

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0217-03

APRIL 对肿瘤细胞增殖作用的研究进展

陆烈综述; 蔡洪培 审阅(第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003)

[摘要] 增殖诱导配体 APRIL 是近年来发现的肿瘤坏死因子家族新成员。通过对 APRIL 的分子结构、转录加工及组织表达的研究,发现 APRIL 与 B 细胞刺激因子 BAFF 氨基酸序列与空间结构均十分相似,初步了解 APRIL 受体 BCMA 和 TACI 及信号转导通路 NF- κ B 途径,并发现了它在消化系统、血液系统、神经系统多种肿瘤细胞增殖发挥着重要作用,阻断 APRIL 与其受体结合可明显抑制肿瘤细胞的增殖从而为肿瘤治疗提供新途径。

[关键词] 增殖诱导配体; 肿瘤; 细胞增殖

[中图分类号] R730.3 [文献标识码] A

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是在 1975 年发现的一种能使肿瘤细胞凋亡、坏死的细胞因子。随着 30 年来对 TNF 及其受体超家族的研究,人们发现它们在细胞的增殖、分化、凋亡,机体的防御、炎症反应、免疫调节等多种生

物学效应中发挥着重要作用。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号 3037644)

增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)是由 Hahne 等^[1]于 1998 年发现 TNF 家族新成员。近年来 APRIL 的分子结构、组织表达、转录过程及受体系统的研究已较深入,越来越多实验表明 APRIL 对肿瘤细胞的增殖起着重要作用。

γ -干扰素具有免疫调节作用,与某些化疗药物联合应用能够增强化疗药物的抗肿瘤作用。Vickers 等^[3]报道, γ -干扰素能够增强 TAM 诱导胆管癌细胞凋亡的作用。本研究表明, γ -干扰素能加强 TAM 的抗癌细胞作用,两者同时应用能够进一步阻滞细胞周期,增强 TAM 诱导 ER(-)乳腺癌细胞凋亡的作用,单用 TAM 浓度在 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时才有明显的细胞周期阻滞作用,但 γ -干扰素预处理 24 h 后,TAM 阻滞细胞周期与诱导细胞凋亡所需浓度降低,TAM 在 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时即产生细胞周期阻滞作用,2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时明显诱导细胞凋亡。

流式细胞仪检测药物处理前后相关凋亡蛋白的表达变化发现,诱导细胞凋亡浓度的 TAM 使 Bcl-2 表达下调,浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 作用 36 h 后,Bcl-2 荧光强度由处理前 13.91 下降到 7.13。 γ -干扰素使 Caspase-8 上调,Caspase-8 荧光强度由药物作用前 27.26 上升到 46.42($P < 0.05$,图、表未列出)。Zhang 等^[4]研究表明,TAM 诱导 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡与 bcl-2 下调有关,而与 Bax, Bcl-X(L)和 p53 无关。在线粒体凋亡途径中,Bax/Bcl-2 比率变化影响细胞凋亡,比例增大促进细胞凋亡。本试验中,尽管 Bax 表达无明显变化,仅仅 Bcl-2 蛋白的变化就足以改变 Bax/Bcl-2 比率,从而引起细胞凋亡。Caspase-8 是死亡受体/配体凋亡途径

中的第一个 Caspase,在 Caspase 级联激活过程中具有重要意义, γ -干扰素处理后,细胞 Caspase-8 表达水平上调,对 TAM 诱导的凋亡敏感。由于 γ -干扰素与 TAM 在死亡受体/配体凋亡途径与线粒体凋亡途径中各起不同的作用, γ -干扰素可增强 TAM 的抗乳腺癌细胞作用,因此,两者可以联合应用,以降低诱导细胞凋亡所需 TAM 的浓度。本研究为临床上联合应用 TAM 与 γ -干扰素治疗 ER(-)乳腺癌提供了理论依据,但本试验结果是通过体外细胞培养所得到的,体内结果如何还需进一步研究。

[关键词] 乳腺肿瘤; γ -干扰素; 他莫昔芬

[中图分类号] R392.1 [文献标识码] A

[参考文献]

- [1] Robinson E K, Grau A M, Evans D B, et al. Cell cycle regulation of human pancreatic cancer by tamoxifen[J]. Ann Surg Oncol, 1998, 5(4): 342-349.
- [2] Salami S, Karami-Tehrani F. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines[J]. Clin Biochem, 2003, 36(4): 247-253.
- [3] Vickers SM, Jhala NC, Ahn EY, et al. Tamoxifen (TMX)/Fas induced growth inhibition of human cholangiocarcinoma (HCC) by gamma interferon (IFN-gamma)[J]. Ann Surg, 2002, 235(6): 872-878.
- [4] Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, et al. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-XL, without alteration of p53 protein levels[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5(10): 2971-2977.

