

蛋氨酸补偿代谢途径及蛋氨酸酶抗肿瘤研究进展

曾红静, 田长富

(昆明医科大学生物医学工程中心基因蛋白研究室, 云南昆明 650500)

[摘要] 蛋氨酸是唯一一种含硫必需氨基酸, 是蛋白合成和细胞转甲基化作用的必需成分, 同时也是同型半胱氨酸的前体物质. 研究发现, 与正常细胞相比, 肿瘤细胞对蛋氨酸呈现出依赖的特性. 这种依赖是一种代谢缺陷, 可从蛋氨酸的生物代谢角度解释肿瘤细胞产生蛋氨酸依赖的缺陷. 正常细胞代谢中存在蛋氨酸补救途径即 5, - 甲基腺苷酸 (MTA) 循环合成蛋氨酸, 而肿瘤细胞却无此途径, 表现出对蛋氨酸的绝对需要. L- 蛋氨酸 γ -裂解酶能够特异性地裂解 L- 蛋氨酸产生氨、 α -丁酮酸和甲硫醇. 蛋氨酸酶在抗肿瘤研究中表现出对肿瘤特异性高, 毒副作用小等特点, 有较好的发展前景, 给肿瘤基因治疗开辟了新的路径.

[关键词] 蛋氨酸; 蛋氨酸依赖; 蛋氨酸代谢; 蛋氨酸酶; 肿瘤治疗

[中图分类号] Q782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 06 - 0144 - 05

Research Progress on Methionine Salvage Pathway and Anticancer Efficacy of Methioninase

ZENG Hong - jing, TIAN Chang - fu

(Dept. of Gene and Protein Engineering Research, Biomedical Engineering Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] Methionine is the only essential sulfur-containing amino acid that is needed for the synthesis of protein and transmethylation. And it is the precursor of homocysteine. Comparing with normal cells, some cancer cells exhibited methionine dependence. It is a kind of metabolic defect which can be explained by biological mechanism of methionine. Methionine salvage pathway, also called the 5'-methylthioadenosine (MTA) cycle was a universal pathway in normal cells while cancer cells have absolute requirement for methionine. The L-methionine α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase (methioninase) can degrade methionine into ammonia, α -ketobutyrate and methanthiol. Methioninase have the advantage of high specificity to cancer cells with few side effects which shows a bright development prospect in the gene therapy for tumor.

[Key words] Methionine; Methionine dependence; Methionine salvage pathway; Methioninase; Tumor therapy

肿瘤已是一种常见病、多发病, 其中恶性肿瘤死亡率高, 生存期短, 已经严重威胁人们的身体健康. 恶性肿瘤的特性是高增长率, 肿瘤细胞消耗寄主的能量, 特别葡萄糖和氨基酸. 利用肿瘤细胞与正常细胞之间的某些生物学性状的差异, 是肿瘤基因治疗的一个新突破口. 与正常细胞相比, 研究发现, 一些肿瘤细胞存在一个共同的特

点是对蛋氨酸的绝对需要, 把这种现象称为“蛋氨酸依赖”^[1]. 肿瘤细胞生长所需 Met, 最低水平较正常细胞高. 同样在动物异植瘤动物模型中也发现肿瘤细胞呈现蛋氨酸依赖的特性.

Met 是人体必需氨基酸之一, 是蛋白合成和细胞转甲基化作用的必需成分. Met 也是同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 的前体物质 (图 1). 已经

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30760287); 云南省科技计划基金资助项目 (2009CC022)

[作者简介] 曾红静 (1987~), 女, 云南曲靖市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗工作.

[通讯作者] 田长富. E-mail: tiancf@21cn.com

证实, 用不含蛋氨酸的培养基培养肿瘤细胞和正常细胞, 蛋氨酸依赖的肿瘤细胞被选择性地杀死^[2]. Met 依赖是肿瘤细胞显著的特征. 目前一些学者运用食物疗法和药理学方法, 有针对性的消除肿瘤细胞依赖的 Met. 1973 年, 第一次报道用酶降解 Met. 之后研究证实这种酶是蛋氨酸酶 (methioninase,

Metase), Metase 能够特异性的降解 Met. 已有报道证实, 血液中引入 Metase 可以降低 Met 浓度水平, 抑制肿瘤生长. 与传统化学疗法相比, Metase 具有肿瘤特异性高, 毒副作用小等特点, 有望成为新一代的抗肿瘤药物.



