



詹启敏 教授,中国工程院院士,研究员。现任中国医学科学院副院长,北京协和医学院副院长,分子肿瘤学国家重点实验室主任,中国微循环学会理事长,中国抗癌协会副理事长。担任国家863高科技研究计划医药生物技术专家组组长,国家973“恶性肿瘤侵袭转移的分子机理和分子阻遏”项目首席科学家。获教育部长江学者特聘教授,国家杰出青年科学基金获得者,新世纪百千万人才工程国家级人选,国家自然科学基金委创新群体首席专家称号。在国际上率先发现和系统揭示了细胞周期监测点关键蛋白的作用和机制,阐明多个重要细胞周期调控蛋白在细胞癌变和肿瘤诊断与个体化治疗中的作用,研究工作位于本领域国际前沿。担任《中华肿瘤杂志》和《科学通报》杂志副主编、J Biol Chem、Carcinogenesis、Cancer Biol and Ther等国际期刊编委。发表SCI论文145篇,SCI他引11 000次,主编著作4部。作为第一完成人获得教育部自然科学一等奖、中华医学科技二等奖、北京市科技二等奖,获科技部“十一五”国家科技计划突出贡献奖、华夏医学科技奖一等奖。应邀在国内外学术会议上作大会报告70余次,6次担任国际(双边)会议共同主席。

细胞周期与肿瘤转化医学*

詹启敏 陈 杰

摘要 恶性肿瘤最基本的生物学特征之一是细胞周期调控紊乱导致的细胞恶性转化和肿瘤细胞失控性增殖。了解细胞周期的调控机制能够揭示肿瘤发生发展的本质,阐释癌症的发生机制,从而为肿瘤的早期诊断和临床治疗提供分子标志物及药物靶点。本综述通过分析参与细胞周期运转的重要蛋白分子以及这些分子在细胞癌变和临床肿瘤防治过程中的作用,探讨基于这些分子的药物研发,从而系统地阐述细胞周期紊乱对肿瘤发生发展的生物学影响及其对肿瘤诊断与治疗的理论和实践意义。

关键词 细胞周期 肿瘤 转化医学

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20132205

Cell cycle and tumor translational medicine

Qimin ZHAN, Jie CHEN

Correspondence to: Qimin ZHAN; E-mail: zhanqimin@pumc.edu.cn

State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China.

This work was supported by the National 973 Project of Major Basic Research (No. 2009CB521801) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81230047).

Abstract Dysregulated cell cycle-mediated cell transformation and uncontrolled cell growth are some of the fundamental biological features of malignant tumors. Thus, understanding the mechanism(s) involved in the cell cycle will facilitate the discovery of the nature of tumor initiation and progression as well as the molecular mechanism of tumor malignancy. Consequently, biomarkers and drug targets for early diagnosis and treatment would be obtained. This study was designed to analyze in detail the key regulators of cell cycle and their importance in carcinogenesis and clinical prevention, diagnosis and treatment, and anti-cancer drug discovery. The biological impact of the dysregulated cell cycle on tumor occurrence and malignancy development is systematically described. The theoretical and practical significance of the cell cycle regulation in tumor diagnosis and therapy are also provided.

Keywords: cell cycle, tumor, translational medicine

作者单位:中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室(北京市100191)

*本文课题受国家973重大基础研究项目(编号:2009CB521801)和国家自然科学基金项目(编号:81230047)资助

通信作者:詹启敏 zhanqimin@pumc.edu.cn

恶性肿瘤最基本的生物学特征是肿瘤细胞失控性增殖,而细胞失控性增殖的生物学基础是细胞周期调控紊乱。细胞周期调控是一个精细的生物学过程,涉及了多个基因和蛋白的参与,进而形成了复杂的信号分子网络系统。因此,了解细胞周期及其相关基因的表达可以从基础生物学的角度深入发掘肿瘤的本质,阐明癌症的发生机制,并为肿瘤的早期诊断提供标记分子。此外,细胞周期蛋白的深入研究还能够为设计特异性抑制肿瘤细胞生长的药物和发展个体化的临床治疗方案提供理论基础,为选择特异性药物靶点、优化治疗措施提供科学基础。

1 细胞周期相关基因在肿瘤发生发展中的作用及意义

细胞周期调控机制与肿瘤发生密切相关,许多抑癌基因如 p53、BRCA1、Rb、p16、p15 以及 p53、BRCA1 的下游调控基因如 p21、Gadd45 是细胞周期监测点的重要组成部分。但在肿瘤发生过程中,这些抑癌基因多有基因改变而失活,造成细胞周期监测点功能缺陷。

