

## 6 研究亮点

### 6.1 NOTCH1受体——肿瘤治疗的新靶点

由于血管内皮生长因子抑制剂（vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition）对几种肿瘤治疗无效，所以人们开始寻找其它替代性治疗靶标。目前，人们将目光投向了肿瘤血管生成过程。最近一项研究证实，NOTCH1受体就是这样一个靶点。



我们先来了解何为NOTCH。NOTCH是一类跨膜受体蛋白，它广泛存在于所有已知的动物细胞中。Notch介导细胞间的局部信号传递及相应的信号级联反应。NOTCH信号对多种组织、细胞的命运起重要作用，包括表皮、神经、血液、肌肉等组织。其信号异常也易导致个体严重的发育缺陷及病理情况。

NOTCH1全称则为Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)。它是人类基因编码的单个跨膜受体蛋白。

Kitajewski等人发现了一种可溶性NOTCH1受体，并将其命名为“NOTCH1 decoy”。该受体可以通过与其配体Jagged 1、DLL1以及DLL4形成一个平底锅样的配体（pan-ligand），从而有效抑制NOTCH1的活性，而且该可溶性受体对于研究肿瘤血管生成过程中的NOTCH1分子信号通路具有非常重要的实用价值。

研究人员首先检测血管发生过程中NOTCH1的作用。同时，他们往小鼠背侧皮下移植能产生VEGF<sub>121</sub>分子的肿瘤细胞，随后检测NOTCH1分子在这种小鼠中的作用。结果发现，小鼠肿瘤细胞周围平滑肌层内的血管生成过程明显被NOTCH1 decoy抑制，这表明皮肤的血管生成需要激活NOTCH1受体。

此外，研究人员还发现小鼠类乳腺肿瘤细胞能产生成纤维细胞生长因子4（FGF4），说明Jagged 1的表达量有所增加。鉴于此，研究人员预测由这些细胞所诱发的肿瘤也需要NOTCH1分子参与肿瘤血管的生成。实际上，如果在这些细胞中表达了NOTCH1 decoy分子，那么就能明显缩小小鼠皮下植入的肿瘤的体积。而且，免疫染色和实时PCR也证实了这些共表达NOTCH1 decoy分子的肿瘤细胞中，NOTCH1信号通路和肿瘤的血管生成、生长过程都受到了抑制。

接下来，研究人员使用人类NGP成神经瘤细胞（NGP neuroblastoma cell）做了进一步研究，因为该肿瘤细胞作为一种异种移植物能诱导并形成成熟的脉管系统。结果发现，在该肿瘤细胞中共表达NOTCH1 decoy也能明显抑制肿瘤细胞的活力及其血管的生成过程。同时他们还发现，NOTCH1 decoy能促进该肿瘤细胞凋亡和肿瘤组织内出血。此外，NOTCH1 decoy还能破坏肿瘤新生血管内皮的连续性。该现象表明，两个相邻血管内皮细胞间的NOTCH1信号通路对于肿瘤新生血管内皮的稳定性起着非常关键的作用。

更为重要的是，虽然VEGF抑制剂对NGP成神经瘤细胞肿瘤不起作用，但它对NOTCH1受体抑制剂却非常敏感，这表明在肿瘤治疗的领域又发现了一个抑制肿瘤血管生成的新方法。

### 参考文献

1. Funahashi, Y. et al. A Notch1 ectodomain construct inhibits endothelial Notch signaling, tumour growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 68, 4727–4735 (2008)
2. <http://cmbi.bjmu.edu.cn/news/report/2004/Notch.htm>
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/NOTCH1>

## 6.2 病毒感染有助于细胞存活

卡波氏肉瘤 (Kaposi sarcoma) 是一种源于血管内皮细胞的脉管系统肿瘤, 现在发现该病与卡波氏肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV) 有关。

研究发现, KSHV基因能够上调磷脂酰肌醇-3激酶-蛋白质丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白的信号通路 (phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt-mammalian target of rapamycin(mTOR), PI3K-Akt-mTOR)。

Ling Wang与Blossom Damania等人对在KSHV感染的情况下, 该信号通路在内皮细胞存活和肿瘤血管生成过程中的作用进行了相关研究。

研究人员采用KSHV侵染人脐静脉内皮细胞, 由此而获得的细胞系称为HUVEC细胞系。通过实验, 他们发现KSHV侵染发生后激活PI3K-Akt-mTOR信号通路, 同时还会抑制一种名为AMPK的mTOR抑制因子。由于这条信号通路与细胞的存活相关, 所以研究人员深入研究了KSHV在HUVEC细胞的凋亡过程中所起的作用。结果显示, 被KSHV侵染的细胞能抵抗由饥饿、依托泊苷 (etoposide, 一种抗肿瘤药物) 和十字孢碱 (staurosporine, 一种蛋白酶C抑制剂) 等诱导产生的凋亡作用, 这表明KSHV侵染有助于细胞存活。

