

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 被公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

[△] 通讯作者, Tel: (023) 68774221; E-mail: zjcqs@yahoo.com.cn.

转导通路是目前研究比较多、比较深入的一条分支。

当经典的 Wnt 信号转导通路被激活后,分泌到胞外的 Wnt 与跨膜受体 Lrp5/Lrp6 以及 Fz 结合形成复合物并激活受体,进而激活胞内的 Dsh,导致 GSK-3 β 活性受到抑制使其从 axin 上脱落,阻止 β -catenin 降解复合体(主要由 APC、axin、GSK-3 β 构成)的形成,因此 β -catenin 也就不会被磷酸化和降解^[8]。研究同时发现 β -catenin 降解复合体(如 APC 或 axin 突变)和 β -catenin 基因本身突变均可导致 β -catenin 降解障碍。当胞内 β -catenin 达到一定的水平时,形成游离的 β -catenin 发生核转移,与转录因子 TCF/LEF 结合,形成转录激活复合体,最终实现某些特定基因表达的增强或者减弱。现有的研究证明^[9] 该信号通路可以激活 c2myc、周期素 D1 (cyclin2D1)、MMP-7、CD44、survivin、PPAR- γ 、生长因子等,并且不断有新的靶基因被发现。在这条信号途径中 β -catenin 处于中心位置,其在细胞内的数量和状态对该途径有决定性影响,因此被认为是该信号途径激活的标志^[10]。

Wnt 非经典信号转导通路又分为 Wnt/Ca²⁺ 通路和细胞极性通路(planar cell polarity pathway,PCP)。Wnt/Ca²⁺ 通路主要由 Wnt5a 和 Wnt11 激活,从而引起细胞内 Ca²⁺ 浓度增加和 Ca²⁺ 敏感信号成分的激活,以调节细胞黏着和细胞运动,但其具体的信号传导机制还不清楚。细胞极性通路 PCP,其主要通过激活 Dsh 下游区、小 GTP 酶、Rho、Rac、Cdc 等从而调节 JNK 信号来发挥作用^[11]。该通路主要参与细胞极性的建立和细胞骨架重排。

2 Wnt 信号通路肾脏纤维化

2.1 Wnt 信号通路相关蛋白在肾脏纤维化中的表达 正常机体肾脏中 Wnt 信号是“沉默”的^[12],胞质中仅有少量游离态的 β -catenin,体内绝大多数 β -catenin 在胞膜处与 E-cadherin 形成复合体,对维持同型细胞的黏附、防止细胞的迁移发挥作用。Surendran 等^[3] 利用单侧输尿管结扎方法造成大鼠小管间质性肾纤维化模型,发现 Wnt4 在集合管中有表达伴随集合管周围纤维化形成,间质成纤维细胞 Wnt4 高水平表达与 I 型胶原 mRNA 及 α -SMA 的高表达一致;体外实验表明 Wnt4 可以诱导培养的成纤维细胞 β -catenin 进入细胞核内。Surendran 等进一步研究发现肾损伤后肾小管上皮细胞及间质细胞中 β -catenin 信号活化,重组的 sFRP4 蛋白可以抑制成纤维细胞的分化及其功能,从而抑制肾纤维化的进程。Bienz^[10] 在单侧输尿管结扎大鼠肾脏纤维化模型中发现多种 Wnt 信号通路及靶基因蛋白 Wnt(1, 2, 2b, 3, 3a, 4, 5a, 6, 7a, 7b, 8a, 9a, 16)、FZD(3, 10)、DKK(1, 3, 4)、Twist、 β -catenin、c-Myc、LEF、fibronectin、MMP-7 均不同程度的升高。Lin 等^[13] 研究表明在高糖条件下肾小球膜细胞 Wnt4、Wnt5a、p-GSK-3 β 、 β -catenin 高表达。闫喆等^[14] 利用高糖培养的人肾小管上皮细胞,检测发现 Wnt4、 β -catenin 和 α -SMA 的 mRNA 和蛋白表达水平均增高,而 E-cadherin 表达降低,且 Wnt4 及胞核 β -catenin 蛋白表达与高糖刺激呈时间依赖性。这些说明当肾脏纤维化时,Wnt 信号转导通路相关蛋白表达增加,提示 Wnt 信号转导通路可能在肾脏纤维化中发挥重要作用。

2.2 Wnt 信号通路在肾脏纤维化中的转导 当 Wnt 通路被激活后,Wnt 蛋白与细胞膜上的跨膜受体结合,激活胞浆内的散乱蛋白,使 β -catenin 的降解复合体:Axin/APC/GSK-3 β 复合物解聚而失活, β -catenin 磷酸化受抑制而降解减少,进入细胞核内的 β -catenin 大大增加,与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)家族成员结合,形成转录激活复合体,引起