图 1 同型半胱氨酸与 5-甲基四氢叶酸合成蛋氨酸

Fig. 1 Methionine synthesized from homocysteine and N5-methyltetrahydrofolic acid

1 蛋氨酸依赖与蛋氨酸代谢

蛋氨酸依赖是一种代谢缺陷, 仅在肿瘤细胞中可见. 这种缺陷可能是由于蛋氨酸合成酶 (methionine synthase, MAT) 活性功能性的缺失以及肿瘤细胞过高的转甲基化率引起的. 在蛋氨酸代谢中 MAT 催化 Hcy 产生 Met^[3] (图 1). 能在 Met-Hcy⁺ 条件下增殖的细胞称为非 Met 依赖细胞. 除淋巴细胞外, 所有的正常细胞细胞系, 包括纤维原细胞、肝细胞、肾细胞、上皮细胞都是非蛋氨酸依赖细胞^[2].

然而, 大量恶性肿瘤细胞, 如乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、膀胱癌、黑色素瘤, 恶性胶质瘤等呈现 Met 依赖^[4]. Met 依赖细胞不能利用 Met-Hcy⁺ 环境中的 Hcy, 只能依赖外源蛋氨酸生长. 肿瘤细胞产生蛋氨酸依赖的基本原理尚不清楚, 但是其生化机制已经广泛研究. 因此, 将从蛋氨酸的生物代谢角度阐述肿瘤细胞产生蛋氨酸依赖的缺陷的后因 (图 2)^[1].

在所有细胞中, Met 用于合成蛋白或进入整个代谢循环, 属于天冬氨酸家族. 蛋氨酸腺苷三磷酸钴胺素腺苷转移酶催化 Met 在 ATP 的参与下成 S-腺苷高半胱氨酸 (SAM). SAM 在转甲基作用中是一种重要的甲基供体, 也是一些代谢物的前体物质, 如乙烯、多胺, 维生素 B1 等. DNA 或蛋白甲基化时, 甲基转移酶催化 SAM 形成 S-腺苷高半胱氨酸 (SAH). SAH 是许多甲基转移酶的强抑制剂, 如 DNA 甲基转移酶^[5]. SAH 分解形成腺苷酸

和 Hcy, 这是一个可逆的过程. 在 Met 代谢中 Hcy 有 2 条主要代谢途径: 甲基化作用和转硫作用.

(1) Hcy 在辅助因子钴胺素、5-甲基四氢叶酸 (5-THF) 参与下由 MAT 催化合成 Met 或是由甜菜碱提供甲基合成 Met. 在正常条件下, 有大约 50% 的 Hcy 在蛋氨酸合酶催化经过再甲基化合成蛋氨酸^[6,7]. Hcy 与丝氨酸 (serine, Ser) 在胱硫醚 β-合酶催化下形成胱硫醚, 半胱氨酸的前体物质, 这个过程是不可逆的. 半胱氨酸用于合成谷胱甘肽, 用于降低细胞内的活性氧, 保护细胞免受氧压^[8]. 这是正常细胞和肿瘤细胞共同的蛋氨酸代谢途径. 而在 Met-Hcy⁺ 环境中, 正常细胞可以通过一条蛋氨酸补救途径 (Methionine salvage pathway) 获取蛋氨酸维持正常的细胞循环, 而肿瘤细胞却没有此代谢途径.

这条补救途径存在于所有有机体 (细菌、植物、动物) 中, 在此途径中, SAM 脱去一分子的 CO₂ 形成脱羧基产物 SAM, 再与亚精胺合成精胺 (Spermine). 5-甲硫基腺苷酸 (methylthioadenosine, MTA) 是亚精胺从 SAM 产生的副产物, 正是这条旁路的必需物质. 甲基硫代腺苷磷酸化酶 (MTAP) 催化 MTA 分解成甲硫基核糖, 这是蛋氨酸旁路的第一步反应, MTA 是旁路的第一反应物质, 由此蛋氨酸旁路又被称为 MTA 循环. 在蛋氨酸旁路中甲硫核糖磷酸盐 (MTOB) 是 Met 的直接前体物质^[9]. 因此, 用 Hcy 替代 Met 治疗蛋氨酸依赖的肿瘤患者, 抑制了肿瘤细胞的生长, 细胞停滞在细胞循环的 S/G₂ 期, 最终导致凋亡^[10].

