

is associated with endocytosis at the pocket region of the primary cilium[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(6):1806-1814.

- [24] Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$ -isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad signaling in endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(10):6086-6105.
- [25] Balogh P, Katz S, Kiss AL. The role of endocytic pathways in TGF- $\beta$  signaling[J]. *Pathol Oncol Res*, 2013, 19(2):141-148.
- [26] Bizet AA, Liu K, Tran-Khanh N, et al. The TGF- $\beta$  co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF- $\beta$  receptors[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5):742-753.
- [27] Hao X, Wang Y, Ren F, et al. SNX25 regulates TGF- $\beta$  signaling by enhancing the receptor degradation[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(5):935-946.

- [28] 张雪梅, 陈海龙. 肺表面活性物质相关蛋白 A 在急性肺损伤时的作用[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2010, 16(6):720-722.
- [29] Fisher AB, Dodia C, Ruckert P, et al. Pathway to lamellar bodies for surfactant protein A[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(1):L51-58.
- [30] Moulakakis C, Stamme C. Role of Clathrin-mediated endocytosis of surfactant protein A by alveolar macrophages in intracellular signaling[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 296(3):L430-441.
- [31] Pan H, Zhang Y, Luo Z, et al. Autophagy mediates avian influenza H5N1 pseudotyped particle-induced lung inflammation through NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(2):L183-195.

(收稿日期:2015-11-15 修回日期:2016-02-29)

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.14.039

## 细胞凋亡基因 GRIM-19 研究进展\*

赵 祯, 沈国华 综述, 蔡华伟<sup>△</sup> 审校

(四川大学华西医院核医学科, 成都 610041)

[关键词] GRIM-19; 细胞凋亡; 肿瘤; 维甲酸; 干扰素

[中图分类号] R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)14-1984-03

2000 年, Angell 等<sup>[1]</sup>用反义 RNA 敲除技术从乳腺癌细胞中, 在维甲酸(retinoic acid, RA)/干扰素(interferon, IFN)联合应用诱导筛选鉴定出的促细胞凋亡基因(gene associated with retinoid/interferon induced mortality 19, GRIM-19)。GRIM-19 蛋白高表达可促进细胞凋亡, 而低表达可能与肿瘤细胞的异常增殖有关<sup>[2]</sup>。本文就 GRIM-19 的结构、促凋亡作用机制、组织分布及其在肿瘤治疗中的作用, 综述如下。

### 1 GRIM-19 结构和促凋亡作用机制

GRIM-19 是 GRIM 家族中分子量最小的一个, 定位于人体 19 号染色体 p13.1, 全长 16 000 bp, 可以编码含 144 个氨基酸残基的蛋白质, 分别有 7-和 93-bp、59-和 39-bp 非翻译区序列<sup>[1]</sup>。GRIM-19 在大多数细胞的细胞质和细胞核中均有分布, 是线粒体 NADH 脱氢酶 I 复合物的组成成分, 在线粒体 I 型呼吸过程中起着重要作用<sup>[3-4]</sup>。RA 是维生素 A 的生物活性代谢产物, 对多种肿瘤, 如急性早幼粒细胞性白血病、头颈部肿瘤等具有诱导细胞分化和促进凋亡的作用<sup>[5]</sup>。IFN 是一族具有多种功能的多肽分子复合物, 具有抗病毒、抗增生和免疫调节作用, 在宿主抗病毒和抗肿瘤免疫防御中发挥核心作用<sup>[6]</sup>。RA 或 IFN 单独诱导 GRIM-19 基因转录和蛋白表达能力很弱, 但 RA/IFN 联合使用可促使 GRIM-19 表达能力明显增强<sup>[7]</sup>。骨肉瘤细胞中加入 RA/IFN, GRIM-19 表达增加, 与其结合的转录信号转导子与激活子 3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)也增多。RA/IFN 联合应

