

钙网蛋白相关信号通路在肿瘤中的研究进展

邱 浩 朱军辉 罗招阳 张志伟 张 瑛 刘重元 朱建思 肖 娟 张先锋

摘 要 钙网蛋白(calreticulin,CRT)是参与多种细胞过程的高度保守的内质网伴侣蛋白。1974 年,它首次被鉴定为钙离子结合蛋白,随后 CRT 与肿瘤之间信号通路相关关系被广泛的研究。另外,在人类多种肿瘤中,细胞表面的 CRT 被认为是 1 个“促吞噬”信号,由此 CRT 与癌细胞的巨噬细胞吞噬免疫系统的相关研究,有望为肿瘤综合治疗提供新的理论依据和策略。也有越来越多的证据表明 CRT 在不同肿瘤中的异常表达,将为 CRT 成为一种新的肿瘤标志物提供许多依据。以及 CRT 对各种肿瘤的发展具有很重要的影响且 CRT 对肿瘤形成和进展的影响取决于细胞类型和临床阶段。

关键词 钙网蛋白 恶性肿瘤 信号通路

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.003

一、CRT 结构和功能

钙网蛋白(CRT)是一种相对分子质量为 46kDa 的蛋白,也是一种主要位于内质网(ER)以及在不同的物种中高度保守的多功能蛋白。人类 CRT 基因位于第 19 号染色体,由 8 个内含子和 9 个外显子所构成,其长度为 1254bp 的开放性阅读框架的编码产物,为 417 个氨基酸组成的酸性蛋白质。CRT 的 N 末端是可切割的信号序列,它的 C 末端是一个内质网 KDEL(赖氨酸-天冬氨酸-谷氨酸-亮氨酸)定位信号。通过结构预测表明,该蛋白质是由 3 个结构域组成,分别为 N-域、P-域和 C-结构域^[1]。N-域是由 8 个反向平行的 β 折叠和单个二硫键桥构成的球形三维结构,该区域不仅是重金属(Zn^{2+})结合位点,而且还有一个非常重要的功能是与 P-域一起维持 CRT 的分子伴侣功能,另外还是整合素 α 亚单位和 DNA 相互作用的结合区域。P-域是一个富含脯氨酸的区域,其伸展形成手臂样结构,此结构是由 6 个短的 β 折叠和两组 3 个氨基酸重复序列构成,形成凝集素样分子伴侣结构,使得 CRT 具有蛋白质折叠功能,也能与内质网腔的其他分子伴侣相互作用。

C-域是高度酸性区域,可高容量结合 Ca^{2+} ,且参与内质网中 Ca^{2+} 的储存,CRT 的 C 末端还存在 KDEL 内质网滞留信号,该信号与其在内质网滞留密切相关^[2]。CRT 主要定位于内质网,在内质网内外均具有多种重要功能,在内质网中其基本生物学功能是蛋白分子伴侣和钙平衡调节^[3]。而 CRT 蛋白功能不仅局限于内质网腔,其非内质网的功能还包括抑制血管生成和肿瘤细胞生长、细胞黏附、RNA 稳定性调节以及在细胞外环境中的新功能等。

二、CRT 信号通路

1. CRT-STAT5A-NRP1 信号通路:Shi 等^[4]研究发现 CRT 能够增强细胞迁移和侵袭,以及他们验证了神经毡蛋白-1(NRP1)是 CRT 的下游效应蛋白。一些研究也报道,在不同类型的肿瘤中 NRP1 蛋白的表达是增加的。NRP1 蛋白高表达与结肠癌患者转移显著相关,在鼻咽癌和食管腺癌也有相同的发现。另外研究发现,NRP1 促进胰腺癌 COLO-357 细胞株的侵袭,但它却抑制另一种胰腺癌 PANC-1 细胞株的迁移。因此表明 NRP1 在恶性肿瘤的生物学作用可能取决于不同的细胞类型,即使在同一种肿瘤中,但在不同的细胞株的作用也可能不同。Shi 等^[4]还发现抑制 NRP1 蛋白表达会降低肿瘤细胞的侵袭性,这表明 NRP1 是肿瘤进展的一个重要调节器,以及该通路的相关基因可能是潜在的分子治疗靶点。

2. CRT-MEK/ERK 信号通路:众所周知,在人类恶性肿瘤细胞中,MEK/ERK 的缺失会延迟肿瘤细胞增殖的进程。目前研究发现,CRT 促进胰腺癌细胞迁移和侵袭,在胃癌细胞、J82 膀胱癌细胞、乳腺癌细胞与食管鳞状细胞癌研究中有这样相同的结果。

