

内质网应激/未折叠蛋白反应在抑制胶质母细胞瘤中的研究进展

杨顺, 袁盾, 刘松林, 李毅锋

中南大学湘雅医院 神经外科, 湖南 长沙 410008

摘要: 胶质母细胞瘤(GBM)是一种预后极差的中枢神经系统恶性肿瘤,具有手术难以切除、高侵袭性、增生性及强耐药性等特点。内质网(ER)应激会破坏细胞中的其他蛋白质稳态,从而导致未折叠的蛋白质反应(UPR)激活,这对于恢复这种平衡和细胞存活至关重要。除了作为一种适应性反应外,最近UPR还与肿瘤发生有关。肿瘤微环境中普遍存在的缺氧、活性氧和营养物质剥夺是众所周知的UPR诱因。在这里,笔者回顾目前对成人最具生命威胁的GBM中UPR的认识。患者样品显示出UPR的慢性激活,体外标准化学疗法和放射疗法通过加重ER应激导致细胞死亡而部分起作用。UPR与凋亡诱导剂如TRAIL和MDA-7的敏感性增强有关。最后,内质网应激被认为与GBM干细胞内稳态的维持有关。UPR中的IRE1与PERK传感器在原位GBM小鼠模型中的作用均有报道,但直接作用仍有待证明。综上所述,UPR似乎可通过抑制其活性成为GBM新的干预手段中一个有希望的治疗靶点。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3): 284-288]

关键词: 胶质母细胞瘤;内质网应激;非折叠蛋白反应;治疗靶点

中图分类号:R739.41

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2021.03.014

Research advances in endoplasmic reticulum stress/unfolded protein reaction in inhibiting glioblastoma

YANG Shun, YUAN Dun, LIU Song-Lin, LI Yi-Feng

Xiangya Hospital Central South University, Changsha, Hunan 410008, China

Corresponding author: LI Yi-Feng, Email: liyifeng87@163.com

Abstract: Glioblastoma is a malignant tumor of the central nervous system with poor prognosis and has the features of difficult surgical resection, high invasiveness and proliferation, and strong drug resistance. Endoplasmic reticulum stress (ERS) disrupts the homeostasis of other proteins in cells and thus leads to the activation of unfolded protein response (UPR), which is essential to the restoration of this balance and cell survival. Except as an adaptive response, UPR is also associated with tumorigenesis. Hypoxia, reactive oxygen species, and deprivation of nutrients in tumor microenvironment are the well-known predisposing factors for UPR. This article reviews the current understanding of UPR in adults with the most life-threatening disease glioblastoma multiforme (GBM). Chronic activation of UPR is observed in the samples of patients, and standard chemotherapy and radiotherapy can lead to cell death partially by aggravating ERS. UPR is associated with increased sensitivity of apoptosis inducers such as TRAIL and MDA-7. Finally, ERS is considered associated with the maintenance of homeostasis in GBM stem cells. The role of IRE1 and PERK sensors in UPR in the mouse model of GBM has been reported, while further studies are still needed to investigate their direct roles. In summary, UPR may become a promising target for new therapeutic interventions for GBM by inhibiting its activity.

[Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2021, 48(3): 284-288]

收稿日期:2020-11-25;修回日期:2021-04-12

作者简介:杨顺,专业型硕士研究生在读,外科学(神经外科方向)。Email: yangshun0924@sina.com。

通信作者:李毅锋,主要从事脑血管病,脑介入治疗,脑肿瘤等疾病的研究。Email: liyifeng87@163.com。

Keywords: glioblastoma; endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response; therapeutic target

