

靶向 survivin 治疗的研究进展

杭燕 综述,余秉翔 审校

[关键词] survivin;细胞凋亡;靶向治疗;肿瘤;肺动脉高压;综述

中图分类号:Q71 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)04-0323-03

[本文著录格式] 杭燕,余秉翔. 靶向 Survivin 治疗的研究进展[J]. 中国康复理论与实践,2006,12(4):323-325.

凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein,IAP)是继 Bcl-2 家族后发现的又一凋亡调控蛋白家族,目前已发现该家族有 8 个成员:NAIP、cIAP1、cIAP2、XIAP、Ts2XIAP、ML2IAP、Apollon 和 survivin。survivin 是该家族中分子量最小的一个成员,具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双重功能。自 1997 年被发现以来,survivin 逐渐成为生物靶向治疗的明星分子,对其在恶性肿瘤治疗中的应用研究也日趋深入。笔者对靶向 survivin 治疗的研究进展做一综述。

1 survivin 的分子生物学特性

1.1 survivin 的结构 survivin 基因由效应蛋白酶受体(effector cell protease receptor-1,EPR-1)cDNA 从人类基因库杂交筛选分离出来,与 EPR-1 序列方向相反,定位于人类染色体 17q25,靠近端粒,全长 14.7 kb,由 3 个内含子和 4 个外显子组成,编码 142 个氨基酸^[1]。survivin 作为 IAP 家族中的新成员,与其他 IAP 成员含有 2~3 个杆状病毒 IAP 重复序列(baculov-

irus IAP repeat,BIR)不同,其单体 NH₃ 端只含有 1 个 BIR 结构,由 3 个螺旋和 3 个反平行 β 片层组成,两个单体通过 76 位的谷氨酸(Glu76)和 80 位的组氨酸(His80)共同结合 1 个 Zn,并以 Zn 原子为中心形成一对称的二聚体,并由 57、60、84 位的半胱氨酸(Cys57、60、84)和 77 位的组氨酸(His77)与 1 个 Zn 原子通过配位键形成锌指模式;COOH 端有一个独特的 α 螺旋,富含疏水基团,能和纺锤体微管上的微管蛋白结合,抑制细胞凋亡。survivin 变异体(MI2G99)缺失 COOH 端螺旋,不能结合到微管,同时也丧失了抑制凋亡的功能^[2]。survivin 第 34 位苏氨酸(Thr34)的磷酸化修饰是决定其功能的重要因素。p34cdc-2 是已知的惟一能对 survivin 磷酸化修饰的细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinase,CDK),p34cdc-2 与 Cyclin B1 结合活化,再使 survivin 的 Thr34 磷酸化^[3]。

Mahotka 等鉴定了 2 个人类 survivin 剪接异构体 survivin- Δ EX3 和 survivin-2B,发现前者的抗凋亡活性强于后者^[4]。Krieg 等发现,在各期胃癌中,survivin 和 survivin- Δ EX3 表达水平未变,但 survivin-2B 的表达水平随着分期的升高而增加($P=0.033$)^[5]。Vegran 等指出,在乳腺癌发生、发展及治疗的不同阶段,survivin 各剪接异构体的表达具有差异性,而另一 sur-

作者单位:解放军总医院呼吸内科,北京市 100853。作者简介:杭燕(1978-),女,陕西西安市人,医师,硕士研究生,主要研究方向:肺癌的临床诊断与治疗。通讯作者:余秉翔。

survivin 剪接异构体 survivin-3B 可能是独立的抗凋亡因子,其表达水平受 p53 调节^[6]。Zheng 等从乳腺癌细胞系 Bcap37 中鉴定了最新的人类 survivin 剪接异构体 survivin image (SI),并认为其可能与肿瘤发生有密切关系^[7]。

1.2 survivin 的功能 survivin 可抑制多种凋亡刺激因子引起的凋亡,是迄今发现的最强的凋亡抑制因子。caspase 级联式激活并溶解蛋白质是凋亡发生的核心机制。survivin 主要通过 3 种方式直接或间接抑制 caspase 活性而抗凋亡:①survivin 能抑制由 Fas/caspase-8 和 Bax/细胞色素 C 诱导的 caspase 活化和凋亡,可能通过作用于各个凋亡途径的汇集点,即直接抑制终末效应蛋白 caspase-3 和 caspase-7,从而抑制凋亡^[8];另有学者通过 X 射线晶体照相术发现, survivin 不能直接作用于 caspase-3,可能是通过 caspase-9 起作用;②survivin 可与辅助性线粒体源性 caspase 激活因子(second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC)结合, SMAC 是一种通过结合 IAP 而保护 caspase 活性的蛋白^[9], survivin 与 SMAC 结合并之对抗进而抑制 caspase 活性;③survivin 通过对抗 SMAC 的作用,保护其他 IAP 家族成员如 XIAP 免受 SMAC 抑制而维持它们的抗凋亡功能,从而增强 IAP 家族成员的功能。还有研究者认为, survivin 可通过非 caspase 依赖细胞凋亡的途径抑制细胞凋亡,如参与调节 p53 依赖的凋亡^[10]。

