

# 卷曲蛋白在肿瘤中的研究进展

沈 艳 综述, 李孝生<sup>△</sup> 审校(重庆医科大学附属第二医院消化内科 400010)

【关键词】 卷曲蛋白; 肿瘤; Wnt 配体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.06.041 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)06-0718-03

卷曲蛋白家族是一类高度保守的信号分子,是七跨膜的细胞表面受体,属于 G 蛋白偶联受体大家族。卷曲蛋白(Frizzled)作为 Wnt 信号通路的受体,通过与 Wnt 配体结合来激活下游的信号传导通路,主要调控细胞的增殖、分化、迁移、组织的极性以及肿瘤的发生、发展等。本文就卷曲蛋白在肿瘤中的研究进展作一综述。

## 1 Frizzled 家族

在 Frizzled 基因发现之前,小鼠的乳腺癌原癌基因 Int-1 和同源的果蝇的无翅基因 Wingless 已经被发现了,由于 Wingless 基因和 Int-1 基因是同源物,故他们一起命名为 Wnt 基因家族<sup>[1]</sup>。不久之后,研究者在果蝇中证实了一种具有胞外氨基末端的七跨膜蛋白是 Frizzled 基因表达的产物。此后,Frizzled 基因在不同的多细胞生物中被发现,包括脊椎动物、线虫、海绵和水螅<sup>[2]</sup>。在哺乳类中发现 Frizzled 蛋白家族包括 10 种 Frizzled 蛋白和 1 种 smoothed 蛋白<sup>[3]</sup>。

## 2 Frizzled 的分布和结构特征

研究者发现 Frizzled 蛋白在细胞质膜上特异性的表达。Frizzled 蛋白位于 Wnt 应答细胞的表面,但有证据表明 Frizzled 蛋白可以被内化,用于调节细胞外 Wnt 蛋白的水平 and (或)Wnt 蛋白的细胞反应。

Frizzled 蛋白的氨基酸长度大约在 500~700 变化,其氨基末端位于胞外区,含有一个半胱氨酸富含区(CRD 区),CRD 区是 Frizzled 受体结合 Wnt 蛋白的位点。Frizzled 蛋白还包含一个七疏水区,形成跨膜的  $\alpha$ -螺旋。Frizzled 蛋白的羧基末端有一高度保守的 KTxxxW 模体,它能够和散乱蛋白(Dvl)的 PDZ 区结合,进而激活 Wnt 信号通路<sup>[4-5]</sup>。Dvl 和细胞膜上带负电荷的磷脂的静电相互作用调控着 Frizzled 蛋白和 Dvl 的结合<sup>[6]</sup>。

## 3 Frizzled 蛋白的配体和协同受体

Wnt 蛋白是 Frizzled 受体同源的配体<sup>[7]</sup>,它是一类分泌性糖脂蛋白家族,目前在哺乳类中发现了 19 种 Wnt 家族成员。Wnt 蛋白分为两类:Wnt1 类和 Wnt5A 类。Wnt1 类蛋白包括 Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3A、Wnt8、Wnt8A,主要通过  $\beta$ -catenin 传递信号,参与经典途径的 Wnt 信号传导;Wnt5A 类蛋白包括 Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt11 等,主要参与非经典途径的 Wnt 信号传导<sup>[8]</sup>。研究者对 Wnt 蛋白和 Frizzled 受体特异性结合做了分析,得出 Wnt3A 和 Wnt5A 蛋白能够高效地激活人类的 FZD1, Wnt7A 能够激活 FZD6, Wnt5A 能够激活 FZD7, Wnt3A 能够激活 FZD10<sup>[9]</sup>。

研究者发现了许多单跨膜的受体可作为 Frizzled 蛋白的协同受体,如 LRP5/6、ROR1/2 和 RYK 等。LRP5/6 属于低密度脂蛋白受体相关蛋白超家族,它在细胞内吞、细胞信号传导、胚胎发育、脂质稳定和疾病产生等方面发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。与 Frizzled 蛋白相比较,LRP5/6 不含有任何 CRD-Wnt