[收稿日期] 2005-03-21

[修回日期] 2005-06-29

[本文编辑] 王莹

1 APRIL 的分子结构、转录加工及组织表达

1.1 分子结构

Hahne 等^[1]于 1998 最先报道了 APRIL 是由 250 个氨基酸组成的 II 型跨膜蛋白, C 端位于胞外, 第 29 ~ 49 氨基酸为疏水跨膜区, 第 50 ~ 250 氨基酸为胞外区, N 端位于胞内, 无信号肽序列。TNF 同源结构域(TNF homology domain, THD) 是 TNF 家族特有的 C 端保守序列, 对构成同源三聚体起着重要作用。在众多的 TNF 家族成员的 THD 中, APRIL 与 B 细胞刺激因子(B cell activating factor from TNF family, BAFF) 及 TNF 相关弱凋亡诱导因子(TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) 具有较高的同源性, 分别为 33% 和 15%^[2]。令人感到有趣的是, Roschke V 等^[3]发现了 APRIL/ BAFF 的异源三聚体, Kolfshoten G 等^[4]更是发现了 APRIL 与 TWEAK 的融合蛋白 TWEPRIL, 该蛋白具有 TWEAK 的胞内区和跨膜疏水区, 同时保留了 APRIL 的受体结合部分, 体现出比 APRIL 更强的受体结合能力。

Wallweber 等^[5]对鼠 APRIL 的晶体结构做了测定, 发现 APRIL 是由 3 个空间结构紧密的 β 原体所构成。每个原体均由 2 个包含 A'AHCF 和 B'BGDE 的 β 折叠组成。A'AHCF 形成三聚体疏水区, 而 B'BGDE 形成了亲水区, 并且 Wallweber 等^[5]证实了人与鼠 APRIL 具有 85% 的同源性, 主要的区别在于疏水区和受体结合区的残基。与 Michael K 等^[6]报道的 BAFF 的晶体结构相比, 无论是氨基酸序列还是空间结构两者均十分相似, 这也为 APRIL 能够刺激细胞增殖提供了有力证明。

1.2 转录加工

人 APRIL 的基因定位于 17p13.1, mRNA 长约 2.1 kb^[2]。与 TNF 家族其他成员相同, APRIL 具有膜结合型与可溶型。关于 APRIL 的基因转录的激活尚无文献报道。Lopez M 等^[7]报道 APRIL 首先在高尔基体中加工修饰, 通过 furin 蛋白酶裂解 105 ~ 250 氨基酸区域(富含精氨酸的 R-K-R-R 序列), 随后部分从胞外脱落形成可溶型, 而 Roschke V 等^[3]研究表明膜结合型由在胞内已被加工后的 APRIL 形成。

1.3 组织表达

APRIL 主要表达于免疫细胞, 包括单核巨噬细胞, 树突状细胞及 T 淋巴细胞, 同时在结肠、脾、胰腺等多个组织中也有表达^[1,8]。Pradet B 等^[8]的研究表明 APRIL 在活化的 T 细胞中表达高于静止的 T 细胞, 同时在多种肿瘤细胞(如结直肠癌细胞 SW480、Hela 细胞) 中亦具有较高的表达活性。

2 APRIL 受体及信号转导

目前可以肯定的 APRIL 受体是 BCMA(B cell maturation antigen)^[9]和 TACI(transmembrane activator and CAML interactor)^[10]。BCMA 全长 185 个氨基酸, 胞外区具有 50 个氨基酸, 包括 1 个富含半胱氨酸结构域(cysteine-rich domains, CRD), 主要分布在活化的 B 淋巴细胞。TACI 全长 293 个氨

