

# GPC3 在肝细胞癌发生中的作用机制研究进展

叶焯琦 李琼 单建贞 阮健

**【摘要】** 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(Glypican3, GPC3)是由硫酸乙酰肝素糖胺聚糖链和内在核心蛋白组成的细胞表面糖蛋白。它在细胞生长、胚胎发生和分化等细胞信号传导中具有重要作用。GPC3 已被证实与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生、发展密切相关,然而, GPC3 在 HCC 中的作用机制尚未完全阐明。本文阐述了 GPC3 如何通过 Wnt 和其他信号通路(包括 YAP 和 Hh)调控 HCC 发生、发展。

**【关键词】** 肝细胞癌 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 Wnt 通路 Hh 通路 YAP 通路

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,以亚洲和非洲高发。近年来西方发达国家的 HCC 发病率也呈上升趋势,尤其是美国和加拿大<sup>[1]</sup>。我国是世界上 HCC 高发地区之一,每年发病人数约为 30 万,年病死率为 20.40/10 万,其中城市为 19.98/10 万,农村为 23.59/10 万,分别居恶性肿瘤病死率的第二位和第一位<sup>[2]</sup>。磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(glypican3, GPC3)是一种细胞表面蛋白多糖,含有与核心蛋白相连的硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)链。GPC3 在 70% 的 HCC 中高表达,但在正常成人组织中不表达,与 HCC 患者的预后不良相关<sup>[3-4]</sup>。Wnt 信号在胚胎发育和组织稳态中至关重要。在成人中, Wnt 信号通路可以促进组织更新和再生,并与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[5]</sup>。多项研究表明 GPC3 的表达通过 Wnt 信号通路调控肿瘤的增殖和转移<sup>[6]</sup>。

由于 GPC3 在 Wnt 及 YAP 和 Hh 等多种信号级联反应中的重要性, GPC3 可能作为生物标志物和免疫治疗中的有效治疗靶点在 HCC 的治疗中发挥关键作用<sup>[7-8]</sup>,因此我们对 GPC3 在 HCC 中的作用机制及相关进展进行了总结。

## 1 GPC3 的结构及功能

GPC 属于肝素硫酸蛋白多糖家族,由一个核心蛋白和两条 HS 糖胺聚糖链组成,通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定驻留在细胞膜外,是介导细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间相互作用的主要部分<sup>[9]</sup>。GPC 的大小在 60~70 kDa,其 N 端有分泌信号肽, C 端为 GPI 锚。所有的 GPC 都存在 14 个保守的半胱氨酸区域,可以形成二硫键连接 N 端和 C 端。这种独特结构使其具有储存和隔离细胞因子、趋化因子和生长因子等分子的能力<sup>[7]</sup>。GPC 吸引这些分子,并在细胞外基质和细胞膜周围形成浓度梯度,允许识别不同阈值的受体。哺乳动物中,该家族包含 GPC1~6 共 6 个亚型。GPC3 的 HS 链已被证明可以结合包括 Wnt 在内的分子,也有相关研究表明核心蛋白也可能参与结合 Wnt 作为一个共受体<sup>[10-12]</sup>。有研究在 GPC3 的 N 端发现了一个用于结合 Wnt 的富含半胱氨酸的区域,这为 GPC3 是一个调节 HCC 细胞中 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导的 Wnt 共受体提供了证据<sup>[13]</sup>。GPC3 通过 HS 链吸引和储存生长因子,并将 Wnt 识别为共受体,在 HCC 细胞中发挥细胞表面糖蛋白的作用,调节 Wnt 信号通路。

## 2 GPC3 与信号通路

**2.1 通过 GPC3 调节 Wnt 信号** Wnt 通路在某些疾病中异常激活,包括肿瘤和代谢紊乱。经典的 Wnt 信号通路传递是一个  $\beta$ -catenin 依赖的过程,由 Wnt 通过两个共受体结合产生,即 G 蛋白偶联受体 Frizzled(FZD)和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6(lipoprotein receptor-

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2020.42.20.2020-3097

基金项目:国家自然科学基金(81874173);浙江省医药卫生科技项目(2017205840、2018274816);浙江省基础公益研究计划项目(LGJ18H160001)

