

Hippo Pathway Expression Changes and the Mechanism of Transformation in Colon Polyps and Colorectal Cancer

Tong Qiu¹ Jialin Wang^{2*}

1. People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia, 010010, China

2. Department of Gastroenterology, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia, 010010, China

Abstract

In China, the incidence of colorectal cancer ranks the third. Hippo pathway, as a tumor suppressor signal transduction pathway that maintains tissue homeostasis and controls organ size, participates in the development of colorectal cancer. Merlin is the only known tumor suppressor gene upstream of Hippo pathway. Following the adenoma-cancer mechanism, adenomatous polyps undergo dysplasia stage into invasive cancer, therefore, the study of the expression of Merlin and Hippo pathway in colon polyps, colorectal cancer and their transformation, can provide theoretical basis for early diagnosis of colorectal cancer, at the same time provide new ideas for targeted treatment of colorectal cancer.

Keywords

Hippo signaling pathway; Merlin; colon polyp; colorectal cancer

结肠息肉和结直肠癌中 Hippo 通路的表达变化及转化机制研究

邱彤¹ 王佳林^{2*}

1. 内蒙古自治区人民医院, 中国·内蒙古 呼和浩特 010010

2. 内蒙古自治区人民医院消化内科, 中国·内蒙古 呼和浩特 010010

摘要

在中国, 结直肠癌的发病率位居第三, Hippo通路作为一条维持组织稳态、控制器官大小的抑癌信号转导通路, 参与结直肠癌的发生发展过程, Merlin是目前已知的Hippo通路上游唯一一个肿瘤抑制基因。遵循腺瘤-癌机制, 腺瘤性息肉经历异型增生阶段转变为浸润性癌症, 因此, 研究Merlin和Hippo通路在结肠息肉、结直肠癌以及二者转化过程中的表达变化, 可以为早期结直肠癌的诊断提供理论依据, 同时为结直肠癌的靶向治疗提供新的思路。

关键词

Hippo信号通路; Merlin; 结肠息肉; 结直肠癌

1 引言

结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 在全球癌症发病率中位居第三, 在全球癌症死亡率中位居第二。在中国, 结直肠癌的发病率位居第三, 且近几年死亡率呈上升趋势^[1]。结直肠癌 1 期的治疗效果最好, 大部分患者可以治愈, 其 5 年生存率可达到 90% 以上, 而 4 期可发生广泛转移, 其 5 年生存率为 8%。了解结直肠癌的分子基础及其从腺瘤到癌的进展, 可提高早期病例的治愈率和晚期病例的生存率。

从组织学和内镜角度来看, 结直肠癌开始是一个小的

肿瘤性息肉, 它逐渐增大并通过不典型增生阶段转变为浸润性癌症。结直肠癌的发生发展涉及多个基因及多条信号转导通路的异常, 其中 Hippo 信号通路发挥重要作用。Hippo 通路通过调节细胞增殖、凋亡和分化, 在细胞命运决定、组织稳态和器官大小的控制中发挥关键作用, 该通路的失调与许多人类恶性肿瘤有关。

2 Hippo 通路概述

2.1 Hippo 通路的组成部分

Hippo 通路是一种高度保守的激酶级联, 主要调节细胞增殖、存活、移动性、干性和分化, 最初是在黑腹果蝇中通过肿瘤抑制因子的遗传筛选而发现的, 肿瘤抑制因子的功能丧失可能导致组织过度生长。哺乳动物 Hippo 通路的核心激酶包括哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1 和 2 (MST1/2), 萨尔瓦多同系物 1 (SAV1), 大型肿瘤抑制因子 1 和 2

【作者简介】邱彤 (1998-), 女, 中国内蒙古鄂尔多斯人, 本科, 从事消化内科研究。

【通讯作者】王佳林 (1972-), 男, 中国内蒙古鄂尔多斯人, 硕士, 主任医师, 从事消化内科研究。

(LATS1/2), MOB 激酶激活剂 1A 和 1B (MOB1A 和 MOB1B), 近年来研究发现, 核 Dbf2 相关 1/2 (NDR1/2) 和丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 (MAP4Ks) 是 Hippo 通路的新组分。yes 相关蛋白 (YAP) 和具有 pdz 结合基序的转录共激活因子 (TAZ) 是主要的效应因子。YAP/TAZ 的主要结合伙伴是转录增强相关结构域 (TEADs), 它们与 DNA 结合以启动转录。