监测点的功能缺陷将导致各种错误被带入细胞周期,例如DNA复制错误和染色体分离紊乱等,并造成基因组的不稳定性。基因组的不稳定性通常表现为基因突变、基因缺失,基因重排和易位,以及中心体扩增和染色体畸形。基因组不稳定性将导致基因组紊乱程度进一步恶化,其结果是细胞周期制动机制(监控机制)失活并伴随细胞周期驱动机制强化,从而产生细胞失控性增殖,导致肿瘤的发生。所以,肿瘤发生的重要原因是细胞周期调控机制的破坏。

2 癌相关基因在肿瘤细胞周期调控过程中的生物学作用

肿瘤抑癌基因 p53 和 BRCA1 在细胞增殖、分化以及凋亡等多种生命活动中发挥重要作用。本课题组与其他研究团队研究显示,p53 和 BRCA1 的最重要生物学功能之一是参与细胞周期调控。p53 和 BRCA1 功能的紊乱导致细胞周期调控机制的失控,进而造成基因组的不稳定性,最终导致肿瘤细胞形成和恶性增殖。p53 和 BRCA1 蛋白是转录激活因子,调节许多基因表达,通过下游基因,参与细胞周期的调控^[1]。p53 在细胞周期运转的多个环节起到重要作用,当某个细胞的染色体 DNA 在 G₁ 期受到损伤时,p53 转录活性增强,诱导 p21 基因的激活,进而使 p21 抑制细胞周期依赖激酶(CDK)的活性,阻止细胞的进一步增殖。而当损伤信号进入 S 期时,由 p53 诱导的 p21 可在复制叉处连接 DNA 聚合酶复合体,并阻止其

活性,诱导细胞的修复。此外,p53 还能通过诱导其他基因和蛋白的活性来加强对细胞周期的阻滞作用,如 14-3-3 σ 等。如果染色体 DNA 的损伤过于严重,p53 就会启动凋亡。

视网膜母细胞瘤基因产物 Rb 是一个重要的抑癌基因。Rb 与 Cyclin D、CDK4 及 p16 等分子相互作用,抑制细胞周期的运转。在肿瘤细胞中,Rb 基因缺失,导致细胞周期的紊乱,进而促进肿瘤细胞的恶性增殖。此外,Rb 也参与了细胞周期的调控,其磷酸化程度与细胞周期的进程一致。当 G₁ 期起始时,Cyclin D/CDK4 复合体形成,Rb 起始磷酸化,磷酸化的 Rb 释放与其结合并抑制的蛋白,如 E2F 家族成员。E2F 刺激了包括 Cyclin E 在内的 G₁/S 期基因的表达,这些分子促进细胞通过 G₁/S 期监测点,使细胞周期进入 S 期。但当细胞 DNA 受到损伤,高表达的 p21 抑制 Cyclin D/CDK4 对 Rb 的磷酸化,使 Rb 处于去磷酸化状态,其结合 E2F 家族成员,阻止了 E2F 调控的 G₁/S 期基因表达,细胞阻滞在 G₁ 期(G₁/S 期监测点)。Gadd45 亦在 DNA 损伤时细胞周期监测点的调控、DNA 修复和细胞凋亡过程中起到重要的作用。

2.1 Gadd45 在肿瘤细胞周期中的生物学作用及意义

Gadd45 表达通过 BRCA1 和 p53 的影响,进而参与细胞周期的调控。近年来本课题组着重研究了 p53/Gadd45 通路和 BRCA1/Gadd45 通路在调控细胞周期 G₂/M 监测点和中心体(centrosome)复制中的分子机制,以揭示细胞增殖失调与肿瘤恶性生长的内在联系。其机制主要有以下 4 点:1)Gadd45 是在细胞 DNA 受到损伤或细胞接受生长阻滞信号时被诱导的一种基因,也是世界上首次报道的 P53 蛋白调控的靶基因^[2]。研究发现,Gadd45 蛋白依赖于正常 p53 分子的功能,进而在细胞周期 G₂/M 监测点调控中发挥重大作用。近一步的研究表明,Gadd45 通过与 Cdc2 激酶相互作用,进而导致 Cdc2/Cyclin B1 复合物解离并改变 Cyclin B1 的亚细胞定位,从而抑制 Cdc2 激酶的活性,形成细胞周期 G₂/M 期介导的生长阻滞(即 G₂/M 监测点)^[3]。此外,激活的 Gadd45 蛋白通过 ERK 信号通路反馈性诱导 P53 蛋白稳定性增强。2)探讨了 Gadd45 蛋白的核内转运过程及其相关的机制。Gadd45 是一种无核定位信号(nuclear localization signal)的核蛋白,可能是通过一种特殊的核转运机制被其他载体蛋白带入核内。目前的研究显示,这种载体蛋白(分子伴侣蛋白)可能是核仁磷酸蛋白 B23/NPM^[4]。3)Gadd45 和中心体复制相关的激酶 Aurora-A 有直接的相互作用。由于 Aurora-A 激酶的过度

