

Chemistry Letters, 2010, 20(12): 3675-3679.

(10): 2949-2952.

[24] Liu X, Huang X, Lin W, et al. New aromatic substituted pyrazoles as selective inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21

(收稿日期: 2013-03-08 修回日期: 2013-04-19)

· 综 述 ·

## Smad4 在结直肠肿瘤中的研究进展

姚紫州 综述, 陈嘉勇<sup>△</sup>, 梁道明 审校

(昆明医科大学第二附属医院急诊科, 昆明 650101)

关键词: Smad4; 抑癌基因; 结直肠肿瘤; 转化生长因子-β

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)24-2923-03

Hahn 等<sup>[1]</sup>在 1996 年研究胰腺癌患者中发现了一种新的抑癌基因 DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4)。因 DPC4 蛋白与果蝇的 MAD (mother against decapentaplegic) 蛋白及线虫的 Sma2、Sma3 和 Sma4 蛋白同源, 这类蛋白统称为 Smads, 故 DPC4 也被称为 Smad4 (similar to mothers against decapentaplegic homologue-4)。大量研究表明, Smad4 基因的突变或缺失与结直肠肿瘤的发生、发展、生物学行为及其预后有着密切关系。因此, 进一步研究 Smad4 基因在结直肠肿瘤中的作用机制可能对结直肠肿瘤的诊断、治疗及预后具有重要意义。本文就 Smad4 在结直肠肿瘤中的研究进展作一综述。

### 1 Smad4 的结构功能及作用机制

Smad4 是定位于 18q21.1 染色体上的抑癌基因, 含有 11 个外显子, 10 个内含子, cDNA 全长为 1 556 个碱基, 其核苷酸序列保存在 GenBank 的 U44378 中; 其转录子长 2 680 bp, 该转录子编码 552 个氨基酸残基组成的蛋白质, 其大小为 60.4 kDa。Smad4 基因编码的蛋白是一种信号转导蛋白, 主要作用是参与转化生长因子 β (transforming growth factor β, TGF-β) 超家族的信号在细胞内的传导, 是信号转导蛋白 Smads 的功能活动中心<sup>[2]</sup>。Smad 蛋白根据结构和功能可以分 3 个亚型: 受体活化型 Smad (receptor-activated smads, R-Smads)、共享型 Smad (common-mediator smads, Co-Smad)、抑制型 Smad (inhibitory smads, I-Smads), 其中, Co-Smad 为 Smad4。Smad4 蛋白含有 2 个高度保守的功能区, 即氨基端的 MH1 区 (mad homology domain 1) 和羧基端的 MH2 区 (mad homology domain 2), 两者之间为非保守的连接区。Smad4 作为 TGF-β 信号通路细胞内信使, 能够激活 TGF-β I 型受体 (TGF-β type I receptor, TβRI), 从而调节细胞的生长、分化和细胞周期<sup>[3-4]</sup>。TGF-β I 型受体活化导致 Smad2、Smad3 的激活和磷酸化, 进而与 Smad4 形成复合物聚集在细胞核内, 并通过与 DNA 结合蛋白相互作用, 从而正向或负向调节靶基因的转录。TGF-β 是一种多功能细胞因子, 对细胞的生长、增殖、分化及凋亡具有调节作用, TGF-β 能抑制大多数正常细胞和肿瘤细胞的生长。Smad4 蛋白的表达异常会导致 TGF-β 信号通路传递中断, 使肿瘤细胞逃脱了 TGF-β 的抑制作用<sup>[4-6]</sup>。突变使 Smad4 蛋白调节靶基因转录的功能受损, 可能与以下 4 个原因有关: (1) MH1 区突变使其不能与 DNA 的 SBE (smad binding elements, SBEs) 结合; (2) MH2 区的突变阻止 Smad4 的核移位, 造成

TGF-β 信号传递中断; (3) MH2 区的断裂突变削弱其转录调节功能; (4) 突变型 Smad4 蛋白经 E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin ligase) 介导的降解作用较野生型 Smad4 迅速增多<sup>[7]</sup>。