2.2 Hippo 通路的调控机制

上游信号激活 Hippo 通路, MST1/2 和 / 或 MAP4Ks 磷酸化并激活, 进而激活 LATS1/2, MOB1/2 和 / 或 NDR1/2。随后, 导致 YAP 和 TAZ 磷酸化, 通过与 14-3-3 蛋白相互作用并经历进一步的泛素化依赖性降解。相反, 当 Hippo 信号被抑制时, 去磷酸化的 YAP/TAZ 转移到并积聚在细胞核中, 与 TEADs 和其他转录因子结合, 启动靶基因转录, 从而调节组织稳态和生长。

2.3 Hippo 通路的负反馈回路

LATS1/2 是 YAP/TAZ 的负调控因子, 研究表明, YAP/TAZ 和 TEADs 复合物既可以直接刺激 LATS2 激酶的表达, 又可以通过 NF2 间接诱导 LATS1/2 的表达, 这对 Hippo 通路形成负反馈。YAP/TAZ 的过度激活可以促进组织发育和再生, 而失活则会损害组织发育和再生。因此, 该反馈回路是调控 YAP/TAZ 稳态和功能的有效机制。

2.4 Hippo 通路的上游信号

多种细胞信号可以调节 Hippo 通路。II 型神经纤维瘤病 /Merlin (NF2) 和 Kibra 可激活 MST1/2, 而一千零一氨基酸蛋白激酶 (TAO-k) 可激活 MST1/2 和 MAP4Ks。Ras 关联结构域家族蛋白 1a (RASSF1A) 可以促进 MST1/2 的激活, 从而促进细胞凋亡。G 蛋白偶联受体 (GPCR) 信号可以间接激活或抑制 LATS1/2, 这取决于偶联的 G 蛋白。通过 G12/13-、Gq/11- 和 Gi/o- 偶联受体介导的信号转导抑制 LATS1/2 激酶, 从而激活 YAP/TAZ 的功能。相反, 刺激 Gs- 偶联受体导致 LATS1/2 的激活和下游效应因子 YAP/TAZ 的抑制。

上游信号除了激活核心 Hippo 激酶抑制 YAP/TAZ 外, 还可以直接抑制 YAP/TAZ 的核定位。血管生成素家族蛋白 (AMOT) 和蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 14 型 (PTPN14) 将 YAP/TAZ 隔离在紧密连接处, YAP/TAZ 也可以通过与 α -连环蛋白 (α -catenin) 相互作用隔离在黏附连接处。

2.5 Hippo 通路和其他途径之间的相互作用

Hippo 和 Wnt 通路。WNT 信号在肠组织稳态和干细胞维持中起着重要作用。Hippo 通路的激活通过细胞质 YAP/TAZ 和磷酸化 YAP/TAZ 抑制 WNT 信号通路, 而 Hippo 通路的关闭通过核 YAP 和去磷酸化 YAP 促进 WNT 靶基因表达^[2]。此外, WNT 激活 β -catenin 可激活和上调 YAP 和 TAZ。除了 Wnt 外, Notch 通路也是维持肠干细胞 (ISCs) 所必需的, Notch 信号还可以决定细胞在分化过程中的命

运。高 Notch 活性促进转运扩增细胞沿吸收谱系分化, 而抑制 Notch 信号导致干细胞特性丧失并诱导分泌谱系分化。Hippo 通路可以调节 Notch 信号。条件敲除肠道中的 MST1/2 可促进 NICD 的核积累, MST1/2 的缺失通过降低 YAP 的磷酸化、增加 YAP 的丰度和核积累强烈激活 Notch 信号。因此, Hippo 通路可以通过磷酸化和抑制 YAP 来抑制 Notch 信号^[3]。