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(13JJ3079);湖南省科技厅基金资助项目(2013SK3118,2014SK3081);湖南省高校创新平台基金资助项目(10K052,12K094,13K083);湖南省教育厅基金资助项目(11C1112,12C0340);湖南省卫生厅基金资助项目(B2014-163,B2013-048)

作者单位:421001 衡阳,南华大学肿瘤研究所(邱浩、朱军辉、罗招阳、张志伟、刘重元、朱建思);570011 海口,海南省人民医院(张瑛);421001 衡阳,南华大学附属第二医院耳鼻喉科(肖娟、张先锋)

通讯作者:张志伟,电子信箱:nhdxxzw@qq.com;罗招阳,电子信箱:1637790824@qq.com

Chen 等的研究发现 CRT 在特定的 MEK/ERK 通路正调控,研究还发现在胰腺癌中 CRT 通过 MEK / ERK 信号通路的激活来调节细胞迁移和侵袭,这可能是 CRT 在肿瘤进展过程另 1 个功能调节方式^[5]。

3. JNK - CRT/c - Jun - NH 2 - kinase - CRT 信号通路: Chang 等^[6] 研究揭示了一种新的 JNK - CRT - 依赖途径,在 Notch 信号通路的阻断分化上,这途径对 GSI 诱导神经元不同神经母细胞瘤必不可少。他们在研究中发现,Notch1 蛋白表达可以作为是 1 个独立的预后因素,并且能够预测神经母细胞瘤患者的预后。他们的研究结果也为神经母细胞瘤患者选择合适的治疗方面提供宝贵的建议。目前的研究数据显示:Notch 依赖的神经元分化的调节的新机制是通过 JNK - CRT - 依赖途径。

4. CRT 与其他途径:以前的研究就已经提出了 CRT 在肿瘤侵袭过程中有影响的几个途径:如 Slug/E - cadherin、PI₃K - Akt 和 TSP1 - CRT - LRP1 信号通路、以及雌激素受体的活性和血管内皮生长因子^[7]。还有研究表明,胃癌细胞中,无论在信使 RNA 还是蛋白水平上 CRT 的过表达与 VEGF 表达上调之间都具有相关性。肿瘤中 CRT 依赖性侵袭和转移潜能的一种机制可能是这种促血管生成的作用。总之,在肿瘤形成过程中,CRT 通过某些通路发挥其促癌及促侵袭作用。

三、CRT 与肿瘤免疫

1. CRT 的暴露途径:CRT 的暴露是由内质网应激反应、细胞凋亡、转位 3 个过程参与,且免疫原性细胞的死亡可以诱导 CRT 的暴露。在内质网应激反应中,eIF2 α 的磷酸化是由于 PERK 激酶的激活或 PPI/GADD34(磷酸酶)的抑制而引起。ROS 的产生和(或)NO 的产生,以及 SERCA 的抑制可能与“内质网应激反应”有关。细胞凋亡过程包括依赖 caspase - 8 裂解 BAP31 和 Bcl - 2 家族蛋白 Bax 和 Bak 蛋白的激活,这可能协调内质网和线粒体之间的跨细胞器的相互作用。然而,目前并不明确具体哪些亚细胞定位的 Bcl - 2、Bax 和 Bak 影响 CRT 暴露途径。在“转位”过程中,肌动蛋白骨架的重排使 CRT 的顺行从内质网腔输送到高尔基体,然后囊泡相关 VAMP1,与质膜相关 SNAP23 相互作用介导两者之间膜相互融合,从而使官腔的 CRT 最终到达细胞表面^[8]。

在免疫原性细胞死亡中,选择性的 CRT 暴露(没有其他的内质网蛋白如钙联接蛋白的暴露)发生在相当早的阶段时,细胞仍然有正常的形态和缺乏磷脂

酰丝氨酸暴露。免疫原性凋亡是 1 个复杂的,需要多种刺激因子依赖的,多步骤的过程,CRT 暴露先于或伴随这一过程。细胞凋亡诱导剂的药理作用可以有有效的触发 CRT 暴露,也会引起内质网的应激反应—活性氧(ROS)的产生。化疗药物的停用会引起产生 ROS 抗氧化剂,或至少在蒽环类药物的情况下,可诱导对 NO 合成酶的抑制作用,从而消除 CRT 暴露。然而,单独加入 ROS 或 ROS - 生成剂不足以诱导的 CRT 暴露。化疗药物(如奥沙利铂、蒽环类抗生素、多柔比星和米托蒽醌)有一个共同的作用,可以引起内质网的应激反应从而触发 CRT 的暴露^[9]。大量研究表明,免疫应答的激活与肿瘤细胞表面 CRT 的表达密切相关。因此,实现抗肿瘤治疗(即杀死肿瘤细胞)可能的一个潜在方法之一就是增加细胞表面 CRT 的暴露。

