

# 经典 Wnt 信号通路中 $\beta$ -连环蛋白的影响因素

郑群 徐立红\*

(浙江大学医学院生物化学和遗传学系, 杭州 310058)

**摘要** Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号途径在动物生长发育过程中发挥了重要作用。一旦该通路中相关信号传递发生异常改变, 就可能引起该通路异常活化, 从而影响生物的胚胎发育、能量代谢等一系列生理过程, 甚至会导致肿瘤的发生及恶化。而这一异常变化的中心事件则是细胞内  $\beta$ -连环蛋白丰度、分布以及功能的变化。现从  $\beta$ -连环蛋白的影响因素这一角度阐述了经典 Wnt 通路的改变, 进而加强对该通路异常和肿瘤的关系的了解。

**关键词** Wnt; 信号通路;  $\beta$ -连环蛋白

Wnt 信号通路是从果蝇和非洲爪蟾的遗传学实验中被发现的, 在生物进化中极为保守。Wnt 族基因及其产物与许多其他相关基因的蛋白质产物构成一条极为复杂的控制生物的胚胎发育、细胞命运及组织器官形态发生的细胞信号通路, 在生物生长发育中具有重要作用。该信号转导途径是一个多环节、多作用位点的生长发育调控信号通路。Wnt 途径活化后通过影响基因表达等促进细胞增殖, 在生物的正常发育中提供了组织分化的诱导信号, 但在成年动物细胞中它们通过局部作用导致肿瘤的发生和生长。因此, 对 Wnt 途径的信号转导及调控的研究不仅可增进人们对胚胎发育机制的了解, 更重要的可增加对肿瘤的发生、发展机制的认识。

Wnt 信号通路转导途径主要有 3 条: 由  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)参与的经典途径; 通过 JNK 介导的 Planer 细胞极性途径; 通过  $Ca^{2+}$  介导的 Wnt/ $Ca^{2+}$  途径, 即通过钙依赖性激酶、钙调蛋白和转录因子 NF-AT 起作用。本文重点就经典途径中  $\beta$ -连环蛋白的影响因素作一简要综述。

## 1 经典 Wnt 信号通路转导机制以及 $\beta$ -连环蛋白结构和生物学特性

### 1.1 经典 Wnt 通路信号转导的分子机制

经典 Wnt 信号途径也称为 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号途径, 在不同物种中该通路的分子机制具有极高的保守性。其分子机制为: 在没有 Wnt 信号时, 胞浆内的  $\beta$ -连环蛋白大部分与细胞膜上的钙黏蛋白(E-cadherin)结合, 少部分与轴蛋白(axin)、腺瘤性结肠息肉病基因蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、

酪蛋白激酶(casein kinase, CK)、糖原合酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )形成巨大复合物, CK1 对  $\beta$ -连环蛋白的第 45 位残基进行丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 此反应又催化了 GSK-3 $\beta$  对  $\beta$ -连环蛋白的第 41、37 和 33 位残基磷酸化, 被磷酸化标记的  $\beta$ -连环蛋白被泛素连接酶  $\beta$ -TrCP 蛋白识别进而被泛肽化, 最终导致  $\beta$ -连环蛋白通过蛋白酶体被降解, 因而胞浆内游离  $\beta$ -连环蛋白水平极低。当有 Wnt 信号传入时, Wnt 蛋白与七次跨膜受体卷曲蛋白(frizzelds, Fzd)的胞外区结合, 在辅助受体 LRP5/6 协同作用下, 胞质中的散乱蛋白(dishevelled, Dvl)被募集至胞膜附近, Dvl 能够促进 GSK-3 $\beta$  等物质磷酸化, 使其从轴蛋白上脱落, 打散了  $\beta$ -连环蛋白降解复合体, 使其不能被降解, 大量游离的  $\beta$ -连环蛋白在胞质中聚集, 这种累积打破了细胞内原有的  $\beta$ -连环蛋白出核和入核平衡, 使得细胞核内的  $\beta$ -连环蛋白大大增加。转录因子 Tcf/Lef-1 能通过 HMG 框结合在 DNA 特定元件上。在没有与  $\beta$ -连环蛋白结合时, Tcf/Lef-1 与许多转录抑制物结合形成复合物, 如转录抑制因子 CtBP、groucho/TLE, 抑制靶基因的转录。当  $\beta$ -连环蛋白进入核内,  $\beta$ -连环蛋白与 Tcf/Lef-1 家族成员的氨基端结合, 降低了与转录抑制物的结合亲和力, 同时还招募了转录所需的辅助激活因子如 CBP/p300<sup>[1]</sup>、BCL9/LGS 和 Pygo<sup>[2]</sup>等, 从而解除抑制作用, 促进 Wnt 靶基因的转录激活。至今已发现多种 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白靶基因,

收稿日期: 2008-05-23 接受日期: 2008-11-25

国家基础科学人才培养基金资助项目(No.J0730856)、浙江大学基础医学理科基地基金项目

\* 通讯作者。Tel: 0571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn

包括(1)细胞周期和细胞凋亡相关基因,如 *c-myc*、细胞周期蛋白 D1; (2)生长因子相关基因,如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子(FGF)<sup>[3]</sup>; (3)与肿瘤进展相关的基因,如基质金属蛋白酶 7 和 26、骨桥蛋白; (4)转录因子相关基因,如免疫球蛋白转录因子 2 (ITF-2)、过氧化物酶增殖体激活受体  $\delta$ ; (5)其他靶基因,如多药耐药基因、环氧合酶 -2。

在这一过程中, Wnt 蛋白、Dvl 等是 Wnt 信号通路的正向调节因子,而 APC 蛋白、GSK-3 $\beta$  及轴蛋白等是负向调节因子(图 1)。正向或者负向调节的直接后果就是引起细胞内  $\beta$ -连环蛋白含量、分布以及功能的变化,进而引起下游靶基因表达的变化。

