

跨膜蛋白 Lgr5 作为胃肠道恶性肿瘤干细胞分子表面标记物的研究进展

陈志达, 陈 凛, 郝洪庆

解放军总医院第一医学中心普通外科医学部, 北京 100853

摘要: 肿瘤干细胞具有持续自我更新和多向分化的特性, 是导致肿瘤复发和耐药的主要原因。能否准确识别并靶向摧毁肿瘤干细胞, 已经成为肿瘤学研究的新方向和热点问题。跨膜蛋白 Lgr5 广泛表达于消化道组织, 具有极强的干细胞活性, 并且在消化道恶性肿瘤细胞膜表面特异性高表达。深入了解 Lgr5 蛋白的分子特点有助于提高消化道肿瘤干细胞分选效率, 对进一步研究消化道肿瘤的发生发展机制、探索新的治疗方法、提高总体预后具有重要意义。本文将 Lgr5 蛋白结构特点为基础, 结合信号转导通路和不同胃肠道肿瘤生物学活性特点, 总结追踪近年来 Lgr5 蛋白作为干细胞标记物在胃肠道肿瘤基础领域的最新进展, 为下一步研究提供理论储备。

关键词: 消化道恶性肿瘤; 肿瘤干细胞; Lgr5; 上皮间质转化; 信号通路

中图分类号: R735

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2023)09-1060-04

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.2023.048

引用本文: 陈志达, 陈凛, 郝洪庆. 跨膜蛋白 Lgr5 作为胃肠道恶性肿瘤干细胞分子表面标记物的研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44 (9): 1060-1062.

Research advances in transmembrane protein Lgr5 as a molecular surface marker of stem cells from gastrointestinal malignancies

CHEN Zhida, CHEN Lin, XI Hongqing

Department of General Surgery, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: XI Hongqing. Email: xihongqing@126.com

Abstract: Tumor stem cells have the property of continuous self-renewal and multi-directional differentiation, which are the main causes of tumor recurrence and drug resistance. Whether the tumor stem cells can be accurately identified and targeted for destruction has become a new direction and hot topic in the research of oncology. The transmembrane protein Lgr5 is widely expressed in the digestive tract and has extremely strong stem cell activity. In addition, it has the characteristics of high specific expression on the membrane surface of gastrointestinal malignant tumors. In-depth understanding of the molecular characteristics of Lgr5 protein will help improve the sorting efficiency of gastrointestinal tumor stem cells, which is of great significance for further research on the occurrence and development mechanism of gastrointestinal tumors, exploration of new therapeutic methods, and improvement of the overall prognosis. Based on the structural characteristics of Lgr5 protein, in combination with the signal transduction pathways and the biological activity characteristics of different gastrointestinal tumors, this paper reviews the latest progress of the Lgr5 protein as a stem cell marker in the basic research field of gastrointestinal tumors in recent years, so as to provide theoretical foundation for further research.

Keywords: digestive tract tumor; tumor stem cells; Lgr5; epithelial-mesenchymal transition; signaling pathway

Cited as: Chen ZHD, Chen L, Xi HQ. Research advances in transmembrane protein Lgr5 as a molecular surface marker of stem cells from gastrointestinal malignancies [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44 (9): 1060-1062.

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 具有干细胞特性, 同时也具有肿瘤细胞的不死性、去接触抑制、迁徙性等固有本质, 是导致肿瘤复发和耐药的主要原因^[1]。Lgr5 蛋白是 G 蛋白偶联受体家族成员, 是由 Lgr5 基因编码表达的跨膜蛋白, 广

泛表达于消化道组织, 具有极强的干细胞活性, 能够持续自我更新, 可以分化多谱系子代细胞^[2]。近 10 年来, 大量分子生物学、基于免疫抗体反应的基因谱系追踪、类器官培养和小鼠动物实验等研究结果不断证实 Lgr5 阳性标记细胞具有促进肿瘤发生、发展、转移以及上皮-间充质转化的潜能^[3-5]。基于 Lgr5 蛋白在胃肠肿瘤干细胞中高表达属性, Lgr5 蛋白被推荐为胃肠恶性肿瘤干细胞的标记物^[6]。为更好地认识跨膜蛋白 Lgr5 的干细胞标记物属性和特点, 本文荟萃追踪近年来 Lgr5 蛋白作为干细胞标记物在胃肠道肿瘤基础领域的最新进展, 并

