

- tially expressed genes by serial analysis of gene expression in human prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(10): 4283-4286.
- [7] Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2000, 1(1): 48-56.
- [8] El-Rifai W, Frierson HF Jr, Harper JC, *et al.* Expression profiling of gastric adenocarcinoma using cDNA array[J]. *Int J Cancer*, 2001, 92(6): 832-838.
- [9] Mori M, Mimori K, Yoshikawa Y, *et al.* Analysis of the gene expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma[J]. *Surgery*, 2002, 131(1 Suppl): S39-47.
- [10] Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, *et al.* Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(1): 233-240.
- [11] Barden CB, Shister KW, Zhu B, *et al.* Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(5): 1792-1800.
- [12] Celis JE, Gromov P. 2D protein electrophoresis: can it be perfect? [J] *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10(1): 16-21.
- [13] Sinha P, Poland J, Schnolzer M, *et al.* Characterization of the differential protein expression associated with thermoresistance in human gastric carcinoma cell lines [J]. *Electrophoresis*, 2001, 22(14): 2990-3000.
- [14] Xiong M, Jin L, Li W, *et al.* Computational methods for gene expression-based tumor classification [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(6): 1264-1268, 1270.
- [15] Katoh M, Katoh M. CLDN23 gene, frequently down-regulated in intestinal-type gastric cancer, is a novel member of CLAUDIN gene family[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(6): 683-689.

(收稿日期:2003-02-25 修回日期:2003-04-28)

Wnt 信号通路与肿瘤侵袭转移的关系

蔡秋凤, 欧阳高亮综述 鲍仕登审校

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:近年来的研究发现, Wnt- β -catenin 信号通路与肿瘤侵袭转移的相关事件如癌细胞的迁移粘附、细胞外基质的降解及肿瘤的血管生成密切相关。Wnt 信号还能激活 Wnt-Ca²⁺、Wnt-JNK 等非正规通路, 与人类肿瘤的侵袭转移也有一定关系。另外, Wnt 通路还可通过与细胞内其他信号通路如 K-ras、RTK 及 ILK 介导的信号通路相互作用, 在肿瘤侵袭转移过程中起重要作用。

关键词:肿瘤; 侵袭; 转移; Wnt; β -catenin

中图分类号: R73-37

文献标识码: A

文章编号: 1000-8225(2003)05-0326-04

肿瘤的侵袭转移是一个非常复杂的多步骤的过程, 需要突破细胞外基质和基膜组成的多个结构屏障: 癌细胞从原发灶脱落, 通过上皮基底膜, 侵入周围基质和邻近组织, 然后进入血管或淋巴管, 接着从脉管中渗出, 在远部位建立新的增殖旺盛的细胞集落^[1]。这其中的每个事件都相当复杂。一直以来对其分子机制的研究主要集中在细胞粘附分子、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)及其抑制因子、转移相关基因、相关信号通路及血管生成等方面。近年来随着 Wnt 信号通路的深入研究, 发现一些参与肿瘤侵袭转移过程的粘附分子、蛋白酶类、血管生成因子及转移相关的信号通路与该通路密切相关。现就这方面的研究进展作一概述。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170463)。

作者简介:蔡秋凤(1979-), 女, 福建漳州人, 硕士, 主要从事肿瘤细胞分子生物学研究。

1 Wnt 信号通路

Wnt- β -连环素(β -catenin)信号通路是研究得比较清楚的 Wnt 信号通路, 通常被称为 Wnt 正规通路。由细胞分泌的 Wnt 蛋白被细胞表面受体结合后, 即触发细胞内的信号转导: 当 Wnt 蛋白结合到 Fz (Frizzled) 后, 活化细胞内蛋白 Dsh (Dishevelled)。Dsh 的活化抑制了细胞质内由糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3)、结直肠腺瘤性息肉 (adenomatous polyposis coli, APC) 基因产物、轴蛋白 (Axin) 和 β -TrCP (Slimb 是 β -TrCP 在爪蟾中的同源物) 组成的复合物的活性, 导致 β -catenin 在细胞内积累并转移到细胞核内, 与转录因子 T 细胞因子 (T cell factor, TCF) 或淋巴样增强因子 (lymphoid enhancing factor, LEF) 相结合, 在其他因子的辅助下协同激活靶基因的转录。其靶基因 c-myc、cyclin D1、MMP-7、CD44、Claudin-1 等在肿瘤发生发展过程中扮演了重要的角色^[2]。

在没有 Wnt 信号刺激的情况下, 由 GSK3、Axin、

APC 和 β -TrCP (Slimb) 组成的降解复合物促进 β -catenin 很快地被蛋白酶体降解,维持细胞内 β -catenin 的低水平状态。在该复合物中, Axin 与 APC、 β -catenin、GSK3 相结合,促进 GSK3 对 β -catenin 的磷酸化作用。 β -TrCP (Slimb) 通过识别 β -catenin 的磷酸化位点使 β -catenin 泛素化,进而被蛋白酶体降解^[3]。

1.2 Wnt 信号通路的调节因子

有许多分子对 Wnt 信号通路的信号转导具有抑制或促进作用。其中起抑制作用的除了上述的降解复合物外,还有 Frizzled 相关蛋白 (Frizzled related proteins, FRP)、Cerberus、Wnt 抑制因子 (Wnt inhibitory factor, WIF)、Dkk (Dickkopf)、CBP (CREB binding protein)、蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase-2A, PP2A) 等抑制因子。FRP、Cerberus 和 WIF 都是通过与 Wnt 蛋白结合而起作用的;在脊椎动物中,Dkk1 则与 Krm (Kremen)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low-density-lipoprotein receptor-related co-receptor, LRP6) 形成三重复合物,诱导快速内吞作用,移去质膜上的 LRP6,从而抑制了 Wnt- β -catenin 信号通路^[4];CBP 可乙酰化 TCF 的 β -catenin 结合区域,在没有 Wnt 信号刺激或 β -catenin 细胞内水平较低时,LEF 或 TCF 与 CBP、Gro (Groucho) 共同作用,抑制基因的转录;而 PP2A 则通过调节 GSK3 的活性降低细胞内 β -catenin 的水平^[3]。此外,还有其他许多分子对该通路起促进作用,如 LRP6 是 Wnt 信号的辅助受体,可促进 Wnt 信号的转导^[5];GSK3 结合蛋白 (GSK3 binding protein, GBP) 通过与 GSK3 结合抑制 GSK3 依赖的磷酸化作用,从而稳定了 β -catenin;酪氨酸激酶 2 (casein kinase, CK2) 作为一种激酶不仅能磷酸化 Dsh,还能直接磷酸化 β -catenin 并使之稳定^[7]。

2 与肿瘤侵袭转移的关系

2.1 Wnt- β -catenin 与癌细胞的迁移粘附

细胞迁移需要精确的调控,其失控将使癌细胞获得高度的侵袭转移能力。 β -catenin 在该过程中具有双重作用:一方面, β -catenin 在 E-钙粘蛋白介导的粘附连接 (adhering junction, AJ) 或紧密连接复合物中通常处于结合状态,在钙粘蛋白和细胞骨架连接中起重要的桥梁作用,使 E-钙粘蛋白保持粘附功能;另一方面,作为 Wnt- β -catenin 通路的关键效应分子, β -catenin 的入核转运可促进上皮到间充质细胞转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 相关基因的表达^[6]。

在癌细胞中,E-钙粘蛋白的过量表达能封闭 β -catenin 的转录能力,有效地关闭靶基因的表达从而阻止细胞的增殖转移^[7]。而一旦 c-erbB-2 诱导 β -catenin

的酪氨酸位点磷酸化,E-钙粘蛋白就会失去与 β -catenin 的连接而丧失粘附功能,导致癌细胞运动能力提高,增强其侵袭力;转移的肿瘤中 E-钙粘蛋白表达下调可能会影响 Wnt- β -catenin 信号通路,使细胞内游离的 β -catenin 增加,导致与肿瘤转移相关基因的异常表达^[7]。不过,虽然游离的 β -catenin 促进基因的表达,但如果没有 Wnt 信号保证其稳定性,多余的 β -catenin 就会被降解^[7],因此,细胞对 E-钙粘蛋白下调的反应可能取决于 Wnt 信号正规通路是否被激活及肿瘤细胞的类型。在 NIH3T3 和 MCF-7 癌细胞中,过量表达活化的低分子量酪氨酸磷酸酯酶 (low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase, LMW-PTP) 也使细胞质内的 β -catenin 去磷酸化,加强钙粘蛋白介导的细胞与细胞间的粘附^[8]。而在结直肠癌细胞中,APC 突变可激活 Asef, Asef 的过量表达则降低 E-钙粘蛋白介导的细胞与细胞间的粘附作用,并赋予癌细胞以侵袭能力^[9]。Muller 等^[6]证实 β -catenin 在上皮细胞迁移过程中具有关键作用,异常表达的 β -catenin 辅以表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 及肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 可诱导不同类型细胞的迁移。骨桥蛋白 (osteopontin) 是分泌性糖蛋白,通过与细胞表面的整联蛋白相结合并活化 HGF 受体,诱导细胞的迁移,Wnt- β -catenin 通路的活化可诱导 Osteopontin 基因的表达。以上这些研究提示 Wnt- β -catenin 通路可通过多种机制调节细胞的迁移粘附,参与肿瘤侵袭转移的过程。

2.2 MMP 与 Wnt- β -catenin 信号通路

MMP 是一种蛋白水解酶,可通过降解细胞外基质的结构组分及细胞外粘附分子而对细胞的生长、分化和凋亡等行为具有调控作用。已有大量实验证明了 MMP 在肿瘤侵袭转移中的促进作用^[1]。近来有研究表明 MMP 作为肿瘤侵袭转移的促进因子与 Wnt 信号通路密切相关。

实验发现,一氧化氮 (NO) 可诱导处于紧密连接状态的 E-钙粘蛋白降解, β -catenin 随之游离并与 LEF 形成转录复合物,而用 NO 处理的同时加入 MMP 抑制剂,则阻碍了 β -catenin 在细胞质内的累积及细胞核内 β -catenin-LEF 复合物的形成,表明 NO 可能诱导活化 MMP 导致 E-钙粘蛋白的降解和 β -catenin 的解离并在细胞质内累积^[10]。

大量实验证实许多人类肿瘤包括结直肠癌和肝癌中,APC 和 β -catenin 基因发生了遗传改变。这些基因的突变导致 β -catenin 的异常积累并激发 Wnt 信号通路靶基因的活化。当把野生型的 APC 转导到

SW480 细胞后,细胞内的 β -catenin 水平下降,其下游至少 84 个基因下调,膜型 MMP(membrane-type matrix metalloproteinase, MT1-MMP)便是其中的基因之一。MT1-MMP 在人类肿瘤包括结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、食管癌、皮肤癌、肝癌以及脑癌中常常过量表达,其过量表达与肿瘤的侵袭或淋巴结转移有关。另外 MT1-MMP 与 TIMP-2 可共同活化 MMP-2 酶原, Claudins-1、Claudins-2、Claudins-3 和 Claudins-5 对该过程起促进作用。值得注意的是, β -catenin-TCF4 也能上调 Claudin-1 和 CD44。这些研究表明 MT1-MMP 是 Wnt 信号通路下游的直接靶点, β -catenin-TCF4 与 MT1-MMP、Claudin-1 和 CD44 的共同作用可促进细胞的迁移、侵袭和转移。另有研究发现在一些细胞中积累大量的 β -catenin 对 MT1-MMP 的表达没有影响,说明还有其他因子影响 MT1-MMP 表达。MMP-7 过量表达可促进肺癌转移和犬肾细胞(MDCK)细胞的侵袭力,它同时也是 β -catenin-TCF4 的一个作用靶点。可以推测可能还有其他 MMP 与 β -catenin-TCF4 相关并促进肿瘤侵袭和转移^[2]。已经发现环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在结直肠癌发生发展过程中具有多方面作用,其中很重要的一点就是促进肿瘤侵袭转移。Dempke 等^[11]发现 COX-2 可增强 MMP 的表达,APC 的突变则极大地提高 COX-2 的活性,暗示了 Wnt- β -catenin 信号还可通过调节 COX-2 提高 MMP 的表达,促进肿瘤的侵袭转移。

2.3 Wnt 信号通路 with 肿瘤血管生成

血管生成是肿瘤转移的必要条件,研究发现 Wnt 信号通路在血管生成及病理学方面扮演了重要的角色。体内外实验都证明了血管细胞中大量表达多种 Wnt 蛋白,如 Wnt-2、Wnt-5a、Wnt-7a、Wnt-10b 和 Wnt 蛋白受体 Fz。在许多发育和病理状态下发现血管内 β -catenin 的稳定表达,进一步证实了 Wnt 信号通路对血管生成的调节作用^[12]。Zhang 等^[13]还发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)启动子上游 805bp 位点有 TCF4 结合元件,使 Wnt 信号通路明显上调 VEGF 的表达。COX-2 除了调节 MMP 的表达外,还参与肿瘤的血管生成,可增强生长因子如 VEGF、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达。APC 的突变可极大提高 COX-2 的活性,说明 Wnt- β -catenin 信号还可通过调节 COX-2 的表达,促进肿瘤的血管生成^[11]。Holnthoner 等^[14]实验发现在人类内皮细胞中成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)会降低 GSK-3 的活

性,提高细胞核内 β -catenin 的水平,诱导 cyclin D1 的转录;进一步实验显示在 cyclin D1^{-/-}小鼠中,其 FGF-2 诱导血管生成能力明显低于 cyclin D1^{+/+}小鼠,实验表明了 Wnt- β -catenin 信号通路部分介导了 FGF-2 的血管生成能力。

2.4 Wnt-Ca²⁺ 信号通路 with 肿瘤的侵袭转移

近年来的研究发现不同的 Wnt 蛋白可激活细胞内不同的信号通路。研究结果显示 Wnt 蛋白可大致分为两类:一类是 Wnt-1 类,包括 Wnt-1、Wnt-3a、Wnt-8a、Wnt-8b,可激活 Wnt 信号正规通路;另一类是 Wnt-5a 类,包括 Wnt-4、Wnt-5a、Wnt-11,可触发细胞内 Ca²⁺的释放。对石斑鱼和爪蟾胚胎的研究证实了 Wnt-Ca²⁺信号通路的存在,并提出该非正规通路涉及到了细胞内 Ca²⁺浓度的升高,由此活化了 PKC 和 Ca²⁺依赖的蛋白激酶(Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase, CaMK)。Michael 等的实验表明 PKC 和 CaMK 可从两个不同的水平上与 Wnt- β -catenin 信号通路相互作用:PKC 的活化可磷酸化 Dsh, CaMK 则直接磷酸化爪蟾淋巴样增强因子(XLEF-1)。用过量表达 Wnt-5a 的载体转染黑色素瘤细胞,观察到 Wnt-5a 表达活化 PKC 的同时伴随着细胞粘附性的提高(在此过程没发现 β -catenin 表达增加和转移到细胞核内的现象);用 Frizzled-5(Wnt-5a 的受体)的抗体阻断该通路,则抑制了 PKC 的活性和细胞的侵袭力,说明 Wnt-5a 激活的 Wnt-Ca²⁺通路在人类黑色素瘤侵袭转移中有重要的作用^[15]。对于 Wnt-Ca²⁺通路的进一步研究并深入探讨其与肿瘤侵袭转移关系,将为肿瘤侵袭转移的分子机制提供一个新的解释。

2.5 Wnt-JNK 信号通路 with 肿瘤的侵袭转移

Wnt-JNK 信号通路是 Wnt 信号的另一条非正规通路,与肿瘤的侵袭转移密切相关。c-Jun 氨基末端激酶(jun N-terminal kinase, JNK)是 MAPK 信号通路的一个终端效应子。MAPK 通路中的组分包括 TAK1(TGF-activated kinase)和 NLK(NEMO-like kinase)与该通路密切相关。已知 TAK1 可活化 JNK 和 p38 MAPK 家族及 NLK(LIT, LIT 是 NLK 在线虫中的同源物)蛋白激酶,由此 Dsh 对 JNK 的作用很可能是通过 Dsh 活化上游的 TAK1,进而活化 NLK(LIT)。有研究表明提高 JNK1 的表达可增强 MMP9 的活性。对其分子机制的研究发现 MMP9 的表达受其启动子上两个特征性 AP1 位点的调节, MMP9 启动子的点突变发现 JNK1 与其作用的转录因子 c-jun 在转录水平上协同作用于最靠近的 AP1 位点,从而提高了 MMP9

的表达,促进肿瘤的侵袭转移^[16]。

2.6 其他信号通路与 Wnt 信号通路的相互作用在肿瘤侵袭转移中的作用

突变的 K-ras 介导的信号转导不仅在结直肠息肉瘤中起作用,还能上调 VEGF 的表达,与肿瘤的侵袭转移密切相关,其活化还可促进 Wnt 信号的转导^[13]。受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTK)是细胞表面跨膜蛋白,在生长因子的刺激下可触发细胞内一系列反应如细胞的增殖、分化等。RTK 过量表达或结构异常常伴随着人类肿瘤的发生发展^[17]。Met、Ron 受体酪氨酸激酶的突变则可提高细胞内 β -catenin 的水平:实验证明 Met、Ron 突变体可磷酸化 β -catenin 的酪氨酸位点, β -catenin 可能由此发生构象变化,降低了其与 Axin 的亲合力,抑制 β -catenin、Axin 复合物的形成,降低泛素化降解速度,提高 β -catenin 在细胞内的浓度^[18]。研究显示,在肠表皮细胞和乳腺表皮细胞中过量表达整联蛋白连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)导致细胞获得侵袭性,伴随着 E-钙粘蛋白表达下降,磷酸化并下调 GSK3 的活性,提高细胞内 β -catenin 的稳定性,促进其在核内的积累^[3]。还有一些生长因子可通过激活 PKC 介导 β -catenin 在细胞质中的积累^[19]。Cagatay 等^[20]还发现癌细胞内 p53 的失活是导致 β -catenin 异常积累的一个重要原因。进一步研究这些通路间的相互作用将有助于更深入地了解肿瘤侵袭转移的分子机制。

3 结语

近年来 Wnt 信号通路的研究已取得很大进展,对其在肿瘤侵袭转移中作用机制的研究也得到了一些令人振奋的结果,但许多方面仍需做进一步深入研究,如 Wnt 信号正规通路中的其他分子与肿瘤侵袭转移的关系, Wnt-Ca²⁺、Wnt-JNK 的下游组分及其与肿瘤侵袭转移关系的分子机制,是否还存在其他 Wnt 非正规通路并参与了肿瘤的侵袭转移过程等。对这些问题的深入研究有望为肿瘤治疗提供新的更为有效的作用靶点。

参考文献

- [1] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 161-174.
- [2] Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, et al. Identification of membranetype matrix metalloproteinase-1 as a target of the β -catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers[J]. *Oncogene*, 2002, 21(38): 5861-5867.
- [3] Miller JR, Hocking AM, Brown JD, et al. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways[J]. *Oncogene*, 1999, 18(55): 7860-7872.
- [4] Mao B, Niehrs C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling[J]. *Gene*, 2003, 302(1-2): 179-183.
- [5] Bafico A, Liu G, Yaniv A, et al. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(7): 683-686.
- [6] Muller T, Bain G, Wang X, et al. Regulation of epithelial cell migration and tumor formation by β -catenin signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 280(1): 119-133.
- [7] Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(4): E101-108.
- [8] Taddei ML, Chiarugi P, Cirri P, et al. β -catenin interacts with low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase leading to cadherin-mediated cell-cell adhesion increase[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6489-6499.
- [9] Kawasaki Y, Sato R, Akiyama T. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(3): 211-215.
- [10] Mei JM, Borchert CL, Donald SP, et al. Matrix metalloproteinase(s) mediate(s) NO-induced dissociation of β -catenin from membrane bound E-cadherin and formation of nuclear β -catenin/LEF-1 complex[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(12): 2119-2122.
- [11] Dempke W, Rie C, Grothey A, et al. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(7): 411-417.
- [12] Goodwin AM, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature[J]. *Angiogenesis*, 2002, 5(1-2): 1-9.
- [13] Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and Kras pathways in colonic neoplasia[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(16): 6050-6054.
- [14] Holthoner W, Pillinger M, Groger M, et al. Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48): 45847-45853.
- [15] Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma[J]. *Cancer Cell*, 2002, 1(3): 279-288.
- [16] Crowe DL, Tsang KJ, Shemirani B. Jun N-terminal kinase 1 mediates transcriptional induction of matrix metalloproteinase 9 expression[J]. *Neoplasia*, 2001, 3(1): 27-32.
- [17] Saucier C, Papavasiliou V, Palazzo A, et al. Use of signal specific receptor tyrosine kinase oncoproteins reveals that pathways downstream from Grb2 or Shc are sufficient for cell transformation and metastasis[J]. *Oncogene*, 2002, 21(12): 1800-1811.
- [18] Danilkovitch Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, et al. Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the β -catenin pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(17): 5857-5868.
- [19] Chen RH, Ding WV, McCormick F. Wnt signaling to β -catenin involves two interactive components: Glycogen synthase kinase-3 inhibition and activation of protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(23): 17894-17899.
- [20] Cagatay T, Ozturk M. P53 mutation as a source of aberrant β -catenin accumulation in cancer cells[J]. *Oncogene*, 2002, 21(52): 7971-7980.

(收稿日期:2003-03-13 修回日期:2003-05-21)