胶质母细胞瘤(Glioblastoma, GBM)是一种侵袭性中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病,每年10万成年人中约2~3人发病,每年造成美国14 000多人死亡^[1]。GBM患者存活时间很少超过15个月,在过去的20年里,这个数字几乎没有变化^[2]。它的病死率是所有恶性原发性脑瘤中最高的,通过标准治疗,平均生存率为14个月。目前GBM患者的标准治疗方法是肿瘤切除后放疗和/或基于替莫唑胺(Temozolomide, TMZ)的化疗^[3]。TMZ是FDA批准的口服烷化药物,可穿越血脑屏障(blood brain barrier, BBB),一旦进入细胞核,即可将甲基转移至双链DNA诱导甲基DNA复合物中的嘌呤碱基上^[4]。这种DNA复合物诱导DNA形成缺口,导致细胞周期停滞和凋亡。DNA修复酶O6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O6-methyl-guanine DNA methyltransferase, MGMT)的过度激活可导致GBM患者对TMZ的耐药^[5]。实际上, TMZ化学疗法的一大缺点是大约90%的GBM患者会产生耐药性,并且对第二轮TMZ治疗无反应。报告显示, TMZ仅可使GBM患者的总生存期增加2.5个月^[6]。其他研究表明,当前的治疗标准、手术、TMZ和放疗以及其他药物(如贝伐单抗)的联合治疗并未显示患者的总体生存率有改善^[7]。肿瘤本身以及目前的治疗方法对大脑的持续损害,会在患者生存时造成身体衰弱、神经认知和心理上的后遗症。显然,现有的治疗方案是不太理想的,需要对这些肿瘤的生物学区有更深的了解,以改进治疗方法。

1 GBM中内质网应激

真核生物的内质网(endoplasmic reticulum, ER)是蛋白质合成和折叠、脂质合成、化合物排毒、葡萄糖代谢和钙存储的主要场所^[8]。此外,内质网中存在的伴侣蛋白、折叠酶和翻译后修饰蛋白介导新生的跨膜蛋白和分泌蛋白适当折叠成其天然构象,然后进行组装。ER还具有质量控制机制,仅输出正确折叠的蛋白质,而末端错误折叠的蛋白质则通过称为ER相关降解(ER-associated degradation, ERAD)的过程降解^[9]。然而,在疾病条件下,或由于微环境、温度和活性氧的变化,或由于化合物导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)升高,内质网维持重要细胞功能的稳态经常受到干扰。在这些情况下,反应主要是由错误折叠或未折叠蛋白质的积累引起的,这个过程也被称为未折叠蛋白反应(unfolded protein reaction, UPR)^[10]。此外,已知有多种药物制剂可以触发ERS;例如Thapsigargin,它干扰钙稳态;Tunicamycin,阻断蛋白糖基化^[11-12]。

ERS可在多种实体肿瘤样本(如胶质瘤)中观察到,研究表明其与调节肿瘤化学敏感性密切相关。ERS标志物78 kDa葡萄糖调节蛋白(78 kDa glucose regulated pro-

tein, GRP78)在正常脑组织中的表达低于其他正常组织,但在GBM中表达高于其他肿瘤^[13]。在胶质瘤等肿瘤细胞系模型中的多项研究表明,ERS相关蛋白如GRP78/免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)^[14]、转录激活因子(activating transcription factor, ATF)4^[15]、ATF6^[16]、脯氨酰4-羟化酶β多肽(prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide, P4HB)^[17]等具有促生存作用,并作为化疗耐药相关因子发挥作用。

2 ERS和非折叠蛋白反应

当未折叠或错误折叠的蛋白质在ER内腔中积聚时,就会激活特定的ER应激途径^[18],称为未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)。UPR由3个主要传感器控制:Ire1同系物(Ire1 homologs, IREs),双链RNA依赖性蛋白激酶(PKR)样内质网激酶[double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase, PERK]和ATF6。当ER蛋白的折叠能力因细胞需求和/或细胞能量利用率不足而无法正确折叠合成到ER中的蛋白时,错误折叠的蛋白会积聚。当应激持续或过于严重时,UPR启动凋亡过程以消除受损细胞。这表明,UPR决定细胞的生存和死亡取决于应激强度和持续时间。

从本质上讲,ERS反应的原理将被简化为该过程中2个中央执行蛋白的活性,即GRP78/BiP和CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白[CCAAT/enhancer-binding protein(C/EBP) homologous protein, CHOP],也称为生长停滞和DNA损伤诱导基因153(growth arrest and DNA damage inducible 153, GADD153)。虽然有更多的成分参与ERS的控制,但GRP78和CHOP在这些事件中起决定性作用。

GRP78是一种被葡萄糖水平降低强烈诱导表达的蛋白。作为内质网驻留蛋白,它可以充当分子伴侣以支持正确的蛋白质折叠,将错误折叠的蛋白质靶向降解,并充当钙结合蛋白。重要的是,GRP78能够结合并抑制上述ERS通路PERK、IRE1和ATF6这3个调控因子的活性,从而在促生存过程中发挥主调控功能^[19]。另一方面,CHOP通过抑制抗凋亡Bcl-2,刺激死亡受体5(DR5)的表达,激活Caspases(程序性细胞死亡的“刽子手”蛋白),是ERS反应中促凋亡过程中的关键执行者。GRP78水平升高对细胞具有保护作用,可恢复和维持ER稳态,而CHOP水平持续升高则拮抗这些作用,并在应激过强且无法解决的情况下使细胞趋于凋亡^[20]。

