

NF- κ B 与肿瘤发生及药物筛选

NF- κ B、Tumorigenesis and Drug Developement

刘巍峰*, 于珊珊, 李越中

LIU Wei-Feng*, YU Shan-Shan and LI Yue-Zhong

山东大学生命科学院微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

State Key Laboratory of Microbial Technology, School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China

摘 要 NF- κ B 是一类能特异性地识别结合 DNA 的 Rel 类蛋白质二聚体转录因子。在静息细胞中, NF- κ B 与抑制性蛋白 I κ Bs 结合形成复合物, 并被滞留于细胞质中而处于非活化状态; 当细胞受到各种胞内外刺激时, I κ Bs 被迅速地降解, NF- κ B 得以释放并进入细胞核, 从而发挥其转录调节功能。NF- κ B 通过调控众多靶基因的转录表达而在免疫、炎症反应、细胞增殖与凋亡及肿瘤发生等许多生理学过程中发挥重要作用。介绍了 NF- κ B 活化的调控机制, 并对 NF- κ B 信号通路在肿瘤发生等相关过程及其在药物筛选中的作用进行了探讨。

关键词 NF- κ B, IKK, 信号转导, 肿瘤发生, 药物研发

中图分类号 R730.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0012-07

Abstract NF- κ B, a collective name of dimeric transcription factors, is composed of members of the Rel family proteins that recognize and bind a specific DNA sequence. It is normally sequestered in the cytoplasm of non-stimulated cells by associating with a family of inhibitor proteins called I κ Bs. Exposure of cells to a variety of extra-and intra-cellular stimuli leads to the rapid proteolytic degradation of I κ Bs, which frees NF- κ Bs allowing them to translocate to the nucleus where it regulates gene transcription. NF- κ B is involved in a lot of physiological processes such as immunity, inflammation, cell proliferation, apoptosis and even tumorigenesis by regulating the transcription of a larger number of genes. This review introduces the various mechanisms of NF- κ B activation including a recently reported alternative activation pathway mediated by lymphotoxin α/β , B cell activating factor and CD40 ligand. The signal transduction pathway leading to NF- κ B activation via IKK in response to proinflammatory factors like TNF- α and IL-1 is addressed in more detail concerning the regulation of IKK activity, mechanism of I κ B degradation and regulation of transactivation activity of NF- κ B on different levels. Considering the important role of NF- κ B in cell proliferation and regulation of various genes participating in apoptosis, the involvement of NF- κ B in tumorigenesis and drug screening is also discussed.

Key words NF- κ B, I κ B kinase, signal transduction, tumorigenesis, drug development

核因子- κ B (NF- κ B) 是一类能识别并结合特异性 DNA 序列位点 (GGRNYYCC) 的二聚体转录因子。早在 1986 年人们就在 B 淋巴细胞中发现 NF- κ B 能特异性地识别结合免疫球蛋白 κ 轻链基因增强了, 后来发现在几乎所有细胞中 NF-

κ B 均参与许多基因的转录调控^[1]。当细胞处于静息状态时, NF- κ B 被一类能与之结合并覆盖其核易位信号的抑制性蛋白-I κ Bs 滞留在细胞质中; 当细胞受到各种胞内外刺激时, I κ Bs 被迅速地磷酸化和泛素化, 并随之被 26S 蛋白酶小体识

Received: June 25, 2004; Accepted: October 12, 2004.

This work was supported by Grant from the Returned Scholarship Funded by Chinese Ministry of Education (No. 2002-11).

* Corresponding author. Tel: 86-531-8365278; Fax: 86-531-8565234; E-mail: weifliu@sdu.edu.cn

国家教育部归国留学人员科研基金资助项目 (No. 2002-11)。

别并降解,最终 NF-κB 得以释放,其核易位信号被暴露而使之进入细胞核,发挥其基因转录调控的功能。最近十几年,人们不仅对 NF-κB 激活的信号转导途径有了较为详尽地了解,而且发现 NF-κB 除了在免疫炎症反应过程中发挥重要作用外,还参与调控细胞的增殖与凋亡,从而暗示了 NF-κB 可能在细胞的恶性转化以及肿瘤细胞药物抗性的产生过程中发挥着一定的作用; NF-κB 及调控其活性的转导途径也成为相关药物研发的热点。本文将着重对由促炎症因子如 TNF-α 和 IL-1 等引起的,由 IKK 介导的典型 NF-κB 活化机制进行综述,并对最近报道发现的由淋巴毒素 α/β(LTα/β)等激活的变通途径做简单介绍,同时对 NF-κB 在肿瘤发生等相关过程中的作用,针对其的药物研发策略进行探讨。

