

磷酸酶及张力蛋白同源物与肝细胞肝癌

谭麟 张谢 李宏

【摘要】 磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 基因, 又名多种晚期癌突变 (MMAC1) 基因, 是一种经典的肿瘤抑制基因, 被视为 p53 后最重要的抑癌基因。PTEN 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 脂质磷酸酶通路的活动, 支配大量的细胞过程, 包括生存、增殖、能量代谢和细胞结构。因此, PTEN 调节机制的表达和功能包括转录调控、由非编码 RNA 转录后调控、转录后修饰和蛋白质之间的相互作用, 都是在改变癌症。许多研究表明, PTEN 基因的突变或缺失与肝细胞肝癌 (HCC) 密切相关。HCC 的肿瘤组织中 PTEN 通常表现为低表达, 而 PTEN 的低表达往往预示着 HCC 更早的肿瘤转移以及更差的预后。通过 PTEN 进行肿瘤治疗有许多尝试, 特别是 PTEN-long 的发现又增加了一种新的选择。

【关键词】 磷酸酶及张力蛋白同源物; 肝细胞肝癌; 治疗

Phosphatase and tensin homolog and hepatocellular carcinoma Tan Lin, Zhang Xie, Li Hong. Ningbo University Medical College, Ningbo 315211, China

Corresponding author, Li Hong, E-mail: lihong6363@hotmail.com

【Abstract】 Phosphatase and tensin homolog (PTEN), also known as muted in multiple advanced cancers gene (MMAC1), is a classic tumor suppressor gene. PTEN is considered as the most important tumor-suppressor gene after p53. PTEN governs multiple cellular processes including cell survival, proliferation, energy metabolism and cellular architecture via suppressing PI3K/AKT/mTOR pathway through lipid phosphatase. Consequently, the mechanisms of regulating PTEN expression and function including transcriptional regulation, post-transcriptional regulation by non-coding RNA, post-translational modifications and protein-protein interaction collectively alter the cancer. Many studies have demonstrated that the mutation or loss of PTEN is closely correlated with hepatocellular carcinoma (HCC). PTEN is lowly expressed in the HCC tissues. Low expression of PTEN constantly indicates a higher risk of tumor metastasis and worse clinical prognosis. Application of PTEN to treat cancer has been attempted. In particular, the discovery of PTEN-long serves as a novel option.

【Key words】 Phosphatase and tensin homolog; Hepatocellular carcinoma; Treatment

磷酸酶及张力蛋白同源物 (PTEN) 基因, 又名多种晚期癌突变 (MMAC1) 基因, 是一种经典的肿瘤抑制基因, 被视为 p53 后最重要的抑癌基因。自 1997 年被 3 个独立的研究团队发现后, 几十年来, 对其的研究持续不断, 人们发现在多种人类肿瘤中存在 PTEN 的缺失或突变。肝细胞肝癌 (HCC) 在人类常见的恶性肿瘤中排第六位, 在全球首要死亡原因中排第三位。现代医学研究结果表明, HCC 是一种多基因、多途径的复杂过程。其中, 原癌基因的激活及抑癌基因的失活起到了关键

性作用。

一、PTEN 的结构和功能

PTEN 最初被认定为一种肿瘤抑制基因, 位于染色体 10q23, 含 9 个外显子和 8 个内含子, mRNA 长度为 5.5 kb。PTEN 蛋白的主要结构功能区位于 N 端, 有 1 209 个核苷酸编码 403 个氨基酸组成一条多肽链。它的氨基酸序列与蛋白酪氨酸磷酸酶和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶催化区结构域高度同源。往往在脑、乳腺、前列腺肿瘤中丢失^[1]。迄今为止, 在 OSMIC 肿瘤数据库中列举了 28 种不同肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2017.05.002

基金项目: 宁波市民生重大课题 (2013C51009); 浙江省公益技术应用研究计划项目 (2017C35002); 浙江省医药卫生平台计划 (2016DTA009)

作者单位: 315211 宁波, 宁波大学医学院 (谭麟为在读硕士研究生)

