

2000,101(6):660-667.

- [17] Gao F, Gao E, Yue TL, et al. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion; the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation[J]. *Circulation*, 2002, 105(12):1497-1502.
- [18] Yoon K, Jung EJ, Lee SY. TRAF6-mediated regulation of the PI3 kinase(PI3K)-Akt-GSK3beta cascade is required for TNF-induced cell survival[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(1):118-121.
- [19] Matsui T, Li L, Montef DEL, et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro [J]. *Circulation*, 1999, 100(23):2373-2379.
- [20] Matsui T, Tao J, Monte F, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo[J]. *Circulation*, 2001, 104(3):330-335.
- [21] McDevitt TC, Laflamme MA, Murry CE. Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39(6):865-873.

- [22] 邸菁, 柏树令, 张凌志, 等. 激活的 Akt 对心肌细胞的增殖调控[J]. *解剖学报*, 2011, 42(1):61-64.
- [23] Yang ZZ, Tschopp O, Di-Po N, et al. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(23):10407-10418.
- [24] Westermann D, Riad A, Richter U, et al. Enhancement of the endothelial NO synthase attenuates experimental diastolic heart failure[J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(5):499-509.
- [25] Zhang HF, Fan Q, Qian XX, et al. Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium in rabbits with acute myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6):777-783.
- [26] Shimizu I, Minamino T, Toko H, et al. Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(5):1506-1514.

(收稿日期:2013-06-30 修回日期:2013-08-02)

· 综 述 ·

mda-9/Syntenin 在肿瘤转移过程中的作用

谭云综述, 钟东审校

(重庆医科大学附属第一医院神经外科 400016)

关键词: mda-9/Syntenin; 肿瘤转移; 分子结构

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)30-3694-03

含有 PDZ 结构域的蛋白属于支架蛋白,在信号转导级联反应中起承上启下的作用,在细胞分裂、蛋白质运输及降解、基因表达等多种体内重要的生物学过程中发挥关键作用。PDZ 是由最早发现含有此结构域的 post-synaptic density protein-95, drosophila disc large tumor suppressor, zonula occludens-1 3 种蛋白质首字母的缩写而得名,由 80~90 个氨基酸组成,包含两个 α 螺旋和 6 个 β 折叠。黑色素瘤分化相关基因 mda-9/Syntenin 是 PDZ 结构域蛋白家族成员之一,其通过特异性的定位调控体内多种分子事件。本文主要就含 PDZ 结构域的 mda-9/Syntenin 在肿瘤的侵袭、转移过程中的作用及其机制进行综述。

1 mda-9/Syntenin 的克隆及与分布

黑色素瘤分化相关基因 9(mda-9)是首先在人类黑色素瘤细胞中作为差异表达基因被克隆出来。采用干扰素 β (IFN- β)和蛋白激酶 C 激动剂 mezerein 联合治疗可重新启动人黑色素瘤细胞的终末分化过程,并伴随着其增殖能力的永久性丧失、黑色素合成增加、细胞表面抗原和表达基因改变以及细胞形态趋于正常黑色素细胞等变化。通过减差杂交技术对正常和终末分化人黑色素瘤细胞的比较,进一步确定了黑色素瘤分化相关基因 9(mda-9)的表达。mda-9 cDNA 全长约 2.1 kb,其开放阅读框架含有 894 bp,编码 298 个氨基酸,预测相对分子量约为

33×10^3 ,具有 PDZ-1 和 PDZ-22 个 PDZ 结构域,这一基因随后被克隆并重新命名为 Syntenin。

2 mda-9/Syntenin 与肿瘤转移的关系及其分子机制

恶性肿瘤细胞具有向远处组织侵袭并形成转移灶的能力。这一过程首先需要肿瘤细胞黏附到多种基质蛋白上,然后通过基质金属蛋白酶(MMP)降解细胞外基质,随后迁移进入周围的间质中。抑制消减杂交技术对非转移性乳腺癌细胞株 MCF-7 和转移性乳腺癌细胞株 MDA-MB-435 进行研究后发现,mda-9/Syntenin 在转移性乳腺癌细胞株中呈过表达。最近的研究发现,MDA-MB-435 细胞系是由 M14 黑色素瘤细胞系衍生的而并非是一种原发的乳腺癌细胞系,提示 mda-9/Syntenin 的表达可能与肿瘤细胞的转移有关^[1]。与原发性或者非转移性肿瘤相比,多种转移性乳腺癌和消化道肿瘤细胞系中均发现 mda-9/Syntenin 的过表达;通过促使非转移性的乳腺癌细胞 MCF-7 以及消化系统肿瘤细胞 Az-521 过表达 mda-9/Syntenin 后发现,细胞伴随着伪足形成增加等形态学改变,肿瘤细胞迁移和侵袭的能力明显增强。mda-9/Syntenin 结构域缺失分析的结果显示,PDZ-2 结构域是该基因促进细胞迁移运动的有效结构域。

对原发性黑色素瘤和转移性黑色素瘤的研究发现,mda-9/Syntenin 的表达随肿瘤转移的进展而上调^[2]。免疫组织化学

分析结果显示,黑色素细胞向原发性黑色素瘤进展过程中都表现出 mda-9/Syntenin 表达水平逐渐增加的趋势^[3]。采用分泌蛋白质组生物标记技术在转移性黑色素瘤病人的葡萄膜黑色素瘤细胞中亦检测到 mda-9/Syntenin 的表达^[4]。临床研究发现,9 个正常皮肤样本中均未见 mda-9/Syntenin 表达,15 个皮肤痣中仅检测到 1 例 mda-9/Syntenin 的阳性表达,30 个垂直生长期原发性黑色素瘤中有 24 例表达 mda-9/Syntenin,12 个转移淋巴结中有 8 个呈阳性表达,提示 mda-9/Syntenin 的表达随肿瘤的进展显著增加;体外研究同时发现高转移性肿瘤细胞 T1P26 中 mda-9/Syntenin 的表达显著高于低转移性肿瘤细胞系 M4Beu,明确了 mda-9/Syntenin 具有参与调节肿瘤转移过程的能力^[5]。将重组 mda-9/Syntenin 腺病毒(Ad. mda-9/S)转染低转移性 FM516-SV 和 M4Beu 细胞后发现,肿瘤细胞的迁移、侵袭以及锚定依赖性生长能力显著增加;而转染重组反义 mda-9/Syntenin 腺病毒(Ad. mda-9/AS)的高转移性肿瘤细胞 T1P26 恶性生物学特征受到明显抑制。将稳定转染 mda-9/Syntenin 的 FM516-SV 和 M4Beu 细胞通过皮下注射方式植入到免疫能力低下的新生大鼠体内可显著增加其自发性肺转移的能力,而在相同实验条件下转染重组反义 mda-9/Syntenin 的 T1P26 细胞自发性肺转移的能力明显下降,进一步证实了 mda-9/Syntenin 在调节肿瘤转移过程中的关键作用^[6]。

分子结构分析发现,mda-9/Syntenin 调节黑色素瘤转移的过程可能是通过黏着斑激酶(FAK),p38 丝裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK),c-JNK,核因子 κ B(NF- κ B)和膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)信号通路介导的^[6-7]。mda-9/Syntenin 具有优先与纤维连接蛋白信号相互作用的特点,将过表达 mda-9/Syntenin 的 FM516-SV 和 M4Beu 细胞接种到纤维连接蛋白上,可产生更多的肌动蛋白应力纤维。而表达反义 mda-9/Syntenin 的 T1P26 细胞中肌动蛋白微丝和黏着斑的形成减少。提示 mda-9/Syntenin 表达引起的细胞骨架组成和形态的改变可能与黏着斑激酶 FAK 相关。FAK 是整合素相关信号通路的关键成份,在调节肿瘤细胞运动和侵袭过程中具有重要作用。在低转移性 M4Beu 细胞中过表达 mda-9/Syntenin 可见磷酸化的 FAK 显著增加,而在高转移性 T1P26 细胞中下调 mda-9/Syntenin 的表达则伴随着 FAK 磷酸化作用的明显减少。共聚焦研究显示,WMI341D 黑色素瘤细胞中 mda-9/Syntenin 与磷酸化的 FAK 共表达;在纤维连接蛋白上,mda-9/Syntenin 促进 FAK 的磷酸化,继而激活 MAPK、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)以及 NF- κ B;采用 FAK,p38 MAPK,JNK 或者 NF- κ B 任一信号分子的抑制剂处理后,均可显著抑制 mda-9/Syntenin 增加细胞迁移和侵袭能力的特性。人色素瘤细胞中 mda-9/Syntenin 通过活化 NF- κ B 和 MT1-MMP 而启动后续的信号级联反应并通过以下模式促进肿瘤的转移:肿瘤细胞与细胞外基质(ECM)结合后,mda-9/Syntenin 诱导 FAK 的磷酸化,后者通过磷酸化作用激活 p38 MAPK,进而引起 κ B 的降解以及胞浆中 p65 与 p50 解聚后与靶基因 MT1-MMP 结合,大量产生的 MT1-MMP 与 TIMP-2 结合后活化 pro MMP-2 进而产生 MMP-2,从而引起肿瘤细胞的运动、侵袭以及生长能力增加^[7]。然而在乳腺癌细胞中,mda-9/Syntenin 并不能诱导 MMP-2 或者 MMP-9 的产生。由于上述观察到的黑色素瘤细胞表现都是种植在纤维连接蛋白上的,因此这一差异可能与细胞类型以及 ECM 的诱导信号有关。

然而,在 FAK 的 C 末端序列中也未能发现与 PDZ 结构域结合的基序,提示 mda-9/Syntenin 可能与黏着斑中调节黏着

斑激酶磷酸化作用的其他成份发生作用。因此,确定 mda-9/Syntenin 激活 FAK 过程中的关键作用蛋白,以及后续的信号事件是了解这一接头蛋白控制肿瘤转移过程的分子的关键。Boukerche 等^[8-9]发现了 mda-9/Syntenin 首先激活 c-Src 介导 c-Src/FAK 信号复合体大量聚集在细胞膜上,通过 FAK 的自身磷酸化作用放大后续信号或者 mda-9/Syntenin 激活 c-Src 后形成的 mda-9/Syntenin/c-Src 复合体直接与 NF- κ B 作用以发挥其促进肿瘤侵袭和转移的能力。Hwangbo 等^[10]认为 FN 首先激活 mda-9/Syntenin,其通过 PDZ 结构域与 PKC α 对话激活 FAK 及其后续信号途径发挥其促进肿瘤侵袭和转移的作用。

缺失突变分析结果显示,在 HEK 293T 向 I 型胶原侵袭过程中需要 mda-9/Syntenin 2 个 PDZ 结构域的共同作用;而在乳腺癌细胞中 PDZ-2 结构域在 mda-9/Syntenin 功能中占据了主导地位。晶体学研究显示,PDZ-1 结构域 K124,R128 和 K130 突变体在多肽结合界面周围形成一个高度正电荷的表面有利于脂类结合,这一界面可抑制 mda-9/Syntenin 与磷酸肌醇的结合及其侵袭作用的发挥。mda-9/Syntenin 的这一突变并不影响其与 syndecan-2 的相互作用却明显干扰其与抑癌蛋白 merlin/schwannomin-1 (sch-1)的相互作用,提示与之结合的配体(脂类/多肽)对 mda-9/Syntenin 的功能具有调节作用^[11]。研究发现,mda-9/Syntenin 介导 I 型胶原侵袭作用的增加过程需要 Rho 家族中小的 GTPases,RhoA,cdc42,Rac-1 以及活化的 H-ras 参与,作为 Ras 下游信号的磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/Akt 以及 MAPK 通路在 mda-9/Syntenin 诱导的侵袭作用中发挥重要作用^[12]。mda-9/Syntenin 过表达可导致 Akt S473 和胞外信号调节激酶(ERK)-1/2 的磷酸化作用增加。然而,抑制 p38 MAPK 或者 JNK 对于 mda-9/Syntenin 诱导的 I 型胶原上的侵袭作用没有任何影响。由此可见,ECM 不同成分的相互作用可通过相应的信号途径影响 mda-9/Syntenin 的表达及其后续的信号级联反应,但 mda-9/Syntenin 表达的最终结果都会导致细胞迁移和侵袭能力增加。

3 mda-9/Syntenin 与肿瘤相关蛋白的作用

大量 mda-9/Syntenin 调节 Syndecans 循环研究发现 Syndecans 可调节肿瘤细胞的增殖,黏附及运动能力,从而成为判定肿瘤进展和病人存活指标。Syndecan-1 参与了 Wnt-1 诱导的小鼠乳腺癌的发生,并可促进肺鳞癌细胞的转移。在胰腺癌、消化道肿瘤、乳腺癌和黑色素瘤中均观察到 Syndecan-1 表达上调;在肝细胞癌和恶性间皮瘤中 Syndecan-4 表达增加并可能与肿瘤细胞的增殖相关。与正常组织相比,Lewis 肺癌细胞和间皮瘤细胞中 Syndecan-2 表达上调,其在结肠癌细胞中的表达可达到正常水平 2~5 倍,并为细胞周期过程和细胞外基质之间的相互作用所必需^[13]。

酵母双杂交实验中采用 Syndecans 胞浆结构域作为诱饵首次发现 mda-9/Syntenin 是 Syndecan 的结合蛋白。Syndecans 家族 4 个蛋白质的近膜面以及小的胞浆结构域在结构上极其相似并在进化上高度保守,提示这一部分对于 Syndecan 功能的发挥至关重要。mda-9/Syntenin 缺失突变体分析显示,mda-9/Syntenin 通过 FYA-C 末端氨基酸序列与 Syndecans 相互作用,但需要 mda-9/Syntenin 的两个 PDZ 结构域同时存在;而 mda-9/Syntenin 的 N 末端于其功能的发挥无关紧要。mda-9/Syntenin 与 Syndecans 在细胞膜和细胞内囊泡上共同表达。进一步研究显示,mda-9/Syntenin 的 PDZ 结构域与 PIP2 的相互作用控制着 Syndecan 从内涵体腔返回细胞膜的循环过程。

mda-9/Syntenin 的两个 PDZ 结构域均可与 syndecan 或者 PIP2 相互作用,其中 PIP2 对 PDZ1 的亲合性高于 PDZ2。细胞膜中高水平的 PIP2 可以完全取代 Syndecans,使其离开 mda-9/Syntenin 并返回到细胞表面。缺乏与 PDZ 相互作用的 Syndecan 不能通过这一通路进行循环而被包裹在胞浆的内涵体或者核周区室内,并由内质网系统快速降解。与此同时,大量结合到 Syndecans 硫酸肝素链上的黏附分子和信号蛋白(FGF 受体和整合素)也被包裹到这些内涵体中,使得细胞表面的受体数量失衡最终导致细胞扩散、黏附及运动功能受到抑制。

mda-9/Syntenin 与 NF2/schwannomin/merlin NF2 基因的失活突变体可导致神经鞘瘤、脑膜瘤、室管膜瘤和其他中枢神经系统肿瘤的发生;NF2 基因的产物称为 NF2 蛋白、schwannomin-1 (sch-1)或者 merlin,该蛋白的失活可导致甲状腺癌、肝细胞癌、神经束膜瘤肿瘤的发生^[14]。

NF2 在胞膜相关蛋白和细胞骨架之间提供调节性的连接,作为一种新的抑癌基因通过调节细胞外信号与细胞骨架之间的连接而在细胞生长和黏附过程中发挥关键作用。依据羧基端 16 个氨基酸的不同可将 NF2 蛋白分为 2 种亚型,即 sch-1 和 sch-2。只有 sch-1 过表达时具有抑制生长的能力,提示其羧基端 16 个氨基酸在调节抑癌功能方面具有重要作用。sch-1 在 C 末端的 25 个氨基酸可与 mda-9/Syntenin 的两个 PDZ 结构域共同调节二者的结合;sch-1 的 VAFEEEL 区域突变分析确定了这一序列对于 mda-9/Syntenin 的识别至关重要。在体内和离体情况下,两种蛋白相互作用并共表达于细胞膜内面和斑点状细胞囊泡中。表达反义 mda-9/Syntenin 的成纤维细胞出现了 sch-1 亚细胞定位的改变,提示 Syntenin/sch-1 相互作用在将 sch-1 运输并锚定在细胞膜过程中具有重要作用。