1 NF-κB 活化的信号转导途径

NF-κB 因子是各种 Rel 类蛋白质 (reticuloendotheliosis oncogen protein) 组合的二聚体。迄今为止,在哺乳动物细胞中已发现了 5 种 Rel 蛋白质: NF-κB1 (p50 和其前体 p105), NF-κB2 (p52 和其前体 p100), c-Rel, RelA (p65) 及 RelB, 其中 RelA 与 p50 形成的异二聚体是最为常见的,也是研究最多的 NF-κB 因子^[1,2]。所有上述蛋白质在 N-末端有一段高度保守的,长达 300 个氨基酸的 RHR (Rel Homology Region, RHR) 区。研究发现, RHR 区主要参与二聚体的形成、DNA 的结合及与 IκB 蛋白质的相互作用, NF-κB 因子的核易位信号也位于 RHR 区。NF-κB 的转录激活域位于蛋白质的 C 末端,不同的 Rel 蛋白质转录激活的能力也不同,其中以 p65/RelA 和 c-Rel 的转录能力最强。基因敲除实验结果发现,不同的 Rel 类蛋白质功能是不同的,相互之间也存在一定的互补作用,但只有 p65/RelA 是小鼠生存所必需的^[3]。最新的研究表明, NF-κB DNA 结合位点中单个核苷酸的差异不仅决定了各种不同 NF-κB 二聚体对该位点识别的特异性,而且还影响到其与转录辅激活因子功能性的相互作用^[4]。

到目前为止,所有的 NF-κB 因子主要都是通过与一类抑制性蛋白质-IκBs 的相互作用得以调控的。已发现的 7 种 IκBs 蛋白质 (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bel-3, p100 和 p105) 均含有 30~33 个氨基酸的锚蛋白重复序列 (ankyrin repeat), 此序列可介导 IκBs 与 NF-κB 因子 RHR 区的结合。其中 IκBα, β, ε 含有 N-末端可调节序列,此调节序列是 NF-κB 活化过程中胞外刺激诱导 IκBs 降解所必需的。除 IκBβ 外,其他 IκBs 的转录表达均受 NF-κB 的调控。IκBα -/- 敲除小鼠在出生后 7 天由于 NF-κB 活性提高引起的持续炎症反应而死亡,其他 IκBs 的生理学功能还不清楚。

很多胞外刺激信号都可以引起 NF-κB 的活化,如促炎症细胞因子 TNF-α、IL-1、细菌脂多糖 (LPS)、T 细胞及 B 细胞丝裂原、病毒双链 RNA 以及各种物理和化学应力等^[5] (图 1)。虽然这些胞外刺激所产生的胞内早期信号途径各不相同,如 TNF-α 与其膜受体 (TNFR1) 结合后,可以募集 TRADD、RIP 及 TRAF2 等形成上游信号转导复合物;而 IL-1 则引起 IL-1 受体 (IL-1R1)-IL-1RACP-MYD88-TRAF6 复合物的形成,其中 TRAF

蛋白 N 末端 RING 指的寡聚化是引起 NF-κB 活化所必需的。但一般认为,大多数此类胞外刺激起始的信号传递反应将最终激活一种蛋白激酶复合物-IKK (IκB kinase complex, IKK), 尤其是 IKKβ 来直接引起 IκBα 第 32 位和第 36 位丝氨酸残基及 IκBβ 第 19 位和第 32 位丝氨酸残基的磷酸化修饰,这种 IκB 的 N 末端磷酸化修饰是典型的 NF-κB 活化过程中最关键的步骤之一。磷酸化的 IκB 可以直接被 SCF 类泛素连接酶 E3 的 IκB 受体蛋白亚基 βTrCP 识别结合,进而使 IκB 上形成泛素聚合链,这种被泛素修饰的 IκB 可以立即被 26S 蛋白酶体降解,从而使 NF-κB 脱离 IκB 的羁绊进入细胞核发挥转录调节功能。最近,人们发现了另一条 NF-κB 活化的变通转导途径^[5],此途径特异性地受淋巴毒素 α/β、B 细胞激活因子 (BAFF) 及 CD40 配体 (CD40L) 的调控。但该途径的活化通过 IKKα 而非 IKKβ 引起 NF-κB2C-末端的降解而生成 p52,并最终促成 p52/RelB 二聚体的核转移。此途径被证明是次级淋巴组织发育、B 细胞成熟及获得性体液免疫所必须的。此外,还有研究报道过三种不涉及 IKK 的 NF-κB 活化情形。一种是细胞在低氧 (hypoxia) 或 pervanadate 的处理下, IκBα 的第 42 位酪氨酸残基发生磷酸化,磷酸化后的 IκBα 可以与 PI3K 的调节亚基 p85 相互作用而与 NF-κB 脱离,从而可以使 NF-κB 进入细胞核^[6];另一种情形是在紫外线或某些化疗药物处理下, IκBα 虽然被 26S 蛋白酶体降解,但 IKK 并不被激活,而且 IκBα N-末端 Ser32/Ser36 的突变也并不影响 IκBα 的降解。最近的研究结果表明,这类刺激信号主要是通过酪氨酸激酶 2--CK2 及激酶及促分裂原活化蛋白激酶 p38 对 IκBα C 末端的磷酸化修饰而诱导其降解的^[7];最后一种情形则与细胞因子或应力诱导的 NF-κB 活化机制完全不同。当线粒体受