用抑制肿瘤细胞增殖并诱导凋亡, 其机制可能是通过上调 GRIM-19 表达, 进而下调 STAT3 表达实现的<sup>[8]</sup>。STAT3 在生长因子、细胞因子的刺激下发生酪氨酸磷酸化而被活化, 启动酪氨酸激酶(janus kinase, JAK)-转录信号转导子与激活子(signal transducers and activators of transcription, STAT)信号传导通路, 上调凋亡抑制因子[如 B 淋巴细胞瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤-XL(B cell lymphoma-XL, Bcl-XL)]和细胞周期调节因子[如细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期调节基因(c-myc)]的表达, 导致细胞异常增殖, 与多种肿瘤形成有关。阻断 STAT3 信号通路, 可抑制细胞异常增生, 诱导凋亡。GRIM-19 与 STAT3 特异性结合, 抑制 STAT3 通路, 下调 cyclin、c-myc、Bcl-2、Bcl-XL 等下游基因的表达, 促进细胞凋亡。GRIM-19 和 STAT3 特异性结合需要转录激活域和 Ser-727 残基<sup>[9]</sup>。GRIM-19 还通过抑制细胞黏附分子(CAM)的酪氨酸磷酸化(如 E-钙黏蛋白、局部黏附激酶、paxillin), 阻碍酪氨酸激酶(Sarcoma, Src)家族诱导的细胞恶性转化和迁移<sup>[10]</sup>。

### 2 GRIM-19 组织分布

GRIM-19 在人体正常组织中普遍存在, 尤其在心脏和骨骼肌中表达较高, 但在肿瘤组织中表达降低或缺失<sup>[11]</sup>。

**2.1 肺癌** Fan 等<sup>[12]</sup>对 51 例肺疾病患者(16 例鳞癌、15 例腺癌、10 例小细胞癌、10 例慢性炎症)研究后发现, 与慢性炎症患者相比, GRIM-19 在鳞癌、腺癌、小细胞癌中的表达均降低。

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201118、81301250)。

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: hw.cai@yahoo.com。

作者简介:赵祯(1982-), 主治医师, 博士, 主要从事分子影像研究。

与鳞癌和腺癌患者相比,GRIM-19 在小细胞癌中的表达更低。GRIM-19 在鳞癌和腺癌患者中的表达,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。GRIM-19 在肺慢性炎症组织中主要位于胞质,而在鳞癌和腺癌组织中主要定位于细胞核。GRIM-19 随肺癌恶性程度升高而显著降低或者缺失,分布由胞质转入细胞核,GRIM-19 低表达可能与肺癌的发生、发展相关。GRIM-19 在肺癌组织中的阳性率为 55.1%(27/49),在癌旁正常组织中的阳性率为 93.8%(46/49),GRIM-19 在癌组织中的表达低于癌旁正常组织<sup>[13]</sup>。肺癌 I 期 GRIM-19 阳性率为 78.6%(11/14),II 期 48.1%(13/27),III~IV 期 12.5%(1/8),GRIM-19 阳性率与肺癌临床分期呈负相关,与年龄、性别、吸烟指数、淋巴结转移无关<sup>[13]</sup>。

**2.2 肝癌** 55 例肝细胞癌和非癌组织中<sup>[14]</sup>,GRIM-19 在肝细胞癌的表达低于非癌组织,p-STAT3 在肝细胞癌的表达高于非癌组织,GRIM-19 与 p-STAT3 呈负相关。GRIM-19 表达与临床分期、门脉癌栓有关,与性别、年龄、甲胎蛋白、肿瘤大小、肝硬化、淋巴结转移无关;GRIM-19 低表达和 p-STAT3 高表达可能与肝细胞癌发生、发展、侵袭力有关。实时定量 PCR 结果显示,83 例肝癌组织中 52 例(62.65%)GRIM-19 表达低于对应癌旁组织,亦低于 8 例正常肝组织<sup>[15]</sup>。GRIM-19 表达与临床分期、微血管浸润和包膜浸润有关。

**2.3 乳腺癌** 20 例乳腺癌患者的 108 个癌组织样本和 20 个癌旁组织样本免疫组织化学结果显示<sup>[16]</sup>,GRIM-19 在癌组织中的表达低于癌旁组织,STAT3 在癌组织中表达高于癌旁组织,GRIM-19、STAT3 表达呈负相关性;GRIM-19 低表达和 STAT3 高表达是乳腺癌发生与发展的影响因素之一。GRIM-19 在乳腺癌 I/II 期患者的表达高于 III 期,与 GRIM-19 表达阳性者相比,GRIM-19 表达阴性者更容易发生乳腺癌淋巴结转移,表明 GRIM-19 与乳腺癌的临床分期和淋巴结是否转移密切相关。该研究同时显示,年龄、组织分型与 GRIM-19 表达无相关性。

