

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.021

· 综 述 ·

GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤进展中的作用和机制

GDNF/GFR α 1 signal in tumor progression: roles and mechanisms

朱哈 综述;刘秋燕 审阅(第二军医大学免疫研究所医学免疫学国家重点实验室,上海 200433)

[摘要] 胶质细胞系源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)属于神经营养因子超家族,是 TGF- β 超家族的一个亚家族成员。目前已发现的 GDNF 家族配体(GDNF family ligand, GFL)有 GDNF、neurturin(NRTN)、artemin(ARTN)、persephin(PSPN)4个成员。GDNF 家族受体为 GFR α 1-4,分别对应着 GDNF 家族配体 GDNF、NRTN、ARTN 及 PSPN。通常 GFR α 通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)锚着到细胞膜上,经 GDNF 家族配体刺激后募集受体酪氨酸激酶 RET 作为共受体并形成 GFL/GFR α /RET 复合物,使 RET 酪氨酸激酶磷酸化,进一步活化下游的 Ras/MAPK、PI3K、PLC γ 信号通路进而调控细胞的功能。最初对 GDNF 家族成员的功能研究主要集中在神经系统,发现 GDNF/GFR α 信号对中枢神经系统有特异的营养作用和促轴突生长作用,在参与促进神经元存活及轴突损伤修复等方面有其他生长因子不可比拟的作用。但随着研究的进展,越来越多的资料表明 GDNF/GFR α 信号在肿瘤的发生发展中也占据一席之地,尤其在促进肿瘤侵袭转移方面具有重要作用。本文聚焦 GDNF/GFR α 1 信号,重点阐述 GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤进展和侵袭转移中的作用以及相关分子信号机制,以期对神经-内分泌-肿瘤相关性研究提供参考,为肿瘤的防治提供新的靶点和视角。

[关键词] 神经营养因子;胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF);GFR α 1;肿瘤进展;侵袭转移

[中图分类号] R730.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0799-07

以往对神经营养因子(neurotrophin, NT)及其受体的研究主要集中在神经系统,如神经营养因子能够维持神经细胞的存活和分化等。但近年来随着神经-内分泌-肿瘤研究的不断深入,越来越多的研究结果表明神经营养因子及其受体在肿瘤发生、发展和侵袭转移调控中具有重要作用。研究^[1-2]发现神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及其前体 pro-NGF 能够以自分泌方式促进乳腺癌细胞生长和侵袭;脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic, BDNF)通过与受体 Trk 结合直接促进胃癌细胞的增殖和扩散^[3];p75 神经营养因子受体,(p75 neurotrophin receptor, p75 NTR)的表达与前列腺癌恶性程度呈负相关^[4],与黑素瘤的恶性程度呈正相关^[5]。此外,转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)在肿瘤进展中具有双重作用,在肿瘤进展的起始阶段 TGF- β 信号能够抑制肿瘤发展,但一旦肿瘤进入晚期,TGF- β 就反过来增强肿瘤细胞的侵袭、转移及免疫逃逸能力^[6]。胶质细胞系源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)家族配体(glial cell line derived neurotrophic factor ligand, GFL)属于神经营养因子超家族,是 TGF- β 超家族的一个亚家族成员。而 GDNF 的受体为 GFR α 1,作为 TGF- β 超家族的亚家族成员,GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤发生发展、侵袭

转移中的作用以及相关分子信号机制备受瞩目。本文旨在对近年来 GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤发生发展、侵袭转移中的作用以及相关分子信号机制的研究进展进行综述,以期对肿瘤的治疗提供新的靶标。

1 GDNF 家族及其受体

GFL 属于神经营养因子多肽家族。从构象上看,GFL 与 TGF- β 超家族类似,且都以同二聚体的方式发挥作用,因此,GFL 又被归为 TGF- β 超家族的一个亚家族。目前发现的 GFL 包括 GDNF、neurturin(NRTN)、artemin(ARTN)、persephin(PSPN)4个成员,其中 GDNF 最早被发现^[7]。1993 年大鼠胶质 B49 细胞来源的 GDNF 被发现并纯化,鉴定为蛋白质。最初的研究发现 GDNF 能够促进胚胎中脑多巴胺神经元的存活^[8],随后发现其在调控大脑、脊

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2014CB542102);国家自然科学基金资助项目(No. 31570869; 31170844)。Project supported by the Major State Basic Research Development Program (973 program) of China (No. 2014CB542102), and the National Natural Science Foundation of China(No. 31570869; 31170844)

[作者简介] 朱哈(1991-)女,浙江省温州市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫相关研究,E-mail: 3090100454@zju.edu.cn

