

氯离子通道与胶质瘤的关系研究进展

陆丽娟 李玉凤 赵喜庆 综述 胡万宁 审核

【关键词】胶质瘤;氯离子通道;发病机制
【文章编号】1009-153X(2016)12-0803-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的原发性肿瘤,根据 WHO 肿瘤分级,胶质瘤分为 WHO I~IV 级,级别越高,恶性程度越高。恶性胶质瘤细胞增殖快、侵袭性强且呈浸润性生长,手术不能完全切除肿瘤,即使术后进行放化疗,效果仍不明显,患者的平均生存期少于 12 个月,恶性胶质瘤是目前预后较差的肿瘤之一。近年来,离子通道与胶质瘤的关系逐渐成为关注热点。本文主要探讨氯离子通道(chloride channel, CLC)在胶质瘤发生发展中的作用,为胶质瘤的治疗提供新的思路。

1 CLC 在胶质瘤中的表达

早期研究表明,CLC-2、CLC-3、CLC-5 在胶质瘤组织中均有表达^[1],而 CLC-2 在正常脑组织中大量表达且有功能^[2]。敲除 CLC-2、CLC-3 基因后,氯离子内部电流选择性降低;而敲除 CLC-5 基因后,氯离子电流未改变^[1]。还有研究发现 CCL-3 的表达参与胶质瘤细胞的侵袭^[3],敲除 CCL-3 基因后,氯离子电流显著被抑制。

2 CLC 参与的胶质瘤发生发展的机制

2.1 参与细胞增殖 离子通道在胶质瘤细胞增殖过程中具有重要作用。细胞增殖与细胞容积的改变密切相关,而 CLC 参与促进细胞容积改变。CLC 电导是部分负责相对去极化的静息电位^[4]。通过钠钾氯协同转运蛋白 1 (Na-K-Cl cotrans- porter 1, NKCC1),胶质瘤细胞氯离子电位累积达到 100 mV^[5]。任何 CLC 的开放都会引起氯离子外流。CLC 阻滞剂通过阻止细胞有丝分裂所需容积的改变,从而

抑制细胞增殖。
Hebla 等^[6]在延时共聚焦显微镜下发现,细胞在分裂前期,细胞膜加倍,细胞质倾向于分裂为两个子细胞,随后细胞需经历好几次完整的分裂。研究发现细胞体积不会一直增加,在细胞周期 M 期前期,母细胞会经历一个细胞冷凝过程,这个过程称作是有丝分裂前期冷凝(premitoticcondensation, PMC)。在此过程中,细胞变圆,因细胞凝结,细胞膜厚度增加,细胞膜与细胞质的比例变成原来的 2 倍。无论细胞初始体积多大,细胞汇集成相同体积大小的特殊类型细胞。高渗性使细胞皱缩变小,细胞周期缩短,细胞分裂数量增加,细胞容积收缩率增加,达到接近最小细胞容积时间减少,细胞冷凝与细胞快速增值相关。PMC 不仅发生在胶质瘤细胞中,还可发生在原发于后颅窝的恶性星形细胞中及 HER-239 细胞中^[6,7]。这提示 PMC 现象在细胞分裂中普遍存在。

离子通道活性直接影响细胞容积。氯离子的流动导致的高渗透压使得水分子跨膜移动。CLC-3 在细胞质膜上相当丰富,在细胞凝结 M 期,CLC-3 的表达量增加为原来的 2 倍,CLC-3 的激活主要是通过钙离子依赖性蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 磷酸化而被激活,进而影响细胞增殖。CLC 阻滞剂或敲除 CLC-3 基因均可降低氯离子电流,破坏 PMC 和延长细胞周期。这提示氯离子的流动和 PMC 进程加快可缩短细胞周期。

在不同的胶质瘤细胞中,其他一些未命名的 CLC 很有可能参与细胞增殖,并发现增殖速率与细胞容积的改变呈“钟形”曲线关系,胶质瘤细胞在一个很窄的细胞容积窗口增殖能力最强,在最高或最低细胞容积时,细胞增殖速率减慢。

2.2 参与细胞迁移 胶质瘤侵袭性在肿瘤刚发生时就存在,通过单个细胞运动侵入细胞外基质。在分子运动中,肌动蛋白的聚合和肌球蛋白 II 的收缩均可调节细胞迁移。离子通道主要通过以下方式影

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.12.029
作者单位:063000 河北唐山,华北理工大学附属唐山市人民医院(陆丽娟、李玉凤、赵喜庆、胡万宁)
通讯作者:胡万宁, E-mail: rmyy_hwn@163.com