### 2 Smad4 在结直肠肿瘤中的研究进展

**2.1 Smad4 在结直肠癌前病变发生、发展中的研究** 幼年性息肉病 (juvenile polyposis syndrome, JPS) 是一常染色体显性遗传疾病, 其表现为胃肠道在幼年时期易发生错构瘤性息肉, 这些息肉会增加患结直肠癌的风险<sup>[8]</sup>。50%~60% JPS 患者存在 Smad4 胚系突变 (germline mutations)<sup>[9-10]</sup>。Langeveld 等<sup>[11]</sup>应用免疫组织化学及 qPCR 检测并分析 JPS 息肉组织中 Smad4 蛋白表达与 Smad4 基因状态的关系, 发现 20 例 Smad4 胚系突变标本中有 9 例出现上皮细胞 Smad4 的表达缺失, 5 例出现 Smad4 杂合性缺失, 2 例无 Smad4 杂合性缺失的息肉出现了一个体细胞终止密码子突变, 约 50% 的 JPS 患者存在 Smad4 胚系突变, 表现为上皮细胞核内 Smad4 表达的缺失或点突变, 9 例 Smad4 异常表达息肉标本中有 7 例存在野生型 Smad4 等位基因二次打击 (second hit)。这说明免疫组织化学检测 Smad4 反映了 JPS 息肉中 Smad4 的表达情况并可成为 JPS 分子诊断的一个辅助指标; 同时他们也发现, 66% 发育不良的息肉中 Smad4 表达正常, 说明 Smad4 的失活并不一定与息肉发育异常并存, JPS 的癌变伴随着 Smad4 胚系突变并不需要野生型 Smad4 基因的失活而启动<sup>[11]</sup>。一些研究表明, 存在 Smad4 胚系突变的结直肠幼年性息肉通常具有较强增殖能力, 息肉中基质较少, 上皮细胞较多, 具有较强的癌变倾向<sup>[12]</sup>。Calva-Cerqueira 等<sup>[13]</sup>研究也表明 Smad4 突变在 JPS 患者中常见, 并增加患结直肠癌的风险。

**2.2 Smad4 在结直肠癌发生、发展中的研究** 结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的发生、发展是一个涉及多种基因改变和多阶段致癌的复杂过程。染色体不稳定性 (chromosome instability, CIN) 和微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI) 是 2 条影响结直肠癌进展的主要通路, 其中前者主要指 APC (adenomatous polyposis coli, APC)、p53 和 DCC (deleted in colorectal carcinoma, DCC)/Smad4 等的缺失。Smad4 基因作为抑癌基因在结直肠癌中的作用不可忽视, 很多研究表明它在肿瘤早期起抑制作用, 在结直肠癌中 Smad4 的突变或缺失为 30% 左右<sup>[14]</sup>。因此, 探索 Smad4 在结直肠癌发生、发展中的作用对结直肠癌的诊断治疗具有重要意义。Kitamura 等<sup>[15]</sup>

