

· 综述 ·

靶向 EBV-LMP1 脱氧核酶在
鼻咽癌中的研究进展

覃岳香¹综述,徐志杰²,王行炜¹审校

(1. 中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科,耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室,湖南长沙 410008; 2. 中南大学肿瘤研究所,湖南长沙 410078)

关键词:鼻咽癌;潜伏膜蛋白 1;脱氧核酶;放疗敏感性
中图分类号:R739.63 文献标识码:C 文章编号:1007-1520(2012)05-0413-04

鼻咽癌(NPC)是发生于鼻咽黏膜上皮细胞的恶性肿瘤,病因学研究显示,EBV 感染、环境因素、遗传易感性等与 NPC 发病密切相关。研究证实 EBV 编码的潜伏膜蛋白 1(latent membrane protein 1, LMP1)、EBV 核抗原 1(Epstein-Barr viral nuclear antigen 1, EBNA1)和 EBV 功能性巨噬细胞集落刺激因子受体基因(BARF1)都与 NPC 发生有关,尤其是 LMP1 更有意义,LMP1 通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B, PI3K/Akt)、转录活化因子 1(activator protein 1, AP-1)、两面神激酶/信号转导子与转录活化子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)和转录因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)等多条信号通路参与了 NPC 细胞的增殖、凋亡和转移等过程^[1]。

放射治疗是 NPC 的首选治疗手段,但 5 年生存率一直徘徊在 50%~60%,因此如何提高 NPC 对放疗的敏感性是当前研究的热点之一。目前已经发现了几种基因控制技术:反义寡核苷酸、核酶、脱氧核酶(DNAzyme, Dz)和 RNA 干扰(RNAi)技术等。Scherer 等^[2]通过比较这几种方法,发现 Dz 是一种具有催化功能的单链 DNA 片段,具有高效的催化活性和结构识别能力,切割位点位于 RNA 分子上的未配对嘌呤和配对嘧啶之间。Dz 有望成为 NPC 有效治疗的基因靶向工具,它可通过下调 LMP1 的表达,降低 NPC 细胞的增殖率,同时促进细胞凋亡,

进而提高了 NPC 放疗的敏感性。

1 Dz 的特性

Dz 是指具有生物催化功能的 DNA 分子,经体外人工选择获得,比蛋白酶具有更高的催化活性。Dz 的主要功能是剪切 RNA 或 DNA,连接 DNA 和催化卟啉金属离子化等。其中具有 RNA 剪切活性的有 10~23 Dz、8~17 Dz 与 HD2 等。10~23 Dz 为最常见的 Dz,由一个催化中心(15 bp)和两个与底物结合的臂组成(图 1),其催化循环包括:①Dz 与底物的结合;②底物的剪切;③剪切产物的释放^[3]。

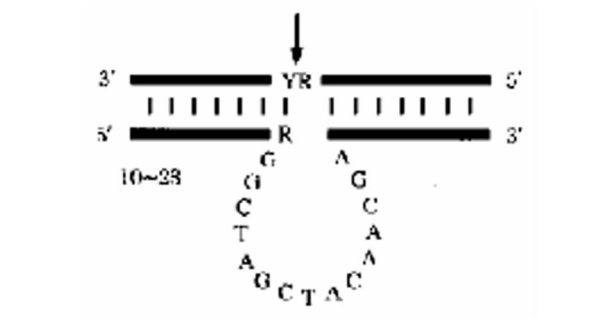


图 1 10~23 Dz 的结构;箭头所指为切割位点,R=A 或 G,Y=U 或 C

Dz 具有分子量小、多样性、低成本、相对稳定性等优点,但目前 Dz 的应用面临着两个主要问题:①如何进一步提高 Dz 的稳定性;②如何高效的转入靶细胞。研究表明,通过硫代磷酸化、3' 翻转、N3'-P5' 磷酸酰胺修饰、

作者简介:覃岳香,女,硕士研究生。
通讯作者:王行炜,Email:wang-xingwei@126.com.