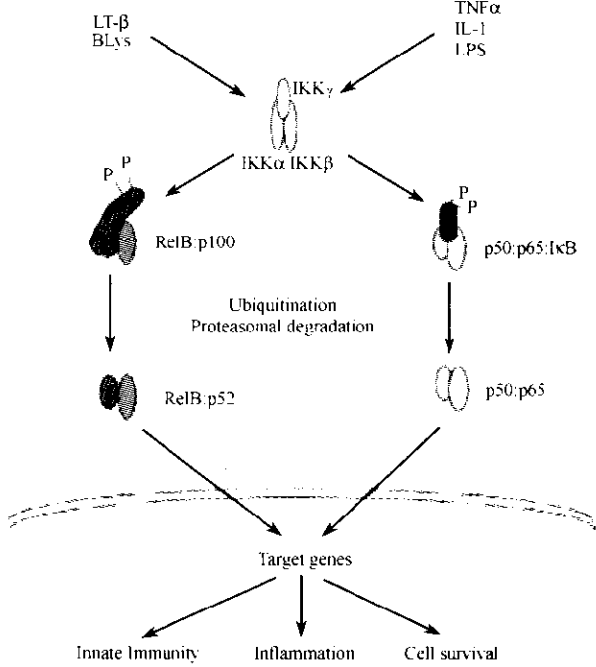


图 1 两条 NF-κB 信号转导通途示意图^[5]
Fig.1 Schematic representation of the two NF-κB signaling pathways^[5]

到遗传或化学应力(mtDNA 缺失或线粒体内钙离子失衡)时,磷酸化酶 calcineurin 的活化将使 I κ B β 的 313 位的丝氨酸脱磷酸,从而解除其对 p50/c-Rel 双体的抑制^[8]。

1.1 IKK 的活性调节及生理功能

1997 年,Didonato^[9] 和 Mercurio^[10] 分别以不同的方法发现了可以使 I κ B 发生特异性磷酸化的蛋白激酶并命名为 IKK。通过蛋白纯化、分子克隆和微测序等一系列实验表明,IKK 是以一种 700~900kD 的巨大激酶复合物形式存在的,并且该复合物至少含有三种组分:85kD 和 87kD 的 IKK α 和 IKK β (亦称 IKK1 和 IKK2)及 48kD 的 IKK γ (亦称 NEMO, NF- κ B essential modulator)。IKK α 和 IKK β 具有较高的序列同源性(>70%)及相似的结构。两种 IKK 在 N-末端均含有蛋白激酶区,靠近中间区域的亮氨酸拉链区(LZ)及螺旋-环-螺旋区(HLH),它们可以通过亮氨酸拉链区形成异源或同源二聚体;而 IKK γ 主要包括大段的卷曲螺旋(coiled-coil)及靠近 C-末端的亮氨酸拉链区。虽然有实验证据表明 700~900kD 的激酶复合物还可能含有其他一些组分,如 IKK 关联蛋白 1(IKKAP1)、促分裂原活化蛋白激酶激酶 1(MEKK1)、NF- κ B 诱导激酶(NIK)及调节蛋白 IKAP 等,但这些蛋白质组分在 IKK 复合物中真正存在与否,以及对 IKK 功能的影响还有待进一步的确定。研究发现,IKK γ 可能通过与 IKK β 和 IKK α 的直接作用而介导 IKK 复合物的组装,并且还能促进 I κ B 蛋白与 IKK 激酶复合物的相互作用^[11]。IKK α/β 含有高度保守的,与其他丝氨酸/苏氨酸激酶类似的 ATP 结合位点,该位点区域中保守的赖氨酸残基(Lys-44)突变将产生失活的 IKK α/β 。突变实验还显示,当以 TNF α 刺激过量表达失活 IKK α/β 的细胞时,虽然体外测试仍可以检测到相当的激酶活性,但 p65 的核易位以及依赖于 NF- κ B 的报告基因表达却受到抑制。因此,IKK 激酶活性在较窄范围内的波动却可以极大地影响 I κ B 的降解及 NF- κ B 的活化。细胞学实验结果也验证了这一点,IKK β + / - 细胞中虽然 IKK 活性只降低了 2 倍,但 NF- κ B 的活化却减少了 70%~80%^[12];同时体外酶动力学实验还发现,当以 I κ B α :p50:p65 复合物做 IKK 底物时,IKK 催化 I κ B α 磷酸化的最大反应速度要大于以游离的 I κ B α 做底物时的最大反应速度,这可能也是在 NF- κ B 活化后期新合成的 I κ B 能避免被磷酸化降解而逐渐得以累积,并协助终止 NF- κ B 活化过程的原因^[13]。

IKK 的活性在 TNF α 刺激后的 5~15min 内达到峰值,30min 左右活性降为峰值时的 ~25%,随后的 90min 活性只是稍微地降低。和其他激酶一样,IKK α /IKK β 在激酶区的活化环中含有可以被磷酸化的两个丝氨酸残基(IKK α 的 Ser176 和 Ser180 及 IKK β 的 Ser177 和 Ser181),这两个氨基酸的磷酸化是 IKK 活化所必须的。把这两个丝氨酸残基突变成丙氨酸可以抑制 IKK 的激活,而以谷氨酸取代则引起 IKK 的持续活化^[10]。许多其他蛋白激酶当过量表达时都可以造成 IKK 的激活,如蛋白激酶 C(PKC)、MEKK1/2/3、NIK、AKT/PKB、COT/TPL-2 及 TAK1 等,但生理条件下活化 IKK 的蛋白激酶还有待进一步确定。另外一种可能性是由上游激酶引发的

