

· 综 述 ·

核转录因子 Snail 与骨肉瘤关系的研究进展

流小舟 综述,黎承军,周光新,赵建宁 审校

【摘要】骨肉瘤是最常见的骨恶性肿瘤,但其发生机制目前尚未阐明。而核转录因子 Snail 不仅参与与骨肉瘤复发转移及预后有关的上皮细胞间质化过程,而且在肿瘤干细胞特性产生和维持、细胞生存和凋亡以及免疫调节中起着重要的作用,其有望成为骨肉瘤等恶性肿瘤治疗的一个新靶点。

【关键词】核转录因子 Snail;骨肉瘤;上皮细胞间质化

【中图分类号】R738.1 【文献标志码】A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.01.022

骨肉瘤是最常见的原发骨组织的恶性肿瘤,好发于 10~20 岁。具有恶性度高、早期转移、病情进展迅速及 5 年生存率低的特点^[1]。虽然随着新辅助化疗和保肢手术研究的逐渐深入,越来越多的骨肉瘤患者得以保留肢体,延长生命^[2]。但肿瘤的复发和转移仍然是导致骨肉瘤患者治疗失败的主要因素,而由于传统检查方法确诊时常常已发生远处转移,故如何早期判断骨肉瘤是否发生复发和转移成为解决此问题的关键^[3]。目前,判断骨肉瘤的生物学行为、疗效和预后尚缺乏具有针对性的特异肿瘤标记物。

肿瘤的转移包括肿瘤细胞在间质中移行并接触脉管、肿瘤细胞突破血管内皮及内皮下的基底膜进入血流,并在血液中存活、肿瘤细胞穿出血管,在组织中存活、增殖,形成转移灶^[4]。由此可见,肿瘤的转移是一个十分复杂的过程,它是多种基因参与的结果,不仅仅是遗传性状的改变,还包括细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间的相互作用^[5]。肿瘤的转移涉及细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附作用,这种相互识别和作用有赖于细胞黏附分子的介导。而作为与细胞黏附分子的表达调节密切相关的上皮细胞间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程中关键的诱导因子 Snail,不仅与骨肉瘤复发转移及预后有关,而且在肿瘤干细胞特性产生和维持、细胞生存和凋亡以及免疫调节中起着重要的作用^[6]。

1 Snail 的结构与功能

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81102039)

作者单位:210002 江苏南京,南方医科大学南京临床医学院(南京军区南京总医院)骨科

通讯作者:赵建宁, E-mail: zhaojianning.0207@163.com

作为转录因子 Snail 超家族中的一员 Snail 蛋白首先发现于果蝇中,它是一类锌指转录因子,因其在许多恶性肿瘤中存在高表达而备受关注^[7]。而 Snail 超家族成员包括 Snail 1 (snail)、Snail 2 (slug) 和 Snail 3 (smuc),均在脊椎动物胚层形成中起重要的作用^[8]。Snail 家族成员在结构上具有很高的相似性,由一个高度保守的羧基末端和一个高度可变的氨基末端构成,而各成员间结构上的差异主要表现在中间 P-S 富集区域^[9],Snail 可以通过磷酸化该区域内的位点来调节其稳定性和定位。其中羧基末端包含 4 个 C2H2 型的锌指结构,介导序列特异性与含有 E-box (CAGGTG) 的 DNA 启动子相互作用。氨基末端则包含作为转录抑制作用关键部位的 SNAG 反式激活区域(Snail/Gfi)。Comijn 等^[10]研究发现,切除 SNAG 区域的 Snail 蛋白没有抑制 E-钙粘蛋白(E-cadherin)启动子的活性,表明 SNAG 区域对于 Snail 抑制 E-cadherin 启动子的活性是必不可少的。

1.1 Snail 参与 EMT 作用于肿瘤的侵袭和转移

EMT 是指具有极性的上皮细胞转换成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程^[11]。肿瘤发生 EMT 时,上皮细胞表型发生可逆的改变,上皮细胞失去了细胞与细胞之间正常的结构,包括上皮细胞极性的丧失和间质特性(成纤维细胞样的外形、波形蛋白等基因的表达)的获得,细胞之间彼此分离,获得活动能力并抵抗凋亡。可见 EMT 是肿瘤发展的决定因素,而 E-cadherin 的表达降低或缺失是 EMT 发生的主要标志,Snail 正是通过抑制 E-cadherin 的表达来促进 EMT 的发生。

