

wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白在卵巢癌中的改变

戴朦^{1,2}, 沈国栋^{1,2}, 王俊³, 胡世莲^{1,2}, 沈干^{1,2}

(1. 安徽医科大学附属省立医院、安徽省立医院老年病科, 合肥 230001; 2. 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室; 3. 安徽省保健委员会)

[摘要] wnt/ β -catenin 信号通路在肿瘤发生发展中的作用已成为近年来研究的热点。wnt/ β -catenin 信号通路可以调控卵巢细胞的增殖、分化及恶性转化, 由此介导肿瘤的发生和发展。研究显示, 细胞膜上、胞质胞核内、细胞间及细胞外影响 wnt/ β -catenin 通路蛋白的改变在卵巢癌形成中起重要作用。我们需要研究出更多在 wnt/ β -catenin 通路中起关键作用的蛋白, 并以此为靶标进行卵巢癌的治疗, 将有助于研发出更加有效的治疗方案。

[关键词] 卵巢肿瘤; Wnt 信号通路; 干细胞

中图分类号: R737.31 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2016.04.035

Change of the proteins associated with wnt/ β -catenin signaling pathway in ovarian cancer Dai Meng*, Shen Guodong, Wang Jun, Hu Shilian, Shen Gan (* Department of Geriatrics, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230001, China; Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy)

Corresponding author: Shen Gan, Email: shenganustc@163.com

[Abstract] The role of wnt/ β -catenin Signaling pathway in tumor development has become a hotspot in recent years. Wnt/ β -catenin signaling pathway could regulating proliferation, differentiation and malignant transformation of ovarian cells, and therefore mediated tumorigenesis and development. Studies have shown that change of the proteins which affecting wnt/ β -catenin pathway on the cell membrane, cytoplasm, nucleus and outside the cell play an important role in the formation of ovarian cancer. More key proteins need to be study in the wnt / β -catenin pathway, and as a target for the treatment of ovarian cancer, which will help develop more effective treatment options.

[Key words] Ovarian neoplasms; Wnt signaling pathway; Stem cells

卵巢恶性肿瘤是当前病死率最高的妇科恶性肿瘤之一, 约 90% 为上皮性卵巢癌。上皮性卵巢癌有多种组织学亚型, 包括浆液性、子宫内膜样、透明细胞样及黏液性卵巢癌。根据 2015 年全球统计结果发现, 卵巢癌每年约有 24 万新发病例, 15 万死亡病例, 其病死率高达 63%^[1]。导致高死亡率的一个主要原因是超过 70% 的卵巢癌患者早期缺乏明显的临床症状及有效的诊断方法, 确诊时已为晚期^[2]。尽管我们知道卵巢癌的组织类型有很多种, 以及对

卵巢癌细胞的起源存有争议, 但临床上一般均采用手术切除联合化疗作为卵巢癌的一般治疗方法^[3]。近年来, 以紫杉醇/铂类为基础的化学疗法和腹腔内化学疗法及剂量密集化疗法的运用, 虽提高了晚期卵巢癌患者的总体生存率, 但其耐药、转移、复发情况仍然比较多见, 因此我们有必要寻找一个新的治疗模式。已有证据证明 wnt 信号通路在卵巢组织的胚胎发育和卵巢细胞增殖、分化及恶性转化过程中起重要作用^[4], 因此本文主要对研究得最多且相关机制解释得较为清楚的经典 wnt 通路进行详细阐述。

1 经典 wnt 通路的组成及其机制

经过多年研究, 目前认为 wnt 通路的主要组成为: Wnt 信号蛋白、胞膜受体 FZD 家族、胞浆内 β -catenin、Dsh、APC、GSK3 β 等蛋白分子、细胞核内

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (1408085MH167); 安徽省科技攻关项目 (1301042094)