一般来说,正常细胞和组织不会受到ERS的影响,因此GRP78的表达量非常有限,CHOP的表达水平也低于检测限。正常细胞只有在故意暴露于应激条件下,如低血糖、严重缺氧或使用Thapsigargin等药物治疗后才会增加GRP78和CHOP的合成。暴露的长度和严重程度决定了CHOP的表达程度,而CHOP的表达程度又决定了细胞

的最终结局,即适应与细胞死亡^[21]。细胞无法长期耐受升高的CHOP水平,GRP78的促生存功能之一是将CHOP水平降低至应激前状态并保持其柔和状态。因此,由于其控制的尝试时间较短,CHOP表达水平可以作为一种方便的读数来揭示ERS的急性期。

在中等应激条件下,GRP78通过与内质网跨膜信号成分PERK、IRE1和ATF6结合并抑制CHOP表达。但是,当压力过大或过长时,大多数GRP78分子会忙于修复内腔中错折叠的蛋白质,因此无法限制这些跨膜蛋白质的活性,从而导致高水平的持续表达CHOP并因此导致细胞死亡。与正常细胞相比,肿瘤细胞经常面临应激性挑战,这些细胞的新陈代谢需求增加,以及永久性的生理变化,如Warburg效应和肿瘤特异性丙酮酸激酶异构体的表达,可能会加剧应激性挑战。在细胞应对和适应这些变化的努力中,促生存成分GRP78的表达增加,而在癌细胞和肿瘤组织中确实经常检测到GRP78的水平升高,通常被认为是这些细胞ERS基线水平长期升高的指标。综上所述,GRP78支持肿瘤细胞在低氧、低血糖、酸性等亚优微环境条件下的增殖和生存,并减轻了细胞因蛋白质合成增强而对蛋白质折叠的需求。GRP78的保护功能还包括抑制促凋亡通路,其中包括CHOP的抑制。直接的结果是,许多具有高GRP78水平的肿瘤细胞显示出对某些类型化学疗法的耐药性增加,例如阿霉素,这可能解释了肿瘤组织中GRP78染色强阳性的癌症患者的预后不良。

然而,尽管慢性ERS和永久升高的GRP78水平似乎为肿瘤细胞提供了生存优势,但这种表型将肿瘤细胞与正常细胞区分开来,因此可能为针对这种应激系统的治疗干预提供了机会。

3 GBM和UPR

在癌症中,最初人们认为UPR主要是作为一种支持肿瘤细胞存活的适应系统。然而,近年来人们认识到UPR,尤其是激活转录因子ATF4、X盒结合蛋白(X-box binding, XBP1)和ATF6在肿瘤发育过程中基因表达重编程中的重要作用^[22]。

3.1 UPR和GBM肿瘤发生

UPR直接参与胶质发育的研究很少。到目前为止,只有IRE1编码基因ERN1的体细胞突变被报道可能代表肿瘤(包括GBM)的驱动突变。然而,在GBM中ERN1突变非常罕见(频率<1%),可能在胶质发育中没有重要作用。此外,IRE1在胶质发育中的功能参与尚未被证实。在其他研究中,ERS相关基因表达的变化与GBM的发展有关。例如,对GBM患者样本基因拷贝数变化的基因组分析显示,在染色体7p11.2处有很强的扩增,可以确定为*SEC61c*和*EGFR*基因^[23]。

ERS与GBM干细胞(Glioma stem cell, GSC)的自我更新特性之间存在联系。GBM被认为起源于GSC,GSC

也与GBM的侵袭性特征相关,例如高肿瘤血管化,侵袭行为,化学和放射抗性以及手术后疾病复发^[24]。GSCs具有自我更新能力和较高的肿瘤启动潜能,并能分化为大体积肿瘤细胞,这些大体积肿瘤细胞通常被认为缺乏或降低了肿瘤形成能力^[25]。通过在小鼠GBM模型中采用体内RNAi筛选方法,发现表观遗传修饰多聚组蛋白BMI1通过影响转化生长因子 β /骨形成蛋白(TGF- β /BMP)通路和ERS通路发挥其功能^[26]。两种途径都可能与各种基因的表达降低和功能改变有关,包括ATF3。ATF3是p53的下游靶标,已参与UPR信号传导,特别是PERK分支^[27]。在小鼠GBM模型中发现ATF3的表达被BMI1抑制,并与增强的干性有关。同时发现在GBM患者样品中,ATF3低表达时与患者预后不良相关,基于这些结果,我们提出了ATF3可能作为肿瘤抑制基因在GBM中起到一定的作用。