初步活化的 IKK,可以进一步进行自身磷酸化,从而将活化状态加以扩增来最终实现 IKK 复合物的完全活化。实验表明,IKK 的 HLH 区也可以和依赖细胞周期蛋白的蛋白激酶中的细胞周期蛋白一样激活 IKK,但前提是 IKK 的激酶区已被磷酸化^[14]。IKK 活化后可以使自身的 C-末端区的丝氨酸磷酸化,而磷酸化引起的 C-末端区构象变化使得其中的 HLH 区与激酶区解离,从而终结 HLH 区对激酶区的正调节作用;同时,有实验表明磷酸酶抑制剂冈田酸(Okadaic acid)可以激活 IKK,从而表明一种未知的磷酸化酶也可能参与了 IKK 活性的负调节^[9]。基因敲除实验结果显示,IKK β 的缺失可导致小鼠在胚胎期死亡;与此相应,IKK β 缺陷的细胞与野生型细胞相比对 TNF α 和 IL-1 等刺激不会引起 NF- κ B 的活化,因此对 TNF α 引起的细胞凋亡更为敏感。最近的实验也证实了 IKK β 的活化是避免因局部缺血/充血引起严重炎症反应而导致多组织功能丧失所必需的^[15]。因此,IKK β 是促炎症反应因子刺激诱导 NF- κ B 的活化的主要激酶^[16]。同样,调节亚基 IKK γ /NEMO 缺失的细胞对 TNF α , IL-1, dsRNA, LPS, Tax 等众多刺激也不发生 IKK 及 NF- κ B 的活化。最新的实验结果显示在细胞受到 DNA 损伤应力的情况下及 T 或 B 淋巴细胞受抗原刺激的情况下,IKK γ /NEMO 的泛素化修饰是 IKK 及 NF- κ B 活化所必须的^[17,18]。与 IKK β 敲除小鼠形成明显反差的是,在以 TNF α , IL-1 和 LPS 刺激的 IKK α - / - 胚胎成纤维细胞、角质原细胞及肝组织细胞中,除了 NF- κ B 的 DNA 结合活性下降 50% 外, I κ B α 的降解以及 IKK 的活化并不受影响,从而表明 IKK α 并不是此类促炎症因子引起 NF- κ B 活化所必须的。但 IKK α 的缺失的确导致许多发育上的缺陷,如短肢、骨骼畸形、表皮细胞过度增殖而缺少分化从而造成 IKK α - / - 小鼠的表皮要比正常小鼠厚 5~10 倍等^[19]。最近的实验结果证实了 IKK α 在 NF- κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)引起 NF- κ B 活化转导途径及上面提到的 NF- κ B 活化变更途径中的特异性^[5,20],而 RANK 途径是骨骼降解细胞形成所必须的,从而对上述的 IKK α 敲除表型作出了很好的阐述。此外,研究还发现了 IKK α 一些与 NF- κ B 非相关的其它调节功能,如组蛋白 H3 磷酸化修饰和角质细胞分化诱导等^[21,22]。

1.2 I κ B 的降解及其他水平上的 NF- κ B 活性调控

被活化的 IKK 可以迅速地使 I κ B α 第 32 位和第 36 位及 I κ B β 和 I κ B ϵ 相应位置丝氨酸残基发生磷酸化,这些磷酸化修饰是 I κ Bs 降解所必须的。如果突变 I κ B α 中的 Ser32 和 Ser36 残基,则可以使 I κ B α 不被诱导降解;同样,突变泛素结合位点的两个赖氨酸残基(Lys21/Lys22)也会使 I κ B α 得以稳定存在。体外实验也表明,只有磷酸化的 I κ B α 可以被无细胞提取物泛素化,而这种泛素化修饰可以被相应于 I κ B α N-末端调节区的磷酸化多肽所抑制;同样, Lys21/Lys22 被替代的磷酸化多肽也能有效地抑制 I κ B α 发生泛素化,从而表明泛素蛋白降解系统中泛素连接酶 E3 在 I κ B α 中的识别位点并不是泛素链的结合位点^[23]。1998 年 Yaron A 和 Ben-Neriah Y 等^[23] 利用固定的磷酸化 I κ B α 多肽做底物从细胞提取物中分

