

1006.

- [16] Sisco KL. Is RNA in selalm bound to nucleopmtein complexes? Clin Chem,2001,47(9):1744-1745.
- [17] El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, et al. Characterization of amplifiable. circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. Clin Chem,2004,50(3):564-573.
- [18] Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory micorRNAs as a versatile communication tool. Commun Integr Biol,2010,3(5):478-481.
- [19] Lawrie C H, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Br J Haematol,2008,141(5):672-675.
- [20] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins tat promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. Nat Cell Biol,2008,10(12):1470-1476.
- [21] Baraniskin A, Kuhnenn J, Schlegel U, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. Neuro Oncol,2011,77(21):2931-2940.

## Apollon 在人脑胶质瘤的研究进展

陈弘韬 综述 李巧玉 审校

江苏大学附属人民医院神经外科,江苏 镇江 212003

**摘 要:** Apollon 是近年来新发现的凋亡抑制因子,具有广泛的生物学作用,有研究发现 Apollon 在多种肿瘤中表达明显升高,可能与肿瘤的发生与预后有关,但具体参与机制仍不明确。本文就 Apollon 在人脑胶质瘤中的生物学特性方面的研究进展做一综述。

**关键词:** Apollon; 凋亡; 胶质瘤

在生理状态下,机体通过自身的凋亡途径清除异常和衰老的细胞,保持机体的动态平衡,而对于肿瘤细胞,如凋亡过程受到抑制,将促使细胞进行恶性生长,导致肿瘤的发生。凋亡蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族,是在病毒、真核生物、哺乳动物等多种物种中广泛存在的进化高度保守的一类抗细胞凋亡调节因子,Apollon 是其中分子量最大的成员,本文主要简介 Apollon 对凋亡的调控及其脑胶质瘤的关系,为深入研究胶质瘤的发病机制、治疗方案及预后评估提供帮助。

### 1 Apollon 的基本结构

IAPs 是迄今发现最强的内源性凋亡抑制因子,共有 XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP, Apollon, Livin, Survivin, ILP-2 八个成员。其中 Apollon 蛋白是 IAPs 中分子量最大的成员,基因定位于 2p22-p21,含有 1 个 BIR 结构域(杆状病毒 IAP 重复序列)及一个

泛素结合结构域(UBC)。其分子量为 530 kD,共含有 4830 个氨基酸,是高尔基体外膜蛋白,具有高度的保守性。Apollon 含有的 BIR 序列约有 40% 与其他 IAPs 家族成员相同<sup>[1]</sup>,是其抑制 caspase 活性、发挥抗凋亡的重要结构。UBC 结构域位于 Apollon 分子中的羧基端,是其特有的结构域,能够参与 caspase-9, Smac 的多泛素化,可以加强 Apollon 的抑制凋亡作用。

### 2 Apollon 的作用机制

Apollon 的抑制凋亡主要通过结合半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)、丝氨酸蛋白酶 HtrA2 (high temperature requirement A2) 和线粒体促凋亡蛋白(Smac)三种主要机制发挥其抑制凋亡的作用<sup>[2]</sup>,而 Apollon 拮抗 caspase-9 前体和成熟体及 Smac 的功能是抑制凋亡的重要机制,基因分析发现 Apollon 上所持有的 cys327 结构是其结合 caspa se-9、

收稿日期:2012-06-07;修回日期:2012-08-06

作者简介:陈弘韬(1983-),男,住院医师,硕士研究生,研究方向:人脑胶质瘤。

通讯作者:李巧玉(1962-),男,主任医师,博士,硕士研究生导师。

Smac 所必需的,而 UBC 序列中的 cys4638 是其决定多泛素化活性的特定区域,故 Apollon 的 UBC 结构域在活体中同样具有抑制凋亡的作用<sup>[3]</sup>。

