

- chemotherapy in the treatment of locally advanced cervical cancer [J]. *Tumori*, 2001, 87(1): 25 - 26.
- [7] PARK D C, KIM J H, LEW Y O, et al. Phase II trial of neoadjuvant paclitaxel and cisplatin in uterine cervical cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(2): 59 - 63.
- [8] HWANG Y Y, MOON H, CHO S H, et al. Ten-year survival of patients with locally advanced, stage I-IIb cervical cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical hysterectomy [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 82(1): 88 - 93.
- [9] ZANETTA G, FEI F, MANGIONI C. Chemotherapy with paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin for the treatment of squamous cell cervical cancer: the experience of Monza [J]. *Semin Oncol*, 2000, 24(1): 51 - 59.
- [10] MOSSA B, FRAMARINO M L, NAPOLITANO C, et al. Does adjuvant chemotherapy improve the prognosis of cervical carcinoma with lymph-node metastasis? A long-term follow-up [J]. *Eur J Gynecol Oncol*, 2003, 24(1): 33 - 40.
- [11] AOKI Y, SATO T, WATANKE M, et al. Neoadjuvant chemotherapy using low-dose consecutive infusions of cisplatin combined with 5-fluorouracil for locally advanced cervical adenocarcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 81(3): 496 - 499.
- [12] PETERS W A, LIU P Y, BARRETT R J, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk-stage cancer of the cervix [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18(5): 1606 - 1613.
- [13] PARK T K, KIM S N, KWON J Y, et al. Postoperative adjuvant therapy in early invasive cervical cancer patients with histopathologic high-risk factors [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, 11(6): 475 - 478.
- [14] SYMONDS R P, HABESHAW T, REED N S, et al. The Scottish and Manchester randomised trial of neoadjuvant chemotherapy for advanced cervical cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(8): 994 - 1001.
- [15] 邵学叶, 杨兆禄, 赵明军. 化放疗联合治疗晚期宫颈癌疗效观察 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(10): 1088 - 1089.
- [16] TATTERSALL M H, LORVIDHAYA V, VOOTIPRUX V, et al. Randomized trial of epirubicin and cisplatin chemotherapy followed by pelvic radiation in locally advanced cervical cancer. Cervical Cancer Study Group of the Asian Oceanian Clinical Oncology Association [J]. *J Clin Oncol*, 1995, 13(2): 444 - 451.
- [17] TABATA T, TAKESHIMA N, NISHIDA H, et al. A randomized study of primary bleomycin, vincristine, mitomycin and cisplatin (BOMP) chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in stage III b and I V_A squamous cell carcinoma of the cervix [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(6): 2885.
- [18] ROSE P G, BLESSING J A, GERHENSON D M, et al. Paclitaxel and cisplatin as first-line therapy in recurrent or advanced squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(6): 2676 - 2680.

(收稿 2005 - 11 - 10)

热休克蛋白的生物功效及与肿瘤热疗的研究进展

王淼舟 综述 李苏宜 审校

在突然升温和其他应激的条件下,一切生物细胞包括原核细胞及真核细胞都合成了一系列蛋白质,这些蛋白质称为热休克蛋白(heat shock protein, HSP),又称应激蛋白。根据同源程度及分子量大小可分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、小分子 HSP(22 ~ 23 ku) 以及泛素等几个家族。HSP 在细胞生长、发育、分化、基因转录等功能方面发挥重要的作用,其主要的生物学功能是在应激状态下保护细胞生命活动必需的蛋白质,维持细胞生存。

HSP 表达的改变不仅可能是细胞老化的因素,而且还可以作为判断细胞生理状态和应激能力的指标。近年来的研究表明 HSP 还参与某些病毒蛋白的成熟。在肿瘤细胞中,一些 HSP 家族成员表达增强并参与肿瘤细胞的某些生物活动。本文仅综述其中较突出的几个内容。