结合区域,然而其氨基末端的  $\beta$ -propeller 表皮生长因子对于 LRP5/6 和 Wnt/FZD 复合物的结合来说是必需的<sup>[11]</sup>。ROR1/2 是受体酪氨酸激酶,他和遗传性的骨骼疾病有关系,如显性的短指症和隐性的 Robinow 综合征<sup>[12]</sup>。RYK 是酪氨酸激酶家族受体的一个成员,RYK 的 Wnt 结合区无特有的 CRD 区,但有同源的 Wnt 抑制因子 1(WIF-1)<sup>[13]</sup>。RYK 不仅能够和 Frizzled 蛋白形成复合物激活经典的 Wnt-FZD 信号通路,而且能够通过 FZD 单独信号通路调控非经典的 Wnt-FZD 信号通路<sup>[8]</sup>。

## 4 Frizzled 信号通路与肿瘤的关系

依靠着不同的配体蛋白,Frizzled 受体激活后可产生 3 种不同的信号级联反应:经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路、Wnt/PCP 信号通路、Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  信号通路<sup>[2]</sup>。这 3 种信号通路的异常激活,与肿瘤的发生、发展有着密切的关系。

**4.1 经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路** 研究者认为经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路激活的标志是  $\beta$ -catenin 在细胞内的积累。在缺乏 Wnt 蛋白时,细胞质内的  $\beta$ -catenin 不断地被激活的轴蛋白复合体降解。轴蛋白复合体由轴蛋白(Axin)、结肠腺瘤样息肉蛋白(APC)、酪氨酸激酶 1(CK1)、糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ )组成。CK1 和 GSK3 $\beta$  不断磷酸化  $\beta$ -catenin 的氨基末端,引起  $\beta$ -catenin 被 E3 泛素化连接酶的  $\beta$ -Trecp 亚单位识别,最终导致  $\beta$ -catenin 发生泛素化和降解。由于  $\beta$ -catenin 的持续减少,影响了  $\beta$ -catenin 转位进入细胞核,进而抑制了 Wnt 靶基因。当 Wnt 配体蛋白结合到 Frizzled 受体和 LRP5/6 协同受体时,他们形成了 Wnt-FZD-LRP5/6 的三联复合体,这促进了散乱蛋白与 Frizzled 受体的结合,进一步引起 LRP5/6 和轴蛋白复合体结合并发生磷酸化。这样就抑制了轴蛋白介导的  $\beta$ -catenin 磷酸化和降解过程。因此, $\beta$ -catenin 在细胞内稳定积累并转位进入细胞核<sup>[7]</sup>。 $\beta$ -catenin 在细胞核内与转录因子 TCF/LEF 结合后,激活 Wnt 信号的靶基因,调控胚胎发育、细胞生长、分化和凋亡以及肿瘤的发生。研究者证实了  $\beta$ -catenin 在细胞内的积累与人类许多肿瘤的发生有关系,如结直肠癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌、皮肤癌及肝癌等<sup>[14]</sup>。

**4.2 Wnt/PCP 信号通路** Wnt/PCP 信号通路调控组织的极性、细胞的迁移和细胞骨架的排列,该通路涉及到 STAT3 的激活和 JAK/STAT 信号通路的激活。参与到 Wnt/PCP 信号通路中的 Wnt 蛋白包括 Wnt5A、Wnt11 和 Wnt7A<sup>[15]</sup>。在 Wnt/PCP 信号通路中,Wnt/FZD/ROR2 的相互作用引起散乱蛋白结合到细胞膜上,进而触发邻近细胞膜上的 vang 和 Prickle 蛋白的积累,调控细胞及组织的极性。依赖于 Dvl 的 Wnt/PCP 信号通路通过 Jun、Daam、RhoA、Rac、Cdc42 和 Profilin 传导信号,这些信号分子都有细胞骨架的作用,最终控制组织和细胞的极性和移动性<sup>[15]</sup>。因为这些信号分子对于肿瘤的发生和发展很关键,所以 Wnt/PCP 信号通路和癌症有一定