特定的基因增强或减弱,最终促进 EMT 的发生,目前证实有 Twist、E-cadherin、fibronectin、MMP-7、 α -SMA 等重要的与纤维化相关基因^[4,15]。同时,Wnt 信号通路与 TGF- β ₁ 通路、PI3K/Akt 通路和 ILK 之间有着重要的对话。TGF- β ₁ 促进 Wnt 蛋白的分泌,激活 PI3K/Akt 通路和 ILK,直接磷酸化 GSK-3 β 并抑制其活性,进而激活转录复合体 β -catenin/TCF 以及转录因子,促进 EMT^[16]。此外,TGF- β ₁ 与受体结合,活化的 TGF- β ₁ 受体能够特异地识别和磷酸化 Smad 蛋白家庭成员 Smad2 和 Smad3,R-Smads 又与其伴侣分子 Smad4 结合,形成有功能的转录复合体,Smad3、Smad4 可以与 β -catenin 和 TCF/LEF 结合,促进两信号间相互作用,引起靶基因的转录^[17-18]。

3 以 Wnt 信号通路为靶点的抗纤维化治疗

越来越多的研究表明,Wnt/ β -catenin 信号转导通路与肾脏纤维化密切相关,因 Wnt 信号途径最早发现于肿瘤的发生,针对 Wnt/ β -catenin 信号转导通路中信号分子为靶点的抑制剂已成为抗肿瘤的候选药物,而这些同样可能成为于抗肾脏纤维化的治疗靶点,只是目前仍在研究阶段。

3.1 在细胞外水平阻断 Wnt 信号 Wnt 配体本身可通过反义寡核苷酸技术、RNA 干扰技术及中和抗体技术等成为抗肾脏纤维化治疗靶点。Wnt 信号分子的拮抗剂,如 Wnt 信号分子特异性结合的卷曲相关蛋白(frizzled-related proteins,FRPs)和 DKKs,已成为天然的抗肿瘤药物。DKK 蛋白是 Wnt 辅助受体 LRP5/6 的拮抗剂,具有抗肾脏纤维化潜能,在人类中已发现 4 种 DKK 蛋白。Zhu 等^[19] 利用培养的间充质干细胞释放的 DKK1 可明显降低肿瘤细胞的侵袭和运动能力,并可诱导 β -catenin 的定位改变及增加细胞间黏附。Dai 等^[20] 研究发现 DKK1 可以明显抑制阿霉素处理大鼠的 Wnt/ β -catenin 信号转导通路,改善蛋白尿及肾脏纤维化。He 等^[4] 研究发现 DKK1 可以显著的抑制单侧输尿管结扎大鼠肾脏 β -catenin 的堆积,从而抑制 α -SMA 以及胶原的产生。

3.2 在细胞质水平靶向 Wnt/ β -catenin 信号 Wnt/ β -catenin 信号转导通路通过细胞内蛋白-蛋白的相互作用而受到严密调控。由于结肠腺瘤性息肉病基因蛋白 APC 在结直肠癌中的核心作用,使针对该蛋白的 β -catenin 结合区域的阻断剂成为有效抑制肿瘤的物质。axin 是 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的负性调控者,该基因突变是某些肿瘤发生的重要因素。刘树立等^[21] 将 axin 基因转染入 axin 低表达的肺癌 BE1 细胞系,结果 axin 的 mRNA 和蛋白水平均明显增加, β -catenin 蛋白表达明显减少,TCF-4 的蛋白和 mRNA 表达均明显下降。同时,BE1-axin 细胞的凋亡率增加,增殖和侵袭能力明显下降。因此,在胞质水平加强 APC、axin 等的表达,可以达到对过剩 β -catenin 的降解作用,从而阻断下游信号转导,达到抗纤维化的目的。

3.3 靶向 β -catenin 蛋白表达和降解 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键分子。以往研究表明,在纤维化的过程中都存在 β -catenin 表达水平上调,因此靶向 β -catenin 的治疗引起人们的广泛关注。目前,反义寡核苷酸技术、RNA 干扰技术及蛋白敲除技术处于研究阶段。特异性的 β -catenin 干扰 RNA 可以减少肿瘤 β -catenin 蛋白的表达,从而阻断 Wnt 信号通路,成为不依赖 GSK-3 β 磷酸化抗肿瘤治疗的一个新靶点。Hong 等^[22] 用 β -catenin 干扰 RNA 转染人胃癌细胞,发现其可以显著抑制 β -catenin 的表达、胞核分布以及胃癌细胞的生长。麦玉洁等^[23] 同样用 β -catenin 干扰 RNA 转染白血病细胞 Jurkat 和 K562 细胞,结果 β -catenin 的 mRNA 和蛋白水平均降低,对细