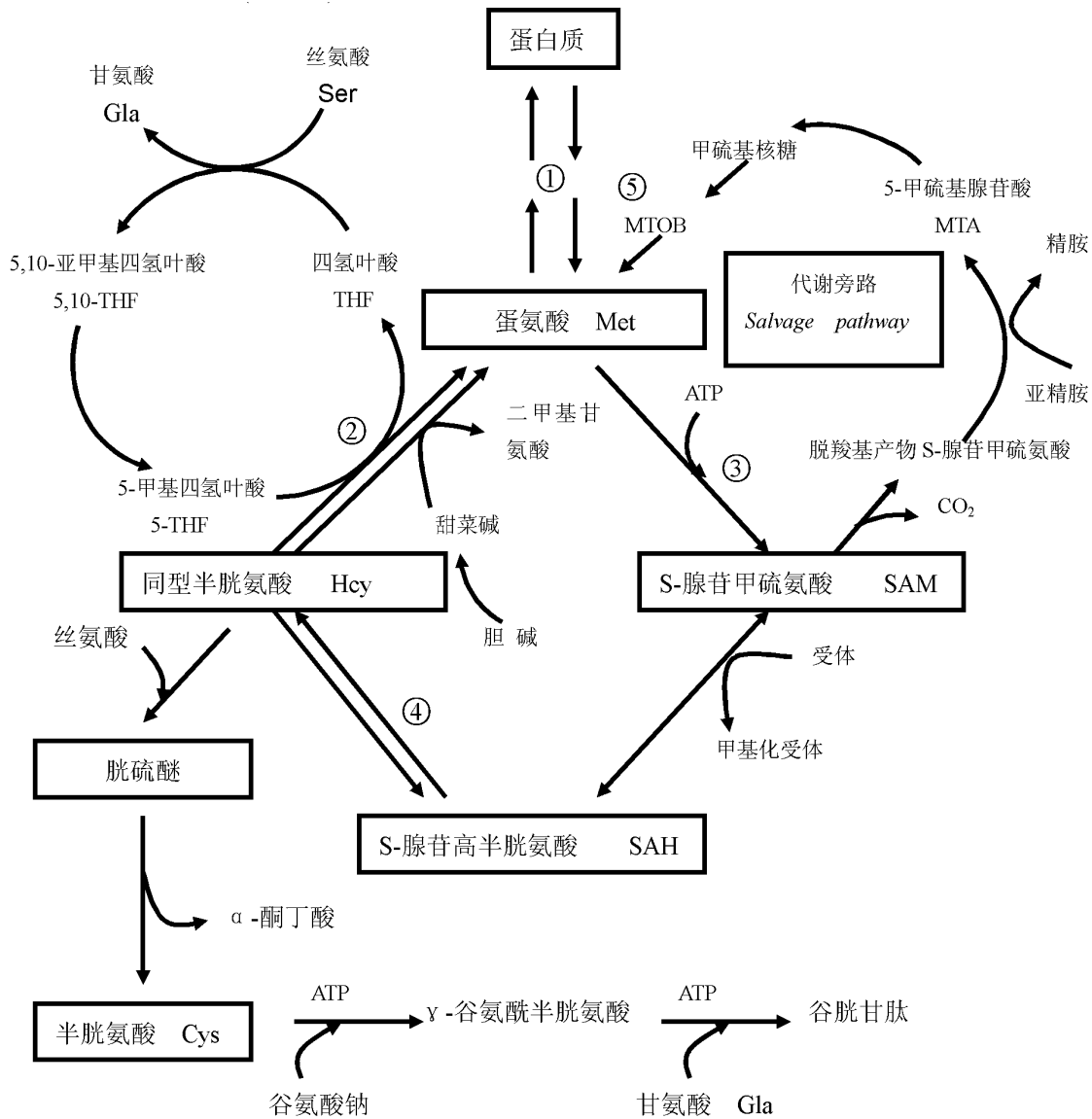


图 2 蛋氨酸和同型半胱氨酸代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways of methionine and homocysteine