[通信作者] 刘秋燕(Liu Qiuyan, corresponding author),E-mail: liuqy@immunol.org

髓及周围神经的生长、存活和迁移中具有广泛作用^[9]。目前已有两个临床试验表明 GDNF 治疗能够使帕金森病患者受益^[10-11], 但亦有一个临床试验结果表示 GDNF 在帕金森疾病治疗中效果并不显著^[12]。除神经系统作用外, GDNF 还促进胚胎肾脏发育过程中肾盂/输尿管的分化发育, 决定精子分化过程中细胞的命运。Gdnf 纯合敲除小鼠由于严重的肾脏发育不全和肠神经系统的缺失导致出生后不久即死亡^[9]。继 GDNF 发现之后, NRTN 通过其生物活性被分离纯化, 随后通过数据库检索和同源克隆技术相继发现了 ARTN 和 PSPN^[7], 它们在维持一些中枢神经系统神经元亚群的存活中具有重要作用^[9]。基因敲除小鼠研究发现, 4 种 GFL 生物学上的重要性排序依次是: GDNF > NRTN > ARTN > PSPN^[7]。

GFL 受体目前发现有 GDNF 家族受体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$), GFR $\alpha 2$, GFR $\alpha 3$, GFR $\alpha 4$ 及 syndecan-3, 以及共受体 RET 和神经细胞黏附分子 (neural cell adhesion molecular, NCAM)^[9, 13]。GFL 发挥效能的主要方式是与其靶细胞表面的糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 交联的 GFR α 结合, 随后募集受体酪氨酸激酶 RET (REarranged during transfection) 形成 GFL/GFR α /RET 信号复合体, 进而导致 RET 自身磷酸化和一系列胞内信号通路的活化。研究结果显示不同 GFL 与 GFR α 的亲和力不同, GDNF 与 GFR $\alpha 1$ 的亲和力远远高于和其他分子, 因此, GDNF 优先结合 GFR $\alpha 1$; NRTN 优先结合 GFR $\alpha 2$; ARTN 优先结合 GFR $\alpha 3$; 而 PSPN 优先结合 GFR $\alpha 4$ 。此外, 发现 GDNF 还可以与 GFR $\alpha 2$ 和 GFR $\alpha 3$ 结合, 而 ARTN 和 NRTN 亦可以与 GFR $\alpha 1$ 结合^[7, 9, 13]。GFR α 通常是与 GPI 交联固定在细胞膜上, 但 GFR α 也能被磷酸酶或蛋白酶水解, 产生可溶性的 GFR α , 可溶性的 GFR α 对 GFL 信号有导向和调节功能^[7, 14]。由于 GFR α 受体没有胞内段, 需与共受体相互作用才能传导下游信号, RET 是 GFL 通用的共受体。RET 蛋白可以分成 3 个区域: 富含钙黏蛋白和半胱氨酸的胞外区, 跨膜区和含酪氨酸激活位点的胞内区^[15]。Ret 或 Gfra1 纯合敲除小鼠与 Gdnf 纯合敲除小鼠同样由于严重的肾脏发育不全和肠神经系统的缺失导致出生后不久即死亡, 而 Gfra2, Gfra3 或 Gfra4 缺失小鼠仍存活且保有繁殖能力^[14]。2003 年, NCAM 被发现是一种可以替代 RET 传导 GDNF 信号的共受体。NCAM 是神经系统一种重要的细胞黏附分子, 已被证实参与细胞迁移、神经轴突生长、突触可塑性等多种发育过程。研究^[16]表明 NCAM 与 GFR $\alpha 1$ 结

合后, NCAM 介导的细胞黏附能力减弱, 与 GDNF 结合的亲和力增强。GDNF 刺激施万细胞 (Schwann cell) 的迁移以及海马与皮层神经元的轴突生长都是通过 NCAM 途径, 并不依赖于 RET, 这部分解释了为什么在神经系统特别是前脑, GFR $\alpha 1$ 的表达比 RET 更加广泛^[16]。NCAM 是否参与 NRTN、ARTN、PSPN 的信号传导目前还未见报道。syndecan-3 (神经元 syndecan, N-syndecan) 是一种跨膜硫酸乙酰肝素蛋白多糖, 含硫酸乙酰肝素链, 是许多生长因子和黏附因子的结合部位。2011 年研究发现 GDNF 能够以 RET 和 NCAM 不依赖的方式直接结合 syndecan-3, 激活胞内信号通路, 促进细胞扩散, 神经轴突生长和神经元迁移, 在大脑皮质发育过程中发挥重要作用。除 GDNF 外, NRTN、ARTN 亦能与 syndecan-3 结合^[13]。进一步研究^[13]发现 syndecan-3 作为受体直接传递信号并不是其最主要功能, 其最主要的作用是通过硫酸乙酰肝素链趋化并富集 GDNF、NRTN 和 ARTN, 使 GFL 的浓度在细胞膜表面局部升高, 形成 GFL 库。通过 syndecan-3 胞外段水解释放出来的可溶性的 GDNF 能结合 GFR α -RET 或 GFR α -NCAM 形成复合体发挥作用。已有研究^[17]证实, 缺乏硫酸乙酰肝素, GDNF 诱导的 RET 磷酸化和神经轴突生长均不能发生, 然而如果 GDNF 浓度很高可以使不表达硫酸乙酰肝素细胞表面的 RET 激活, 这提示硫酸乙酰肝素在局部聚集和调节 GDNF 信号中的重要作用。当然, syndecan-3 只是含硫酸乙酰肝素的成员之一^[9], 不排除有其它含硫酸乙酰肝素成员的作用, 关于 syndecan-3 相关的复合体的功能阐明需要进一步的深入研究。

