

c-FLIP在凋亡增殖中的双向调节作用及与肿瘤预后和治疗关系的研究*

臧凤琳 综述 孙保存 审校

摘要 细胞型Fas相关死亡域样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白(c-FLIP)在细胞凋亡和增殖信号通路中具有重要的调节作用。一方面通过与Caspase-8竞争性结合上游信号阻断凋亡通路,另一方面经酶切释放出p43-FLIP和p22-FLIP片段促进NF- κ B、Erk等增殖信号通路,最终引发肿瘤发生发展、浸润转移。c-FLIP的双向调节作用与蛋白表达量、底物的亲和力和亚细胞定位密切相关。恶性肿瘤中c-FLIP高表达使细胞逃逸机体免疫监视、耐受化疗药物杀伤以及抵抗TRAIL、FasL诱导的凋亡。本文初步阐释c-FLIP在不同的细胞微环境中对凋亡-增殖通路的双向调节作用及其分子机制,并对c-FLIP与恶性肿瘤预后、化疗和TRAIL生物治疗相关性进行综述,为肿瘤化疗耐药和TRAIL抵抗提供理论基础。

关键词 c-FLIP 凋亡 增殖 预后 肿瘤标志物

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2013.1080

Research progress on the dual regulation of c-FLIP in apoptosis and proliferation and the relationship between c-FLIP and tumor prognosis, chemotherapy, and TRAIL treatment in cancers

Fenglin ZANG, Baocun SUN

Correspondence to: Baocun SUN; E-mail: baocunsun@gmail.com

Department of Pathology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin 300060, China

This study was supported by the Outstanding Young Scientist Program of the National Natural Science Foundation of China (No. 81001020)

Abstract Cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme inhibitory protein (c-FLIP) belongs to the death effector domain superfamily, which is important in regulating apoptosis and proliferation. c-FLIP inhibits the extrinsic receptor-mediated apoptotic pathways and intrinsic mitochondrial apoptotic pathways through competition with caspase-8 for recruitment to Fas-associated death domain protein. Moreover, the cleavage products (i.e., p43-FLIP fragment and p22-FLIP fragment) directly activate NF- κ B, Erk survival signaling, and other non-apoptotic signaling pathways. The c-FLIP (L) can function either as an anti-apoptotic molecule, in a way analogous to c-FLIP (S) and c-FLIP (R), or as a pro-apoptotic molecule to facilitate the activation of caspase-8 at the death-induced signaling complex. The identified dual functionality of c-FLIP depends on various factors, including its expression level, interaction with caspase-8, and its subcellular localization. c-FLIP is frequently over-expressed in many different tumor types, and contributes to tumor cell immune surveillance, chemotherapy resistance, and apoptosis-resistance induced by TNF α , TRAIL, and FasL. Furthermore, c-FLIP is essential in obtaining aggressive biological behaviors, and is useful in predicting the prognosis of patients with various malignant tumors. This review focuses on the molecular mechanisms that control the dual regulation of c-FLIP in life/death decision at death-induced signaling complex. Increasing evidence supports the function of c-FLIP as a tumor therapeutic marker to restore an apoptotic response for TRAIL therapy in cancers. Insight into these processes will improve our understanding of apoptosis, and provide new approaches for rational treatment strategies.

Keywords: c-FLIP, apoptosis, proliferation, prognosis, tumor marker

c-FLIP是目前发现的、能够在死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC)水平参与凋亡调节的重要因子,有3种表达形式和2种酶切

产物。长片段c-FLIP(L)、短片段c-FLIP(S),来自Raji细胞的c-FLIP(R),以及p43-FLIP和p22-FLIP片段在凋亡和增殖中起到重要调节作用,直接或间

作者单位:天津医科大学肿瘤医院病理科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室(天津市300060)

*本文课题受国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81001020)资助

通信作者:孙保存 baocunsun@gmail.com

网络出版日期:2013-11-7 网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1099.R.20131107.0851.002.html>

