

Hippo 信号通路在骨肉瘤中的研究进展

陈敬腾 方 硕 郭卫春

摘 要 骨肉瘤是临床上最常见的原发性恶性肿瘤之一,新辅助化疗使患者 5 年生存率得到提高,但是伴有肺部转移的患者 5 年生存率亦不足 20%,亟需新的治疗方案。Hippo 信号通路参与了哺乳动物多种细胞和器官的稳态调控,最近研究表明 Hippo 信号通路调控骨肉瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等恶性行为,Hippo 信号通路可能为骨肉瘤治疗提供新的靶点,本文综述了 Hippo 信号通路的组成、调节机制及骨肉瘤中 Hippo 信号通路分子变异情况,以期对骨肉瘤研究和防治提供更广阔思路。

关键词 骨肉瘤 Hippo 信号通路 进展

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.041

骨肉瘤是最常见的原发性骨肿瘤之一,5 年生存率仅 60% ~ 70%^[1]。相比其他肉瘤,骨肉瘤对放射敏感度低,目前其主要的治疗方式是手术切除辅以化疗,但是伴有肺部转移的患者 5 年生存率亦不足 20%,亟需寻找新的治疗方案^[2]。近年来提倡以免疫疗法、基因疗法及靶向治疗与化疗结合的综合治疗方案,而骨肉瘤基因存在着复杂的基因重组及拷贝基因变异,对其进行基因靶向治疗仍然是一项艰巨的任务^[3,4]。

Hippo 是一种进化上高度保守的信号转导通路,通过控制细胞增殖和凋亡起到调节器官大小和维持组织稳态的作用^[5]。现已发现,Hippo 信号通路可调控骨肉瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等恶性行为^[6]。但关于 Hippo 信号通路在骨肉瘤中的研究较少,分子调控机制尚不清楚。本文综述了 Hippo 信号通路的组成、调节机制及骨肉瘤中 Hippo 信号通路分子变异情况,以期对骨肉瘤研究和防治提供更广阔思路。

一、Hippo 信号通路的概述

对 Hippo 信号通路的描述始于 2003 年果蝇 hippo 基因的发现,Pan 和 Hariharan 实验室研究发现 Hippo 功能失活负性调控组织生长。随后,研究揭示 Hippo 信号通路是一种进化上高度保守的级联,由接头蛋白和调控 Yorkie(促生长转录调节因子)的抑制性激酶组成^[7]。哺乳动物中,Hippo 信号通路将来自

质膜和细胞质的信号传递到细胞核中,在核内调节多组不同靶基因的表达,从而控制细胞增殖、分化和凋亡。典型的 Hippo 信号转导通路包括哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1/2 (mammalian STE20-like protein kinase 1/2, MST1/2, 为果蝇 Hippo 同源物)、大肿瘤抑制基因 1/2 (large tumor suppressor 1/2, Lats1/2), 接头蛋白 Salvador 同源物 1 (Salvador homolog 1, SAV1)、Mob 激酶活化剂 1 (Mob kinase activator 1, MOB1)、Yes-相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP, 为 Yorkie 同源物)和具有 PDZ 结合基序的转录共激活因子 (transcriptional co-activator with PDZ binding motif, TAZ, 也称为含 WW 结构域的转录调节因子 1, WW domain-containing transcription regulator 1, WWTR1)^[7,8]。Hippo 信号通路打开时, MST1/2 激酶发生磷酸化以激活 Lats1/2 激酶,活化的 Lats1/2 在 Sav1 的辅助下激活 MOB1,继而 Lats1/2 的 PPxY (PY)基序与 YAP/TAZ 的 WW 结构域之间相互作用使 YAP/TAZ 磷酸化,磷酸化的 YAP/TAZ 与 14-3-3 结合后滞留在细胞质中,被 β -含有 E₃ 泛素转导重复蛋白连接酶 (β -transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, β -TRCP) 依赖性蛋白酶体降解,失去转录共激活作用。当 Hippo 信号通路关闭时,YAP/TAZ 转移至细胞核,与 TEA-含有特异性序列转录因子 (TEA domain-containing sequence-specific transcription factors, TEADs) 以及其他转录因子形成复合物,激活下游靶基因,促进肿瘤形成^[8,9]。

二、Hippo 信号通路的调节机制

笔者对 Hippo 信号通路的理解大部分来自于在上皮组织中进行的研究,其中 YAP/TAZ 的转录活性受 4 个相互关联的信号调节:①质膜蛋白,它可以直

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341078)