## 1.2 $\beta$ -连环蛋白的结构和生物学特性

人  $\beta$ -连环蛋白基因定位于染色体的 3p21.3-p22,全长 23.2 kb,有 16 个外显子,其 mRNA 长度为 3 362 个核苷酸。 $\beta$ -连环蛋白为一条多肽链,含 781 个氨基酸,分子量约为 92~95 kDa,基本结构包括:氨基端约 130 个氨基酸,含有多个 GSK-3 $\beta$  和酪氨酸蛋白激酶(protein tyrosine kinase, PTK)的磷酸化位点,其后为  $\alpha$ -连环蛋白的结合部位,控制着分子的稳定性。羧基端约 100 个氨基酸,具有活化相应靶基因转录的功能。中间区域含 550 个氨基酸,由 42 个氨基酸的 12~14 个重复序列的基本肽链单位组成,称为 arm 区域,可有效的防止蛋白质水解。此 arm 区域的电荷分布不对称,多数正电荷位于由超螺旋形成的浅沟中。不同的结合蛋白能识别  $\beta$ -连环蛋白的头 10 个

片段, E-钙黏蛋白, APC 蛋白, Tcf 的  $\beta$ -连环蛋白结合区域为酸性,可能与  $\beta$ -连环蛋白浅沟的碱性区域相作用。APC 蛋白和 E-钙黏蛋白均可和  $\beta$ -连环蛋白结合,并且这些结合还存在一定程度上的竞争性。

异常 Wnt 信号通路致癌关键是  $\beta$ -连环蛋白水平升高及其核内分布增加,从而激活相关基因的转录。一方面,  $\beta$ -连环蛋白能促进许多原癌基因的表达,另一方面,  $\beta$ -连环蛋白现又被认为是许多原癌基因的产物,它既能被原癌基因 Wnt-1 等上调,也能被肿瘤抑制基因 APC 等下调,很多因素直接或间接影响这一中心事件。

## 2 Wnt 信号通路中 $\beta$ -连环蛋白的影响因素

### 2.1 Wnt 蛋白及其受体促进 $\beta$ -连环蛋白积聚的同时,又能调节其亚细胞定位

Wnt 蛋白是一类广泛存在的分泌性糖蛋白,分子内均带有一段几乎恒定的由 23 个半胱氨酸构成的信号区,它们常与细胞外基质成分结合。目前已知的 Wnt 蛋白中,激活经典通路的主要有 Wnt-1、Wnt-3a 和 Wnt-8 等。Wnt 蛋白是经典信号通路的起始信号,因此其表达量及结构的异常会影响到 Wnt 信号通路的活化, Kirikoshi 等<sup>[5]</sup>发现在宫颈癌细胞株 SKG-IIIa、HeLa S3 中 Wnt10B mRNA 高表达,提示 Wnt10B 可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白途径,改变  $\beta$ -连环蛋白的含量和分布而致癌。但是, Wnt 蛋白中还存在负性调节的蛋白质,现在所知的并不多。最近

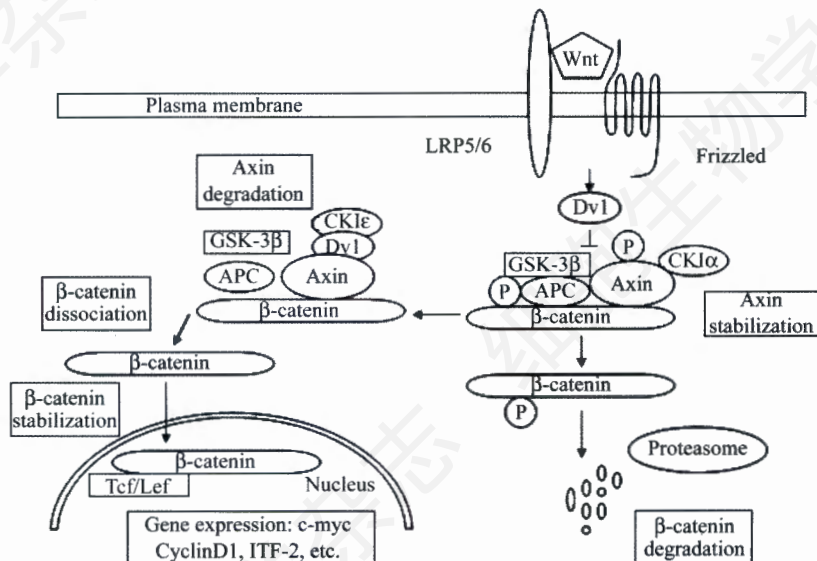


Fig.1 Mechanism of the classic Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway<sup>[4]</sup>



研究发现的 Wnt-4 就是其中一种, 该蛋白质不影响  $\beta$ -连环蛋白的稳定性, 但能调节它的亚细胞定位, 使之向膜移动, 从而抑制其介导的 Tcf 基因转录活化<sup>[6]</sup>。

Wnt 蛋白受体卷曲蛋白(Fzd)是 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号转导途径的正性调节子, 受体表达上升可能与某些 Wnt 蛋白协同作用, 使得该信号通路过度激活, 从而引起一系列后续反应, 而 LRP5/6 作为辅助受体参与了这一过程。LRP5/6 除了协同完成信号传递这一任务以外, 酵母双杂交和免疫共沉淀实验发现, LRP 的胞内域与轴蛋白相互作用, 可能促进轴蛋白降解, 并且这一相互作用可以被 Dvl 和 Fzd 增强<sup>[7]</sup>。

## 2.2 Wnt 蛋白拮抗剂抑制 Wnt 信号激活, 下调 $\beta$ -连环蛋白

Wnt 蛋白拮抗剂包括分泌型 Fzd 受体蛋白(SFRP)、WIF-1 和 Dickkopf (DKK)等。在细胞膜上, 分泌因子 WIF-1、Cerberus 和 SFRP 等可与 Wnt 直接结合, 从而阻断 Wnt 与 Fzd 受体结合, 遏制了 Wnt 信号的激活。如 WIF-1 的主要功能区是一个约由 150 个氨基酸组成的 N 端区域(称为 WIF 区), 该区域能与 Wnt 蛋白结合, 抑制 Wnt 信号的传递。目前已确定与 Wnt 通路异常有关的肿瘤的研究中发现, 多数肿瘤存在 WIF-1 的表达缺失或下降<sup>[8]</sup>, 这种表达下调, 可能会使过多的 Wnt 蛋白激活 Wnt 信号通路, 引起一系列异常。但是, 其表达量升高并不能说明该通路是抑制的, 因为这也可能是机体调节该通路过度激活的一种负反馈, 可以用来监测病变早期和预后<sup>[9]</sup>。又如, DKK-1 和 DKK-2 都能与 LRP5/6 结合, 间接阻断 Wnt 信号, 抑制  $\beta$ -连环蛋白的变化和基因的异常转录。因此可以说这些蛋白质是 Wnt 信号通路的负性调节子。