收稿日期: 2022-11-02

基金项目: 北京市科技新星计划课题 (Z181100006218011); 军队医学科技青年培育计划拔尖项目 (20QNYPY113)

作者简介: 陈志达, 男, 博士, 主治医师, 讲师。研究方向: 消化道恶性肿瘤的治疗和微创治疗。Email: pinker111@126.com

通信作者: 郝洪庆, 男, 博士, 副主任医师, 副教授, 解放军总医院普通外科医学部腹部创伤外科副主任。Email: xihongqing@126.com

结合信号转导通路和不同胃肠道肿瘤生物学活性特点, 梳理分析 Lgr5 蛋白的标记识别作用、调控诱导机制以及作为靶标临床靶向治疗的潜在可能性, 为下一步研究提供理论储备。

1 Lgr5 蛋白的结构基础

Lgr5 基因大小 144 kb, 位于 12q22 ~ 23 染色体区域, 内有 907 个碱基序列的开放式阅读框架编码区域, 由此转录翻译产生 Lgr5 蛋白。Lgr5 蛋白的结构与促甲状腺激素、促卵泡激素、促黄体激素受体等其他糖蛋白激素受体相似, 都属于 G 蛋白偶联受体家族 (G protein-coupled receptor, GPCR), 但其 N 末端胞外配体结合区域却显著不同^[7]。Lgr5 蛋白的 N 末端胞外结构由富含亮氨酸的 17 个重复序列、1 个信号肽和 7 次 α -螺旋跨膜的高度保守区域组成, 是 Lgr5 蛋白与糖蛋白配体相互接触的重要结构^[2]。

Lgr 蛋白家族同属于胞膜蛋白, 其中激素受体 Lgr1、Lgr2 和 Lgr3 蛋白很早就已经通过分离实验获知其相应的配体。因苦于没有找到相应的配体, Lgr 蛋白家族的 Lgr4、Lgr5 和 Lgr6 蛋白一直被认为是“孤儿”受体, 直到 2011 年荷兰学者 De Lau 等^[8]在体外培养细胞时发现 R-spondin 生长因子 (R-spondin growth factor) 作为配体可以与 Lgr4、Lgr5 和 Lgr6 蛋白结合, 继而激活相应信号通路发挥作用。

Lgr5 蛋白是跨膜蛋白, 主要定位在细胞膜表面, 通过与配体因子相互作用激活信号通路发挥调控作用。近年来多项研究表明, Lgr5 蛋白具有空间动态分布特点, 在细胞质和细胞核中也可以检测到 Lgr5 蛋白的表达^[9]。因此, Lgr5 蛋白的多次跨膜结构和细胞内分布属性是其介导细胞内外信号传递的重要基础, 为 Lgr5 蛋白标记调控细胞通路影响肿瘤细胞功能提供了可能。

2 Lgr5 蛋白标记与信号通路的关系

2.1 Wnt 信号通路

Wnt 信号通路是目前胃肠道肿瘤 Lgr5 蛋白相关性研究较为集中的通路。在 Lgr5 蛋白参与肿瘤发生、进展和转移过程中, 受到强化的 Wnt 信号通路是最核心的通路途径, 刺激肿瘤干细胞增殖和自我更新^[10]。当它被异常激活后, 将会促进胃癌细胞的增殖、迁移和 EMT 转化, 进而影响胃癌细胞的耐药能力, 而且 Wnt/ β -catenin 信号通路也被认为是驱动组织修复和干细胞自我更新的关键途径。

由成纤维细胞分泌的顶部盘状底板反应蛋白 (roof plate-specific spondins, RSPOs) 是 Lgr5 蛋白

的特异性配体, 两者相结合后以二聚体的形式存在^[11]。两者结合可以抑制 β -连环蛋白 (β -catenin) 的泛素化降解复合体功能, 导致 β -catenin 累积增多^[12], 激活 TCF 转录因子, 竞争性结合 TCF4 蛋白, 形成中介复合物, 驱动 Wnt 通路信号下游的靶基因转录过程, 对胃肠道肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、EMT 转化和耐药等过程发挥作用^[13-14]。

