七、结 语

内吞蛋白由于其特殊的蛋白质结构，C端的SH3结构域可以与许多蛋白质相互作用，也可以参与细胞内的信号转导，目前已知的生物学功能主要涉及神经介质回收以及生物膜运输作用，很多功能尚不清楚，随着进一步的研究，将会发现更多作用。

参 考 文 献

[1] So, C. W., Caldas, C., Liu, M. M. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **94**:2563－2568.

[2] Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P., 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**:40424－40430.

[3] Modregger, J., Schmidt, A. A., Ritter, B. et al., 2003, *J. Biol. Chem.*, **278**:4160－4167.

[4] So, C. W., So, C. K., Cheung, N. et al., 2000, *Leukemia*, **14**:594－601.

[5] So, C. W., Sham, M. H., Chew, S. L. et al., 2000, *Biochem. J.*, **348** Pt 2:447－458.

[6] Simpson, F., Hussain, N. K., Qualmann, B. et al., 1999, *Nat. Cell Biol.*, **1**:119－124.

[7] Gad, H., Ringstad, N., Low, P. et al., 2000, *Neuron*, **27**:301－312.

[8] Tang, Y., Hu, L. A., Miller, W. E. et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **96**:12559－12564.

[9] Howard, L., Nelson, K. K., Maciewicz, R. A. et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**:31693－31699.

[10] Reutens, A. T. and Begley, C. G., 2002, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**:1173－1177.

[11] Modregger, J., Schmidt, A. A., Ritter, B. et al., 2003, *J. Biol. Chem.*, 278(6):4160－4167.

[12] Wiejak, J. and Wyroba, E., 2002, *Cell Mol. Biol. Lett.*, **7**:1073－1080.

[13] Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I. et al., 2002, *Nature*, **416**:183－187.

[14] Petrelli, A., Gilestro, G. F., Lanzardo, S. et al., 2002, *Nature*, **416**:187－190.

[15] Ramjaun, A. R., Angers, A., Legendre-Guillemin, V. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**:28913－28919.

[16] Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C. et al., 1999, *Nature*, **401**:133－141.

[17] Guichet, A., Wucherpfennig, T., Dudu, V. et al., 2002, *EMBO J.*, **21**:1661－1672.

[18] Barr, F. A. and Shorter, J., 2000, *Curr. Biol.*, **10**: R141－R144.

[19] Chatellard-Causse, C., Blot, B., Cristina, N. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, **277**:29108－29115.

Wnt信号转导途径及其与结肠癌的关联*

孔 民 白 阳 王敬泽**

（中国科学院动物研究所生物膜与膜工程国家重点实验室 北京 100080）

摘 要 Wnt信号转导途径参与细胞多种复杂的生化反应过程。目前认为Wnt通路的组成主要包括：细胞外因子(Wnt)、跨膜受体Frizzled(Frz)、β-连环蛋白(β-catenin)及T细胞趋化因子(T cell factor, TCF)等一系列蛋白。细胞外因子Wnt激活的信号通过胞质蛋白的相互作用，能够使胞浆内β-连环蛋白保持稳定并累积，β-连环蛋白进而入核与T细胞趋化因子联合作用激活靶基因(多数是参与细胞增殖与凋亡的基因，如：Cyclin D1、c-myc等)的转录，而且在Wnt信号途径的不同阶段有各种蛋白因子进行调控；另外，Wnt胞内信号途径的异常激活与人类各种癌症的产生有联系，尤其是结肠癌变。大多数结肠癌患者的转化细胞存在APC(adenomatous polyposis coli)基因缺失突变或失活，导致β-连环蛋白在核内的累积，并能影响相关基因转录，被认为是结肠癌发生的关键因素之一。由于该信号转导途径具有如此重要的作用，因此受到研究者越来越多的重视。

Wnt信号转导途径与细胞的发育分化密切相关，而且在许多肿瘤的发生中起重要作用，是近年来国际前沿研究的热点之一。早期对Wnt信号途径的探索主要集中在致癌病毒和果蝇(*Drosophila*)发育机制的研究，Nusse用小鼠乳头瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)诱导小鼠产生乳腺癌，并且发现MMTV常整合于宿主染色体的特定位置，激活该位点基因Wnt-1[1]，后来发现此基因与果蝇胚胎发育基因Wingless(Wg)同源，Wg基因突变将导致成年果蝇无翅；Wnt-1是Wnt基因家族成员之一(已知哺乳动物中Wnt成员至少16个)[2]。