作者单位:430060 武汉大学人民医院骨科

通讯作者:郭卫春,教授,博士生导师,电子信箱:guoweichun@

aliyun.com

接与 YAP/TAZ 直接复合,从而在细胞-细胞连接处阻断质膜信号;②上游接头蛋白,它可以激活 Hippo 核心激酶,最终磷酸化 YAP/TAZ 以抑制其活性;③其他信号通路的交叉串扰调节;④作用于细胞的机械力,它可以局部控制 YAP/TAZ 定位。

1. 质膜蛋白:当细胞密度增加到一定程度时,生长调控信号通过质膜蛋白传递到上游 Hippo 蛋白,进而启动下游一系列细胞因子表达以调节细胞增殖。目前,研究较多的质膜蛋白有 Crumbs 极性复合物、G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptor, GPCR)、CD44 以及非典型钙黏蛋白 Fat。Crumbs 极性复合物是一种跨膜蛋白,招募位于顶端区域的支架蛋白介导细胞极性,它与其他极性蛋白质和黏附蛋白之间即相互作用,又为 Hippo 组件提供上游信号输入因子^[10]。GPCR 被认为是一种调节 Hippo 信号转导通路的质膜蛋白,YAP/TAZ 受到众多分泌信号和相关 GPCR 的调控,从而将 Hippo 信号通路与其他胞外信号联系起来,发挥更多的生理功能^[11]。跨膜透明质酸受体 CD44 在 Hippo 通路中起到重要作用,它与神经纤维蛋白 2 (neurofibromin2, NF2, 也称为 Merlin) 和其他支架蛋白相互作用,募集 Lats 到细胞膜并在那里磷酸化^[12]。非典型钙黏蛋白 Fat 能促进 FRMD6 扩增并定位到顶端连接,导致 MST1/2 的激活^[13]。

2. 上游接头蛋白:Hippo 通路的核心元件受上游复杂的调控网络控制。MST 和 Lats 激酶的活性受多种上游蛋白调节,包括含 Ras-相关结构域家族蛋白 (Ras-association domain containing family proteins, RASSFs1-10), 肾和脑蛋白 (kidney and brain protein, KIBRA), 一千零一个氨基酸蛋白 1 (thousand and one amino acid protein 1, TAO-1), MAP/微管亲和调节激酶 1 (microtubule affinity-regulating kinase 1, MARK1) 和 NF2^[14]。RASSFs 和 SAV1 通过与 SARAH (Salvador-RASSF-Hpo) 结合域相互作用调节 MST 活性,之后 MST1/2 与 SAV1 形成复合物以磷酸化 Lats1/2; MAT1/2-SAV1 复合物也可以结合 MOB1 使 MOB1 磷酸化,磷酸化的 MOB1 结合 Lats1/2 使其发生自我磷酸化^[15]。目前已经有越来越多的研究来探讨上游蛋白和 Hippo 激酶之间的相互作用,但它们结合到何种程度还取决于组织类型、细胞环境以及它们对典型 Hippo 信号通路的依赖性,这仍需要进一步的研究。

Hippo 信号通路在细胞接触抑制、细胞增殖和促进细胞凋亡中起重要作用。随着细胞汇合增加,肿瘤

抑制因子 NF2 定位在细胞连接处的附近以激活 Hippo 信号,研究表明抑制 YAP 可以抑制间皮瘤和脑膜瘤中 NF2 失活引起癌细胞的过度增殖;另外,敲除肝脏特异性 NF2 的小鼠中过表达显示阴性的 TEAD 能够抑制肿瘤生长^[16]。YAP/TAZ 和 Lats2 之间存在着负反馈回路,YAP/TAZ 和 TEAD 复合后通过 NF2 诱导 Lats2 表达,同时 Lats2 可以通过 AMOT 磷酸化抑制 YAP/TAZ 活性。另外,YAP 和 TAZ 之间也可能存在着负性调节,有研究表明,YAP 敲除的小鼠中 TAZ 富集,而体外抑制或过表达 YAP 会导致 TAZ 蛋白表达的反向变化^[17]。

3. 信号通路间的交叉串扰:细胞、器官、组织的状态和功能由一个多信号通路组成的形态发生信号整合网络调控,有研究者发现 Hippo 转导通路是这个整合网络的枢纽^[9]。虽然肉瘤中通路间交叉串扰仍需要进一步探讨,但是已有研究证明这个网络中许多通路可以单独引起肉瘤发生。YAP/TAZ 已经被公认为是众多信号级联的共转录激活因子。然而,目前人们对交叉串扰调节方式的认知还处于初步阶段,Hippo 信号通路与其他通路间是通过协同作用还是拮抗作用来调节生物活动的还需要进一步研究。