接影响肿瘤的恶性进展。本文将阐述 c-FLIP 的双向调节功能,并介绍该因子在肿瘤预后以及化疗、生物治疗作用中的最新研究进展。

1 c-FLIP 调节细胞凋亡和增殖

1.1 c-FLIP 对凋亡的调节

1.1.1 c-FLIP 抑制凋亡通路 在多种肿瘤和炎症反应中,c-FLIP 阻断肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)、Fas 配体(Fas ligand, FasL)和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)等诱导的凋亡。如皮肤淋巴瘤细胞对 TRAIL 抵抗与 c-FLIP 高表达密切相关;应用转录核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)刺激细胞表达 c-FLIP,使细胞对 FasL 诱导的凋亡抵抗;降低 c-FLIP 表达后,细胞恢复对 TRAIL 和 FasL 的凋亡敏感性^[1]。c-FLIP 不同片段对凋亡的反应存在差异。在髓样白血病中,过表达 c-FLIP(L)完全抑制 TRAIL 和 TNF α 诱导的凋亡;而 c-FLIP(S)过表达时,细胞存在一定的凋亡反应^[2]。c-FLIP 对线粒体凋亡通路和自发性凋亡同样具有调节作用。在人胚肾 293 细胞中,降低 c-FLIP 表达使促凋亡蛋白 Bad、Bax、细胞色素 C 和抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达量均发生改变^[3]。因此,c-FLIP 抑制多条凋亡信号通路,使肿瘤细胞逃避药物杀伤或理化损伤。

1.1.2 c-FLIP 抗凋亡的分子机制 c-FLIP 蛋白的晶体结构含有 6 个保守的 α 螺旋,在 α 2 和 α 5 螺旋之间存在重要的亲水集团。当 c-FLIP 与 Fas 相关死亡结构域蛋白(Fas-associated death domain, FADD)相互靠近时,c-FLIP 中死亡效应结构域(death effector domain, DED)2 的 α 2 和 α 5 的亲水集团与 FADD 的 α 1 和 α 4 片段结合并形成稳定的刚性结构,竞争性阻断 Caspase-8 的酶切和活化,抑制凋亡^[4]。Caspase-8 活化步骤为:释放 p10 小亚基,残留 p43 亚单位;释放 p18 大亚基,形成具有酶活性的异源四聚体。c-FLIP 对 Caspase-8 的抑制体现在两个层次:占据 FADD 上的结合位点,使 Caspase-8 分散在胞浆中,无法彼此切割;与少数 Caspase-8 形成异源二聚体,无法完成同源二聚体的酶切^[5]。目前认为,c-FLIP(S)和 c-FLIP(R)在 Caspase-8 酶切水解和凋亡转导中起负性调节作用;而 c-FLIP(L)的凋亡调节作用不是唯一,并与蛋白表达量、Caspase-8 的亲合力以及亚细胞定位等因素密切相关^[6]。

1.2 c-FLIP 对增殖的调节

1.2.1 c-FLIP 促进细胞增殖 c-FLIP 在细胞增殖、存活方面同样具有重要调节功能。首先,c-FLIP(L)基因纯合性缺失小鼠表现出与 Caspase-8 和 FADD 基因纯合性缺失相似的致死性贫血和心脏发育障碍,

提示 c-FLIP(L)在器官分化过程中发挥调节作用^[2]。随后发现,特异性降低 c-FLIP 表达后,细胞对 T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)的刺激不产生应答,同时胸腺、脾、淋巴结中的 T 细胞总数均减少,机体免疫反应的程度明显减弱^[5]。此外,在恶性胶质瘤中存在对 TRAIL 诱导凋亡抵抗的细胞,这群细胞凭借高表达的 c-FLIP(L)不仅逃避凋亡,而且促进细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, Erk)磷酸化,促进细胞增殖,更显著地展现恶性生物学行为,上述表现在特异性降低 c-FLIP(L)后,均不复存在^[6]。以上研究通过体内、外实验证实 c-FLIP 在器官发育、免疫应答以及肿瘤发生发展中均不同程度地调节着细胞的存活和增殖。