除了抑制凋亡, survivin 还在细胞分裂过程中起重要作用。survivin 的表达具有细胞周期性,只在 G2/M 期表达。这是因为细胞周期依赖性因子(cell cycle-dependent element, CDE)和细胞周期同源区区域(cell-cycle homology regions, CHR)是特异性存在于 G2/M 期的表达基因,人类 survivin 基因的启动子含有 3 个 CDE 和 1 个 CHR,所以 survivin 表达具有明显的细胞周期性, survivin mRNA 及其蛋白选择性在有丝分裂期间增多。survivin 能对抗 G2/M 期凋亡的诱导,过表达可逃逸凋亡切点(checkpoint),通过有丝分裂促进转化细胞异常增殖。Fortugno 等认为,在有丝分裂细胞中, survivin 存在一个亚细胞池,80%的 survivin 与有丝分裂中期的中心体和微管结合并发生主要作用^[11]。survivin 的反义抑制可导致继发性有丝分裂过程紊乱,致使细胞生成多余中心体、多极纺锤体、多核,且胞质无法分裂。

2 靶向 survivin 治疗的理论基础

2.1 survivin 的分布 survivin 是一种肿瘤特异性凋亡抑制因子,根据 Northern blotting 检测, survivin 主要分布于胚胎及分化不成熟的组织,除在胎盘及成人胸腺中有微量表达外,所有分化成熟的组织,包括外周血白细胞、淋巴结、胰、肾、骨骼肌、肝、脑以及心脏组织中几乎都检测不到 survivin 的表达,这与 IAP 家族其他成员及另一重要凋亡抑制因子 Bcl-2 在成人正常组织中有不同水平广泛表达明显不同。而在大多数常见肿瘤如肺癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌,以及 50%以上的高分化淋巴瘤、子宫内膜癌和卵巢癌等的肿瘤组织内,其表达异常增高,并与这些肿瘤的发生、发展及预后密切相关。胸腺内 survivin 的表达则对 T 细胞的发育、成熟有重要作用^[12]。

2.2 survivin 与化疗耐药性 多项临床前试验已证实了靶向 survivin 治疗的潜在价值。在体外培养细胞中, survivin 的过表达可导致对多种化疗药物的耐药性,以及抑制由 Fas/caspase-8 和 Bax/细胞色素 C 诱导的 caspase 活化和凋亡。同时,体外培养细胞中抑制 survivin 的表达可直接诱导凋亡,并使对化疗药物耐药的细胞致敏。在动物模型中,靶向 survivin 的反义寡核

苷酸可使移入肺^[13]和胃^[14]中的肿瘤组织延缓生长。

2.3 survivin 抑制物对正常细胞的无害性 靶向 survivin 治疗的研究能够吸引众多研究人员关注的重要原因是其抑制物对正常成人细胞未表现出毒副作用,这与 survivin 的特殊分布密切相关。同时,这一特性为解决肿瘤化学药物疗法特异性差、毒性强的缺点开辟了新的途径。但迄今为止, survivin 抑制物有针对性地优先作用于恶性肿瘤细胞的机制仍是未解之谜。有观点认为,这可能与恶性肿瘤细胞受到诸如癌基因、低氧、缺失细胞器等多种因素刺激后,能够产生一种内生性的“动力”激活 caspase 有关。survivin 通过阻断恶性肿瘤细胞中这种驱使 caspase 活化的“动力”抑制肿瘤细胞的凋亡,因此,这种“动力”也吸引 survivin 抑制物去除这种阻断,从而使凋亡可以继续行下去。正常细胞则因为缺少这种内生性“动力”而对 survivin 抑制物缺乏敏感性。Hague 等的实验显示,口腔鳞癌细胞的 caspase-3 水平明显高于正常口腔上皮细胞^[15],该实验结果支持了上述假说。

2.4 survivin 与预后 Zhang 等检测了 60 例非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)标本中的 survivin 表达,并对其临床病理特征加以分析,发现 survivin 表达的阳性率越高,其 TNM 分期越高、分化程度越差、淋巴结转移越多,而与组织细胞类型、年龄、性别无明显关系,表明 survivin 基因的表达预示肿瘤有较高的侵袭性和不良预后^[16]。Meng 等通过对胃癌标本的检测也得到了相同的结论^[17]。survivin 与肿瘤预后的密切关系首先验证了其作为靶向治疗靶点的价值;其次,为验证靶向 survivin 治疗的效果提供了理论依据。