1 HSP 与肿瘤的关系

1.1 HSP 与肿瘤的发生及转移

HSP 与细胞的转化密切相关。在癌基因转化的

细胞和人类恶性肿瘤细胞系中, HSP 表达增高;酪氨酸激酶抑制剂格尔德霉素能通过破坏 HSP90 与 pp60v src 复合物的形成而使肿瘤细胞逆转;抑癌基因发挥抑癌作用有赖于它与 HSP 的结合,如抑癌基因 P53 与 HSP70、HSP90 的结合能抑制肿瘤的发生与生长。此外, fes、fps、yes、fgr 等转化蛋白也可与 HSP90 结合,通过肌动蛋白将其定位于细胞骨架上,以介导细胞的转化诱发肿瘤的发生。HSP10 通过分子伴侣在肝细胞癌的发生中发挥重要的作用^[1]。因此,深入研究 HSP 在肿瘤发生中的作用,有可能使我们对肿瘤的无限增殖机制有更深入的了解。另外 HSP 与肿瘤的侵袭、新生血管生成和转移相关。HSP90 也可以影响新生血管生成,它可以在多个层次不同程度地破坏新生血管生成过程中很多关键的信号级联反应^[2]。HSP60 与表达于乳腺癌细胞膜表面的 $\alpha 3\beta 1$ 整合素结合,提高后者活性,而肿瘤细胞的增殖、肿瘤的转移和侵袭力的大小都依赖于 $\alpha 3\beta 1$ 整合素的活性,因此, HSP60 在乳腺癌细胞的转移中发挥作用。HSP90 参与对肿瘤细胞周期的调控。

HSP90 活性被抑制后可以使乳腺癌细胞株停滞在 G₁ 期,而且这种阻滞的发生依赖于细胞内 Rb 的表达,并最终会导致细胞分化或凋亡^[3]。

1.2 HSP 与肿瘤细胞凋亡

HSP 以直接或间接的方式参与了细胞凋亡的调节,其作用靶点涉及不同凋亡信号通路的主要激酶或关键性调控蛋白。除对凋亡相关信号转导通路的蛋白质直接调节作用之外,还涉及了一些细胞膜生长因子受体,如 EGFR、ErbB2、FLT3 及细胞内雌、雄激素受体等蛋白质稳定性和活性的调节,这种调节作用具有双向性,即既有抗凋亡的作用,也有促凋亡的作用。细胞凋亡分为线粒体通路介导的凋亡及死亡受体通路介导的凋亡,而 HSP 不同程度地对这两条通路的活化具有调节作用。研究表明 HSP 家族成员可以对凋亡体形成的不同阶段发挥阻断作用,如 HSP70 可以通过阻断细胞色素 c 的释放、阻断 Apaf-1 寡聚化及阻断 caspase-9 的活化等多重环节阻断凋亡体的形成。而 HSP90 及 HSP27 则分别通过阻断 Apaf-1 寡聚化及直接阻断细胞色素 c 与 Apaf-1 的结合,最终阻断凋亡

作者单位: 210009 南京市, 东南大学医学院附属中大医院临床肿瘤中心

体的形成^[4]。但也有不少研究认为, HSP 具有促凋亡作用。新近的研究表明 HSP90 和辅助伴侣分子 p50cdc37 还参与了对 JNK 及 p38 上游激酶 MLK3 稳定性和活性的调节, 当 HSP90 功能受到抑制时, MLK3 激酶水平明显降低 NF κ B 诱导的 MLK3 及 JNK 的活化随之被阻断^[5], 这一结果提示可能一些促进凋亡的蛋白质同样受到 HSP90 伴侣功能调控。TNF 可以启动 3 种不同的信号转导通路, 即 NF- κ B 通路和 JNK 通路的活化及诱导细胞凋亡, 在 TNF 诱导的 NF- κ B 通路活化的过程中, 需要形成由胞内重要的受体交互作用蛋白, 而 HSP90 可以通过维持此蛋白的稳定性, 提高 NF- κ B 的活性, 介入阻断 TNF 诱导的细胞凋亡, 此外 HSP90 还可以通过调节 AKT 激酶而间接影响 NF- κ B 的活性。死亡受体介导的凋亡在原发性肝癌中 HSP70 呈过表达, 其表达率与肿瘤细胞凋亡指数呈正相关。