关系。

**4.3 Wnt/Ca<sup>2+</sup> 信号通路** Wnt/Ca<sup>2+</sup> 信号通路抑制了依赖于  $\beta$ -catenin 的通路和促进细胞的迁移。参与到 Wnt/Ca<sup>2+</sup> 信号通路中的 Wnt 蛋白包括 Wnt5A、Wnt11 和 Wnt4<sup>[14]</sup>。这些 Wnt 蛋白结合并激活 Frizzled 受体,引起细胞膜中的磷酸肌醇流动和细胞内储存的钙的释放。随着细胞内钙的堆积,就激活了 Ca<sup>2+</sup> 依赖的信号分子,如 Ca<sup>2+</sup> 依赖的蛋白激酶 II (CAMK II) 和蛋白激酶 C(PKC)等,进而对下游的信号通路产生影响。研究者已经证实了 Wnt5A 通过不同的机制抑制经典的 Wnt 通路,这些机制包括激活 CAMK II 和诱导 Siah。Siah 是 E3 泛素化连接酶复合物的成员,主要负责  $\beta$ -catenin 的泛素化和降解。Wnt5A 通过 CAMK II 在炎症反应中诱导巨噬细胞与之结合<sup>[16]</sup>,它对巨噬细胞的效应可能在乳腺癌的转移中起作用。Wnt5A 激活 CAMK II 的作用对于人脐静脉血管内皮细胞的增殖至关重要,这可能涉及到血管的生成和癌症的发生<sup>[17]</sup>。

**5 Frizzled 蛋白在肿瘤中的研究及意义**

Frizzled 蛋白作为 Wnt 蛋白的受体,在肿瘤细胞系和组织中频繁上调。研究者在胃癌中发现 FZD2、FZD3 及 FZD7 表达上调,在胃腺癌中发现 FZD8、FZD9 和 FZD10 表达上调<sup>[18]</sup>。在肝细胞肝癌中,FZD7 在 mRNA 和蛋白水平过量表达,研究发现上调的 FZD7 与减少了  $\beta$ -catenin 的磷酸化及  $\beta$ -catenin 在细胞核内积累有关。因此,在 HCC 的发生过程中,FZD7 受体上调与激活了经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关<sup>[19]</sup>。此外,FZD7 在小鼠和人类肝癌组织中过量表达,而在癌旁和非典型增生的组织中高表达,这表明了 FZD7 蛋白的过量表达在肝癌的发生过程中属于早期事件<sup>[20]</sup>。Ueno 等<sup>[21]</sup>发现 FZD7 mRNA 在 6 种结直肠癌细胞系中显著表达,这与激活了经典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关,并证实了 FZD7-siRNA 可用于结直肠癌的治疗。最近的研究表明,在所有的 Wnt 受体中,FZD7 在不同的癌症中通常是表达上调的,如结直肠癌、肝细胞肝癌、三阴性乳腺癌等。FZD7 在癌症的发生及进展方面起着重要的作用,在体内及体外实验中已经证实了 siRNA 敲除的 FZD7、抗 FZD7 抗体或胞外的 FZD7 肽段具有抗肿瘤的活性,都是通过抑制经典的 Wnt 信号通路发挥作用<sup>[22]</sup>。因此,靶向抑制 FZD7 代表了一种合理的肿瘤治疗新方式。Wang 等<sup>[23]</sup>发现 FZD8 是人肺癌的治疗靶点,证实了 FZD8 的过表达激活了肺癌的异常 Wnt 信号通路。

自从发现异常激活的 Wnt 信号通路与人类癌症有关后,医药研发人员对 Wnt 信号通路的抑制剂产生了浓厚的兴趣。NSAIDs 在结直肠癌的预防和治疗方面显示出了良好的效果,因为 NSAIDs 通过抑制前列腺素 E2 的产生来干扰了 TCF/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[24]</sup>,前列腺素 E2 能够增强依赖于  $\beta$ -catenin 的 TCF 转录。另外一种潜在的治疗靶点是激酶 CDK8。在结肠癌细胞中,CDK8 作为调节亚单位,常常上调并参与到依赖于  $\beta$ -catenin 的转录和增殖过程中<sup>[25]</sup>。最近研究发现了一种抑制  $\beta$ -catenin 信号通路的新型小分子,它通过一种不明机制稳定轴蛋白(Axin),即使在缺少 APC 功能的癌症细胞中也能够促进  $\beta$ -catenin 的降解<sup>[26]</sup>。因此,操纵轴蛋白(Axin)的稳定表现了一种有希望的治疗战略。最近,科研人员开发了一种基于抗体的治疗,靶向针对 Wnt 通路中高表达的分子,如 Wnts 和 FZDs。此外,抑制 Wnt 通路的蛋白治疗(如 SFRPs 等)正在临床前期的肿瘤模型中被开发和测试。

