

合,导致蛋白质具有开放状态但不具备功能上的活性。Li 等<sup>[18]</sup>使用恶性间皮瘤细胞系和 Met-5A 永生型细胞系进行实验研究发现 merlin 蛋白的肿瘤抑制活性是由 E3 泛素化链接酶 CRL4 DCAF1 介导的。当 merlin 处于活化闭合状态,能聚集在细胞核内,并且能与 DCAF1 结合,抑制 E3 泛素化链接酶 CRL4 DCAF1 的生物活性,使细胞周期停止,抑制肿瘤的发生。而基质的黏附和整合素受体酪氨酸激酶信号转导的后续活化能激活丝氨酸-苏氨酸激酶 PAK,使 merlin 的羧基端磷酸化,导致 merlin 失活,无法进入核内,不能抑制 CRL4 DCAF1 的生物活性。CRL4 DCAF1 能促进广泛的致癌基因的表达,如泛素转录因子,组蛋白,染色质重塑酶等,导致肿瘤的产生。而 Marrow 等<sup>[19]</sup>发现 merlin 失活不仅仅是基突变导致的,其他机制也能使 merlin 失活。McClatchey 等发现 Merlin 通过对细胞表面多种受体的调控来抑制信号转导,而一旦 Merlin 失活,就会激活多种促有丝分裂的信号通道,导致细胞异常增殖。其中研究较多的是 PI<sub>3</sub>K-AKT-mTOR 通路。哺乳动物西罗莫司靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,被认为是一种雷帕霉素的细胞内靶点。细胞外信号分子作用于受体酪氨酸激酶,激活 K-ras 和磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI<sub>3</sub>K),后者可使蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)激活,而活化的 AKT 可直接激活 mTOR,也可通过下游信号作用于 mTOR。该通路不仅在蛋白合成与细胞增殖中起重要调节作用,与肿瘤的侵袭转移也密切相关。研究显示,同时有 PI<sub>3</sub>K 和 mTOR 信号通路激活的 MM 患者预示更差的存活率。Lopez-Lago 等研究发现 merlin 失活,能激活 mTOR 通路,促进 MM 细胞异常增殖。并且,在 Merlin 突变的 MM 细胞中发现, mTOR 抑制剂雷帕霉素能选择性地抑制该细胞的生长。因此, mTOR 蛋白可作为恶性间皮瘤潜在的治疗靶点。

Suzuki 等在对 21 株 MM 细胞系进行实验时,发现其中 13 株细胞 AKT 活性增高,表明恶性间皮瘤发展过程中存在 PI<sub>3</sub>K-AKT-mTOR 通路的激活。通过对 MPM 组织和细胞系研究证实,磷酸化-mTOR 的表达和 NF2 的表达存在反比关系。临床上利用 NF2 和磷酸化 mTOR 进行免疫组化来筛选对 mTOR 抑制剂敏感的 MPM 患者成为可能。已有研究者根据这些临床前研究,用 mTOR 抑制剂雷帕霉素来治疗 MPM 患者。此外, Brevet 等研究发现,单独抑制

mTOR 信号通路可能不足以抑制肿瘤的生长,在 MPM 细胞系中,由于 mTOR 信号通路的抑制激活了并行 c-MET,表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)和胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)信号通路,可能进一步激活 AKT。随后 Carracedo 等研究发现,单独抑制 mTOR 信号通路减轻了 PI<sub>3</sub>K 的反馈抑制,从而允许恢复 PI<sub>3</sub>K 的下游 AKT 信号激活。为了解决 mTOR 反馈激活 AKT 这一问题,双 PI<sub>3</sub>K/mTOR 抑制剂已被广泛应用于临床。

### 三、展 望

大量研究表明,石棉暴露与恶性间皮瘤的发生、发展密切相关,恶性间皮瘤的诊断可直接归属于职业的石棉暴露。西方国家已经禁止石棉的生产及销售,而我国大部分地区仍在继续使用。随着恶性间皮瘤发生率的不断上升,对其建立强制的预防、诊断及治疗措施是必不可少的。同时,随着对 MM 细胞遗传学及表观遗传学的研究发现,许多抑癌基因的突变、缺失会直接影响恶性间皮瘤的发生、发展,在其诊断、治疗及预后中具有潜在的生物标志物作用。虽然近年来对恶性间皮瘤分子生物学特别是某些抑癌基因及其蛋白功能的研究取得重大的进展,但仍存在许多疑问,如恶性间皮瘤的发病机制尚未完全阐述;间皮瘤的潜伏期很长,它的转化过程中是否涉及多个基因的协同作用。此外, NF2 基因的失活及 PTEN 基因表达的下调都能活化 AKT 基因,可见各信号通路互相交织成网,增加了对恶性间皮瘤研究的复杂性,因而有必要对参与恶性间皮瘤发生、发展的信号通路进行更加深入全面的研究,为恶性间皮瘤的个体化靶向治疗提供更多的理论依据。