1.3 HSP 与肿瘤免疫 HSP70 可通过多种机制发挥其抗肿瘤活性。HSP70 作为分子伴侣与肿瘤细胞内的内源性多肽结合, 呈递给杀伤细胞介导抗肿瘤作用; 通过激活细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) (CD8⁺) 杀伤肿瘤细胞; 通过自然杀伤细胞 (NK) 发挥作用, 同时激活辅助性 T 淋巴细胞释放细胞因子, 经细胞免疫途径发挥抗肿瘤效应。HSP 的高表达不仅参与肿瘤抗原的加工递呈, 而且可作为抗原递呈分子直接将肿瘤抗原肽递呈给 T 细胞, 激发 T 细胞介导的特异性抗肿瘤细胞免疫。用 HSP70 免疫小鼠后引起外周血中 CD8⁺T 细胞及 Th1 型细胞因子升高, 肿瘤生长受到抑制, 2 周内肿瘤全部消退^[6]; 用适量肿瘤来源的 gp96 免疫小鼠可产生依赖于 CD4⁺T 细胞的抗肿瘤免疫, 它也可通过诱导树突状细胞 (DC) 产生细胞因子来调节免疫反应; 此外, 表达于凋亡肿瘤细胞表面的 HSP60 可向吞噬细胞和 DC 提供必要的信号, 使其分泌致炎细胞因子, 促进 DC 成熟, 诱发机体 T 细胞的抗肿瘤免疫效应。热疗增加了 HSP 免疫原性, 还使得 HSP 从细胞浆转移到细胞核, 同时它导致了浸润肿瘤的巨噬细胞的增加^[7]。SRIVASTAVA 等发现 HSP 引起抗肿瘤免疫的特异性是由 HSP 伴随的小分子蛋白抗原肽决定的。在肿瘤形成过程中累积了一系列肿瘤特异性的小分子肽, 肿瘤组织的 HSP 结合这些小分子肽成为 HSP-抗原肽复合物, 后者具有免疫原性, 这一机制的阐明为 HSP-抗原肽复

合物用于肿瘤的免疫治疗提供了依据。

1.4 HSP 与肿瘤耐药性 肿瘤细胞耐药是化疗失败的重要原因之一, 耐药是多种机制共同作用的结果。P-gp 是一个由多药耐药 (mdr1) 基因编码的细胞膜糖蛋白, 是高度保守的 ABC 转运蛋白, 是一种能量依赖性药物排出泵。唐武兵等^[8]研究发现热休克后 P-gp 表达增高, 伴随 HSP70 表达, 提示 HSP70 可能与 P-gp 有相关关系, 高表达 HSP70 的肿瘤细胞耐药性增高。长期化疗在导致肿瘤细胞 P-gp 过度表达时, 还可诱导 HSP70 表达增强。石永进等^[9]实验证实热疗诱导 HSP70 在药物敏感株 MCF7 上的表达超过了多药耐药株 MCF7/ADR, CIK 细胞对 MCF7 的杀伤活性也超过了 MCF7/ADR。说明多药耐药株更易于出现免疫逃逸, 这可能与 HSP70 和 P-gp 间的调控有关。HSP 的作用具有双相性。LIU 等^[10]在用顺铂来治疗卵巢癌细胞系 CaOV3 的试验中发现肿瘤细胞的药物抵抗与 HSP70、HSP90 的表达水平无关。WORKMAN^[11]发现, HSP 90 可作为某些抗癌药的分子伴侣, 促进药物进入细胞, 发挥选择性抗癌活性。因此, 在肿瘤放、化疗过程中, 采取何种措施尚需进一步研究。