### 2.1 Apollon 与 Caspase 的相互作用

到目前为止,Caspase 家族共有 14 个成员被发现,分别被命名为 Caspase1-Caspase14,他们在氨基酸序列、结构及酶的特性上均相似,正常时均以无活性的酶原形式存在于细胞质基质中。当受到凋亡信号刺激后,酶原分子在特异的天冬氨酸残基位点被切割,形成由大小两个亚基组成的异二聚体,即有活性的 Caspase,完成了 Caspase 酶原的激活。Apollon 通过在 E2 UbcH5 和 E3 Nrdp1 的介导下,其 BIR 序列不仅可以抑制 Caspase-9 前体的活性,还能够与活化的 Caspase-9 结合,促进其降解,阻止 Apaf-1 与 Caspase-9 的结合,从而保护其他 IAPs 成员的抑制凋亡功能。同时 Apollon 还可作为 E2 泛素酶参与 Caspase-9 的多泛素化,促使 Caspase-9 的降解,最终达到抑制凋亡的目的,Lopergolo A 研究证实通过抑制 p53 以及活化 Caspase-3,Apollon 基因沉默可以导致 ZR75.1 乳腺癌细胞的生长明显受到抑制,并且肿瘤细胞的凋亡速率显著上升<sup>[4]</sup>。

### 2.2 Apollon 与 HtrA2 的相互作用

HtrA2 最早是因为具有与 IAPs 有结合能力并可以拮抗 IAPs 而被分离确定的,其与细菌内蛋白酶同源<sup>[5]</sup>。HtrA2 属于丝氨酸蛋白水解酶家族,其基因定位于人类染色体 2p12<sup>[6]</sup>,HtrA2 前体是一个 50 kDa 大小的蛋白质,成熟的 HtrA2 是含有 36 kDa 的蛋白质,具有活性的 HtrA2 是以三聚体的形式存在<sup>[7]</sup>。HtrA2 主要含有三个重要结构<sup>[8]</sup>:氨基末端的 Reaper 样基序;中心的丝氨酸蛋白酶功能区;C 末端的 PDZ 结构域,除了以上三个重要的功能区外,HtrA2 还含有一个胰蛋白酶催化结构域和一个线粒体定向序列。Apollon 可被 HtrA2 通过其丝氨酸蛋白酶活性催化裂解<sup>[9]</sup>,同时 Apollon 还可以与 HtrA2 的 Reaper 样基序结合,并促进 Apollon 的降解,并释放出被 IAPs 封闭的 Caspase,因此 Apollon 和 HtrA2 的相互作用可以使对方表达水平降低。有催化活性的 HtrA2 可以诱导 Apollon 表达阳性的细胞发生凋亡,然而在 Apollon 表达阴性的细胞中,无催化活性但 Reaper 样基序完整的 HtrA2 突变体也能诱导其凋亡,从而推测 HtrA2 所含有的 Reaper 样基序是其发挥诱导凋亡作用的重要结构。

### 2.3 Apollon 与 Smac 的相互作用

Smac 基因位于 12 号染色体长臂,由 7 个外显子组成,有其编码的蛋白含有 239 个氨基酸,有 Smac-L、Smac-S、和野生型 Smac 等三种存在形式。结构分析发现,Smac N-末端存在类似线粒体靶信号序列,Smac-L 在线粒体中将线粒体靶信号序列裂解掉后便生成野生型 Smac,从而获得凋亡活性,并以纯二聚体的形式存在于线粒体的膜间腔内<sup>[10]</sup>。当细胞发生凋亡时,Smac 与细胞色素 C 一同释放进入胞质中与 IAP 结合,解除 IAP 对 Caspase 的抑制,从而启动凋亡联级反应,最终促使细胞发生凋亡。