### 参考文献

- 1 Bridda A, Padoan I, Mencarelli R, *et al.* Peritoneal mesothelioma: a review[J]. *Med Gen Med*, 2007,9(2): 32
- 2 Porpodis K, Zarogoulidis P, *et al.* Malignant pleural mesothelioma: current and future perspectives[J]. *J Thorac Dis*, 2013,5(Suppl 4): 397-406
- 3 Toyokuni S. Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2009,71(1-2): 1-10
- 4 Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma[J]. *Carcinogenesis*, 2013,34(7): 1413-1419
- 5 Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, *et al.* TNF- $\alpha$  inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- $\kappa$ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006,103(27): 10397-10402

(下转第 3 页)

- 12 Fox JG, Rogers AB, Whary MT, *et al.* Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2<sup>-/-</sup> C57BL6 × Sv129 helicobacter pylori – infected mice [J]. *Am. J. Pathol*, 2007, 171: 1520 – 1528
- 13 Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, *et al.* Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT – mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice [J]. *Nat. Med*, 2002, 8: 1089 – 1097
- 14 Judd LM, Ulaganathan M, Howlett M, *et al.* Cytokine signalling by gp130 regulates gastric mucosal healing after ulceration and indirectly antral tumour progression [J]. *Pathol*, 2009, 217: 552 – 562
- 15 Ernst M, Najdovska M, Grail D, *et al.* STAT3 and STAT1 mediate IL – 11 – dependent and inflammation – associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice [J]. *Clin Invest*, 2008, 118: 1727 – 1738
- 16 El – Omar EM, Carrington M, Chow WH, *et al.* The role of interleukin – 1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer [J]. *Nature* 2001, 412: 99
- 17 Tu S, Bhagat G, Cui G, *et al.* Overexpression of interleukin – 1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid – derived suppressor cells in mice [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14: 408 – 419
- 18 Song X, Krelin Y, Dvorkin T, *et al.* CD11b + /Gr – 1 + immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL – 1beta – secreting cells [J]. *Immunol*, 2005, 175: 8200 – 8208
- 19 Waghay M, Zavros Y, Saqui – Salces M, *et al.* Interleukin – 1beta promotes gastric atrophy through suppression of Sonic Hedgehog [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(2): 562 – 72, 572. e1 – 2
- 20 Quante M, Tu SP, Tomita H, *et al.* Bone marrow – derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19: 257 – 272
- 21 Shibata W, Ariyama H, Westphalen CB, *et al.* Stromal cell – derived factor – 1 overexpression induces gastric dysplasia through expansion of stromal myofibroblasts and epithelial progenitors [J]. *Gut*, 2012, 62: 192 – 200
- 22 Okumura T, Ericksen RE, Takaishi S, *et al.* K – ras mutation targeted to gastric tissue progenitor cells results in chronic inflammation an altered microenvironment and progression to intraepithelial neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 8435 – 8445
- 23 Ray KC, Bell KM, Yan J, *et al.* Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to Kras( G12D) – initiated tumorigenesis in a mouse model [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16786
- 24 Matkar SS, Durham A, Brice A, *et al.* Systemic activation of K – ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice [J]. *Cancer Res*, 2011, 1: 432 – 445
- 25 Wu MS, Lee CW, Shun CT, *et al.* Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 27: 403 – 411
- 26 Hahn JN, Falck VG, Jirik FR. Smad4 deficiency in T cells leads to the Th17 – associated development of premalignant gastroduodenal lesions in mice [J]. *Clin Invest*, 2011, 121: 4030 – 4042
- 27 Li QL, Ito K, Sakakura C, *et al.* Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer [J]. *Cell*, 2002, 109: 113 – 124
- 28 Ito K, Liu Q, Salto – Tellez M, *et al.* RUNX3 a novel tumor suppressor is frequently inactivated in gastric cancer by protein mislocalization [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 7743 – 7750
- 29 Shimada S, Mimata A, Sekine M, *et al.* Synergistic tumour suppressor activity of E – cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse – type gastric cancer [J]. *Gut*, 2012, 61: 344 – 353
- 30 Ito K, Chuang L S, Ito T, *et al.* Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach [J]. *Gastroenterology*, 2011, 140: 1536 – 1546. e8
- 31 Shimada S, Mimata A, Sekine M, *et al.* Synergistic tumour suppressor activity of E – cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse – type gastric cancer [J]. *Gut*, 2012, 61: 344 – 353