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：30171071)。

** 通讯作者。E-mail: wangjz@panda.ioz.ac.cn

Wnt信号转导途径即由Wnt基因编码产物所介导的信号通路，本文将重点讨论该通路的组成和调控及其与结肠癌的关联。

从低等生物果蝇(*Drosophila*)直至高等哺乳动物，Wnt信号转导途径是高度保守的[3]。对于该途径的研究一直有新的进展，细胞内Wnt信号通路主要有：典型的Wnt信号转导途径，即β-连环蛋白途径，能够激活细胞核内靶基因的表达；以及非典型的Wnt/Ca^{2+}途径[4]。

一、Wnt信号转导途径简介

Wnt蛋白能够以自分泌或旁分泌两种不同形式作为细胞生长及细胞分化信号，结合到跨膜受体Frz(Frizzled，Frz)，Frz受体由半胱氨酸富集结构域(cysteine rich domain，CRD)的胞外区、七次跨膜区和胞质内羧基端三个部分组成，并且能与异源三聚体G蛋白偶联[5]。低密度脂蛋白的受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor related protein，LRP)是一类在脂代谢中具有重要作用的蛋白家族，其成员LRP5/6存在于哺乳动物中，与果蝇(*Drosophila*)的Arrow具有高度同源性[6]；LRP5/6起着Wnt信号关键的辅助受体作用，参与依赖β-连环蛋白的典型Wnt信号转导途径[7]。

1．典型的Wnt信号转导途径

在细胞内，典型的Wnt信号转导途径可促使胞浆内游离β-连环蛋白稳定。β-连环蛋白不仅对细胞粘连起关键作用，而且是胞内Wnt信号通路重要的传递信使。绝大多数β-连环蛋白结合于质膜，介导钙粘素依赖的细胞间粘连[8]；小部分β-连环蛋白存在于胞质与核内，由Wnt信号调节。该信号转导途径详见图1[9]。

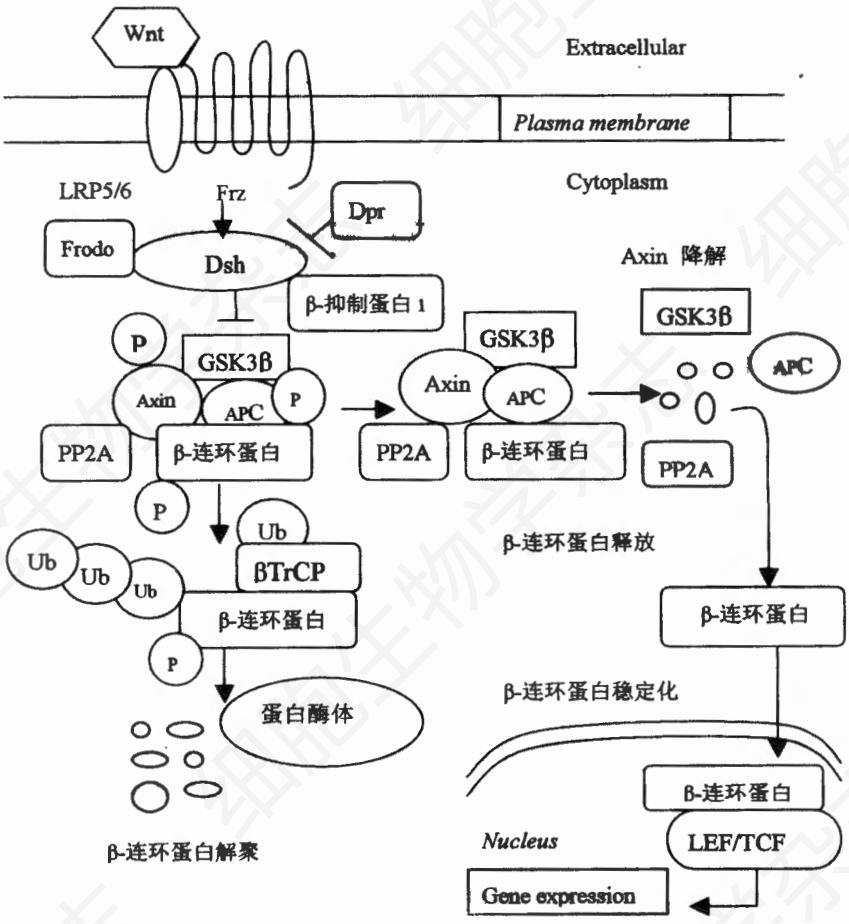

图1 典型Wnt信号转导途径[9]