**6 结 语**

Frizzled 蛋白在肿瘤发生、进展及抗肿瘤治疗中具有重要作用,通过各种手段抑制 Wnt 信号通路的异常活化可以用于

治疗癌症。目前以 Wnt 信号通路为靶点的抗肿瘤治疗措施包括:治疗性的蛋白(SFRPs、DKKs)、核酸类物质(疫苗、干扰病毒、小干扰 RNAs)和许多 Wnt 通路中小分子量的干扰物质<sup>[27]</sup>。在将来,通过低分子量的物质、重组体和治疗性的分子来操纵 Wnt 通路治疗疾病是很有希望的。因此研究 Frizzled 蛋白对理解肿瘤的发生及治疗具有重要意义。

**参考文献**

- [1] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development[J]. *Development*, 2009, 136(19):3205-3214.
- [2] Huang HC, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways[J]. *Genome Biol*, 2004, 5(7):234-237.
- [3] Schulte G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors[J]. *Pharmacol Rev*, 2010, 62(4):632-667.
- [4] Punchihewa C, Ferreira AM, Cassell R, et al. Sequence requirement and subtype specificity in the high-affinity interaction between human frizzled and dishevelled proteins [J]. *Protein Sci*, 2009, 18(5):994-1002.
- [5] Gao C, Chen YG. Dishevelled: the hub of Wnt signaling [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(5):717-727.
- [6] Simons M, Gault WJ, Gotthardt D, et al. Electrochemical cues regulate assembly of the Frizzled/Dishevelled complex at the plasma membrane during planar epithelial polarization[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3):286-294.
- [7] MacDonld BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1):9-26.
- [8] Maiese K, Li F, Chong ZZ, et al. The Wnt signaling pathway: Aging gracefully as a protectionist? [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 118(1):58-81.
- [9] Koval A, Purvanov V, Egger-Adam D, et al. Yellow submarine of the Wnt/Frizzled signaling: Submerging from the G protein harbor to the targets[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(10):1311-1319.
- [10] May P, Woldt E, Matz RL, et al. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions[J]. *Ann Med*, 2007, 39(3):219-228.
- [11] Liu CC, Pearson C, and Bu G. Cooperative folding and ligand-binding properties of LRP6 beta-propeller domains [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(22):15299-15307.
- [12] Minami Y, Oishi I, Endo M, et al. Ror-family receptor tyrosine kinases in noncanonical Wnt signaling: their implications in developmental morphogenesis and human diseases[J]. *Dev Dyn*, 2009, 239(1):1-15.
- [13] Fradkin LG, Dura JM, Noordermeer JN. Ryks; new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system[J]. *Trends Neurosci*, 2010, 33(2):84-92.
- [14] Camilli TC, Weeraratna AT. Striking the target in Wnt-y conditions; Intervening in Wnt signaling during cancer progression[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5):702-711.

- [15] Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signaling; a new paradigm for cancer therapy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(8):2103-2109.
- [16] Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, et al. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the anti-inflammatory action of activated protein C and interleukin-10[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(3):504-510.
- [17] Cheng CW, Yeh JC, Fan TP, et al. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signaling regulates human endothelial cell proliferation and migration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(2):285-290.
- [18] Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. Expression profiles of 10 members of Frizzled gene family in human gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(4):767-771.
- [19] Merle P, Kim M, Herrmann M, et al. Oncogenic role of the frizzled-7/ $\beta$ -catenin pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(5):854-862.
- [20] Merle P, de la Monte S, Kim M, et al. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(4):1110-1122.
- [21] Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, et al. Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(7):697-705.
- [22] King TD, Zhang W, Suto MJ, et al. Frizzled-7 as an emerging target for cancer therapy[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(4):846-851.
- [23] Wang HQ, Xu ML, Ma J, et al. Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1):62-66.
- [24] Shao J, Jung C, Liu C, et al. Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(28):26565-26572.
- [25] Firestein R, Bass AJ, Kim SY, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity[J]. *Nature*, 2008, 455(7212):547-551.
- [26] Chen B, Dodge ME, Tang W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer[J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(2):100-107.
- [27] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signaling and its impact on development and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(5):387-398.

(收稿日期:2012-08-26 修回日期:2012-12-26)

## 乙型肝炎病毒感染的免疫应答及其疫苗的应用

蒋霞<sup>1</sup>综述, 腾飞鹏<sup>2</sup>审校(1. 四川省双流县第一人民医院检验科 610200; 2. 四川省人民医院检验科, 成都 610072)

【关键词】 乙型肝炎; 免疫应答; 疫苗

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.06.042 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)06-0720-03

遵照为成员国提供健康政策指导原则的要求,WHO 正在定期发布一系列有关疫苗和联合疫苗的最新立场性文件,这些疫苗是指可预防对全球公共健康造成危害的疾病的疫苗。这些文件主要针对大规模免疫接种。乙型肝炎(简称乙肝)免疫策略的主要目的是预防慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染及其严重的并发症,包括肝硬化和肝细胞癌。针对所有婴儿抗 HBV 感染的常规免疫接种,应该成为世界各国国家免疫计划的组成部分。高覆盖率的婴儿基础系列免疫接种已在预防儿童慢性 HBV 感染中发挥了极大作用。

### 1 背景

**1.1 病原体与疾病** HBV 是一种双链、带包膜的病毒,其基因组只有 3 200 个碱基对,是已知的 DNA 病毒中最小的。HBV 在人类和其他高级灵长类动物的肝细胞中复制,在人工细胞培养物中不能生长。乙肝病毒表面抗原(HBsAg)是一种病毒包膜上的脂蛋白,在乙肝患者体内过量生成,以直径为 22 nm 的球状和管状颗粒在血液中循环。HBsAg 含有一个抗原中和表位,称为决定簇 a,与另外两个 HBsAg 抗原决定簇 d/y 和 w/r 共同将 HBV 分成 4 个亚型,即 adw、adr、ayw 和 ayr。该决定簇中某些氨基酸,特别是第 137~147 个氨基酸区域的置换,可能导致决定簇 a 不能被普通的筛选试验所鉴别,也不能被疫苗产生的抗体所识别。

尽管从理论上,疫苗接种所带来的选择压力或抗病毒作用可能更利于这类突变体的复制,但是其在临床上的重要性尚不清楚,并且也未能证实其在公共健康方面的意义。HBV 感染的后果依年龄而变化,包括急性乙肝(出现临床症状)、慢性乙肝、肝硬化和肝细胞癌。在急性乙肝中,约有 1% 是由围产期感染,10% 由低龄儿童(1~5 岁)感染,30% 由较大儿童(5 岁以上)感染发展而成,其中 0.1%~0.6% 的急性肝炎发展为暴发性肝炎。暴发性肝炎的病死率约为 70%。慢性乙肝感染的进展与年龄呈反比,大约有 90% 的围生期感染、30% 的低龄儿童以及 6% 的较大儿童的感染能够发展为慢性乙肝<sup>[1]</sup>。无论感染者有无症状,慢性 HBV 感染的进程是相似的。慢性 HBV 感染者中有 15%~25% 的人存在因 HBV 相关肝硬化与肝细胞癌导致过早死亡的危险<sup>[2]</sup>。

从临床角度不可能将乙肝与其他病毒因子造成的肝炎加以区分,因此实验室诊断很重要。从血清学角度看,急性 HBV 感染的特点是出现 HBsAg 和抗-HBc 的 IgM 抗体(抗-HBcIgM)。在病毒高度复制的感染初期,乙肝患者的血清 e 抗原(HBeAg)也为阳性。几周后抗-HBs 出现,然后清除 HBsAg。慢性感染的特征是 HBsAg 持续(6 个月以上)存在(可能同时出现 HBeAg,也可能不同时出现)。这一特征是日后发展为慢性肝病和肝癌的重要危险信号。存在 HBeAg 表明该个体具