

# Clusterin 在乳腺癌研究中的进展

徐亮 综述 张瑾 审校

簇集蛋白(Clusterin, CLU), 也称异二聚体硫酸糖蛋白(sulfatealglycoprotein, SGP-2)和糖蛋白Ⅲ等, 广泛存在于人体各种体液中并在各种组织中表达, 参与包括细胞死亡、免疫调节、细胞粘连和组织重塑等多种生物学过程。CLU 与凋亡的关系是最近研究的热点。起初研究者认为 CLU 是细胞凋亡的标志物, 高水平的 CLU 具有促凋亡作用<sup>[1]</sup>, 但后来也有实验证实 CLU 具有抗凋亡作用<sup>[2]</sup>。研究发现, CLU 在多种肿瘤组织中都有上调表达, 并通过其抗凋亡作用参与肿瘤的形成<sup>[3]</sup>。CLU 过表达可能与肿瘤的化疗耐药相关。本文针对近年来 CLU 在乳腺癌中的研究现状作一综述, 以探讨其在乳腺癌等恶性肿瘤的发生、发展及治疗和预后中的作用。

## 1 CLU 的分子结构

Clusterin 是一种凋亡相关因子。人类 Clusterin 由 TRPM-2 单拷贝基因表达, 定位于 8p21 上<sup>[4]</sup>。CLU 由含 1651 个核苷酸的 mRNA 翻译而来, 最初的翻译产物是由 448 个氨基酸组成的蛋白质, 氨基端的前 21 个氨基酸组成典型的疏水性分泌信号序列(CLU 的前导序列), 此前导序列为 CLU 的分泌及形成完整二聚体结构所必需, 也是抗凋亡作用所必需的功能域。这个最初的翻译产物通过在第 205 位精氨酸和 206 位丝氨酸之间蛋白水解成为一个相对分子质量( $M_r$ )为 24 000 的  $\alpha$  链(1~205 氨基酸)和一个  $M_r$  26 000 的  $\beta$  链(206~426 氨基酸),  $\alpha$  链和  $\beta$  链之间通过 5 个二硫键相联。这个  $M_r$  50 000 的前体蛋白通过不同程度的糖基化形成一个  $M_r$  76 000~80 000 的成熟蛋白质, 糖基化的程度具有种属和组织的特异性。人类 CLU 因糖基化而使  $\alpha$  和  $\beta$  链的相对分子质量相等, 而鼠的 CLU 糖基化  $\alpha$  链和  $\beta$  链的  $M_r$  分别是 30 000~40 000 和 42 000~48 000<sup>[5]</sup>。

## 2 CLU 的生物学功能

CLU 生物学功能多样, 参与脂质运输、补体调节, 参与生殖以及促进或抑制凋亡等多种生物学过程<sup>[4]</sup>。CLU 与神经系统的发育有关。Charney 等<sup>[6]</sup>研究小鼠的神经系统发育时发现: 小鼠胚胎时期的皮质下结构就有 CLU 表

作者单位: 300060 天津, 天津医科大学附属肿瘤医院乳腺三科

通信作者: 张瑾, E-mail: davidz9132002@yahoo.com

达;在缺少 CLU 蛋白表达时,虽然神经系统的发育没有明显改变,但是小鼠面神经的运动神经元明显发育障碍。CLU 也有抗动脉粥样硬化作用。Schwarz 等<sup>[7]</sup>发现:CLU 存在于硬化动脉的内膜层和中膜层中,平滑肌细胞也能合成 CLU;CLU 能和酶修饰的低密度脂蛋白结合,减轻其细胞毒性,从而发挥其在动脉粥样硬化形成时的保护作用。还有研究表明,CLU 作为一种重要的补体调节因子,是膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC) 组装的调节蛋白,可与 C5b~7、C5b~8 或 C5b~9 结合,对 MAC 的组装起抑制作用,从而防止 MAC 的溶细胞作用。CLU 与 S 蛋白具有协同作用,可使 MAC 具有可溶性而失去溶细胞作用。体内外的研究均表明 CLU 具有显著的保护靶细胞免于补体攻击的作用<sup>[8]</sup>。此外,CLU 还参与巨噬细胞聚集、生殖道中精子的膜稳定、 $\beta$  淀粉样前体蛋白在血脑屏障的往返转运以及脂类的运输和清除等。目前,对它的许多生理功能了解甚少。