(收稿日期: 2014 – 04 – 15)

(修回日期: 2014 – 04 – 22)

## 恶性间皮瘤的分子生物学研究进展

姚银丽 徐伟珍 毛伟敏

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

恶性间皮瘤(malignant mesothelioma, MM)是一种高侵袭性的肿瘤,预后极差。石棉暴露是目前认为

与间皮瘤发生、发展较为密切的致病因素。由于 20 世纪 50 ~ 70 年代石棉材料的广泛应用,我国间皮瘤的发生率有上升趋势,为(0.1 ~ 0.6)/10 万,由于我国的人口基数庞大,总的发病人数多于其他国家。目前治疗恶性间皮瘤的疗效不佳,大部分患者发现时已无手术机会。肿瘤的快速进展以及目前尚无明确有

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学(姚银丽);310022 杭州,浙江省肿瘤医院、浙江省胸部肿瘤(肺、食管)诊治技术研究重点实验室(毛伟敏、徐伟珍)

通讯作者:毛伟敏,电子信箱:MaoWM@163.com

效的治疗方案使得 MM 患者的中位生存期只有 12 个月。虽然距离 MM 首次报道已经过去 50 多年,但目前仍没有建立起最优治疗策略,对 MM 的诊断、分期以及治疗仍然困难重重。近几年来,对恶性间皮瘤的分子生物学研究逐渐成为热点。检测 MM 发生、发展过程中基因表达改变,抑癌基因和癌基因的变异,以及研究高危人群致癌过程的有效标志物,将对 MM 的诊断、治疗及预后具有重要的意义。本文就恶性间皮瘤流行病学特征、潜在分子靶点的发现及研究进展做一综述。

### 一、恶性间皮瘤的流行病学特征

恶性间皮瘤是一种来源于间皮细胞的原发肿瘤,它可发生在胸膜、心包膜、腹膜和卵巢上皮细胞,其中恶性胸膜间皮瘤(malignant pleural mesothelioma, MPM)发生率约占间皮瘤的 70%<sup>[1]</sup>。在组织病理学上分为上皮型、肉瘤型、混合型(双向型)3 大类,预后均极差。石棉暴露是目前认为与间皮瘤发生、发展较为密切的致病因素。自从 1960 年, Wagner 首次报道石棉接触与 MM 的相关性后,陆续有研究证实世界上石棉采矿工人 MM 高发,有石棉暴露史的人群中 MM 的发生率可达到 100/(百万·年),而正常人群中 MM 的发生率只有 1/(百万·年),且由于职业因素,男性 MM 的发生率远高于女性。石棉已被国际癌症研究中心(IARC)确认为致癌物。石棉纤维暴露可诱发间皮细胞内 DNA 损伤及染色体异常<sup>[3]</sup>。间皮细胞能吞噬石棉纤维,石棉纤维与染色体或纺锤体缠绕,干扰有丝分裂过程,导致染色体结构异常和间皮细胞内非整倍体的形成。石棉纤维能吸收各种蛋白质和化学物质于表面,导致有害物质的积累,其中包括致癌物。石棉纤维还结合重要的细胞蛋白,对于正常间皮细胞,这些蛋白的缺失可能是有害的。体内研究发现,石棉纤维暴露后引发由大量单核-吞噬细胞组成的炎症反应,巨噬细胞吞噬纤维,但不能将其消化,并释放各种细胞因子和生长因子,从而诱导炎症和肿瘤的产生<sup>[4]</sup>。

最近研究发现,肿瘤坏死因子  $\alpha$  及 NF- $\kappa$ B 通路在石棉致间皮瘤发生、发展过程中起了关键作用<sup>[5]</sup>。接触石棉到 MM 的确诊有 40 年的潜伏期<sup>[6]</sup>。因此,在该潜伏期内,防止石棉采矿工人再次接触石棉,在很大程度上可能降低其发生率及病死率。虽然许多发达国家及一些发展中国家已禁止石棉的生产及销售,但由于潜伏期的影响,近几年 MM 的发生率及病死率仍呈不断上升趋势。作为世界上最大的石棉消