激活可以导致中心体扩增和染色体畸形,推断并证明 Gadd45 在维持中心体稳定性的生物学功能是通过抑制 Aurora-A 激酶的活性来体现的^[5]。4) 分析 BRCA1 调控 Gadd45 基因的分子生物学机制。证明 BRCA1 对 Gadd45 的调控是发生在基因转录水平, BRCA1 调控 Gadd45 基因的活性位点是在 Gadd45 的启动子上^[6]。但 p53 对 Gadd45 基因的调控是通过直接结合 Gadd45 第3个内含子来进行的。由于 BRCA1 目前还不能被证实是一个能够结合特异 DNA 位点的转录因子,本课题组研究发现 BRCA1 对 Gadd45 基因的调控是通过2个可与 Gadd45 启动子直接结合的转录因子 Oct-1 和 NF-YA 相互作用而体现的。这项研究工作极大地拓宽了 BRCA1 在基因转录调控中的生物学功能^[7]。

2.2 Nlp 在肿瘤细胞周期中的生物学作用及意义

本课题组研究发现了—个与 BRCA1 有直接相互作用且共定位于中心体的新蛋白 Nlp (ninein like protein)。Nlp 在中心体的定位以及蛋白质的稳定性可能依赖于 BRCA1 的正常功能,突变的 BRCA1 或沉默内源性 BRCA1 均会破坏其在中心体的共定位关系以及 Nlp 的降解。抑制内源的 Nlp 会导致异常纺锤体的形成、染色体分离失败、胞质分裂失败以及染色体的非整倍性^[8-9]。

人乳腺癌和肺癌中研究显示, Nlp 过表达可能与 Nlp 基因的扩增有关。Nlp 表现出较强的癌基因特性,可以转化 NIH3T3 成纤维细胞。更有重要的是 Nlp 转基因小鼠的表型与缺失 BRCA1 正常功能的表型相似,包括中心体扩增和自发肿瘤^[10]。可见, Nlp 可能是 BRCA1 调控细胞分裂的重要蛋白分子,在有丝分裂过程中发挥作用, Nlp 的异常可以导致基因组不稳定和肿瘤发生。本课题组最新的研究结果发现, Nlp 的异常高表达明显降低紫杉醇对乳腺癌细胞的杀伤作用,直接影响到临床乳腺癌患者的疗效^[11]。

3 细胞周期分子与临床诊断及肿瘤治疗

细胞周期调控的正常进行以及遗传物质的稳定性与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。因此,鉴定参与调控细胞周期各个环节的蛋白质群并且评价这些蛋白质群在调控细胞周期的各个阶段、维持基因组稳定性中的作用机制以及蛋白质群之间的相互作用对于肿瘤研究至关重要。其中, Cyclins 和 CDKs 所构成的细胞周期时钟复合体以及其相应的抑制分子 CKIs (cyclin kinase inhibitor) 功能的紊乱在多种肿瘤被发现,因此了解 Cyclins/CDKs/CKIs 轴在各型肿瘤中的表达及研究其相应的生物学功能对于临床早

