

- 19 Baskett DA, Andersen KE, Liden C, et al. Evaluation of the skin sensitizing potency of chemicals by using the existing methods and considerations of relevance for elicitation. Contact Dermatitis, 2005, 52(1): 39-43.
- 20 Ruckert R, Brandt K, Hofmann U, et al. IL-2-IgG2b fusion protein suppresses murine contact hypersensitivity in vivo. J Invest Dermatol, 2002, 119(2): 370-376.
- 21 Plitz T, Saint-Mezard P, Satho M, et al. IL-18 binding protein protects

- against contact hypersensitivity. J Immunol, 2003, 171(3): 1164-1171.
- 22 Mimura T, Shinozaki Y, Kawasaki H, et al. JTP-27536 [(+)-1, 3-dihydroxy-2-hydroxymethylpropyl-2- ammonium 2-[(R)-3-cyclohexyl-1-phenylpropyl]-1, 3-dioxo-2, 3-dihydro-1H-isoindole-5-carboxylate monohydrate], a novel inhibitor of immunoglobulins and interleukin-5 with anti-inflammatory properties in mouse allergic dermatitis model. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 314(1): 293-301.

(收稿日期: 2005-03-31)

磷脂酶 D 与肿瘤的关系



王亚雄

摘要 磷脂酶 D(PLD)是一种重要的信号转导分子,具有水解磷脂酰胆碱(PC)的能力。在细胞内,PLD 的直接或者间接水解产物磷脂酸(PA)及甘油二酯(DAG)均是重要的脂质第二信使,在多条信号转导通路中都涉及 PLD 的活化。在许多肿瘤组织中,PLD 的活性异常升高,大量的研究表明 PLD 与肿瘤的关系密切。

关键词 磷脂酶 D; 肿瘤发生; 分化; 凋亡; 转移

文章编号 1673-4394(2006)02-0089-04

中图分类号 R730.2

文献标识码 A

Phospholipase D and Tumor

WANG Ya-xiong

(Department of Immunology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

Abstract Phospholipase D (PLD) is an important signaling molecule, which can hydrolyse phosphatidylcholine (PC) into phosphatidic acid (PA) and choline. Furthermore, PA and its hydrolysis product, diacylglycerol (DAG), are important lipid second messengers. Hence, the activation of PLD involves in multiple signaling pathways. A large body of evidence indicates that the activity of PLD is significantly increased in a variety of tumors and PLD is tightly involved in biological behaviors of tumor cells.

Key words Phospholipase D; Tumorigenesis; Differentiation; Apoptosis; Tumor metastasis

磷脂酶 D(phospholipase D, PLD)首先在植物中发现,随后细菌及哺乳动物的 PLD 基因相继被克隆。在哺乳动物存在 PLD1 及 PLD2 两种异构体,且这两种异构体在基因序列上具有相当大的同源性,但是其活性调节及亚细胞分布却存在很大的差异:PLD1 主要分布于高尔基体、内体、溶酶体及其分泌囊泡,而 PLD2 主要分布于胞膜。在不同的组织、细胞类型这两种 PLD 异构体的表达水平也存在很大的差异。

PLD1 是一个含有 1 074 个氨基酸、分子量 124 000 的蛋白质,而 PLD2 是一个含 933 个氨基酸、分子量 106 000 的蛋白质,与 PLD1 有 50%~53% 的同源性。PLD 具有水解磷脂酰胆碱(phosphatidyl-choline, PC)的能力,水解 PC 生成磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和胆碱(choline),而 PA 则可在磷脂酸磷酸水解酶(Phosphatidic acid phosphohydrolase, PAP)作用下水解生成甘油二酯(diacylglycerol, DAG),或者是在磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)的作用下水解生成溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)^[1]。在细胞内,PA 及 DAG 均是重要的脂质第二信使。有研究表明 PA 在

基金项目: 福建省科技厅重点项目(2004Y010)

作者单位: 350004 福州,福建医科大学免疫学系(硕士研究生)

审校者: 福建医科大学免疫学系 朱玲

Raf-1 的募集及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (The mammalian target of rapamycin, mTOR) 的活化过程中具有重要作用^[2,3]。Raf-1 募集至胞膜是丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号级联反应活化过程中关键的一步, 并且 MAPK 信号级联反应及 mTOR 的活化均能提供一种促有丝分裂信号, 这可能与一些肿瘤的发生、发展过程密切相关。