费国,不久的将来,中国可能会遭遇 MM 的发病高峰。尽管关于石棉如何致 MM 发生的可能机制已被探讨,但准确的发病机制仍需要进一步探索。除石棉暴露以外,目前还发现放射线照射、接触其他矿产纤维如毛沸石、感染 SV40 病毒以及遗传易感性也是 MM 发生、发展的可能原因。

### 二、恶性间皮瘤诊断与治疗的潜在分子靶点研究进展

恶性间皮瘤在临床表现上无特异性,易误诊,大多数 MM 患者在确诊时已是晚期,失去手术切除机会,故预后极差。目前对 MM 没有明确有效的治疗方法,放疗受限于肿瘤体积大,很难达到根治量。作为一线化疗方案,培美曲塞与顺铂的联合治疗提高了部分患者的存活率,但远期生存率仍较差。因此,寻找恶性间皮瘤诊断与治疗的潜在分子靶点具有重要意义。

基于分子生物技术的不断发展,对间皮细胞恶性转化中分子事件的研究逐渐增多。人们通过细胞遗传学分析染色体核型、比较基因组杂交技术和单核苷酸多态性分析等方法发现,恶性间皮瘤中存在杂合子的缺失,且检测到染色体臂的 1p-、3p-、4p-、4q-、6q-、9p-、13q-、14q-、15q- 和 22q- 这些区域发生频繁缺失<sup>[7]</sup>。MM 细胞系与人肿瘤组织存在共同的染色体突变区域。然而一些研究者发现,由于人肿瘤组织中存在少量的正常组织,结果显示 MM 细胞系在这些染色体区域突变的频率要高于人肿瘤组织。此外,研究还发现在这些区域存在着较重要的肿瘤抑制基因,他们包括在染色体 17p13 上的 p53 基因、9p21 上的 p16INK4a/p14ARF 基因和位于 22q12 的神经纤维瘤病 II 型(neurofibromatosis type 2, NF2)基因。这些抑癌基因的失活,可能在 MM 的发生和发展中发挥着重要作用。

1. p53 与间皮瘤:p53 基因是一种抑癌基因,定位于人类染色体 17p13.1,主要通过抑制细胞的增殖及促进细胞凋亡来稳定基因组、抑制突变细胞的产生。p53 基因突变可促进细胞进入持续的分裂状态,抑制细胞凋亡,导致肿瘤的产生。在人类恶性肿瘤中普遍存在 p53 基因的突变,而在 MM 中,只有 20% 的患者发生该基因突变,突变率较其他恶性肿瘤明显偏低<sup>[8]</sup>。但进一步研究发现,其他途径也可导致 p53 基因的表达异常。

通过荧光原位杂交(FISH)分析发现,50%~70% 的恶性间皮瘤及培养的 MM 细胞系中存在纯合子

p16INK4a/p14ARF 的缺失,影响两条抑癌通路 p53 和视网膜细胞瘤蛋白 (retinoblastoma protein, pRb) 的失活导致恶性胸膜间皮瘤的发生,并提示预后不良<sup>[9]</sup>。INK4a/ARF 基因定位于人类染色体 9p21,是重要的细胞周期调控基因,其表达产物 p16INK4a 和 p14ARF 蛋白分别在 pRb 和 p53 通路中发挥重要调节作用。p16INK4a 是细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent protein kinases, CDK) 的抑制剂,通过失活 CDK4/CDK6 抑制蛋白质 pRB 的磷酸化,减少转录因子 E2F 的释放,将细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期。而 p14ARF 是在细胞 DNA 损伤后通过加速泛素蛋白连接酶 (murine double minute 2, MDM2) 的降解,导致抑癌基因 p53 水平升高,抑制细胞异常分裂,并促进细胞凋亡。最近的动物实验发现,鼠 p16INK4a/p19ARF,与人 p14ARF 同源,缺失其中一个基因会对石棉诱导的 MM 易感,若两个基因都缺失,则会加速石棉对肿瘤的诱导作用<sup>[10]</sup>。p16INK4a/p14ARF 基因可以用来预测恶性间皮瘤的发生。

2. PTEN 与间皮瘤:磷酸酶-张力蛋白同源物基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 定位于染色体 10q23,基因全长 200kb,编码 5.5kb 的 mRNA。研究发现,PTEN 基因在人染色体 10q23 频繁缺失,与肿瘤的发生密切相关。约 50%~80% 的单等位基因突变存在于散发性肿瘤,30%~50% 发生在乳腺癌、结肠癌和肺癌,而在子宫内膜癌及成胶质细胞瘤中纯合性缺失更常见,且与较差的预后和转移有关<sup>[11]</sup>。目前有关 PTEN 与恶性间皮瘤的报道较少,且存在一定的争议。