1.2.2 c-FLIP 促增殖的分子机制 c-FLIP 促增殖通过 p43-FLIP 和 p22-FLIP 片段实现。在特定微环境中,二者激活 NF- κ B、Akt 和 Erk 等细胞增殖通路。具体机制:1) p43-FLIP 与肿瘤坏死因子受体相关因子 1(TNF receptor associated factor 1, TRAF1)、TRAF2 和受体相互作用蛋白 1(receptor interacting protein 1, RIP1)形成复合体,激活 NF- κ B 通路^[7]。2) p43-FLIP 和 p22-FLIP 直接活化 NF- κ B 抑制剂激酶(NF- κ B inhibitory kinase, IKK),磷酸化 NF- κ B 抑制剂(inhibitory NF- κ B, I κ B),解除对 NF- κ B 的抑制,展现细胞增殖效应。研究发现,p22-FLIP 片段是在缺乏死亡受体的条件下,由 Caspase-8 剪切 c-FLIP 产生的。此时,Caspase-8 仅发挥酶切水解能力,切割出 p22-FLIP 片段,进而直接活化 NF- κ B 通路^[8]。3) c-FLIP(L)干扰 Akt 通路重要位点 Gsk3- β 磷酸化,解除对 Akt 的抑制,促进细胞增殖^[9]。4) 与 c-FLIP(L)的空间分布有关,当 c-FLIP(L)和 RIP1 位于细胞膜非脂筏部位时,二者相互作用促进 NF- κ B、Erk 活化和增殖^[10]。

1.3 c-FLIP 对凋亡-增殖的双向调节

经过十余年的研究,人们认识到 c-FLIP 在细胞凋亡和增殖领域均具有重要的调节功能,故将其比喻为“细胞生死存亡的分子开关”。c-FLIP 双向调节能力主要由 c-FLIP(L)展现,并与 Caspase-8 密不可分。凋亡转导与 Caspase-8-p43 和 p41 片段直接相关,而增殖调节则依赖于 p43-FLIP^[11]。双向调节的决定因素包括:蛋白表达量、与 Caspase-8 的亲合力及亚细胞定位^[4, 6, 10-12]。c-FLIP(L)低表达时,Caspase-8 形成同源二聚体,不产生 p43-FLIP,促进凋亡、抑制增殖;c-FLIP(L)高表达时,Caspase-8 与结合 FADD 受阻,Caspase-8-p43 和 p41 片段、p43-FLIP 均无法形成,凋亡和增殖均被阻滞^[11]。只有 c-FLIP(L)中等程度表达时,c-FLIP(L)和 Caspase-8 形成异源二聚体,释放 p43-FLIP 片段,促进增殖。由于形成异源二聚

体的能量相对较低,因此Caspase-8优先与c-FLIP(L)结合,并形成Caspase-8-p43-FLIP正反馈,转导凋亡^[6]。此外,c-FLIP(L)在DISC附近表现为抑制Caspase-8活性并阻断凋亡;而在胞浆中则经Caspase-8酶切产生p22-FLIP片段,触发NF- κ B增殖通路^[10]。Fricker等^[12]进一步补充c-FLIP(L)促凋亡的先决条件:c-FLIP(L)呈中等水平表达并同时具备强烈的Fas刺激;c-FLIP(S)和c-FLIP(R)高表达也是c-FLIP(L)促凋亡的重要分子基础。

2 c-FLIP与肿瘤预后和治疗的关系

2.1 c-FLIP与肿瘤预后的相关性

c-FLIP在多种恶性肿瘤中高表达,并与患者预后不良显著相关。如在恶性黑色素瘤中,c-FLIP与肿瘤浸润深度及组织学类型显著相关,并与增殖指数呈正相关^[13];在II期和III期结肠癌患者中,c-FLIP表达越高临床分期越差,高表达c-FLIP患者无病生存期明显缩短^[14];在对子宫内膜癌放疗后复发病例的研究中发现,c-FLIP表达量和异常核定位与高复发率显著相关,且缺氧微环境诱发c-FLIP出现异常核定位并促进肿瘤复发^[15];在卵巢癌中c-FLIP与Caspase-8、TRAIL受体表达呈正相关,与P53蛋白核表达呈负相关,c-FLIP(L)高表达、P53蛋白核浓集患者的生存时间明显缩短^[16]。Mitsiades等^[17]指出c-FLIP和Caspase-8的平衡决定甲状腺癌患者的预后,且Caspase-8蛋白的酶切活化也依赖于二者间的表达平衡。因此,在对c-FLIP功能的研究中,要关注Caspase-8的表达水平和活性,只有将两者综合考虑才能得到全面、客观的实验结论。