研究发现结直肠癌细胞中 Smad4 缺失导致 Smad4 介导的 TGF- $\beta$  信号通路失活引起含有 CCR1 蛋白的未成熟骨髓样细胞 (immature myeloid cell, iMC) 聚集, 趋化因子 CCL9 与 CCR1 结合后释放一种使正常组织变得脆弱的酶, 从而促进肿瘤侵袭。Shi 等<sup>[16]</sup> 通过构建 Smad4 过表达质粒 (Smad4-cDNA) 并转染 SW480 细胞, 使 SW480 细胞中 Smad4 再表达, 发现 Smad4 的表达能降低 SW480 细胞的增殖、迁移及侵袭能力; 他们还发现 Smad4-shRNA 介导 Smad4 基因沉默能提高人结肠癌细胞 HCT116 的增殖、迁移和侵袭性, 这充分说明 Smad4 在结直肠癌中是一种肿瘤抑制基因<sup>[17]</sup>。Panagiotis 等<sup>[18]</sup> 也发现, Smad4 的缺失促进了结直肠癌的恶性和侵袭, 并增强了血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达, 在 Smad4 缺失型细胞株中 VEGF 表达上调, Smad4 缺陷抑制低氧诱导的细胞死亡, 诱导有氧糖酵解, 从而促进结直肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的耐药, Smad4 的表达能抑制 VEGF 的表达, 从而抑制肿瘤血管生成。Zhang 等<sup>[19]</sup> 研究发现 Smad4 能抑制结肠癌细胞的成瘤及转移, Smad4 的缺失能促进结直肠癌中 TGF- $\beta$  从肿瘤抑制物向肿瘤促进物转化。Royce 等<sup>[20]</sup> 应用免疫组织化学检测 109 例早发型结直肠癌患者 (年龄小于 45 岁) 肿瘤标本中 Smad4 蛋白的表达, 发现 Smad4 蛋白的表达缺失率为 25% (27/109)。Garcia-Solano 等<sup>[21]</sup> 研究发现在结直肠锯齿状腺癌标本中 Smad4 表达缺失率为 65.1%。以上种种证据表明 Smad4 的表达缺失或突变在结直肠癌的发生、发展中具有密切的相关性。

**2.3 Smad4 与结直肠肿瘤的预后关系** 在欧洲和北美, 结直肠癌是仅次于肺癌第 2 大导致死亡的最常见原因<sup>[22]</sup>。在中国, 结直肠癌在消化道肿瘤中仅次于胃癌和食管癌, 且发病率呈逐年上升趋势。目前, 结直肠癌的治疗仍以手术治疗为首选, 辅以放疗化疗, 但疗效欠佳, 患者生存率低 (5 年生存率约为 32%)<sup>[23]</sup>。通过基因检测手段来判断肿瘤预后具有重要意义, 也是目前肿瘤研究的一个新热点。近年来, 对 Smad4 的深入研究表明, Smad4 表达的减少或缺失与结直肠癌患者预后不佳具有相关性<sup>[24-25]</sup>。Isaksson-Mettavainio 等<sup>[26]</sup> 应用免疫组织化学检测 479 例结直肠癌石蜡包埋标本细胞核内 Smad4 表达量与预后的关系, 表达结果判定分为阴性、弱阳性、强阳性, 其中, 表达阴性结直肠癌患者的生存率更低, 在表达强阳性结直肠癌患者的生存率更高; 此外, 在微卫星不稳定性肿瘤和 CpG 岛高甲基化肿瘤中, Smad4 高表达可显著增加生存率, Smad4 表达阴性的预测预后不佳; 这项研究发现 Smad4 高表达提示预后较好, Smad4 可成为结直肠癌病理检查判断预后的一个分子标记物。Alhopuro 等<sup>[27]</sup> 研究表明 Smad4 低水平表达与结直肠癌术后化疗获益不佳存在相关性。Alazzouzi 等<sup>[24]</sup> 应用免疫组织化学检测 86 例 Duke's 分期 C 期的结直肠癌患者癌组织中 Smad4 的表达水平与患者生存率的关系, 结果显示 Smad4 低表达组的中位总体生存期为 1.7 年, 而高表达组患者的中位总体生存期大于 9 年, 表明 Smad4 表达水平与患者预后显著相关。远处转移是结直肠癌根治术后疗效不佳的主要原因, Losi 等<sup>[28]</sup> 研究表明结直肠癌远处转移患者中 Smad4 的表达缺失率较无转移者高, 免疫组织化学检测 Smad4 的表达可作为预测结直肠癌远处转移的一种有价值的方法, 很可能成为筛选结直肠癌患者术前或术后是否需要适度化疗的一项辅助手段。Ahn 等<sup>[29]</sup> 研究表明 Smad4 分子标记物可成为结直肠癌患者术后早期复发的一个预测指标。Baraniskin 等<sup>[30]</sup> 研究也表明 Smad4 表达水平可作为评估奥沙利铂联合 5-FU 化疗方案治