作者简介: 戴朦, 硕士在读, Email: 972087149@qq.com

通信作者: 沈干, 主任医师, 硕士生导师, Email: shenganustc@163.com

TCF/LEF 转录因子家族等^[5]。Wnt 通路激活的重要标志是 β -catenin 于胞质稳定表达及核内定位。当没有 wnt 配体或受体被封闭时 wnt 通路关闭, β -catenin 就被由 Axin、APC 和 GSK3 β 组成的降解复合物磷酸化。磷酸化后的 β -catenin 再经泛素化后进一步被送进蛋白酶体, 最终在那里被迅速降解破坏。而当 Wnt 与 7 次跨膜卷曲蛋白 Frizzled (Fzd) 以及共同受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 结合后, wnt 通路打开, 散乱蛋白 Dishevelled (Dsh) 在有 Wnt 信号时激活而被 Frizzled 磷酸化。Dsh 是细胞膜相关 Wnt 受体复合物的关键成分, 它被激活后可抑制降解复合物活性, 使 β -catenin 不能磷酸化, 避免泛素及蛋白酶体对其识别及降解, 这样 β -catenin 在胞质内得以稳定存在。而后积累并转入核内, 与核转录因子 TCF /LEF 结合并促进特定靶基因如 C-myc、Survivin、VEGF 等的启动子暴露, 使其激活并表达, 导致细胞异常增殖和迁移, 从而参与肿瘤的发生^[6]。

2 wnt 通路相关蛋白在卵巢癌中的改变

2.1 细胞膜因素 wnt 通路活化的第一个事件是 wnt 配体与 FZD 和 LRP5/6 的结合。Fzd 受体的两种亚型 Fzd1 和 Fzd5 在上皮性卵巢癌中是增加的, 且 Fzd5 阳性的肿瘤患者 6 年生存状况要差于 Fzd5 阴性患者^[7-8]。另外, 还有几种蛋白在 wnt 通路中充当拮抗剂的作用, 这些蛋白包括: 分泌 Fzd 受体蛋白家族 (SFRP1-5)、Dkkopf 家族 (DKK1-4) 以及 wnt 抑制因子 (WIF-1) 等。SFRP5 是 wnt 的拮抗剂, 因启动子高度甲基化而表达减少。Su 等发现, 在 4 种卵巢癌细胞系 (SKOV3, A2780s, OVCAR3 和 CP70) 中都存在 SFRP5 的甲基化, 而在给予 DNA 酶甲基化抑制剂 5-Aza-CdR (DAC) 后, SFRP5 的 mRNA 表达水平增加, 说明 SFRP5 的沉默是由 SFRP5 甲基化引起的。SFRP5 的后天沉默会导致 wnt 通路的癌性活化并通过 TWIST 介导的 EMT 和 AKT2 信号途径引起卵巢癌的进展和化疗耐药。亦发现 SFRP4^[9] 在卵巢癌中及 SFRP1 和 SFRP2^[10-11] 在其他癌中有同样的作用; DKK2 也是 wnt 的拮抗剂, Jing Zhu 等在体内体外实验都证实了 DKK2 过表达会抑制卵巢癌细胞的增殖和侵袭。将 DKK2 转染至卵巢癌细胞, 发现其 wnt 通路下游靶基因 β -catenin、TCF、c-Myc 和 cyclinD1 的表达都减少。DKK-1, -2, -4 都可作为

wnt/ β -catenin 通路的拮抗剂通过结合 LRP5/6 阻止 LRP5/6 与 FZD 的作用^[12]。与结合 wnt 共受体的 DKK 家族其他成员不同, DKK3 可能通过抑制 β -catenin 的核定位以抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[13]; Jia 等^[14] 对比卵巢癌淋巴结转移灶和无淋巴结转移灶发现 CXCR4 表达水平不同。CXCR4 是间质细胞起源的生理性趋化因子受体, 敲低 CXCR4 可以明显降低卵巢癌细胞的增殖、侵袭及抑制 wnt 靶基因和 vimentin、SLUG 等间质标志分子的表达, 说明 CXCR4 可以成为卵巢癌患者潜在的一个预后因素。