2.2 c-FLIP与化疗的关系

多种化疗药物破坏c-FLIP基因结构,并降低蛋白表达水平,诱导肿瘤细胞凋亡,实现抗肿瘤的治疗目的。异羟肟酸通过调节受体和线粒体凋亡通路的多种因子诱导皮肤T细胞淋巴瘤细胞凋亡,其中降低c-FLIP表达是该药物重要的抗癌机制之一^[18]。在卵巢癌细胞中,顺铂使c-FLIP与P53、E3连接酶Itch形成复合物,并以P53依赖的方式诱导c-FLIP泛素化降解,使肿瘤细胞对化疗药物敏感性;活化的Akt减弱顺铂对c-FLIP的降解能力并使肿瘤细胞具有抗药性^[19]。硼替佐米在多发骨髓瘤中,降低c-FLIP(L)的表达;伴随着c-FLIP(L)的降低,会出现c-FLIP(S)表达的短暂上升^[20]。以上研究表明,化疗药物通过降低c-FLIP表达水平,解除对凋亡通路的抑制,继而杀伤肿瘤细胞。肿瘤细胞高表达的c-FLIP拮抗药物的化疗效果,特异性降低c-FLIP表达可能成为对抗化疗耐药的研究方向。

2.3 c-FLIP对TRAIL生物治疗的辅助作用

TRAIL为TNF超家族成员,通过死亡受体通路诱导细胞凋亡。因其选择性诱导肿瘤细胞凋亡、对正常细胞不产生作用,成为一种很有前途的生物治疗手段。但仍有部分肿瘤对TRAIL不敏感,推测与c-FLIP的凋亡抑制密切相关。如在散发性和遗传性非息肉病性结肠癌患者中,c-FLIP和Caspase-8均高水平表达,降低c-FLIP和/或增强Caspase-8均提高患者对TRAIL生物治疗的敏感性^[21]。Piggott等^[22]观察到c-FLIP对TRAIL的辅助作用与乳腺癌干细胞有关,特异性降低c-FLIP并辅以TRAIL处理后,虽然仍有10%~30%肿瘤细胞存活,但该治疗方法能够选择性减少干细胞数目,最终降低原发瘤80%的复发率和移植瘤90%的转移率。基于以上研究,目前认为c-FLIP很可能是TRAIL治疗的选择性标志物,即对TRAIL耐药的肿瘤细胞首先要检测c-FLIP表达水平。如果c-FLIP高表达,可以应用特异性降低c-FLIP联合TRAIL的方法;如果c-FLIP低表达,说明TRAIL对该肿瘤治疗无效,需要改换其他治疗手段。

3 展望

c-FLIP对凋亡-增殖的双向调节历经多个步骤、多个层面,涉及众多协调因子和分子事件,具体的分子机制仍需要进一步阐释。明确c-FLIP生物学功能,丰富和完善凋亡-增殖调控理论,对于肿瘤的预后因素、阐释化疗和TRAIL治疗耐药机制以及寻找有应用价值的治疗选择性标志物均具有十分重要的意义。

参考文献

- 1 Braun FK, Hirsch B, Al-Yacoub N, et al. Resistance of cutaneous anaplastic large-cell lymphoma cells to apoptosis by death ligands is enhanced by CD30-mediated overexpression of c-FLIP[J]. *J Invest Dermatol*, 2010, 130(3):826-840.
- 2 Oztürk S, Schleich K, Lavrik IN. Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(11):1324-1331.
- 3 Zaitseva L, Rushworth SA, MacEwan DJ. Silencing FLIP(L) modifies TNF-induced apoptotic protein expression[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(7):1067-1072.
- 4 Yu JW, Jeffery PD, Shi Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL[J]. *Proc Natl Sci U S A*, 2009, 106(20):8169-8174.
- 5 van Raam BJ, Salvesen GS. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1824(1):113-122.
- 6 Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(1):36-41.
- 7 Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy[J]. *Integr Biol (Camb)*, 2011, 3(4):279-296.
- 8 Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, et al. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells[J]. *Mol Syst Biol*, 2010, 6:352-368.