肿瘤细胞在生物学特性上具有以下特点: 增殖失控、分化障碍和凋亡受阻。在许多肿瘤组织中, 例如肾癌、胃癌及结肠癌中^[4~6], PLD 的活性异常升高。大量的研究表明 PLD 在肿瘤的发生、分化、凋亡及转移等过程中扮演重要的角色。

1 PLD 与肿瘤的发生

在肿瘤的发生过程中, 增殖失控是一种重要的机制。Ahn 等^[7]的研究表明 PLD 能够与 c-Src 相互作用协同促进细胞增殖, 而过度表达 PLD1 或者 PLD2 的成纤维细胞不仅发生形态学的改变, 生长特性也发生改变, 在软琼脂糖中表现出非锚定依赖性生长, 并且这些细胞基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的分泌也增加。细胞周期分布揭示处于 S 期的细胞比例增加, 细胞周期素 D3 (cyclin D3) 的表达异常上调, 表现出恶性转化的特点^[8]。在表达表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的大鼠 3Y1 成纤维细胞, 过度表达野生型的 RalA 或者活性的 Rala 突变体导致 PLD 的活性升高并使细胞发生转化。而且过度表达 PLD1 可导致表达 EGFR 的 3Y1 成纤维细胞在软琼脂中的集落形成率增加, 更重要的是细胞形成集落的能力与 PLD1 的表达水平相关^[9]。这些结果表明 PLD 具有促细胞增殖、诱导细胞转化的潜能。

2 PLD 与分化

El Marjou 等^[10]利用不同分化程度的白血病细胞株证实, PLD 的表达水平随着细胞分化程度的增加而增加, 而对分化诱导剂抵抗的白血病细胞株在分化诱导剂的作用下不能诱导分化, PLD 的表达水平也不发生改变。这就表明 PLD 涉及白血病细胞的分化过程, 同时在神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 诱导 PC12 细胞向神经元分化的过程中, PLD1 及 PLD 的激活剂 PKC α 及 PKC β II 的表达水平均发生上调。PKC 抑制剂 Ro-31-8220 抑制 PLD 的活化后导致神经突的生长抑制, 细胞的分化过程受阻^[11]。Watanabe 等^[12]的研究也指出在 NGF 诱导 PC12 细胞向神经元分化的过程中抑制 PLD2 的活性, 同样也抑制 PC12 细胞的分化过程, 但是 B16 黑色素瘤细胞在

黑素细胞刺激激素 (melanocyte-stimulating hormone, MSH) 的作用下, 发生以增加黑色素水平为特征的分化过程。在这一过程中, B16 细胞 PLD1 的蛋白水平及活性均降低, 同时加入外源性的细菌 PLD 或者过度表达 PLD1 均可抑制黑素细胞刺激素诱导的黑色素生成作用^[13]。这就表明在 MSH 诱导 B16 细胞分化的过程中, PLD1 具有抑制 B16 细胞黑色素生成的作用, 并且 Kageyama 等^[14]的研究指出乙酸豆寇佛波酯 (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, TPA) 在作用于 B16 小鼠黑素瘤细胞后, 通过激活 PLD 而降低黑色素的生成量, 正丁醇及 PLD2 的显性负性突变体 (dominant negative mutant) 均能阻断 TPA 对黑色素生成的抑制作用。他们的研究表明酪氨酸酶是黑色素生成过程中的关键酶, PLD2 通过激活泛素-蛋白酶系统而导致酪氨酸酶的降解加速, 进而导致黑色素的生成减少。

综上所述, 似乎有点矛盾, 前面指出 PLD 的活化为 PC12 细胞的分化所需, 而在 B16 黑色素瘤细胞分化的过程中, PLD 抑制黑色素的生成, 即 PLD 具有抑制黑色素瘤细胞分化的作用。其实, 在诱导不同细胞分化的过程中, PLD 表现出不同的生物学活性, 这可能由于细胞类型及诱导剂的种类不同而异, 具体的机制还有待进一步探讨。