期诊断恶性肿瘤和有效防治肿瘤具有重大的意义和价值。

3.1 Cyclin B1 与肿瘤预后判断、个性化治疗的关联及相应的基础研究

Cyclin B1 蛋白在细胞周期中呈时相性表达,在 G₂/M 期时表达达到峰值,并与 CDK1 结合形成复合体,启动有丝分裂,进而诱导 G₂/M 期的转变。Cyclin B1 表达的紊乱能够导致细胞周期运行的失控及细胞恶性转化。在多种肿瘤中,如食管鳞癌、肺癌、头颈部肿瘤、乳腺癌、直肠癌、肝癌、肾癌及胰腺癌中均发现了 Cyclin B1 的过表达。Cyclin B1 过表达的机制可能与原癌基因 c-myc、H-Ras 等诱导的启动子活性增强, mRNA 稳定性增加及 p53 介导的转录后调节有关。Cyclin B1 过表达可作为肿瘤恶性进展的指征,对判断多种鳞状细胞癌,如食管鳞癌、肺鳞癌和舌癌等患者预后及生存率有着重要的意义。利用反义寡核苷酸等方法特异性地抑制多种肿瘤细胞中 Cyclin B1 基因的表达,能够显著地抑制这些肿瘤细胞的恶性增殖,说明 Cyclin B1 作为临床肿瘤治疗靶点的应用价值。此外,乳腺癌患者中 BRCA1 基因缺陷时常伴有 Cyclin B1/CDK1 复合体功能亢进。因此,在乳腺癌的治疗过程中,除了判断 BRCA1 基因的缺失与否,检测 Cyclin B1 的表达情况对乳腺癌的个性化治疗起到了重要的作用。虽然大量临床研究显示了 Cyclin B1 与肿瘤的关联性,但是对于 Cyclin B1 诱导肿瘤恶性进展的机制却知之甚少。本课题组研究首次证实了 Cyclin B1 在肿瘤细胞的过度表达能够诱导肿瘤细胞向特定器官转移。进一步研究发现食管鳞癌细胞中过表达的 Cyclin B1 能够导致细胞的恶性增殖和侵袭转移,特别是透过微血管内皮向肺组织侵袭转移能力的增强。抑制食管鳞癌细胞中过表达的 Cyclin B1 能够显著抑制食管鳞癌的生长和对肺组织的靶向性转移。其分子机制研究发现, Cyclin B1 诱导侵袭转移能力的增强与激活 NF- κ B 信号通路介导的上皮-间质转化(EMT)有关^[12]。此外,研究还发现 Cyclin B1 能够通过激活 PI3K/AKT 信号通路,参与食管鳞癌化疗药耐药的产生,进一步证实了 Cyclin B1 作为肿瘤治疗药物靶点的重要意义^[13]。

3.2 Aurora-A 与肿瘤预后判断、个性化治疗的关联及相应的基础研究

Aurora 激酶家族分为3个成员: Aurora-A、Aurora-B 和 Aurora-C,主要调节中心体和微管的功能。其中 Aurora-A 在 G₂/M 期转变、中心体分离、纺锤体装配以及胞质分裂中扮演了重要的角色。在结肠癌、

乳腺癌、卵巢癌、胃癌,肝癌、胰腺癌、食管鳞癌及胃癌等临床研究中 Aurora-A 均过表达。Aurora-A 过表达的机制可能与其基因组扩增,进而导致中心体异常以及 p53 分子的突变及 Aurora-A 本身在肿瘤组织中存在的基因多态性有关。在胃癌、结肠癌及头颈肿瘤等临床研究中 Aurora-A 的基因拷贝数均过度增加。Aurora-A 的基因多态性能够诱导其激酶活性的增强,更易出现非整倍体细胞,并与绝经后妇女患乳腺癌的风险性呈正相关^[14]。Aurora-A 基因与蛋白在非小细胞肺癌组织中表达明显高于邻近正常组织,并且其表达情况与 TMN 分级、组织分化程度、淋巴结转移、远处器官转移、复发和家族史等都存在明显的相关性^[15]。进一步研究其机制,发现 Aurora-A 在不同非小细胞肺癌细胞系中的表达程度与其 DNA 拷贝数有关^[16]。针对此机制,在非小细胞肺癌中通过 Aurora-A 特异性抑制剂能够抑制多种非小细胞肺癌细胞系的恶性生长。此外,Aurora-A 的蛋白表达量与肾母细胞瘤的临床分期关系密切,针对 Aurora-A 活性的抑制剂在临床前期肾母细胞瘤的治疗过程中显示了良好的应用前景。基于这些认识,开发 Aurora-A 的特异性抑制剂能够为肿瘤个性化治疗提供一种新的策略。本课题组研究发现,Aurora-A 能够与抑癌基因 AP-2 α 相互结合,进而降低 AP-2 α 的稳定性并通过蛋白酶体促进其降解,进一步丰富了 Aurora-A 在诱导肿瘤发展过程中的生物学机制^[17]。研究还发现,Aurora-A 过表达能够提高食管鳞癌细胞的增殖、黏附及侵袭转移能力,并增强裸鼠的致瘤能力和对周围组织的侵袭能力,与食管鳞癌的临床病理分级存在明显的相关性。利用 siRNA 干扰 Aurora-A 的表达后发现,抑制 Aurora-A 表达能够使食管鳞癌细胞的生长和侵袭能力显著降低。从另一个角度发现了 Aurora-A 在食管鳞癌中的促肿瘤功能并证实 Aurora-A 作为食管鳞癌预后判断的独立因素和抗肿瘤药物靶点开发的潜在价值^[18]。此外,还发现 Aurora-A 能够诱导 Bcl-2 的活性,进而产生化疗药耐药性,进一步丰富了 Aurora-A 的生物学功能和该蛋白的临床应用价值^[19]。