3 Merlin 的结构和功能

2 型神经纤维瘤病 (Neurofibromatosis Type 2) 患者携带一个突变的 NF2 等位基因, 并发展出一个高度特异的中枢和外周神经系统肿瘤亚群, NF2 相关的肿瘤包括神经鞘瘤、脑膜瘤和室管膜瘤。NF2 (Neurofibromatosis Type 2) 肿瘤抑制基因编码 FERM (4.1 蛋白 /Ezrin/Radixin/Mosin) 结构域蛋白 Merlin, 除了常染色体显性 NF2 疾病外, 非生殖系 Merlin 缺乏症是导致几乎所有前庭神经鞘瘤、大多数脑膜瘤和一小部分室管膜瘤零星发生的驱动因素。此外, 发现 Merlin 在很大比例的恶性间皮瘤中失活, 在其他实体肿瘤中失活程度较小。

3.1 Merlin 蛋白的调节

Merlin 蛋白由细胞间黏附和细胞外基质的附着协同调节。钙粘蛋白的结合使 PAK 失活, 导致活性的去磷酸化形式的 Merlin 积累。由于整合素附着到细胞外基质激活 PAK, 因此可以独立于接触介导的信号传导调节 Merlin。

3.2 Merlin 蛋白的结构

Merlin 由一个球状氨基末端 FERM 结构域和一个羧基末端亲水尾部组成, 由一个柔性卷曲的螺旋段连接, FERM 结构域可以与羧基末端亲水尾部形成分子内关联。通过全面的生化研究, Anthony Bretscher 等人表明, 磷酸化的 Merlin 显示出更高的域间结合, 因此 Merlin 在其开放状态下抑制细胞生长。观察到稳定封闭的 Merlin 突变体不会抑制细胞生长, 而 Merlin-2 和 S518A 突变体 (两者在结构域间结合方面都有缺陷, 因此更开放) 在与野生型 Merlin 相同的程度上抑制生长。这些结果表明, S518 磷酸化或突变导致 Merlin 变得更封闭, 导致生长抑制降低, 而开放形式的 Merlin 在生长抑制中更活跃。Merlin 的 FERM 结构域与 CRL4^{DCAF1} E3 泛素连接酶直接相互作用, 抑制其泛素化活性和下游致癌信号传导。

3.3 Merlin 蛋白的功能

Merlin 抑制细胞皮层的有丝分裂信号传导, 以介导接触抑制和肿瘤抑制。首先, 活性 Merlin 抑制 Rac-PAK 信号, 独立于 Akt 抑制 mTORC1 的激活, 抑制 PI3K-Akt 和 FAK-Src 信号, 并负调控 EGFR-Ras-ERK 途径, 然而, Merlin 抑制这些途径的机制尚不清楚, 这些促有丝分裂信号对各种 Merlin 缺陷性恶性肿瘤的相对贡献尚不清楚。其次, Merlin 激活了 Hippo 肿瘤抑制通路, 以抑制哺乳动物或果蝇的转录

辅激活因子 YAP/TAZ, 揭示了 Merlin 在调节器官大小、干细胞行为和细胞增殖方面的保守作用。值得注意的是, 除 Merlin 外, 在人类肿瘤中几乎没有发现 Hippo 通路成分的种系或体细胞突变, 它仍然是 Hippo 途径中唯一真正的肿瘤抑制剂。最后, 核定位的 Merlin 抑制 CRL4^{DCAF1} E3 泛素连接酶以抑制致癌基因的表达。

在角质形成细胞和皮肤上皮中, Merlin 被招募到 α -catenin 中, 并促进其与 Par3 的结合, 帮助粘附物连接的成熟。在紧密连接处, Merlin 与 AMOT 结合并取代 Rich (Rac 的 GTPase 激活蛋白), 从而抑制 Rac-PAK 信号。因此, Merlin 对紧密连接处 Rac 的抑制促进了接触抑制, 并作为有丝分裂信号传导的屏障^[4]。