2'-O 甲基化等途径能够提高 Dz 的稳定性,延长 Dz 的半衰期,而不影响 Dz 的催化活性和转入细胞能力^[4]。

2 靶向 LMP1 的 Dz 对 EBV-LMP1 的效应

2.1 LMP1 在 NPC 中的效应

LMP1 是 NPC 发生发展中的重要调控因子。Hatzivassiliou 等^[5]发现 LMP1 通过 NF- κ B、PI3K/Akt、AP-1、JAK/STAT 等多条信号途径激活多种转录因子,参与 NPC 的发生发展。NPC 分组分期、放疗敏感性与 LMP1 高表达有密切关系^[6],SiRNA 的应用已证明抑制 LMP1 的表达,能降低细胞增殖率,抑制肿瘤转移,增强 NPC 化疗敏感性^[7]。

2.2 Dz 对 LMP1 的影响

在 NPC 中靶向 LMP1 的 Dz 能显著抑制 EBV 编码的致癌基因 LMP1 表达^[8]。通过合理设计 DNA 酶底物识别部位的核苷酸序列,就能对任何含有嘧啶、嘌呤的 RNA 分子进行靶向切割,从 mRNA 水平上对基因灭活,从而调控蛋白质的表达^[9]。研究表明,针对 LMP1 C 端 RNA 设计合成的靶向性 Dz,能够对体外转录技术获得的 LMP1 C 端 RNA 进行体外剪切,调控 LMP1 的表达^[10]。Ke 等^[11]研究了靶向 LMP1 的 Dz 对 NPC 生长的抑制效应,发现 Dz 在 mRNA 和蛋白质水平上显著抑制了 LMP1 的表达。

2.3 Dz 调控 LMP1 异常激活的信号转导通路

靶向 LMP1 的 Dz 磷硫酰修饰后,能明显下调 NPC 细胞系中 LMP1 的表达,调控 LMP1 活化的下游信号通路。研究表明,在 NF- κ B 信号转导通路中,Dz 抑制 LMP1 表达,减少了 I κ -B α 的降解,导致 NF- κ B 途径的失活;Dz 能明显抑制 c-Jun 和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)表达,表明下调 LMP1 能够抑制 AP-1 信号通路;Dz 下调 LMP1 表达,虽然对总 STAT 几乎无影响,但能明显降低 STAT3 的磷酸化水平。总之,靶向 LMP1 的 Dz 主要通过上述 3 条信号通路作用于 NPC 细胞^[12]。

3 Dz 参与的信号通路

3.1 PI3K/Akt

在 NPC 的发病机理中,PI3K/Akt 信号转导

途径发挥着重要的作用,这条途径的激活能够调控癌细胞的增殖和凋亡。同时,LMP1 与 EGFR/VEGFR 能够增强 Akt 信号通路,有利于细胞生长和生存。在 90% NPC 患者的鼻咽拭子里都能检测到 LMP1,而剔除 LMP1 能够抑制 Akt 和下游靶点 I κ B、叉头框转录因子(forkhead transcription factor, FOXO1/FKHR)的磷酸化,表明 LMP-Akt 轴在 NPC 中非常重要^[13]。研究表明,靶向 Akt1 的 Dz 能够强烈抑制 NPC 细胞中 Akt1 mRNA 和蛋白质的表达,抑制细胞增殖,并通过下调抗凋亡基因 Bcl-2,同时上调 Bax 的表达来促进细胞凋亡,实现对肿瘤生长的抑制,有望成为 NPC 的抗癌治疗新策略之一^[14]。