## 2.3 E-钙黏蛋白抑制 $\beta$ -连环蛋白胞内积聚, 而 E-钙黏蛋白抑制物(如 ILK, Snail)则促进其游离

在无 Wnt 信号的不增殖细胞中, 大量  $\beta$ -连环蛋白被束缚在从细胞膜向内突起的 E-钙黏蛋白分子上, 而且它们的相互作用对后者介导的细胞黏连是必需的。当 E-钙黏蛋白基因发生异常改变, 使得其蛋白浓度和结构发生变化时, 就能很大程度上影响  $\beta$ -连环蛋白的水平。Pečina-Slaus 等<sup>[10]</sup>发现 Wnt 信号通路相关信号分子参与了脑肿瘤的发生, 值得注意的是 31% 的硬脑膜肉瘤中存在 CDH1 (E-钙黏蛋白基因)的杂和性丢失, 提示 E-钙黏蛋白可能作为该通路的一个重要元件影响着通路的活化, 进而影响到肿瘤的发生。

ILK 是一种能与细胞表面整合素蛋白结合的丝氨酸/苏氨酸激酶, 在生长因子作用下可与整合素的胞外亚基作用, 使结合  $\beta$ -连环蛋白的 E-钙黏蛋白表达减少, 游离  $\beta$ -连环蛋白的增多则影响到基因表达, ILK 的癌基因性质就是通过 LEF-1- $\beta$ -连环蛋白信号通路表现出来的。Snail 是 E-钙黏蛋白的转录抑制物, 在上皮细胞迁移和肿瘤细胞浸润中发挥着重要作用。GSK-3 $\beta$  可以磷酸化 Snail, 导致  $\beta$ -TRCP 介导的泛素化和蛋白酶体的降解, 而 Wnt 信号以及 GSK-3 $\beta$  的抑制物则能够抑制该过程<sup>[11]</sup>, 所以说 Wnt 信号途径中的相关物质以各种各样的方式相互联系、辅助、制约, 形成一个平衡。

## 2.4 正性调节子散乱蛋白(dishevelled, DSH/Dvl)除了直接参与 Wnt 信号传递抑制 $\beta$ -连环蛋白降解外, 还与其他物质反应而间接影响 $\beta$ -连环蛋白的变化

Dvl 是机体组织细胞中广泛存在的胞浆蛋白, 最近发现核内也有存在, 并且在胚胎发育中发挥着重要作用。Dvl 由 670 个氨基酸残基组成, 分子内含有高度保留的 3 个区段: 氨基端 DIX 区(有与部分轴蛋白相同的 51 个氨基酸), 中间 PDZ 区及羧基端 DEP 区(能结合 Dvl、EGL210、Pleckstrin 蛋白的部位)。Dvl 是一种磷蛋白, 其丝氨酸和苏氨酸残基易受 Wnt 信号激活而被磷酸化, 是组装轴蛋白复合物所必须的连结分子, 含有结合轴蛋白、CKI $\epsilon$ 、CKII、FRAT (frequently rearranged in advanced T cell lymphomas) 蛋白的结合部位及 Dvl 间多聚位点, 具有募集轴蛋白、CKI $\epsilon$  等物质的作用, 并且这种向细胞膜趋化的作用在 Wnt 信号传递以后还存在<sup>[12]</sup>。

当 Wnt 信号途径激活时, Dvl 被上游信号激活, 一端与 Fzd 的胞内部分相连, 另一部分则与轴蛋白、APC 等重要元件相结合以抑制其活化, 从而阻断  $\beta$ -连环蛋白磷酸化和泛素化, 引起  $\beta$ -连环蛋白在胞质内积累而进入细胞核。Dvl 对  $\beta$ -连环蛋白的影响, 除了通过 Wnt 上游信号传递来完成, 其本身的浓度及活性在某一程度上也会影响  $\beta$ -连环蛋白的变化。有研究发现在肝细胞癌中, Dvl 的抑制子 HDPR1 的表达下调, 能引起  $\beta$ -连环蛋白的积聚; 在宫颈鳞癌中 Dvl-1 mRNA 表达上升, Dvl-1 在癌细胞胞质中表达显著, 而在周围正常宫颈鳞状细胞中不表达<sup>[13]</sup>, 这些都说明 Dvl-1 能通过基因扩增及表达上调扰乱 Wnt 信号转导途径, 与肿瘤的形成有关。

此外, Dvl 还与其他许多物质结合并相互作用, 间

接影响着 Wnt 信号通路。Wnt 通路对抗物裸露角质蛋白(NKD) 1 和 2 就是通过与 Dvl 结合达到抑制通路的效果的, 并且这种作用不只发生在细胞质内, 也发生在 Wnt 信号存在时的细胞核内<sup>[14]</sup>。但又有研究显示, 在没有  $\beta$ - 连环蛋白突变的人类肝肿瘤细胞中, Nkd-1 抑制 Wnt-3a 活化的 Tcf 敏感的荧光素酶指针激活, 而在  $\beta$ - 连环蛋白突变的肝毒细胞瘤中 Nkd-1 没有拮抗效应<sup>[15]</sup>, 这提示了 Nkd-1 对  $\beta$ - 连环蛋白的负调节可能还包括了与  $\beta$ - 连环蛋白的相互作用。又如另外一种对抗物  $\beta$ -arrestin, 它能够与 Dvl 的 PDZ 区 N 末端结合, 而该区域包含了 CKI 的磷酸化位点, 并且这种结合能够被 CKI 抑制物所抑制, 因此  $\beta$ -arrestin 能够影响 CKI 的磷酸化, 从而影响  $\beta$ - 连环蛋白的代谢<sup>[16]</sup>。最近还有研究表明, Dvl 能够作用于 p53 开头的 50 个氨基酸即激活区, 促进 p53 的转录活性, 虽然该过程不属于 Wnt 信号通路, 但是作为重要元件和影响因素, Dvl 和 p53 之间可能存在独特的调控机制甚至是通路, 从而影响 Wnt 信号通路<sup>[17]</sup>。