2. CRT 的免疫原性:CRT 是死亡细胞免疫原性形成的关键因素^[10]。肿瘤细胞保护需要细胞表面 CRT 以及 CD8 和 CD4 T 细胞。暴露在细胞表面的 CRT 是破坏的肿瘤细胞诱导免疫应答非常重要的一个诱因^[11,12]。多项研究表明,凋亡细胞和癌细胞的摄取和吞噬需要细胞表面的 CRT 的帮助^[13]。另外有研究表明,多数肿瘤细胞中 CD47 的表达和 CRT 的表达常常相伴进行,此目的是防护 CRT 介导的吞噬作用。另外有一些文献报道,细胞表面上的 CRT 被认为是一个“促吞噬”的信号,在人类的多种肿瘤中也有类似的发现,CRT 的这种促吞噬功能可以被抗吞噬信号 CD47 所中断^[13]。许多研究结果也证明了这一结论,肿瘤细胞逃避免疫系统的吞噬作用原因之一可能是 CRT 的高表达伴随着抗吞噬信号 CD47 的增加。因此利用抗 CD47 抗体对 CD47 的中断作用,可能对癌细胞有加强其吞噬吸收的治疗效果。也有研究者分别测试了单纯的肿瘤抗原和 CRT 与肿瘤抗原嵌合在一起后的抗原,后者免疫原性明显增强^[14]。有文献报道,机体的抗肿瘤免疫应答能够被从肿瘤中纯化的 CRT 所激发,其机制可能为肿瘤的抗原多肽结合在 CRT 分子中^[15]。CRT 在外翻到细胞膜的过程中,也会将与之结合的肿瘤抗原肽带到细胞膜上并递呈给抗原递呈细胞,从而激发机体的抗肿瘤免疫应答。总之,这些研究结果表明,CRT 介导的免疫机制的逐步探明,可能为抗癌治疗提供了 1 个重要的策略。

四、CRT 与肿瘤诊断、预后

肿瘤患者病死率高至少有两个主要原因:①缺乏

早期敏感度高、特异性高的肿瘤标志物,不能早期诊断而错过最佳治疗时机,所以极为关键的一点就是要不断寻找有利于肿瘤早期诊断的标志物;②患者及早就医的意识有待于进一步提高。大量研究表明,多种肿瘤中 CRT 的表达上调,且发现 CRT 在肿瘤组织中的表达水平比其在正常组织明显增加,故其很有可能成为合适的新肿瘤标志物。一些研究发现,在乳腺癌中,CRT 的表达水平明显上调,它的临床分期、淋巴结转移和生存率与 CRT 的表达水平密切相关,前两者与 CRT 的表达水平正相关而生存率恰好相反^[16]。Lee 等^[17]的研究也有类似发现,CRT 表达水平上调与肿瘤大小、远端转移有关。由此说明 CRT 表达与肿瘤进展十分相关,故 CRT 有望成为诊断和预后的一种相关肿瘤标志物。李晓曦等^[18]研究首次报道了下调钙网蛋白表达对抑制乳腺癌干细胞增殖、侵袭能力,诱导乳腺癌干细胞凋亡的影响。在肺癌中也有类似的报道,虽然 CRT 的表达水平都会上调,但不同的组织类型的肺癌也有差别,鳞癌的 CRT 表达水平最高、腺癌次之、小细胞肺癌的 CRT 水平最低^[19]。也有文献报道,在神经母细胞瘤中,CRT 表达上调反而有更好的组织学分化类型和预后^[20]。此外,在膀胱癌中,癌组织中 CRT 表达也是上调的,其患者的尿液中 CRT 也明显增多,其组织学分型也会升高^[21]。也有相关研究已证实尿液中的 CRT 可以作为检测尿路上皮癌的一种有用的生物标志物。此外还有研究表明,在口腔癌、前列腺癌中 CRT 的表达水平也都明显增加。

目前还没有明确的临床研究资料来支持它们的组织分化类型,临床分型、淋巴结转移和生存率与 CRT 表达水平之间的相关关系。在大肠癌中,Xu 等^[23]的研究发现,大肠癌患者其血清中 CRT 的含量较正常人明显增加,其中高、中分化腺癌患者血清中 CRT 含量也比低分化和黏液腺癌患者要高。由此可以知道,在大肠癌中也存在 CRT 过表达的现象,且不同的病理分型也有差异表达。临床研究资料发现,高中分化的患者比低分化、黏液腺癌患者的预后明显要好,不同的病理分型直接决定其预后。因此可以推测在一定程度上,CRT 的表达水平未来有望可以用来评估大肠癌患者的预后。同样在胃癌中,研究结果发现,CRT 的表达水平与临床分期和淋巴结转移呈正相关^[22]。也有临床回访资料结果显示,在食管鳞状细胞癌和胰腺癌患者中,CRT 表达水平较高的其生存率非常低^[23]。综上所述,在各种肿瘤中,CRT 的过表达与肿瘤的发生、发展、诊断和预后密切相关,CRT

很可能使其成为肿瘤发生及诊断的生物学标志物。

在肿瘤的治疗上,CRT 也有望发挥重要作用。Shi 等^[4]的研究揭示了一种新的信号通路: CRT - STAT5A - NRP1,该通路促进癌细胞迁移和侵袭,这可能有助于食管癌转移。另外 NRP1 表达与食管鳞癌组织中 CRT 表达呈正相关,提示该通路的相关基因可能是潜在的分子治疗靶点。同样 Chen 等的研究表明,CRT 和 MEK / ERK 信号通路之间的相互作用可能揭示肿瘤恶性生物学行为,也有可能为肿瘤的化疗提供了新的靶向基因^[8]。还有研究表明,在肿瘤的免疫治疗中,建立有效的抗肿瘤免疫反应是机体杀死肿瘤细胞的关键环节,如在 Liu 等的研究数据显示,在 MAGE - A3 + 非小细胞肺癌细胞中,CRT 充当了内源性佐剂,较好地促进了树突状细胞的成熟和增强了 Th1 细胞样细胞毒性 T 淋巴细胞反应。因此,他们的研究结果可能会在帮助制定 MAGE - A3 + 非小细胞肺癌免疫疗法提供新的战略设计。CRT 在抗肿瘤免疫中扮演重要角色,因此,CRT 在抗肿瘤免疫的重要作用未来可能为肿瘤的免疫治疗开辟了新方向,提供了新途径。总之,随着 CRT 研究的不断深入,将有望在肿瘤的治疗中扮演越来越重要的角色。

五、展 望

综上所述,在肿瘤的综合治疗上,CRT 有着广泛的应用前景。大致可以总结为如下 3 个方面:①据大量的文献报道,CRT 在不同的肿瘤中均有异常表达,随着 CRT 在肿瘤发生、发展过程中所扮演的角色逐渐清晰,CRT 未来可能成为一种新的肿瘤标志物,并有望在肿瘤早期诊断及预后判断方面发挥作用;②在肿瘤免疫凋亡的吞噬和免疫应答方面 CRT 扮演者十分重要的角色。虽然其中许多机制还需许多研究不断充实,而且这些研究成果能否真正应用到临床还需许多临床可行性研究,但是随着 CRT 与肿瘤免疫的研究的不断发现,很有可能成为肿瘤综合治疗的一道曙光;③随着 CRT 与信号通路相关研究的不断深入,它们之间的相互作用可以为肿瘤的化疗提供新的靶向基因和潜在的分子治疗靶点。相信随着 CRT 与肿瘤研究的更进一步更深入的研究,一定会为肿瘤的综合治疗提供许多方法和途径,也将为肿瘤患者带去诸多福音。

参考文献

- 1 Lu YC, Weng WC, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 526524
- 2 Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44 (6):

842 – 846

- 3 Goitea VE, Hallak ME. Calreticulin and arginylated calreticulin have different susceptibilities to proteasomal degradation [J]. Biol chem, 2015, 290(26): 16403 – 16414
- 4 Shi F, Shang L, Pan BQ, *et al.* Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin – 1 expression via STAT5A [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6153 – 6162
- 5 Sheng W, Chen C, Dong M, *et al.* Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer [J]. Cell Physiol, 2014, 229(7): 887 – 897
- 6 Chang HH, Lee H, Hu MK, *et al.* Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(17): 4411 – 4420
- 7 金明, 张志伟, 罗招阳. 钙网蛋白与肿瘤的相关研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2015, 21: 3265 – 3268
- 8 Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, *et al.* Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(12): 3100 – 3104
- 9 Verneret M, Tacnet – Delorme P, Osman R, *et al.* Relative contribution of c1q and apoptotic cell – surface calreticulin to macrophage phagocytosis [J]. J Innate Immun, 2014, 6(4): 426 – 434
- 10 Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin [J]. Oncogene, 2010, 29(4): 482 – 491
- 11 Raghavan M, Wijeyesakere SJ, Peters LR, *et al.* Calreticulin in the immune system: ins and outs [J]. Trends Immunol, 2013, 34(1): 13 – 21
- 12 Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, *et al.* Mechanisms of translocation of ER chaperones to the cell surface and immunomodulatory roles in cancer and autoimmunity [J]. Front Oncol, 2015, 5: 7
- 13 Chao MP, Jaiswal S, Weissman – Tsukamoto R, *et al.* Calreticulin is the dominant pro – phagocytic signal on multiple human cancers and is