HSP 通过阻碍肿瘤细胞内药物转运、改变肿瘤细胞代谢、多药耐药 (multidrug resistance, MDR)、再生耐药 (regrowth resistance) 等机制造成肿瘤细胞耐药。黄常志等^[12]报道 HSP27、70 在抗阿霉素的乳腺癌细胞系中高水平表达, 与肿瘤的耐药性相关。与耐药相关的还有 HSP90 β , 这是一类可溶性蛋白, 参与对底物蛋白质的作用, 影响信号传递分子的构象变化过程, 可能参与了细胞对化疗药物的抗性作用, 调节细胞对化疗药物的敏感性, 与肿瘤细胞的多药耐药相关^[13]。

2 HSP 与肿瘤热疗的关系

HSP 与肿瘤的放疗、化疗及基因治疗密切相关, 以下就 HSP 与热疗的关系做重点综述。

2.1 HSP 与肿瘤的热疗 实验和临床研究表明, 全身热疗能明显提高病人免疫功能, 减少肿瘤细胞释放血管生长因子, 直接抑制或杀伤肿瘤细胞。热疗不仅可以使肿瘤细胞凋亡, 而且促使肿瘤细胞产生大量的 HSP, 而 HSP 在细胞内作为分子伴侣携带多种多肽物质, 这些多肽正是肿瘤细胞的抗原表位, HSP-抗原肽复合物经肿瘤患者抗原递呈细胞 (APC) 递呈或本身作为抗原递呈分子可

诱发 T 细胞强大的免疫效应^[14]。肿瘤敏感性明显高于正常细胞, 高温可导致肿瘤细胞死亡或抑制其生长, 同时高温还可提高肿瘤细胞对化疗和放疗的敏感性。因此, 肿瘤热疗现已成功用于临床。石永进等^[9]非致死温度处理 MCF7 和 MCF7/ADR 细胞后, 两种靶细胞 HSP70 表达增强, CIK 细胞对这两种靶细胞的杀伤活性均明显增加, 提示热疗可提高肿瘤抗原的免疫原性, 基于热疗的细胞免疫治疗可能会进一步提高肿瘤综合治疗的整体疗效。

2.2 HSP 与热耐受 当机体细胞经过亚致死温度处理后对致死性高温产生耐受性, 即热耐受 (thermotolerance) 现象。有研究表明, 肿瘤细胞的热耐受与 HSP 家族有关。在临床应用过程中发现, 在加热温度低于 43 $^{\circ}$ C (如温和热疗即加热温度为 42 $^{\circ}$ C) 或时间过长时, 肿瘤细胞更易发生热耐受。ROCCHERI 等^[15]研究也发现, 热耐受现象的发生与 HSP70 的诱导表达相关。热耐力是无特异性的, 对其他能引起应激反应的刺激原也同样产生耐受, 即所谓交叉耐受性。而且 HSP 增加的速度很快, 一般几分钟, 最多 30 min 即可达到高水平。MCULLY 将 42 $^{\circ}$ C 高温灌注液直接灌注离体鼠心与对照组相比, HSP-mRNA 的水平于 15 min 增加 5 倍, 30 min 增加了近 10 倍, HSP-72KDA 于 60 min 增加两倍, 这表明预应激能迅速取得高水平 HSP。

HSP 家族中的 HSP70 与细胞在温热作用中的自身保护、热损伤后的修复以及热耐受性的形成有密切关系, HSP70 的表达量直接决定热耐受性的程度。陈斌等^[16]实验结果提示: 胃癌细胞在 41 $^{\circ}$ C 诱导后产生的热耐受性可分两部分, 一为非 HSP70 依赖性细胞热耐受性, 于温热作用后立即产生, 与 HSP70 表达增加无关, 持续时间较短; 另一为 HSP70 依赖性细胞热耐受性, 出现较前者迟, 热耐受性的高低与 HSP70 表达量平行, 持续时间较长。有研究表明: 除 HSP70 外, HSP 家族的其他成员和细胞膜也参与热耐受性的产生。胡永成等研究发现, 虽然热疗过程中热应激使 HSP70 高表达易于产生热耐受, 降低再次热疗效果, 但高表达的 HSP70 可显著提高机体抗肿瘤免疫作用。