离到能特异性识别结合磷酸化 I κ B α 的蛋白-泛素连接酶 E3 受体亚基- β -TrCP (亦称 E3RS^{I κ B})。随后的体外实验表明, β -TrCP 中的 WD 结构域能特异地识别结合 I κ B α 中的 DS³² (PO3)GXXS³⁶ (PO3)位点; 并且在泛素激活酶 E1 和泛素结合酶 E2 的存在下, E3RS^{I κ B} 复合物可以使磷酸化的 I κ B α 发生泛素化。与其他 SCF 类 E3 不同, E3RS^{I κ B} 的 F 盒 (F-box) 并不参与磷酸化的 I κ B α 的识别结合, 但缺失 F 盒的 E3RS^{I κ B} 却不能使 I κ B α 发生多聚泛素链修饰, 并且在体内能显性地抑制 I κ B α 的降解和 NF- κ B 的活化, 从而暗示 F 盒可能通过募集 SCF 复合物的其他组分来保证泛素化的顺利进行。连接了泛素链的 I κ B α 随之被 26S 蛋白酶小体迅速降解。I κ Bs 的降解使 NF- κ B 得以释放并暴露了其上的核易位信号, 在细胞质-细胞核转移系统的作用下进入细胞核, 调控靶基因的转录。最近的研究显示, 与 I κ B 分离后的 p65 可以通过一种肽基脯氨酸顺反异构酶 Pin1 的作用而阻止其与 I κ B α 的重新结合, 从而保证 NF- κ B 在核内的充分积累并增强其转录活性^[24]。NF- κ B 的活化除了 I κ B 水平的调控外, NF- κ B 的转录活性还受到自身磷酸化状态的影响。Zhong 和 Ghosh^[25] 等发现, 在细胞受到 LPS 刺激引起 NF- κ B 活化的过程中, 蛋白激酶 A 可以使 NF- κ B p65 亚基的第 276 位丝氨酸发生磷酸化, 而此位点的磷酸化可以增强 p65 与转录辅激活因子-cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 的结合蛋白 CBP 及另一种相关因子 p300 间的相互作用, 从而增加其转录活性。Baldwin 等^[26] 也发现在 TNF α 引起的 NF- κ B 活化中, p65 的 Ser529 也可以被磷酸化。上述 NF- κ B 与 Pin1 间的相互作用也是通过其 254 位的 Thr 磷酸化介导的。总之, 这些结果都显示各种生理刺激还可以通过 NF- κ B 自身不同位点的磷酸化而进一步调控其转录活性, 但现在还不清楚这种主要发生在 NF- κ B (p65) C-末端转录激活区的磷酸化是如何通过影响其与基本转录装置组分, 如 TBP, TFII B, TAF105 以及 CBP, p300 等的相互作用而影响转录的。最近的研究还发现 NF- κ B (RelA/p65) 在活化过程中还可以被诱导发生乙酰化, 这种乙酰化的 RelA 与 I κ B α 的结合作用被大大减弱, 但其在核内可以随后被组蛋白去乙酰化酶 (HDAC3) 脱去乙酰基, 从而促进 RelA 与 I κ B α 的有效结合, 形成的复合物在核质运输蛋白 CRM1 的协助下被排除核外, 最终终止 RelA 的转录活性^[27]。Ryo 等人还发现细胞核内 NF- κ B (p65) 的稳定性同样还受到一种泛素化连接酶 SOCS-1 的调节^[24]。同时, 在众多受 NF- κ B 调控的基因中, I κ B α 自身的转录表达也受 NF- κ B 的调控。新合成的 I κ B α 由于在 NF- κ B 活化后期 IKK 活性的下调而得以积累, 并进入细胞核与 NF- κ B 结合, 借助于其 C-和 N-末端区中的富亮氨酸区核外排信号, 在 CRM1 等核质转运蛋白的协同作用下, 重新返回细胞质中, 从而保证 NF- κ B 活化过程的适时终止。Hoffman A 和 Baltimore D^[28] 等通过对各种 I κ Bs 敲除细胞系中 NF- κ B 活化的动态变化研究发现, I κ B α 是活化过程中最强的负反馈因子, 保证 NF- κ B 活化的迅速发生和关闭; 而 I κ B β 和 I κ B ϵ 则能缓冲系统活化的波动趋势从而使 NF- κ B 保持一个相对较长的响应时间。

2 NF- κ B 与肿瘤发生及相关药物研发

由于 NF- κ B 信号转导途径在免疫及炎症反应中的重要作用而引起人们的普遍重视与广泛研究, 但近年来越来越多的证据还表明, NF- κ B 在细胞生长、细胞凋亡、肿瘤发生等方面也发挥着重要作用。首先, 群体遗传学分析结果发现, p65/RelA, c-Rel, NF- κ B2 及 Bcl-3 基因都位于易发生重排或扩增的染色体区域。例如, 在许多淋巴瘤, 尤其是上皮淋巴瘤中存在与 NF- κ B2 相关的 t(10, 14) 染色体易位断点^[29]; 同时在 Hodgkin's 淋巴瘤中, 人们亦检测到 I κ B α 基因异常突变, 并且 Hodgkin's 细胞中 NF- κ B 是持续活化的。其次, 与 NF- κ B 可能参与细胞转化和肿瘤发生过程的推测一致, 许多体外培养的肿瘤细胞系与非转化的细胞系相比含有较高水平的核 NF- κ B 活性。此外, 许多癌基因产物, 包括许多病毒转化蛋白, 如 Ras, Raf, Her2/Neu, BCR-ABL 及人 T 细胞白血病病毒 I (HTLV-I) 的 Tax 蛋白等均能活化 NF- κ B; 而一种超抑制 I κ B α 突变体的表达可以阻碍 H-Ras 和 BCR-ABL 等引起的细胞转化或肿瘤发生^[30]。