通讯作者, 李宏, E-mail: lihong6363@hotmail.com

类型中共超过 2 700 个变异。在 TCGA 中列举了 27 种不同肿瘤类型中共超过 1 120 个变异^[2]。

PTEN 是一种双特异性蛋白和脂质磷酸酶,它的主要底物是第二信使 PIP3, PIP3 被水解成 PIP2。PIP3 能够引发膜蛋白聚集和 AKT 活化, PTEN 通过阻止依赖 PIP3 的途径抑制 PI3K 信号通路,从而抑制细胞的生存、生长和增殖。因而,在肿瘤的发展中 PTEN 是一个关键的节点。

越来越多的证据表明, PTEN 也有与许多不依赖 PIP3 的其他功能。PTEN 抑制细胞迁移的关键在于 PTEN 蛋白的磷酸化活性。在神经胶质瘤细胞中已表明, PTEN 蛋白磷酸化会抑制细胞迁移。此外也有证据表明, PTEN 磷酸活化也许会通过抑制 SRC 家族激酶调节胶质瘤细胞的迁移。也有报道称 PTEN 将局部黏膜激酶去磷酸化, 会减少细胞迁移以及转变为成纤维细胞。

PTEN 也有核功能, 协作参与维持基因组稳定性、修复 DNA、控制着基因的重组和促进依赖泛素蛋白降解的 PLK1、AURK 的癌基因蛋白^[3]。多种蛋白影响 PTEN 的核定位, 从而影响 PTEN 在核内的作用以及稳定基因的能力^[4]。

除了蛋白调节, 许多研究表明, PTEN 通过启动子的甲基化出现下调, 在乳腺癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胃癌、肝癌、脑肿瘤中均有报道。也有证据表明, 通过一些微小 RNA (miRNA) 及非编码 RNA 的表达, PTEN 会被沉默^[3]。这些情况十分关键, 因为这一直是在表明, PTEN 含量的变化对肿瘤的易感性有着显著的影响^[5-6]。

二、PTEN 在 HCC 中的表达以及对于肿瘤迁移、预后的影响

自 PTEN 被提出后, 就有大量对于 PTEN 与 HCC 研究的报道。Horie 等^[7]发现 PTEN 在人类许多恶性肿瘤中出现突变, 在 HCC 中几乎有一半患者出现 PTEN 的表达减少或缺失。用 Cre-loxP 系统生成的 PTEN 无效的特异小鼠进行试验发现, 在 44 周龄时 47% 的小鼠出现肝细胞腺瘤形成, 在 74~80 周龄时 100% 出现肝细胞腺瘤形成, 甚至 66% 的小鼠出现 HCC 细胞。Wan 等^[8]通过免疫组织化学 (组化) 的检测发现, 在 HCC 组织中 PTEN 蛋白的阳性表达率明显低于相应的癌旁组织, 甚至不表达。Lu 等^[9]通过对 120 例 HCC 组织及其癌旁组织和 10 例正常组织中 PTEN 表达情况的检测, 发现 120 例 HCC 组织中 12.5% 阴性, 17.5% 弱阳性及 70% 强阳性。与其对应的含淋巴

结转移例数的百分率分别为 80% (12/15)、57% (12/21) 及 11% (9/84)。

Chen 等^[10]研究表示 PTEN 蛋白的减少, 导致 p-AKT、p-mTOR 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的过表达, 这与肿瘤分级与转移能力密切相关。与非 HCC 组织相比, HCC 组织 PTEN 的 mRNA 明显下调, MMP-2、MMP-9 的 mRNA 明显上调。PTEN、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 水平与肿瘤的分期以及转移情况密切相关。

Rahman 等^[11]发现 PTEN 蛋白表达低下的患者, 门静脉分支侵犯、血清 AFP 水平异常升高的发生率均明显升高。此外, 此类患者的肝功能分级中处于 Child B 级或 Child C 级显著多于 Child A 级。

Zhong 等^[12]研究表明, PTEN 在有肿瘤家族遗传倾向的患者中的表达明显低于无家族遗传倾向的患者。经 6 个月、1 年、2 年观察, 有家族遗传倾向的 HCC 患者的术后复发率明显高于无家族倾向的, 术后生存时间明显低于无家族倾向的患者。PTEN 缺乏可视为 HCC 根治术后的一个独立的危险因素。