3.2 NF- κ B

NF- κ B 是重要的转录调节因子,调节众多基因的表达,参与多种病理生理反应,LMP1 在 NPC 细胞中激活 NF- κ B 呈剂量和时间效应,抑制 NF- κ B 的活化可以抑制 NPC 细胞的恶性表型^[15]。LMP1 可经肿瘤坏死因子受体相关死亡结构域蛋白(tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein, TRADD)结合于 CTAR2 区 384-386 位氨基酸而激活高水平 NF- κ B 表达^[16]。Dz 通过 NF- κ B 信号传递途径的激活,下调 EBV-LMP1 的表达,从而抑制 LMP1 阳性细胞的增殖和生长,并下调 bcl-2 蛋白的表达,释放线粒体中的细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)来促进 LMP1 阳性细胞的凋亡^[17]。抑制因子 κ -B α (inhibitor kappa B alpha, I κ -B α)在终止 NF- κ B 活性过程中发挥很重要的作用,靶向 LMP1 的 Dz 通过下调 LMP1 的表达,减少 I κ -B α 的降解实现对 NF- κ B 信号通路的抑制。

3.3 AP-1

AP-1 是已经被证实的 LMP1 信号传导靶基因,与细胞转化、增殖等紧密相关。其活化主要通过两条信号路径实现:一条是应激信号激酶(stress signaling kinase, SEK)→JNK→c-Jun/AP-1 途径;另一条是大鼠肉瘤蛋白(rat sarcoma, Ras)→迅速加速纤维肉瘤 1(rapidly accelerated fibrosarcoma 1, Raf1)→细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)→AP21 途径^[1]。Eliopoulos 等^[18]证明,LMP1 可以通过 SEK1 活化 JNK,启动 c-Jun 转录,从而活化 AP-1。Kieser 等^[19]发现虽然

LMP1 不激活 ERK2,但可使 ERK1/2 活性增加 3.8~5 倍。靶向 LMP1 的 Dz 通过下调 LMP1 的表达,对 AP-1 信号通路产生抑制作用。

3.4 JAK/STAT

JAK/STAT 是一种较简单的信号转导途径。STATs 主要参与介导细胞因子和生长因子对细胞的信号转导作用,在细胞的增殖、分化、周期调控及凋亡过程中起重要作用。STATs 的过度活化导致细胞的异常增殖和凋亡障碍,促进肿瘤的发生发展,并在肿瘤细胞的侵袭转移及免疫逃避中发挥重要功能^[20]。研究发现,活化的 STAT3 和 STAT5 可上调 bcl-2 家族成员 bcl-xl 及 mcl1 的表达,从而抑制 Fas 介导的凋亡途径^[21]。靶向 LMP1 的 Dz 能显著降低 STAT3 的磷酸化水平,调控 NPC 中 STAT 信号通路。

3.5 Op18/stathmin

Op18/stathmin 是一种小分子磷蛋白,通过整合体内外不同信号影响微管动力学变化,从而影响细胞周期,与细胞生长、增殖、分化等密切相关,对肿瘤细胞恶性表型的维持、转移与侵袭等也都至关重要,是一个有望在肿瘤治疗上取得突破、非常重要的潜在靶标^[22]。研究发现,Dz 下调 LMP1 表达,抑制细胞分裂周期基因 2 (cell division cycle gene 2, cdc 2) 激酶活性,及 cdc-2 与 Op18/stathmin 之间的相互作用^[23]。

3.6 ATM

在 DNA 损伤时,毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 能够将有丝分裂细胞临时地阻滞于 G1/S 或 G2 期,便于 DNA 修复^[24]。ATM 蛋白失活,增强了细胞放疗的敏感性^[25]。研究发现,Dz 能通过 NF- κ B 途径抑制 ATM 表达,并且减弱了 NF- κ B 转录因子与 ATM 启动子间的相互作用,从而提高了 LMP-1 阳性细胞的放疗敏感性^[23]。

4 Dz 对 NPC 的生物学作用

靶向 LMP1 的 Dz 能够抑制 NPC 细胞增殖。DNA 分子是遗传的物质基础,确保其结构和功能的完整性对维持正常生命活动和物种延续至关重要。细胞无论是在自身代谢过程中,还是在受到环境有害因子的攻击下,随时都有可能发生 DNA 损伤。在 DNA 受到损伤时,可通

过几个监测点机制启动细胞周期延迟或阻滞,以便于 DNA 修复,因此细胞周期阻滞是一种有利于机体的保护机制,但是在肿瘤细胞中细胞周期阻滞可能会增强细胞的放射性抵抗^[26]。在细胞有丝分裂中,转录因子 E2F1 对于细胞进入 S 期非常重要^[27],研究表明,LMP1 能上调核结合蛋白 P105-Rb 的磷酸化水平,进而促进 E2F1 表达上调,增强了 E2F1 通过抑制 p16INK4A 表达来激活下游信号分子的能力^[28]。靶向 LMP1 的 Dz 能够明显下调 E2F1 表达和 Rb 蛋白 780 位丝氨酸的磷酸化水平,抑制 Rb/E2F1 信号通路,进而减少了 G1/S 期相关分子的表达水平和活性,并阻断这些分子之间相互作用,导致细胞周期 S 期阻滞。同时,Dz 下调 LMP1 的表达,也能抑制 cdc2 激酶活性,通过 G2 期限制点导致细胞分裂阻滞^[23],进一步导致 NPC 细胞增殖率降低。

同时,靶向 LMP1 的 Dz 能够促进 NPC 细胞凋亡。研究表明,在 Dz T 的 3' 末端添加倒位连接 T 碱基的 Dz Ti 能够切割 NPC 细胞中人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) mRNA 来下调 NPC 细胞的端粒酶活性,并能抑制 NPC 细胞的生长和凋亡拮抗蛋白 bcl-2 的表达,增强凋亡促进蛋白 bax 的表达,bcl-2/bax 的比值下调对于细胞凋亡具有关键性的作用,有利于 NPC 细胞的凋亡^[29]。

NPC 细胞转移和侵袭力与癌细胞代谢能力相关,靶向 LMP1 的 Dz 能够明显的抑制 NPC 细胞发生转移。研究表明,Dz 通过 JAK3 和 ERK1/2 抑制 STAT3 的活性,进而抑制了 NPC 的迁移力和侵袭力^[23]。

5 展望

NPC 是我国最常见的头颈部恶性肿瘤,目前仍采用以放疗为主的综合治疗方式,但对于晚期及复发性肿瘤,其复发和转移率控制仍不理想。随着分子生物学的发展,疾病相关基因和基因药物的开发已成为研究热点。Dz 作为一类新型生物技术来源药物,能够减少鼻咽癌细胞增殖,促进细胞凋亡,提高 NPC 的放疗敏感性,有可能成为 NPC 诊疗新的策略。

参考文献:

[1] 王承兴,曹亚. EB 病毒膜潜伏蛋白-1 介导的信号传导

- [J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(6): 528 - 530.
- [2] Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(12): 1457 - 1465.
- [3] 方平. 化学修饰在反义寡核苷酸和核酸催化剂的应用[J]. 医学分子生物学杂志, 2004, 1(3): 161 - 164.
- [4] Dass CR, Saraavolac EG, Sun LQ, et al. Cellular uptake, distribution and stability of 10 ~ 23 deoxyribozymes[J]. Anti-sense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12(5): 289 - 299.
- [5] Hatzivassiliou E, Mosialos G. Cellular signaling pathways engaged by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1[J]. Front Biosci, 2002, 7: 319 - 329.
- [6] 姜武忠, 赵素萍, 廖遇平, 等. 鼻咽癌组织中 LMP1 和 VEGF 蛋白表达及临床意义[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2007, 3(3): 173 - 177.
- [7] Li G, Li XP, Peng Y, et al. Effect of inhibition of EBV-encoded latent membrane protein-1 by small interfering RNA on EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cell growth[J]. J First Mil Med Univ, 2004, 24(3): 241 - 246.
- [8] 柯霞, 杨玉成, 洪苏玲. 脱氧核酶抑制鼻咽癌细胞 EBV-LMP1 的表达[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(12): 1245 - 1251.
- [9] 刘其友, 张云波, 赵朝成, 等. 脱氧核酶的应用研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 8(1): 12 - 15.
- [10] 杨玉成, 王伟琴, 钱迪, 王伟琴, 等. EBV-LMP1 C 端 RNA 的体外转录合成及其靶向脱氧核酶的初步筛选[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(24): 2426 - 2429.
- [11] Ke X, Yang YC, Hong SL. EBV-LMP1-targeted DNAzyme restrains nasopharyngeal carcinoma growth in a mouse C666-1 xenograft model[J]. Med Ocol, 2011, 28(1): 326 - 332.
- [12] Lu ZX, Ma XQ, Yang LF, et al. DNAzymes targeted to EBV-encoded latent membrane protein-1 induce apoptosis and enhance radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Letters, 2008, 265(2): 226 - 238.
- [13] Lee MH, Yeung SC. Intercepting Akt with DNAzyme: A nasopharyngeal carcinoma story[J]. Cancer Biology & Therapy, 2009, 8(4): 372 - 374.
- [14] Yang L, Xiao L, Ma X, et al. Effect of DNAzymes targeting Akt1 on cell proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Biology Ther, 2009, 8(4): 366 - 371.
- [15] 潘雷, 顾焕华, 梁荣, 等. 鼻咽癌中 EBV LMP1 激活 NF- κ B 的实验研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 1999, 5(2): 95 - 99.
- [16] Izumi KM, Kieff E. The Epstein-Barr Virus LMP-1 engages the TRADD to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF- κ B[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23): 12592 - 12597.
- [17] Lu ZX, Ye M, Yan GR, et al. Effect of EBV LMP1 targeted DNAzyme on cell proliferation and apoptosis[J]. Cancer Gene Therapy, 2005, 12: 647 - 654.
- [18] Eliopoulos AG, Young LS. Activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr Virus-encoded latent membrane protein (LMP1)[J]. Oncogene, 1998, 16(13): 1731 - 1742.
- [19] Kieser A, Kilger E, Gires O, et al. Epstein-Barr Virus LMP-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade[J]. EMBO J, 1997, 16(21): 6478 - 6485.
- [20] 刘轶平, 曹亚. STATs 研究新进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(4): 336 - 338.
- [21] Niu G. Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth[J]. Oncogene, 2002, 21(46): 7001 - 7010.
- [22] 林雪迟, 曹亚. Op18/stathmin 信号调控的研究进展[J]. 生命科学研究, 2007, 11(3): 195 - 199.
- [23] Yang L, Lu Z, Ma X, et al. A therapeutic approach to nasopharyngeal carcinomas by DNAzyme targeting EBV LMP-1 gene[J]. Molecules, 2010, 15(9): 6127 - 6139.
- [24] Sommer SS, Jiang Z, Feng J, et al. ATM missense mutations are frequent in patients with breast cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2003, 145(2): 115 - 120.
- [25] Pandita TK. A multifaceted role for ATM in genome maintenance. Expert Rev[J]. Expert Rev Mol Med, 2003, 5(16): 1 - 21.
- [26] 马小倩, 曹亚. G2 期阻滞的分子机制及其在降低肿瘤细胞放射性抵抗中的应用[J]. 生命的化学, 2007, 27(4): 329 - 331.
- [27] Korotayev K, Chaussepied M, Ginsberg D. Erk activation is regulated by E2F1 and is essential for E2F1-induced S phase entry[J]. Cell Signal, 2008, 20(6): 1221 - 1226.
- [28] Ding L, Li L, Yang J, et al. Latent membrane protein 1 encoded by Epstein-Barr virus induces telomerase activity via p16INK4A/Rb/E2F1 and JNK signaling pathways[J]. J Med Virol, 2007, 79(8): 1153 - 1163.
- [29] 赵家明, 李明意, 李震, 等. 脱氧核酶对端粒酶 hTERT mRNA 的切割以及对鼻咽癌细胞凋亡相关基因的影响[J]. 广东医学院学报, 2005, 23(3): 242 - 245.

(修回日期: 2012-06-05)