作者单位:310003 杭州,浙江大学医学院附属第一医院肿瘤内科

通信作者:阮健, E-mail: software233@zju.edu.cn

related protein 5/6, LRP5/6)<sup>[14]</sup>。Wnt 配体与 FZD 中含有 Wnt 结合域的胞外富含胱氨酸结构域结合, 两者的相互作用促进 FZD-LRP5/6 受体复合物的形成<sup>[15]</sup>。FZD 和 LRP5/6 构象的改变以及随后糖原合酶激酶 3 和酪蛋白激酶 1 的磷酸化促进轴蛋白(Axin)的招募, 细胞质散乱蛋白(dishevelled, DVL)被招募并结合到 FZD 的 C 端尾部进而形成含有 DVL、Axin 和其他结合物的破坏复合体<sup>[16-18]</sup>。Axin 抑制了  $\beta$ -catenin 降解, 从而使  $\beta$ -catenin 在细胞质中积累, 并向细胞核移动, 驱使细胞增殖相关基因的转录<sup>[19]</sup>。由于 Wnt 信号对细胞分化和修复等多种功能至关重要, 因此 Wnt 信号通路的异常可导致多种肿瘤的发生。

GPC3 能在 HCC 中激活经典的 Wnt 信号通路, 约 95% 的 HCC 存在 Wnt/ $\beta$ -catenin 异常<sup>[20]</sup>。在 HCC 细胞系中, GPC3 过表达促进肿瘤细胞的增殖和生长, 说明 GPC3 作为 Wnt 蛋白的共受体可以调节细胞表面信号转导<sup>[14]</sup>。GPC3 和缺失 HS 链的突变体 GPC3 都能与 Wnt 形成复合物, 表明该复合物是通过 GPC3 核心蛋白激活的。Wnt 激活不需要 HS 链, 而 HS 链可能对稳定 FZD 很重要<sup>[21]</sup>, 这为 GPC3 和 Wnt 相互作用提供了初步的证据。有研究报道通过抗体阻断 GPC3 可以增强 Hep3B 等 HCC 细胞系 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号活性。Gao 等<sup>[6]</sup>分离出 HS20 抗体, 通过结合 HS 链阻断 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路, 发现 HS20 抗体干扰 GPC3 与 Wnt3a 的结合, 阻碍与 FZD 的结合, 在 HCC 细胞系和内源性表达 GPC3 的细胞中抑制了 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导。该研究还指出, HS20 在分别接种 Hep3B 和 HepG2 细胞的裸鼠体内模型中具有较强的抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>。另一项研究在 Hep3B 模型中证实了 GPC3 和 Wnt 的内源性相互作用<sup>[22]</sup>。致癌的人硫酸酯酶 2 (sulfatase 2, SULF2) 在 60% 以上的 HCC 患者中上调, 并在哺乳动物细胞中具有 6-O-脱硫酸酶活性, 可以从 HS 链中释放 Wnt, 并与 GPC3 和 Wnt 形成复合物。此外, 研究表明, HS 的硫酸化可能在结合 Wnt 和其他生长因子方面发挥重要作用。为了了解 Wnt 在 HS 聚糖上结合基序的确切机制, Gao 等<sup>[11]</sup>设计了一系列不同长度和硫酸化修饰的合成 HS 寡糖, 研究发现, 2-O 和 6-O 硫酸化对 Wnt 结合至关重要, 而 3-O 硫酸化可以增强 Wnt 结合, 这为 GPC3 HS 链上的 Wnt 结合域提供了直接证据。上述实验数据合理地联系了 GPC3、SULF2、Wnt 和 FZD。然而, HS 上精确的 Wnt 结合域在结构和功能上还有待研究证实。