3.3 Cyclin D 与肿瘤预后判断、个性化治疗的关联及相应的基础研究

Cyclin D 家族分为 3 个亚型:Cyclin D1、Cyclin D2 和 Cyclin D3。其中 Cyclin D1 的研究最为广泛,在正常组织中,Cyclin D1 不表达或者表达较低,而在肿瘤组织中,Cyclin D1 经常出现基因扩增,基因重排及突变,导致基因产物增多。在胃癌、乳腺癌、淋巴瘤、原

发性肝癌等临床研究中 Cyclin D1 表达阳性率明显高于正常组织。此外,抑制头颈肿瘤及非小细胞肺癌中高表达 Cyclin D1 的活性显示了良好的肿瘤抑制作用。反义寡核苷酸 Cyclin D1 能够抑制 Cyclin D1 的活性,进而增强卡铂在多种肿瘤中的生长抑制效果,这些研究为肿瘤的治疗提供了新的靶点^[20-21]。

3.4 Cyclin E 与肿瘤预后判断及个性化治疗的关联

Cyclin E 能够控制细胞周期进入 S 期,常被视为 S 期的标志物,Cyclin E 介导的 G₁/S 期决定和限速作用在细胞周期的运转过程中起到中心调控作用。Cyclin E 过表达主要由于其基因扩增所诱导,这些过表达的 Cyclin E 能够形成大量畸形的中心体,有利于细胞的转化和肿瘤恶性增殖。在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、食管癌、胃癌、膀胱癌及白血病等临床研究中 Cyclin E 均过度表达。因此,Cyclin E 在恶性肿瘤发生发展中扮演的癌基因角色越来越被学者们认同,在临床上逐渐被作为一种独立或者联合指标用来判断疾病进展程度和患者预后^[22-24]。

3.5 p16 与肿瘤预后判断及个性化治疗的关联

p16 基因又称为多肿瘤抑制基因(multi-tumor suppressor gene, MTS1)。该基因定位于 9 号染色体短臂,主要抑制 CDKs 的活性,起到分子刹车的作用。在多种肿瘤中,如肺癌、肝癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌及神经胶质瘤等,p16 基因出现较高频率的功能缺失性突变。胃癌、肝癌及非小细胞肺癌等临床研究中 p16 基因缺失。作为功能与 p16 相类似的抑癌基因 p14 也能够起到细胞周期阻滞的作用。但是 p14 作用机制与 p16 不同,不与 CDK 激酶结合,主要通过诱导 MDM2 从核质向核仁转位,进而使 p53 在核质中积累导致 p53 的稳定性增强^[25-26]。在许多人类肿瘤细胞中,如肺癌、白血病、黑色素瘤及肝癌等细胞中 p14 基因均出现了缺失性突变。这种 p14 基因的缺失性突变也能够被作为判断肿瘤患者预后的临床指征。通过腺病毒将 p16 基因导入肺癌、乳腺癌及膀胱癌细胞中,能够造成细胞周期阻滞,进而抑制肿瘤细胞的生长,为肿瘤的靶向基因治疗提供了策略和思路。

3.6 p21 与肿瘤预后判断及个性化治疗的关联

p21 是最先发现的 CKI 基因,定位于 6 号染色体短臂 21.2。作为一种抑癌基因,p21 通过与多个 Cyclin/CDK 复合体结合,进而抑制其活性,在细胞周期的多个时相起到阻滞作用。此外,p21 的 C 端还有增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合域,与 PCNA 结合后使之不能与 DNA 聚合酶形

成复合物,阻止DNA全酶复合物在DNA单链上滑动,抑制DNA复制。多种肿瘤中存在着p21的多态性突变,导致p21难以抑制Cyclin/CDK复合体的形成^[27-28]。p27与p21有较高的同源性,亦能够与多种Cyclin/CDK结合并抑制其活性。近年来,p27在肿瘤中的异常表达与肿瘤恶性增殖的关系受到广泛重视,在乳腺癌、膀胱癌、胃癌、肺癌及结肠癌等多种肿瘤中p27的表达水平下降^[29-31]。因此,p21、p27基因的功能缺失性突变和多态性突变都能够被用来作为判断肿瘤患者预后。将外源性p21基因通过基因克隆的方法转染入慢性粒细胞白血病细胞系中能够显著抑制细胞的恶性增殖,并诱导细胞凋亡。