2 GDNF/GFR $\alpha 1$ 信号促进肿瘤进展作用

2.1 促进肿瘤存活、增殖、侵袭和转移

有研究^[18]通过原位杂交和免疫组化等实验方法比较了良性乳房疾病与乳腺癌中 GDNF 的受体 GFR $\alpha 1$ 的表达, 发现乳腺癌组织中 GFR $\alpha 1$ 的表达量较良性乳房组织显著增加, 且 GFR $\alpha 1$ 表达量与乳腺癌患者的肿瘤淋巴结转移、高的临床分期呈正相关, 与患者的生存时间呈负相关。侵袭性乳腺癌组织芯片筛选实验发现 GFR $\alpha 1$ 和共受体 RET 在部分雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 阳性或孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 阳性的侵袭性乳腺癌肿瘤中表达量较 ER⁻PR⁻ 的侵袭性肿瘤显著增高。GDNF 体外刺激 RET⁺/GFR $\alpha 1$ ⁺ MCF7 乳腺癌细胞能够显著促进细胞的增殖、存活和分散。小鼠肿瘤模型研究^[19]发现, 炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 通

过协同作用上调肿瘤微环境中成纤维细胞和肿瘤细胞 GDNF 的表达和分泌,并以自分泌和旁分泌的方式作用于肿瘤细胞进而活化 RET/ GFR α 1 通路,促进乳腺癌的进展与转移。胶质瘤的高致死率离不开它的高迁移侵袭能力,迁移侵袭能力强的胶质瘤细胞 GDNF 的表达量显著高于迁移侵袭能力弱的胶质瘤细胞。研究^[20]发现 GDNF 通过 GDNF/RET/ GFR α 1 或 GDNF/RET/GFR α 2 复合物方式激活下游的 ERK、JNK、c-jun、API 信号通路,促进 MMP-13 的分泌从而增强胶质瘤细胞的迁移能力。除乳腺癌、胶质瘤外,GDNF 还被证实能够促进结肠癌细胞及口腔癌细胞的迁移,GDNF 通过增加 VEGF-VEGFR 的相互作用促进结肠癌细胞系 HCT116、SW480 的迁移^[21],通过上调基质金属蛋白酶 MMP9、MMP13 的表达促进口腔癌 HSC3 细胞的迁移^[22]。上述两个促迁移过程分别受 p38、PI3K/Akt、HIF1 α 和 ERK、p38、JNK、API 信号通路调节^[21-22]。此外,GDNF 能够增强结直肠癌细胞系整合素的表达,阻断 RET/GFR α 1 或者整合素 P1 亚单位能抑制 GDNF 对结直肠癌细胞入侵细胞外基质的促进作用^[23]。

2.2 促进神经侵袭

神经侵袭是肿瘤除血行转移、淋巴转移外的另一转移途径。胰腺癌即使在疾病的早期也经常伴随着沿胰腺内、外的神经侵袭。研究^[24]发现伴神经侵袭的胰腺癌患者的肿瘤组织样本中 GFR α 1 和 RET 的表达量显著高于不伴神经侵袭的患者。GDNF 能够促进胰腺癌细胞的嗜神经侵袭。胰腺癌细胞系 PANC-1 表达 RET 和 GFR α 1,体内外实验发现 GDNF 能够刺激 PANC-1 细胞激活 Ras-Raf-MEK-ERK 和 PI-3k/Akt 信号途径,有效趋化 PANC-1 细胞,使用信号分子特异性抑制剂或者稳定表达 dominant-negative H-Ras 均能抑制 GDNF 介导的 PANC-1 细胞的迁移和侵袭^[25]。此外,GDNF 趋化胰腺癌细胞的神经浸润与 MMP9 有关。GDNF 以 PI3K 依赖的方式上调胰腺癌细胞系 MiaPaCa-2 中 MMP9 的表达,以 Ras-Raf-MEK-ERK 依赖的方式激活 MMP9,进而 MMP9 降解细胞外基质,促进癌细胞的侵袭和转移^[26]。GDNF/ GFR α 1 的共受体 RET 在胰腺癌的嗜神经侵袭中发挥不可或缺的作用,RET 功能缺陷后胰腺癌细胞就失去了神经周围浸润和神经损害的功能。胰腺癌细胞的 GFR α 1 受体可以由神经细胞分泌的可溶性 GFR α 1(soluble GFR α 1, sGFR α 1)代替,sGFR α 1 可以招募 GDNF,然后一起激活 RET^[27]。除神经对胰腺癌细胞的作用外,胰腺癌细胞也能通过自分泌/旁分泌 GDNF 的方式促进自身