## 2.5 APC 抑制 Wnt 通路激活, 促进 $\beta$ - 连环蛋白的降解, 同时还参与核内转录调节

1986 年, APC 基因首次在一位患有息肉病及多种其他先天性畸形病人的 5 号染色体长臂片段先天性中间缺失中得到证实。APC 基因定位于人染色体 5q21-22, 长度约 10.7 kb。该基因含 16 个外显子, 后来发现的位于外显子 10 和 11 之间的命名为外显子 10A<sup>[18]</sup>。由 APC 基因编码的 APC 蛋白的分子量为 311.8 kDa, 含 2 843 个氨基酸。

APC 基因失活方式主要包括染色体的等位基因片段缺失, APC 启动子甲基化, 点突变和移码突变等。APC 基因突变有 300 多种不同形式, 分布遍及整个基因区, 现在有越来越多的研究显示肿瘤与 APC 基因突变密切相关, 如在喉癌、脑肿瘤中发现了很大比例的 APC 基因杂和性丢失<sup>[19]</sup>, 这些都提示了 Wnt 信号通路在肿瘤的发生发展中有重要作用。APC 基因突变以第 15 外显子的 5' 端(654~2 843 密码子)最为常见。其中 1 020~1 169 密码子(编码 3 组 15 个氨基酸的重复序列)及 1 323~2 075 密码子(编码 7 组 20 个氨基酸的重复序列)编码区域被认为是  $\beta$ - 连环蛋白与 APC 蛋白结合区域并为降解所需, 若是该区域发生异常改变, 则 APC 蛋白不能与  $\beta$ - 连环蛋白结合, 无法有效调节  $\beta$ - 连环蛋白。此外, APC 基因突变还能加强其他物质对 Wnt 信号通路的激活, 或者说 APC 基因突变导致了 APC 抑制其他物质活化能力的降

低。有实验表明, 在 APC 基因突变的细胞系中铁离子浓度升高, 从而引起 Wnt 信号增加, 而在无 APC 基因突变的细胞系中没有这样的改变<sup>[20]</sup>。

APC 除了在细胞质中与细胞骨架连接外, 它还存在于细胞核中。APC 有其特定的核输入和输出信号, 因此它具有在细胞核与细胞质之间穿梭的功能, APC 在细胞核内与 C 端结合蛋白(C-terminal binding protein, CtBP)结合, 减少  $\beta$ - 连环蛋白与 Tcf 结合<sup>[21]</sup>, 这也是 APC 作为抑癌基因调节 Wnt 信号通路的一方面; 同时也认为, 细胞核内的 APC 促进了  $\beta$ - 连环蛋白在细胞核与细胞质中的穿梭。

另外, APC 本身的降解也通过泛素依赖的蛋白酶体降解途径, Wnt 信号和轴蛋白分别促进和抑制该降解过程, 因此, Wnt 信号激活或者轴蛋白相关基因突变都能影响 APC 在该通路中的重要作用, 形成恶性循环。

## 2.6 轴蛋白作为降解复合体的主体促进 $\beta$ - 连环蛋白的降解

轴蛋白含有与 Wnt 信号途径中许多成员相互结合的功能区域, 起支持蛋白作用。其 N 端为 RGS 结构域, 紧挨着的是 MID 结构域, GID 结构域, C 端为 DIX 结构域, 它们分别是 APC 蛋白、GSK-3 $\beta$ 、有丝分裂原激活蛋白胞外调节激酶激酶 1 和 Dvl 蛋白的结合位点。轴蛋白能够使 GSK-3 $\beta$  向  $\beta$ - 连环蛋白靠拢而促进  $\beta$ - 连环蛋白被 GSK-3 $\beta$  磷酸化, 因此认为轴蛋白是一种肿瘤抑制因子, 其发生基因缺陷能增强  $\beta$ - 连环蛋白活性, 促进肿瘤的形成。轴蛋白第 1 外显子(Pro255Ser)编码 APC 结合位点的区域发生突变, 会使原本降解  $\beta$ - 连环蛋白的蛋白质复合物不能有效完成降解任务。若与 GSK-3 $\beta$  结合的位点发生突变也是如此, 如 392 位的亮氨酸突变成脯氨酸(L392P)。在许多肿瘤中都可以检测到轴蛋白突变, 提示肿瘤与 Wnt 通路的激活有关。如在结肠癌研究中发现  $\beta$ - 连环蛋白在突变型轴蛋白 2 阳性细胞中聚集在核内, 在野生型轴蛋白 2 阳性细胞中则聚集在胞质中, 因为与正常的野生型轴蛋白 2 相比, 突变型轴蛋白 2 缺少 DIX 结构域, 不能有效的形成降解  $\beta$ - 连环蛋白的复合物, Wnt 信号过度激活, 可能导致了肿瘤的发生<sup>[22]</sup>。

轴蛋白作为一个降解  $\beta$ - 连环蛋白的重要枢纽, 参与了许多物质对  $\beta$ - 连环蛋白的调节作用。而最近发现轴蛋白本身的降解也是 LRP5/6 介导的。胞内受体分子 Disabled-2 作为  $\beta$ - 连环蛋白的抑制物, 是通过



与轴蛋白相互作用,抑制轴蛋白与 LRP5/6 的相互作用,减少其降解而实现的<sup>[23]</sup>。另外, Tcf 能通过与  $\beta$ -连环蛋白相互作用调节核内相关物质对 Wnt 信号的反应,而实验表明轴蛋白的低表达与 Tcf-4 的高表达之间存在一定联系,并且都影响到肺癌细胞的增殖与侵袭性<sup>[24]</sup>。同时发现,轴蛋白也在进行核浆穿梭,以调节  $\beta$ -连环蛋白的核浆分布。这些都说明了轴蛋白在调节  $\beta$ -连环蛋白中具有重要作用。