**2.4 宫颈癌** 20 例正常子宫颈组织、35 例子宫颈上皮内瘤变 I (cervical intraepithelial neoplasia I, CIN I)、30 例 CIN II、30 例 CIN III、20 例子宫颈癌组织免疫组织化学结果显示<sup>[17]</sup>,GRIM-19 阳性表达率分别为 100%、80.0%、76.7%、43.3%、5.0%,表明 GRIM-19 阳性表达率与子宫颈病变恶性程度呈负相关。Cheng 等<sup>[17]</sup>对 200 例子宫颈非典型鳞状细胞增生、200 例低度鳞状上皮内病变、200 例高度鳞状上皮内病变、200 例鳞状细胞癌研究后发现,GRIM-19 阳性表达率分别为 83.5%、68.0%、39.5%、2.5%,高危型人乳头状瘤病毒(high-risk human papillomaviruses,HR-HPV)感染阴性者和阳性者,GRIM-19 阳性表达率分别为 67.2%(160/238)和 40.4%(227/562),表明 GRIM-19 阳性表达率与 HR-HPV 感染呈负相关,GRIM-19 表达减少可能是 HR-HPV 感染的结果,而 HR-HPV 持续感染是子宫颈癌发生的关键因素之一。GRIM-19 N 端的第 1-35 位氨基酸残基与 HPV E6 蛋白结合,抑制 E6-E6AP 复合体形成,减少 p53 蛋白泛素化降解,促进细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

**2.5 其他肿瘤** 同样,在胃癌<sup>[19]</sup>、食管癌<sup>[20]</sup>、前列腺癌<sup>[21]</sup>、膀胱癌<sup>[22]</sup>、卵巢上皮性癌<sup>[23]</sup>、神经胶质瘤<sup>[24]</sup>、甲状腺 Hurthle 细胞肿瘤<sup>[25]</sup>中,GRIM-19 均有不同程度的表达降低、缺失甚至突变。因此,GRIM-19 在多种人类恶性肿瘤中表达明显降低,且其表达与肿瘤的恶性程度和预后密切相关。

