形成^[17],其中电离辐射可导致细胞发生高度复杂的 DSB,如果这种 DSB 不能修复就会导致细胞死亡,即使修复发生错误,也会增加细胞的遗传不稳定性。目前已知的 DSB 修复通路有同源重组修复(homologous recombination repair HRR)和非同源末端连接(non-homologous end joining NHEJ),而由 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase,DNA-PK)介导的非同源末端连接是最主要的修复通路^[18]。

3.1 CLU 与肿瘤放射损伤 近年来研究结果表明 CLU 参与 DNA 修复信号转导通路。nCLU 是最早被发现的应激诱导蛋白之一,它主要通过 DNA-PK 复合体的组成成分 Ku70 及 Ku80 结合形成三聚体而参与非同源末端连接通路的 DSB 修复,当哺乳动物细胞对电离辐射或其他 DNA 损伤进行修复时,由于 nCLU 的过表达能减弱 Ku70/Ku80 与 DNA 末端结合的能力,进而影响 DNA 非同源末端连接修复通路,最终导致 DSB 修复失败,进而导致基因组不稳定或细胞死亡^[17]。因此 nCLU 可能直接影响 DSB 修复。

以 Ku80 羧基端的抗体作用于乳腺癌细胞 MDA231 的实验进一步证实上述理论,结果表明接受放射后细胞存活率明显降低^[19],该实验既是基于该部位——Ku80 羧基端,即与 DNA-PKcs 相互作用的区域,又参与 Ku 二聚体装配和与 DNA 末端结合。但 DNA-PK 在 DSB 再修复中的确切机制还不清楚,有待进一步深入研究。

3.2 CLU 抑制剂与肿瘤的放射敏感性 CLU 在细胞保护及抗凋亡方面的强大功能常导致治疗失败,而 CLU 特异性抑制剂能显著地遏制其抗凋亡的功能无疑给肿瘤的治疗带来了新的希望,针对 CLU 靶点的研究也越来越受到重视。

July 等^[20]利用 149 例肺癌组织制作成组织芯片进行体外 CLU 的免疫染色实验,在人非小细胞肺癌细胞系(non-small cell lung cancer,NSCLC)A549 细胞中观察 CLU-ASO 和 siRNA 对 CLU 的表达及对紫杉醇的敏感性影响;体内实验应用 A549 细胞的免疫缺陷小鼠考察 CLU-ASO 对化疗敏感性的影响,发现 80% 以上的人 NSCLC 对 CLU 起免疫反应,CLU 在人类 NSCLC 中普遍表达,CLU-ASO 和 siRNA 降低 A549 中的 mRNA 表达,呈现一种剂量依赖的、序列特异的特征,且明显增强 A549 对紫杉醇的体外药物敏感性。说明 CLU 有望作为 NSCLC 治疗的新靶点。Cao 等^[21]在利用 CLU-ASO 转染 H460 肺癌细胞系的实验中,利用特异性 siRNA 干扰 sCLU 的表达,而 nCLU 的表达未受影响,在体内、外实验中发现,当对 H460 施行放疗加 OGX-011(针对 sCLU 的反义寡核苷酸)处理时凋亡的细胞数量明显增加,说明体外实验中 CLU-ASO 能增强肺癌细胞的放疗敏感性。

目前对于针对 CLU 的研究大多仍停留在基础研究上,尤其是一些作用机制上。而由 Oncogenex 公司与 Isis 制药公司联手开发的一种抗前列腺癌先导候选药物——针对 CLU 的 OGX-011 无疑是一个升华。

Chi 等^[22]利用 CLU 的反义核苷酸 OGX-011 联合多西紫杉醇治疗晚期恶性肿瘤,I 期临床试验结果显示其联合多西紫杉醇治疗多种晚期恶性肿瘤,尤其是雄激素抗拒性前列腺癌证明是安全、可行的,现相关研究已进入 II 期临床试验。同时利