3.7 细胞周期分子与肿瘤治疗

放疗和化疗是治疗恶性肿瘤最重要的手段,但肿瘤细胞对放疗产生耐受及对化疗药物产生耐药常常最终导致放化疗失败。肿瘤细胞的细胞周期监测点缺陷有可能是增加放化疗治疗效果的希望所在。细胞周期监测点缺陷的肿瘤细胞对电离辐射和某些抗癌药物十分敏感。其机制是监测点缺陷的肿瘤细胞在放射线和化疗药物引起DNA损伤后,不能正常行使监测点功能,细胞周期不能停滞,修复机制不被启动,而细胞周期强行通过时启动了细胞凋亡机制,从而更容易使细胞死亡。基于此研究理论,目前开发的多种消除细胞周期G₂监测点功能的药物,如咖啡碱和UCN-01等,能增加放射线的治疗作用。可见,细胞周期监测点缺陷既是肿瘤发生的根本原因,又是研制特异性肿瘤治疗的靶点。阐明细胞周期相关分子及其相应机制可以为临床肿瘤治疗药物和特异的治疗方案提供理论基础,达到有效治疗恶性肿瘤的目的。

近年来,各种组学研究的迅速发展和生物信息学的利用使化疗药物作用机制等方面的研究获得了突破性进展。分析化疗药物对肿瘤细胞杀伤效应与特定基因的表达和/或多态性的关联性,选择合适的药物进行个体化治疗,已经成为提高疗效、减少无效治疗的合理选择。肿瘤组织中多种靶标基因mRNA表达水平可以用来预测患者对多种常用化疗药物的反应。此外,对于细胞周期相应分子的基因表达情况及多态性研究也日益丰富。了解这些基因表达及多态性情况对选择有针对性的药物及其剂量,开展个性化治疗,提高治疗效果起到了重要的作用。

4 细胞周期分子与药物设计

4.1 作用于细胞周期的抗肿瘤药物

细胞周期的异常运转是肿瘤细胞恶性增殖的核

心环节,其中S期的DNA合成和G₂/M期的细胞有丝分裂对维持肿瘤细胞的恶性增殖尤为重要。各种抗肿瘤药物对肿瘤细胞的生长抑制大都体现在对于细胞周期这2个时相的调控上。因此,针对这2个时相以及相应药物的研究对于了解细胞周期和化疗药的相互关系起到重要的作用。1)作用于S期化疗药物主要有喜树碱和氟尿嘧啶。喜树碱作为从中国珙桐科植物喜树中分离出来的化合物能够通过抑制拓扑异构酶I(Topo I)活性,进而抑制DNA的复制和转录,使细胞阻滞在S期。喜树碱在多种肿瘤,如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、直肠癌、乳腺癌及皮肤癌等中具有抗肿瘤活性。氟尿嘧啶是一类广谱的抗肿瘤药物,在肿瘤细胞中氟尿嘧啶转化为氟尿嘧啶脱氧核苷酸,并与还原型四氢叶酸及胸腺嘧啶核苷酸合成酶结合,使胸腺嘧啶核苷酸合成酶失活,进而抑制S期的DNA合成,达到抗肿瘤的效果。2)作用于G₂/M期化疗药物主要有紫杉醇和长春新碱。紫杉醇作为临床常用的化疗药能够用来治疗多种实体瘤,如肺癌、胃癌、肝癌、头颈肿瘤、食管鳞癌等。通过破坏微管的聚合,使肿瘤细胞阻滞在G₂/M期,导致Cyclin/CDK复合体,特别是Cyclin B1/CDK1复合体难以形成,最终阻止细胞的有丝分裂,促进肿瘤细胞的凋亡。另外,长春新碱亦可通过作用于微管,抑制微管聚合进而使细胞阻滞于G₂/M期,进而对多种肿瘤,如胃癌、肝癌、小细胞肺癌等起到杀伤作用。

4.2 基于Aurora-A、Cyclin B1及MDM2的化疗药物开发

基于大量前期研究并结合本课题组研究成果,Aurora-A、Cyclin B1及MDM2有望作为新型细胞周期分子靶点,用于化疗药物的开发。其中,Aurora-A靶向小分子化合物(MLN8054)能够竞争性结合Aurora家族成员中ATP结合位点抑制Aurora,特别是Aurora-A的激酶活性。其机制主要与MLN8054抑制Aurora-A T288位点的自磷酸化有关。此外,MLN8054诱导肿瘤细胞的凋亡作用能够在多种p53缺陷性的肿瘤细胞中产生,进一步说明了MLN8054能够不依赖于p53的作用抑制肿瘤生长。PHA-680632作为与MLN8054功能相类似的小分子化合物,在临床前实验中已被证实可用于多种肿瘤细胞系,并且其半数抑制率已达到nM级。此外,PHA-680632还能够增敏放疗在肿瘤治疗过程中的效果,证实了PHA-680632能够联合其他抗肿瘤方案的疗效。喹啉噻唑啉酮类化合物(RO-3306)能够竞争性结合CDK1中ATP结合位点,抑制Cyclin B1/CDK1复合体的功能,诱导G₂/M