为阐明KSHV在肿瘤血管生成过程中如何发挥作用, 研究人员采用HUVEC细胞系进行体外试验, 以查看该细胞系在体外条件下能否形成血管样结构。结果显示, 在血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 不存在的情况下, HUVEC细胞的存活率和生成血管的能力仍然有所提高。该研究成果同样有力支持了以下学说: 在被KSHV侵染的血管内皮细胞中, KSHV蛋白仍能持续促进内皮细胞合成并分泌VEGF因子, 因而能抵消因缺乏外源性VEGF因子而对细胞造成的不利影响。当HUVEC细胞与被KSHV侵染的B细胞淋巴瘤细胞共存时, 前者形成血管样结构的能力得到了提高。这进一步表明, 被KSHV侵染的肿瘤细胞能合成、分泌血管生成因子前体物质。

那么, KSHV对PI3K-Akt-mTOR信号通路的激活作用在内皮细胞形成血管的过程中真的发挥了重要作用吗? mTOR的化学抑制剂或mTOR抑制剂AMPK的活化既能彻底瓦解HUVEC细胞形成的血管样结构, 也能减少HUVEC细胞形成血管样结构的数目。虽然相比之下, PI3K抑制剂对HUVEC细胞形成血管样结构的过程的抑制作用不是很明显, 但它却能杀死大部分的HUVEC细胞。该研究结果表明, PI3K对HUVEC细胞的存活更加重要。

综上所述, KSHV侵染可以通过激活PI3K-Akt-mTOR信号通路, 帮助内皮细胞存活和形成血管样结构。此外, 上述结果还提示我们, PI3K抑制剂可能会成为临床上治疗卡波氏肉瘤的一种新方法。



图片来源: BANANASTOCK

## 参考文献

1. Wang, L. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus confers a survival advantage to endothelial cells. *Cancer Res.* 68, 4640-4648 (2008)

## 6.3 TGF $\beta$ 与PGE $_2$ 相互作用初探

最近20年，人们开始对血管生成过程有了进一步的了解。20年的研究获得了大量分子层面的数据。在这些资料的帮助下，研究人员得以在临床治疗方面取得更多进展。不过，对于血管生成过程中每一条信号通路之间的相互作用机制还有待深入阐明。



Redondo等人做了相关研究工作。他们重点研究肿瘤血管生成过程中转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ )和前列腺素E $_2$  (PGE $_2$ )之间的关系。

研究人员发现，使用PGE $_2$ 处理人血管内皮细胞 (EC) 能提高细胞内磷酸化水平、提高核定位能力以及促进DNA与SMAD3复合体结合，这和TGF $\beta$ 与其I型受体ALK5结合后对细胞产生的影响一样。为了进一步研究它们之间的关系，研究人员使用TGF $\beta$  1的抗体孵育EC细胞，结果发现经过孵育的EC细胞，尽管接着采用PGE $_2$ 处理，也完全不会表现出促进DNA与SMAD3复合体结合的作用。

此外，在体外膜基质血管生成实验中，研究人员发现使用PGE $_2$ 处理血管内皮细胞后会增加其生成血管样结构的数量，但这种作用会被ALK5抑

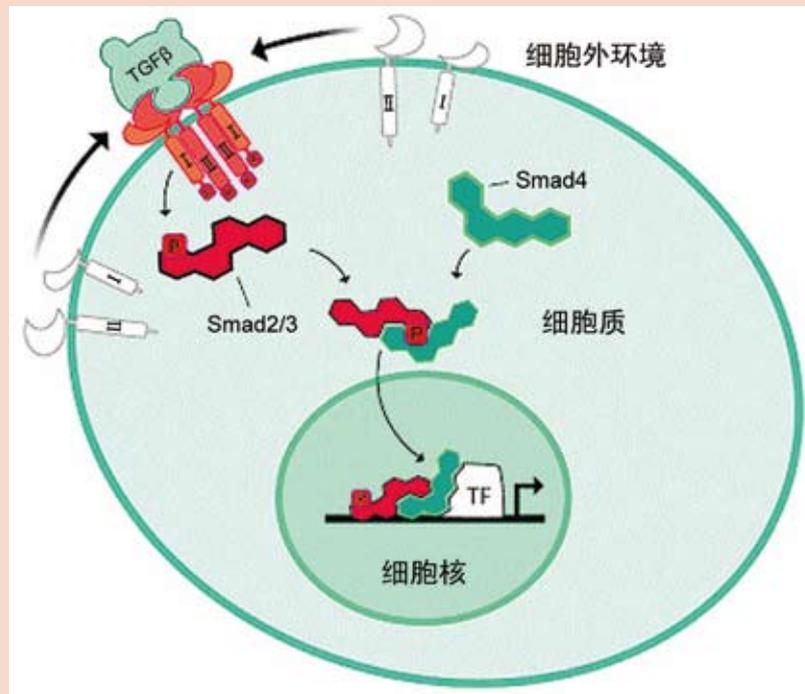
制剂阻断。同样，在小鼠角膜活体血管生成试验中发现，ALK5对于PGE $_2$ 介导的血管生成作用是必需的，但对于VEGF介导的血管生成作用则并非必需。将这些试验结果归纳在一起，可以发现ALK5是PGE $_2$ 介导的血管生成过程中一个非常重要的媒介分子。