Wnt 通路与 Hippo 通路之间存在着相互作用以调节细胞功能。Rosenbluh 等在 85 个癌细胞系 (包括骨肉瘤) 中进行全基因组规模的功能丧失筛选,发现肿瘤 Wnt 活化依赖于 β -catenin 和转录因子 TBX5。 β -catenin 来源的原位结肠癌小鼠模型中 β -catenin 与 YAP 形成复合物参与肿瘤形成^[18]。Heallen 等^[19]发现敲除小鼠心肌细胞 Hippo 组件中的 Sav1, MST1/2 或 Lats2 后 YAP 活性增加,且心肌细胞增殖增强。对这些小鼠进行基因谱分析发现 Wnt 活性增强,而条件性缺失 β -catenin 一条等位基因后心肌细胞功能受到抑制,证实了 Wnt 与 Hippo 通路间的相互作用。TGF- β 和 Hippo 信号通过协同作用指导细胞行为。YAP/TAZ 与 SMADs 相互作用以促进 TGF- β 和 BMP 靶基因的转录,TGF- β 信号转导可以调节 YAP/TAZ 表达以驱动间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 分化^[20]。Hong 等用 BMP2 处理 MSC,发现 TAZ 表达增加,其与 Runx2 的相互作用也增强以促进成骨细胞分化。Notch 与 Hippo 信号转导间的也存在着协同作用的“交叉串扰”。Notch 已被证明是骨和软组织肉瘤的驱动因素^[21]。在 YAP/TAZ 机械依赖性调节信号转变为 Notch 信号转导调节的过程中,YAP/TAZ 将来自细胞外基质的物理刺

激转化为细胞-细胞间信号级联,继而控制细胞增殖、凋亡、分化等^[22]。综上,在调节细胞生物学和恶性肿瘤方面,这些见解为研究 Hippo 信号通路提供了更深入的认识。

4. 机械力因素:细胞在发挥维持体内稳态,促进器官发育的功能时,必须及时感知微环境变化且对变化做出相应改变,除了传输生物化学信号外,细胞还可以从机械力信号中提取信息。在细胞水平,机械力转导是通过感知物理刺激(细胞外基质的弹力和细胞-细胞或细胞-基质相互作用产生的力)将其转化为生物信号,细胞通过快速支架重塑来适应这种物理刺激,将支架重塑与细胞生物行为变化联系起来的动态因子即 YAP 和 TAZ^[23]。因此,机械力刺激可以通过调节 YAP/TAZ 活性调节细胞命运,并决定干细胞维持、增殖和分化。

在高机械应力和低细胞接触的情况下,YAP/TAZ 转录活跃,而致细胞增殖及组织生长;随着细胞接触增加,黏附分子激活 Lats,导致 YAP/TAZ 磷酸化而无法进入细胞核发挥转录作用^[9]。F-肌动蛋白聚合和应力纤维形成均可使 YAP/TAZ 定位于核内而活化,而破坏 F-肌动蛋白则抑制 YAP/TAZ 转录活性。细胞外基质硬度以及细胞形状可以控制 Rho-GTP 酶的活性及应力纤维和肌动蛋白束的形成来调节 YAP/TAZ 定位;而当培养于高硬度细胞外基质或被制成“伸展”形态时,YAP 和 TAZ 在核内活化且 MSC 分化成成骨细胞^[24]。可见 YAP 和 TAZ 充当这机械力转导的感受器和细胞对机械信号响应的介质,YAP/TAZ 的这种机械力因素取代了来自细胞-细胞或细胞-基质的接触因素。

三、骨肉瘤 Hippo 信号通路变异

1. YAP:人类组织芯片分析证实骨肉瘤中 YAP1 表达量高于周围非肿瘤组织,并且表达量与肿瘤级别相关,78% 的人类骨肉瘤样本中 YAP1 高表达,同时靶基因表达量也增多^[25]。体外实验中,抑制 YAP 表达后细胞增殖及细胞侵袭能力降低,Runx3、CyclinD1 和 MMP-9 的表达量也降低;动物实验中,抑制小鼠异种移植骨肉瘤或转基因小鼠成瘤模型的 YAP 活性后肿瘤生长被抑制^[26]。

骨肉瘤中 YAP 上调的机制复杂,其中干细胞转录因子 Sox2 起着重要作用。在小鼠骨肉瘤细胞系中,Sox2 直接抑制 Hippo 通路激活剂 NF2 和 Kibra,导致 YAP 高表达,细胞继续培养成为干细胞富集的骨肉瘤球后,YAP 表达量则更高(而 NF2 表达量更低)。