期阻滞,进而导致多种肿瘤细胞的凋亡。MDM2通过与野生型p53相互拮抗,进而起到癌基因的作用。通过分子对接及进一步活性筛选实验发现的一些抑制MDM2-p53结合的小分子化合物,如苯二氮平类、螺-吡啶酮类、Nutlin-3等均在临床前细胞实验中显示了良好的肿瘤抑制效果。

4.3 天然产物及单克隆抗体对肿瘤细胞周期的作用

目前正在临床应用或者处于临床前研究的多种抗肿瘤药物,如一些天然产物及单克隆抗体等均具备了一定的细胞周期抑制作用。因此,研究这些药物的细胞周期调节作用,对于理解药物的抗肿瘤药理机制及效应起到了重要的作用。其中多种生物碱类、黄酮类及萜类天然产物能够作用于细胞周期各个时相,进而起到抗肿瘤作用。如苦参碱能够使肝癌细胞系和慢性粒细胞白血病细胞系阻滞于S期,同时抑制端粒酶活性,进而抑制细胞生长。此外,从槟榔树果中提取的槟榔碱能够使口腔上皮癌细胞系阻滞于G₂/M期,起到细胞毒作用。水飞蓟素能够通过提高CKIs,特别是p21的活性,进而抑制Cyclin D/CDK4复合体的功能,使肿瘤细胞的细胞周期阻滞于G₁期。异黄酮类能够在低剂量时使细胞阻滞于G₂/M期,高剂量时使细胞阻滞于S期,进而抑制多种肿瘤细胞生长。萜类化合物棉子酚能够使肿瘤细胞的细胞周期阻滞于S期,而多萜类及半萜类化合物能够抑制多种肿瘤细胞的G₁期。

虽然目前无特异性针对细胞周期分子的单克隆抗体,但是多种酪氨酸激酶受体抑制剂能够抑制各种生长信号及激酶受体本身对下游促细胞周期分子特别是对CDKs的激活效应,进而间接地起到细胞周期阻滞作用。

4.4 基于CDKs的小分子化合物开发

当前CDKs抑制剂开发的方向主要针对CDKs-ATP结合位点结构的高度保守性,采用分子对接及相应的高通量筛选等技术获得小分子化疗药物。主要的CDKs小分子抑制剂主要分为以下3类:嘌呤衍生物、Flavopiridols及Paullones。1)嘌呤衍生物主要包括6-二甲基-氨基嘌呤、Isopentenyladenine、Olomoucine、Roscovitine及其衍生物等。其中,6-二甲基-氨基嘌呤是第1代CDKs抑制剂,其作用靶点为CDK1,但其作用特异性不高。第2代和第3代嘌呤的衍生物(Isopentenyladenine和Olomoucine)对CDKs的作用强度及选择性均较强,但是其半数抑制浓度仍停留在 μM 级。第4代衍生物Roscovitine是对

Olomoucine进行进一步结构改造的产物,对CDK1及CDK2激酶抑制活性半数抑制浓度值达到了nM级。由于Roscovitine对肿瘤细胞的增殖有较高的抑制作用以及副作用较小,目前已经进入II期和III期临床试验。2)Flavopiridol是一种源于植物的黄酮类化合物,从树皮中提取出纯化化合物,对其进行结构改造,人工合成了一系列衍生物。临床前研究显示,Flavopiridol具有广谱的CDKs抑制活性,其中对CDK1、CDK2及CDK4激酶活性的抑制作用尤其明显^[32-33]。尽管Flavopiridols对肿瘤细胞的增殖有显著的抑制作用,但由于其对正常细胞毒性较为严重,因此开发与之药理作用相近但正常细胞毒性较少的CDKs抑制剂成为必然,在对其结构进行改进后获得了Paullones衍生物。3)Paullones类化合物对CDK1和CDK2及CDK5有特异性的抑制作用,其中,Alsterpaullone和Kenpaullone对CDKs激酶的半数抑制浓度均已达到nM级,且毒性作用较低。因此,基于细胞周期调控分子CDKs在肿瘤发生中的重要作用,CDKs抑制剂的开发成为肿瘤治疗的新亮点。

5 结语

本文以细胞周期为核心,系统分析了细胞周期对肿瘤发生发展的生物学影响,及相应的临床诊断和药物治疗的意义。为深入了解恶性肿瘤的发生发展机制,寻找有效的肿瘤诊断、治疗靶点和制定治疗方案提供新的思路 and 理论依据。