2.2 胞质和胞核因素 先前的研究证实, 子宫内膜样卵巢癌经常发生 CTNNB1 基因的突变, 约占 40%。CTNNB1 基因编码的是 wnt 信号通路的一个关键成分, 即 β -catenin。CTNNB1 基因的错义突变影响 β -catenin 的 NH2 末端调节域, 使其不被降解复合物降解。 β -catenin 聚集后转向核内与 TCF/LEF 蛋白结合并激活靶基因的转录, 如 c-MYC, CCND1/cyclinD1, PPAR δ , gastrin, Cx43 (connexin 43), WISP-1, WISP-2 及 MMP-7。尽管 β -catenin 降解的主要机制在于 CTNNB1 基因的突变, 但是也可以由 APC、AXIN1 和 AXIN2 基因突变引起; Hendrix 等对有无 wnt/ β -catenin 通路调节异常的原发性子宫内膜样卵巢癌进行基因芯片和定量 PCR 检测, 发现 wnt 通路异常的卵巢癌其成纤维细胞生长因子 9 (FGF9) 的表达量是无 wnt 通路异常卵巢癌的 6 倍多。 β -catenin/TCF 介导的 FGF9 转录激活依赖于一种新蛋白的合成, 四羟基他莫昔芬则可以诱导新融合蛋白 β -catenin-S33Y-ER 的合成使 FGF9 转录增加并促进肿瘤形成和侵袭。用新融合蛋白抑制剂放线菌酮可以有效阻断这种作用, 说明 FGF9 是 wnt 信号通路间接的转录靶基因; Hendrix 等^[15] 通过组织芯片技术发现编码一个同源序列转录因子的 MSX2 (也叫 HOX-8) 高度表达。Wnt3a 配体或 GSK3 β 抑制剂可激活 wnt 通路使 MSK2 表达升高, 而 TCF4 显性失活使 MSK2 表达降低。染色质免疫共沉淀实验证明 β -catenin/TCF 可以使 MSX2 通过结合 TCF 结合原件直接调控 MSX2 的表达。用 shRNA 敲低 MSX2 可以抑制卵巢癌细胞的增殖。也有报道在其他癌细胞中 MSX2 也有这个作用^[16]。

2.3 细胞间相互作用 EMT 的发生是以 E-cadherin、细胞角蛋白等上皮性标志物表达下调, Vimentin、N-cadherin 等间叶性标志物表达上调为特点。与大多数上皮细胞起源的肿瘤不同, 卵巢表面上皮恶性转化和腹腔转移时伴随着 E-cadherin 表达的增加。大多数正常上皮表达高水平的 E-cadherin, 但间质起源的正常卵巢上皮却很少表达这种蛋白, 它主要表达的是 N-cadherin。上皮性卵巢癌有一个特征, 在低分化卵巢癌中 E-cadherin 表达增加, 在晚期肿瘤及腹水肿瘤细胞中表达减少^[17]。启动 EMT 标志之一是经典 wnt 信号通路的激活, wnt 信号通路能通过抑制糖原合成酶激酶 3β (GSK3 β) 介导的磷酸化作用以及抑制胞质中的 β -连环蛋白 (β -catenin) 降解等作用来诱发 EMT 转换。胞内大量增加的 β 连环蛋白会转移进入核内, 作为转录因子亚单位诱导大量基因的表达, 这些靶基因的表达产物中有很多都是能够诱导 EMT 转换过程的转录因子。研究表明, 癌细胞经诱导发生 EMT 后可增强对化疗药物的抗药性且获得干细胞的特征, 因而抑制 EMT 的发生, 为潜在的特异性肿瘤干细胞治疗开辟了道路。