### 3 GRIM-19 与肿瘤治疗

单用全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)、单用

IFN- $\beta$  和联合应用 ATRA+IFN- $\beta$  对人骨肉瘤细胞株 MG-63 的 48 h 生长增殖抑制率分别为(0.215 $\pm$ 0.010)%、(0.225 $\pm$ 0.005)%和(0.705 $\pm$ 0.014)%,与单用药组比较,ATRA+IFN- $\beta$  组对细胞的抑制作用明显增强<sup>[7]</sup>。ATRA 组、IFN- $\beta$  组和 ATRA+IFN- $\beta$  组,GRIM-19 mRNA 表达分别为 1.020 $\pm$ 0.147、1.090 $\pm$ 0.055 和 1.620 $\pm$ 0.095,STAT3 mRNA 表达分别为 0.700 $\pm$ 0.047、0.670 $\pm$ 0.029、0.120 $\pm$ 0.032,与单用药组比较,ATRA+IFN- $\beta$  组中 GRIM-19 表达增高、STAT3 表达降低。ATRA+IFN- $\beta$  联合应用对 MG-63 细胞的促凋亡作用明显增强,可能与 GRIM-19 高表达,与 STAT3 特异性结合,使 STAT3 低表达有关。王同等<sup>[26]</sup>成功构建稳定表达 GRIM-19 的肺腺癌 SPC-A1 细胞株(SPC-A1/GRIM-19),肿瘤细胞增殖明显受到抑制。与对照组 SPC-A1/CON 比较,SPC-A1/GRIM-19 组 48 h 吸光度值降低,GRIM-19 蛋白升高,STAT3 蛋白降低,肿瘤体积较小。与空载体对照组比较,GRIM-19 能增强顺铂耐药人肺腺癌 A549 细胞对化疗药物的敏感度,耐药逆转倍数为 3.70 $\pm$ 0.91,可能与下调 STAT3、血管内皮细胞生长因子和 P-糖蛋白的表达有关<sup>[27]</sup>。Hao 等<sup>[15]</sup>研究显示,高侵袭力肝癌细胞株 MHCC-97H、Huh-7 中 GRIM-19 的表达低于低侵袭力细胞株 HL-7702、MHCC-97L,GRIM-19 低表达可能与增强肝癌细胞的侵袭力有关。存活素(Survivin)属于凋亡抑制蛋白,在大多数恶性肿瘤组织中高表达,在正常人体组织中无表达或低表达,利用 RNA 干扰技术可降低细胞内 Survivin 的转录和表达抑制肿瘤生长<sup>[28]</sup>。Liu 等<sup>[21]</sup>将 GRIM-19 和 siRNA-Survivin 共表达质粒转染至人前列腺癌 DU145 细胞,高表达 GRIM-19 同时沉默 Survivin,两个基因之间可协同杀伤肿瘤细胞,较单基因治疗更有效抑制肿瘤生长。psi-Survivin、pGRIM-19 和 pGRIM-19-si-Survivin 转染 DU145 细胞,Survivin 表达水平分别为 0.55 $\pm$ 0.05、0.62 $\pm$ 0.08 和 0.35 $\pm$ 0.05,GRIM-19 表达水平分别为 1.93 $\pm$ 0.14、2.57 $\pm$ 0.20 和 4.12 $\pm$ 0.21,转染 72 h 后细胞增殖率分别为(43.4 $\pm$ 4.3)%、(51.3 $\pm$ 6.7)%和(26.8 $\pm$ 7.1)%,与 psi-Survivin 和 pGRIM-19 组比较,pGRIM-19-si-Survivin 抑制细胞增殖作用明显增强。3 组重组质粒转染 DU145 细胞并接种至裸鼠,至 70 d 处死裸鼠时,肿瘤体积分别为(671.36 $\pm$ 165.11)mm<sup>3</sup>、(857.29 $\pm$ 170.07)mm<sup>3</sup>和(284.33 $\pm$ 57.33)mm<sup>3</sup>,瘤体重量分别为(2.04 $\pm$ 0.71)g、(2.62 $\pm$ 0.75)g 和(1.26 $\pm$ 0.42)g,pGRIM-19-si-Survivin 组肿瘤体积明显缩小,瘤重明显减轻。p-SiRNA Survivin/GRIM-19 转染人喉癌 Hep-2 细胞<sup>[29]</sup>、pSi-Stat3-GRIM-19 转染甲状腺癌 SW579 细胞<sup>[30]</sup>,亦可促进细胞凋亡,延缓肿瘤生长。

### 4 结语与展望

GRIM-19 异常表达或突变,可能与多种肿瘤形成有关,在肿瘤放化疗过程中有重要作用。目前对 GRIM-19 研究取得一定进展,但仍有许多问题需进一步研究,如 GRIM-19 表达调控和细胞定位、GRIM-19 与其他凋亡基因的关系、有无其他分子弥补 GRIM-19 功能等需进一步研究。

### 参考文献

- [1] Angell JE, Lindner DJ, Shapiro PS, et al. Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach[J]. J Biol Chem, 2000, 275(43):33416-33426.