胞的生长有明显的抑制。然而,目前其在抗肾脏纤维化方面的研究还有待进行进一步的研究。

3.4 在细胞核水平靶向 Wnt/ β -catenin 信号转导通路 β -catenin 最终发挥生物学效应是在其入核同 TCF/LEF 形成复合物,增强或抑制特定的靶基因实现的。因此,抑制复合物的形成理所当然地成为了抗纤维化治疗的又一治疗靶点。Lepourcelet 等^[24]设计出用于鉴别抑制 TCF-4 与 β -catenin 相互作用化合物的高通量药物筛选方法。Wei 等^[25]应用 3 种 TCF-4 与 β -catenin 复合物拮抗剂 PKF118-310、PKF115-584 和 CGP 049090 处理肝癌细胞,可以明显地抑制 c-Myc、cyclin D1 和 survivin 等的转录活性,从而抑制癌细胞的生长。

4 结 语

综上所述,Wnt 信号转导通路在肾脏纤维化发生发展中起重要作用,但目前对 Wnt 信号转导通路本身及其在肾脏纤维化中的作用机制尚未完全阐明。Wnt 信号转导通路的调控方式、与其他信号通路间的相互作用、各靶基因激活的作用和意义、参与 Wnt 信号转导通路的各分子的生理作用等均需进一步研究证实。随着对这条信号转导通路不断深入的了解,有望把 Wnt 信号转导通路作为抗肾脏纤维化治疗的一个重要靶点。

参考文献:

[1] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis[J]. *Pediatr Nephrol*,2000,15(3/4):290-301.

[2] Rhyu DY, Yang Y, Ha H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16(3):667-675.

[3] Surendran K, Schiavi, Hruska K A. Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16(8):2373-2384.

[4] He W, Dai C, Li Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*,2009,20(4):765-776.

[5] Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome[J]. *Cell*,1982,31(1):99-109.

[6] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors[J]. *J Biol Chem*,2006,281(32):22429-22433.

[7] Krieghoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention[J]. *J Cell Sci*,2006,119(7):1453-1463.

[8] Mi K, Dolan PJ, Johnson GV. The low density lipoprotein receptor related protein 6 interacts with glycogen synthase kinase 3 and attenuates activity[J]. *J Biol Chem*,2006,281(8):4787-4794.

[9] Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post translational modifications[J]. *Exp Mol Med*,2006,38(1):1-10.

[10] Bienz M. Beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling[J]. *Curr Biol*,2005,15(2):1764-1767.

[11] Karner C, Wharton KA JR, Carroll TJ. Planar cell polarity and vertebrate organogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*,2006,17(2):194-203.

[12] He X. Cilia put a brake on Wnt signaling[J]. *Nat Cell Biol*,2008,10(1):11-13.

[13] Lin C, Wang L, JY, et al. Superoxide destabilization of β -catenin augments apoptosis of high glucose stressed mesangial cells[J]. *Endocrinology*,2008,149(6):2934-2942.

[14] 闫喆,姚芳,段惠军,等. Wnt/ β -catenin 信号途径在高糖诱导肾小管上皮细胞转分化中的作用[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*,2009,18(4):396-400.

[15] Howe LR, Watanabe O, Leonard J, et al. Twist is up-regulated in response to Wnt and inhibits mouse mammary cell differentiation[J]. *Cancer Res*,2003,63(8):1906-1913.

[16] 郑颖,张璟,卓文磊,等. TGF- β_1 对人肾小管上皮细胞表达糖原合成酶激酶-3 β 的影响[J]. *重庆医学*,2007,36(5):414-416.

[17] Nawshad A, Medici D, Liu CC, et al. TGF- β inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex[J]. *J Cell Sci*,2007,120(9):1646-1653.

[18] Vincent T, Neve EP, Johnson JR, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Cell Biol*,2009,11(8):943-950.

[19] Zhu Y, Sun Z, Han Q, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1 [J]. *Leukemia*,2009,23(5):925-933.

[20] Dai C, Stolz DB, Kiss LP, et al. Wnt/beta-catenin signaling promote podocyte dysfunction and albuminuria[J]. *J Am Soc Nephrol*,2009,20(7):1997-2008.

[21] 刘树立,徐洪涛,杨连赫,等. Axin 过表达下调 β -catenin 和 TCF-4 表达并抑制肺癌 BE1 细胞的增殖和侵袭[J]. *中国肺癌杂志*,2009,12(4):277-282.

[22] Hong J, Jian GX, Jian K, et al. Short hairpin RNA targeting β -catenin suppresses cell proliferation and induces apoptosis in human gastric carcinoma cells[J]. *Scand J Gastroenterol*,2009,44(12):1452-1462.

[23] 麦玉洁,邱录贵,李增军,等. β -catenin 特异的 RNA 干扰对 Jurkat 和 K562 细胞的作用[J]. *中国医学科学院学报*,2008,30(3):290-295.

[24] Lepourcelet M, Chen YN, France DS, et al. Small molecule antagonists of the oncogenic Tcf /beta-catenin protein complex[J]. *Cancer Cell*,2004,5(1):91-102.

[25] Wei W, Chua MS, Grepper S, et al. Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo[J]. *Int J Cancer*,2010,126(10):2426-2436.