Merlin 调控 Hippo 通路的确切机制尚无定论。Yin 等人认为 Merlin 促进下游 Hippo 信号通路, 而不激活 MST 的内在激酶活性。Merlin 和 LATS 之间的直接物理相互作用通过将 LATS 招募到质膜来促进 Hippo 信号传递。SAV 是一种膜相关支架, 可促进 LATS 上游激酶 MST 的膜结合。因此, 两种主要的膜相关蛋白 Merlin 和 SAV 参与了 Hippo 激酶盒中的两种必需激酶靶向到质膜^[5]。其次, Fisun Hamaratoglu 等人的研究表明, Merlin 和 Expanded 在果蝇体内通过 Hpo (MST 同源物) 信号上游发挥作用, 从而发挥其肿瘤抑制功能, 由于 Hippo 信号通路的所有已知成分和信号转导机制在果蝇和脊椎动物中都是保守的, 可以推测 Merlin 和 Expanded 同源物可能通过 Hpo 同源物 MST1/2 作为肿瘤抑制基因发挥作用^[6]。第三, Zhang 等人对果蝇的研究表明, Merlin 与其他两种顶端膜定位蛋白 Expanded 和 Kibra 一起调节 Hpo-Sav 激酶复合物的作用, 果蝇和哺乳动物之间 Merlin 活性的功能保护表明, Hippo 信号的这一方面在哺乳动物中可能是保守的^[7]。

去磷酸化的 Merlin 转移到细胞核, 结合并抑制 CRL4^{DCAF1} E3 泛素连接酶。由于大量 Merlin 穿梭于接触抑制细胞的细胞核, 梅林的核功能可能对生长抑制至关重要。事实上, 多条证据表明 Merlin 主要通过抑制 CRL4^{DCAF1} 抑制肿瘤发生。在几种细胞系中进行的遗传上位性实验显示, Merlin 通过抑制 CRL4^{DCAF1} 介导其抑瘤和抗有丝分裂作用。此外, 由于核定位缺陷、Merlin-DCAF1 结合破坏或这些畸变的组合, 多个患者来源的 Merlin 错义突变体无法与 DCAF1 相互作用。

4 Hippo 通路与结肠息肉

对 175 例经内镜从家族性腺瘤性息肉病 (FAP) 患者中切除的管状腺瘤中的 YAP 进行染色, 几乎所有腺瘤 (175 例中的 174 例) 与其邻近非肿瘤组织相比, 在肿瘤上皮中表现出 YAP 的核积聚, 这表明 YAP 激活是管状腺瘤的一般特征。

Peutz-Jeghers 综合征 (PJS) 以胃肠道良性息肉的发展

为特征, 这些息肉可导致出血、肠梗阻和疼痛。PJS 患者患各种癌症的风险增加, 尤其是胃肠道肿瘤。观察到这些患者的息肉显示 YAP1 核定位增加。

对编码 Hippo 通路成分基因的肠上皮特异性敲除小鼠的研究表明, Hippo 通路的肿瘤抑制因子失活或 YAP 过度激活可能导致肿瘤形成, 并且这种作用依赖于 YAP。野生型小鼠, YAP 缺失小鼠以及 SAV1-YAP 双突变小鼠具有正常的隐窝结构和增殖细胞, 而 SAV1 缺失小鼠隐窝增大、增殖细胞增多, YAP S112 磷酸化水平下降以及 YAP 核积累。13 个月龄时, SAV1 缺失小鼠出现结肠息肉, 而对照同窝小鼠在同年龄均未出现息肉, 组织学分析表明, 这种息肉为无柄锯齿状息肉 (SSP), 后来, 观察到 SSP 的腺瘤性转化和肿瘤腺体对肌层黏膜的侵袭。同样, 在人类 SSP 中也观察到 YAP 的核聚集。此外, 肠上皮中 MST1 和 MST2 特异性敲除的小鼠发展为发育不良的小肠及结肠自发性腺瘤^[8]。