响迁移:作为细胞外调控的感受器,调节钙离子的移动,进而控制肌动蛋白的聚合,诱使细胞形状、体积的改变适应新的细胞内环境^[8]。

通常,迁移的胶质瘤细胞呈瘦长形或楔形,可以通过细胞形状和体积的改变来侵入狭窄的细胞外基质间隙。在体外胶质瘤细胞迁移中,对细胞容积进行直接测量显示容积降低30%~35%^[9]。这种调节性细胞容积减少(regulatory volume decrease, RVD)主要是因为细胞质中水分完全丧失。通过削减细胞内的未结合水,细胞在进入细胞外基质时,获得最小的细胞容积。NKCC1抑制剂使得氯离子外流,抑制胶质瘤细胞的迁移。这表明氯离子是一种低渗剂,可促进细胞质水分的外流^[9]。

然而目前缺乏特异性CLC抑制剂来明确识别潜在的离子通道,非特异性CLC抑制剂可以降低胶质瘤细胞体内体外的迁移^[10]。通过敲除CLC-3基因的表达可以降低胶质瘤细胞迁移能力。氯霉素可以降低CLC-3的表达,从而抑制胶质瘤的迁移^[11]。CLC-3抑制剂抑制迁移的机制是细胞容积的异常调节。因为氯离子阻滞剂可以抑制RVD,并抑制胶质瘤细胞的迁移^[12]。

为了维持容积改变后细胞的等电点性,细胞内的钾离子和氯离子流出。研究发现,氯离子通过CCL-3流出至细胞外,钾离子通过钾钙离子通道流出至细胞外,从而激活水通道使胞内水分子流出,细胞失水皱缩。KCa3.1通过激活缓激肽影响胶质瘤细胞的迁移。KCa3.1和CLC-3共定位,应用缓激肽可以激活这两种通道,抑制这两种通道中的任何一种通道均可抑制胶质瘤细胞迁移,阻滞这两种离子通道可完全抑制胶质瘤的迁移^[10, 13]。钾钙离子通道和CLC-3均可以抑制迁移是因为它们参与细胞迁移过程中细胞容积的改变及它们的共同作用于生长因子激活的下游信号(主要是钙离子信号)。大量离子通道参与迁移需要钙离子信号的激活,主要包括缓激肽受体和瞬时受体电位通道。

2.3 参与细胞凋亡 凋亡指细胞程序性死亡,具有DNA碎片、染色质凝聚、细胞凝集即凋亡性容积减少(apoptotic volume decrease, AVD)的特征。凋亡分为内在凋亡和外在凋亡。内在凋亡指细胞内在受损,比如营养不足或DNA受损。外在凋亡指细胞表面结合到CD95死亡受体及Fas和TRAIL配体上^[14]。在胶质瘤细胞中,由于CLC所致的细胞内水分丢失,而这两种凋亡发生与细胞凋亡性容积减少有关。降低AVD可抑制caspases的激活^[15]。氯离子外流参与胶

质瘤细胞凋亡,CLC抑制剂可以降低AVD,从而抑制caspases的激活。细胞容积足够的减少刺激凋亡发生。尽管CLC与凋亡的分子机制还没有完全明确,但对于AVD和凋亡是必须的^[15]。尽管AVD在多种细胞类型的凋亡中是一个普遍的特征。特殊的离子通道的参与凋亡有待进一步研究,与离子通道相关的具有AVD活性及凋亡的下游调控机制有待进一步明确。

3 CLC与胶质瘤治疗

CLC参与胶质瘤多种恶性特征,因此可能成为潜在的治疗靶点。然而针对胶质瘤药物的开发比其他肿瘤的药物更复杂,不仅需要抑制CLC在胶质瘤细胞中的高表达,不影响在周围正常组织中表达,而且还需使药物穿过血脑屏障。在使用CLC药物治疗胶质瘤时,可能激活或抑制多个离子通道。为了阻止其他离子通道表达上调,往往就抑制了多个类似的离子通道。胶质瘤细胞的增殖、迁移、凋亡是相当复杂的过程,延缓胶质瘤进展需要多种治疗方式的干预,离子通道的活性成为其化疗后的辅助治疗^[14, 16]。