基酸, 胞外含有 2 个 CRD, 主要分布于 B 淋巴细胞和活化的 T 淋巴细胞。令人奇怪的是 Rennert 等^[2]发现 APRIL 对于不表达 BCMA 和 TACI 但 FACS 阳性的未活化 T 细胞、成纤维细胞及多种肿瘤细胞也具有刺激增殖作用, 是否具有其他的 APRIL 受体尚在研究中。

关于 APRIL 信号转导途径目前尚无定论。目前较广泛接受的学说为 NF- κ B 途径^[11], 该学说认为 APRIL 与受体结合后通过与 TNF 受体相关因子(TRAF) 的结合, 活化后的 TRAF 使 I κ B 的磷酸化后与 P65、P50 蛋白解聚, 最后导致靶基因转录, NF- κ B 途径激活从而完成使细胞增殖的最终目的。

3 APRIL 对肿瘤细胞增殖刺激作用

目前已有许多实验证明了 APRIL 具有重要的增殖刺激作用, 包括肿瘤细胞的增殖, 多种自身免疫疾病中淋巴细胞增殖, 以及对于炎症细胞的增殖。以下主要阐述 APRIL 在肿瘤细胞增殖过程中所起作用。

3.1 消化系统肿瘤

Hahne 等^[1]首先运用 North blot 分析法证明了 APRIL 的 2.1 kb mRNA 在结肠癌、胰腺癌、胃癌等消化道肿瘤中高表达。将这些 mRNA 的 cDNA 与 EST 数据库比较后, 发现结肠癌与胰腺癌的 cDNA 与 EST 数据库相一致, 这进一步说明了 APRIL 在消化道肿瘤中是高表达的。Hahne 等进一步研究了 APRIL 对于肿瘤细胞增殖刺激作用。将由 APRIL 的胞外第 110 ~ 250 氨基酸构成的并由 FLAG 标记的可溶性多肽(sAPRIL) 放入培养基, 配置成不同比例, 并且用上述培养基培养肿瘤细胞, 结果发现经 sAPRIL 处理的肿瘤细胞增殖明显, 并且增殖程度与剂量成正比。

3.2 慢性 B 淋巴细胞白血病

B 淋巴细胞表面具有大量的 BCMA 与 TACI 存在。Novak A 等^[12]首先认为 BAFF 在慢性 B 淋巴细胞白血病(B cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL) 中可以使肿瘤细胞避免死亡, 促进生长。Kern C 等^[13]在随后的研究中发现 APRIL 与 BAFF 在 B-CLL 中具有强大的促增殖作用和坏死逃避功能, 并且 APRIL 的作用并不亚于 BAFF。

3.3 多发性骨髓瘤

Novak A 等^[14]研究了 APRIL 在多发性骨髓瘤中的作用。他们首先使用 BCMA 抗体和 TACI 抗体证明了多发性骨髓瘤细胞表面存在比正常浆细胞高 10 倍以上的 BCMA 和 TACI。而他们的试验证明 BAFF 并不能直接刺激肿瘤细胞生长, 而是通过增强细胞与 IL-6、IGF-1 的反应性来使肿瘤细胞逃避坏死和刺激增殖。而 Moreaux J 等^[15]证实作为与 BAFF 极为相似的 APRIL 对多发性骨髓瘤细胞具有刺激增殖作用, 并且在 IL-6 缺乏的条件下可以使细胞逃避死亡。

3.4 神经胶质瘤

Hahne 等^[1]在研究 APRIL 的表达的实验中发现了 APRIL 在体外的神经胶质瘤永生株高表达。而 Roth W 等^[16]最新研究表明 APRIL 在体内的神经胶质瘤细胞中亦表达。

Roth W 等对 12 名恶性神经胶质瘤患者的肿瘤细胞进行分析,发现 5 例高表达 APRIL。深入的研究发现,APRIL 的异常表达并不能使肿瘤细胞逃避长春新碱等细胞毒药物的杀伤作用,从而否定了 APRIL 通过调控 CD95L、TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)、Apo2L (Apo2 ligand)等细胞因子使肿瘤细胞增殖和抗坏死。与此相对,异常表达 APRIL 的同时,肿瘤细胞内的 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)表达明显上调。这些都揭示 APRIL 在调节由细胞坏死因子及受体介导的细胞坏死过程中起着重要作用。