①介于游离蛋氨酸与蛋氨酸蛋白之间的平衡；②蛋氨酸合酶；③蛋氨酸腺苷三磷酸钴胺素腺苷转移酶；④腺苷高半胱氨酸酶；⑤甲硫核糖磷酸盐。

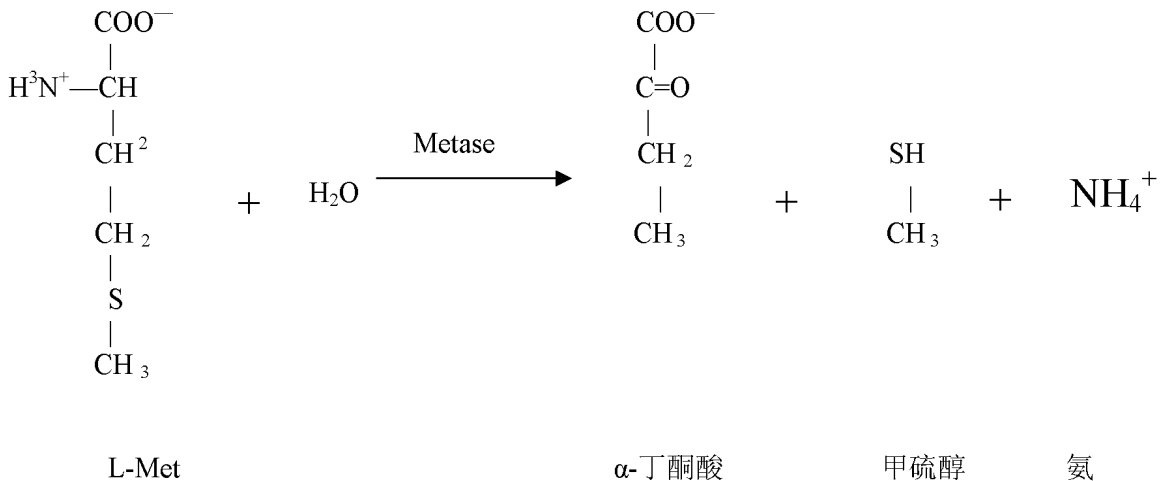


图 3 Metase 催化 L-Met 产生 α -丁酮酸、甲硫醇、氨

Fig. 3 Metase tranforms methionine into ammonia, α -ketobutyrate and methanthiol

2 蛋氨酸酶肿瘤治疗中的作用

当前, 治疗肿瘤所面临最大的问题就是缺乏针对性, 导致不可估量的副作用. 肿瘤研究正致力于开发一种只针对肿瘤细胞起效而对正常细胞杀伤作用几乎可忽略不计的新型药物. 对于消除肿瘤细胞依赖的蛋氨酸, 最有效的方法是用 L- 蛋氨酸 γ - 裂解酶 (Metase, Methioninase), 它是一种能裂解 L- 蛋氨酸 (L-Met) 的 5' - 磷酸吡哆醛 (PLP) 依赖酶. 利用 Metase 清除肿瘤细胞中的 Met 其原理是: Metase 催化 L-Met α , γ 消除反应, 产生 α - 丁酮酸、甲硫醇和氨 (图 3), 从而降低蛋氨酸浓度. Metase 的引入给肿瘤治疗注入了新的活力. 蛋氨酸酶治疗蛋氨酸依赖细胞, 表现出以下几方面的特征.

2.1 rMetase 抗肿瘤的广泛性

体外实验研究证实, 蛋氨酸酶对肿瘤细胞有广泛的抑制作用. TAN 等^[11]用 rAdMetase 治疗 21 种人肿瘤细胞系 (4 肺癌、4 直肠癌、4 肾癌、4 黑色素瘤、3CNS、2 前列腺癌) 测定细胞的 IC₅₀ 发现肿瘤细胞 IC₅₀ (肺癌 0.12, 直肠癌 0.04, 肾癌 0.07, 黑色素瘤 0.19, CNS0.195, 前列腺癌直肠癌 0.01) 普遍较低, 然而正常细胞有较高的 IC₅₀ (皮肤纤维细胞 4, 主动脉平滑肌细胞 0.88, 主动脉内皮细胞 0.8, 角质细胞 0.75, 支气管细胞 0.75). 这就暗示蛋氨酸酶对肿瘤细胞具有广泛的选择性, 相比较而言, 正常细胞对 rMetase 有较强的耐受力. 动物体内实验已证实, rMetase 有效抑制了移植在裸鼠上的人肿瘤细胞, 如肠癌、肺癌、神经母细胞瘤、脑癌细胞等蛋氨酸依赖性肿瘤. 研究发现, 当动物血浆中 Met 浓度 $< 5 \mu\text{M}$ 时, 肿瘤细胞的生长受到抑制^[10]. rMetase 作用诱导肿瘤细胞凋亡, 肿瘤细胞选择性的停滞在细胞循环的 S-G₂ 期.