2.1 NF- κ B 在肿瘤发生等相关过程中的作用机制

众多研究显示, NF- κ B 在肿瘤发生过程中的作用可能与其以下的几种生物学功能有关: 首先, 作为一种重要的抗凋亡因子, NF- κ B 可以在肿瘤发生的早期抑制由于转化所引起的细胞凋亡。在 TNF α 及其它一些胞外刺激因子激活 NF- κ B 的过程中, 活化的 NF- κ B 可以同时保护细胞免受这些刺激所引起的凋亡^[31]。同样, 在大脑中, 神经元细胞促红细胞生成素受体的活化可以激发 Janus2 激酶对 I κ B 的磷酸化, 并引起 NF- κ B 的活化及对神经元细胞本身的抗凋亡保护作用^[32]。随后的研究进一步发现活化的 NF- κ B 的确可以调控许多抗凋亡基因的表达, 如 c-IAP1/2, A1/B κ -1, IEX-1, XIAP 及 caspase 8 抑制因子 FLIP 等, 但目前还不清楚哪些被 NF- κ B 调节的抗凋亡基因在肿瘤发生中发挥作用。Tang 等^[33] 发现 TNF α 活化的 IKK 可以通过 XIAP 或 myd118 负调节 c-Jun N 端激酶 (JNK) 的激活, 从而抑制细胞凋亡的发生; 而对肿瘤样本的免疫化学分析及分子细胞生物学研究则显示 IKK β 的激活与叉头转录因子 FOXO3 的活性负相关, 从而促进细胞的增殖与肿瘤化发生^[34]。Brummel Kamp 等^[35] 在对一种因突变而引起家族性圆柱瘤的基因产物 CYLD 研究时发现, CYLD 实际上是一个针对 TNF α 受体相关因子 TRAF2 的去泛素化酶; CYLD 的去泛素化作用会影响 TRAF2 第 63 位赖氨酸残基的泛素化修饰, 从而抑制包括 TRAF2 在内的 IKK 激活复合物的形成及 NF- κ B 的活化; 而 CYLD 的突变则可能造成 NF- κ B 的持续活化, 并因此降低细胞凋亡的发生而最终引发肿瘤的产生。

人们很早就注意到慢性炎症与癌症发生之间存在一定的内在关系, 慢性炎症引发的癌症占人类癌症发生率的 20%, 但其中的分子机制不是很清楚。最新的研究结果则显示, 在一种炎症相关肝癌模型的 Mdr 敲除小鼠中, 如果在其发育成长的早期阻断 NF- κ B 的活性, 并不影响肝炎及肝细胞

初期转化的发生;但如果在肿瘤发生的晚期阶段通过抗 TNF 处理或诱导超抑制 I κ B α 突变体的表达来抑制 NF- κ B 的活化,则可以引起已经转化的肝细胞的大量凋亡,并进一步阻断肝癌的形成^[36]。Greten 等^[37]利用一种结肠炎相关肿瘤模型,通过敲除肠上皮细胞中的 IKK β 后,发现组织的炎症反应虽并无消灭,但癌症发生的几率却大大的降低,进一步的分析显示上皮细胞的凋亡明显增加;同样,如果失活骨髓细胞中的 IKK β ,则可以大大地减小所形成肿瘤的体积,这可能与某些促炎症因子的表达降低有关,因为这些促炎症因子在某种程度上可以作为肿瘤生长因子。总之,上述结果明确表明,在某些炎症相关癌症发生过程中,IKK β /NF- κ B 通途发挥着重要的作用。研究还发现,在众多雌激素受体缺失的乳腺肿瘤细胞中,可以检测到 NF- κ B 活性的增加,而 NF- κ B 活性的抑制不仅可以抑制细胞的增殖,而且还可以诱导增殖细胞的凋亡,从而消除这些细胞的致癌潜能^[38]。

其次,NF- κ B 还可能通过促进细胞周期蛋白 D1 基因的转录表达而使肿瘤抑制蛋白 Rb 超磷酸化来促进细胞的生长增殖,并在某些情况下抑止细胞的分化^[39];而另一种肿瘤抑制因子 ARF 除参与调控 Mdm2 和 p53 的胞内水平外,还能通过诱导 NF- κ B RelA 与组蛋白去乙酰化酶的结合而抑制 NF- κ B 靶基因的转录,从而从一个角度说明了对 NF- κ B 的调控构成肿瘤抑制因子作用机制的一个重要方面;此外,NF- κ B 还参与许多与细胞黏附及血管生长有关的蛋白质因子的转录调节,其中包括肌腱蛋白 C、细胞间粘连分子(ICAM1)、基质金属蛋白酶 MMP-9,以及环氧化酶(COX-2)和可诱导一氧化氮合成酶(iNOS)等,所有这些都暗示 NF- κ B 除促进细胞增殖和抑制凋亡外,还可以通过控制细胞黏附和血管生成等过程而在肿瘤的扩增转移中发挥作用。有研究还发现,IKK 还可能通过对连环蛋白的调节作用而影响 Wnt 信号转导途径,从而影响与其相关的生物学过程,其中包括某些肿瘤的发生^[40]。NF- κ B 的抗凋亡活性使得人们有必要重新评估 NF- κ B 对癌症化疗和放射治疗疗效的影响。Wang 和 Baldwin 等^[41]发现当以离子辐射或道诺霉素处理 HT1080 纤维瘤细胞时,NF- κ B 的活性会大大增加;而如果进行上述处理的同时抑制 NF- κ B 的活化,可以极为显著地增加癌细胞的凋亡。Tergaonkar^[42]等人的实验进一步显示 IKK α/β 敲除细胞在化疗剂的处理条件下会发生广泛的凋亡,而且胞内的 p53 会大幅上升;而细胞内重新引入 IKK β 则会造成 p53 的降解。动物实验结果亦显示,对生长有 HT1080 纤维瘤的裸鼠感染能表达抑制 NF- κ B 活化的 I κ B α 突变体的腺病毒同时,施以系统的化疗剂 CPF11,可以有效地诱导肿瘤细胞的凋亡。以上结果都表明了 NF- κ B 在肿瘤化疗诱发的抗性过程中亦发挥着重要作用,而如果在癌症化疗的同时结合对 NF- κ B 适当的有效抑制可能将大大增加对癌症治疗的效果。