另外 Apollon 所含有的 UBC 结构域可以使 Smac 泛素化,并促进 Smac 发生降解。有学者研究发现 Apollon 不仅能作用于成熟的 Smac,还能够与 Smac 前体结合,并加速其降解<sup>[11]</sup>。另一方面 Apollon 的 BIR 结构域能够与野生型 Smac 稳定的相互作用,竞争性抑制 BIR 结构域与 Caspase 的结合,从而解除对 Caspase 的抑制,恢复 Caspase 的酶活性,促进细胞凋亡。Apollon 还有一个特殊功能,可作为 E2(E3)泛素酶嵌合体与 Smac 作用,使 Smac 泛素化。因此,Apollon 中无论是 BIR 结构域还是 UBC 结构域都可与 Smac 发生作用,均在抑制凋亡中起重要作用。

### 3 Apollon 与人脑胶质瘤

胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,肿瘤细胞的凋亡同增值一样是肿瘤的普遍现象,癌细胞的凋亡易感性决定于多种凋亡相关基因表达产物的水平和相互作用。近来研究表明,细胞凋亡和增殖的平衡破坏为肿瘤的发生发展提供了平台<sup>[12]</sup>。凋亡异常导致本该死亡的细胞被保留下来,其中有些突变的细胞增殖失控,最终形成肿瘤。有报道证实 Apollon 在 38 种人类癌细胞株中的表达,其中发现 6 种神经胶质瘤细胞及 5 种卵巢癌细胞中分别有 4 种和 1 种高表达。Apollon 的过度表达将会抑制细胞产生凋亡,而 Apollon 表达的缺失将促进细胞产生凋亡<sup>[2]</sup>。有研究显示 Apollon 基因敲除导致小鼠胚胎和新生小鼠的死亡,说明 Apollon 可能在早期胚胎发育起重要作用<sup>[13]</sup>。Apollon 缺失小鼠的死因不明确,缺乏细胞凋亡增强的证据,提示小鼠在细胞分化方面存在缺陷。还有研究提出 Apollon 能够影响细胞分裂,尽管此项研究中 Apollon 的失活导致了全部小鼠胚胎的死亡,但许多组织没有检测到细胞凋亡增多,与对照组比

较, Apollon 失活的小鼠外表无异常, 但体积小 10% ~ 20%, 而且超过半数的胚胎伴有血管发生缺陷<sup>[14]</sup>。笔者所进行的 Apollon 在人脑胶质瘤切片 S-P 染色的结果中, 也证实 Apollon 在胶质瘤中的表达较正常脑组织明显增高, 且随着胶质瘤恶性程度的增高, Apollon 的表达程度也逐渐增高, 两者呈正相关。

#### 4 展望

凋亡在人脑胶质瘤的发生、发展过程中起重要作用, Apollon 作为 IAPs 家族中的一员, 发挥着抑制细胞凋亡的作用, 但其详细的作用途径还没有完全研究清楚。目前国内外对于 Apollon 的研究很少, 有些研究表明 Apollon 可在白血病、口腔癌、胃癌、肝癌、结肠癌等肿瘤中高度表达, 证实 Apollon 可能与肿瘤的发生与预后有关, Pennati 等报道通过敲碎 Apollon 基因可引发多种肿瘤细胞凋亡, 从而抑制细胞增值, 达到治疗肿瘤的目的<sup>[15]</sup>。陈建发等报道通过沉默 Apollon 基因可导致肝癌细胞增殖显著降低及细胞凋亡水平的提高, 并且提高了 HCC 细胞对化疗药物的敏感性<sup>[16]</sup>。Ismail 等证实 Apollon 的表达水平在小儿急性髓细胞白血病和急性淋巴细胞白血病显著提高, 并确定成为评价疗效及判断预后的有效生物学指标<sup>[17]</sup>, 郭俊等也报道 Apollon 在成人急性白血病中的表达水平显著高于对照组, 可能促进白血病的发生、发展<sup>[18]</sup>。何金花等利用 Apollon 反义核酸技术作用于结肠癌 Lovo 细胞, 使 Lovo 细胞的增殖得到明显抑制, 并通过联合使用化疗药物, 使 Lovo 细胞出现明显的 S 期阻滞, 从而提高化疗药物的敏感性<sup>[19]</sup>。随着对 Apollon 的研究深入, 我们可以通过研究其在细胞水平上的活动情况, 从而找出很多抑制各种肿瘤细胞的治疗方法, 比如抑制细胞因子的表达, 拮抗细胞表面受体的激活或者阻断下游的细胞信号传导途径等, 可以利用这些方法来降低胶质瘤增殖及侵袭能力, 提高治疗效果。对于 Apollon 的研究有助于在分子水平进一步揭示人脑胶质瘤的发生、侵袭等机制, 在判断人脑胶质瘤的恶性程度, 预测复发等方面具有重要意义, 并有望作为判断胶质瘤预后情况的生物学标志物。为肿瘤的早期诊断和基因治疗可能开辟新的研究领域。

