

# 四次跨膜蛋白-1与肝癌关系的研究进展

张惠文<sup>1</sup> 李程<sup>2</sup> 李嘉珂<sup>1</sup> 李俊<sup>1</sup> 邱氟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中南大学湘雅三医院普外三科, 长沙 410013; <sup>2</sup>中南大学湘雅三医院放射科, 长沙 410013)

**摘要** 原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球病死率极高的恶性肿瘤,然而到目前为止HCC的临床治疗效果仍不令人满意。因此,亟需寻找更为可靠、安全的HCC治疗手段。四次跨膜蛋白-1是四次跨膜蛋白家族的重要成员之一,其介导细胞发育、活化、生长和运动的信号转导过程。四次跨膜蛋白-1在HCC、肺癌、结直肠癌、膀胱癌、卵巢癌、胰腺癌等多种肿瘤的发生发展过程中起着重要作用。该文概述了TM4SF1的结构和功能,归纳了已经研究过的TM4SF1促进HCC发生、发展的相关机制,并回顾了近年来TM4SF1作为癌症免疫疗法的理想抗原和新型生物标志物的临床应用。

**关键词** HCC; 四次跨膜蛋白-1; 蛋白激酶B; 转移

## Research Progress on the Relationship between the Transmembrane-4-L6 Family 1 and Hepatocellular Carcinoma

ZHANG Huiwen<sup>1</sup>, LI Cheng<sup>2</sup>, LI Jiake<sup>1</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, QIU Fu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of General Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China;

<sup>2</sup>Department of Radiology, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract** HCC (hepatocellular carcinoma) is a malignant tumor with an extremely high mortality rate in the world, but the clinical treatment effect of HCC so far is not satisfactory. Therefore, it is urgent to find more reliable and safe treatment methods. TM4SF1 (transmembrane-4-L6 family 1) is one of the important members of the TM4SF, which mediates the signal transduction process that regulates cell development, activation, growth and movement. TM4SF1 plays important roles in the occurrence and development of HCC, lung cancer, colorectal cancer, bladder cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer and other tumors. This article outlines the structure and function of TM4SF1, summarizes the mechanisms of TM4SF1 to promote the occurrence and development of HCC, and reviews the recent clinical application of TM4SF1 as an ideal antigen for cancer immunotherapy and new biomarker.

**Keywords** hepatocellular carcinoma; transmembrane-4-L6 family 1; AKT; metastasis

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤之一,是目前全球第六大最常见的癌症,也是癌症相关死亡的第二大主要原因<sup>[1]</sup>。四次跨膜蛋白-1(transmembrane-4-L6 family 1, TM4SF1)参

与肿瘤细胞新陈代谢及微环境的形成,调控肿瘤细胞的生长、侵袭、转移<sup>[2]</sup>。TM4SF1是一种存在于上皮癌细胞中的具有肿瘤特异性的抗原,并且在肿瘤血管生成和血管内皮细胞(endothelial cell, EC)中高度选择性表

收稿日期: 2020-04-01 接受日期: 2020-06-15

湖南省重点研发计划项目(批准号: 2015JC3003)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13875854119, E-mail: qiuffu@163.com

Received: April 1, 2020 Accepted: June 15, 2020

This work was supported by the Key Research and Development Program in Hunan Province (Grant No.2015JC3003)

\*Corresponding author. Tel: +86-13875854119, E-mail: qiuffu@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5366>

达<sup>[3]</sup>。TM4SF1的致癌作用主要在于促进恶性肿瘤细胞转移和肿瘤血管生成<sup>[3]</sup>。TM4SF1在癌细胞中具有选择性表达的特性,已经发展成了备受关注的单细胞克隆抗体肿瘤治疗的靶点。