2.2 rMetase 抗肿瘤的低毒性

rMetase I 期临床研究中, 对晚期乳腺癌、肺癌、肾癌和淋巴瘤患者单独给予剂量为 5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0.25 g) 至 20 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1.0 g) rMetase, 静脉点滴, 6 ~ 24 h. 由此临床试验初步发现 rMetase 可以降低血浆中蛋氨酸水平, 未产生明显的临床毒副作用^[12]. 励保秋等^[13]延伸了临床研究, 在灵长类动物模型上对 rMetase 药物动力学, 免疫原性和系统毒性的研究, 发现 rMetase 有效降低血浆蛋氨酸水平, 其毒性可忽略不计. 对其用于临床的安全性和可靠性提供的保证. Metase 治疗的低毒性是其

开发成为新型药物的一个亮点, 这给癌症患者特别是晚期患者降低了痛苦.

2.3 rMetase 抗肿瘤的特异性

rMetase 能够强烈的抑制肿瘤的生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常细胞的生长无影响, 这是依赖蛋氨酸的肿瘤细胞所特有的性质. TAN 等^[11]研究发现, 21 种肿瘤细胞对蛋氨酸酶的敏感性是 5 种正常细胞细胞株的 10 倍, 由此可以看出蛋氨酸酶对降低肿瘤细胞中蛋氨酸水平有明显的针对性.

2.4 rMetase 与其他化学药剂联合抗肿瘤的协同作用

研究发现, Metase 和产生细胞毒性的化学药物间有着协同作用. Yoshioka 等^[14]用 rMetase 法联合 5-FU 诱导人纤维肉瘤细胞 HT-1080、人结肠癌细胞 HCT-116、人肺癌细胞 NCI-H460 等发现凋亡, 以及抑制了人肿瘤细胞在裸鼠身上的生长. rMetase 可增强 5- 氟二氧嘧啶 (5-Fluorouracil, 5-FU) 的疗效, 且呈剂量增加. 5-FU 抗肿瘤作用有 2 种机理: (1) 由于限制胸苷酸合酶 (thymidylate synthase, TS) 活性和 RNA 应答减少, 从而抑制 DNA 甲基化; (2) 叶酸循环的构成成分 5, 10-THF 增加可以降低 TS 的活性^[15]. Gupta 等^[16]将人肺癌 H460 细胞种植到 NCr 裸鼠上, 形成异植瘤模型后, 分组治疗并观察小鼠肿瘤体积变化, 发现 AdMet 联合 SeMet (硒代蛋氨酸) 及 Dox (阿霉素) 治疗组小鼠肿瘤倍增时间延长了 10 d, 其他小鼠肿瘤倍增时间最慢的只是 2 ~ 3 d, 有效延长了小鼠的生存期, 由此看出 AdMet 与 SeMet、DOX 有着明显的协同作用. 长春新碱 (Vincristine), 其抗肿瘤作用靶点是微管, 主要抑制微管蛋白的聚合而影响纺锤体微管的形成, 使有丝分裂停止于中期. Hu 等^[17]通过实验发现, rMetase 与长春新碱抑制神经母细胞瘤的增殖, 使细胞停滞在 G₂ 期, 从而表现出协同作用. 据报道 Metase 蛋氨酸酶与影响 DNA 合成的丝裂霉素 C, (Mitomycin)、顺氯氨铂 (CDDP)、卡莫斯丁 (BCNU)、亚硝基脲等有协同作用. Metase 与这些化学药物的协同作用增强了抗肿瘤作用.

3 总结

Met 依赖广泛存在于肿瘤细胞中, 表现在肿瘤细胞无法在 Met- 环境中生长. rMetase 的引入对消除肿瘤细胞依赖的 Met 具有特异性. 将 rMetase 应用到临床, 存在以下几方面的困难: 首先, 解决

rMetase 量的问题.临床上治疗肿瘤患者需要不断的注射 rMetase, 而 rMetase 的来源少, 纯化过程复杂, 导致 rMetase 不能大范围的应用到临床, 导致临床应用的局限性. 其次, rMetase 注射到人体后发生免疫反应. 现在临床研究仅限于 I 期临床, 由于 Metase 分子量大, 多次注射后机体产生的免疫反应而受限. 最后, 人体对腺病毒的敏感性, 致使腺病毒载体应用临床受阻.以腺病毒为载体构造的带有 Met 基因的表达体系, 注射到人体后, 由于机体的天然免疫系统对腺病毒的敏感, 导致腺病毒不能进入细胞表达 Metase 发挥抗肿瘤作用.