### 2.7 酪蛋白激酶(casein kinase, CK) I $\alpha$ 和 I $\epsilon$ 分别促进和抑制 $\beta$ -连环蛋白降解, CK2 则抑制 $\beta$ -连环蛋白降解,促进转录

参与 Wnt 信号的 CK 主要是 CKI,哺乳类 CKI 包括 7 种: CKI $\alpha$ , CKI $\beta$ , CKI $\gamma^1$ , CKI $\gamma^2$ , CKI $\gamma^3$ , CKI $\delta$  及 CKI $\epsilon$ ,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,CKI $\alpha$  能将  $\beta$ -连环蛋白的丝氨酸残基 45 磷酸化,促进其降解,是经典 Wnt 信号途径的负性调节子。而 CKI $\epsilon$  则是正性调节子,抑制  $\beta$ -连环蛋白的降解。CKI $\epsilon$  的作用部位可能在 Dvl 的 DEP 或 PDZ 区域,在 GSK-3 $\beta$  的上游起作用,实验证实它可直接结合 Dvl 的 PDZ 区。当 Wnt 信号启动后,CKI $\epsilon$  可磷酸化 Dvl,并导致 FRAT 替代 Dvl,FRAT 的替代和定位可抑制已与轴蛋白结合的 GSK-3 $\beta$  的作用,从而影响  $\beta$ -连环蛋白的降解。Tcf-3 也是 CKI $\epsilon$  的磷酸化目标,磷酸化后的 Tcf-3 与  $\beta$ -连环蛋白的亲和力增加,与 APC 和轴蛋白竞争结合  $\beta$ -连环蛋白,最终导致基因的异常转录。CKI 还能通过降解  $\beta$ -连环蛋白降解复合物成员(CKI $\epsilon$ ),磷酸化 LRP6 (CKI $\gamma$ )起到正性调节的作用。

CK2 也是该信号通路的一种正调节蛋白,存在于  $\beta$ -连环蛋白复合物中,当 Wnt 信号存在时被活化,具体的调控机制还不是很清楚。使用 CK2 抑制物能够减少 Fzd 的活化和 Lef/Tcf 的转录活性,并且 CK2 参与了异源三聚体 G 蛋白和 Dvl 的下游反应<sup>[25]</sup>。总的来说,CK2 加强  $\beta$ -连环蛋白的作用:加强 LEF-1 的转录活性,促进 CK2 和  $\beta$ -连环蛋白与抑制物 TLE1 结合或离开靶基因的交替过程。有意思的是,在体外,CK2 能够直接磷酸化 hLEF-1,刺激  $\beta$ -连环蛋白与之结合和活化,这样一来, hLEF-1 与  $\beta$ -连环蛋白的亲合性增加,与 TLE1 的亲合性减少,促进目标基因的转录。因此说 CK2 是体内 Wnt 信号增强复合物募集和循环所必需<sup>[26]</sup>。

### 2.8 GSK-3 $\beta$ 促进 $\beta$ -连环蛋白的降解, GSK-3 $\beta$ 负性调节物则间接抑制 $\beta$ -连环蛋白的降解

GSK-3 $\beta$  是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在 Wnt

信号途径失活时,将磷酸基团加到  $\beta$ -连环蛋白的 4 个 N 端位点,为  $\beta$ -TrCP 提供了很好的结合位点,促进其降解。因此,当 GSK-3 $\beta$  失活时,  $\beta$ -连环蛋白水平将会发生明显异常。如在肝细胞肝癌标本中发现磷酸化的 GSK-3 $\beta$  水平增高,与  $\beta$ -连环蛋白的积聚有关,进一步研究发现乙型肝炎病毒 x 基因编码的蛋白质(HBX)能活化 Erk,后者使 GSK-3 $\beta$  失活,从而上调  $\beta$ -连环蛋白水平。很少有疾病报道说是因为 GSK-3 $\beta$  基因突变导致 Wnt 信号通路异常,那是因为只有当 GSK-3 $\beta$  基因中三个或者四个等位基因发生缺失时才发生异常<sup>[27]</sup>。但是还是存在相关蛋白的突变,比如 267 位缬氨酸突变成甘氨酸后(V267G),GSK-3 $\beta$  就不能有效的与轴蛋白结合,这是因为疏水性相互作用对于两物质的结合是非常必要的,而突变改变了这种作用<sup>[28]</sup>,导致两物质不能有效发挥降解  $\beta$ -连环蛋白的作用。

FRAT 是 Wnt 通路的有效激活剂,它能够与 GSK-3 结合,从而抑制  $\beta$ -连环蛋白的磷酸化和随后的降解,促进下游靶基因的激活。非洲蟾蜍在轴胚形成中,FRAT 的同系物 GBP 是 Wnt 通路的重要组成部分,因此猜想在高等动物中 FRAT 的功能也是如此。因此曾经有人提出 FRAT 可能是 Wnt 信号通路中被遗漏的重要元件,用来传递 Dvl 到 GSK-3 信号。但是后来在小鼠的实验中 FRAT 又被重新评估,因为除去了 FRAT 家族成员的细胞中,  $\beta$ -连环蛋白/TCF 信号并没有表现出明显的异常<sup>[29]</sup>,但这不影响 FRAT 也是 Wnt 通路的正性调节子这一事实。

GSK-3 $\beta$  反应蛋白(GSKIP),这是一种新发现的蛋白质,它的羧基末端的 25 个氨基酸与轴蛋白上的 GID 相似,能够与 GSK-3 $\beta$  结合。通过体外激酶测定发现, GSKIP 是 GSK-3 $\beta$  很好的底物,在各种模型中无论是羧基末端的框架还是整个蛋白都能封闭 GSK-3 $\beta$  对其他底物的磷酸化,实验也证明了 GSKIP 的过表达能够引起  $\beta$ -连环蛋白在胞质和核内的积聚。更有意思的是,转染 GSKIP 的细胞表现出 Tcf-4 的转录活性增强<sup>[30]</sup>。因此, GSKIP 是 GSK-3 $\beta$  的一种负性调节子,也是 Wnt 通路的正性调节子。