Syntenin 与其他蛋白的相互作用 mda-9/Syntenin 还分别与白细胞介素-5 (IL-5)受体以及转录因子 Sox4, ephrin B1, 谷氨酸受体以及 Unc51.1 和 Rab5 相互作用,从而 B 细胞发育和分化的调节、控制轴突延伸方向、调节神经递质传递等多种生物过程中发挥重要作用。而且有最近研究表明 mda-9/Syntenin 通过与泛素相互作用在调控肿瘤转移和侵袭中起着重要的作用^[15]。

参考文献:

- [1] Rae JM, Creighton CJ, Meck JM, et al. MDA-MB-435 cells are derived from M14 melanoma cells—a loss for breast Cancer, but a boon for melanoma research[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 104(1): 13-19.
- [2] Gangemi R, Mirisola V, Barisione G, et al. Mda-9/syntenin is expressed in uveal melanoma and correlates with metastatic progression [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e29989.
- [3] Helmke BM, Polychronidis M, Benner A, et al. Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(2): 221-228.
- [4] Pardo M, García A, Antrobus R, et al. Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum[J]. *J Proteome Res*, 2007, 6(7): 2802-2811.
- [5] Das SK, Bhutia SK, Kegelman TP, et al. MDA-9/syntenin: a positive gatekeeper of melanoma metastasis [J]. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 2012, 17 (17): 1-15.
- [6] Das SK, Bhutia SK, Kegelman TP, et al. MDA-9/syntenin: a positive gatekeeper of melanoma metastasis [J]. *Cancer Res*, 2012, 17: 1-15.
- [7] Boukerche H, Su ZZ, Emdad L, et al. mda-9/syntenin regulates the metastatic phenotype in human melanoma cells by activating nuclear factor-kappaB[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1812-1822.
- [8] Boukerche H, Su ZZ, Prévost C, et al. mda-9/syntenin promotes metastasis in human melanoma cells by activating c-Src[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(41): 15914-15919.
- [9] Boukerche H, Aissaoui H, Prévost C, et al. Src kinase activation is mandatory for MDA-9/syntenin-mediated activation of nuclear factor-kappaB[J]. *Oncogene*, 2010, 29 (21): 3054-3066.
- [10] Hwangbo C, Kim J, Lee JJ, et al. Activation of the integrin effector kinase focal adhesion kinase in Cancer cells is regulated by crosstalk between protein kinase Calpha and the PDZ adapter protein mda-9/Syntenin[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1645-1655.
- [11] Meerschaert K, Bruyneel E, De Wever O, et al. The tandem PDZ domains of syntenin promote cell invasion[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(9): 1790-1804.
- [12] Hwangbo C, Park J, Lee JH. mda-9/syntenin protein positively regulates the activation of Akt protein by facilitating integrin-linked kinase adaptor function during adhesion to type I collagen[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33601-33612.
- [13] Han I, Park H, Oh ES. New insights into syndecan-2 expression and tumorigenic activity in colon carcinoma cells[J]. *J Mol Histol*, 2004, 35(3): 319-326.
- [14] Pineau P, Marchio A, Nagamori S, et al. Homozygous deletion scanning in hepatobiliary tumor cell lines reveals alternative pathways for liver carcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2003, 37(4): 852-861.
- [15] Okumura F, Yoshida K, Liang F, et al. MDA-9/syntenin interacts with ubiquitin via a novel ubiquitin-binding motif[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 352(1/2): 163-172.

(收稿日期: 2013-05-21 修回日期: 2013-08-15)