3 靶向 survivin 治疗的临床研究

3.1 靶向 survivin 的抗肿瘤治疗

3.1.1 药物治疗 以 survivin 为靶向的肿瘤药物治疗可通过 4 种途径:①抑制 survivin 的磷酸化:cdc2 激酶抑制剂通过阻断 cdc2 对 survivin 的磷酸化作用,达到抑制肿瘤生长、诱导凋亡的目的,一种名为 flavopiridol 的 CDKs 抑制剂已用于临床肿瘤治疗,目前已进入 II 期临床试验^[18];②阻止有丝分裂微管的装配:抗微管结合药物如 vincristine、vinblastine 可间接抑制 survivin;③诱导细胞周期紊乱,抑制 survivin 的表达: Fulda 等综合细胞周期、survivin 的表达和细胞凋亡三者进行研究分析,发现用肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体的增敏剂白藜芦醇诱导细胞发生 G1 期阻滞时, survivin 表达降低,且肿瘤细胞更易发生凋亡^[19];④阻止 survivin DNA 转录,下调 survivin 的表达:有研究表明,赫达霉素(hedamycin)可以通过与 survivin 启动子-115~-95 一段长达 21 bp 的富含 GC 片段结合,抑制-124~-39 这段 86 bp 的富含 GC 片段生成参与 survivin DNA 转录的重要蛋白——妊娠特异性 B1-糖蛋白(pregnancy specific B1-glycoprotein, SPI)或 SPI 样蛋白,从而阻止其基因转录,下调 survivin 的表达^[20]。

3.1.2 基因治疗 目前,利用 survivin 基因作抗肿瘤治疗的策略有:①以 survivin 为靶标的反义药物作为重点研发的抗肿瘤新药:该类物质主要有 survivin 反义 cDNA 表达载体与合成的 survivin 反义寡核苷酸两类, Shen 等针对 survivin DNA 3'端非编码区构建了反义寡核苷酸,通过电泳测定该寡核苷酸在生理条件下形成稳定的 3 倍体结构(triplex-forming oligodeoxynucleotides, TFO),以 TFO 转染 survivin 过表达的肺腺癌细胞株 A549,发现 survivin 蛋白表达水平明显下调,细胞增殖显著抑制^[21],提示利用靶向 survivin 的 TFO 抑制 survivin 的表达可能

是肺癌基因治疗的良好方案;②survivin 核酶(ribozyme)及核糖体:靶向 survivin 的核酶可以对 survivin mRNA 进行切割,干扰其蛋白翻译过程,从而导致 survivin 表达水平降低;Khanna 从鼠胸腺细胞中分离出 S29cDNA 核糖体蛋白,其高表达可杀死 NSCLC 的 H520 细胞株^[22];用蛋白印迹法发现 S29 诱导凋亡机制中可见 survivin 蛋白的下调;③survivin 显性失活突变体:将表达磷酸化缺陷的 survivin 突变体 Pa δ T34 注入肺癌等肿瘤细胞中,可致肿瘤细胞增殖能力降低和大规模凋亡,而正常增生活跃的组织细胞(如纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞)均未受影响;④survivin RNA 干扰(RNAi):RNA 干扰技术是基因沉默的有力手段,靶向 survivin 的 RNA 干扰可以阻断 survivin 的表达,从而显著抑制肿瘤细胞的生长,如 You 等应用小干扰 RNA 及单克隆抗体两种途径靶向抑制肺癌细胞株 A549 高水平表达的 Wnt-2 蛋白,观测到 A549 细胞凋亡率显著提高,同时发现两组细胞中 survivin 表达水平均被下调,表明抑制 Wnt-2 蛋白的表达,可能是通过钝化 survivin 基因的机制诱导了细胞凋亡^[23];Yonesaka 等用靶向 survivin 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)抑制 survivin 表达,可以显著提高肺癌细胞株 A549(尤其是带有突变 p53 的耐药细胞)对阿霉素的敏感性^[24]。以上方法为靶向 survivin 的抗肿瘤基因治疗提出了新的方向,但临床应用价值尚待进一步证实,目前合成 survivin 反义寡核苷酸的应用已进入临床试验阶段。

3.2 靶向 survivin 的其他治疗 肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是先天或后天异常造成肺血管壁细胞正常凋亡受抑而细胞增殖加强,从而导致肺循环血管阻力增高的临床疾病,现有的治疗不但方法少,费用昂贵,而且副作用显著。Sean 等在 6 例 PAH 患者以及由野百合碱诱发 PAH 大鼠的肺血管壁细胞中发现了 survivin 的表达,而在未患 PAH 的患者及大鼠肺血管壁细胞中则未发现其表达^[25]。将载有表达磷酸化缺陷 survivin 突变体的腺病毒对 PAH 大鼠进行吸入治疗后,生存率提高 25%,同时,大鼠的 PAH 发展过程也呈现逆转的趋势,肺血管阻力、右心室肥大程度均有所减小。体内及体外实验均显示,抑制肺血管壁细胞 survivin 的表达可以促使肺动脉平滑肌细胞凋亡,抑制细胞增殖,故靶向 survivin 治疗为 PAH 的治疗开辟了一条新的途径。