### 2.9 $\beta$ -连环蛋白自身基因突变及结构改变影响其正常功能的发挥

肿瘤细胞中常有  $\beta$ -连环蛋白基因第三外显子某些密码子(如 Ser33、Ser37、Ser45、Thr41 等)的碱基发生替换突变或第三外显子部分片段的缺失,导致潜在的丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点的消失。这些



密码子编码区域构成的 $\beta$ -连环蛋白的 $\text{NH}_2$ 末端是GSK-3 $\beta$ 结合位点,其缺失或突变使 $\beta$ -连环蛋白不能与GSK-3 $\beta$ 结合形成复合物,从而不能被其磷酸化, $\beta$ -连环蛋白不会被有效降解;另外, $\beta$ -连环蛋白翻译后被一种钙依赖的蛋白酶calpain水解成为缺失N端132个氨基酸的75 kDa片段<sup>[31]</sup>,这两种变异的 $\beta$ -连环蛋白都能逃脱降解,在胞浆内积累,但仍保留与Tcf结合后的转录活性,诱导下游许多基因的异常转录。

肿瘤细胞中 $\beta$ -连环蛋白基因突变也可能使 $\beta$ -连环蛋白与E-钙黏蛋白结合位点结构异常改变,不能形成E-钙黏蛋白- $\beta$ -连环蛋白复合体,导致细胞黏附功能降低或丧失,这是肿瘤细胞易发生浸润和转移重要原因。 $\beta$ -连环蛋白基因多态性也与疾病有相关性。本实验室<sup>[32]</sup>在Wnt通路相关基因多态性与胃癌发病风险的病例对照研究中发现, $\beta$ -连环蛋白基因rs1880481位点杂合基因型在男性对照组的频率显著高于男性胃癌组,提示该位点杂合基因型低下或者AA基因型升高可能导致胃癌发生的风险性增加。

## 2.10 其他因素对 $\beta$ -连环蛋白的不同影响作用

**2.10.1  $\beta$ -TrCP 负调节 $\beta$ -连环蛋白** 在多种真核生物中 $\beta$ -TrCP由基因slimb编码,属于转录素家族,主要对于细胞骨架装配与细胞内的信号转导起关键作用。在脊椎类动物中,它除了编码氨基端和羧基端的外显子不同外,其氨基酸序列、大小、结构等在物种之间高度保守。作为蛋白酶体降解途径中重要的泛素连接酶, $\beta$ -TrCP对 $\beta$ -连环蛋白的影响作用是显而易见的, $\beta$ -TrCP的突变可以导致 $\beta$ -连环蛋白的积聚,最终诱导胃癌等肿瘤的发生<sup>[33]</sup>。换个角度说,在肿瘤细胞如中, $\beta$ -TrCP能够独立于 $\beta$ -连环蛋白突变呈现高表达,因此有人把 $\beta$ -TrCP归为Wnt靶基因。何为因何为果,或者互为因果,这还待进一步查证,但是可以肯定的是Wnt通路激活时 $\beta$ -TrCP处于高水平<sup>[15]</sup>。

**2.10.2 蛋白酶活化受体1 (protease-activated receptor 1, PAR-1)正调节 $\beta$ -连环蛋白** 这也是近年来发现的能够使 $\beta$ -连环蛋白稳定性增加的一种物质。通过转基因使PAR-1组织靶向过量表达,发现 $\beta$ -连环蛋白出现核内分布,而野生型却没有这样的变化。PAR-1与 $\beta$ -连环蛋白之间存在某种联系,并且与肿瘤的发生发展也息息相关,但是具体机制还不是很清楚。有实验表明可能是通过促进Wnt蛋白分泌而实现的,因为加强Wnt蛋白拮抗剂SFRP5的表达能够抑制PAR-1介导的 $\beta$ -连环蛋白过稳定,同时在上皮

细胞瘤的细胞株中应用SFRP5或者SFRP2都能有效抑制 $\beta$ -连环蛋白的核内聚集<sup>[34]</sup>。这些都说明了PAR-1在调节Wnt信号通路中的重要作用,并且为肿瘤研究提供了新的靶点。

**2.10.3 p53 抑癌基因负调节 $\beta$ -连环蛋白** 研究显示p53抑癌基因活化后可以通过激活Siah-1基因,继而激活SIP、Sgt1,最终活化Skp1、Cullin及Fbox的SCF E3泛素蛋白连接酶而加速 $\beta$ -连环蛋白的降解,因此,在许多肿瘤中p53一致被认为能下调 $\beta$ -连环蛋白信号,抑制Wnt信号途径。目前通过对前列腺癌的研究表明肿瘤细胞中p53基因的缺失或突变可以反馈引起 $\beta$ -连环蛋白的异常积聚:野生型,249丝氨酸结构突变型,273组氨酸DNA触点突变型的p53过表达都能通过降解 $\beta$ -连环蛋白抑制其介导的Tcf转录活性,然而175组氨酸结构突变型,四聚体结构域的C末端缺失突变型p53却失去了这样的功能<sup>[35]</sup>。到目前为止,p53干扰 $\beta$ -连环蛋白信号的具体机制还不是很清楚,但可以肯定的是与p53的转录活性无关,并且p53羧基端可能通过反式阻抑方式在下调 $\beta$ -连环蛋白介导的Tcf转录活性时发挥重要作用。