当受体Frz未结合Wnt因子时，游离的β-连环蛋白结合Axin复合体，被磷酸化、泛素化后逐步降解，使胞浆中的β-连环蛋白含量维持在最低水平；有Wnt信号刺激细胞时，Dsh蛋白抑制Axin活性，去磷酸化的β-连环蛋白从Axin复合体解离，在胞浆中富积；β-连环蛋白被转运至核内，结合LEF/TCF并活化，共同激活靶基因的转录。

在无 Wnt 因子的情况下，胞浆中游离的 β-连环蛋白可被酪氨酸激酶 Iα(CkIα)和(或)CkIε 在 45 位 Ser 磷酸化，然后由糖原合成酶 3β(GSK3β)磷酸化第 41，37 和 33 位的 Ser/Thr 残基；后两个氨基酸残基的磷酸化启动了由蛋白 βTrCP(能特异性结合磷酸化的蛋白，并且是泛素连接酶复合体 SCF 的组成成分)介导的 β-连环蛋白的泛素化作用(ubiquitination)和在蛋白酶体内的降解。

β-连环蛋白的磷酸化发生在多蛋白复合体中，此复合体包含有支架蛋白(scaffold protein)Axin 或其同系物 Conduction、抑癌基因 APC 的产物和胞质蛋白 Diversin(可连接 CKIε 与多蛋白复合体)。Axin 能构成同源二聚体或与另外的相关蛋白 Conduction/Axin2 组成异源三聚体，协助 GSK3β 磷酸化 β-连环蛋白，抑制 Wnt 信号的活化；野生型 Axin 是抑癌基因，在正常细胞中下调 Wnt 信号。

当细胞受到 Wnt 因子的激活作用后，细胞质蛋白 Dishevelled (Dsh)重新结合到膜上，通过恢复 GSK3β 结合蛋白 GBP(GSK3 binding protein)或哺乳类中同源蛋白 Frat-1 的活性来抑制 β-连环蛋白降解；GBP/Frat-1 能从支架蛋白 Axin 上将 GSK3β 替代，抑制 GSK3β 磷酸化 41、37 和 33 位 Ser/Thr 残基，进而阻止 β-连环蛋白的降解。Frodo 蛋白和 β-抑制蛋白 1(β-arrestin1)能与 Dsh 蛋白协同作用，而蛋白 Dapper (Dpr)则是 Dsh 的拮抗因子[10]。

稳定的 β-连环蛋白进入核内，与淋巴细胞强化因子 LEF(lymphoid enhancer factor)/ T 细胞趋化因子 TCF(T cell factor)结合，共同激活 Wnt 靶基因(包括 Smad4、Tsh、XSox17、Cyclin D1、c-myc)的转录；转录活性可由 β-连环蛋白上结合的组蛋白乙酰基转移酶、染色质重组 SWI/SNF 复合物和连接有 Bc19 的蛋白 pygopus(Pyg)之间的相互作用进行调控[11]。

2. Wnt/Ca^{2+} 途径(见图 2[12])

Wnt/Ca^{2+} 途径可诱导细胞内源 Ca^{2+} 的释放。细胞外 Wnt 配体结合受体 Frz，激活与 Frz 受体偶联的异源三聚体 G 蛋白(包含 G_α 与 $G_{\beta/\gamma}$亚基)，G_α 与 $G_{\beta/\gamma}$解离。G_α 活化磷酸二酯酶(PDE)，后者导致胞浆内 cGMP 浓度下降；$G_{\beta/\gamma}$亚基激活 PLC，PLC 水解 PIP_2 为 IP_3 和二酰基甘油 DAG.，IP_3 催化细胞内源 Ca^{2+} 的释放，并激活依赖 Ca^{2+}/钙调蛋白的蛋白激酶 II(CamkII)与 Ca^{2+}/钙调蛋白敏感的蛋白磷