- counterbalanced by CD47 [J]. Sci Transl Med, 2010, 2(63): 63 – 94
- 14 Chuang CM, Monie A, Hung CF, *et al.* Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination [J]. J Biomed Sci, 2010, 17: 32
- 15 Tamura Y, Hirohashi Y, Kutomi G, *et al.* Tumor – produced secreted form of binding of immunoglobulin protein elicits antigen – specific tumor immunity [J]. J Immunol, 2011, 186(7): 4325 – 4330
- 16 Lwin ZM, Guo C, Salim A, *et al.* Clinicopathological significance of calreticulin in breast invasive ductal carcinoma [J]. Mod Pathol, 2010, 23(12): 1559 – 1566
- 17 Lee HH, Lim CA, Cheong YT, *et al.* Comparison of protein expression profiles of different stages of lymph nodes metastasis in breast cancer [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(3): 353 – 362
- 18 李晓曦, 孟琳, 王天一, 等. 下调钙网蛋白表达对乳腺癌干细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 [J]. 解剖科学进展, 2013, 4: 346 – 350
- 19 Liu R, Gong J, Chen J, *et al.* Calreticulin as a potential diagnostic biomarker for lung cancer [J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(6): 855 – 864
- 20 Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, *et al.* Calreticulin expression in neuroblastoma – a novel independent prognostic factor [J]. Ann Oncol, 2005, 16(2): 314 – 321
- 21 Minami S, Nagashio R, Ueda J, *et al.* Detection of tumor – associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer [J]. Biomed Res, 2014, 35(1): 25 – 35
- 22 Shi F, Shang L, Pan BQ, *et al.* Calreticulin promotes migration and invasion of esophageal cancer cells by upregulating neuropilin – 1 expression via STAT5A [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(23): 6153 – 6162
- 23 Sheng W, Chen C, Dong M, *et al.* Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer [J]. Cell Physiol, 2014, 229(7): 887 – 897

(收稿日期: 2016 – 09 – 28)

(修回日期: 2016 – 10 – 18)

(上接第 6 页)

- 15 Apostolou P, Fostira F, Papamentzelopoulou M, *et al.* CHEK2 c. 1100delC allele is rarely identified in Greek breast cancer cases [J]. Cancer Genet, 2015, 208(4): 129 – 134
- 16 Marouf C, Hajji O, Diakite B, *et al.* The CHEK2 1100delC allelic variant is not present in familial and sporadic breast cancer cases from Moroccan population [J]. Springerplus, 2015, 4
- 17 Thirthagiri E, Cheong LS, Yip CH, *et al.* CHEK2 * 1100delC does not contribute to risk to breast cancer among Malay, Chinese and Indians in Malaysia [J]. Famil Cancer, 2009, 8(4): 355 – 358
- 18 Wang N, Ding H, Liu C, *et al.* A novel recurrent CHEK2 Y390C mutation identified in high – risk Chinese breast cancer patients impairs its activity and is associated with increased breast cancer risk [J]. Oncogene, 2015, 34(40): 5198 – 5205
- 19 Han FF, Guo CL, Liu LH. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a Meta – analysis [J]. DNA Cell Biol, 2013, 32(6): 329 – 335

- 20 Liu C, Wang Y, Wang QS, *et al.* The CHEK2 I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and Meta – analysis [J]. Asian Pac J Cancer Preven, 2012, 13(4): 1355 – 1360
- 21 Baloch AH, Daud S, Raheem N, *et al.* Missense mutations (p. H371Y, p. D438Y) in gene CHEK2 are associated with breast cancer risk in women of Balochistan origin [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(2): 1103 – 1107
- 22 Guo X, Ward MD, Tiedebohl JB, *et al.* Interdependent phosphorylation within the kinase domain T – loop regulates CHK2 activity [J]. J Biol Chem, 2010, 285(43): 33348 – 33357
- 23 Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond [J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(6): 442 – 457
- 24 Parameswaran B, Chiang HC, Lu YZ, *et al.* Damage – induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection [J]. Cell Cycle, 2015, 14(3): 437 – 448

(收稿日期: 2016 – 10 – 15)

(修回日期: 2016 – 10 – 24)