2.2 Hedgehog 信号通路

在正常成年人体内该通路表达静默, 但在胃肠道肿瘤组织中十分活跃, 并与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生、侵袭及转移有关^[15-16]。该通路被激活时, 释放配体蛋白 SHH 与 Ptch 蛋白结合, 解除 Ptch 蛋白对 Smoothed (Smo) 的抑制, 而 Smo 蛋白可以进入细胞核内转导引发级联反应, 刺激转录因子胶质瘤转录因子 1 转录表达, 进而改变细胞生物学特性, 促进肿瘤增殖和上皮间质转化^[17-19]。

2.3 Hippo 信号通路

Hippo 信号通路高度保守。不同于其他信号通路, Hippo 没有特异性受体和配体, 通路的核心是接收上游 G 蛋白偶联受体信号或活化的酪氨酸激酶调控引起激酶级联反应, 通过降解或积累下游效应因子 YAP 来完成 CSC 稳态调节^[20]。正常状态下, YAP 可以参与和诱导 EGFR、Notch 信号通路启动肠道干细胞暂时性再生功能, 修复肠道黏膜损伤^[21]。而在胃肠道肿瘤发展过程中, 细胞核中的 YAP 又可联合 β -catenin 蛋白、TCF4 形成结构复合体, 以 Lgr5 作为靶基因, 驱动胃肠道肿瘤细胞侵袭和迁移^[22]。

3 Lgr5 蛋白标记与胃肠道恶性肿瘤生物学活性的关系

3.1 胃癌

在正常胃部组织中, Lgr5 蛋白主要局限表达于成熟幽门腺体的底部, 并且具有自我更新能力, 承担着胃上皮细胞组织的长期更新工作。但当胃黏膜上皮细胞发生肠上皮化生, Lgr5 蛋白又转变角色, 成为促癌蛋白, 促进胃癌的发生发展^[23]。Barker 等^[24]首次通过体外实验验证了 Lgr5⁺干细胞驱动胃上皮组织的自我更新的能力, 并提出 Lgr5 蛋白可以作为干细胞研究稳定标记物的论断。随后, Yamanoi 等^[25]通过逆转录 PCR 扩增技术也发现了 Lgr5 蛋白双重身份属性, 在蛋白质合成的第一步, 即基因转录的 mRNA 水平, Lgr5 在胃癌组织中表达即显著高于正常胃黏膜组织。

胃癌组织中 Lgr5 蛋白异常升高的程度与患者生存预后密切相关, 人们开始将 Lgr5 蛋白视为胃癌预后的独立预测因子。Liu 等^[26]发现, Lgr5⁺患

者中位生存期较 Lgr5⁺患者减少 26 个月, 提示我们 Lgr5 蛋白高表达状态预示较低生存率。分析其原因, 除了 Lgr5 蛋白能够维持胃癌 CSC 的“干”性导致肿瘤难治难控的特点以外, Lgr5 蛋白表达与胃癌的 TNM 临床分期密切相关。一项纳入 257 例 I、II 期胃癌术后患者的研究中发现, N₀₋₁ 亚群中 Lgr5⁺患者 5 年总生存率显著低于 Lgr5⁻患者 (89.4% vs 54.4%), T₁₋₂ 亚群中, Lgr5⁺患者 5 年无病生存率显著高于 Lgr5⁻患者 (94.1% vs 0)^[27]。

相较于 CD133、CD44、上皮细胞黏附分子、ABCG2 等其他跨膜蛋白类胃癌相关标记物, Lgr5 蛋白具有维持胃癌 CSC 持续更新的能力, 因此 Lgr5 蛋白被视为突破 CSC 耐药困境的新策略靶点^[28]。

3.2 结直肠癌 众多研究发现, 通过干扰或敲除等方式调低 Lgr5 蛋白的表达, 可以抑制结直肠肿瘤的干细胞自我更新能力。Gzil 等^[29]的病理学分析发现, Lgr5 蛋白表达程度与结直肠肿瘤分化程度、浸润深度、TNM 分期高度相关, 即低分化、深度浸润和晚期分期的结直肠肿瘤中存在 Lgr5 蛋白高表达。且 Lgr5 蛋白高表达患者更容易出现淋巴结转移和远处器官转移, 其机制主要通过两种方式实现: (1) Lgr5⁺肿瘤干细胞可能承担转移性肿瘤干细胞的作用, 促进肿瘤细胞的播散和转移; (2) Lgr5 蛋白通过诱导上皮细胞-间充质转换过程, 促进肿瘤细胞的转移发生。因此, 依据以上两种作用方式, Lgr5 蛋白可以作为判断结直肠肿瘤预后的重要参考因素。