## 1 TM4SF1结构特点及功能

TM4SF1又被称为肿瘤相关抗原L6,是一种含202个氨基酸的四次跨膜蛋白。TM4SF1位于3号染色体(3q213q25)上,作为肿瘤相关抗原存在于许多人上皮恶性肿瘤中<sup>[4-5]</sup>。TM4SF1蛋白含有3个预测的-NH<sub>2</sub>末端疏水跨膜区、2个潜在的N-键糖基化位点和1个-COOH末端疏水跨膜区<sup>[4]</sup>。由于TM4SF1在细胞外环中缺乏CCG基序,并且与其他33个TM4SF家族成员相比没有完全一致的序列同源性,因此被归类于包含TM4SF5、TM4SF4、TM4SF18和TM4SF20的新型超家族,而且TM4SF1可在肿瘤细胞的质膜、培养的内皮细胞以及体内肿瘤细胞相关的内皮细胞中高效选择性表达<sup>[6]</sup>。TM4SF1聚集在质膜和纳米伪足上的一种间歇微区中,这种微区是一种薄的细长突起,从内皮细胞表面延伸达50 nm。通过免疫荧光显微镜发现,在培养的内皮细胞和肿瘤细胞中, TM4SF1除了分布在细胞表面外,还沉积在细胞质和细胞核中<sup>[7]</sup>。TM4SF1通过调节细胞信号转导从而在细胞生长、发育、活化和运动中发挥重要的作用,参与肿瘤的发生和发展<sup>[8]</sup>。例如, TM4SF1可通过向TERM区域募集和相关泛素化修饰促进肿瘤细胞迁移<sup>[5]</sup>。此外, TM4SF1通过与分化簇13(cluster of differentiation 13, CD13)相互作用,调节跨膜蛋白CD63、CD82等的表达,影响细胞的运动和侵袭<sup>[5]</sup>。TM4SF1在活化的内皮细胞中高表达,并且可以激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)或凝血酶以刺激血管生成<sup>[9]</sup>。TM4SF1还是纳米伪足形成的必要条件,并与肌球蛋白-10和 $\beta$ -肌动蛋白相互作用,从而在细胞极化和运动过程中调节丝状伪足的形成<sup>[10]</sup>。TM4SF1在活化的内皮细胞中也高度表达,包括培养的内皮细胞和衬有转移细胞的血管内皮细胞<sup>[11]</sup>。刺激血管内皮生长因子或凝血酶后, TM4SF1与整联蛋白相互作用介导血管生成<sup>[10]</sup>。TM4SF1不仅参与细胞转移,而且还调节发育血管生成,使其成为抗血管生成和抗肿瘤治疗的潜在目标<sup>[10]</sup>。

## 2 TM4SF1在HCC中的作用机制

### 2.1 TM4SF1与miRNA的关系

miRNA(mircoRNA)是一类长度约为22~24个核苷酸的小型非编码RNA,它们通过结合靶mRNA的3'非翻译区(untranslated region, UTR)来调节基因表达,从而抑制蛋白质的翻译。miRNA可以作为癌基因或肿瘤抑制物来调节肿瘤细胞的生理活动,包括细胞分化、增殖、凋亡、侵袭和转移<sup>[12]</sup>。

研究证明, TM4SF1参与各种miRNA介导的癌症进展。在三阴性乳腺癌中(triple-negative breast cancer, TNBC), miR-206对TM4SF1基因表达进行负调控, TM4SF1在细胞中的表达水平与细胞的迁移和侵袭能力呈正相关<sup>[8]</sup>。miR-141的低表达可以通过促进TM4SF1的表达而增强食管癌干细胞的自我更新能力和致癌性,促进细胞的侵袭和迁移,因此, miR-141对TM4SF1的调节可能在控制食管癌干细胞的自我更新中起重要作用<sup>[13]</sup>。TM4SF1是miR-30a/c的直接靶点, TM4SF1被miR-30a/c靶向抑制会导致非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞的生长和增殖能力减弱<sup>[14]</sup>。有研究通过人细胞实验发现, miR-520f表达增加会显著地抑制HCC细胞的增殖,减弱细胞迁移和侵袭的能力,诱导G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>细胞周期的停滞,促进细胞的凋亡,而miR-520f的表达下调与HCC较差的临床病理特征密切相关,如较大的肿瘤直径、晚期TNM分期和细胞转移,表明miR-520f参与了HCC的进展<sup>[15]</sup>。此外, miRNA需要通过调节其靶基因的表达来发挥其生物学功能, TM4SF1在生物信息学数据库TargetScan中被鉴定为miR-520f的靶基因<sup>[16]</sup>。