肿瘤的进展^[28]。

2.3 化疗抵抗

化疗和放疗是目前肿瘤治疗的常规方法。但化、放疗的基因毒作用能够造成 DNA 损伤,导致肿瘤微环境中的正常细胞受损并释放大量细胞因子,进而以旁分泌方式诱导肿瘤细胞的化、放疗抵抗。研究^[29]发现,放射线、拓扑异构酶抑制剂米托蒽醌(mitoxantrone)、微管毒物多西他赛(docetaxel)处理后的前列腺和骨基质细胞中 GDNF 的表达增加。成纤维细胞的 GDNF 能通过旁分泌方式活化前列腺癌细胞中的 GFR α 1/SRC/ERK 信号通路,进而促进前列腺癌细胞增殖和侵袭。此外,GDNF 能诱导前列腺癌细胞对米托蒽醌和多西他赛的耐受,在米托蒽醌刺激下,GDNF 能够增强 GFR α 1 高表达细胞的细胞活力;还能够促进 LNCap 细胞(表达低水平的 RET 和 GFR α 1)的生存。研究表明^[29],GDNF 能直接影响前列腺癌化疗的效力,促进化疗抵抗。芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors, AI)是治疗 ER⁺ 乳腺癌的常用药物,2D 或 3D 乳腺癌细胞培养实验发现,AI 耐受的细胞模型中 GDNF 信号显著增强。GDNF-RET 信号通路的激活能促进 AI 耐受细胞的存活,并诱发 AI 敏感细胞的化疗抵抗,抑制 RET 活性,能部分挽救上述现象^[30]。除前列腺癌和乳腺癌外,GDNF 还能诱导神经系统肿瘤的化疗抵抗。GDNF 刺激的恶性胶质瘤细胞有丝分裂行为增加,并能耐受化疗药物 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)的处理,该过程与 GDNF 激活 Akt 信号通路,抑制 JNK 活性有关,恶性胶质瘤中剪接体 GFR α 1b 和 RET9 是主要表达的共受体^[31]。

2.4 细胞黏附

细胞间黏附和分散的平衡是影响细胞迁移的重要因素。研究^[19]发现,GDNF 能促进 RET⁺/ GFR α 1⁺ 乳腺癌 MCF7 细胞集落的发散,尤其在细胞集落的边缘位置。GDNF 刺激后,MCF7 肌动蛋白重组能力减弱,应力纤维形成增多,黏着斑数量增加,失去了原有的紧密堆积、牢固黏附的细胞形态。TGF- β 能促进细胞的上皮间质转化,削弱细胞之间的黏附,促进细胞迁移。GDNF 和 TGF- β 共刺激 MCF7 细胞较 TGF- β 单独刺激能更有效地削弱细胞间的黏附。TGF- β 被证实能够招募 GFR α 1 至信号复合体,GDNF/RET/GFR α 1 能增强乳腺癌细胞的运动性。在神经母细胞瘤细胞中,GDNF 能通过 Rac1 和 RhoA 诱导黏着斑激酶磷酸化,促进板状伪足的形成^[25, 32]。GFR α 1 能以 GDNF 依赖的方式介导 GFR α 1⁺ 神经细胞之间的同型黏附,促进神经突触

的生长,影响神经细胞间的相互作用,对神经系统发育有重要作用。sGFR α 1 能通过结合 GDNF 干扰这种同型黏附。同型黏附在肿瘤中的作用目前尚未阐明^[14, 33]。此外, GFR α 1 能够削弱 NCAM-NCAM 介导的细胞同型黏附,促进 GDNF 与 NCAM 的相互作用^[34]。

3 GDNF/GFR α 1 信号抑制肿瘤进展研究

上述研究表明 GDNF/GFR α 1 信号能够通过促进肿瘤增殖、侵袭及化疗抵抗等方式促进肿瘤的进展和转移,但在一些肿瘤中 GDNF/GFR α 1 信号亦具有抑制肿瘤进展的作用。用 single-CpG resolution infinium array 对正常人的肺组织、肺腺癌患者的癌旁和癌组织进行 DNA 甲基化分析发现, *GFR α 1* 在正常组织中处于非甲基化状态,在癌旁组织中处于甲基化状态,癌组织的 *GFR α 1* 甲基化程度高于癌旁组织。*GFR α 1* 的甲基化程度与肺腺癌进展呈正相关。组织学分析显示 *GFR α 1* mRNA 表达量越高,肺腺癌的恶性程度越低。高甲基化状态使 *GFR α 1* mRNA 表达量下调,限制了 GFR α 1 抑制肺腺癌进展的作用^[35]。虽然 *RET* 在甲状腺癌和嗜铬细胞瘤中起致癌基因的作用,但在结直肠癌中 *RET* 是抑癌基因。通过 DNA 甲基化检测发现, *RET* 在结直肠癌中的甲基化比例高于结肠腺瘤中甲基化的比例(63% vs 27%)。异常的甲基化降低了 *RET* 的表达量,重新表达 *RET* 能导致结直肠癌细胞凋亡,起到抑癌作用。除甲基化外,在原发结直肠癌中还发现了突变的 *RET*, *RET* 突变后失活,进一步证实了 *RET* 在结直肠癌中的抑癌作用^[36]。有研究^[37]表明, GDNF 能削弱氨基糖苷硫酸钠(DSS)诱导的肠道炎症,提高肠道功能。由此可推测, GDNF 可能减缓 AOM/DSS 诱导的结肠癌的发生。

4 可溶性 GDNF/GFR α 1 的来源

GDNF/GFR α 1 除了组成型或诱导性地表达在细胞表面,还能以可溶性形式存在于细胞间或体液中。可溶性 GDNF/GFR α 1 的来源如下:

4.1 神经系统

4.1.1 神经间质细胞 (1) 胶质细胞(glia cells): GDNF 首先发现来源于神经元损伤刺激的胶质细胞^[8]。随后研究^[14, 33]发现,胶质细胞表面还能释放出可溶性的 GFR α 1,参与神经的生长,调节 GFR α 1⁺神经细胞之间的同型黏附。(2) 星形胶质细胞(astrocytes): LPS 诱导的脊髓炎症及炎症性肠炎等慢性炎症中都发现星形胶质细胞高表达 GDNF^[38, 39]。

星形胶质细胞在炎症刺激如 LPS 或促炎细胞因子 TNF α 或 IL-1 β 的作用下能够释放大量 GDNF^[40]。(3) 肠胶质细胞(enteric glial cells): 肠胶质细胞释放的 GDNF 是肠神经系统的重要神经营养因子,在促进肠神经的发育和生存中发挥突出作用。GDNF 能抑制肠道的黏膜炎症,并减少神经元的凋亡,且与肠道蠕动有关。胶毒素去除大鼠的肠胶质细胞后,大鼠表现出肠动力障碍^[37]。GDNF 是肠胶质细胞 GFR α 1/RET 强有力的激动剂,能引起多种生理和病理的改变^[41-42]。(4) 施万细胞(Schwann cells): 施万细胞是周围神经系统 GDNF 的重要来源,且施万细胞还能释放可溶性的 GFR α 1,促进 GDNF 对损伤和退行性改变的神经的修复。值得一提的是,施万细胞表面 GPI 交联的 GFR α 1 的共受体是 NCAM,而非 RET^[14]。

4.1.2 神经细胞 (1) 神经节(neural ganglia): 后根神经节能释放可溶性 GFR α 1,激活 RET,促进胰腺导管腺癌细胞的迁移和嗜神经侵袭^[27]。免疫组化分析人胰腺癌组织发现, GDNF 主要分布于胰腺周围的神经节^[43]。(2) 神经元前体细胞(neuron): RN33B 是一种永生化的神经前体细胞系,其培养上清提取液中能检测到可溶性 GFR α 1 的存在^[44]。

4.2 肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)

研究发现,胰腺癌患者的神经内膜中浸润的巨噬细胞(endoneurial macrophage, EM)较正常神经显著增多。EM 主要分布于肿瘤细胞侵袭的神经,是由肿瘤细胞释放的集落刺激因子 1 招募而来,故又称肿瘤激活的 EM(tumor activated EM, tEM)。tEMs 能分泌大量的 GDNF,诱导 RET 磷酸化,激活下游 ERK 通路。抑制 GFR α 1 和 RET 后能够显著抑制 tEM 条件培养基的促肿瘤细胞迁移作用^[45]。

4.3 癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)

在乳腺癌中,浸润的 α SMA⁺的成纤维细胞表达高水平的 GDNF,在非癌组织的成纤维细胞中未能检测到 GDNF 的表达^[19]。有研究^[46]发现乳腺癌浸润的 TAM 能够分泌大量的 TNF- α 和 IL-1 β ,这些炎症因子以旁分泌方式进而上调移植瘤模型中浸润的 α SMA⁺的成纤维细胞和 GFR α 1⁺人乳腺癌中的间质成纤维细胞 GDNF 的表达。

4.4 肿瘤细胞

部分肿瘤细胞能分泌 GDNF,如胶质瘤细胞 T98G、A172^[43],胰腺癌细胞 BxPC、MIAPaca-2^[47]。

5 GDNF/GFR α 1 信号转导机制

5.1 RET 依赖信号途径(GDNF/GFR α 1/RET 信号)

GDNF 能诱导 RET 四个关键酪氨酸激酶位点磷酸化,即 Tyr905、Tyr1015、Tyr1062 和 Tyr1096。其中 Tyr1096 是 RET51 特有的,其他位点为 RET9、RET43、RET51 共有。Tyr905、Tyr1015、Tyr1096 激活后分别将信号传递给 GRB7/10、PLC、GRB2。Tyr1062 被发现能结合至少 5 种不同的接头蛋白,包括 Shc、FRS2、DOK4/5、IRS1/2、enigma。GDNF 通过 RET 能激活 RAS/ERK、MAPK、JNK、PI3K/Akt 等信号通路,激活这些信号通路主要是通过激活 Tyr1062 磷酸化^[48]。另外,GDNF 能通过激活 Tyr1015 激活 PKC 信号通路^[28]。RET 各酪氨酸激活位点的下游信号通路详见综述^[48]。RET 在脂筏内外传导的信号途径不同。在脂筏内,RET 主要与脂锚定接头蛋白 FRS2 相互作用,在脂筏外,RET 主要与游离的 Shc 结合^[7]。泛素连接酶 Cbl 能通过 GRB2 部分调节 RET 的周转半衰期^[49]。除酪氨酸激酶位点外,RET 胞内段的 Ser696 参与 GDNF 诱导的 Rac 信号通路,参与伪足的形成^[7]。GDNF 能阻断 RET 触发的促细胞凋亡作用^[50]。突变的 RET 已经被证实与人乳头状甲状腺癌、多发性内分泌瘤 2A 和 2B 型有关^[48]。

5.2 RET 非依赖途径(GDNF/GFR α 1/NCAM 信号)

GFR α 1 在一些组织中的分布较 RET 更加广泛,提示 GDNF 可能以 RET 非依赖的途径发挥作用。NCAM 的胞外段包含 5 个 N 端免疫球蛋白区域、2 个纤连蛋白样区域。研究^[34]发现,NCAM 的第 3 个免疫球蛋白区域能与 GDNF 结合。通过分子模型与位点突变等进一步确定了第 3 个免疫球蛋白域的 4 个氨基酸残基是 NCAM 与 GDNF 相互作用的关键位点。在正常情况下,NCAM 与 GDNF 是低亲和力结合的,只有在 GFR α 1 存在条件下,才能与 GDNF 高亲和力结合且激活 GDNF 相关信号通路。NCAM 的第 4 个免疫球蛋白域是与 GFR α 1 结合的区域。在培养的施万细胞和皮质神经元中,GDNF 能通过 GFR α 1 和 NCAM 的亚型 p140NCAM 激活胞质酪氨酸激酶 Fyn 和 FAK^[14]。RET-GFR α ⁺ 细胞中,GDNF 还能诱导 MET 磷酸化。通过培养神经细胞与上皮细胞发现,GDNF 诱导 MET 磷酸化依赖于 Src 家族激酶。该过程可能受乙酰肝素蛋白聚糖及 NCAM 的调节。GDNF 能以 RET 非依赖的方式激活 Src 家族激酶、ERK、MAPK、PLC,磷酸化转

录因子 CREB,诱导 Fos 的表达^[9]。尚有其他 GDNF 共受体未被发现。

5.3 膜型 GFR α 1(membranous GFR α 1, mGFR α 1) 信号途径

mGFR α 1 与 GPI 交联固定在膜上,没有胞内段和跨膜区,胞外段可分为 N 端、中间段、C 端 3 个区域^[34]。mGFR α 1 除了辅助 RET 或 NCAM 等共受体传导 GDNF 相关信号通路外,还发挥独特的作用。在没有 RET 或 NCAM 存在情况下,mGFR α 1 能以 GDNF 诱导的方式发生细胞间的同型黏附。神经突触前和突触后的 mGFR α 1 维系的神经细胞同型黏附能触发突触成熟,且是影响突触囊泡向突触终端迁移的重要环节。突触前 GDNF/mGFR α 1/NCAM 诱导的信号通路也参与突触囊泡向突触终端迁移的过程。无论 GDNF 存在或不存在,mGFR α 1 都能阻断 NCAM⁺ 细胞间的同型黏附,增加 NCAM 与 GDNF 相互作用能力^[14]。mGFR α 1 与 NCAM 发挥相互作用部位是 N 端区域,而 N 段区域并非 GFR α 1 与 GDNF 相互作用的必要区域^[34]。mGFR α 1/NCAM 与 GDNF/mGFR α 1/NCAM 是两个相互独立的信号通路^[14]。GFR α 1 有两个剪接体:GFR α 1a 和 GFR α 1b,两者在 N 端区域有 5 个氨基酸的差异。研究^[32]发现,在 GDNF 刺激下,是 GFR α 1a 而非 GFR α 1b 能通过激活 ERK1/2、Rac1 和 Cdc42 促进神经母细胞瘤细胞的神经轴突生长。在共表达 GFR α 1a 和 GFR α 1b 的细胞中,GDNF 能抑制神经轴突的生长。GFR α 1b 抑制 GFR α 1a 的作用依赖于 RhoA 和 ROCK 的激活。只有 GFR α 1b 能激活 RhoA 和 ROCK 下游效应分子 LIMK1/2、cofilin 和 MLC2,GFR α 1a 不能激活^[32]。RET 和 NCAM 在 GFR α 1 剪接体信号通路中的作用尚未研究清楚。

5.4 sGFR α 1 信号途径

sGFR α 1 是 mGFR α 1 被未知的蛋白酶或磷酸酶水解产生^[14]。同 mGFR α 1 相似,sGFR α 1 也能招募 RET 到脂筏发挥作用,但是两者的动力机制不同。mGFR α 1 本就在脂筏上,与 GDNF 二聚体形成四聚体复合物后,趋化脂筏外的 RET 到脂筏内形成六聚体复合物。sGFR α 1 与 GDNF 形成复合物后与脂筏外的 RET 直接形成六聚体,然后以六聚体的形式迁移到脂筏上,驱动六聚体复合物迁移的机制尚不明了。与 mGFR α 1 不同,sGFR α 1 还能介导 RET 脂筏外的信号通路,脂筏外六聚体复合物中的 RET 磷酸化位点 Tyr1062 被激活,募集 Shc 及其下游靶基因,调控 MAPK 等信号通路^[44]。除调节 RET 信号通路外,

sGFR α 1 能够干扰 GDNF 依赖的 mGFR α 1 介导的细胞同型黏附, 与 mGFR α 1 共同调节神经的发育, 尤其是神经突触的成熟^[14]。sGFR α 1 与 mGFR α 1 的相互平衡对神经系统的发育有重要意义。

6 展 望

神经营养因子 GDNF/GFR α 1 信号不仅调控神经系统的分化和发育, 还参与肿瘤的发展和侵袭、转移过程。GDNF/GFR α 1 信号在不同组织类型的肿瘤中发挥着不同的效应, 在乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌及神经胶质瘤中起促进肿瘤进展的作用; 而在肺癌和肠癌中则起抑瘤效应, 提示 GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤进展中的作用和分子信号机制需要进一步深入研究, GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤进展中的作用尚存在许多问题亟待研究与解决。(1) 不同组织类型的肿瘤中 GDNF/GFR α 1 表达差异性的调控因素和机制如何? 即肿瘤微环境中的何种因素调控了 GDNF/GFR α 1 不同组织类型肿瘤中表达的高低? (2) GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤免疫逃逸中的作用机制尚未清晰; (3) GDNF/GFR α 1 信号与其他信号通路如 TGF- β 信号之间是否存在的交互作用? (4) GDNF/GFR α 1 信号通路是否还存在一些尚未被发现的共受体和相互作用蛋白? 相信随着神经-内分泌-免疫-肿瘤研究领域的深入和上述问题的阐明, GDNF/GFR α 1 信号在肿瘤进展中的作用会更加清晰, 靶向 GDNF/GFR α 1 信号防治肿瘤的策略会更加完善。

[参 考 文 献]

- [1] Adriaenssens E, Vanhecke E, Saule P, et al. Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2): 346-351.
- [2] Demont Y, Corbet C, Page A, et al. Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(3): 1923-1931.
- [3] Okugawa Y, Tanaka K, Inoue Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B pathway in gastric cancer [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(1): 121-130.
- [4] Krygier S, Djakiew D. Neurotrophin receptor p75(NTR) suppresses growth and nerve growth factor-mediated metastasis of human prostate cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(1): 1-7.
- [5] Truzzi F, Marconi A, Lotti R, et al. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration[J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(8): 2031-2040.
- [6] Papageorgis P, Stylianopoulos T. Role of TGFbeta in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review) [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(3): 933-943.
- [7] Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(5): 383-394.
- [8] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- [9] Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 19): 3855-3862.
- [10] Gill SS, Patel NK, Hotton GR, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease[J]. *Nat Med*, 2003, 9(5): 589-595.
- [11] Slevin JT, Gerhardt GA, Smith CD, et al. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor[J]. *J Neurosurg*, 2005, 102(2): 216-222.
- [12] Lang AE, Gill S, Patel NK, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease[J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(3): 459-466.
- [13] Beshpalov MM, Sidorova YA, Tumova S, et al. Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin[J]. *J Cell Biol*, 2011, 192(1): 153-169.
- [14] Paratcha G, Ledda F. GDNF and GFRalpha: a versatile molecular complex for developing neurons[J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(8): 384-391.
- [15] Wells SA, Santoro M. Targeting the RET pathway in thyroid cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(23): 7119-7123.
- [16] Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands[J]. *Cell*, 2003, 113(7): 867-879.
- [17] Barnett MW, Fisher CE, Perona-Wright G, et al. Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 23): 4495-4503.
- [18] Wu ZS, Pandey V, Wu WY, et al. Prognostic significance of the expression of GFRalpha1, GFRalpha3 and syndecan-3, proteins binding ARTEMIN, in mammary carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 34.
- [19] Essegir S, Todd SK, Hunt T, et al. A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11732-11741.
- [20] Lu DY, Leung YM, Cheung CW, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration and matrix metalloproteinase-13 expression in glioma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(8): 1201-1209.
- [21] Huang SM, Chen TS, Chiu CM, et al. GDNF increases cell motility in human colon cancer through VEGF-VEGFR1 interaction[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(1): 73-84.
- [22] Chuang JY, Tsai CF, Chang SW, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration in human oral squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncol*, 2013, 49(12): 1103-1112.
- [23] Furuta A, Funahashi H, Sawai H, et al. The relationship between

- GDNF and integrins in human colorectal cancer cell activity[J]. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(77): 1398-1402.
- [24] Gil Z, Cavel O, Kelly K, et al. Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(2): 107-118.
- [25] Veit C, Genze F, Menke A, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5291-5300.
- [26] Okada Y, Eibl G, Duffy JP, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor upregulates the expression and activation of matrix metalloproteinase-9 in human pancreatic cancer[J]. *Surgery*, 2003, 134(2): 293-299.
- [27] He S, Chen CH, Chemichenko N, et al. GFR α 1 released by nerves enhances cancer cell perineural invasion through GDNF-RET signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(19): E2008-2017.
- [28] Liu H, Li X, Xu Q, et al. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor in perineural invasion of pancreatic cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(1): 112-120.
- [29] Huber RM, Lucas JM, Gomez-Sarosi LA, et al. DNA damage induces GDNF secretion in the tumor microenvironment with paracrine effects promoting prostate cancer treatment resistance[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2134-2147.
- [30] Morandi A, Martin LA, Gao Q, et al. GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(12): 3783-3795.
- [31] Ng WH, Wan GQ, Peng Z N, et al. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) family of ligands confer chemoresistance in a ligand-specific fashion in malignant gliomas[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(3): 427-436.
- [32] Yoong LF, Wan G, Too HP. GDNF-induced cell signaling and neurite outgrowths are differentially mediated by GFR α 1 isoforms[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 41(4): 464-473.
- [33] Ledda F, Paratcha G, Sandoval-Guzman T, et al. GDNF and GFR α 1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(3): 293-300.
- [34] Sjostrand D, Ibanez CF. Insights into GFR α 1 regulation of neural cell adhesion molecule (NCAM) function from structure-function analysis of the NCAM/GFR α 1 receptor complex[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(20): 13792-13798.
- [35] Sato T, Arai E, Kohno T, et al. DNA methylation profiles at pre-cancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59444.
- [36] Luo Y, Tsuchiya K D, Il Park D, et al. RET is a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer[J]. *Oncogene*, 2013, 32(16): 2037-2047.
- [37] Liu GX, Yang YX, Yan J, et al. Glial-derived neurotrophic factor reduces inflammation and improves delayed colonic transit in rat models of dextran sulfate sodium-induced colitis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19(1): 145-152.
- [38] Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(7): 1748-1757.
- [39] Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, et al. Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury[J]. *Neuroreport*, 2005, 16(2): 99-102.
- [40] Kuno R, Yoshida Y, Nitta A, et al. The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes[J]. *Brain Res*, 2006, 1116(1): 12-18.
- [41] Von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, et al. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation[J]. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11: 3.
- [42] Rusmini M, Griseri P, Lantieri F, et al. Induction of RET dependent and independent pro-inflammatory programs in human peripheral blood mononuclear cells from Hirschsprung patients[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59066.
- [43] Okada Y, Takeyama H, Sato M, et al. Experimental implication of celiac ganglionotropic invasion of pancreatic-cancer cells bearing c-ret proto-oncogene with reference to glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) [J]. *Int J Cancer*, 1999, 81(1): 67-73.
- [44] Paratcha G, Ledda F, Baars L, et al. Released GFR α 1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts[J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 171-184.
- [45] Cavel O, Shomron O, Shabtay A, et al. Endoneurial macrophages induce perineural invasion of pancreatic cancer cells by secretion of GDNF and activation of RET tyrosine kinase receptor[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(22): 5733-5743.
- [46] Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions [J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5(1): 31-36.
- [47] Liu H, Ma Q, Li J. High glucose promotes cell proliferation and enhances GDNF and RET expression in pancreatic cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 347(1-2): 95-101.
- [48] Ichihara M. RET and neuroendocrine tumors[J]. *Cancer Lett*, 2004, 204(2): 197-211.
- [49] Scott RP, Eketjall S, Aineskog H, et al. Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13442-13449.
- [50] Bordeaux MC, Forcet C, Granger L, et al. The RET proto-oncogene induces apoptosis: a novel mechanism for Hirschsprung disease[J]. *EMBO J*, 2000, 19(15): 4056-4063.

[收稿日期] 2015 - 06 - 09 [修回日期] 2015 - 10 - 29

[本文编辑] 党瑞山