3 PLD 与凋亡

凋亡 (apoptosis) 又称程序性细胞死亡 (programmed cell death), 是一种基因调控的细胞自主性死亡过程。在肿瘤治疗过程中, 诱导肿瘤细胞凋亡是一种重要的治疗手段。有研究表明在诱导肿瘤细胞凋亡的过程中 PLD 能够提供一种促生存抗凋亡信号。Zhong 等^[15]的研究指出, 具有酪氨酸激酶活性的 v-Src 转化大鼠 3Y1 成纤维细胞后, PLD 的活性升高, 且对血清去除的凋亡产生抵抗。但是阻断 PLD 的活性, v-Src 转化的细胞将发生凋亡, 而且过度表达 PLD1 或者 PLD2 可以阻止放线菌素 D 诱导的 S1P₃-CHO 细胞的凋亡过程^[16]。

mTOR 具有蛋白激酶的活性, 可以磷酸化多种靶蛋白, 这些靶蛋白大多是蛋白合成的重要调控因子, 其中核糖体亚单位 S6 激酶-1 (ribosomal subunit S6 kinase 1, S6K1) 及真核起始因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1) 是 mTOR 的两个重要靶蛋白, 并且 S6K1 及 4E-BP1 的活化通常作为 mTOR 活化的标志。mTOR 通过调节蛋白的合成参与细胞生长、增殖等过程的调控^[17]。因而在一些肿瘤的发生、发展过程中 mTOR 起重要的

作用。PLD 的活性产物 PA 对 mTOR 具有活化作用, 而雷帕霉素(rapamycin)具有抑制 mTOR 活化的作用, 其中一种机制就是雷帕霉素, 它可以与 PA 竞争性地结合到 mTOR 的 FK506 结合蛋白-雷帕霉素结合结构域 (FK506-binding protein-rapamycin-binding domain, FRB domain), 从而阻止 mTOR 激活下游的效应分子^[3]。Chen 等^[18] 利用 4 种不同生物学性状的乳腺癌细胞株证实在一些肿瘤细胞 PLD 通过激活 mTOR 而提供一种促生存信号, 证据如下: ①MDA-MB-231 乳腺癌细胞的 PLD 水平明显高于 MCF-7 细胞, MCF-7 乳腺癌细胞对血清去除诱导的凋亡敏感, 而 MDA-MB-231 细胞对血清去除诱导的凋亡产生抵抗; ②MCF-7 细胞增加 PLD2 的表达水平导致 PLD 的活性升高, 同时也导致 S6K1 的磷酸化水平升高, 并使得 MCF-7 细胞对血清去除诱导的凋亡产生抵抗; ③在雷帕霉素抑制 mTOR 的活性后, 导致 PLD 活性较高的 MDA-MB-231 及 MCF-7R 乳腺癌细胞对血清去除诱导的凋亡敏感, 而 PLD 活性较低的 MDA-MB-435S 乳腺癌细胞株对这种凋亡应激不敏感; ④同雷帕霉素与 PA 竞争相一致, MDA-MB-231 乳腺癌细胞株的 PLD 水平高于 MCF-7R 乳腺癌细胞, 在诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株凋亡的过程中需要更高浓度的雷帕霉素。Zhong 等^[15] 的研究指出, 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的 PLD 活性后, 将诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞细胞凋亡, 而在 MCF-7 细胞未观察到这种现象。这就表明一些肿瘤细胞 PLD 通过激活 mTOR 而产生抗凋亡效应。

野生型 P53 蛋白是核内一种磷酸化的蛋白质, 在细胞凋亡的调控过程中起重要作用。一些外界刺激如 DNA 损伤、应激等可引起细胞内 P53 的蛋白水平升高, 从而激活一系列下游靶基因的转录, 诱导细胞周期 G1 期停滞及细胞凋亡, 其中 MDM2 癌基因及 P21/WAF1 基因均是野生型 P53 蛋白的靶基因。MDM2 蛋白与 P53 蛋白结合后可抑制 P53 蛋白介导的反式激活、增殖抑制、诱导凋亡等功能, 同时 MDM2 蛋白可以催化 P53 蛋白的降解。P21 蛋白是一种广泛的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白, 是介导细胞 G1 期停滞的重要因子, 对整个细胞周期起着负调节作用^[19]。最近, Hui 等^[20] 的研究表明增加 PLD 的表达可以抑制 DNA 损伤诱导的凋亡。在这一过程中, 增加 PLD 的表达导致 MDM2 的表达增加, 进而导致 P53 的稳定性降低, 降解加速。同时, 他们也观察到增加 PLD 的表达同样抑制了野生型 P53 蛋白转录调控的靶蛋白 P21/WAF1 的表达。这就说明 PLD 的