### 2.2 TM4SF1与AKT信号通路

磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号传导通路调节着包括细胞生长、增殖、迁移和葡萄糖代谢在内的许多生理过程。PI3K/AKT信号传导通路在人类癌症中常常被激活,是人类多种肿瘤的常见分子机制之一,所以AKT是肿瘤侵袭性的关键调节分子<sup>[17]</sup>。PI3K/AKT信号通路也是HCC发展的关键途径之一,其通过多种途径介导下游生物学效应,该信号通路的激活会导致细胞生长减缓和细胞凋亡增强<sup>[18-19]</sup>。细胞实验发现, miR-520f的低表达可以促进HCC细胞中TM4SF1的表达, TM4SF1的表达增加进而有效地激活PI3K/AKT信号通路,因此, miR-520f/TM4SF1轴介导的HCC增殖和侵袭被认为有可能是通过激活PI3K/AKT信号

通路实现的<sup>[15]</sup>。

### 2.3 TM4SF1对癌症相关蛋白的作用

为了说明TM4SF1对癌症相关蛋白的作用,有研究通过免疫组织化学分析和蛋白质印迹分析发现,HepG2细胞中TM4SF1的过表达降低了含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteiny l aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)的表达,而增加了基质金属蛋白酶2(matrix metalloprotein 2, MMP2)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloprotein 9, MMP9)和VEGF的表达<sup>[20]</sup>。MMP2和MMP9是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解的主要调控因子, TM4SF1介导了它们的表达和活性,从而增强了细胞的迁移和侵袭<sup>[21]</sup>。VEGF是强大的血管生成因子,可诱导血管内皮细胞的增殖和迁移,对生理性和病理性血管生成都有重要作用,且其表达与肿瘤的分期和进展有关,在许多肿瘤中不受调控<sup>[22]</sup>。XUE等<sup>[13]</sup>证明,MMP-2、MMP-9和VEGF是TM4SF1的下游蛋白,而TM4SF1的过表达反过来又上调了MMP-2、MMP-9和VEGF的表达。VEGF的过表达促进MMP-2和MMP-9的分泌,这可能在肿瘤的侵袭和转移中起着至关重要的作用<sup>[13]</sup>。Caspase-3是参与凋亡的最关键的凋亡蛋白酶。DNA依赖性蛋白激酶和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶是重要的DNA修复酶。Caspase-3可以水解这两种酶,以抑制DNA复制、转录和损伤修复<sup>[9]</sup>。基于这些发现, TM4SF1似乎通过多种机制增强了癌细胞的侵袭性。因此,抑制TM4SF1的表达可能是抑制肿瘤生长并减少癌细胞迁移和侵袭的有效策略。

### 3 TM4SF1的临床应用前景

TM4SF1被认为是癌症免疫疗法的理想抗原,因为它可能是体液免疫和细胞免疫的理想靶标。LIN等<sup>[23]</sup>通过将TM4SF1的B细胞表位与细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)和辅助T细胞(T helper cell, Th)表位结合以形成嵌合长肽,并在乳剂型纳米颗粒佐剂的配合下诱导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和CTL反应,从而抑制TM4SF1阳性癌细胞的生长。THOMAS等<sup>[24]</sup>通过检测结直肠癌患者中癌胚抗原水平与TM4SF1 mRNA的水平发现,在所有结直肠癌患者中,有79%的患者的TM4SF1 mRNA呈阳性,而只有35%