5 Hippo 通路与结直肠癌

Liang 等人发现, 与健康结肠相比, 结直肠癌中 LATS1 和 MST1/2 mRNA 比值降低, YAP、TAZ、TEAD mRNA 水平升高。在正常结肠组织中, YAP 主要表达于肠干细胞所在的基底隐窝区。YAP 对于肠道再生和肿瘤发生至关重要。结肠腺癌组织中 YAP 蛋白在胞浆和细胞核中的表达均显著升高。YAP、TAZ 蛋白表达水平与肿瘤分期、淋巴结状态、转移呈正相关。YAP 蛋白表达升高, 血浆癌胚抗原 (CEA) 水平升高, 是早期结直肠癌患者预后的潜在生物标志物。

对结直肠癌患者和人结直肠癌衍生细胞系样本的研究支持 YAP1 和 TAZ 在 CRC 中的致癌特性。在 CRC 患者中观察到 YAP1 蛋白表达水平与不良预后呈正相关, TAZ 也是 CRC 的预后指标。在人结直肠癌细胞系中, 敲除 YAP1 导致细胞增殖、转移和侵袭显著减少, 而 YAP1 过度表达导致增殖率增加。在体外和异种移植小鼠模型中, 敲除 TAZ 导致细胞增殖减少。这些研究表明 YAP1 和 TAZ 作为癌基因存在于 CRC 中。

肿瘤干细胞 (Cancer Stem Cells, CSCs) 是影响结直肠癌治疗抵抗和疾病复发的主要因素。Hippo/YAP 的异常激活促进了 CRC 中 CSCs 的过度自我更新和治疗耐药性, YAP 信号在结直肠癌耐药中起关键作用。

6 结语

Hippo 通路可作为癌症靶向治疗的目标。第一, 靶向激酶。Hippo 途径中的大多数激酶是肿瘤抑制因子, 恢复肿瘤抑制激酶的功能是一项具有挑战性的任务。同源结构域相互作用蛋白激酶 2 (HIPK2) 因在 p53 介导的 DNA 损伤反应中的作用而具有肿瘤抑制特性, 也有研究表明, HIPK2 激活 YAP, 促进黑腹果蝇的组织生长, 这意味着 HIPK2 靶向可能是一种有价值的治疗策略。第二, 靶向 YAP 和 TAZ。YAP 对于某些组织的正常生长和内环境稳定是不必要的,

因此潜在地限制了 YAP/TAZ 抑制的副作用。此外, 由于 YAP/TAZ 在介导 Hippo 通路信号中具有关键作用, 因此对靶向 YAP 和 TAZ 的药物产生耐药性的机会可能有限。最近发现了 YAP 的小分子抑制剂, 苯并吡啉衍生物维特波芬在临床上用作黄斑变性光凝治疗中的光敏剂, 在阻断由 YAP1 过度表达或 NF2 缺失驱动的小鼠肝肿瘤发生中具有中度有效性。第三, 其他治疗靶点。刺激 YAP 活性的 LPA 和 S1P 可作为潜在靶点。S1P 拮抗剂鞘氨醇单抗可减弱 vivo 中膀胱癌细胞的转移^[9]。

Hippo 通路与结肠息肉、结直肠癌的发生、发展密切相关, Merlin 作为 Hippo 通路上游唯一一个肿瘤抑制基因, 值得研究结肠息肉、结直肠癌中是否有 Hippo 通路的表达变化, 明确 Merlin 通过 Hippo 通路调控 YAP 是否在结肠的腺瘤-癌转化过程中发挥作用, 为早期结直肠癌的诊断提供理论依据, 同时为结直肠癌的靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Xia C, Dong X, Li H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl)*, 2022(135):584-590.
- [2] Xie Z, Wang Y, Yang G, et al. The role of the Hippo pathway in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Cell Death Dis*, 2021(12):79.
- [3] Hong AW, Meng Z, Guan KL. The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016(13):324-337.
- [4] Cooper J, Giaccotti FG. Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function. *FEBS Lett*, 2014(588):2743-2752.
- [5] Yin F, Yu J, Zheng Y, et al. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*, 2013(154):1342-1355.
- [6] Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2006(8):27-36.
- [7] Zhang N, Bai H, David KK, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Dev Cell*, 2010(19):27-38.
- [8] Cai J, Zhang N, Zheng Y, et al. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev*, 2010(24):2383-2388.
- [9] Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2013(13):246-257.