- [2] Kalakonda S, Nallar SC, Jaber S, et al. Monoallelic loss of tumor suppressor GRIM-19 promotes tumorigenesis in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(45): E4213-4222.
- [3] Tamminen P, Anugula C, Mohammed F, et al. The import of the transcription factor STAT3 into mitochondria depends on GRIM-19, a component of the electron transport chain[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 4723-4732.
- [4] Chen Y, Lu H, Liu Q, et al. Function of GRIM-19, a mitochondrial respiratory chain complex I protein, in innate immunity[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(32): 27227-27235.
- [5] Liu Y, He P, Liu F, et al. Tetra-arsenic tetra-sulfide (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) promotes apoptosis in retinoid acid-resistant human acute promyelocytic leukemic NB4-R1 cells through downregulation of SET protein[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4): 3421-3430.
- [6] Zhao B, Yan J, Wu H, et al. Interferon- $\gamma$  and its pathway-associated gene expression in the vaginal tissue of premenopausal females with pelvic organ prolapse[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1145-1149.
- [7] 李甲振, 张怀栓, 镐英杰, 等. 全反式维甲酸联合干扰素- $\beta$  对人骨肉瘤细胞株 MG-63 的生长抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(2): 308-311.
- [8] Nallar SC, Kalakonda S, Lindner DJ, et al. Tumor-derived mutations in the gene associated with retinoid interferon-induced mortality (GRIM-19) disrupt its anti-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity and promote oncogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(11): 7930-7941.
- [9] Shulga N, Pastorino JG. GRIM-19-mediated translocation of STAT3 to mitochondria is necessary for TNF-induced necroptosis[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 12): 2995-3003.
- [10] Kalakonda S, Nallar SC, Lindner DJ, et al. GRIM-19 mutations fail to inhibit v-Src-induced oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(24): 3195-3204.
- [11] Kapoor S. Grim-19 expression and its close association with tumor progression in systemic malignancies [J]. *Gene*, 2013, 517(2): 240.
- [12] Fan XY, Jiang ZF, Cai L, et al. Expression and clinical significance of GRIM-19 in lung cancer[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5): 3183-3189.
- [13] 周爱民, 赵继京, 叶静, 等. GRIM-19 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *癌症*, 2009, 28(4): 431-435.
- [14] Li F, Ren W, Zhao Y, et al. Downregulation of GRIM-19 is associated with hyperactivation of p-STAT3 in hepatocellular carcinoma [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5): 3046-3054.
- [15] Hao H, Liu J, Liu G, et al. Depletion of GRIM-19 accelerates hepatocellular carcinoma invasion via inducing EMT and loss of contact inhibition[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(3): 1212-1219.
- [16] Zhou T, Chao L, Rong G, et al. Down-regulation of GRIM-19 is associated with STAT 3 overexpression in breast carcinomas[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(9): 1773-1779.
- [17] Cheng Y, Zhang HY, Zhou Y, et al. Decreased expression of GRIM-19 and its association with high-risk HPV infection in cervical squamous intraepithelial neoplasias and cancer[J]. *Clin Invest Med*, 2014, 37(2): E77-84.
- [18] Zhou Y, Wei Y, Zhu J, et al. GRIM-19 disrupts E6/E6AP complex to rescue p53 and induce apoptosis in cervical cancers[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22065.
- [19] Bu X, Zhao C, Wang W, et al. GRIM-19 inhibits the STAT 3 signaling pathway and sensitizes gastric cancer cells to radiation[J]. *Gene*, 2013, 512(2): 198-205.
- [20] 陈铎, 张牧霞. 食管鳞癌组织中 GRIM-19 的表达及意义 [J]. *肿瘤基础与临床*, 2014, 27(1): 5-7.
- [21] Liu YB, Zhang L, Guo YX, et al. Plasmid-based Survivin shRNA and GRIM-19 carried by attenuated Salmonella suppresses tumor cell growth[J]. *Asian J Androl*, 2012, 14(4): 536-545.
- [22] 彭晓晖, 梁培育, 欧善际, 等. 膀胱癌组织中 GRIM-19 及其靶基因产物 STAT3 的表达及其相关性的研究[J]. *海南医学院学报*, 2013, 19(9): 1201-1203, 1207.
- [23] 邵玉佩, 程晓东, 万小云. 卵巢上皮性癌组织中 GRIM-19 蛋白的表达及其临床意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(10): 751-755.
- [24] Liu Q, Wang L, Wang Z, et al. GRIM-19 opposes reprogramming of glioblastoma cell metabolism via HIF1 $\alpha$  destabilization[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(8): 1728-1736.
- [25] Cameselle-Teijeiro J, Ferreira R, Caramés N, et al. Absence of the BRAF and the GRIM-19 mutations in oncocytic (Hürthle cell) solid cell nests of the thyroid[J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 137(4): 612-618.
- [26] 王同, 武道荣, 刘坤贺. 上调 GRIM-19 基因对 SPC-A1 生长影响观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(5): 337-341.
- [27] 武道荣, 王同, 江子丰, 等. GRIM-19 基因对肺腺癌耐药细胞株 A549/DDP 药物敏感性及相关基因表达的影响 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(2): 92-98.
- [28] 赵祯, 匡安仁. 凋亡抑制蛋白 Survivin 研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(24): 4761-4764.
- [29] Wen LJ, Gao LF, Jin CS, et al. Small interfering RNA survivin and GRIM-19 co-expression salmonella plasmid inhibited the growth of laryngeal cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(10): 2071-2081.
- [30] Wang GM, Ren ZX, Wang PS, et al. Plasmid-based Stat3-specific siRNA and GRIM-19 inhibit the growth of thyroid cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(2): 573-580.