2.3 热休克蛋白增强耐受性的机制

2.3.1 分子伴侣 (molecular chaperones) 作用 分子伴侣是指帮助新合成和解折叠蛋白正确折叠和成功组装而本身不具功能的最终装配产物的组成蛋白。而

HSP70 是主要的分子伴侣蛋白,能够和一些细胞中的蛋白质结合,并帮助这些蛋白穿过内质网腔或线粒体膜,其解离过程需 ATP 参与。细胞内有很多蛋白合成后即和 HSP70 暂时结合,以保证其适宜的结构状态。HSP 可以保护细胞免受蛋白变性和降解变性蛋白^[17],因而可以在机体热应激时加快正常蛋白质合成的恢复,使热休克时由于蛋白质变性而造成的蛋白质量的减少得到补充,因此使机体获得热耐受力。

2.3.2 抗氧化作用 HSP 具有抗氧化能力:(1)HSP 可抑制产生氧自由基的关键酶,通过反馈作用减少氧自由基的产生。由于 SOD 能清除氧自由基,故有细胞保护作用, DASDK 发现缺血再灌注引起了数种应激相关的抗氧化基因的激活,包括 HSP70、Mn-SOD 基因。NIEDWIECKIA 等在 37℃ 果蝇中发现 SOD-RNA 水平的增高是与 HSP70 RNA 表达的增高相一致的。(2)HSP 可直接释放和增加内源性过氧化酶如超氧化物歧化酶水平,使机体内源性抗氧化剂合成和释放增加,对随之而来的应激有较强的抵抗作用。(3)HSP 影响糖皮质激素的释放和代谢,并与激素受体结合,保持其非活性形式,将受体由胞降运送到细胞核中,发挥受体的作用。

2.3.3 协同免疫作用 热应激可干扰宿主的炎症反应,高温可以引起吞噬能力的增强,整体高温作用后,单核巨嗜细胞的吞噬作用较常温增大,吞噬作用后细胞产生高浓度的活性氧族(ROS)以及细胞因子,ROS 和细胞因子均可诱导 HSP 的表达,反过来,HSP 通过抑制 ROS 和细胞因子起到保护细胞和组织免受炎症损伤的作用。当刺激因素引起机体细胞免疫应答时,不但有各种细胞因子(IL-1、IL-2、TNF- α 等)产生,同时亦伴有 HSP 的产生,以对抗细胞因子对细胞的损害作用,HSP70 可抑制人的单核细胞产生 IL-1 和 TNF。

2.3.4 抗细胞凋亡作用 HSP70 可以通过抑制凋亡诱导因子 AIF 的功能而保护细胞免于凋亡。AIF 是位于线粒体内膜的黄素蛋白,可以通过 caspas 非依赖的方式直接诱导细胞凋亡。值得注意的是 HSP 对凋亡体的调节是通过其分子伴侣功能来实现的,提示对 HSP 功能的调节将直接影响其对凋亡体的调控作用。

3 存在的问题及展望

HSP 是一种高度保守性蛋白质,在化疗、放疗、热疗等多种应激状态下均会出现差异性表达,所以又存在表达的不

稳定性。它既参与了热应激反应以提高肿瘤的热耐受性,又作为伴侣分子参与了肿瘤抗原免疫原性的调控^[18]。讨论肿瘤的化疗和放疗均可基于热疗提高疗效,热疗的增敏作用亦可用于肿瘤的免疫治疗。

热应激可诱导几乎所有组织细胞合成 HSP,它的细胞保护作用基本明确,但目前还有许多待解决的问题:(1)进一步从分子水平研究阐明 HSP 在肿瘤的发生发展、生物学行为中的确切作用及其机制的关系,利用其作为肿瘤诊断、预后标记物,有重大意义。(2)如何通过药物或其他手段诱导 HSP 以及在肿瘤热疗中如何控制好热疗的温度,使 HSP 适量表达,达到既降低热耐受又提高机体抗肿瘤免疫效应的表达有待于进一步研究。(3)HSP 反义寡核苷酸基因治疗、逆转肿瘤细胞耐药和 HSP-肽复合物免疫治疗及高效广谱 HSPPCS 的肿瘤疫苗研制,尚处于实验阶段,需进一步明确其作用机理,继续改善药物的制备技术等工作,才能最终把它们应用于临床。