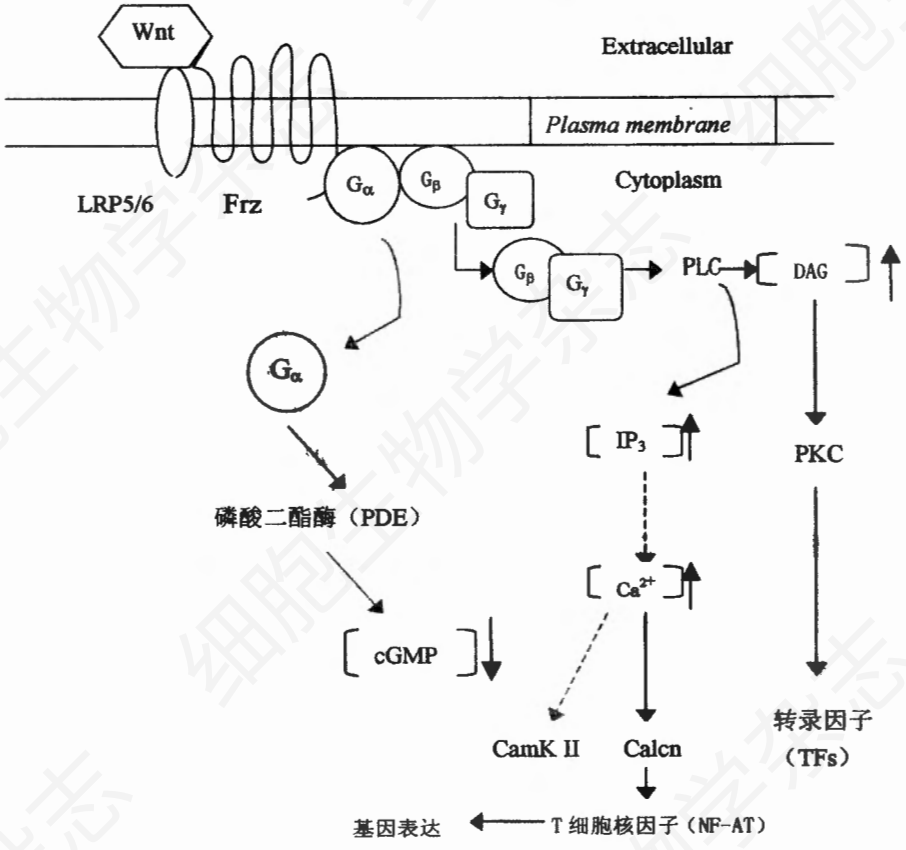

图 2 Wnt/Ca^{2+} 信号途径[12]

酸酶 calcineurin(Calcn),而 DAG 活化的产物 PKC 与 Calcn 直接或间接影响各种转录因子的活性;例如,Calcn 能够激活 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NF-AT)。在非洲蟾蜍(*Xenopus*)胚胎里,NF-AT 转录因子既是 Calcn 的底物又在背侧脊椎构建的过程中发挥作用。

二、Wnt 信号转导途径的调控机制

几种蛋白质分子在通路的不同阶段调节 Wnt 信号。可溶性分泌蛋白 Cerberus (Cer)和 FrzB(一种 Wnt 蛋白的竞争性拮抗物)能够与 Wnt 结合,抑制 Wnt 和跨膜受体 Frz 的相互作用。Dickkopf (Dkk)蛋白通过阻断 LRP5/6 辅助受体通道从而抑制 Wnt 信号,并且与 Kremen 因子联合诱导 LRP5/6 的胞吞作用。当 β-连环蛋白未进入核内时,TCF 通过结合 Groucho 因子抑制转录过程,同时核内的 ICAT 蛋白与 β-连环蛋白的相互作用负调控 Wnt 信号途径[7]。

Wnt 信号途径可能也会受到钙黏素(Cadherins)的影响。β-连环蛋白有一个由 12 个称为"臂重复(arm-repeats)"的核心区域,并且这个区域结合钙黏素和 TCF 因子之间是相互排斥的,即此区域不能同时与钙黏素和 TCF 因子结合。钙黏素的过量表达导致胞浆内 β-连环蛋白的降解,能够干扰 Wnt 信号;反之,Wnt 信号会通过调控 β-连环蛋白的含量影响钙黏素依赖的细胞粘连[13]。

整合蛋白连接激酶(ILK)可将整合蛋白信号和 Wnt 信号通路联系起来。在上皮细胞中 ILK 如果过量表达,就会负调节 E-钙黏素的含量和诱导 β-连环蛋白的核内转运,激活依赖 β-连环蛋白/TCF 的基因转录。ILK 能阻抑 GSK3β 的活性,但不大可能改变 β-连环蛋白的含量[14]。与 ILK 的作用类似,癌基因 Ras 能促进 E-钙黏素的降解,并促使 β-连环蛋白向核内的转移;这个过程可能涉及 β-连环蛋白与 1,4,5-三磷酸肌醇激酶之间的相互作用[15]。

三、Wnt 信号途径在结肠癌变过程中所起的作用

对遗传性和散发性结肠癌的研究显示,在绝大多数病例中原发突变发生于单一的信号转导通路,即 Wnt 信号途径在此类癌症病因学研究方面扮演着具有核心作用的"角色"。

结直肠肿瘤属于最常见的人类肿瘤之列。西方人结肠癌的发病率约为 5%,其中有一小部分患者是由于遗传因素。此类癌症中最典型也较为少见的是家族性腺瘤样息肉(familial adenomatous polyposis,FAP),患有 FAP 的病人青年时期在结肠上皮组织会长有大量的良性腺瘤样息肉,在绝大多数情况下,这些良性腺瘤样息肉会发展成具有侵袭性并最终成为能转移的恶性肿瘤[16]。

早在 1991 年,由 FAP 基因位点编码的结肠癌抑制因子 APC 已经通过分子克隆被鉴定[17]。有关资料证明,大约有 85% 的散发性和遗传性结肠癌患者的 APC 基因丧失功能[18]。具有突变 APC 基因的结肠癌细胞通常有高表达的 β-连环蛋白,而 β-连环蛋白的含量又被外源野生型 APC 负调控[19]。APC 的肿瘤抑制作用是它能恰到好处地调节细胞内 β-连环蛋白的含量[20]。在约 15% 保留野生型 APC 的结肠癌患者中,发现 β-连环蛋白上存在点突变,它的 N 末端四个 Ser/Thr 残基中任何一个都可能发生改变,而这个区域被公认为是糖原合成酶激酶 3β 的作用靶点[21]。这些突变使 β-连环蛋白能抗拒 Axin 复合物的降解破坏作用,导致 β-连环蛋白含量升高并激活 LEF/TCF 依赖的转录作用,从而引起细胞增殖失控及肿瘤生成[22]。此外,最近发现在含有功能完整的 APC、但 DNA 错配修复缺陷的结肠癌细胞中有 Conductin 的突变,Axin 或 Conductin 的突变只影响一个等位基因;突变的 Axin/Conductin 的癌基因效果可能是由于它的某些片段具有一种抗显性等位基因活性的作用,进而抑制 β-连环蛋白降解[20]。

由于结肠肿瘤的逐步恶变,具有了侵袭能力,在基因水平上发生改变;更为重要的是对 TGF-β 信号反应的丧失,继而失去对表皮细胞异常生长的调控[23]。另外,一部分结肠癌患者的癌细胞中出现抑癌基因 DPC4 的缺失,此基因编码人的 Smad4 蛋白,Smad4 蛋白能辅助诱导所有 TGF-β 类似的信号[24];在鼠的 APC 和 Smad4 突变的双杂交体系中能发展成巨大的肠肿瘤,表现出恶性增殖和侵袭性,这些肿瘤都存在 APC 和 Smad4 等位基因的缺失,这表明在小鼠肠道对 TGF-β 信号反应的丧失有可能导致肿瘤细胞恶性和侵袭性的演化。还发现人类晚期结肠癌阶段的 TGF-β 受体发生突变,这与良性肿瘤恶性转化的过程有关[25]。

四、结　　语

综上所述,Wnt 信号转导途径对正常和肿瘤细

胞生长都至关重要。一个关键的作用靶点是β-连环蛋白,以及它与 TCF 共同作用从而导致靶基因转录。最近,发现人类 Weo 与 Pygo 蛋白(Pygopus,是一种核内蛋白,能够与β-连环蛋白组成复合物),两者都参与结肠癌细胞中 TCF 介导的转录作用,能够指导染色质与 TCF 或β-连环蛋白的结合[26]。然而,对 Wnt 信号转导途径的研究有许多问题亟待解决,例如,受体 Frz 传递 Wnt 信号的具体过程如何? Wnt 信号途径怎样与其他信号通路相互联系? 另外,APC 基因在不同生物体内的功能也需进一步研究。

恶性肿瘤是一个多因素作用、多基因参与、经过多个阶段发展的极其复杂的生物学现象。Wnt 信号途径的成员有癌基因,也有抑癌基因,它们通过遗传或非遗传途径在人类许多常见恶性肿瘤发生和发展的过程中起着极其重要的作用。因此,这些基因可以为肿瘤的早期诊断及预防提供良好的分子标记。例如,检测 APC 基因突变可筛查结肠癌的高危人群。另外,可以通过研究 Wnt 信号转导途径中的一些关键蛋白(如:β-连环蛋白,β-连环蛋白/TCF 复合物和 Pygo 蛋白等)和靶基因(如:c-myc,Cyclin D1 等),设计针对某一特定靶点的治疗结肠癌等恶性肿瘤的药物。目前,在这一领域的探索具有非常广阔的前景和深远的意义。

参 考 文 献

[1] Cadigan KM, Nusse R, 1997, *Genes Dev.*, **11**: 3286 - 3305.

[2] Van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, et al., 1997, *Cell.*, **88**:789 - 799.

[3] Hamada F, Murata Y, Nishida A, et al., 1999, *Genes Cells.*, **4**:465 - 474.

[4] Kühl M, Sheldahl LC, Park M, et al., 2000, *Trends Genet.*, **16**:279 - 283.

[5] Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, et al., 2001, *Science.*, **292**: 1718 - 1722.

[6] Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, et al., 2000, *Nature.*, **407**:527 - 530.

[7] Hülsken J, Behrens J, 2002, *J. Cell. Sci.*, **115**:3977 - 3978.

[8] Bienz M, Clevers H, 2000, *Cell.*, **103**:311 - 320.

[9] Moon RT, Bowerman B, Boutros M, 2002, *Science.*, **296**: 1644 - 1646.

[10] Seidensticker MJ, Behrens J, 2000, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1495**:168 - 182.

[11] Hülsken J, Behrens J, 2000, *J. Cell. Sci.*, **113**:3545.

[12] Wang HY, Malbon CC, 2003, *Science.*, **300**: 1529 - 1530.

[13] Hüelsken J, Birchmeier W, 2001, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**:547 - 553.

[14] Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J, et al., 1994, *J. Cell biol.*, **124**:729 - 741.

[15] Dedhar S, Williams B, Hannigan G, et al., 1999, *Trends Cell Biol.*, **9**:319 - 323.

[16] Espada J, Perez-Moreno M, Braga VMM, et al., 1999, *J. Cell boil.*, **146**:967 - 980.

[17] Kishida M, Koyama S, Kishida S, et al., 1999, *Oncogene.*, **18**:979 - 985.

[18] Farr GH, Ferkey DM, Yost C, et al., 2000, *J. Cell boil.*, **148**:691 - 702.

[19] Kinzler KW, Vogelstein B, 1996, *Cell.*, **87**:159 - 170.

[20] VonKries JP, Winbeck G, Asbrand C, et al., 2000, *Nat. Struct. Biol.*, **7**:800 - 807.

[21] Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al., 1997, *Science.*, **275**:1787 - 1790.

[22] Korinek V, Barker N, Morin P, et al., 1997, *Science.*, **275**: 1784 - 1787.

[23] Polyak K, 1996, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1242**: 185 - 199.

[24] Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, et al., 1996, *Nat. Genet.*, **13**:347 - 349.

[25] Grady WM, Rajput A, Myeroff L, et al., 1998, *Cancer Res.*, **58**:3101 - 3104.

[26] Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, et al., 2002, *Nature Cell Biology.*, **4**:367 - 373.

《英汉遗传工程词典》出版

复旦大学遗传学研究所赵寿元教授编写的《英汉遗传工程词典》(第3版)已由复旦大学出版社出版。该书收录了遗传工程、分子遗传学和基因组学的名词逾2000条,每条均有言简意赅的释义,有些还附有简图。同时还收录了基因组学、蛋白质组学等相关网址。该书可作为高等院校师生和研究人员教学和科研的参考工具书。购买请垂询复旦大学出版社发行科,电话:(021)65118853