Agarwal 等<sup>[12]</sup>的一项研究收集 86 例 MM 标本,结果显示只有 26.7% 的标本 PTEN 基因表达缺失,而超过 26.7% 的标本显示 PTEN 基因低表达。第 2 项研究用 21 株 MM 细胞株进行筛选,发现只有 2 株细胞株 PTEN 基因表达缺失,而与正常间皮细胞株 MET5a 相比,7 株细胞显示 PTEN 基因低表达。另一方面,Opitz 等<sup>[13]</sup>纳入 341 例 MM 患者进行研究,其中发现 62% 的患者 PTEN 表达缺失,并提示较差的存活率。因此,在恶性间皮瘤中 PTEN 基因表达缺失或低表达,仍需大量研究确认。

PI<sub>3</sub>K/AKT 抑制剂:PTEN 基因还是人类发现的第 1 个具有磷酸化酶功能的抑癌基因。PTEN 通过使 PIP3 脱磷酸化为 PIP2,而成为 PI<sub>3</sub>K/AKT 信号转导通路的主要负调控因子。PTEN 表达的下降,将导致 PIP3 的过表达,进而活化 AKT 和 3'磷酸肌醇依赖

的激酶 1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase, PDK1),PDK1 是一个 63kDa 的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白酶,它是 AKT 的上游活化激酶。PDK1 可在磷酸化 AKT 的 Thr308 位点使 AKT 的活性增加 30 倍以上,促进细胞异常增殖。因此,通过药物抑制 PI<sub>3</sub>K/AKT 信号通路,可抑制肿瘤的生长。然而 1993 年研发的 PI<sub>3</sub>K/AKT 抑制剂 LY294002 报道特异性差,毒性不良反应大。此后,新的 PI<sub>3</sub>K/AKT 抑制剂不断被研发。目前,新药派立福在 III 期临床试验中被用于治疗多发性骨髓瘤和结肠癌<sup>[14]</sup>。临床上也尝试用 PI<sub>3</sub>K/AKT 抑制剂来治疗恶性间皮瘤,但缺少大规模的临床试验。

在核内,PTEN 能调节 Rad51 的表达,减少自发性 DNA 双链断裂,从而维持染色体的完整性<sup>[15]</sup>。PTEN 还能与 p53 结合成复合体,在 DNA 损伤时,保持 p53 的高乙酰化状态,调节 p53 的稳定性及活性。而研究发现,这种机制与上述所讲的磷酸化过程完全独立<sup>[16]</sup>。此外,AKT 通过在 Ser166 和 Ser186 位点磷酸化 MDM2,使其进入细胞核内,从而导致 p53 的恒定失活。因此,利用 PTEN 基因负向调控 PI<sub>3</sub>K/AKT 信号转导通路,能够提高 p53 的表达及其转录活性,提高肿瘤细胞对化疗的敏感度<sup>[17]</sup>。尽管我们已知晓 PTEN 在多种癌症中起关键作用,但是 PTEN 在 MM 中的作用还需进一步探索。

3. NF2 基因与间皮瘤:NF2 基因是一种肿瘤抑制基因,编码一个含有 FERM 区域的蛋白 merlin,该蛋白与细胞的活动与增殖密切相关。NF2 基因定位于 22q12.2,由 17 个外显子组成。而细胞遗传学资料表明,间皮瘤细胞系中第 22 号染色体的数目和结构改变十分频繁。相关研究证实,40%~50% 的间皮瘤患者发生了 NF2 的突变。由于 NF2 基因突变,导致其编码的蛋白质变性,从而丧失了肿瘤抑制作用<sup>[9]</sup>。

NF2 编码的蛋白 merlin 与 4.1 超蛋白家族中保守的埃兹蛋白 (ezrin)、根蛋白 (moesin)、膜突蛋白 (moesin) ERM 家族具有高度同源性,ERM 蛋白含有一个保守的氨基末端,称 FERM 区,连接着一个  $\alpha$  螺旋臂以及一个带电荷的羧基末端区域。ERM 蛋白的 FERM 区域与羧基尾端相互作用导致蛋白质形成一种闭合式的构象,几个蛋白结合部位被隐藏,导致 ERM 处于休眠状态。但不同的是 merlin 的羧基端缺少 1 个保守的 F-肌动蛋白的结合位点,当 merlin 分子内 N 端和羧基端缔合时,虽处于闭合状态,但仍具有活性。若 merlin 的羧基端被磷酸化,抑制分子内结