通过使用 HN3 单结构域抗体, 可以发现 GPC3 核

心蛋白上有 Wnt 结合结构域<sup>[12, 23]</sup>。Gao 等<sup>[13]</sup>对 Wnt/GPC3 进行建模, 将位于 GPC3 的 N 端疏水槽内的关键残基苯丙氨酸 41(F41)突变为 F41E, 发现其在 HCC 细胞和小鼠模型中对 Wnt3a 的识别具有重要作用。同时发现 GPC3 的核心蛋白和 HS 多糖链的两个主要部分都可以调节 Wnt 信号。在 Wnt 基因检测功能报告中, 单独的 GPC3 过表达激活了 Wnt 信号, 并可通过 F41E 突变而减弱, 但不能通过消除 HS 链而减弱。有趣的是, GPC3 和 FZD 共转染诱导了 Wnt 活性的协同激活。当 GPC3 的 HS 链被移除后, 这种协同效应被终止, 而 F41E 突变则不再有协同效应。该动态模型可以将 GPC3 表达与 HCC 疾病进展联系起来, 低 FZD 和无 GPC3 代表正常肝脏, 高 GPC3 和低 FZD 代表早期 HCC, 高 FZD 和高 GPC3 代表晚期 HCC<sup>[24]</sup>。正常肝细胞中不存在 GPC3, Wnt 可在无 GPC3 协同的情况下独立激活 FZD, 保持 Wnt/ $\beta$ -catenin 的普通激活水平。在 HCC 中 GPC3 上调, GPC3 作为 Wnt 共受体, 通过位于 GPC3 N 端包含 F41 的富含半胱氨酸疏水槽吸引 Wnt 至细胞表面<sup>[25]</sup>。HCC 细胞中 GPC3 含量进一步升高时, FZD 富集形成 Wnt/GPC3/FZD 复合物, 此时 HS 发挥稳定 Wnt 和 FZD 的桥梁作用, Wnt 信号通路扩大激活。

2.2 GPC3 和 Wnt 参与 YAP 信号调控 早期在果蝇模型中的研究涉及 Hippo 信号通路, 其在调节器官大小和发育中起着重要作用。在哺乳动物中, Hippo 信号通路涉及两个主要激酶, 正蛋白激酶 1/2 (mammalian sterile 20-like kinase 1/2, Mst1/2) 和大肿瘤抑制基因 (large tumor suppressor 1/2, Lats1/2) 激酶, Lats1/2 使转录共激活因子 YAP 发生磷酸化而失活, 失活的 YAP 下调其下游靶基因如 Cyclin E, diap1 和 bantam 等的表达。YAP 已被证明是 Hippo 信号通路中起关键作用的核效应因子, 而 Hippo 信号通路在哺乳动物中导致 YAP 失活的确切机制尚不清楚<sup>[26]</sup>。此外, 在信号通路方面的最新进展表明, Hippo 通路能够抑制肝脏过度生长和 HCC 的发展。YAP 在调节细胞增殖、组织再生和肿瘤形成中起着至关重要的作用。研究表明 GPC3 和 Wnt 通过 YAP 建立了联系, 但  $\beta$ -catenin 和 YAP 的调节机制尚未明确。此外, 在细胞质中, 有证据表明 YAP 可以调节 DVL<sup>[27]</sup>。在 HCC 组织中, YAP 的表达较高, 提示 HCC 进展与 YAP 表达呈正相关<sup>[28]</sup>。

Miao 等<sup>[29]</sup>利用靶向 GPC3 的抗体发现 HN3 能有效抑制 HCC 细胞生长。在进一步探索 HN3 具体作用机制时, 发现在经 HN3 处理的 HCC 细胞中磷酸化的 YAP (p-YAP), 即失活的 YAP 表达明显升高。此外, 在接受

HN3 处理的 HCC 细胞中, YAP 总水平是降低的。GPC3 沉默导致肿瘤细胞增殖速度下降, 重组 YAP 的重新导入能够阻止由于 GPC3 沉默引起的细胞凋亡。该结果与早期发现的 GPC3 在 HCC 细胞中调控 YAP 信号通路一致<sup>[23]</sup>。在 HCC 细胞中敲低 YAP, 肿瘤细胞增殖速度显著减慢。在随后的实验中, 通过 HN3-GPC3 的结合阻断 Wnt 信号通路的同时也抑制了 YAP 的表达, 提示 Wnt 可能参与了 YAP 信号的上游调控<sup>[12]</sup>。以上结果表明 YAP 参与调节 HCC 细胞的增殖, 且 GPC3 可能是 YAP 的上游调控因子, 这些工作将 YAP 与 GPC3 和 Wnt 合理地联系起来。

**2.3 GPC3 调节 Hh 信号** Hh 信号通路在胚胎发育中起着决定性作用, 参与细胞生长、分化和血管形成等。当 Hh 通路过度激活时, 可导致肿瘤发生或转移, 与多种肿瘤密切相关<sup>[30-31]</sup>。在探讨 GPC3 在 HCC 细胞中的生物学作用时, Wang 等<sup>[32]</sup>发现 GPC3 通过 Hh 信号通路促进 HepG2 细胞增殖。在哺乳动物中有 3 种 Hh 配体, 包括 desert (Dhh), indian (Ihh) 和 sonic (Shh)。Hh 信号传递受靶细胞膜上两种受体的控制, 分别为 12 次跨膜蛋白 patched (Ptc) 和 7 次跨膜蛋白 smoothed (Smo)。在正常情况下, Ptc 抑制 Smo 蛋白活性, 从而抑制下游通路, 这时下游的胶质瘤相关癌基因同源蛋白 (Gli) 在蛋白酶体内被截断, 并以羧基端被截断的形式进入细胞核内, 抑制下游靶基因的转录。当 Ptc 和 Hh 结合以后, 解除对 Smo 的抑制作用, 促使 Gli 蛋白与蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 及一些未知因子与微管形成大分子复合物, 使得全长 Gli 蛋白进入核内激活下游靶基因转录。GPC3 在细胞膜上能与 Ptc 竞争性结合 Hh, 当 GPC3 与 Hh 结合后能促发胞吞作用及复合物的降解。此外, GPC3 与 Hh 结合后导致未结合的 Ptc 受体数目增加, 从而加强了对 Smo 的抑制作用。因此, GPC3 在 Hh 通路是起着负性调节作用的<sup>[14, 33]</sup>。

总而言之, 上述信号通路之间的确切联系尚不清楚, Wnt、YAP 和 Hh 通路的关键步骤可能通过 GPC3 进行连接, 未来对 GPC3 的进一步研究将有助于加深对 HCC 发病机制的理解及推动新型抗肿瘤药物的研发。

### 3 参考文献

- [1] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. The Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314. DOI:10.1016/s0140-6736(18)30010-2.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [3] Baumhoer D, Tornillo L, Stadlmann S, et al. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples[J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(6): 899-906. DOI:10.1309/HQWPD50XHD2DW6.
- [4] Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Sci, 2009, 100(8): 1403-1407. DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01206.x.
- [5] Madan B, Virshup DM. Targeting Wnts at the source--new mechanisms, new biomarkers, new drugs[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(5): 1087-1094. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-14-1038.
- [6] Gao W, Kim H, Feng M, et al. Inactivation of Wnt signaling by a human antibody that recognizes the heparan sulfate chains of glypican-3 for liver cancer therapy[J]. Hepatology, 2014, 60(2): 576-587. DOI:10.1002/hep.26996.
- [7] Li N, Gao W, Zhang YF, et al. Glypicans as Cancer Therapeutic Targets[J]. Trends Cancer, 2018, 4(11): 741-754. DOI:10.1016/j.trecan.2018.09.004.
- [8] Ortiz MV, Roberts SS, Bender JG, et al. Immunotherapeutic Targeting of GPC3 in Pediatric Solid Embryonal Tumors[J]. Front Oncol, 2019, 9: 108. DOI:10.3389/fonc.2019.00108.
- [9] Ho M, Kim H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(3): 333-338. DOI:10.1016/j.ejca.2010.10.024.
- [10] Gao W, Kim H, Ho M. Human Monoclonal Antibody Targeting the Heparan Sulfate Chains of Glypican-3 Inhibits HGF-Mediated Migration and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137664. DOI:10.1371/journal.pone.0137664.
- [11] Gao W, Xu Y, Liu J, et al. Epitope mapping by a Wnt-blocking antibody: evidence of the Wnt binding domain in heparan sulfate[J]. Sci Rep, 2016, 6: 26245. DOI:10.1038/srep26245.
- [12] Gao W, Tang Z, Zhang YF, et al. Immunotoxin targeting glypican-3 regresses liver cancer via dual inhibition of Wnt signalling and protein synthesis[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6536. DOI:10.1038/ncomms7536.
- [13] Li N, Wei L, Liu X, et al. A Frizzled-Like Cysteine-Rich Domain in Glypican-3 Mediates Wnt Binding and Regulates Hepatocellular Carcinoma Tumor Growth in Mice[J]. Hepatology, 2019, 70(4): 1231-1245. DOI:10.1002/hep.30646.
- [14] Kolluri A, Ho M. The Role of Glypican-3 in Regulating Wnt, YAP, and Hedgehog in Liver Cancer[J]. Front Oncol, 2019, 9: 708. DOI:10.3389/fonc.2019.00708.
- [15] Cong F. Wnt signals across the plasma membrane to activate the  $\beta$ -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP[J]. Development, 2004, 131(20): 5103-5115. DOI:10.1242/dev.01318.
- [16] Zeng X, Tamai K, Doble B, et al. A dual-kinase mechanism for

- Wnt co-receptor phosphorylation and activation[J]. Nature, 2005, 438(7069): 873–877.DOI:10.1038/nature04185.
- [17] Davidson G, Wu W, Shen J, et al. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction[J]. Nature, 2005, 438(7069): 867–872.DOI:10.1038/nature04170.
- [18] Gao C, Chen YG. Dishevelled: The hub of Wnt signaling [J]. Cell Signal, 2010, 22(5): 717–727.DOI:10.1016/j.cellsig.2009.11.021.
- [19] Schaefer KN, Peifer M. Wnt/Beta-Catenin Signaling Regulation and a Role for Biomolecular Condensates[J]. Dev Cell, 2019, 48(4): 429–444.DOI:10.1016/j.devcel.2019.01.025.
- [20] Bengochea A, Souza MMD, Lefrancois L, et al. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2008, 99(1): 143–150.DOI:10.1038/sj.bjc.6604422.
- [21] Capurro M, Martin T, Shi W, et al. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 7): 1565–1575.DOI:10.1242/jcs.140871.
- [22] Lai JP, Oseini AM, Moser CD, et al. The oncogenic effect of sulfatase 2 in human hepatocellular carcinoma is mediated in part by glypican 3-dependent Wnt activation[J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1680–1689.DOI:10.1002/hep.23848.
- [23] Feng M, Gao W, Wang R, et al. Therapeutically targeting glypican-3 via a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(12): E1083–1091.DOI:10.1073/pnas.1217868110.
- [24] Liu H, Yang C, Lu W, et al. Prognostic significance of glypican-3 expression in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(4): e9702.DOI:10.1097/MD.00000000000009702.
- [25] Xia Y, Cheng X, Li Y, et al. Hepatitis B Virus Deregulates the Cell Cycle To Promote Viral Replication and a Premalignant Phenotype[J]. J Virol, 2018, 92(19): e00722–18.DOI: 10.1128/JVI.00722–18.
- [26] Zheng Y, Pan D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease[J]. Dev Cell, 2019, 50(3): 264–282.DOI:10.1016/j.devcel.2019.06.003.
- [27] Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP and TAZ: a signalling hub of the tumour microenvironment[J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(8): 454–464.DOI:10.1038/s41568-019-0168-y.
- [28] Li H, Wolfe A, Septer S, et al. Deregulation of Hippo kinase signalling in human hepatic malignancies[J]. Liver Int, 2012, 32(1): 38–47.DOI:10.1111/j.1478-3231.2011.02646.x.
- [29] Miao HL, Pan ZJ, Lei CJ, et al. Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(3): 625–631.DOI:10.1002/jcb.24404.
- [30] Chatterjee S, Sil PC. Targeting the crosstalks of Wnt pathway with Hedgehog and Notch for cancer therapy[J]. Pharmacol Res, 2019, 142: 251–261.DOI:10.1016/j.phrs.2019.02.027.
- [31] Matsui WH. Cancer stem cell signaling pathways[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(1 Suppl 1): S8–S19.DOI:10.1097/MD.00000000000004765.
- [32] Wang S, Chen N, Chen Y, et al. Elevated GPC3 level promotes cell proliferation in liver cancer[J]. Oncol Lett, 2018, 16(1): 970–976.DOI:10.3892/ol.2018.8754.
- [33] Ding M, Wang X. Antagonism between Hedgehog and Wnt signaling pathways regulates tumorigenicity[J]. Oncol Lett, 2017, 14(6): 6327–6333.DOI:10.3892/ol.2017.7030.

(收稿日期:2020-08-05)

(本文编辑:沈昱平)

## 本刊投稿方式

鉴于目前不断出现冒充本刊名义进行征稿的情况,为维护广大作者的权益和本刊声誉,特郑重声明:

浙江医学官网([www.zjyxzss.com](http://www.zjyxzss.com))是《浙江医学》杂志的唯一投稿平台,或从浙江省医学会([www.zjma.org](http://www.zjma.org))或浙江卫生健康科技研发与转化平台([www.msttp.com](http://www.msttp.com))登录,注册后即可投稿。

要求通过其他平台或 E-mail 邮箱、QQ、微信投稿的征稿均非本刊行为,请谨慎投稿。若有疑问可来电询问:0571-87567843。

本刊编辑部