表达增加可以使野生型 P53 蛋白的稳定性降低而抑制 DNA 损伤诱导的凋亡。总之, 大量的研究表明 PLD 具有抗凋亡的效应。

4 PLD 与肿瘤转移

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌离子依赖的内肽酶, 对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)具有广泛的降解作用, 在肿瘤的浸润、转移过程中起重要作用。MMP-9 又称白明胶酶 B, 对 IV 型胶原具有特异性水解作用, 而 IV 型胶原又是 ECM 中的主要成分。因此, MMP-9 在肿瘤浸润、转移过程中的作用显得尤为重要。有研究表明肿瘤细胞 MMP-9 的分泌与 PLD 的活化有关。佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)作用于人纤维肉瘤细胞株 HT1080 细胞后, 以时间及剂量依赖的方式诱导 MMP-9 的分泌, 同时细胞内 PLD 的活性也增加。将短链磷脂酸加入 HT 1080 细胞培养基中同样刺激 MMP-9 的分泌, 而正丙醇在抑制 PLD 活性产物 PA 产生的同时也抑制了 MMP-9 的分泌。在 HT 1080 细胞培养基中加入短链甘油二酯未能刺激 MMP-9 的分泌, 而且心得安(一种磷脂酸磷酸酶活性的抑制剂)对 PMA 或者 PA 诱导的 MMP-9 的分泌无明显抑制作用。这就表明在 PMA 诱导 MMP-9 分泌的过程中 PLD 起主要作用, 并且这一效应是通过 PLD 的活性产物 PA 介导的^[21]。Ho 等^[22] 的研究表明在 HT 1080 细胞, BFA(一种 ARF 的活性抑制剂)能够阻断 PMA 刺激的 MMP-9 的分泌效应, 而且过度表达的 arfaptin 1(一个 39 000 的 ARF 结合蛋白在体外能够抑制 ARF 对 PLD 的活化)在抑制 PLD 活化的同时也抑制了 PMA 诱导的 MMP-9 的分泌。这些结果从另一个侧面也反映了 PLD 参与肿瘤细胞分泌 MMP-9 的过程。在偏酸性的条件下培养 B16 黑色素瘤细胞可以使得 MMP-9 的表达增加, 在这一过程中同样涉及 PLD 的活化, 运用正丁醇抑制 PLD 的活性后, 以剂量依赖性的方式抑制 B16 细胞 MMP-9 的表达水平, 而且在培养基中加入外源性的 PLD 后, B16 细胞 MMP-9 的表达水平也提高。研究表明在 MMP-9 的启动子区含有 NF-κB 的结合位点, B16 细胞在 pH 值偏酸性的条件下培养可以导致 PLD 活化, 随后激活 ERK1/2 及 p38, 最终导致 NF-κB 活化, 使得 MMP-9 的转录水平增加^[23]。

5 结语

PLD 是一种重要的信号转导分子, 在多条信号转导通路中都涉及 PLD 的活化, 如 PLD/mTOR 促生存信号通路; PLD 的直接水解产物 PA 对 Raf-1 的

募集作用,从而参与 MAPK 信号传导通路的活化;PLD 对泛素-蛋白酶系统的激活作用等。虽然其中的一些机制还有待进一步阐明,但可以这样认为,这些信号通路的活化是 PLD 表现其生物学效应的主要分子基础。总之,大量的研究表明,在一些肿瘤的发生、分化、凋亡及转移等过程中 PLD 扮演极其重要的角色。随着免疫学及分子生物学技术的发展,在不久的将来 PLDs 有望成为肿瘤治疗的靶标。