**2.10.4 Hedgehog 途径抑制Wnt信号通路** 在上皮细胞分化过程中Hedgehog与Wnt信号途径之间有紧密联系,现在研究表明,Hedgehog途径能通过各种物质抑制Wnt信号途径,但具体机制还不是很清楚。通过对分泌型Wnt蛋白抑制物基因启动子区的研究发现,Hedgehog途径反式激活因子Gli结合位点在SFRP1的启动子区,SFRP1很有可能就是Hedgehog-Gli途径的靶蛋白,从而起到能抑制Wnt信号途径的作用<sup>[36]</sup>。又如SUFU基因,在Hedgehog途径中起负调控作用,在Wnt通路中又有调节 $\beta$ -连环蛋白活性作用。Meng等<sup>[37]</sup>在实验中第一次证实SUFU在Wnt途径中的作用:SUFU与 $\beta$ -连环蛋白结合,从而抑制了 $\beta$ -连环蛋白与Tcf/Lef结合,未能启动下游靶基因的转录,抑制了肿瘤的生成。而后又有实验证实SUFU突变能导致SHH和Wnt两条信号途径激活。SUFU突变中心是SUFU2Dex8(由促结缔增生型髓母细胞瘤克隆而来并有10P染色体缺失),SUFU突变失去了将 $\beta$ -连环蛋白运出胞核的能力,但是仍可与 $\beta$ -连环蛋白结合,从而阻止 $\beta$ -连环蛋白/Tcf介导的转录活性。

**2.10.5  $\beta$ -arrestin 促进Wnt信号转导**  $\beta$ -arrestin是一种多功能的鹰架蛋白,如前文所述,它能够与Dvl的PDZ区N末端结合,从而影响CKI的磷酸化。此

外它还能够与轴蛋白结合, 与 Dvl 一起形成三聚体复合物, 参与信号传递。缺少  $\beta$ -arrestin 的小鼠胚胎成纤维细胞在 Wnt-3a 作用时发生 LRP6 磷酸化, Dvl 活化减少,  $\beta$ -连环蛋白的信号传递受抑制。因此有学者认为  $\beta$ -arrestin 与其他元件一样是 Wnt 信号通路的重要组成部分, 结合 Dvl 和轴蛋白, 开拓了信号途径, 并为与其他  $\beta$ -arrestin 参与的信号通路发生串扰提供了可能<sup>[16]</sup>。

2.10.6 其他还有很多分子直接或者间接影响着  $\beta$ -连环蛋白 如 Easwavan 等<sup>[38]</sup>发现视黄酸(retinoic acid)可以减少  $\beta$ -连环蛋白-Tcf/Lef 复合体的活性, 并影响由 Wnt 途径控制的动物发育, 细胞分化和癌症形成。Nemo-like kinase (NLK)能够磷酸化 Tcf/Lef 蛋白, 抑制  $\beta$ -连环蛋白/Tcf 复合体与 DNA 的结合, 从而抑制下游靶基因的表达<sup>[39]</sup>。细胞周期蛋白依赖的激酶-2 (CDK-2)与细胞周期蛋白 A/E 结合后, 可通过进一步与  $\beta$ -连环蛋白结合, 促进其 Ser33/37、Thr41 和 Ser45 磷酸化以及  $\beta$ -TrCP 介导的蛋白酶体降解, 并且 CDK-细胞周期蛋白 E 促进 G<sub>1</sub> 期  $\beta$ -连环蛋白迅速降解, 表明 CDK-2 可能在细胞周期中调节  $\beta$ -连环蛋白水平。最近又在肾母细胞瘤中发现一种突变基因编码的蛋白质 WTX, 能够与  $\beta$ -连环蛋白、轴蛋白 1、 $\beta$ -TrCP2 和 APC 形成复合物, 从而促进  $\beta$ -连环蛋白的泛素化和进一步的降解, 该基因被认为是抑癌基因<sup>[40]</sup>。

### 3 展望

Wnt 通路是一条既保守而又重要的信号转导通路, 呈网状的信号传递方式, 和其他细胞内信号传递过程互相交叉, 构成了纷繁复杂的调控体系。就目前的研究现状而言, 关于信号通路之间的交叉使得细胞内的信号传递的过程已形成了一个整体的框架, 其中许多交叉信号都不约而同的指向了  $\beta$ -连环蛋白。因此, 在整体把握 Wnt 信号通路的基础上, 进一步从多环节、多途径研究影响  $\beta$ -连环蛋白变化的各个因素是很有必要的, 这也为肿瘤治疗药物的研发提供了新的思路和潜在的靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Bienz M, Clevers H. Armadillo/ $\beta$ -catenin signals in the nucleus—proof beyond a reasonable doubt, *Nat Cell Biol*, 2003, 5(3): 179-182
- [2] Stadel R, Basler K. Dissecting nuclear Wingless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins, *Mech Dev*, 2005, 122(11): 1171-1182
- [3] Rohde F, Rimkus C, Friederichs J, et al. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer, *Int J Cancer*, 2007, 121(8): 1717-1723
- [4] Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications, *Exp Mol Med*, 2006, 38(1): 1-10
- [5] Kirikoshi H, Katoh M. Expression and regulation of WNT10B in human cancer: up-regulation of WNT10B in MCF-7 cells by estradiol and down-regulation of WNT10B in NT2 cells by retinoic acid, *Int J Mol Med*, 2002, 10(4): 507-511
- [6] Bernard P, Fleming A, Lacombe A, et al. Wnt4 inhibits  $\beta$ -catenin /TCF signaling by redirecting  $\beta$ -catenin to the cell membrane, *Biol Cell*, 2008, 100(3): 167-177
- [7] Tamai K, Zeng X, Liu C, et al. A mechanism for Wnt coreceptor activation, *Mol Cell*, 2004, 13(1): 149-154
- [8] Lin YC, You L, Xu Z, et al. Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(2): 635-640
- [9] Horvath LG, Lelliott JE, Kench JG, et al. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer, *Prostate*, 2007, 67(10): 1081-1090
- [10] Peäina-Slaus N, Kljaiä M, Nikuseva-Martiä T. Loss of heterozygosity of APC and CDH1 genes in laryngeal squamous cell carcinoma, *Pathol Res Pract*, 2005, 201(8-9): 557-563
- [11] Ko H, Kim HS, Kim NH, et al. Nuclear localization signals of the E-cadherin transcriptional repressor Snail, *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1-3): 66-72
- [12] Schwarz-Romond T, Metcalfe C, Bienz M. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies, *J Cell Sci*, 2007, 120(14): 2402-2412
- [13] Okino K, Nagai H, Hatta M, et al. Up-regulation and over production of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma, *Oncol Rep*, 2003, 10(5): 1219-1223
- [14] Waldrop S, Chan CC, Cagatay T, et al. An unconventional nuclear localization motif is crucial for function of the *Drosophila* Wnt/wingless antagonist naked cuticle, *Genetics*, 2006, 174(1): 331-348
- [15] Koch A, Waha A, Hartmann W, et al. Elevated expression of Wnt antagonists is a common event in hepatoblastomas, *Clin Cancer Res*, 2005, 11(12): 4295-4304
- [16] Bryja V, Gradl D, Schambony A, et al.  $\beta$ -arrestin is a necessary component of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling *in vitro* and *in vivo*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(16): 6690-6695
- [17] Ding VW, Lin LP, Chiang AL, et al. Activation of p53 by Dishevelled independent of Wnt or planar polarity pathways, *J Mol Med*, 2007, 85(11): 1281-1289
- [18] Sulekoviä Z, Ballhausen WG. A novel coding exon of the human adenomatous polyposis coli gene, *Hum Genet*, 1995, 96(4): 469-471
- [19] Nikuseva-Martiä T, Beros V, Peäina-Slaus N, et al. Genetic changes of CDH1, APC, and CTNBN1 found in human brain tumors, *Pathol Res Pract*, 2007, 203(11): 779-787
- [20] Brookes MJ, Boulton J, Roberts K, et al. A role for iron in Wnt signaling, *Oncogene*, 2008, 27(7): 966-975
- [21] Hamada F, Bienz M. The APC tumor suppressor binds to