3.2 UPR和GBM肿瘤进展

UPR在GBM肿瘤进展中的作用已得到更深的探讨。DROGAT等首次证明,在U87 GBM细胞系中过表达显性阴性(dn)IRE1可抑制缺氧或葡萄糖剥夺诱导的血管内皮生长因子A(VEGFA)表达^[28]。特别是,已发现ATF4/XBP1和HIF1/XBP1异二聚体可转录激活包括血管内皮生长因子(VEGF)在内的促血管生成基因的表达^[29]。通过对小鼠原位颅内植入术中U87对照或IRE1缺陷细胞的肿瘤生长情况进行评估,发现IRE1(dn)细胞产生的肿瘤小,并伴有血管化减少,进一步证实了VEGFA在IRE1适应性信号传导中的重要性。在后续研究中发现IRE1确实是U87模型中血管生成和侵袭的关键调节因子。使用类似的方法,IRE1信号因U87细胞中IRE1的过表达而受损,与U87对照肿瘤相比,颅内植入后观察到肿瘤的生长减少和侵袭增加。另外,在U87(dn)肿瘤中检测到肿瘤血管形成减少,这也可以在鸡蛋血管生成测定中得到证实。转录谱的比较显示,U87(dn)细胞中IL-1 β ,IL-6,IL-8和VEGFA降低。这些细胞中白介素-6(IL-6)的过量表达可促进血管形成。此外,在IRE1受损的U87细胞中,星形细胞瘤细胞迁移的重要调节剂半胱氨酸酸性分泌蛋白(SPARC)的上调与间充质标志物表达的增加有关。这些发现共同表明,与正常组织相比,GBM中的UPR活性提高,并有助于GBM的发展。这为设计新的UPR靶向策略和开发新的治疗方法提供了一个治疗窗口。

4 总结与展望

尽管尚未证明UPR直接参与神经胶质瘤的发生,但上述研究表明,UPR在GBM的生长和进展中起着重要的作用。UPR整合了不同的细胞过程,从蛋白质折叠到转录和翻译的控制,从蛋白质降解到调控细胞命运的信号通路。UPR的慢性活化是肿瘤细胞的一种普遍特征,被认为是抑制肿瘤细胞增殖迁移、抗凋亡和抗肿瘤药物的

机制之一。传统上,UPR被认为是一种有利于生存的适应机制,旨在降低未折叠蛋白水平和恢复内质网平衡。尽管这可能是正确的,尤其是在肿瘤发生的早期阶段,但癌细胞显然已经以多种方式共同采用了UPR,从而有利于其进展和转移。事实上,这种复杂网络的激活代表了致癌转化过程中的重要一步,并影响了GBM的多个标志,包括耐药性。因此,ERS/UPR调节剂对于传统化疗或其他靶向治疗失败的患者似乎是很有前途的药物。然而,UPR对细胞命运的双重影响强烈表明,针对这种复杂网络的治疗靶标需要全面了解决定UPR促进细胞死亡或存活的确切机制。另外,笔者前期研究^[30]发现ERS诱导剂衣霉素可以通过抑制CD47和EGFR等膜蛋白表达,抑制胶质瘤细胞的增殖能力及迁移能力并最终抑制胶质瘤的发生,预示着靶向ERS有望进一步增强免疫治疗的疗效。但未来面临挑战众多,例如ERS导致的CD47和EGFR的信号变化对胶质瘤细胞功能的影响、ERS是否可以抑制膜蛋白的表达从而抑制肿瘤的发生发展、ERS调控机制、衣霉素结合化疗手段(卡铂)的给药剂量和频率,以及可能最重要的需要解决的是GBM的分子异质性等,尚待进一步研究。