转移性卵巢癌上皮细胞在腹腔内播散, 通过整合素粘附于间质胶原纤维。整合素增加会导致 E-cadherin 内在化增多、抑制 GSK-3 β 、增加核内 β -catenin 的水平、增加调控 β -catenin 启动子的活化及 wnt/ β -catenin 靶基因转录活性。Cox2, 尿激酶型纤溶酶原激活物受体 (uPAR), vimentin, LRP6, Wnt5a, MMP-9 和 Snail 表达增加。Burkhalter 等发现一个 TCF/LEF 转录因子家族成员, 它是 β -catenin 和 TCF4 的多肽抑制剂, 通过结合 β -catenin 阻碍其与 TCF4 的结合以抑制核内 β -catenin 的信号。将其转染至卵巢癌细胞内, 发现比空转的细胞侵袭能力下降, 证明 β -catenin/TCF 调控的靶基因对卵巢癌的侵袭有重要作用。

2.4 细胞外因素 研究发现, 上皮性卵巢癌 wnt 通路不只是细胞上、细胞内及细胞间的成分上调, 细胞外活化剂也上调, 这些成分特别地包括: wnt-1、wnt2b、wnt-5a、wnt7a 和 wnt-11。Yoshioka 等^[18]将正常卵巢组织与卵巢癌组织做比较, 通过实时定量 PCR 发现 wnt7a 基因的转录在所有 wnt 配体中最高并发现 wnt7a 只在上皮性卵巢癌中表达, 其他类型不表达。因此构建 TCF/LEF Top-Flash 荧光素酶报

告基因载体, 并将 TCF 结合域突变的 FOP-Flash 作为阴性对照组, 分别转染 wnt7a 高表达的 SKOV3 及 HEY 细胞, 发现 TCF/LEF Top-Flash 荧光素酶报告基因活性比较高。将 wnt7a 和 Fzd5 共转染 SKOV3 及 HEY 细胞, 其 TCF/LEF Top-Flash 荧光素酶报告基因活性更高, 同时用 SFRP2 拮抗 wnt 配体或敲低 TCF4 可以抑制活性, 而只转染 FZD5 却不引起报告基因活性表达; MMP7 为 wnt 通路的靶基因, wnt7a 可激活 MMP7 启动子引起 wnt 通路的活化并增加 MMP7 在卵巢癌的表达。以上结果说明 wnt7a 可通过 Fzd5 激活 wnt/ β -catenin 通路。

3 wnt/ β -catenin 通路与肿瘤干细胞

研究发现, 卵巢癌干细胞与化疗耐药、肿瘤转移及复发有关。正常分化的成体细胞因为增殖缓慢且生命周期较短, 不足以累积恶性转化所需要的多重基因突变。而干细胞具有自我更新和产生不同种类分化细胞的能力, 其较成体细胞更易成为肿瘤发生的靶细胞, 并恶变为肿瘤干细胞。肿瘤是由肿瘤干细胞无限自我更新和混乱发育而成的畸形器官或组织。传统治疗可减小肿瘤体积, 但留下来的卵巢癌干细胞便成为卵巢癌复发和难治的根源。肿瘤干细胞的异常信号通路主要有 wnt/ β -catenin、Notch、Hedgehog、HMGA2、TGF- β 、PTEN、Bcl-2、CXCR4-SDF-1 等, 它们通过各自的机制以及一定的交互作用对卵巢癌干细胞进行调节, 并最终导致卵巢癌的转移、化疗耐受及复发。研究表明, 在乳腺癌、皮肤癌、肠癌、肝细胞癌等肿瘤组织的肿瘤干细胞中, 均存在 wnt/ β -catenin 信号通路的过度活化^[19]。

4 结语

已发现影响 wnt 通路的胞膜、胞质、胞核等蛋白的改变在卵巢癌的形成中起重要作用。对这些成分的鉴定给了我们治疗的潜在靶标。Fzds 是结合 wnt 配体的膜受体之一, 它可以激活 wnt 通路且在卵巢癌中过表达; 临床实验证实卵巢癌中已知 19 个 wnt 配体中的 5 个的上调可以导致 wnt 通路活性的增加; β -catenin 本身的上调及组成降解复合物蛋白的下调会导致核内 β -catenin 的增加, 从而增加 wnt 通路的活性; β -catenin 助激活剂的上调也会引起靶基因转录的增加; 研究发现, 有 23 种不同的靶基因的改变可以引起细胞的增殖, 这是核内 β -catenin 积累的结果, 已证实其在卵巢癌中过表达。

wnt 信号在上皮性卵巢癌中被激活,有直接通过配体激活通路上调和通过与其他通路交联而不依赖配体的核内 β -catenin 的增加。前已述及,卵巢癌预后差主要是因为诊断迟及化疗耐药。卵巢癌在进展早期会向上皮表型转化,因此寻找卵巢癌新的诊断和预后因子有助于预测临床结局。由于卵巢癌化疗耐药的具体机制仍然不清楚,因此有必要寻找一种新的方法来解决,对信号通路中调控化疗反应的关键分子的识别将会有助于研发出更加有效的治疗药物组合方案。

参考文献

- [1] Torre LA, Freddie B, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Xiaoping H, Takayo O, Peng L, et al. Downregulation of HtrA1 promotes resistance to anoikis and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. [J]. Cancer Res, 2010, 70(8): 3109-3118.
- [3] Spiliotis J, Halkia E, Lianos E, et al. Cytooreductive surgery and hipec in recurrent epithelial ovarian cancer: a prospective randomized phase II I Study [J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(5): 1570-1575.
- [4] Gatliffe TA, Monk BJ, Planutis K, et al. Wnt signaling in ovarian tumorigenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1846(2): 638-654.
- [5] Polakis P. The many ways of Wnt in cancer [J]. Curr Opin Genet Dev, 2007, 17(1): 45-51.
- [6] Schuijers J, Mokry M, Hatzis P, et al. Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF / LEF [J]. Embo J, 2014, 33(2): 146-156.
- [7] Badiglian Filho L, Oshima CT, De Oliveira Lima F, et al. Canonical and noncanonical Wnt pathway: A comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer [J]. Oncol Rep, 2009, 21(4): 313-320.
- [8] Vidya PR, Senthil MR, Nagini S. Aberrant activation of Wnt catenin signaling pathway contributes to the sequential progression of DMBA-induced HBP carcinomas [J]. Oral Oncol, 2011, 48(1): 33-39.
- [9] Su HY, Lai HC, Lin YW, et al. Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway [J]. Int J Cancer, 2010, 127(3): 555-567.
- [10] Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, et al. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2006, 107(3): 579-590.
- [11] Chung MT, Lai HC, Sytwu HK, et al. SFRP1 and SFRP2 suppress the transformation and invasion abilities of cervical cancer cells through Wnt signal pathway [J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(3): 646-653.
- [12] Zhu J, Zhang S, Gu LY, et al. Epigenetic silencing of DKK2 and Wnt signal pathway components in human ovarian carcinoma. [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(12): 2334-2343.
- [13] Wen Y, Quanhong S, Sanja D, et al. Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 84-92.
- [14] Jia W, Jing C, Fang H, et al. Silencing of CXCR4 blocks progression of ovarian cancer and depresses canonical Wnt signaling pathway. [J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(6): 981-987.
- [15] Hendrix ND, Rong W, Rork K, et al. Fibroblast growth factor 9 has oncogenic activity and is a downstream target of Wnt signaling in ovarian endometrioid adenocarcinomas. [J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1354-1362.
- [16] Zhai Y, Iura A, Yeasmin S, et al. MSX2 is an oncogenic downstream target of activated WNT signaling in ovarian endometrioid adenocarcinoma. [J]. Oncogene, 2011, 30(40): 4152-4162.
- [17] Voutilainen KA, Anttila MA, Sillanpää SM, et al. Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. [J]. J Clin Pathol, 2006, 15(5): 460-467.
- [18] Yoshioka S, King mL, Ran S, et al. WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/ β -catenin pathway. [J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(3): 469-482.
- [19] Holland JD, Klaus A, Garratt AN, et al. Wnt signaling in stem and cancer stem cells [J]. Semin Cell Dev Biol, 2010, 21(8): 254-264.

(收稿日期: 2015-11-10)