#### 参 考 文 献

- [1] Chen ZH, Mikiyiko N, statoko H, et al. A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem biophys Res Commun*, 1999, 264 (3): 847-854.
- [2] Bartke T, Poh1 C, Pyrowolakis G, et al. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell*, 2004, 14 (6): 801-811.
- [3] Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, et al. Agiant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *Cell Biol*, 1998, 141 (6): 1415-1422.
- [4] Lopergolo A, Pennati M, Gandellini P, et al. Apollon gene silencing induces apoptosis in breast cancer cells through p53 stabilisation and caspase-3 activation. *Br J Cancer*, 2009, 100 (5): 739-746.
- [5] Suzuki Y, Lmai Y, Nakayama H et al. A serine protease HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP inducing cell death. *Mol Cell*, 2001, 8 (3): 613-621.
- [6] Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*, 2002, 277 (1): 445-454.
- [7] Nam MK, Seong YM, Park HJ, et al. The homotrimeric structure of HtrA2 is indispensable for executing its serine protease activity. *Exp Mol Med*, 2006, 38 (1): 36-43.
- [8] Li W, Srinivasula SM, Chai J, et al. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *Nat Struct Biol*, 2002, 9 (6): 436-441.
- [9] Sekine K, Hao YY, Suzuki Y, et al. changes in gene expression in the course of proliferative processes in the parathyroid gland. *Magy Onkol*, 2006, 50 (2): 137-140.
- [10] Srinivasa MS, Datta P, Xum JU, et al. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *Biol Chem*, 2000, 275: 36152.
- [11] Qiu XB, Goldberg AL. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE /APOLLON, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *J Biol Chem*, 2005, 280 (1): 174-182.
- [12] Fulda S. Cell death in hematological tumors. *Apoptosis: An international journal on programmed cell death*, 2009, 104 (12): 2775.
- [13] Lotz K, Pyrowolakis G, Jentsch S. BRUCE, a giant E2/E3 ubiquitin ligase and inhibitor of apoptosis protein of the trans-Golgi network, is required for normal placenta development and mouse survival. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (21): 9339-9350.
- [14] Martin SJ, An Apollon vista of death and destruction. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (9): 804-806.
- [15] Pennati M, Millo E, Gandellini P, et al. RNA interference-me-

diated validation of survivin and Apollon/BRUCE as new therapeutic targets for cancer therapy. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(2): 69-78.

- [16] 陈建发, 李宇华, 陈引香, 等. Apollon siRNA 提高肝癌细胞化疗敏感性的实验研究. *南方医科大学学报*, 2011, 31(10): 1701-1704.
- [17] Ismail EA, Mahmoud HM, Tawfik LM, et al. BIRC6/Apollon gene expression in childhood acute leukemia: impact on

therapeutic response and prognosis. *Eur J Haematol*, 2012, 88(2): 118-127.

- [18] 郭军, 朱传生, 徐文伟, 等. Apaf-1 基因启动子甲基化与抑凋亡蛋白 Apollon 表达在成人急性白血病发生发展中的意义. *中华血液学杂志*, 2010, 31(11): 736-739.
- [19] 何金花, 张小鹰, 吴风云, 等. 靶向 Apollon 反义核酸抑制结肠癌细胞增殖并提高化疗药物的敏感性. *药学报*, 2011, 46(2): 138-145.