在敲除 Sox2 基因的细胞中,无论是 Yap 过度表达还是 NF2 抑制都能促使骨肉瘤球形成;而抑制 YAP 或者高表达 NF2 却促进成骨分化并抑制骨肉瘤球形成。过表达野生型 YAP 或活化重组突变型 YAP 能够抑制 NF2 诱导的骨肉瘤细胞分化表型,而缺乏 TEAD 结合位点的突变型 YAP 没有此作用。Sox2 通过经典 Hippo 信号转导途径调节 YAP 活性,抑制 MST1/2 或 Lats1/2 消除了 NF2 诱导的成骨分化作用,YAP 的表达和功能也发生变化^[27]。

YAP 上调也可受 Hedgehog 通路调节。Ptc1^{+/+}、p53^{+/-}、HOC-Cre 突变小鼠中恶性骨肉瘤具有高外显率,在 p53 杂合背景下 Hedgehog 信号部分上调,并且所得肿瘤中 YAP1 高表达,而在抑制 Hedgehog 信号后 YAP1 表达又显著降低,YAP1 所引起的肿瘤进展也被抑制。Chan 等^[28]也表明 Hh-YAP 轴可能通过调节 LncRNA-H19 的表达导致肿瘤发生。

2. RASSFs:现已证明 RASSF5 与 RASSF10 是骨肉瘤的肿瘤抑制因子,类似于 RASSF 家族中其他成员,在人类肿瘤(包括骨肉瘤)CpG 岛启动子超甲基化作用下 RASSF5 和 RASSF10 下调。在一份载有 45 例骨肉瘤样本的组织芯片数据中,RASSF5 显著下调,其表达量与肿瘤远处转移呈负相关。体外实验中,抑制 U2OS 细胞 RASSF5 表达,则 MST1 促凋亡功能失活,从而抵抗 TNF- α 诱导的细胞凋亡;相反地,高表达骨肉瘤细胞系中的 RASSF5,细胞的增殖能力和侵袭能力减弱,而细胞凋亡增强^[29]。

3. NF2:人类生殖细胞或体细胞中 NF2 的一个等位基因突变将会导致 2 型神经纤维瘤病发生,该突变与神经鞘瘤,脑膜瘤和室管膜瘤也有相关性。NF2 杂合的小鼠具有高致瘤率,能导致多种恶性肿瘤发生,其中骨肉瘤发生率为 63%。而在这些肿瘤体细胞内野生型 NF2 等位基因均存在突变,也就意味着 NF2 杂合性的丧失可能导致肉瘤生成。

4. CD44:CD44 是一种细胞表面糖蛋白,可将细胞外信号传递给 ERK,AKT 和 Hippo 通路。研究发现,异种移植小鼠中降低 CD44 表达可以观察到骨肉瘤恶性表型增强,但在体外实验中,发现 CD44 被 NF2 抑制后会导致骨肉瘤细胞系迁移和侵袭能力减弱。Hartmann 等表明 NF2 与 CD44 复合后通过 ECM 信号介导接触生长抑制。

5. MOB1:在体外实验中,MOB1A 高表达会降低细胞增殖能力,而抑制 MOB1A 表达将导致异常有丝分裂。在缺失 MOB1A 和 MOB1B 的双突变小鼠中,

两个等位基因完全丧失(MOB1A^{Δ/Δ}1B^{tr/tr},MOB1A 无效突变,MOB1B 基因陷阱)会导致胚胎死亡。然而,保留任一个等位基因(MOB1A^{Δ/+}1B^{tr/tr}或 MOB1A^{Δ/Δ}1B^{tr/+})的双突变小鼠可在 70 周内存活,并且 100% 能自发形成肿瘤。24% 的小鼠(9/37)出现骨外骨肉瘤,而 92% 小鼠(34/37)出现良性外生骨疣。检测单个杂合子(MOB1A^{Δ/+}1B^{tr/tr}或 MOB1A^{Δ/Δ}1B^{tr/+})组中,发现所有肿瘤都显示野生型 MOB1 等位基因缺失,表明杂合性缺失可能是肿瘤生长所必需的。

四、展 望

Hippo 信号通路是一种进化上保守的肿瘤抑制网络,不仅对正常的细胞、组织和器官的发育,体内平衡和修复有重要作用,在许多癌症中也发现它调控异常。目前,上游核心 Hippo 通路成员、接头蛋白的遗传和表观遗传失调已经被注意到,Hippo 信号在正常和癌性间充质细胞行为和命运的机械转导中的作用提供了对肉瘤生物学的更多见解。Hippo 通路中单个基因的突变会造成通路调节的失调进而促进肿瘤的发生,但其在骨肉瘤中发生、发展机制尚不清楚,需要进一步的研究来阐明特定肉瘤亚型中 Hippo 途径失调的潜在机制,为成功开发治疗干预骨肉瘤提供基础。