的患者的癌胚抗原滴度升高( $P=0.001$ )。在结直肠癌Dukes A期患者中,有84.9%的患者的TM4SF1 mRNA呈阳性,而只在16.9%的患者中癌胚抗原升高的。通过逆转录聚合酶链反应对TM4SF1 mRNA进行检测发现,与癌胚抗原的酶联免疫吸附法相比,其可以更早地检测到结直肠癌的发生和复发等异常情况。TM4SF1在胰腺癌中高表达, TM4SF1的下调可以减少胰腺癌细胞的迁移、侵袭和化疗耐药性,而且可以增强吉西他滨治疗的有效性和抑制肿瘤血管生成的能力<sup>[25]</sup>。miR-141的表达降低导致TM4SF1表达增强,进而通过激活AKT信号通路抑制E-cadherin的表达并促进VEGF-A的表达,导致胰腺癌上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和肿瘤血管生成增强,提示miR-141/TM4SF1/AKT轴可能是胰腺癌的治疗靶点<sup>[4]</sup>。在前列腺癌中, TM4SF1的过表达显著激活了细胞外调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)信号通路,使EMT增强,促进了前列腺癌细胞系DU145的侵袭、迁移和增殖<sup>[5]</sup>。有研究通过高通量测序构建了低分化HCC的miRNA和mRNA表达谱。进一步整合与癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)差异程度不同的HCC表达数据,发现TM4SF1和人膜联蛋白A2(recombinant human annexin A2, ANXA2)是密切相关的分子,它们可以被用于区分分化较差的HCC和分化良好的HCC。TM4SF1、ANXA2和8号染色体开放阅读框33抗体(chromosome 8 open reading frame 33, C8orf33)这三种分子是HCC潜在的生物标志物,可被用于区分分化差的HCC和分化良好的HCC<sup>[26]</sup>。然而, TM4SF1的表达与胃癌浸润深度、淋巴结转移、TNM分期和Lauren分级呈负相关,提示TM4SF1在胃癌的发生、发展过程中具有抑癌作用, TM4SF1是胃癌的抑癌因子,也是胃癌患者的一种新的预后标志物<sup>[27]</sup>。SCIUTO等<sup>[7]</sup>发现, TM4SF1是具有抗体结合毒素的癌症治疗的潜在候选物,该毒素具有与肿瘤细胞或肿瘤相关血管内皮细胞的细胞质或细胞核反应的能力,其抗体药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC)有望成为治疗癌症的新方法。ZOU等<sup>[28]</sup>发现,在卵巢癌患者中,与糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)相比,包含有TM4SF1的自身抗体对卵巢癌的诊断具有更高的特异性。但是目前,关于甲胎蛋

白和TM4SF1哪个指标对诊断HCC的灵敏性和特异性更好的研究尚未有文献报道, 我们期望未来有更多的研究报告能详细阐述TM4SF1在诊断HCC方面的应用和价值。

#### 4 结语

综上所述, HCC中TM4SF1表达增强可以通过介导PI3K/AKT信号通路引起凋亡相关蛋白Caspase-3表达降低, 而与HCC细胞转移和血管生成相关的蛋白如MMP-2、MMP-9和VEGF表达却升高, 且TM4SF1的表达受到miR-520f的抑制。这说明TM4SF1的过度表达通过抗凋亡、侵袭、转移和血管生成等途径促进了HCC的生长和复发。除了PI3K/AKT信号通路之外, 影响HCC发生发展的信号通路众多且复杂, 目前关于TM4SF1与其他信号通路关系的研究仍旧欠缺。我国是世界上的乙肝大国, TM4SF1是一个潜力巨大、收益可观的抗肿瘤治疗靶点, 研究TM4SF1的作用机制可以增加和改善HCC的早期诊断方法和治疗手段。