## 磁共振在颅脑创伤中应用研究进展

袁陆涛 综述 陈世文\* 审校

上海交通大学附属第六人民医院神经外科, 上海市 200233

**摘要:** 磁共振在颅脑外伤诊断中起着越来越重要的作用。磁共振先进序列的应用不仅提升了创伤病灶的检出能力, 还能提供预后相关信息。弥散加权成像可鉴别脑水肿类型并检测轴索损伤; 弥散张量成像对白质完整性极为敏感; 磁敏感加权成像极大地提高了微小出血灶的检出率; 磁共振波谱可检出代谢异常, 并可提供预后信息。磁共振多序列联合应用不仅可更全面地检测颅脑创伤病变类型, 且能准确地判断患者预后, 是颅脑创伤影像学研究的热点。

**关键词:** 颅脑创伤; 磁共振; 新序列;

颅脑创伤 (Traumatic Brain Injury, TBI) 占全身外伤的第二位, 但其死亡率却为第一位, 因而被称为“沉默的传染病 (Silent Epidemic)”。美国 CDC 报导每年全美大约有 140 万人遭遇颅脑外伤, 造成 5 万人死亡及约 23 万人住院治疗<sup>[1]</sup>。计算机断层扫描 (Computered Tomography, CT) 是颅脑外伤病人的首选影像检查手段, 但许多 TBI 的病变不能从 CT 得到准确反映, 如微小出血灶、轴索损伤等。同时, CT 存在电离辐射的风险, 限制了对于儿童、孕妇的使用。磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 不存在放射性损伤, 适用对象广泛。

### 1 常规 MRI 序列

常规 MRI (conventional MRI, cMRI) 包括 T1、T2 及 FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery, 液体衰减反转恢复序列), 是经典的磁共振成像序列, 其优点在于 CT 所无法发现的微小出血灶及非出血性伤灶, 即创伤性轴索损伤 (Traumatic Axonal Injury,

TAI)。许多研究发现, 相较于 CT, cMRI 可发现更多的脑实质内伤灶, 尤其是非出血性伤灶<sup>[2]</sup>, 但骨折敏感性较 CT 差<sup>[3]</sup>。另一方面, 临床上有些患者意识障碍重或轻度脑损伤 (mild TBI, mTBI) 后出现脑震荡后综合征 (Postconcussion Syndrome, PCS), 但 CT 或 cMRI 仅表现为轻度异常甚至正常, 提示 CT 及 cMRI 对于 TBI 微小病变如微出血、TAI 的检测仍存在疏漏, 逐渐出现的 MRI 新序列可弥补这些不足。

### 2 弥散成像

弥散成像是利用组织中水分子的自由热运动所产生的信息成像的技术, 包括弥散加权成像 (Diffusion Weighted Imaging, DWI) 和弥散张量成像 (Diffusion Tensor Imaging, DTI)。DWI 最早应用于脑水肿的检测。无论是细胞毒性脑水肿或血管源性脑水肿, 均伴有水分子的净移位改变, 其信息可被 DWI 捕捉而成像。在 TBI 中, DWI 可在伤后 1 小时即出现局灶信号改变, 而 T2/FLAIR 需要 4 小

**基金项目:** 上海市博士后基金: 颅内动脉瘤流行病学特征的 3T 3D-TOF-MRA 研究, 课题编号: 07R214136

**收稿日期:** 2012-05-23; **修回日期:** 2012-08-01

**作者简介:** 袁陆涛 (1987-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 颅脑损伤的基础及临床研究, 脑血管病的早期诊断和微创治疗。

**通讯作者:** 陈世文 (1971-), 男, 博士 (后), 副教授, 副主任医师, 主要研究方向: 颅脑损伤的基础及临床研究, 脑血管病的早期诊断和微创治疗。