Snail 既可与共抑制子 Sin3A 及组蛋白去乙酰化酶 1、2 (histone deacetylase, HDAC1、2) 形成的转录抑制复合物相互作用,通过局部组蛋白去乙酰化的

染色质修饰,进而抑制 E-cadherin 表达;又能通过募集多梳抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 到 E-cadherin 启动子区,导致其组蛋白 H3K27 甲基化从而阻止其表达^[12]。除可下调 E-cadherin 外,Snail 还下调封闭蛋白 (claudin)、闭锁蛋白 (occludin)、粘蛋白 (mucin)、角蛋白 18 (cytokeratin 18, CK18)^[13], 同时也可上调纤维粘连蛋白 (fibronectin)、波形蛋白 (vimentin)、基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 1, 2, 7, 9 和细胞膜型基质金属蛋白酶-1 (membrane type 1-matrix metalloproteinase, MT1-MMP) 等^[14]。由此可见,Snail 通过抑制 E-cadherin 不仅可以下调上皮细胞标记蛋白的表达,也促进间质细胞标记蛋白的表达,同时其上调基质金属蛋白酶的表达使得细胞具有迁移能力;而 E-cadherin 过表达可以反过来抑制 Snail 对间质细胞标记蛋白的诱导^[15]。但这些间质细胞标记蛋白的激活并不完全是由 E-cadherin 降低引起的,在 E-cadherin 表达缺陷的细胞中 Snail 也可以促进间质细胞标记蛋白的表达。

同时,在多数肿瘤形成的过程中,Snail 也可从其他途径启动 EMT,包括 TGF- β /smad 通路^[16]、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK)/3-磷酸磷脂酰肌醇 (PI3) 通路^[17]、NF-kappaB^[18]、Ras/MAPK^[19] 等所介导的信号通路均能诱导 Snail 的表达。另外有研究^[20-21]表明,Snail 在胞核中与 β -catenin 相互作用,可激活 Wnt 通路的靶基因,间接导致波形蛋白和其他间质细胞基因产物的表达,参与 EMT 的发生。

1.2 Snail 参与肿瘤干细胞特性的产生和维持 肿瘤干细胞因其具有自我更新和分化能力,与肿瘤发生、增殖、复发及化疗耐药密切相关^[22]。侵袭性的肿瘤干细胞在邻近的基质组织微环境信号影响下经历 EMT,导致肿瘤局部和远处转移成为可能,而此作用与上调 Snail 表达有关。由此可见 Snail 可以导致两个重要的肿瘤进展因素——肿瘤干细胞的存在和 EMT 的启动^[23]。

1.3 Snail 参与免疫调节 Snail 可通过免疫抑制细胞因子、调节性 T 细胞、致使树突状细胞受损和抵抗细胞毒性 T 淋巴细胞,从而导致免疫抑制和免疫抵抗。Snail 表达阳性的黑色素瘤细胞表现出部分能通过 Treg 诱导细胞因子,致使黑色素瘤细胞维持在免疫抑制状态,提示 Snail 可以通过免疫调节调控肿瘤的发展进程^[24]。

2 Snail 在骨肉瘤中的组织分布和表达

细胞生长和凋亡途径的紊乱有利于肿瘤的生长

和侵袭,骨肉瘤组织中的 Snail 基因异常表达可能直接促进肿瘤细胞逃离生长监控,抑制异常突变细胞凋亡^[25]。根据 Zhang 等^[26] 研究结果显示,Snail 蛋白在骨肉瘤中表达明显高于骨软骨瘤组织中的表达,且 Snail 蛋白在骨肉瘤组织中的表达与软组织浸润、Enneking 分期、肺转移密切相关 ($P < 0.01$),而与性别、年龄、肿瘤部位、Dahlin 类型无关 ($P > 0.05$);并通过 Kaplan-Meier 生存曲线分析骨肉瘤组织 Snail 蛋白阳性患者累积生存率明显低于阴性患者。可见分化程度越差、恶性程度越高的肿瘤,Snail 蛋白的表达越高。而这种高表达可能对骨肉瘤的局部浸润能力、远处转移及不良预后有一定的促进作用^[27]。同时蒋朋翔等^[28]发现,Snail、MMP-9 蛋白在骨肉瘤中的表达呈正相关,而作为基质金属蛋白酶家族的一员 MMP-9 因可在胞外降解基质的同时,配合其他酶类降解血管基底膜和血管周围基质,最终促进骨肉瘤细胞的转移和侵袭,故可能成为骨肉瘤肺转移的标志物^[29]。由于 Snail 参与其上调,从而为进一步明确骨肉瘤生长、转移的分子机制提供了新的平台。也有研究表明^[30]恶性纤维组织细胞瘤、软骨母细胞瘤、滑膜肉瘤等恶性骨肿瘤均存在 Snail 的高表达。苏涛等^[31]证实骨软骨瘤 Snail 表达阳性率明显低于骨恶性肿瘤;骨肉瘤和软骨肉瘤 Snail 表达阳性率无明显差异,提示 Snail 可能成为诊断恶性骨肿瘤的重要生物学标记物。

3 Snail 与骨肉瘤治疗

目前骨肉瘤的治疗,由于传统的手术治疗创伤性较大,放化疗的选择性不高,毒副作用大以及存在耐药性,导致预后较差。基因治疗和免疫治疗为骨肉瘤的治疗提供了新途径。以 Snail 为靶点的探索性治疗骨肉瘤方法主要集中在沉默或抑制 Snail 的表达及作用上^[32]。程中衡等^[33]研究表明,高转移性骨肉瘤细胞株 MG-63 能表达较高水平的 Snail,用反义 Snail 技术抑制其表达后,可引起骨肉瘤细胞周期的阻滞,观察体外细胞运动实验及重组细胞基底膜 (Matrigel) 侵袭实验中穿过屏障的 MG-63 细胞明显减少,细胞的运动能力也明显下降,证明抑制 Snail 表达能抑制 MG-63 细胞的侵袭能力。同时还发现,Snail 表达阻滞后,MG-63 细胞的体外增殖能力明显下降,说明 Snail 表达抑制可抑制 MG-63 细胞生长。由于 Snail 在正常成人大多数细胞类型并不表达,针对异常表达的 Snail 进行干预,有可能成为临床骨肉瘤治疗的新策略。Sharili 等^[34]研究发现,将 Snail 转染入骨肉瘤 Saos-2 细胞后,使用体内

及体外细胞侵袭实验均可以观察到细胞的运动能力出现明显上升,而与之相对应的自骨肉瘤肺转移组织内提取的 D-17 细胞则未有此表现,并反映出 D-17 细胞内 Snail 含量趋向饱和的状态,而这种介导骨肉瘤细胞侵袭能力改变的机制目前尚不清楚。在干扰 RNA 阻断 Snail 表达后,由 Snail 控制下调的 E-cadherin 及 OB-cadherin 在骨肉瘤 Saos-2 细胞中均呈现高表达,并且与临床患者的生存率呈正相关,这与既往报道结果一致^[35]。同时他们发现 Snail 并非通过 Wnt 通路调节细胞骨架重建进而影响细胞的运动能力,而可能通过具有促进细胞间黏附、加强细胞间信号传导功能的 Rho GTPases 发挥作用^[36]。另外,近来有研究^[37]显示 Snail 不仅在骨肉瘤组织中呈现高表达,联合治疗时抑制其能促进维生素 D 的治疗效果。

4 结语和展望

综上所述,转录因子 Snail 通过特定的结构发挥转录抑制作用,在骨肉瘤发生发展及侵袭转移中产生生物学效应,这与正常发育和其他疾病(如器官纤维化)时的生物学效应之间存在着极大的相似性,弄清它们之间是否存在差异以及导致这些差异的细胞内、外信号作用网络和相应的表观遗传学和遗传学改变,可为早期诊断骨肉瘤、探讨骨肉瘤的复发转移机制和判断预后提供更有利的依据,这也是我们今后研究的重点和目标。

【参考文献】

- [1] Smith BR, Stabile BE. Extreme aggressiveness and lethality of gastric adenocarcinoma in the very young[J]. Arch Surg, 2009, 144(2):506-510.
- [2] San-Julian M, Diaz-De-Rada P, Noain E, et al. Bone metastases from osteosarcoma[J]. Int Orthop, 2003, 27(2):117-120.
- [3] Bacci G, Rocca M, Salone M, et al. High grade osteosarcoma of the extremities with lung metastases at presentation: treatment with neoadjuvant chemotherapy and simultaneous resection of primary and metastatic lesions[J]. Surg Oncol, 2008, 98(6):415-420.
- [4] Wittekind C, Neid M. Cancer invasion and metastasis[J]. Oncology, 2005, 69(1):4-6.
- [5] Eble JA, Haier J. Integrins in cancer treatment[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6(2):89-105.
- [6] Ray M E, Mehra R, Sandler HM, et al. E-cadherin protein expression predicts prostate cancer salvage radiotherapy outcomes[J]. J. Urol, 2006, 176(4):1409-1414.
- [7] Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, et al. Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(7):2657-2664.
- [8] Nieto MA. The snail super family of zinc-finger transcription factors

- [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(3):155-166.
- [9] Hardy RG, Vicente-Duenas C, González-herrer I, et al. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis[J]. Am J Pathol, 2007, 171(3):1037-1046.
- [10] Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion[J]. Mol Cell, 2001, 7(6):1267.
- [11] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(12):2153-2160.
- [12] Herranz N, Pasini D, Difaz VM, et al. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail transcription factor[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(15):4772-4781.
- [13] Olmeda D, Montes A, Moreno Bueno G, et al. Snail and snail2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines[J]. Oncogene, 2008, 27(34):4690-4701.
- [14] Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Nat Protoc, 2009, 4(11):1591-1613.
- [15] Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agusti C, et al. E-cadherin controls beta-catenin and NF-kappaB transcriptional activity in mesenchymal gene expression[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 13):2224-2234.
- [16] Xu J, Iamouine S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. Cell Res, 2009, 19(2):156-172.
- [17] Bachelder RE, Yoon S, Franci C, et al. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Biol, 2005, 168(1):29-33.
- [18] Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, et al. Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells[J]. Oncogene, 2004, 23(44):7345-7354.
- [19] 徐娟, 唐敏, 曹亚. 上皮-间质转化与肿瘤的浸润和转移[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(6):504-507.
- [20] Stemmer V, de Craene B, Berx G, et al. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin[J]. Oncogene, 2008, 27(37):5075-5080.
- [21] Ren D, Minami Y, Nishita M. Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following Snail-mediated epithelial—mesenchymal transition[J]. Genes Cells, 2011, 16(3):304-315.
- [22] Koch U, Krause M, Baumann M. Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures-Radiation oncology perspective[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 20(2):116-124.
- [23] Hermann PC, Huber SL, Healer T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer[J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(3):313-323.
- [24] Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, et al. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells[J]. Cancer Cell, 2009, 15(3):195-206.
- [25] Herfs M, Hubert P, Suarez-Carmona M, et al. Regulation of p63 isoforms by snail and slug transcription factors in human squamous cell carcinoma[J]. Am J Pathol, 2010, 174(4):1941-1949.

- [J]. 中国妇幼保健, 2013(28):721-723.
- [6] Sleep J, Grant A, Garcia J, et al. West berkshire perineal management trial[J]. BMJ, 1984, 289(6445):587-590.
- [7] Woolley RJ. Benefits and risks of episiotomy; a review of the english-language literature since 1980. Part I[J]. Obstet Gynecol Surv, 1995, 50(11):806-820.
- [8] 张宏玉, 谢春雨, 黄明媚, 等. 低危初产妇正常分娩会阴侧切的病例对照研究[J]. 护理学报, 2011(5A):10-12.
- [9] 李晓燕, 徐括琴. 无保护会阴接生法的临床探讨[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(18):3053-3055.
- [10] 王少芳, 黄银英, 章慧燕. 会阴无保护接生技术在低危孕妇正常分娩中的应用[J]. 解放军护理杂志, 2013, 30(3):69-71.
- [11] 孔 欣, 郭培奋. 经阴道头位分娩中倡导限制会阴切开[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(2):117-120.
- [12] 张宏玉, 胡春霞, 李亚洁. 会阴侧切对母儿结局的影响及相关因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2011(23):3642-3644.
- [13] Sartore A, De Seta F, Maso G, et al. The effect of mediolateral episiotomy on pelvic floor function after vaginal delivery[J]. Obstet Gynecol, 2004, 103(4):669-673.
- [14] Clemons JL, Towers GD, McClure GB, et al. Decreased anal sphincter laceration associated with restrictive episiotomy use[J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192(5):1620-1625.
- [15] 宋亚琴, 马锦琪, 徐惠英, 等. 护理干预在限制会阴侧切中的临床探讨[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(22):3832-3833.
- [16] 曾嘉苹, 沈 伶, 李丽萍, 等. 产妇自然分娩时软产道裂伤的危险因素分析[J]. 中国全科医学, 2005, 7(9):609-611.
- [17] 刘佩蓉, 涂伟妹. 无保护会阴接生的临床观察[J]. 实用临床医学, 2013, 14(4):70-71.
- [18] 刘淑艳. 限制性会阴切开的临床应用[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(13):1761-1762.
- [19] 李玉玲, 郭培奋, 孔 欣, 等. 自然分娩中限制会阴切开的应用[J]. 武警医学, 2012, 23(6):468-471.
- [20] 李小敏. 阴道分娩非常规会阴侧切 100 例临床分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2012, 15(7):1017-1018.
- [21] 周 临. 改良拉玛泽呼吸法在第二产程中的应用[J]. 解放军护理杂志, 2012, 29(3):115.
- [22] 陈 宇. 呼吸按摩法在减轻产妇自然分娩疼痛中的作用[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(11):1192-1193.
- [23] 魏晓霞, 王淑琴. 妇产科门诊医疗风险的影响因素及防范措施[J]. 东南国防医药, 2012, 14(6):577-578.
- [24] 梁 静, 芦小娟, 张 颖. 改良式接生手法的临床应用[J]. 陕西医学杂志, 2013, 42(6):763-764.
- (收稿日期:2013-10-22;修回日期:2013-11-28)
- (本文编辑:黄攸生)

(上接第 69 页)

- [26] Zhang XB, Xiong ZW, Zhang HD. Expression of Snail protein in patients with osteosarcoma and its clinical significance[J]. Med Pharm J Chin PLA, 2011, 23(3):8-10.
- [27] Hu CT, Wu JR, Chang TY, et al. The transcriptional factor Snail simultaneously triggers cell cycle arrest and migration of human hepatoma HepG2[J]. J Biomed Sci, 2008, 15(3):343-355.
- [28] 蒋朋翔, 刘光耀, 梁柏坚, 等. MMP-9 和 Snail 在骨肉瘤中的表达及其诊断意义[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(5):916-917.
- [29] Zhang K, Chen D, Jiao X, et al. Slug enhances invasion ability of pancreatic cancer cells through upregulation of matrix metalloproteinase-9 and actin cytoskeleton remodeling[J]. Lab Invest, 2011, 91(12):426-438.
- [30] Yang MH, Chen CL, Chau GY, et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and Snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 50(5):1464-1474.
- [31] 苏 涛, 谭 潭. 骨恶性肿瘤组织中 Claudin-1 和 Snail 的表达及其临床病理意义[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(13):2001-2004.
- [32] Sharili AS, Allen S, Smith K, et al. Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy[J]. Tumour Biol, 2011, 32(3):515-526.
- [33] 程中衡, 张泽米, 杨 芳, 等. 反义 Snail 转录因子对骨肉瘤细胞增殖和影响转移能力的[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(15):2690-2692.
- [34] Sharili AS, Allen S, Smith K, et al. Snail2 promotes osteosarcoma cell motility through remodelling of the actin cytoskeleton and regulates tumor development[J]. Cancer Lett, 2013, 333(2):170-179.
- [35] Nakajima G, Patino-Garcia A, Bruheim S, et al. CDH11 expression is associated with survival in patients with osteosarcoma[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2008, 5(1):37-42.
- [36] Shields MA, Krantz SB, Bentrem DJ, et al. Interplay between b1-integrin and Rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by Slug protein[J]. J Biol Chem, 2012, 287(9):6218-6229.
- [37] Yang H, Zhang Y, Zhou Z, et al. Snail-1 regulates VDR signaling and inhibits 1, 25(OH)-D3 action in osteosarcoma[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(2/3):341-346.
- (收稿日期:2013-10-03;修回日期:2013-10-19)
- (本文编辑:黄攸生)