4 治疗肿瘤的基础研究

Rennert P 等^[2]基于 APRIL 对肿瘤细胞刺激增殖作用,研究了可溶性 BCMA 抗体对于肿瘤细胞生长的影响。通过给予可溶性 BCMA 抗体组、给予 hIgG 组与未作任何处理的对照组比较,可溶性 BCMA 抗体组肿瘤细胞增殖显著减少。田瑞阳等^[17]构建了稳定表达 BCMA、TACI 与 IgG1 融合蛋白的非洲绿猴 COS-7 细胞和中国仓鼠卵巢细胞 CHO 细胞,并且上述细胞表达的融合蛋白 BCMA-Fc、TACI-Fc 可特异结合 BAFF、APRIL 而不与其他 TNF 家族成员作用从而显著抑制细胞增殖。以上的研究都表明阻断 APRIL 与受体结合是抑制肿瘤生长的有效途径。而由于 APRIL 的细胞内作用途径及 APRIL 基因转录启动途径尚未明了,针对这两个环节的研究尚未展开。

5 问题与展望

APRIL 是近几年来所发现的 TNF 家族新成员,作为一个重要的肿瘤增殖刺激因子已被许多实验所证实。虽然阻断 APRIL 与受体结合已被证明可有效减慢肿瘤生长,但 APRIL 是否具有特异受体 APRIL-R 目前不得而知,APRIL 信号转导通路目前未完全阐明,这些都给 APRIL 成为治疗肿瘤的靶分子带来一些难度。但无论怎样,随着对 APRIL 认识的不断加深,针对 APRIL、APRIL 作用通路中关键分子及其受体的药物将成为治疗肿瘤的有力武器。

[参考文献]

- [1] Hahne M, Kataoka T, Schroter M, *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates cell growth [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(6): 1185-1190.
- [2] Rennert P, Schneider P, Cachero T, *et al.* A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(11): 1677-1684.
- [3] Roschke V, Sosnovtseva S, Ward C, *et al.* BlyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with

systemic immune-based rheumatic disease [J]. *Immunol*, 2002, 168(8): 4314-4321.

- [4] Kofschoten G, Balade B, Hahne M, *et al.* TWE-PRIL: A fusion protein of TWEAK and APRIL [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 16(8): 1427-1432.
- [5] Wallweber J, Compau M, Strovastnik A, *et al.* The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL [J]. *Mol Biol*, 2004, 343(2): 283-290.
- [6] Michael K, Teresa G, Fang Q, *et al.* Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes [J]. *Mol Biol*, 2002, 315(5): 1145-1154.
- [7] Lopez M, Fernandez R, Albar J, *et al.* Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase [J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(10): 945-951.
- [8] Pradet B, Medema J, Lopez M, *et al.* An endogenous hybrid mR-NA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein [J]. *EMBO J*, 2002, 21(21): 5711-5720.
- [9] Laabi Y, Gras MP, Carbonnel F, *et al.* A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by t(4; 16) (q26; p13) translocation in a malignant T cell lymphoma [J]. *EMBO J*, 1992, 11(11): 3897-3904.
- [10] Von Bulow GU, Bram J. NF-AT activation inducing by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily [J]. *Science*, 1997, 278(5335): 138-141.
- [11] Mackay F, Ambrose C. The TNF family members BAFF and APRIL: The growing complexity [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(3): 311-324.
- [12] Novak J, Bram J, Kay E, *et al.* Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: A mechanism for survival [J]. *Blood*, 2002, 100(8): 2973-2979.
- [13] Kern C, Comuel F, Billard C, *et al.* Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway [J]. *Blood*, 2004, 103(2): 679-688.
- [14] Novak A, Darce J, Arendt B, *et al.* Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: A mechanism for growth and survival [J]. *Blood*, 2003, 103(2): 689-694.
- [15] Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, *et al.* BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis inducing by interleukin 6 deprivation and dexamethasone [J]. *Blood*, 2004, 103(8): 3148-3157.
- [16] Roth W, Wagenknecht B, Klumpp A, *et al.* APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(4): 403-410.
- [17] 田瑞阳, 黄玉辉, 陈悦, 等. BlyS 受体 TACI、BCMA 与人 IgG1 融合蛋白在哺乳动物细胞中的表达与鉴定 [J]. *动物学报*, 2004, 50(3): 401-407.

[收稿日期] 2005 - 02 - 22

[修回日期] 2005 - 05 - 08

[本文编辑] 王莹