2.2 针对 NF- κ B 的药物研发策略及展望

鉴于 NF- κ B 因子在细胞生长分化与凋亡、免疫炎症反应以及肿瘤发生等众多生物学过程中的重要作用,它也一直是倍受人们关注的药物干预靶点。已有的众多研究成果显示,

大多数通用的抗炎反应或免疫调节类药物如非固醇类抗炎药、Thalidomide 和环戊烯前列腺素(cyPGs)类衍生物等的疗效或副作用都至少和抑制 IKK-NF- κ B 通路有关。随着 NF- κ B 信号转导途径的被深入解析,理论上人们可以有针对性地选择在其活化途径的不同水平层次来调节 NF- κ B 的活性:1)干扰 NF- κ B 蛋白的表达及其与 DNA 位点的结合,如使用 RelA 反义 RNA、RNAi 或 κ B 位点寡核苷酸等;2)干扰 IKK 复合物的形成,如设计使用相当于 IKK β 的 IKK γ 结合域多肽;3)抑制 IKK 激酶活性;4)抑制 26S 蛋白酶体活性;5)抑制 NF- κ B 的细胞核转移,如表达不可降解的 I κ B 超抑制子突变体和相当于 NF κ B 核转移信号的多肽等;6)抑制 NF κ B 的转录活性。到目前为止,一种可以通过抑制 26S 蛋白降解酶体的抑制剂-Velcade 已经被美国食品药品监督管理局(FDA)批准作为治疗骨髓瘤的药物。鉴于 IKK,尤其是 IKK β 在 NF- κ B 活化过程中的重要作用,从实际医疗应用角度考虑,筛选 IKK 激酶,尤其是 IKK β 高效特异的抑制剂可能是最为有效的途径,这也是目前众多医药公司努力的焦点。迄今为止,人们已经获得了大量的高效特异抑制 IKK β 活性的抑制化合物,但这些化合物临床上的安全有效性还有待进一步确定。与 IKK β 抑制剂研发的迅速发展相比,至今还没有得到针对 IKK α 的高效选择性抑制剂;最近对 IKK α 在 NF- κ B 变更活化途径中作用的阐述,将为筛选 IKK α 的高效选择性抑制化合物提供更为有效的细胞模型。此外,在上述 NF- κ B 因子参与各生物学过程中,NF- κ B 因子的作用最终是由其调控的众多靶基因产物来实现的,所以针对 NF- κ B 自身转录活性的调节手段也应该值得加以考虑。在这一点上,与上述 Wang 和 Baldwin 等^[41]结果相矛盾的是,最近发现某些 DNA 损伤剂如 UV-C 和道诺霉素,虽然可以诱导 NF- κ B RelA 的核转移及其与 DNA 的结合,但它们因同时诱导 RelA 与组蛋白去乙酰化酶的结合而最终抑制某些抗凋亡基因的表达^[43]。现在还不清楚在此条件下 NF- κ B 由激活转录转化为抑制转录的分子机制,及此种抑制是否依赖于特定的细胞与启动子环境;即特定条件下被激活的 NF- κ B,能否特异性地参与某些靶基因的调节还不清楚,对这些问题进一步的研究将有助于将来能在不影响 NF- κ B 正常参与自然或获得性免疫反应的前提下,特异性地关闭受 NF- κ B 调控的抗凋亡基因,从而增加肿瘤细胞的死亡。Murno 曾经从海洋海绵体中分离得到的一种小分子化合物,该化合物不仅具有免疫抑制活性,而且还具有较强的细胞毒活性,可以抑制某些肿瘤细胞的生长^[45]。我们在对其免疫抑制机制的研究中发现,该化合物可以在不影响 NF- κ B 上游转导途径如 IKK 的激活,及 NF- κ B DNA 结合能力的情况下,抑制 NF- κ B 的转录活性;进一步的研究发现该化合物能特异性地作用于 NF- κ B 的转录激活域,抑制激活域的进一步活化,推测可能影响其与转录基本装置成分的相互作用;对其胞内直接作用靶点蛋白的鉴定及受控靶基因的分析工作正在进行中。必须指出的是,由于细胞内各信号途径间存在的复杂相互作用及 NF- κ B 在自然免疫过程中的重要作用,在针对 IKK 及 NF- κ B 抑制药物研发的同时,人们还应