CLU 与凋亡的关系是最近研究的热点。研究发现,CLU 既有促进凋亡的作用<sup>[1]</sup>,又有抑制凋亡、促进肿瘤进展和诱导化疗耐药等作用<sup>[2]</sup>。主要是由于 CLU 有两种功能不同但又相互联系的亚型,核型 CLU(nCLU)和分泌型 CLU(sCLU)<sup>[9]</sup>。在人体细胞中,nCLU 是 nCLU mRNA 选择性剪切的结果,省略了第 II 个外显子。nCLU 的前体形式(糖基化 pnCLU)是一个  $M_r$  40 000 的蛋白质,在细胞损伤后,pnCLU 蛋白发生翻译后修饰,形成一个成熟的  $M_r$  约 55 000 具有促凋亡作用的 nCLU 蛋白。核型 CLU 不能定位于内质网并被糖基化,它的过度表达被认为是一种抑制细胞正常生长的死亡信号。有研究认为:核型 CLU 是受较高的细胞毒性应激诱导后产生的,可导致细胞死亡,在未受离子辐射的正常细胞内,如果核型 CLU 出现过表达也可引起细胞死亡<sup>[10]</sup>。成熟的分泌型蛋白是  $M_r(70\sim 80)\times 10^3$  的硫化异二聚体蛋白,是由  $M_r 60\times 10^3$  的前体蛋白在前导肽的作用下定位于内质网进行糖基化以后,并剪切成  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚单位,两者之间通过二硫键结合而成<sup>[11]</sup>。细胞受刺激后表达的 sCLU 被认为具有天然的抗凋亡能力。sCLU 的抗凋亡机制可能与 Bax 有关。sCLU 能特异性与变构的 Bax 相互作用,阻碍 Bax 寡聚化,阻止线粒体释放细胞色素 C 及活化 Caspase。CLU 在多种恶性肿瘤中表达上调,推测 CLU 可能与变构的 Bax 相互作用,抑制 Bax 介导的凋亡,启动癌基因转化,导致肿瘤进展<sup>[12]</sup>。此外,CLU 的抗凋亡作用也可能通过下面三种途径:(1)由于 CLU 特有的黏附功能,它能与凋亡刺激因子肿瘤坏死因子(TNF)相互作用从而使靶细胞无法获得该细胞因子;(2)CLU 可在受体水平与 TNF 竞争;(3)CLU 可与细胞表面分子相互作用而干涉 TNF 的信号转录。

### 3 CLU 与恶性肿瘤

许多研究表明 CLU 与多种恶性实体肿瘤的发生和发展有关,其中 CLU

在前列腺癌、肾癌、膀胱癌等泌尿系统肿瘤和乳腺癌、胰腺癌、淋巴瘤等表达上调,在食管鳞癌组织中则表达下调<sup>[3]</sup>。有学者认为,nCLU可能是一种细胞凋亡促进分子,在体内可以清除异常复制的细胞,避免了肿瘤的进一步发生、发展,而sCLU定位于肿瘤细胞质内,促进肿瘤的发生、发展<sup>[13]</sup>。有学者提出,许多恶性肿瘤的发生是由于sCLU的过表达和nCLU表达缺失引起的,CLU通过其表达亚型的转变,使肿瘤细胞抵抗凋亡,参与肿瘤的发生和发展,并成为对抗癌药物产生耐药性的因素之一<sup>[11]</sup>。此外,CLU还可通过参与血管形成,调节细胞周期和DNA修复过程等参与肿瘤的发生和发展。

Ammar等<sup>[14]</sup>研究发现:在前列腺癌细胞株中,sCLU过表达的细胞有50%能抵抗TNF- $\alpha$ 和放线菌素D诱导的凋亡,其可能通过细胞表面膜受体介导蛋白激酶B(Akt)磷酸化;而活化的Akt能导致细胞色素C释放减少,从而抑制凋亡,参与前列腺癌的发生。Narita等<sup>[15]</sup>比较了CLU在良性前列腺增生组织和前列腺癌组织中的表达。其研究结果显示:前列腺癌组织中CLU的表达水平明显高于良性前列腺增生组织;用雄激素去势后,前列腺癌组织CLU表达明显降低,但对雄激素非依赖的癌细胞系,CLU表达水平又可再次升高。相反,Sowery等<sup>[16]</sup>用针对CLU的反义核苷酸(antisense oligonucleotides,OGX-011),作用于体外对多西他赛耐药的PC-3前列腺癌细胞亚系(PC-3dR)和接种了PC-3dR细胞株的裸鼠,发现前列腺癌细胞对化疗药物的敏感性均增加;这种CLU-ASO的化疗增敏作用呈剂量依赖性和序列特异性。

CLU在大肠癌细胞水平也有抗凋亡作用。Gao等<sup>[17]</sup>研究发现CLU有明显的抗大肠癌细胞凋亡作用,且CLU的前导序列是其发挥抗凋亡作用的必须功能域。Xie等<sup>[18]</sup>也研究发现,CLU的过表达率在晚期大肠癌中明显高于大肠原位癌,大肠腺瘤和正常大肠黏膜;并且CLU的表达水平和大肠癌的临床分期正相关,与大肠癌组织中的凋亡水平负相关。推测CLU可能是决定肿瘤侵袭性行为的重要因素之一,有望成为肿瘤诊断标志物和判断预后的独立因素。

此外,CLU在肝癌、肾癌、食管癌等恶性肿瘤的发生发展及化疗耐药中发挥重要作用,但其具体机制仍不十分清楚。

#### 4 CLU与乳腺癌

乳腺癌的发生与细胞的增殖和凋亡有着密切的关系。Sun等<sup>[19]</sup>研究发现sCLU在TA2自发乳腺癌小鼠正常乳腺组织中和肿瘤组织中明显上调而nCLU表达下调或缺失,提示TA2自发性乳腺癌小鼠乳腺癌的发生、发展可能与sCLU过表达和(或)nCLU表达缺失有关。nCLU可通过阻断NF- $\kappa$ B介导的抗凋亡作用和抑制凋亡蛋白BCL-XL的表达而促进细胞死亡,而

sCLU 通过调节细胞周期和 DNA 修复以及抑制细胞凋亡参与乳腺癌的发生和发展<sup>[20]</sup>。Redondo 等<sup>[21]</sup>发现 CLU 在正常乳腺组织中不表达,在乳腺良性肿瘤组织中低表达,在非典型增生和导管原位癌中表达轻度增高,在乳腺浸润性导管癌中明显上调表达。CLU 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达与淋巴结转移情况正相关,与 ER、PR 阴性状态负相关,与 HER-2 表达、年龄、绝经状态不相关,还发现 CLU 在乳腺浸润性导管癌组织中的表达与肿瘤的大小正相关。Krüger<sup>[22]</sup>等也研究发现:CLU 的表达与乳腺癌的组织学分级和 Ki-67 标记指数的高低正相关;COX 回归分析表明,CLU 的表达水平与无复发生存率和无转移生存率有密切的关系。有学者认为,CLU 表达水平与肿瘤大小以及有无淋巴结转移成正相关,肿瘤细胞的 CLU 表达明显高于癌旁正常细胞,有淋巴结转移的肿瘤 CLU 表达明显高于无淋巴结转移者,且 CLU 表达阳性患者的生存时间明显短于 CLU 表达阴性患者的生存时间<sup>[13]</sup>。因此,现在大多学者认为,CLU 表达与乳腺癌的发生和发展,有无淋巴结转移,ER、PR 的表达水平,以及乳腺癌的预后都有着很密切的联系,CLU 很有希望成为判断乳腺癌生物学行为的诊断和评估预后的独立指标<sup>[22]</sup>。

乳腺癌患者的治疗往往要包括系统的全身化疗、放射治疗、内分泌治疗以及靶向治疗等在内的综合治疗。So 等<sup>[23]</sup>研究 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞株时发现,在应用抗雌激素治疗或紫杉醇治疗后,细胞 CLU 表达水平明显增高。在体外 MCF-7 和无胸腺小鼠接种的 MCF-7 肿瘤应用特异性抗 CLU 的 OGX-011 和小干扰 RNA (double-stranded small interfering RNAs, siRNA) 后,CLU 的表达水平下降了 90%,并呈剂量依赖性和序列特异性。在应用 OGX-011 或 siRNA 后肿瘤细胞对紫杉醇和三苯氧胺的反应性明显增加,细胞凋亡率明显升高,肿瘤生长缓慢。推测肿瘤细胞的化疗耐药性与 CLU 过表达有关,CLU 能使肿瘤细胞免于紫杉醇等化疗药物介导的细胞凋亡<sup>[23]</sup>。Cappelletti 等<sup>[24]</sup>发现:ER 阳性患者使用托瑞米芬抗雌激素治疗后,对内分泌治疗抵抗的患者,CLU 表达明显升高;在使用 siRNA 沉默 CLU 基因后,患者对内分泌治疗的反应恢复;对内分泌治疗抵抗的肿瘤细胞 CLU 表达下降时,细胞对内分泌治疗的敏感性增加。Sutton 等<sup>[25]</sup>在研究针对 CLU 的 siRNA 治疗与放射治疗效果的关系时发现,使用特异性抗 CLU 的 siRNA 后,基础 sCLU 和放射治疗引起的 sCLU 表达均明显受到限制,放射治疗的肿瘤细胞致死率明显上升。此外,Brioccio 等<sup>[26]</sup>还发现:乳腺癌患者使用 HER-2 单克隆抗体 Herceptin 治疗后,患者乳腺癌细胞 CLU 表达水平明显升高;在使用 OGX-011 后,患者对曲妥珠单克隆抗体的反应性明显升高,肿瘤细胞凋亡的比例明显升高。故推测 CLU 过表达与乳腺癌细胞的治疗耐受有关,CLU 过表达限制了化疗、放射治疗、内分泌治疗以及靶向治疗的效果,推测这与其抗凋亡作用和调节细胞周期作用有关,其具体机制还不十分清楚。联合

针对 CLU 的靶向治疗药物 OGX-011 或 siRNA 能明显降低 CLU 表达,提高乳腺癌细胞对化疗、放射治疗、内分泌治疗和靶向治疗等各种治疗的反应性,延缓肿瘤的生长。抗 CLU 的治疗有望为乳腺癌综合治疗提供新的靶点<sup>[23]</sup>。

## 5 结语

肿瘤的发生和发展与凋亡密切相关,作为新发现的凋亡相关因子,CLU 参与了乳腺癌、肝癌、肺癌等许多肿瘤的发生。针对 CLU 的反义核苷酸和 siRNA 治疗已经在肿瘤治疗方面取得了令人振奋的结果,使将来针对 CLU 进行肿瘤的基因治疗成为可能。并且 CLU 的研究也为新一代抗癌药物的研发提供了理论基础。当然,目前对 CLU 的许多功能及其与肿瘤细胞的相互作用等方面仍然知之甚少,有待进一步的研究。

【关键词】 簇集蛋白;凋亡;乳腺肿瘤

【中图分类号】 R737.9      【文献标识码】 A

### 参考文献

- [1] Hasan Q, Rüger B M, Tan S T, *et al.* Clusterin/apoJ expression during the development of hemangioma. *Hum Pathol*, 2000,31:691-697.
- [2] Gleave M E, Zellweger T, Chi K, *et al.* Targeting anti-apoptotic genes upregulated by androgen withdrawal using antisense oligonucleotides to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. *Invest New Drugs*, 2002, 20:145-158.
- [3] Shannan B, Seifert M, Leskov K, *et al.* Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ*, 2006,13:12-19.
- [4] Pajak B, Orzechowski A. Clusterin: the missing link in the calcium dependent resistance of cancer cells to apoptosis stimuli. *Postepy Hig Med Dosw(Online)*, 2006,60:45-51.
- [5] Jones S E, Jomary C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002,34:427-431.
- [6] Charnay Y, Imhof A, Vallet P G, *et al.* Clusterin expression during fetal and postnatal CNS development in mouse. *Neuroscience*, 2008,155:714-24.
- [7] Schwarz M, Spath L, Lux C A, *et al.* Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis; Binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity. *Thromb Haemost*, 2008, 100:110-118.
- [8] Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, *et al.* Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury. *Kidney Int*, 2001,59:137-146.
- [9] Gleave M, Miyake H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen and chemo-sensitivity in prostate cancer. *World J Urol*, 2005,23:38-46.
- [10] Cristwell T, Klokov D, Beman M, *et al.* Regression of IR—indecent clusterin expression by the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Biol Ther*, 2003,2:372-380.
- [11] Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, *et al.* Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene*, 2004,23:2298-2304.
- [12] Zhang H, Kim J K, Edwards C, *et al.* Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol*, 2005,7: 909-915.
- [13] Zhang S, Zhang D F, Jing M Y, *et al.* COX proportional hazards model analysis on breast cancer prognosis and the correlation with clusterin expression. *Chin J Cancer Prev treat*, 2007,14:1314-1317.
- [14] Ammar H, Closset J L. Clusterin activities survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem*, 2008,283:12 851-12 861.
- [15] Narita S, So A, Ettinger S, *et al.* GIL2 knockdown using an antisense oligonucleotide induces apoptosis and chemosensitizes

- cells to paclitaxel in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 5769—5777.
- [16] Sowery R D, Hadaschik B A, So A I, *et al.* Clusterin knockdown using the antisense oligonucleotide OGX-011 re-sensitizes docetaxel-refractory prostate cancer PC-3 cells to chemithreapy. *BJU Int*, 2008, 102: 389—397.
- [17] Gao Z C, Chen R, Zhou P, *et al.* Anti- apoptosis effect of clusterin in lovo cells. *Journal of Luzhou Medical College*, 2007, 30: 363—366.
- [18] Xie D, Sham J S, Zeng W F, *et al.* Oncogenetic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 3285—3289.
- [19] Sun B, Zhang S, Liu Y, *et al.* Clusterin is associated with spontaneous breast cancer in TA2 mice. *FEBS Lett*, 2007, 581: 3277—3282.
- [20] Takase O, Minto A W, Puri T S, *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent Bcl-xl expression by clusterin promotes albumin-induced tubular cell apoptosis. *Kidney International*, 2008, 73: 567—577.
- [21] Redondo M, Villar E, Torres Munoz J, *et al.* Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *Am J Pathol*, 2000, 157: 393—399.
- [22] Krüger S, Ola V, Fischer D, *et al.* Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer. *Neoplasma*, 2007, 54: 46—50.
- [23] So A, Sinnemann S, Huntsman D, *et al.* Knockdown of the cytoprotective chaperone, clusterin, chemosensitizes human breast cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4: 1837—1849.
- [24] Cappelletti V, Gariboldi M, De Cecco L, *et al.* Patterns and changes in gene expression following neo-adjuvant anti estrogen treatment in estrogen receptor-positive breast cancer. *Endocr Realt Cancer*, 2008, 15: 439—449.
- [25] Sutton D, Kim S, Shuai X, *et al.* Efficient suppression of secretory clusterin levels by polymer-siRNA nanocomplexes enhances ionizing radiation lethality in human MCF-7 breast cancer cells *in vitro*. *Int J Nanomedicine*, 2006, 1: 155—162.
- [26] Biroccio A, D'Angelo C, Jansen B, *et al.* Antisense Clusterin Oligodeoxynucleotides Increase the response of HER-2 gene amplified breast cancer cells to trastuzumab. *J Cell Physiol*, 2005, 204: 463—469.

(收稿日期: 2008-11-05)

(本文编辑: 周艳)

徐亮. Clusterin 在乳腺癌研究中的进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2009, 3(6): 659—664.