参考文献

- Zhan Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage[J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1-2): 133-143.
- Zhan Q, Chen IT, Antinore MJ, et al. Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18(5): 2768-2778.
- Jin S, Tong T, Fan W, et al. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity[J]. *Oncogene*, 2002, 21(57):8696-8704.
- Gao H, Jin S, Song Y, et al. B23 regulates Gadd45a nuclear translocation and contributes to Gadd45a-induced cell cycle G2-M arrest[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(12):10988-10996.
- Shao S, Wang Y, Jin S, et al. Gadd45a interacts with aurora-a and inhibits its kinase activity[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39):28943-28950.
- Jin S, Zhao H, Fan F, et al. BRCA1 activation of GADD45 promoter[J]. *Oncogene*, 2000, 19(35):4050-4057.
- Fan W, Jin S, Tong T, et al. BRCA1 regulates GADD45 through its interactions with the OCT-1 and CAAT motifs[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10):8061-8067.
- Wang Y, Zhan Q. Cell cycle dependent expression of centrosomal

- ninein-like protein in human cells is regulated by the anaphase-promoting complex[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(24):17712–17719.
- 9 Li J, Zhan Q. The role of centrosomal Nlp in the control of mitotic progression and tumorigenesis[J]. *Br J Cancer*, 2011, 104(10):1523–1528.
- 10 Shao S, Liu R, Wang Y, et al. Centrosomal Nlp is an oncogenic protein that is gene-amplified in human tumors and causes spontaneous tumorigenesis in transgenic mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(2):498–507.
- 11 Zhao W, Song Y, Xu B, et al. Overexpression of centrosomal protein Nlp confers breast carcinoma resistance to paclitaxel[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(3):156–163.
- 12 Song Y, Zhao C, Dong L, et al. Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(2):307–315.
- 13 Ou Y, Ma L, Ma L, et al. Overexpression of cyclin B1 antagonizes chemotherapeutic-induced apoptosis through PTEN/Akt pathway in human esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(1):45–55.
- 14 Ruan Y, Song AP, Wang H, et al. Genetic polymorphisms in AURKA and BRCA1 are associated with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population[J]. *J Pathol*, 2011, 225(4):535–543.
- 15 Provencio M, Camps C, Cobo M, et al. Prospective assessment of XRCC3, XPD and Aurora kinase A single-nucleotide polymorphisms in advanced lung cancer[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 70(6):883–890.
- 16 Hook KE, Garza SJ, Lira ME, et al. An integrated genomic approach to identify predictive biomarkers of response to the aurora kinase inhibitor PF-03814735[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(3):710–719.
- 17 Zou L, Sun Y, Wang M, et al. Aurora-A interacts with AP-2 α and down regulates its transcription activity[J]. *Plos One*, 2011, 6(8):e23110.
- 18 Tong T, Zhong Y, Kong J, et al. Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(21):7304–7310.
- 19 Wang XX, Liu R, Jin SQ, et al. Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line[J]. *Cell Res*, 2006, 16(4):356–366.
- 20 Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(8):558–572.
- 21 Saini SS, Klein MA. Targeting cyclin D1 in non-small cell lung cancer and mesothelioma cells by antisense oligonucleotides[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(11):3683–3690.
- 22 Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortés J, et al. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(9):3761–3766.
- 23 Huang LN, Wang DS, Chen YQ, et al. Meta-analysis for cyclin E in lung cancer survival[J]. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(7–8):663–668.
- 24 Davidson B. The diagnostic and molecular characteristics of malignant mesothelioma and ovarian/peritoneal serous carcinoma[J]. *Cytopathology*, 2011, 22(1):5–21.
- 25 Maglic D, Zhu S, Fry EA, et al. Prognostic value of the hDMP1-ARF-Hdm2-p53 pathway in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(35):4120–4129.
- 26 Eischen CM, Boyd K. Decreased Mdm2 expression inhibits tumor development and extends survival independent of Arf and dependent on p53[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e46148.
- 27 Radu M, Semenova G, Kosoff R, et al. PAK signalling during the development and progression of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 14(1):13–25.
- 28 Warfel NA, El-Deiry WS. p21WAF1 and tumorigenesis: 20 years after[J]. *Curr Opin Oncol*, 2013, 25(1):52–58.
- 29 Wei F, Xu J, Tang L, et al. p27(Kip1)V109G polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27(10):665–671.
- 30 Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, et al. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(6):677–693.
- 31 Wander SA, Zhao D, Slingerland JM. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(1):12–18.
- 32 Hayashi T, Adachi K, Ohba S, et al. The Cdk inhibitor flavopiridol enhances temozolomide-induced cytotoxicity in human glioma cells[J]. *J Neurooncol*, 2013, 115(2):169–178.
- 33 Blachly JS, Byrd JC. Emerging drug profile: cyclin-dependent kinase inhibitors[J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54(10):2133–2143.

(2013-12-20 收稿)

(2013-12-30 修回)

(本文编辑:张佷)