参考文献

- Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma[J]. Cancer Treat Res, 2009,152: 3-13
- Vijayamurugan N, Bakhshi S. Review of management issues in relapsed osteosarcoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2014,14(2): 151-161
- Gianferante DM, Mirabello L, Savage SA. Germline and somatic genetics of osteosarcoma - connecting aetiology, biology and therapy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017,13(8): 480-491
- Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The genetics of osteosarcoma[J]. Sarcoma, 2012,2012: 627254
- Maugeri - Sacca M, De Maria R. The Hippo pathway in normal development and cancer[J]. Pharmacol Ther, 2018,186:60-72
- Deel MD, Li JJ, Crose LE, et al. A Review: molecular aberrations within Hippo signaling in bone and soft - tissue sarcomas[J]. Front Oncol, 2015,5:190
- 吉新彦, 钟国轩, 赵斌. 哺乳动物 Hippo 信号通路分子机制研究进展[J]. 遗传, 2017,39(7): 546-567
- Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. Cancer Cell, 2016,29(6): 783-803
- Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer[J]. Cell, 2015,163(4): 811-828
- Margolis B. The crumbs3 polarity protein[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018,10(3): a027961
- 许传铭, 万福生. 哺乳动物 Hippo 信号通路: 肿瘤治疗的新靶点[J]. 遗传, 2012,34(3): 269-280

- Yin F, Yu J, Zheng Y, et al. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2[J]. Cell, 2013,154(6): 1342-1355
- 史梦婕, 邵松军, 李洁媚, 等. Hippo 通路和肿瘤相关性研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2014,36(3): 361-365
- Mohseni M, Sun J, Lau A, et al. A genetic screen identifies an LKB1 - MARK signalling axis controlling the Hippo - YAP pathway[J]. Nat Cell Biol, 2014,16(1): 108-170
- Sanchez - Sanz G, Matallanas D, Nguyen LK, et al. MST2 - RASSF protein - protein interactions through SARAH domains[J]. Brief Bioinform, 2016,17(4): 593-602
- Sato T, Sekido Y. NF2/Merlin inactivation and potential therapeutic targets in mesothelioma[J]. Int J Mol Sci, 2018,19(4): E988
- Moroishi T, Park HW, Qin B, et al. A YAP/TAZ - induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis[J]. Genes Dev, 2015,29(12): 1271-1284
- Kim NH, Lee Y, Yook JI. Dishevelled Wnt and Hippo[J]. BMB Rep, 2018,51(9): 425-426
- Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size[J]. Science, 2011,332(6028): 458-461
- Grannas K, Arngarden L, Lönn P, et al. Crosstalk between Hippo and TGFbeta: subcellular localization of YAP/TAZ/Smad complexes[J]. J Mol Biol, 2015,427(21): 3407-3415
- Tao J, Jiang MM, Jiang L, et al. Notch activation as a driver of osteogenic sarcoma[J]. Cancer Cell, 2014,26(3): 390-401
- Totaro A, Castellan M, Di Biagio D, et al. Crosstalk between YAP/TAZ and notch signaling[J]. Trends Cell Biol, 2018,28(7): 560-573
- Dupont S. Role of YAP/TAZ in cell - matrix adhesion - mediated signalling and mechanotransduction[J]. Exp Cell Res, 2016,343(1): 42-53
- 门通, 朴善花, 滕春波. Hippo 信号通路转录效应因子 TAZ/YAP 对间充质干细胞分化的调控[J]. 遗传, 2013,35(11): 1283-1290
- Zhang YH, Li B, Shen L, et al. The role and clinical significance of YES - associated protein 1 in human osteosarcoma[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2013,26(1): 157-167
- 魏光兵, 杨魁, 余均辉, 等. YAP 蛋白在结肠癌中的表达及其对 SW480 细胞增殖和侵袭的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2018,26(14): 2209-2214
- Basu - Roy U, Bayin NS, Rattanakornt, et al. Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells[J]. Nat Commun, 2015,6: 6411
- Chan LH, Wang W, Yeung W, et al. Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression[J]. Oncogene, 2014,33(40): 4857-4866
- Nussinov R, Zhang M, Tsai CJ, et al. Autoinhibition in Ras effectors Raf, PI3Kalpha, and RASSF5: a comprehensive review underscoring the challenges in pharmacological intervention[J]. Biophys Rev, 2018,10(5): 1263-1282 (收稿日期:2018-11-26)

(修回日期:2018-12-05)