应用 rMetase 消除肿瘤细胞依赖的 Met 的效果是可观的, 但是在此基础上通过基因手段降低 rMetase 的分子量, 延长 rMetase 半衰期, 降低免疫原性, 达到反复、长期使用的目的, 是未来一段时间内学者研究的方向.

[参考文献]

- [1] DURANDO X, THIVAT E, GIMBERGUES P, et al. Methionine dependency of cancer cells: a new therapeutic approach[J]. Bull Cancer, 2008, 95(1):69 - 76.
- [2] HALPEM B C, CLARK B R, HARDY D N, et al. The effect of replacement of Methionine by homocysteine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 71(4):1 133 - 1 136.
- [3] AGRAWAL V, ALPINI S E, STONE E M, et al. Targeting Methionine auxotrophy in cancer: discovery & exploration [J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(1):53 - 61.
- [4] CAVUOTO P, FENECH M F. A review of Methionine dependency and the role of Methionine restriction in cancer growth control and life-span extension [J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(6):726 - 736.
- [5] SAKATA S F, OKUMURA S, MATSUDA K, et al. Effect of fasting on Methionine adenosyltransferase expression and the Methionine cycle in the mouse liver [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2005, 51(2):118 - 123.
- [6] KALHAN S C, EDMISON J, MARCZEWSKI S, et al. Methionine and protein Metabolism in non-alcoholic steatohepatitis: evidence for lower rate of transMethylation of Methionine [J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(4):179 - 189.
- [7] SHINOHARA Y, HASEGAWA H, KANEKO T et al. Analysis of [(2)H7]Methionine, [(2)H4]Methionine, Methionine, [(2)H4]homocysteine and homocysteine in plasma by gas chromatography-mass spectrometry to follow the fate of administered [(2)H7]Methionine [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(3-4):417 - 422.
- [8] ELSHORBAGY A K, VALDIVIA-GARCIA M, REFSUM H, et al. Sulfur amino acids in Methionine-restricted rats: hyperhomocysteinemia [J]. Nutrition, 2010, 26(11-12): 1 201 - 1 204.
- [9] ALBERS E. Metabolic characteristics and importance of the universal Methionine salvage pathway recycling Methionine from 5'-Methylthioadenosine [J]. IUBMB Life, 2009, 61(12):1 132 - 1 142.
- [10] KOKKINAKIS D M. Methionine-stress: a pleiotropic approach in enhancing the efficacy of chemotherapy [J]. Cancer Lett, 2006, 233(2):195 - 207.
- [11] TAN Y, XU M, HOFFMAN R M. Broad selective efficacy of recombinant Methioninase and polyethylene glycol - modified recombinant Methioninase on cancer cells In Vitro [J]. Anticancer Res, 2010, 30(4):1 041 - 1 046.
- [12] TAN Y, ZAVALA J S R, HAN Q, et al. Recombinant Methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum Methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients [J]. Anticancer Res, 1997, 17(5B): 3857 - 60.
- [13] 厉保秋, 杨志坚, Takayaki, 等. 重组蛋氨酸酶在猕猴体内的药动学、免疫原性及系统毒性 [J]. 食品与药品, 2006, 8(04A):33 - 38.
- [14] YOSHIOKA T, WADA T, UCHIDA N, et al. Anticancer efficacy in vivo and in vitro, synergy with 5-fluorouracil, and safety of recombinant Methioninase [J]. Cancer Res, 1998, 58(12):2 583 - 2 587.
- [15] WIGMORE P M, MUSTAFA S, EL-BELTAGY M, et al. Effects of 5-FU [J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 678:157 - 164.
- [16] GUPTA A, MIKI K, XU M, et al. Combination efficacy of doxorubicin and adenoviral Methioninase gene therapy with prodrug selenoMethionine [J]. Anticancer Res, 2003, 23(2B):1 181 - 1 188.
- [17] HU J, CHEUNG N K. Methionine depletion with recombinant Methioninase: in vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs [J]. Int J Cancer, 2009, 124(7):1 700 - 1 706.

(2013 - 02 - 14 收稿)