充分认识到 NF- κ B 活性抑制所可能带来的毒副作用。许多实验结果已经表明 NF- κ B 活化的抑制会明显地引起许多组织器官功能的破坏及有机体机会性感染的增加^[15]。但相信随着人们对各种 NF- κ B 同源或异源双体形成的调节、其生物物理性能和构象的深入认识以及在各种条件下受 NF- κ B 调节靶基因的分析鉴定,无疑将会为人们最终获得能针对不同类型细胞,并对不同外源刺激而特异性地抑制各种 NF- κ B 活性的抑制剂提供帮助。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Sen R, Baltimore D. Inducibility of the immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, **47**(6):921-928
- [2] Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 1996, **14**:649-681
- [3] Gosh S, May SJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1998, **16**:225-260
- [4] Leung TH, Hoffmann A, Baltimore D. One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers. *Cell*, 2004, **118**(4):453-464
- [5] Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, 2002, **109**(suppl):S81-S96
- [6] Imbert V, Rupec RA, Livolsi A *et al*. Tyrosine phosphorylation of I κ B α activates NF- κ B without proteolytic degradation of I κ B α . *Cell*, 1996, **86**(5):787-798
- [7] Kato T Jr, Delhase M, Hoffmann A *et al*. CK2 Is a C-terminal I κ B kinase responsible for NF-kappaB activation during the UV response. *Mol Cell*, 2003, **12**(4):829-839
- [8] Biswas G, Anandatheerthavada HK, Zaidi M *et al*. Mitochondria to nucleus stress signalling: a distinctive mechanism of Nf κ B/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of I κ B β . *J Cell Biol*, 2003, **161**(3):507-519
- [9] DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM *et al*. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 1997, **388**(6642):548-554
- [10] Mercurio F, Zhu H, Murray BW *et al*. IKK-1 and IKK-2: cytokine activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, 1997, **278**(5339):860-66
- [11] Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G *et al*. IKK γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, 1998, **395**(6699):297-300
- [12] Li ZW, Chu W, Hu Y *et al*. The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for NF- κ B activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*, 1999, **189**(11):1839-1845
- [13] Zandi E, Chen Y, Karin M. Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science*, 1998, **281**(5381):1360-1363
- [14] Delhase M, Hayakawa M, Chen Y *et al*. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation. *Science*, 1999, **284**(5412):309-313
- [15] Chen LW, Egan L, Li ZW *et al*. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature Med*, 2003, **9**(5):575-581
- [16] Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K *et al*. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK-3-deficient mice. *Immunity*, 1999, **10**(4):421-429
- [17] Huang TF, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH *et al*. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell*, 2003, **115**:565-76
- [18] Zhou H, Wertz I, O'Rourke K *et al*. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*, 2004, **427**(6970):167-171
- [19] Hu Y, Baud V, Delhase M *et al*. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science*, 1999, **284**(5812):316-320
- [20] Cao Y, Bonizzi G, Seagroves TN *et al*. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell*, 2001, **107**(6):763-775
- [21] Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S *et al*. Histone H3 phosphorylation by IKK- α is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, 2003, **423**(6940):655-659
- [22] Hu Y, Baud V, Oga T *et al*. IKK α controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature*, 2001, **410**(6829):710-714
- [23] Yaron A, Hatzubai A, Davis M *et al*. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature*, 1998, **396**(6711):590-594
- [24] Ryo A, Suizu F, Yoshida Y *et al*. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell*, 2003, **12**(6):1413-1426
- [25] Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H *et al*. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, 1997, **89**(3):413-424
- [26] Wang D, Baldwin AS Jr. Activation of nuclear factor- κ B-dependent transcription by tumor necrosis factor- α is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem*, 1998, **273**(45):29411-29416
- [27] Chen LF, Fischle W, Verdin E *et al*. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, 2001, **293**(5535):1653-1657
- [28] Hoffmann A, Levchenko A, Scott LM *et al*. The I κ B α -NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, 2002, **298**(5596):1241-1245
- [29] Fracchiolla NS, Lombardi L, Salina M *et al*. Structural alterations of the NF- κ B transcription factor I κ B-10 in lymphoid malignancies. *Oncogene*, 1993, **8**(13):2839-2845
- [30] Reuther JY, Reuther GW, Cortez D *et al*. A requirement for NF- κ B activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev*, 1998, **12**(7):968-981

- [31] Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T *et al.* Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science*, 1996, **274**(5288):787 - 789
- [32] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*, 2001, **412**(6847):641 - 647
- [33] Tang G, Minemoto Y, Dibling B *et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature*, 2001, **414**(6861):313 - 317
- [34] Hu MC, Lee DF, Xia W *et al.* I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, 2004, **117**(2): 225 - 237
- [35] Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM *et al.* Loss of the cyclin-dromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, 2003, **424**(6950):797 - 801
- [36] Pikarsky E, Porat RM, Stein I *et al.* NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 2004, **431**(7007):461 - 466
- [37] Greten FR, Eckmann L, Greten TF *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 2004, **118**(3):285 - 296
- [38] Biswas DK, Shi Q, Bailly S *et al.* NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, **101**(27):10137 - 10142
- [39] Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY *et al.* NF- κ B controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(8):5785 - 5799
- [40] Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y *et al.* Regulation of β -catenin function by the IkappaB kinases. *J Biol Chem*, 2001, **276**(45): 42276 - 42286
- [41] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, 1996, **274**(5288):784 - 787
- [42] Tergaonkar V, Pando M, Vafa O *et al.* p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*, 2002, **1**(5): 493 - 503
- [43] Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NFkappaB. *Mol Cell*, 2004, **13**(6):853 - 865
- [44] Zhang L, Youn HD, Liu JO. Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NFkappa B-dependent activation of p53. *J Biol Chem*, 2001, **276**(47):43534 - 40
- [45] Northcote PT, Blunt JW, Munro MHJ. Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand Marine sponge, mycale sp. *Tetrahedron Letters*, 1991, **32**(44):6411 - 6414