用 OGX-011 针对 NSCLC 和乳腺癌等实体肿瘤的试验也取得满意效果,并也已进入 II 期临床试验。有研究指出 CLU 的表达还可导致前列腺癌以及其他癌症治疗中耐药性的产生,且对激素治疗、放疗、化疗等各种癌症疗法均有影响,而通过特异性地抑制其功能将明显改善治疗效果。因此对 CLU 的抑制能增加肿瘤对放疗和其他治疗的敏感性,促进肿瘤细胞死亡。

4 结 语

目前针对 CLU 的研究正在不断加深、扩大,并且得到了大量与肿瘤相关的成果,有研究表明,针对 CLU 的 siRNA 能明显抑制其表达而增加肿瘤细胞对放疗的敏感性,OGX-011 针对抗雄性激素前列腺癌等肿瘤的临床 I、II 期试验所取得的成果就是很好的说明,大量研究表明,CLU 为肿瘤的诊治提供了新的思路与策略,这也为放射抗拒肿瘤的治疗提供了更广阔的方向。

参考文献:

- [1] Blaschuk O, Burdzya K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell aggregating factor(clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid[J]. *Biol Chem*, 1983, 258(12):7714.
- [2] Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, et al. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11):5907.
- [3] Leskov K, Klokov D, Li J, et al. Synthesis functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein[J]. *Bio Chem*, 2003, 278:11590.
- [4] Zhang H, Kim JK, Edwards CA, et al. Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax[J]. *Nat Cell Biol*, 2005, 7:909.
- [5] Schwochau GB, Nath KA, Rosenberg ME. Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties[J]. *Kidney Int*, 1998, 53(6):1647.
- [6] Miyake H, Hara I, Gleave ME, et al. Protection of androgen-dependent human prostate cancer cells from oxidative stress-induced DNA damage by overexpression of clusterin and its modulation by androgen[J]. *Prostate*, 2004, 61:318.
- [7] Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, et al. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23:2298.
- [8] Xie D, Lau SH, Sham JS, et al. Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 103(2):277.
- [9] Sintich SM, Steinberg J, Kozlowski JM, et al. Cytotoxic Sensitivity to tumor Necrosis factor-alpha in PC3 and LNCaP Prostatic cancer cells is regulated by extracellular levels of SGP-2(clusterin)[J]. *Prostate*, 1999, 39(2):87.
- [10] Miyake H, Hara I, Kamidomo S, et al. Resistance to cytotoxic chemotherapy-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with intracellular clusterin expression[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(20):469.
- [11] Lee C, Janulis L, Ilio K, et al. In vitro models of prostate apoptosis: clusterin as antiapoptosis mediator[J]. *Prostate Suppl*, 2000, 9:21.
- [12] Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, et al. Induction of apoptosis and enhancement of chemosensitivity in human prostate cancer LNCaP cells using bispecific antisense oligonucleotide targeting Bcl-2 and Bcl-xL genes[J]. *BJU Int*, 2006, 97(6):1300.
- [13] Chung J, Kwak C, Jin RJ, et al. Enhanced chemosensitivity of bladder cancer cells to cisplatin by suppression of clusterin in vitro[J]. *Cancer Lett*, 2004, 203(2):155.
- [14] Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, et al. Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia[J]. *Natl Acad Sci USA*, 2003, 100:9530.
- [15] Miyake H, Gleave M, Kamidono S, et al. Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence[J]. *Urology*, 2002, 59(1):150.
- [16] Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, et al. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23:2298.
- [17] Leskov K, Criswell T, Antonino S, et al. When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2001, 11:352.
- [18] Lieber MR, May, Pannicke U, et al. mechanism of mammalian double-strand break repair[J]. *Oncogene*, 2003, 22(37):5792.
- [19] Kim CH, Park SJ, Lee SH. A targeted inhibition of DNA-dependent protein kinase sensitizes breast cancer cells following ionizing radiation[J]. *Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 2002, 303(2):753.
- [20] July LV, Beraldi E, So A, et al. Nucleotide based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(3):223.
- [21] Cao C, Shinohara ET, Li H, et al. Clusterin as a therapeutic target for radiation sensitization in a lung cancer model[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63(4):1228.
- [22] Chi KN, Zoubeidi A, Gleave ME, et al. Custirsen(OGX-011): a second-generation antisense inhibitor of clusterin for the treatment of cancer[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008, 17(12):1955.