参考文献

- 1 Liscovitch M, Czamy M, Fiucci G, et al. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J*, 2000, 345(Pt 3): 401-415.
- 2 Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, et al. The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem*, 2000, 275(31): 23911-23918.
- 3 Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, et al. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 2001, 294(5548): 1942-1945.
- 4 Zhao Y, Ehara H, Akao Y, et al. Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278(1): 140-143.
- 5 Uchida N, Okamura S, Kuwano H. Phospholipase D activity in human gastric carcinoma. *Cancer Res*, 1999, 59(1B): 671-675.
- 6 Yoshida M, Okamura S, Kodaki T, et al. Enhanced levels of oleate-dependent and Arf-dependent phospholipase D isoforms in experimental colon cancer. *Oncol Res*, 1998, 10(8): 399-406.
- 7 Ahn BH, Kim SY, Kim EH, et al. Transmodulation between phospholipase D and c-Src enhances cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(9): 3103-3115.
- 8 Min DS, Kwon TK, Park WS, et al. Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with overexpression of phospholipase D isozymes in cultured murine fibroblasts. *Carcinogenesis*, 2001, 22(10): 1641-1647.
- 9 Lu Z, Hornia A, Joseph T, et al. Phospholipase D and RalA cooperate with the epidermal growth factor receptor to transform 3Y1 rat fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(2): 462-467.
- 10 El Marjou M, Montalescot V, Buzyin A, et al. Modifications in phospholipase D activity and isoform expression occur upon maturation and differentiation in vivo and in vitro in human myeloid cells. *Leukemia*, 2000, 14(12): 2118-2127.
- 11 Min DS, Ahn BH, Rhie DJ, et al. Expression and regulation of phospholipase D during neuronal differentiation of PC12 cells. *Neuropharmacology*, 2001, 41(3): 384-391.
- 12 Watanabe H, Yokozeki T, Yamazaki M, et al. Essential role for phospholipase D2 activation downstream of ERK MAP kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth from PC12 cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(36): 37870-37877.
- 13 Ohguchi K, Banno Y, Akao Y, et al. Involvement of phospholipase D1 in Melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(5): 3408-3412.
- 14 Kageyama A, Oka M, Okada T, et al. Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. *J Biol Chem*, 2004, 279(26): 27774-27780.
- 15 Zhong M, Shen Y, Zheng Y, et al. Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(3): 615-619.
- 16 Yamada M, Banno Y, Takuwa Y, et al. Overexpression of phospholipase D prevents actinomycin D-induced apoptosis through potentiation of phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in Chinese hamster ovary cells. *Biochem J*, 2004, 378(Pt 2): 649-656.
- 17 Hay N, Sonnenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1926-1945.
- 18 Chen Y, Rodrik V, Foster DA. Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells. *Oncogene*, 2005, 24(4): 672-679.
- 19 Colman MS, Alshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res*, 2000, 462(2-3): 179-188.
- 20 Hui L, Abbas T, Pielak RM, et al. Phospholipase D elevates the level of MDM2 and suppresses DNA damage-induced increases in p53. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(13): 5677-5686.
- 21 Williger BT, Ho WT, Exton JH. Phospholipase D mediates matrix metalloproteinase-9 secretion in phorbol ester-stimulated human fibrosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1999, 274(2): 735-738.
- 22 Ho WT, Exton JH, Williger BT. Arfaptin 1 inhibits ADP-ribosylation factor-dependent matrix metalloproteinase-9 secretion induced by phorbol ester in HT1080 fibrosarcoma cells. *FEBS Lett*, 2003, 537(1-3): 91-95.
- 23 Kato Y, Lambert CA, Colige AC, et al. Acidic Extracellular pH Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in mouse metastatic melanoma Cells through the Phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280(12): 10938-10944.

(收稿日期: 2005-05-04)

中华医学会《国外医学眼科学分册》2006 年变更刊名为《国际眼科纵览》

为了进一步促进杂志发展,经新闻出版总署批准,《国外医学眼科学分册》自 2006 年变更刊名《国际眼科纵览》,CN 11-5500/R, ISSN 1673-5803。本刊办刊宗旨不变,将继续保持综述特色,竭诚为广大读者、作者服务。邮发代号不变:2-609,欢迎订阅。

中华医学会《国际眼科纵览》编辑部