综上所述, survivin 作为一种新的凋亡抑制因子,其独特的组织表达特异性及促进增殖、抑制凋亡的生物学功能,使得有关 survivin 的研究倍受科学家的关注;各种靶向 survivin 治疗不但能够促进肿瘤细胞的自发凋亡,还可以辅助增强例如化疗等常规抗肿瘤治疗的效果,而且在 PAH 的治疗上也有令人期待的突破。但更值得期待的是,已有实验显示, survivin 在肿瘤血管发生中具有决定性的作用^[26],提示靶向 survivin 治疗不仅可通过直接干扰肿瘤细胞的凋亡途径,还将通过促进肿瘤血管细胞的凋亡提高肿瘤的治疗效果。

[参考文献]

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917-921.
- [2] Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, et al. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions[J]. Mol Cell, 2000, 6(1): 183-189.
- [3] O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, et al. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(24): 13103-13107.
- [4] Mahotka C, Wenzel M, Springer E, et al. Survivin-delta Ex3 and surviving-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor surviving with different antiapoptotic properties[J]. Cancer Res,

1999, 59(24): 6097-6102.

- [5] Krieg A, Mahotka C, Krieg T, et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of surviving-2B in tumour progression[J]. Br J Cancer, 2002, 86(5): 737-743.
- [6] Vegran F, Boidot R, Oudin C, et al. Distinct expression of survivin splice variants in breast carcinomas[J]. Int J Oncol, 2005, 27(4): 1151-1157.
- [7] Zheng W, Ma X, Wei D, et al. Molecular cloning and bioinformatics analysis of a novel spliced variant of survivin from human breast cancer cells[J]. DNA Seq, 2005, 16(5): 321-328.
- [8] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein surviving inhibits caspases, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998, 58: 5315-5320.
- [9] Verhagen AM, Ekort PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. Cell, 2000, 102(1): 43-53.
- [10] Mitza A, McGuirk M, Hockenberry TN, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(17): 2613-2622.
- [11] Fortugno P, Wall NR, Giodini A, et al. Survivin exists in immunologically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function[J]. J Cell Sci, 2002, 115(3): 575-585.
- [12] Xing Z, Conway EM. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis[J]. J Exp Med, 2004, 199(1): 69-80.
- [13] Hu Y, Chertom Horvat G, Dragowska V, et al. Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 2826-2836.
- [14] Tu SP, Jiang XH, Lin MC, et al. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer[J]. Cancer Res, 2003, 63: 7724-7732.
- [15] Hague A, Eveson JW, MacFarlane M, et al. Caspase-3 expression is reduced, in the absence of cleavage, in terminally differentiated normal oral epithelium but is increased in oral squamous cell carcinomas and correlates with tumour stage[J]. J Pathol, 2004, 204: 175-182.
- [16] Zhang XY, Zhong LH, Hu K, et al. Expression of survivin and its correlation with P53 in non-small cell lung cancer[J]. Med J Wuhan University, 2004, 25(3): 271-274.
- [17] Meng H, Lu C, Mabuchi H, et al. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2004, 216: 147-155.
- [18] Shapiro GI. Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(12 Pt 2): 4270s-4275s.
- [19] Fulda S, Debatin KM. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol[J]. Cancer Res, 2004, 64(1): 337-346.
- [20] Wu JG, Ling X, Pan DL, et al. Molecular mechanism of inhibition of survivin transcription by the GC-rich sequence selective DNA-binding antitumor agent, hedamycin: evidence of surviving down-regulation associated with drug sensitivity[C]. JBC Papers in Press, Published on January 5, 2005.
- [21] Shen C, Buck A, Polat B, et al. Triplex-forming oligodeoxynucleotides targeting survivin inhibit proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells[J]. Cancer Gene Ther, 2003, 10(5): 403-410.
- [22] Khanna N, Sen S, Sharma H, et al. S29 ribosomal protein induces apoptosis in H520 cells and sensitizes them to chemotherapy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(1): 26-35.
- [23] You L, He B, Xu Z, et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(36): 6170-6174.
- [24] Yonesaka K, Tamura K, Kurata T, et al. Small interfering RNA targeting survivin sensitizes lung cancer cell with mutant p53 to adriamycin[J]. Int J Cancer, 2006, 118(4): 812-820.
- [25] McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension[J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1479-1491.
- [26] Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor mediated endothelial cell protection by Survivin targeting[J]. Am J Pathol, 2001, 8(4): 305-310.

(收稿日期: 2006-01-16)