- 9 Fulda S. Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(2):195-201.
- 10 Lavrik IN, Krammer PH. Life and death decisions in the CD95 system: main pro- and anti-apoptotic modulators[J]. Acta Naturae, 2009, 1(1):80-83.
- 11 Lavrik IN. Systems biology of apoptosis signaling networks[J]. Curr Opin Biotechnol, 2010, 21(4):551-555.
- 12 Fricker N, Beaudouin J, Richter P, et al. Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL[J]. J Cell Biol, 2010, 190(3):377-389.
- 13 Tian F, Lu JJ, Wang L, et al. Expression of c-FLIP in malignant melanoma, and its relationship with the clinicopathological features of the disease[J]. Clin Exp Dermatol, 2012, 37(3):259-265.
- 14 McLornan DP, Barrett HL, Cummins R, et al. Prognostic significance of TRAIL signaling molecules in stage II and III colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(13):3442-3451.
- 15 Santacana M, Yeramian A, Velasco A, et al. Immunohistochemical features of post-radiation vaginal recurrences of endometrioid carcinomas of the endometrium: role for proteins involved in resistance to apoptosis and hypoxia[J]. Histopathology, 2012, 60(3):460-471.
- 16 Duiker EW, van der Zee AG, de Graeff P, et al. The extrinsic apoptosis pathway and its prognostic impact in ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2010, 116(3):549-555.
- 17 Mitsiades CS, Poulaki V, Fanourakis G, et al. Fas signaling in thyroid carcinomas is diverted from apoptosis to proliferation[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(12):3705-3712.
- 18 Al-Yacoub N, Fecker LF, Möbs M, et al. Apoptosis induction by SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells is related to downregulation of c-FLIP and enhanced TRAIL signaling[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(9):2263-2274.
- 19 Abedini MR, Muller EJ, Bergeron R, et al. Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein[J]. Oncogene, 2010, 29(1):11-25.
- 20 Perez LE, Parquet N, Meads M, et al. Bortezomib restores stroma-mediated APO2L/TRAIL apoptosis resistance in multiple myeloma[J]. Eur J Haematol, 2010, 84(3):212-222.
- 21 Heijink DM, Kleibeuker JH, Jalving M, et al. Independent induction of caspase-8 and cFLIP expression during colorectal carcinogenesis in sporadic and HNPCC adenomas and carcinomas[J]. Cell Oncol, 2007, 29(5):409-419.
- 22 Piggott L, Omidvar N, Martí Pérez S, et al. Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anti-cancer agent, TRAIL[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(5):R88.

(2013-07-05 收稿)

(2013-10-24 修回)

(本文编辑:张佖)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

科技论文材料与方法的撰写要求

材料(资料或对象)与方法让读者在同等条件下可重复出该结果,是科技论文的重要特征。其撰写应注意以下几个方面:1)紧扣主题;2)科学真实;3)典型而新颖;4)符合伦理学原则。

按重要性程度,时间排序或实验过程书写。包括:1)实验动物:包含品系名称,级别,雌雄,月龄或周龄,体重,合格证号,提供单位和生产许可证号,饲养及环境;2)药品及试剂:主要试剂的名称,级别,来源,批号和配置方法;3)主要仪器:主要仪器名称,生产厂家;4)方法:包含随机分组方法,给药剂量与途径,动物处理,指标测定方法,数据处理方法。

信息不全,主次不分,顺序颠倒,写入一般常规试剂是撰写禁忌。常见引起注意的问题:1)组别名称随心所欲,全文不统一,没有直呼其名,用A,B组代号,读者阅读时要反复前后对应,文字表述不简明,术语使用不当。小标题太多冗长;2)过繁:避免教科书式的撰写方法;3)过简:介绍的内容无法使读者重复该实验;4)不规范:应选用规范的单位和书写符号。