4 参考文献

- [1] MUNSTER P N, SRETHAPAKDI M, MOASSER M M, et al. Inhibitors of heat shock protein 90 founction by ansamycins causes the morphological and functional differentiation of breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(7): 2945 - 2952.
- [2] WEBB C P, HOSE C D, KOOCHEKPOUR S, et al. The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor factor-met-urokinase plasminogen activatorplasmin proteolytic network [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (2): 342 - 349.
- [3] GOTOH K, NONOGUCHI K, HIGASHITSUJI H. et al. Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp110 and is overexpressed in hepatocellular carcinomas [J]. *FEBS Lett*, 2004, 560 (1/3): 19 - 24.
- [4] 于晓瘤. 热休克蛋白对细胞凋亡的调控作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27 (1): 1 - 4.
- [5] WANG E. Heat shock protein 90 suppresses tumornecrosis factoralpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bidin NIH3T3fibroblasts [J]. *Cell Signal*, 2004, 16(3): 313 - 321.
- [6] 傅庆国, 孟凡东, 郭克建, 等. 肿瘤热休克蛋白 70 对几种 Th1 型细胞因子的诱升作用 [J]. *肿瘤防治杂志*, 2003, 10(3): 250 - 252.

- [7] IVARSSON K, MYLLYMAKI L. Heat shock protein 70 (HSP70) after laser thermotherapy of an adenocarcinoma transplanted into rat liver [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23 (5A): 3703 - 3712.
- [8] 唐武兵, 马佩球. 热休克诱导人肝癌 HePG2 细胞 HSP70 和 P-gp 的表达及槲皮素对二者的抑制作用 [J]. *癌症*, 2003, 22(9): 954 - 958.
- [9] 石永进, 虞积仁. 热疗促进 HSP70 表达对免疫效应杀伤肿瘤的影响 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2005, 37(2): 175 - 178.
- [10] LIU J R, OPIPARI A W, TAN L, et al. Dysfunction alaptot meactivationinovari an cancer implications for chemo resistance [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(3): 924 - 931.
- [11] WORKMAN P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone [J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(2): 47 - 51.
- [12] 黄常志, 周纯, 赵玫, 等. 反义热休克蛋白的 90 β 对 HeLa 胞恶性表型和药敏感性的影响 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2000, 22(1): 14 - 16.
- [13] SALVIOLI S, STORCI G, PINTI M, et al. Apoptosis-resistant phenotype in HL-60-derived cells HCW-2 is related to changes in expression of stress-induced proteins that impact on redox status and mitochondrial metabolism [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(2): 163 - 174.
- [14] MURTHY R, HONAVAR S G, NAIK M, et al. Thermochemotherapy in hereditary retinoblastoma [J]. *British Journal of Ophthalmology*, 2003, 87(11): 1432.
- [15] ROCCHERI M C, ONORATO K, TIPA C, et al. EGTA treatment causes the synthesis of heat shock proteins in sea urchin embryos [J]. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2000, 3(5): 306 - 311.
- [16] 陈斌, 杨虎川, 杨耀琴, 等. 吐温 80 合并温热对人胃癌细胞热耐受性和 HSP70 表达的影响 [J]. *癌症*, 1999, 18 (S1): 67 - 70.
- [17] WADHWA R, TAIRA K, KAUL S C. An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2002, 7(3): 309 - 316.
- [18] TODRYK S M, EATON J, BIRCHALL L, et al. Heated tumour cells of autologous and allogeneic origin elicit anti-tumour [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(4): 323 - 330.

(收稿 2005-11-08 修回 2006-01-26)