Su 等^[13]检测了 110 例 HCC 样本以及与之相关的 98 例毗邻正常组织, 发现 PTEN 表达与 CD133、CD90 和 EpCAM 阳性表达呈负相关, p-AKT 和 p-mTOR 表达与 CD133、CD90 和 EpCAM 表达呈显著正相关。通过单因素和多因素分析, 高水平的 AFP、PTEN 表达缺失, CD133、p-AKT、p-mTOR 及 EpCAM 的阳性表达, 可作为 HCC 复发的预测因素, TNM 分期、PTEN 表达缺失和 p-AKT、p-mTOR 表达阳性, 可作为生存时间的预测分析。

三、PTEN 在 HCC 治疗上的探索

通过 PTEN 进行 HCC 治疗, 现在并没有非常成熟的技术, 但有不少的相关探索。

1. 腺病毒技术

Liu 等^[14]通过腺病毒技术, 进行直接利用病毒导入 PTEN 的方法, 探索肿瘤的治疗。在特定条件下, 将聚甘露糖聚合在腺病毒表面, 形成聚甘露糖修饰的腺病毒 (Man-Ad5-PTEN), 通过体外细胞实验以及 H22 小鼠实验, 评估 man-ad5-PTEN 的体外细胞毒性和抗肿瘤活性, 最终发现 man-ad5-PTEN 对正常细胞无明显抑制, 能够选择性地只杀伤肿瘤细胞。

因为 PTEN 输送的原因, 更多的研究在于间接增加 PTEN 的表达, 从而达到治疗的目的。

2. miRNA 对 PTEN 的调控

近年来, 大量 miRNA 研究显示了对 PTEN 调

控的另一途径。miRNA 是内源性短单链 RNA, 主要通过靶细胞 mRNA 的 3'UTR 发生部分互补, 抑制靶基因功能蛋白质的翻译, 施行转录性调控。miRNA-29a 在乙型病毒性肝炎 (乙肝) 病毒 X 蛋白 HBX 的诱导下表达量增多, 下调 PTEN 表达量, 从而提升了 HCC 细胞的迁移率^[15]。miRNA-21 抑制 PTEN 和人类 sulfatase-1 在 HCC 细胞中的表达。miRNA-185 过表达会减少 PTEN DNA 的甲基化, 能增强 PTEN 的过表达, 阻遏 AKT 磷酸化^[16]。miRNA-519a、miRNA-367、miRNA-130b、miRNA-20a、miRNA-32、miRNA-93、miRNA-49、miRNA-492 通过调控 PTEN, 介导 PI3K/AKT 通路, 促进肿瘤生长。通过对于此类 miRNA 调控, 可以间接增强 PTEN 的表达, 从而达到治疗的目的^[17-19]。

3. 中成药对 PTEN 的调控

Shi 等^[20]利用扶正解毒汤进行 BALB/c 裸鼠实验, 结果表明扶正解毒汤能延长生存时间, 减少模型小鼠肝脏肿瘤转移。治疗 HCC 的中药扶正解毒汤部分机制可能是通过增强 PTEN 基因在肝脏中的表达。

Qian 等^[21]修改了苦参碱的结构, 得到了一种新的苦参碱衍生物 WM130 (C30N4H40SO5F)。经体外细胞实验及小鼠实验证实, 经 WM130 治疗, p-EGFR、p-ERK、p-AKT 蛋白的表达以及 MMP-2 和 Bcl-2/Bax 的比值均明显下调, 而 PTEN 的表达在 HCC 细胞中明显增多。WM130 静脉注射的剂量与治疗效果呈正相关。

4. PI3K/PTEN/AKT/mTOR 通路上的调控

PTEN 是 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 的重要组成部分, 最终的调控也是基于对通路的调控。现有的研究就 mTOR 抑制剂雷帕霉素对于 HCC 的治疗取得一定效果^[22]。