- C-terminal binding protein to divert nuclear  $\beta$ -catenin from TCF, *Dev Cell*, 2004, 7(5): 677-685
- [22] Wang FW, Wen L, Zhu SW, *et al.* Mechanism of wnt signaling pathway regulation by a truncated mutant of axin2 in colorectal cancer, *Ai Zheng*, 2007, 26(10): 1041-1046
- [23] Jiang Y, Prunier C, Howe PH. The inhibitory effects of Disabled-2 (Dab2) on Wnt signaling are mediated through Axin, *Oncogene*, 2008, 27(13): 1865-1875
- [24] Xu HT, Wei Q, Liu Y, *et al.* Overexpression of axin downregulates TCF-4 and inhibits the development of lung cancer, *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(11): 3251-3259
- [25] Gao Y, Wang HY. Casein kinase 2 is activated and essential for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, *J Biol Chem*, 2006, 281(27): 18394-18400
- [26] Wang S, Jones KA. CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes *in vivo*, *Curr Biol*, 2006, 16(22): 2239-2244
- [27] Doble BW, Patel S, Wood GA, *et al.* Functional redundancy of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines, *Dev Cell*, 2007, 12(6): 957-971
- [28] Zhang N, Jiang Y, Zou J, *et al.* Insights into unbinding mechanisms upon two mutations investigated by molecular dynamics study of GSK3 $\beta$ -axin complex: role of packing hydrophobic residues, *Proteins*, 2007, 67(4): 941-949
- [29] van Amerongen R, Nawijn M, Franca-Koh J, *et al.* Frat is dispensable for canonical Wnt signaling in mammals, *Genes Dev*, 2005, 19(4): 425-430
- [30] Chou HY, Howng SL, Cheng TS, *et al.* GSKIP is homologous to the Axin GSK3 $\beta$  interaction domain and functions as a negative regulator of GSK3 $\beta$ , *Biochemistry*, 2006, 45(38): 11379-11389
- [31] Rios-Doria J, Kuefer R, Ethier SP, *et al.* Cleavage of  $\beta$ -catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells, *Cancer Res*, 2004, 64(20): 7237-7240
- [32] 郑鸿平, 周雯, 徐立红, 等. Wnt 通路相关基因多态性与胃癌发病风险的病例对照研究, *中华医学遗传学*, 2006, 23(6): 647-651
- [33] Kim CJ, Song JH, Cho YG, *et al.* Somatic mutations of the  $\beta$ -TrCP gene in gastric cancer, *APMIS*, 2007, 115(2): 127-133
- [34] Yin YJ, Katz V, Salah Z, *et al.* Mammary gland tissue targeted overexpression of human protease-activated receptor 1 reveals a novel link to  $\beta$ -catenin stabilization, *Cancer Res*, 2006, 66(10): 5224-5233
- [35] Prowald A, Cronauer MV, von Klot C, *et al.* Modulation of  $\beta$ -catenin-mediated TCF-signalling in prostate cancer cell lines by wild-type and mutant p53, *Prostate*, 2007, 67(16): 1751-1760
- [36] Katoh Y, Katoh M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target, *Int J Mol Med*, 2006, 17(1): 171-175
- [37] Meng X, Poon R, Zhang X, *et al.* Suppressor of fused negatively regulates  $\beta$ -catenin signaling, *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 40113-40119
- [38] Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin, *et al.* Cross regulation of  $\beta$ -catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways, *Curr Biol*, 1999, 9(23): 1415-1418
- [39] Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, *et al.* The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between  $\beta$ -catenin and transcription factor TCF, *Nature*, 1999, 399(6738): 798-802
- [40] Major MB, Camp ND, Berndt JD, *et al.* Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/ $\beta$ -catenin signaling, *Science*, 2007, 316(5827): 1043-1046

## Influential Factors of $\beta$ -catenin in the Classic Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway

Qun Zheng, Li-Hong Xu\*

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway plays an important role in the processes of growth and development of vertebrates. The abnormal activation of the pathway could result from the abnormal change or expression of relevant moleculars, which affects a series of physiological processes, such as the embryonic development and energy metabolism, and even leads to tumorigenesis. However, the alterations of content, distribution and function of  $\beta$ -catenin are the mark of the abnormalities of Wnt pathway. This paper expounds the influential factors of  $\beta$ -catenin, which should enhance the understanding of the relationship between the pathway and the tumor.

**Key words** Wnt; signaling pathway;  $\beta$ -catenin

Received: May 23, 2008 Accepted: November 25, 2008

This work was supported by the National Foundation for Training Talents in Basic Science (No.J0730856) and the Science Base of Basic Medicine Foundation of Zhejiang University

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn