

cal neoplasia[J]. Environ Mol Mutagen, 2003, 41(1): 69-76.

268-269.

[40] 张南霞, 李运来, 兰义亮, 等. 青岛地区生殖系统疾患与单纯疱疹病毒高危关系的调查[J]. 疾病监测, 2002, 17(7):

(收稿日期: 2011-04-20 修回日期: 2011-05-28)

· 综 述 ·

侧群细胞与卵巢癌干细胞*

赵 玲¹, 邱 倩²综述, 杨 鹰^{1△}审校

(1. 第三军医大学新桥医院妇产科, 重庆 400037; 2. 河南开封市第 155 医院内二科 475000)

关键词: 肿瘤干细胞; 侧群细胞; 卵巢癌

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.034

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)28-2891-04

侧群细胞(side population, sP)是一类具有干细胞特性, 能够排出活性染料 Hoechst33342 而具有弱荧光染色特性的细胞。利用这一特性, sP 细胞可以通过免疫荧光激活细胞法结合流式细胞仪被分选, 目前在人、鼠多种卵巢癌细胞株及患者腹水中成功分选、鉴定、培养, 证实了 sP 细胞的存在, 并证实其与肿瘤干细胞之间存在一致性。基于对 sP 细胞生物学特性的研究, 进一步了解肿瘤干细胞在基因调控、信号转导等方面的研究, 并且为研究卵巢癌干细胞创造有价值的细胞模型。本文就 sP 细胞在卵巢癌干细胞中的研究进展作一综述。

1 侧群细胞的发现

1996 年 Goodell 等^[1]在研究鼠造血干细胞(hemopoiesis stem cells, HSCs)的过程中, 用荧光染料 Hoechst33342 染色小鼠骨髓细胞后, 经流式细胞仪检测, 在流式二维分析点阵图上发现一小群具有弱荧光染色或拒染特性的细胞, 呈彗星状分布在细胞主群的一侧, 他们将这群细胞称为侧群细胞(side population, sP), 也称边群细胞。这类细胞约占骨髓细胞比例 0.05%, 虽然含量很低, 但具有很强的造血干细胞活性, 重建能力是普通骨髓的 1 000 倍。目前, sP 细胞已经成为一种常用的分离造血干/祖细胞的方法。甚至有学者认为 sP 细胞可作为鉴定干细胞的标志之一。继骨髓中分离出 sP 细胞之后, 陆续在人和动物的许多正常组织中发现 sP 细胞的存在, 如乳腺、心脏、肝脏、肺、脑组织、神经组织、小肠、气管、皮肤表皮组织、子宫内膜、子宫平滑肌、羊膜等中, 发现 sP 细胞具有自我更新和多项分化潜能^[2-7]。

随着人们对干细胞的深入了解及恶性肿瘤病因学的研究, 发现肿瘤是一种干细胞疾病。肿瘤干细胞学说的提出^[8], 如何能成功分离和鉴定肿瘤干细胞就显得尤为重要, 形态学上很难区分肿瘤细胞和肿瘤干细胞, 只能在功能学上来鉴定肿瘤干细胞。目前肿瘤干细胞分离方法主要有 3 种: 利用肿瘤干细胞的表面标志、无血清培养悬浮生长细胞球和 sP 细胞分选法。在仍不能完全确定某种特性类型肿瘤干细胞表面特异性膜蛋白标记, sP 细胞分选法仍不失为分选肿瘤干细胞的一种常用方法。随着人们逐步开始研究 sP 细胞的生物学特性, 在多种恶性肿瘤细胞株及肿瘤组织中检测 sP 细胞的存在, 并证实其富含肿瘤干细胞样特性。最近的研究工作在淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、甲状腺癌、喉癌、髓母细胞瘤、子宫内膜腺

癌等^[9-14]细胞系中检测出 sP 细胞的存在, 并在人实体瘤肿瘤组织原代培养(如肝癌^[15]、人神经母细胞瘤^[16])中也检测有 sP 细胞的存在, 并初步研究 sP 细胞含量与肿瘤恶性程度的相关性。在对卵巢癌肿瘤干细胞的研究中, Szotek 等^[17]于 2006 年从鼠卵巢癌细胞系 MOCAR-7 和 4306、人卵巢癌细胞系(IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3)和患者腹水细胞中检测出 sP 细胞, 并培养研究其生物学特性。Hu 等^[18]在卵巢癌 III 期患者腹水、卵巢癌细胞株(OVCAR3, A2780, A2780-CP, HEYA8, OCC1, SKOV3)异体移植免疫缺陷性小鼠培养后分选及鉴定出具有干细胞样特性的 sP 细胞。王伟等^[19]在人卵巢癌细胞系 OVCAR-3 中检测 sP 亚群细胞具有很强的成瘤性和侵袭性, 认为其具有一定的肿瘤干细胞样特性。虽然目前尚不能证明 sP 细胞亚群中百分之百的细胞都具有干细胞特性, 同时并非所有肿瘤干细胞都具有 sP 细胞的特性, 但其的确富集了具有引起并维持肿瘤发生发展能力的极少数干细胞样细胞。目前实验报道卵巢癌肿瘤干细胞的标记的说法不一, 如 CD44、CD117、CD24、CD133 等, 尚无特异的表面标记物, sP 细胞分选法作为肿瘤干细胞分离纯化方法得到广泛应用, 并得到肯定。用 sP 细胞来分选并富集卵巢癌肿瘤干细胞是可行的。因此具有 sP 细胞表型的干细胞将是研究卵巢癌肿瘤干细胞生物学特性的细胞模型, 可以作为研究卵巢癌干细胞的重要资源。

2 卵巢癌 sP 细胞生物学特性的初步鉴定

2.1 sP 的细胞表型 sP 细胞膜表面高表达 ATP 结合盒转运子超家族, 包括多药抵抗蛋白 I(Mdela/1b, mouse; MDR1, human)和乳腺癌耐药蛋白 1(breast cancer resistance protein1, Bcrp1)/ATP 结合转运子 G2(ATP-binding cassette, subfamily G, member 2, ABCG2)。ABCG2 是一种 P-糖蛋白, 属 ATP 结合框转运体(ATP-binding cassette transponer, ABC)家族所介导的肿瘤细胞多重耐药分子家族中的一种, 属跨膜药物转运蛋白, 是抗肿瘤药物难以发挥效应的关键耐药蛋白, 该蛋白质由多药抗性蛋白 1(multidrug resistance protein1, MDR1)基因和多药抗性相关蛋白(multidrugresistance associated protein, MAP)基因编码^[20], 这些转运蛋白可以被维拉帕米抑制, 在实验研究中就发现 sP 细胞具有把染料 Hoechst33342 泵出细胞外的特性与 ABCG2 有关。在对卵巢癌细胞株 A2780 分选 sP 细胞实验中已证实^[21], sP 细胞中 ABCG2 分子的表达量明显

高于 Non-sP 细胞, ABCG2⁺ 细胞对化疗药物的耐受能力则明显高于 ABCG2⁻ 细胞, 且 ABCG2⁺ 细胞加入 ABCG2 单克隆抗体孵育后能使 ABCG2⁻ 细胞对化疗药物的耐受性明显降低, 说明 ABCG2 分子是参与维持卵巢癌细胞多药耐药性的一个主要分子标志。因此推测 ABCG2 分子可能是卵巢 CSC 表面的一个特异性分子标志, ABCG2/Bcrp1 作为确定 sP 细胞的重要表型标记。研究者在采用 sP 细胞分选法来分离肿瘤干细胞时, 流式细胞仪检测到 sP 细胞的存在后, 加入维拉帕米后 sP 细胞比例减少, 表明 ABCG 转运蛋白对维拉帕米敏感, 其活性在维拉帕米存在的情况下有所减弱。并提出将荧光染料 Hoechst33342 外排、维拉帕米敏感、BCRP1+sP 细胞有可能作为一种标记去用于检测和分离卵巢癌干细胞的一种生物学特性。

在 Szotek 等^[17] 通过流式细胞仪对人和鼠卵巢癌细胞系检测中发现 MOVCAR-7 中 sP 细胞高密度表达 c-kit/CD117、CD44, 但在细胞系 4306 和人腹水中不能表达, 在 MOVCAR-7 和 4306 细胞系中 sP 细胞和 Non-sP 细胞均不表达 CD24、CD34、CD105、CD133、SCA-1。目前在卵巢癌细胞株中检测的表面标记物与肿瘤干细胞、sP 细胞之间存在一定的相关性, 仍不能证明所有的 sP 细胞都含有表面标志物, 也不能证明 sP 细胞表面标记物的特异性。这就需要今后大量实验研究上有所进一步突破。

2.2 sP 细胞的自我更新增值成瘤能力 sP 细胞在肿瘤中的生物学特性可概括为具有自我更新、多向分化和高致瘤性, 对放疗、化疗具抵抗性, 与肿瘤干细胞生物学特性具相似之处。卵巢癌 sP 细胞可以通过对称和不对称细胞分裂的方式获得自我更新能力, 在体外长时间克隆增殖。这一生物学特性与干细胞和肿瘤干细胞有类似的特性, 为 sP 细胞具有肿瘤干细胞样特性提供依据。目前研究者在卵巢癌细胞株及患者腹水中培养 sP 细胞, 观察其生物学特性。Szotek 等^[17] 在鼠卵巢癌细胞系 MOVCAR7 和 4306、王伟等^[19] 均在人 OVCAR3 细胞系中分选 sP 细胞并培养过程中证实 sP 细胞可发生不对称分裂增殖, sP 细胞不仅可以产生 sP 细胞, 还可以产生 Non-sP 细胞, 而 Non-sP 细胞培养后不能产生 sP 细胞。并且在多次传代培养中发现 sP 细胞的比例不断升高, 而 Non-sP 细胞体外增值受限。Patrawala 等^[22] 在分析前列腺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌的肿瘤细胞株中证实, 尽管 sP 细胞含量很少 (0.01%~5%), 但与 Non-sP 细胞相比, 其具有高成瘤性。张弦等^[23] 在人卵巢癌细胞株 A2780 中, 分选培养的 sP 细胞的平板克隆率及软琼脂克隆率均明显高于 Non-sP 细胞; 裸鼠体内致瘤实验中, 2 周内 sP 细胞组有 2 只裸鼠长出了肿瘤 (2/3), Non-sP 细胞组在 8 周后仍无肿瘤生长 (0/3)。Moserle 等^[24] 也在人卵巢癌建立的细胞株中和异体移植后证实, sP 细胞有较高的分芽、增殖、细胞凋亡率减少和高成瘤性。同一细胞株来源, 且用相同细胞数量、同等时间内观察 sP 细胞的自我更新、克隆增殖、成瘤性等方面, sP 细胞明显优于 Non-sP 细胞。这些生物学特性均为肿瘤干细胞的重要特征, 因此可以证实卵巢癌 sP 细胞具有肿瘤干细胞最重要的特征。

3 侧群细胞与肿瘤干细胞之间的关系

近年来肿瘤干细胞的研究表明, 多种恶性肿瘤的细胞系和肿瘤组织中都含有富含肿瘤干细胞样的亚群。在分离培养过程中, 这些细胞具有自我更新、多分化潜能、高致瘤性、对放疗的抵抗性等特性, 与肿瘤干细胞生物学特性具相似之处。鉴于 sP 细胞的高致瘤性和增生潜能, 人们广泛猜测 sP 细胞群体可能也包含肿瘤干细胞。分选后 sP 细胞群体更具克隆原性,

与 Non-sP 细胞相比, 在低细胞密度下优先存活。而且越来越多研究发现, 肿瘤组织中存在具有干细胞特征的 sP 细胞, 并将 sP 分选法可作为鉴定肿瘤干细胞的新方法。

sP 细胞与肿瘤干细胞之间在生物学特征上存在一致性, 但随着对 sP 细胞的不断研究, 发现二者之间也存在一定的差异性。在人、鼠卵巢癌细胞株和人腹水细胞中分选的 sP 细胞时就发现, 不是所有的卵巢癌细胞株中都能分选出 sP 细胞。而且在不同的细胞株中 sP 细胞的含量亦不尽相同, 如 Kondo 等^[25] 报道, 人乳腺癌细胞系 MCF7 和人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞中分别含有 2.0% 和 1.2% 的 sP 细胞, 而 Parawala 等^[22] 在 MCF7 中仅检测到约 0.2% 的 sP 细胞, 在 HeLa 细胞中未检测到 sP 细胞的存在。虽不能排除实验技术、条件、试剂等人因素为影响, 但也看到 sP 细胞与肿瘤干细胞之间存在差异性。随着研究进一步的深入, 有观点提出不是所有的肿瘤干细胞都含 sP 细胞, sP 细胞只是富集肿瘤干细胞样特性的一个亚群, 其中部分细胞并非肿瘤干细胞; 而且所有肿瘤干细胞都具有 sP 表型。各实验室用流式细胞仪分离获得 sP 细胞的数量和特性存在一定的差异, 这就仍需大量反复实验研究, 在工作中发现优化 sP 细胞分选条件, 尽量减少一些人为或环境因素。sP 细胞是否完全具有卵巢癌干细胞的功能特性有待今后的实验考证。

4 侧群细胞研究中存在的问题

鉴于 sP 细胞的分选主要是依靠外排荧光染料 Hoechst33342 的特性。关于 Hoechst33342 染料是否具有细胞毒性说法不一。早在 1982 年 Fried 等^[26] 年就提出其是一种细胞 DNA 合成的抑制剂。随后实验发现 Hoechst33342 可明显抑制人乳腺癌细胞系 MCF7 和人卵巢癌细胞系 SKOV-3 中非 sP 细胞的克隆形成能力^[27], 并且 sP 细胞的克隆形成率也明显低于未经流式分选和未经 Hoechst33342 染料染色的细胞; 分选出的 sP 细胞, 与 Non-sP 细胞相比, 具有更强的外排 Hoechst33342 染料的能力, 表明 sP 细胞所受 Hoechst33342 染料带来潜在的毒副作用要小, 对实验结果会产生一定的干扰。Szotek 等^[17] 报道 Hoechst33342 染料浓度的高低对 sP 细胞不同周期含量的影响和对 ABCG2/bcrp1 蛋白的表达的差异。故 sP 细胞和 Non-sP 细胞成瘤能力的不同很可能是由 Hoechst33342 的毒性作用造成的假象, 而非真正的干细胞特性的差异引起的。是否存在 sP 细胞因具有膜转运能力而受到保护, 而 Non-sP 细胞因得不到这种保护而被细胞毒性伤害, 可能因此无法成瘤的这一观点, 仍需通过今后大量的实验去证实。

通过近几年的实验研究结果表明, 大多数肿瘤细胞系或异体移植肿瘤中 sP 细胞群体数目都较少, 不能完全排除在一定程度上对检测可靠性的影响。不同实验室 sP 细胞群体“设门”各异, 在很大程度上, 从 sP 细胞群体中区分 Non-sP 细胞成分取决于人为因素且变化很大。而且 sP 细胞群体证实具有明显的异质性, 肿瘤干细胞样细胞只是部分而非专一地富集于 sP 细胞群体。Patrawala 等^[22] 在活体注射高数目的非 sP 肿瘤细胞时发现其也能导致肿瘤发生; 高致瘤性的前列腺肿瘤细胞系 PPC-1 中 sP 细胞难以检测; 另外, 在低致瘤性的乳腺癌细胞系 MCF7 容易发现 sP 细胞, 高致瘤性的 MDA-MB231 和 MDA-MB435 却检测不到。可能由于不合理的培养条件或者缺少可定义的干细胞样群体, 许多肿瘤还未能证实 sP 细胞的存在。

不同实验室采用 sP 细胞分选法研究同种类型肿瘤的肿瘤干细胞, 在针对同一细胞株情况下, 实验结果有时也存在较大

偏差,缺乏很好的可比性。因此需要进一步摸索 sP 细胞的分离和纯化条件,建立合适的流式参数,确定 Hoechst33342 浓度和毒理曲线,只有这样才能更加科学地比较不同实验室分析的结果,去深入研究卵巢癌肿瘤干细胞与 sP 细胞之间的关系。

5 结 语

目前的实验研究已经证实 sP 细胞广泛分布于各种组织、器官及多种肿瘤组织和肿瘤细胞系中,而且具有明确的表型标记和分离方法,并富含干细胞样细胞。但通过对之前大量文献研究结果的回顾,该方法也有其自身的局限性;另一方面也不能不正视 sP 表型与肿瘤干细胞特异性分子表型之间的差异性。已有大量文献给出足够的证据证实二者之间具有一致性,但也另有一些实验结果证实二者之间存在差异性。

肿瘤干细胞表型标记了解有限,缺乏已知统一的特异性标记,因此肿瘤干细胞的分离纯化一直成为研究的难点。而 sP 细胞与相应组织来源的肿瘤干细胞有相似之处,具有干细胞样特性,因此 sP 细胞分选法仍不失为一种分离肿瘤干细胞有效的实验方法。目前在卵巢癌 sP 细胞的实验中仅局限在永生化的细胞株,有些报道从卵巢癌患者腹水中、卵巢癌组织中原代培养鉴定出 sP 细胞,但 sP 细胞的含量与肿瘤分化程度有无相关性的报道至今未见。而且在有些细胞株中并未检测出 sP 细胞,因此将 sP 细胞作为卵巢癌干细胞的一种特殊细胞亚群,还是作为卵巢癌干细胞的 sP 表型,是否是卵巢癌肿瘤复发和转移的根源,能否作为卵巢癌的筛选以及 sP 细胞的 ABCG2/Bcrp1 耐药蛋白特性,还有待于今后大量实验证实。相信随着深入研究,sP 细胞分选法不仅解决研究肿瘤干细胞中的干细胞来源问题,对推动肿瘤干细胞的研究和发展具有重要意义,也为肿瘤临床靶向性治疗提供新的思路和策略。

参考文献:

- [1] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cell that are replicating in vivo[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4):1797-1806.
- [2] Behbod F, Xian W, Shaw CA, et al. Transcriptional profiling of mammary gland side population cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):1065-1074.
- [3] Majka SM, Beutz MA, Hagen M, et al. Identification of novel resident pulmonary stem cells: form and function of the lung side population[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8):1073-1081.
- [4] Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, et al. Human side population keratinocytes exhibit long term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4):965-974.
- [5] Ono M, Maruyama T, Masuda H, et al. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(47):18700-18705.
- [6] 朴正福, 张海燕, 丁淑芹, 等. 羊膜干细胞分离方法及其细胞学特性鉴定[J]. *透析与人工器官*, 2009, 3(20):1-5.
- [7] Kato K, Takao T, Kuboyama A, et al. Endometrial cancer side-population cells show prominent migration and have a potential to differentiate into the mesenchymal cell lineage[J]. *Am J Pathology*, 2010, 176(1):381-392.
- [8] 田福起, 孙浩, 潘鹏, 等. 肾癌干细胞的培养鉴定及其凋亡的实验研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(3):259-261.
- [9] Szotek PP, Pieretti Vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and mullerian inhibiting substance responsiveness[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30):11154-11159.
- [10] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties[J]. *Hepatology*, 2006, 44(1):240-251.
- [11] Moshaver B, van Rhenen A, Kelder A, et al. Identification of a small subpopulation of candidate leukemia initiating cells in the side population of patients with acute myeloid leukemia[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(12):3059-3067.
- [12] Wang J, Guo LP, Chen LZ, et al. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(8):3716-3724.
- [13] Mit sutake N, Iwao A, Nagai K, et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem like cells are enriched partly but not exclusively[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(4):1797-1803.
- [14] Sung J M, Cho HJ, Yi H, et al. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(1):163-167.
- [15] Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 49(1):318-329.
- [16] Wu C, Wei Q, Utomo V, et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(17):8216-8222.
- [17] Szotek PP, Piereth-vanmarcke R, Masiakos PT, et al. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell like characteristics and Mullerian inhibiting substance responsiveness[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(130):11154-11159.
- [18] Hu L, McArthur C, Bjaaffe R, et al. Ovarian cancer stem like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(8):1276-1283.
- [19] 王伟, 王沂峰, 张岭梅, 等. 人卵巢癌 OVCAR3 细胞系中侧群细胞的分离及其成瘤性、侵袭性的实验研究[J]. *山东大学学报:医学版*, 2009, 47(6):9-11.
- [20] Nicolazzo JA, Katneni K. Drug transport across the blood-brain barrier and the impact of breast cancer resistance protein (ABCG2) [J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9(1):130-147.
- [21] Dou J, Wen P, Hu W, et al. Identifying tumor stem like cells in mouse melanoma cell line by analyzing the characteristics of side population cells[J]. *Cell Bid Int*, 2009, 33(8):807-815.
- [22] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al.

Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, where as ABCG2 and ABCG2-cancer cells are similarly tumorigenic[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207-6219.

- [23] 张弦, 蒋翠莲, 王宝德, 等. 基于 SP 细胞分选法初步鉴定卵巢癌干细胞表面标志[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2009, 28(6): 491-496.
- [24] Moserle L, Indraccolo S, Ghisi M, et al. The Side Population of Ovarian Cancer Cells Is a Primary Target of IFN-Antitumor Effects[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 5658-5868.
- [25] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma

cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(3): 781-786.

- [26] Fried J, Doblin J, Takamoto S, et al. Effects of Hoechst 33342 on survival and growth of two tumor cell lines and on hematopoietically normal bone marrow cells[J]. *Cytometry*, 1982, 3(1): 42-47.
- [27] Shen G, Shen F, Shi Z, et al. Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, 44(7): 280-289.

(收稿日期: 2011-04-16 修回日期: 2011-05-20)

· 综 述 ·

Wnt 信号通路与肾脏纤维化

周宝尚 综述, 张 璟[△] 审校

(第三军医大学新桥医院肾内科/全军肾脏病中心/重庆市肾病研究所, 重庆 400037)

关键词: 信号通路; Wnt 基因; β -环连蛋白; 肾脏纤维化

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.035

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)28-2894-03

肾小管间质纤维化是各种不同病因的慢性肾脏疾病进行性发展的共同通路, 是导致终末期肾病的主要病理基础。近年研究显示, 肾小管上皮细胞-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肾小管间质纤维化的重要机制之一^[1], 肾小管上皮细胞可通过 EMT 转分化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MF), 进入间质, 合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 直接导致肾间质纤维化的进行性发展。肾小管上皮转分化受多种因素影响, TGF- β_1 被认为是最重要的诱导上皮细胞转分化的细胞因子。TGF- β_1 作为核心因子, 启动并调节 EMT 的全过程, 其诱导 EMT 的过程也是在病理状态下导致肾间质纤维化的主要途径^[2]。除此之外, 整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK), 受体酪氨酸激酶-Ras/丝裂原活化的蛋白激酶(mitogenactivated protein kinases, MAPK), RhoA/ROCK 等均参与肾小管上皮细胞的转分化过程。Wnt 信号转导通路在调控细胞的黏附、迁移、上皮间质转化、生长、分化、凋亡等过程, 以及在胚胎发育、器官发生和维持组织器官内环境稳定中具有重要作用^[3]。研究表明 Wnt 信号通路与肾纤维化的形成密切相关, 近年来的研究证实 Wnt 信号转导通路在肾间质纤维化的发生发展中发挥着重要作用^[4]。因此深入研究 Wnt 信号转导通路及其在肾间质纤维化发生发展中的作用, 可为抗肾脏纤维化的治疗提供新的可能途径及干预靶点。

1 Wnt 信号通路

1982 年, Nusse 和 Varmus^[5] 在用小鼠乳头瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)诱导小鼠乳腺癌过程中发现了 Wnt 基因, 由于该基因的激活依赖 MMTV 的插入(insertion), 因此被命名为 Int21。随后的研究证明, Int21 与果蝇属体节极性基因 Wingless 为同源基因, 因此, 又将 Wingless 与 Int21 结合, 称为 Wnt 基因。

1.1 Wnt 信号通路的组成 Wnt 信号转导通路是一条在生物进化中极为保守的通路, 调控着机体的许多生命过程。该通路的主要成分包括 Wnt 蛋白家族、Frizzled/低密度脂蛋白受体相关蛋白(Fz/LRP)、胞质内的 Dishevelled 蛋白(Dsh)、 β -环连蛋白(β -catenin)、糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、支架蛋白(axin/conductin)、结肠腺瘤性息肉病基因蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)和 T 细胞因子/淋巴增强因子(T cell factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)转录因子家族。Wnt 是一种富含半胱氨酸残基的分泌型糖蛋白, 在进化过程中高度保守, 在多种组织细胞中均有表达, 主要通过自分泌或旁分泌的方式激活膜受体而发挥作用, Wnt 蛋白表达是 Wnt 信号通路活化的重要起始信号。目前已知的主要有 19 种 Wnt 蛋白, 参与 Wnt 经典信号通路的 Wnt 蛋白有 Wnt1, 3a, 8 等。参与非经典信号通路的 Wnt 蛋白有 Wnt4, 5a, 11 等^[6]。Fz 为 7 次跨膜蛋白, 其氨基端的配体结合区(cysteine rich domain, CRD)富含半胱氨酸, 是 Wnt 信号通路中最主要的受体蛋白。Dsh 蛋白是 Wnt 经典信号从膜受体传递至胞内的中心分子, 有 3 个高度保守的结构域(DIX、DEP、PDZ), Dsh 能通过它的 DIX 结构域和 PDZ 与 DEP 结构域之间的一部分序列与 axin 相互作用。 β -catenin 是由 CTNBN1 基因编码的一种多功能蛋白质, 具有介导细胞间黏附及信号转导两大功能, 1980 年由德国细胞生物学家 Walt Birchmeier 在研究细胞黏附分子 E-钙黏蛋白(E-cadherin)相关分子时首先发现的, 是 Wnt 信号通路中有转录调控活性的关键成员, 在细胞核内与 Wnt 途径的另一成员 TCF/LEF 结合从而激活靶基因的转录^[7]。

1.2 Wnt 信号通路的转导过程 目前的研究证实 Wnt 信号转导通路分为: Wnt 经典信号转导通路, 也称 Wnt/ β -catenin 信号转导通路和 Wnt 非经典信号转导通路。Wnt/ β -catenin 信号