#### 参考文献 (References)

- [1] KOSUKE S, MASAFUMI I, YASUSHI K, et al. Lipid profiling of pre-treatment plasma reveals biomarker candidates associated with response rates and hand-foot skin reactions in sorafenib-treated patients [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82: 677-84.
- [2] 姚红羽, 阳志军. TM4SF1在恶性肿瘤研究中的进展[J]. *医学与哲学(YAO H Y, YANG Z J. Progress of TM4SF1 in malignant tumours [J]. Med Phil)*, 2018, 39(3B): 60-3.
- [3] CAO R, WANG G, QIAN K Y, et al. TM4SF1 regulates apoptosis, cell cycle and ROS metabolism via the PPAR $\gamma$ -SIRT1 feedback loop in human bladder cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2018, 414: 278-93.
- [4] XU D, YANG F, WU K J, et al. Lost miR-141 and upregulated TM4SF1 expressions associate with poor prognosis of pancreatic cancer: regulation of EMT and angiogenesis by miR-141 and TM4SF1 via AKT [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(4): 354-63.
- [5] CHEN J Y, WANG F B, XU H, et al. Over-expression of TM4SF1 improves cell metastasis and growth by activating ERK1/2 signaling pathway in human prostate cancer [J]. *J Buon*, 2019, 24: 2531-8.
- [6] GAO C Y, YAO H Y, LIU H M, et al. TM4SF1 is a potential target for anti-invasion and metastasis in ovarian cancer [J]. *Bmc Cancer*, 2019, 19(1): 237.
- [7] SCIUTO T E, MERLEY A, LIN C I, et al. Intracellular distribution of TM4SF1 and internalization of TM4SF1-antibody complex in vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(3): 338-43.
- [8] FAN C N, LIU N, ZHENG D, et al. MicroRNA-206 inhibits metastasis of triple-negative breast cancer by targeting transmembrane 4 L6 family member 1 [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6755-64.
- [9] WEI Y H, SHEN X Y, LI L Q, et al. TM4SF1 inhibits apoptosis and promotes proliferation, migration and invasion in human gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16: 6081-8.
- [10] CAO J, YANG J C, RAMACHANDRAN V, et al. TM4SF1 regulates pancreatic cancer migration and invasion *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39: 740-50.
- [11] LIN C I, MERLEY A, SCIUTO T E, et al. TM4SF1: a new vascular therapeutic target in cancer [J]. *Angiogenesis*, 2014, 17: 897-907.
- [12] PARK Y R, KIM S L, LEE M R, et al. MicroRNA-30a-5p (miR-30a) regulates cell motility and EMT by directly targeting oncogenic TM4SF1 in colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143: 1915-27.
- [13] XUE L, YU X Y, JIANG X R, et al. TM4SF1 promotes the self-renewal of esophageal cancer stem-like cells and is regulated by miR-141 [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 19274-84.
- [14] MA Y S, YU F, ZHONG X M, et al. Mir-30 family reduction maintains self-renewal and promotes tumorigenesis in nsccl-initiating cells by targeting oncogene TM4SF1 [J]. *Mol Ther*, 2018, 26: 2751-65.
- [15] DU X Q, FAN W H, CHEN Y R. MicroRNA-520f inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion by targeting TM4SF1 [J]. *Gene*, 2018, 657: 30-8.
- [16] VISINTIN A, KNOWLTON K, TYMINSKI E, et al. Novel anti-TM4SF1 antibody-drug conjugates with activity against tumor cells and tumor vasculature [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 1868-76.
- [17] WAN X L, ZHENG C X, DONG L. Inhibition of CTRP6 prevented survival and migration in hepatocellular carcinoma through inactivating the AKT signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 17059-66.
- [18] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170: 605-35.
- [19] GONG C W, AI J Y, FAN Y, et al. Ncapg promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma through PI3K/AKT signaling [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 8537-52.
- [20] HUANG Y K, FAN X G, QIU F. TM4SF1 promotes proliferation, invasion, and metastasis in human liver cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 661.
- [21] YANG J C, ZHANG Y, HE S J, et al. TM4SF1 promotes metastasis of pancreatic cancer via regulating the expression of DDR1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45895.
- [22] DAI W J, WANG Y L, YANG T X, et al. Downregulation of exosomal CLEC3B in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and angiogenesis via AMPK and VEGF signals [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17: 113.
- [23] LIN S I, HUANG M H, CHANG Y W, et al. Chimeric peptide containing both B and T cells epitope of tumor-associated antigen L6 enhances anti-tumor effects in HLA-A2 transgenic mice [J]. *Cancer Lett*, 2016, 377: 126-33.
- [24] SCHIEDECK T K, WELLM C, ROBLICK U, et al. Diagnosis and monitoring of colorectal cancer by L6 blood serum polymerase chain reaction is superior to carcinoembryonic

- antigen-enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Dis Colon Rectum*, 2003, 46: 818-25.
- [25] CAO J, YANG J C, RAMACHANDRAN V, et al. TM4SF1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0144969.
- [26] SHAO P, SUN D G, WANG L M, et al. Deep sequencing and comprehensive expression analysis identifies several molecules potentially related to human poorly differentiated hepatocellular carcinoma [J]. *Febs Open Bio*, 2017, 7: 1696-706.
- [27] PENG X C, ZENG Z, HUANG Y N, et al. Clinical significance of TM4SF1 as a tumor suppressor gene in gastric cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7: 2592-600.
- [28] ZOU Y P, LI L. Identification of six serum antigens and auto-antibodies for the detection of early stage epithelial ovarian carcinoma by bioinformatics analysis and liquid chip analysis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16: 3231-40.