GBM表现出了强大的应激抵抗和抗凋亡生存机制的特征。也许我们的治疗工作应着重于动摇压力反应的基础。然而,ERS诱导剂治疗的临床效益仍有待进一步研究。与其使用具有多效性的天然产物,不如开发和测试特异性的UPR分支靶向分子,以检验UPR作为治疗GBM患者的有希望的靶点的潜力。

参 考 文 献

- [1] WIRSCHING HG, GALANIS E, WELLER M. Glioblastoma[J]. *Handb Clin Neurol*, 2016, 134: 381-397.
- [2] OHGAKI H, KLEIHUES P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005, 64(6): 479-489.
- [3] FURNARI FB, FENTON T, BACHOO RM, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(21): 2683-2710.
- [4] FRIEDMAN HS, KERBY T, CALVERT H. Temozolomide and treatment of malignant glioma[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(7): 2585-2597.
- [5] ZHANG JH, STEVENS MF, BRADSHAW TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2012, 5(1): 102-114.
- [6] KIM D, SHIN H, JOUNG JG, et al. Intra-relation reconstruction from inter-relation: miRNA to gene expression[J]. *BMC Syst Biol*, 2013, 7(Suppl 3): S8.
- [7] ALCEDO-GUARDIA R, LABAT E, BLAS-BORIA D, et al. Diagnosis and new treatment modalities for glioblastoma: do they improve patient survival? [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(5): 447-464.
- [8] HETZ C, CHEVET E, OAKES SA. Proteostasis control by the unfolded protein response[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 829-838.
- [9] HARDING HP, ZENG H, ZHANG Y, et al. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(6): 1153-1163.
- [10] AUSTIN RC. The unfolded protein response in health and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(9): 2279-2287.
- [11] TREIMAN M, CASPERSEN C, CHRISTENSEN SB. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, 19(4): 131-135.
- [12] MIYAKE H, HARA I, ARAKAWA S, et al. Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 77(3): 396-408.
- [13] KANG BR, YANG SH, CHUNG BR, et al. Cell surface GRP78 as a biomarker and target for suppressing glioma cells[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34922.
- [14] VIRREY JJ, DONG DZ, STILES C, et al. Stress chaperone GRP78/BiP confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(8): 1268-1275.
- [15] CHEN DS, RAUH M, BUCHFELDER M, et al. The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemo-resistance in human gliomas[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 51164-51176.
- [16] DADEY DY, KAPOOR V, KHUDANYAN A, et al. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2): 2080-2092.
- [17] LEE D, SUN S, ZHANG XQ, et al. MicroRNA-210 and endoplasmic reticulum chaperones in the regulation of chemoresistance in glioblastoma[J]. *J Cancer*, 2015, 6(3): 227-232.
- [18] WANG M, KAUFMAN RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 326-335.
- [19] SUZUKI T, LU J, ZAHED M, et al. Reduction of GRP78 expression with siRNA activates unfolded protein response leading to apoptosis in HeLa cells[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 468(1): 1-14.
- [20] SCHÖNTHAL AH. Endoplasmic reticulum stress and autophagy as targets for cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(2): 163-169.
- [21] RUTKOWSKI DT, ARNOLD SM, MILLER CN, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins[J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(11): e374.
- [22] CHEVET E, HETZ C, SAMALI A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(6): 586-597.
- [23] LU ZM, ZHOU L, KILLELA P, et al. Glioblastoma proto-onco-

- gene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress[J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (23): 9105-9111.
- [24] CHEN J, MCKAY RM, PARADA LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells[J]. *Cell*, 2012, 149 (1): 36-47.
- [25] SINGH SK, HAWKINS C, CLARKE ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [26] GARGIULO G, CESARONI M, SERRESI M, et al. In vivo RNAi screen for BMI1 targets identifies TGF- β /BMP-ER stress pathways as key regulators of neural- and malignant glioma-stem cell homeostasis[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 660-676.
- [27] JIANG HY, WEK SA, MCGRATH BC, et al. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(3): 1365-1377.
- [28] DROGAT B, AUGUSTE P, NGUYEN DT, et al. IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6700-6707.
- [29] CHEN X, ILIOPOULOS D, ZHANG Q, et al. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway[J]. *Nature*, 2014, 508(7494): 103-107.
- [30] LIU SL, TANG YH, YUAN XR, et al. Inhibition of Rb and mTOR signaling associates with synergistic anticancer effect of palbociclib and erlotinib in glioblastoma cells[J]. *Invest New Drugs*, 2018, 36(6): 961-969.

责任编辑:王荣兵