疗结直肠癌转移患者预后价值的一个指标。

### 3 展 望

抑癌基因 Smad4 的表达缺失或突变与结直肠癌发生、发展、转移及侵袭性密切相关。它有可能成为判断结直肠癌预后的一个新的肿瘤标记物, 也可能成为评价结直肠癌术后复发的一个指标。随着抑癌基因 Smad4 研究的深入, Smad4 有望成为结直肠癌基因治疗的一个新靶点。总之, Smad4 作为一个新的抑癌基因很可能成为结直肠癌诊断和治疗研究的热点, 并具有非常重要的研究价值。

### 参考文献:

- [1] Hahn SA, Schutte M, Hoque ATMS, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1 [J]. *Science*, 1996, 271(5247): 350-353.
- [2] Bardeesy N, Cheng K, Berger JH, et al. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer [J]. *Genes & Development*, 2006, 20(22): 3130-3146.
- [3] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(23): 2783-2810.
- [4] Rojas A, Padidam M, Cress D, et al. TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(7): 1165-1173.
- [5] Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription [J]. *Intern J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 383-408.
- [6] Massagué J. TGF $\beta$  in cancer [J]. *Cell*, 2008, 134(2): 215-230.
- [7] Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGF $\beta$  signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation [J]. *Oncogene*, 2004, 23(11): 2071-2078.
- [8] Brosens LA, van Hattem A, Hyland LM, et al. Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis [J]. *Gut*, 2007, 56(7): 965-967.
- [9] Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, et al. High proportion of large genomic deletions and a genotype-phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome [J]. *J Med Genet*, 2007, 44(11): 702-709.
- [10] van Hattem WA, Brosens LA, de Leng WW, et al. Large genomic deletions of Smad4, BMPR1A and PTEN in juvenile polyposis [J]. *Gut*, 2008, 57(5): 623-627.
- [11] Langeveld D, van Hattem WA, de Leng WW, et al. Smad4 immunohistochemistry reflects genetic status in juvenile polyposis syndrome [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16): 4126-4134.
- [12] van Hattem WA, Langeveld D, de Leng WWJ, et al. Histological variations in juvenile polyp phenotype correlate with genetic defect underlying juvenile polyposis [J]. *Amer J Surg Pathol*, 2011, 35(4): 530-536.
- [13] Calva-Cerqueira D, Chinnathambi S, Pechman B, et al. The rate of germline mutations and large deletions of Smad4 and BMPR1A in juvenile polyposis [J]. *Clin Genet*, 2009, 75(1): 79-85.
- [14] Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation

- in human cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,306(4):799-804.
- [15] Kitamura T, Kometani K, Hashida H, et al. Smad4-deficient intestinal tumors recruit CCR1<sup>+</sup> myeloid cells that promote invasion[J]. *Nature Gene*, 2007,39(4):467-475.
- [16] Shi Q, Zhong YS, Ren Z, et al. Analysis of the role of the BMP7-Smad4-Id2 signaling pathway in SW480 colorectal carcinoma cells[J]. *Mol Med Report*, 2011, 4(4): 627-631.
- [17] Shi Q, Zhong YS, Yao LQ, et al. Down-regulation of Smad4 enhances proliferation and invasion of colorectal carcinoma HCT116 cells and up-regulates Id2[J]. *Mol Med Report*, 2012,5(1):89-95.
- [18] Papagiorgis P, Cheng K, Ozturk S, et al. Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer[J]. *Cancer Res*, 2011,71(3):998-1008.
- [19] Zhang B, Halder SK, Kashikar ND, et al. Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2010,138(3):969-980.
- [20] Royce SG, Alsop K, Haydon A, et al. The role of Smad4 in early-onset colorectal cancer[J]. *Colorectal Dis*, 2010, 12(3):213-219.
- [21] Garcia-Solano J, Conesa-Zamora P, Trujillo-Santos J, et al. Immunohistochemical expression profile of beta-catenin, E-cadherin, P-cadherin, laminin-5gamma2 chain, and Smad4 in colorectal serrated adenocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2012,43(7):1094-1102.
- [22] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2007[J]. *Cancer J Clin*, 2009,57(1):43-66.
- [23] Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, et al. Cancer sur-  
· 综 述 ·
- vival in five continents; a worldwide population-based study(CONCORD) [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(8): 730-756.
- [24] Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, et al. Smad4 as a prognostic marker in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(7):2606-2611.
- [25] Isaksson-Mettavainio M, Palmqvist R, Forssell J, et al. Smad4/DPC4 expression and prognosis in human colorectal cancer[J]. *Anticancer Res*, 2006,26(1B):507-510.
- [26] Isaksson-Mettavainio M, Palmqvist R, Dahlin AM, et al. High Smad4 levels appear in microsatellite instability and hypermethylated colon cancers, and indicate a better prognosis[J]. *Int J Cancer*, 2012,131(4):779-788.
- [27] Alhopuro P, Alazzouzi H, Sammalkorpi H, et al. Smad4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005,11(17):6311-6316.
- [28] Losi L, Bouzourene H, Benhattar J. Loss of Smad4 expression predicts liver metastasis in human colorectal cancer[J]. *Oncol Rep*, 2007,17(5):1095-1099.
- [29] Ahn BK, Jang SH, Paik SS, et al. Smad4 may help to identify a subset of colorectal cancer patients with early recurrence after curative therapy[J]. *Hepatogastroenterology*, 2011,58(112):1933-1936.
- [30] Baraniskin A, Munding J, Schulmann K, et al. Prognostic value of reduced Smad4 expression in patients with metastatic colorectal cancer under oxaliplatin-containing chemotherapy: a translational study of the AIO colorectal study group[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2011,10(1):24-29.
- (收稿日期:2013-02-05 修回日期:2013-05-22)

## 阿米替林预防性治疗偏头痛的研究进展

郑安海 综述,周冀英 审校

(重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室 400016)

**关键词:**阿米替林;偏头痛;小剂量;剂量变化;联合治疗;不良反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.042

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)24-2925-04

偏头痛是一种常见慢性疾病,流行病学研究表明在欧美人群患病率为10%,男性为6%~8%,女性为12%~14%,婴幼儿及青少年为5%,高峰年龄是35~45岁<sup>[1-2]</sup>。2011年中国一项偏头痛流行病学研究表明,人群患病率为9.3%,男性为5.0%~6.9%,女性为11.5%~14.1%<sup>[3]</sup>。WHO将慢性偏头痛与四肢瘫痪、精神病、痴呆列为21世纪4大慢性致残疾病。

综合的偏头痛治疗计划应包括:(1)患者教育与安慰疗法;(2)避免诱发因素;(3)非药物性治疗,如放松疗法、生物反馈、规律的生活方式;(4)急性发作期药物的治疗;(5)预防性药物治疗;(6)定期评估治疗方案<sup>[4]</sup>。

药物治疗包括急性发作期及预防性治疗,预防性治疗药物主要包括β受体阻滞剂、钙离子通道阻滞剂、抗癫痫药物、抗抑

郁药物等,其中三环类抗抑郁药阿米替林已被大量临床研究证明对偏头痛具有较好的预防性治疗作用。且因其较高的性价比,适合在发展中国家推广使用<sup>[5]</sup>。本文就阿米替林在偏头痛预防性治疗中的作用机制及临床疗效研究综述如下。

### 1 阿米替林在预防性治疗偏头痛中的作用机制

阿米替林是一种常见的三环类抗抑郁药,主要作用机制包括:(1)通过增强弥散镇痛神经元的活动,抑制5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)及促进去甲肾上腺素的释放,达到镇痛的作用;(2)下调5-HT<sub>2</sub>受体;(3)抑制钠通道,这种机制可能与抑制外周致敏具有潜在的相关性;(4)通过竞争肾上腺1受体,能够增强腹内内侧核神经元下行抑制作用;(5)通过抑制氨基丁酸(gamma amino acid butyric acid,GABA)的转运蛋白