Liu 等^[30]研究发现, 在直肠肿瘤患者中, Lgr5 蛋白高表达组放疗有效率低于对照组, 而且更容易出现化疗药物的耐药性, 导致肿瘤复发或进展。近年来, Lgr5 蛋白高表达导致肿瘤细胞耐药性成为探究肿瘤细胞耐药性原因的重要方向。

对分选 Lgr5 标记后的结肠癌肿瘤细胞系使用 10 μg/mL 伊立替康药物 3 d, 发现肿瘤细胞停止增殖, 只有约 50% 的细胞存活, 暂时失去 Lgr5 标记, 且 Lgr5 mRNA 水平显著下降。然而, 把抗肿瘤药物处理因素去除后, 又可以通过免疫反应检测到 19%~43% 的细胞有 Lgr5 表面标记。用 5-氟尿嘧啶和奥沙利铂药物处理, 也获得了相同的结果^[31]。以上结果也提示我们 Lgr5⁺ CSC 在化疗治疗时可暂时性转为 Lgr5⁻状态, 以逃脱化疗药物的捕杀; 当化疗药物浓度下降或消失时, 再由 Lgr5⁻转为 Lgr5⁺状态并恢复肿瘤细胞大量快速增殖。因此, 如何能够紧紧锚定 Lgr5⁺ CSC, 避免脱靶现象, 成为药理学家关注的重点。

4 结语和展望

Lgr5 蛋白的广泛消化道实体肿瘤高表达特点以及与肿瘤生物学活性的高度相关性, 显示出其作为抗癌治疗靶点的潜力。通过深入研究基因组编辑技术或源于抗体特异性免疫反应靶向投送药物的传递送系统, 达到调控实体肿瘤中 Lgr5 表达, 将成为抗耐药治疗的突围点^[32]。

此外, 调控 Lgr5 在稳态干细胞和 CSC 中表达的分子机制尚不清楚, 如果我们能够进一步掌握多面的 Lgr5 复杂调节机制, 将可以极大地推动 Lgr5 靶向治疗的进步。虽然该领域已经在干细胞和体外器官培养疾病建模方面取得了巨大的进步, 但距离临床应用仍然很远。通过将基因组编辑技术与类器官培养相结合, 有可能更加真实地模拟疾病发展过程, 并跟踪 Lgr5⁺干细胞在正常生理和癌症环境中的生物学行为特点。以 Lgr5 为干细胞标记物和在多信号通路背景下研究 Lgr5⁺干细胞特点, 应用于肿瘤疾病建模、耐药性机制研究、药物靶向投送系统、动物模型移植等方向, 将是未来肿瘤干细胞生物学研究的前景领域和必经途径。

作者贡献 陈志达: 论文书写, 文献检索及整理; 陈凇: 选题指导; 郗洪庆: 论文校审; 课题基金支持。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

参考文献

- 1 Shyntar A, Patel A, Rhodes M, et al. The tumor invasion paradox in cancer stem cell-driven solid tumors [J]. *Bull Math Biol*, 2022, 84 (12): 139.
- 2 Fatehullah A, Terakado Y, Sagiraju S, et al. A tumour-resident Lgr5⁺ stem-cell-like pool drives the establishment and progression of advanced gastric cancers [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23 (12): 1299-1313.
- 3 Morgan RG, Mortenson E, Williams AC. Targeting LGR5 in Colorectal Cancer: therapeutic gold or too plastic? [J]. *Br J Cancer*, 2018, 118 (11): 1410-1418.
- 4 Cheng Q, Zheng H, Li M, et al. LGR4 cooperates with PrPc to endow the stemness of colorectal cancer stem cells contributing to tumorigenesis and liver metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2022, 540: 215725.
- 5 Ishikawa K, Sugimoto S, Oda M, et al. Identification of quiescent LGR5⁺ stem cells in the human colon [J]. *Gastroenterology*, 2022, 163 (5): 1391-1406.
- 6 Wuputra K, Ku CC, Pan JB, et al. Stem cell biomarkers and tumorigenesis in gastric cancer [J]. *J Pers Med*, 2022, 12 (6): 929.
- 7 Hsueh AJW, Feng Y. Discovery of polypeptide ligand-receptor pairs based on their co-evolution [J]. *FASEB J*, 2020, 34 (7): 8824-8832.
- 8 De Lau W, Barker N, Low TY, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling [J]. *Nature*, 2011, 476 (7360): 293-297.

- 9 Alharbi SA, Ovchinnikov DA, Wolvetang E. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 marks different cancer stem cell compartments in human Caco-2 and LoVo colon cancer lines [J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27 (15): 1578-1594.
- 10 Zhang J, Cai HQ, Sun LX, et al. LGR5, a novel functional glioma stem cell marker, promotes EMT by activating the Wnt/ β -catenin pathway and predicts poor survival of glioma patients [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37 (1): 225.
- 11 Gao YH, Cai AZ, Xi HQ, et al. Ring finger protein 43 associates with gastric cancer progression and attenuates the stemness of gastric cancer stem-like cells via the Wnt- β /catenin signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 98.
- 12 Tejada-Muñoz N, Albrecht LV, Bui MH, et al. Wnt canonical pathway activates macropinocytosis and lysosomal degradation of extracellular proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116 (21): 10402-10411.
- 13 Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13: 165.
- 14 Fu DJ, Wang LH, Chouairi FK, et al. Gastric squamous-columnar junction contains a large pool of cancer-prone immature osteopontin responsive Lgr5-CD44 + cells [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 84.
- 15 Ke B, Wang XN, Liu N, et al. Sonic hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates cell migration and invasion via induction of epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *J Cancer*, 2020, 11 (13): 3932-3943.
- 16 Cai D, Yu J, Qiu J, et al. Dynamic changes of Sonic Hedgehog signaling pathway in gastric mucosa of rats with MNNG-induced gastric precancerous lesions [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (7): 10827-10834.
- 17 Doheny D, Manore SG, Wong GL, et al. Hedgehog signaling and truncated GLI1 in cancer [J]. *Cells*, 2020, 9 (9): 2114.
- 18 Jeng KS, Chang CF, Lin SS. Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (3): E758.
- 19 Iriana S, Asha K, Repak M, et al. Hedgehog signaling: implications in cancers and viral infections [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (3): 1042.
- 20 LeBlanc L, Ramirez N, Kim J. Context-dependent roles of YAP/TAZ in stem cell fates and cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78 (9): 4201-4219.
- 21 Yu SY, Tong K, Zhao YL, et al. Paneth cell multipotency induced by Notch activation following injury [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23 (1): 46-59.
- 22 Deng FH, Peng L, Li ZJ, et al. YAP triggers the Wnt/ β -catenin signalling pathway and promotes enterocyte self-renewal, regeneration and tumorigenesis after DSS-induced injury [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (2): 153.
- 23 Xi HQ, Zhang KC, Li JY, et al. RNAi-mediated inhibition of Lgr5 leads to decreased angiogenesis in gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (19): 31581-31591.
- 24 Barker N, Huch M, Kujala P, et al. Lgr5 (+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6 (1): 25-36.
- 25 Yamanoi K, Fukuma M, Uchida H, et al. Overexpression of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 in gastric cancer [J]. *Pathol Int*, 2013, 63 (1): 13-19.
- 26 Liu XS, Lin XK, Mei Y, et al. Regulatory T cells promote overexpression of Lgr5 on gastric cancer cells via TGF- β 1 and confer poor prognosis in gastric cancer [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1741.
- 27 Ehara T, Uehara T, Nakajima T, et al. LGR5 expression is associated with prognosis in poorly differentiated gastric adenocarcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21 (1): 228.
- 28 Leng ZW, Xia QH, Chen JH, et al. Lgr5 + CD44 + EpCAM + strictly defines cancer stem cells in human colorectal cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46 (2): 860-872.
- 29 Gzil A, Zarębska I, Jaworski D, et al. The prognostic value of leucine-rich repeat-containing G-protein (Lgr5) and its impact on clinicopathological features of colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, 146 (10): 2547-2557.
- 30 Liu H, Zhang ZZ, Zhen PL, et al. High expression of VSTM2L induced resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer through downstream IL-4 signaling [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 6657012.
- 31 Morsy H, Gaballah A, Samir M, et al. LGR5, HES1 and ATOH1 in young rectal cancer patients in Egyptian [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2021, 22 (9): 2819-2830.
- 32 Xu LL, Lin WP, Wen LP, et al. Lgr5 in cancer biology: functional identification of Lgr5 in cancer progression and potential opportunities for novel therapy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10 (1): 219.

(责任编辑: 孟晓彤)