胶质瘤的一个治疗靶点是受钙离子调控的离子通道,大量离子通道参与胶质瘤的发生发展都需要钙离子通道被激活。CLC参与胶质瘤细胞的增殖、迁移和凋亡。CLC-3是CaMK II磷酸化的激活靶点,主要通过影响CaMK II活性进而影响细胞的增殖、迁移^[11]。临床试验的另一个药物是蝎毒中分离出来的小分子肽(chlorotoxin, Cltx),与含有基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和CLC-3结构的细胞膜表面结合,引起细胞内结构的内在融合^[17]。Cltx抑制胶质瘤细胞迁移的机制主要是通过CLC-3的抑制作用^[18]。TM-601是Cltx的一种合成药物,已经被用于I、II期临床试验,主要是针对应用¹³¹I放疗和其他辅助化疗的成人胶质瘤再复发的患者^[19]。研究发现TM-601没有毒性和其他副作用。临床试验都是在胶质瘤早期阶段进行,目前还没有足够的研究来证明该药物的有效性,但可证明存在抗癌效果,为CLC在胶质瘤中的靶向治疗提供了方向^[20]。

另外,治疗胶质瘤药物的药物是使用被美国食品和药物管理局批准的药物,例如靶向NKCC1的药物,NKCC1的抑制剂布美他尼,可以胶质瘤细胞中氯离子的累及,从而抑制细胞迁移^[21]。

CLC参与胶质瘤发生发展,许多其他类似的离

子通道同样参与其他肿瘤的发生发展。因此,同样的离子通道治疗被应于不同的肿瘤。例如他莫昔芬,能够抑制 CLC,常用来治疗雌激素依赖型肿瘤。而且 CLC 参与其他肿瘤的形成,类似的离子通道在不同的肿瘤治疗具有相同的靶点。

总之,CLC 在胶质瘤的发生发展中被证实,然而将 CLC 阻滞剂用于临床治疗还需要不断探索。随着探索的不断深入,CLC 将成为抗肿瘤治疗的靶点。

【参考文献】

- [1] Olsen ML, Schade S, Lyons SA, *et al.* Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5572-5582.
- [2] Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, *et al.* Disruption of CLC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus [J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 185-196.
- [3] McFerrin MB, Sontheimer H. A role for ion channels in glioma cell invasion [J]. *Neuron Glia Biol*, 2006, 2(1): 39-49.
- [4] Ransom CB, O'Neal JT, Sontheimer H. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(19): 7674-7683.
- [5] Habela CW, Ernest NJ, Swindall AF, *et al.* Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration [J]. *J Neurophysiol*, 2009, 101(2): 750-757.
- [6] Habela CW, Sontheimer H. Cytoplasmic volume condensation is an integral part of mitosis [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(13): 1613-1620.
- [7] Habela CW, Olsen ML, Sontheimer H. CLC3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells [J]. *J Neurosci*, 2011, 28(37): 9205-9217.
- [8] Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, *et al.* Role of ion channels and transporters in cell migration [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(4): 1865-1913.
- [9] Watkins S, Sontheimer H. Hydrodynamic cellular volume changes enable glioma cell invasion [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(47): 17250-17259.
- [10] Luigi C, Francesco A, Bernard F, *et al.* Serum-activated K and Cl currents underlay U87-MG glioblastoma cell migration [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(7): 1926-1933.
- [11] Cuddapah VA, Sontheimer H. Molecular interaction and functional regulation of CLC-3 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) in human malignant glioma [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(15): 11188-11196.
- [12] Sontheimer H. Ion channels and amino acid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors [J]. *Mol Neurobiol*, 2004, 29(1): 61-71.
- [13] Cuddapah VA, Turner KL, Seifert S, *et al.* Bradykinin-induced chemotaxis of human gliomas requires the activation of K(Ca)3.1 and CLC-3 [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(4): 1427-1440.
- [14] McFerrin MB, Turner KL, Cuddapah VA, *et al.* Differential role of IK and BK potassium channels as mediators of intrinsic and extrinsic apoptotic cell death [J]. *Ajp Cell Physiology*, 2012, 303(10): 1070-1078.
- [15] Ernest NJ, Habela CW, Sontheimer H. Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(3): 290-297.
- [16] Weaver AK, Liu X, Sontheimer H. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant gliomacells [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 78(2): 224-234.
- [17] Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 4135-4144.
- [18] Sontheimer H. An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008, 233(7): 779-791.
- [19] Hockaday D C, Shen S, Fiveash J, *et al.* Imaging glioma extent with ^{131}I -TM-601 [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(4): 580-586.
- [20] Mamelak AN, Rosenfeld S, Bucholz R, *et al.* Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine- ^{131}I -TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(22): 3644-3650.
- [21] Haas BR, Sontheimer H. Inhibition of the sodium-potassium-chloride cotransporter isoform-1 reduces glioma invasion [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13): 5597-5606

(2016-07-25 收稿, 2016-09-04 修回)