四、PTEN 与 PTEN-long

新的一些研究发现了一种 PTEN 翻译变体, 被命名为 PTEN-long, 它是 PTEN 的 mRNA 5' 启动子区的翻译变体, 这个变体使原有翻译基础上在 N 端增加了 173 个氨基酸, 且在进化上高度保守^[23]。PTEN-long 的表达高度依赖 PTEN 的表达, 在实体肿瘤中已被证实, PTEN-long 伴随着 PTEN 明显减少, 但 PTEN-long 不是蛋白翻译后修饰产物, 可能是 PTEN 蛋白选择性剪接产物。PTEN-long 能够被分泌, 并在血清及血浆中均能找到。PTEN-long 较 PTEN 多出来的部分包含一种多聚精氨酸, 与细胞膜上的多肽同源, 因为这个结构, 使 PTEN-long 不

论在体内或体外均能够进入细胞, 并且抑制 PI3K 信号通路。在已有的部分细胞实验及肿瘤小鼠相关实验上, 已实现使用 PTEN-long 纯化蛋白治疗肿瘤^[23-25]。

五、小结与展望

目前手术治疗是 HCC 首选的治疗方法。通过完整的清除肿瘤组织, 达到治愈的目的。手术后予以一定的化学治疗, 以减少术后复发的机会。但是手术治疗主要针对早期 HCC 患者。对于大量 HCC 晚期患者及术后复发患者, 新的治疗方法是其延长生存时间, 提高生活质量的迫切要求。

通常认为通过腺病毒将 PTEN 的 cDNA 重新引入有 PTEN 基因缺陷的患者体内, 可以抑制因 PI3K/AKT 通路过于活跃导致的癌症。但是, 越来越多的临床报道显示, 腺病毒介导的基因治疗存在安全隐患, 接受基因治疗的患者并没有像所期望的那样从癌症中康复, 有相当一部分患者出现了由腺病毒导致的各类副作用包括新的癌症。单独地去看通路抑制, 对于疾病的治疗可能过于狭隘。PI3K/PTEN/AKT/mTOR 是可以抑制肿瘤, 但是其他研究表明, PI3K/PTEN/AKT/mTOR 通路的抑制会诱发免疫功能紊乱和衰老, 这限制了通路抑制剂的实际应用。

PTEN 的突变和缺失与 HCC 的发生密切相关, 利用 PTEN 相关技术的治疗为 HCC 的治疗打开了一扇新的大门。虽然一些自然复合物能够间接引起 PTEN 的激活, 但到目前为止仍然没有明确的有效治疗药物能够直接激活 PTEN 的功能。长链非编码 RNA 的出现、假基因以及其他调控 PTEN 表达的机制有可能提供新的治疗策略。一些研究发现 PTEN 蛋白能够被分泌并转运至细胞, 这提供了 PTEN 蛋白作为直接进行治疗措施的可能性。PTEN-long 作为 PTEN 的翻译变体, 保留了 PTEN 的生物活性, 同时 N 端增加的 173 个氨基酸, 形成新的复合物, 能够作为一个理想的药物输送系统, 达到直接干预 PTEN 活性的目的。

参 考 文 献

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997, 275 (5308): 1943-1947.
- [2] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer

- SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 2013, 6 (269): p11.
- [3] Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13 (5): 283-296.
- [4] Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6 (3): 184-192.
- [5] Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, Salmena L, Sampieri K, Haveman WJ, Brogi E, Richardson AL, Zhang J, Pandolfi PP. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet*, 2010, 42 (5): 454-458.
- [6] 廖山婴, 朱小波, 王蓓蓓, 马娟, 沙卫红. Ppar γ 、pten、akt 在胃癌中的表达及其与胃癌生物学行为的关系. *新医学*, 2014, 45 (6): 394-398.
- [7] Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest*, 2004, 113 (12): 1774-1783.
- [8] Wan XW, Jiang M, Cao HF, He YQ, Liu SQ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129 (2): 100-106.
- [9] Lu DD, Zhang XR, Cao XR. Expression and significance of new tumor suppressor gene PTEN in primary liver cancer. *J Cell Mol Med*, 2003, 7 (1): 67-71.
- [10] Chen JS, Wang Q, Fu XH, Huang XH, Chen XL, Cao LQ, Chen LZ, Tan HX, Li W, Bi J, Zhang LJ. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma; Association with MMP-9. *Hepatol Res*, 2009, 39 (2): 177-186.
- [11] Rahman MA, Kyriazanos ID, Ono T, Yamanai A, Kohno H, Tsuchiya M, Nagasue N. Impact of PTEN expression on the outcome of hepatitis C virus-positive cirrhotic hepatocellular carcinoma patients; possible relationship with COX II and inducible nitric oxide synthase. *Int J Cancer*, 2002, 100 (2): 152-157.
- [12] Zhong Y, Yan J, Deng M, Hu K, Yao Z, Zou Y, Xu R. Impaired phosphate and tension homologue deleted on chromosome 10 expression and its prognostic role in radical surgery for hepatocellular carcinoma with family aggregation resulting from hepatitis B and liver cirrhosis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238 (8): 866-873.
- [13] Su R, Nan H, Guo H, Ruan Z, Jiang L, Song Y, Nan K. Associations of components of PTEN/AKT/mTOR pathway with cancer stem cell markers and prognostic value of these biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2016, 46 (13): 1380-1391.
- [14] Liu Z, Ke F, Duan C, Lan H, Li J, Gao C, Li J, Zhong Z. Mannan-conjugated adenovirus enhanced gene therapy effects on murine hepatocellular carcinoma cells invitro and in vivo. *Bioconjug Chem*, 2013, 24 (8): 1387-1397.
- [15] Kong G, Zhang J, Zhang S, Shan C, Ye L, Zhang X. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PLoS One*, 2011, 6 (5): e19518.
- [16] Qadir XV, Han C, Lu D, Zhang J, Wu T. miR-185 inhibits hepatocellular carcinoma growth by targeting the DNMT1/PTEN/Akt pathway. *Am J Pathol*, 2014, 184 (8): 2355-2364.
- [17] Tu K, Liu Z, Yao B, Han S, Yang W. MicroRNA-519a promotes tumor growth by targeting PTEN/PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 2016, 48 (3): 965-974.
- [18] Meng X, Lu P, Fan Q. miR-367 promotes proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by negatively regulating PTEN. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470 (1): 187-191.
- [19] Chang RM, Xu JF, Fang F, Yang H, Yang LY. MicroRNA-130b promotes proliferation and EMT-induced metastasis via PTEN/p-AKT/HIF-1 α signaling. *Tumour Biol*, 2016, 37 (8): 10609-10619.
- [20] Shi DY, Liu HL, Stern JS, Yu PZ, Liu SL. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in hepatoma cells via the PTEN/Akt pathway. *FEBS Lett*, 2008, 582 (12): 1667-1671.
- [21] Qian L, Liu Y, Xu Y, Ji W, Wu Q, Liu Y, Gao Q, Su C. Matrine derivative WM130 inhibits hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR/ERK/MMP-2 and PTEN/AKT signaling pathways. *Cancer Lett*, 2015, 368 (1): 126-134.
- [22] Chang AY, Wang M. Molecular mechanisms of action and potential biomarkers of growth inhibition of dasatinib (BMS-354825) on hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2013, 13: 267.
- [23] Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, Dendy M, Rapp Z, Shaw J, Pappas K, Yu JS, Hodakoski C, Mense S, Klein J, Pegno S, Sulis ML, Goldstein H, Amendolara B, Lei L, Maurer M, Bruce J, Canoll P, Hibshoosh H, Parsons R. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science*, 2013, 341 (6144): 399-402.
- [24] 张谢, 谭麟, 朱杰, 尹博伟, 李宏. 一个新磷酸酶张力蛋白样同源物亚型的研究. *中国现代医生*, 2016, 54(9): 1-4.
- [25] Wang H, Zhang P, Lin C, Yu Q, Wu J, Wang L, Cui Y, Wang K, Gao Z, Li H. Relevance and therapeutic possibility of PTEN-long in renal cell carcinoma. *PLoS One*, 2015, 10 (2): e114250.

(收稿日期: 2016-11-06)

(本文编辑: 杨江瑜)