那么PGE $_2$ 与TGF $\beta$ 之间如何相互作用呢？以前研究已表明，有部分金属蛋白酶 (MMP) 在TGF $\beta$ 因子的转移和激活过程中发挥作用。如果使用GM6001这种金属蛋白酶抑制剂就能减少SMAD3转移到核内。因此，研究人员推测这是由于MT1-MMP被抑制所导致的结果，而MT1-MMP又在TGF $\beta$ 的活化过程中发挥作用。所以，抗MT1-MMP的抗体能阻断PGE $_2$ 介导的SMAD3活化过程。同时免疫荧光试验也发现，PGE $_2$ 能局部增加胞内MT1-MMP的聚集，但不能增加胞内整体的MT1-MMP浓度。MT1-MMP的聚集与酶活性增高和蛋白复合体形成有关，研究人员也推测像整合素一类的蛋白质会增强TGF $\beta$ 因子在EC细胞中的活化过程。

该研究发现了PGE $_2$ 和TGF $\beta$ 这两个与肿瘤生长和肿瘤血管生成有关的媒介分子之间的互相作用关系。更重要的是，这条新的作用途径将有可能会成为抗肿瘤血管生成治疗的重要靶点。

## 参考文献

1. Alfranca, A. et al. PGE $_2$  induces angiogenesis via MT1-MMP mediated activation of the TGF $\beta$  /ALK5 signalling pathway. Blood 9 Jun 2008 (doi 10.1182/blood-2007-09-112268)

TGF  $\beta$  信号从膜到核转运的分子机理

图片说明：TGF  $\beta$ -Smad通路。

首先，I型和II型受体与TGF  $\beta$ 结合进而激活Smad2/3。然后，被激活的Smad2/3与Smad4结合，并在细胞核内不断积累。最后，Smad复合体与其它转录因子（TF）结合，两者共同调控基因转录。

图片来源：R. Bergström

自从1981年Robert发现TGF  $\beta$ ，人们一直致力探究其信号传导通路机制。直到近年发现了细胞内信号转导蛋白Smad家族，才较为深入地阐明了TGF  $\beta$ 信号从膜到核转运的分子机理。TGF  $\beta$ 家族成员通过与两种类型的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体异源复合物结合，启动了细胞反应。胞内信号蛋白Smad被受体激酶活化，形成异源蛋白复合物转移至核内，与特定的DNA序列结合，指导转录，从而实现TGF  $\beta$ 对基因表达的调控。

目前，人们已经在脊椎动物中至少克隆出9种Smad基因。Smad蛋白的分子量大约42kD~60kD，其N端和C端各有一段高度保守的区域，分别称为MH1区和MH2区（mad-homology domain），中间由一段富含pro的L区连接。在非活性状态下，Smad的MH1区和MH2区相互作用，形成自我抑制。被受体激活后，分子打开，Smad形成异源复合物，转移至核内。

TGF  $\beta$ 超家族成员先与细胞膜上的TGF  $\beta$  II型受体结合，然后吸收I型受体，在细胞膜上形成一个异源复合物。I型受体被II型受体激酶磷酸化并被激活，活化的I型受体与R-Smad暂时结合。磷酸化R-Smad C端SS（V/M）S区的ser残基。Smad1、5、8被BMP受体磷酸化，介导BMP信号，而Smad2、3被activin和TGF  $\beta$ 受体活化，介导这些因子的效应。

受体对R-Smad的磷酸化使活化的Smad构象发生变化后从受体上解离下来，并与Smad4结合。结合后，异源寡聚物转移到核内，激活特定基因的转录。进入核以后，磷酸化的Smad异源复合物与效应物配体的启动子序列之间相互作用、调节转录。近年，人们还发现Smad蛋白不仅受TGF  $\beta$ 信号的调节，还受很多其它信号通路的调控。