

·综述·

# BCL9 与肿瘤及肿瘤靶点治疗研究

吴帅, 简斌\*

(重庆医科大学 附属永川医院, 胃肠外科, 中国重庆 永川 402160)

**摘要:** Wnt 信号传导通路与肿瘤的关系是近年来肿瘤研究的热点, 该通路包含许多信号成员, 其中 BCL9 是近年来该通路上发现的新的癌基因, 其在多种 Wnt 信号通路失调肿瘤中的异常表达表明其与肿瘤的发生、发展有密切关系. 而针对 Wnt 信号通路不同基因靶点的高特异性基因药物开发以及肿瘤的分诊断也相继出现, 尤其是针对 BCL9 与  $\beta$ -catenin 作用界面的小分子抑制剂基因药物的开发更是引起广泛的注意. 现就 BCL9 及其与肿瘤的关系和 BCL9 基因为靶点的肿瘤基因治疗等三方面做一综述.

**关键词:** B 细胞淋巴瘤因子-9(BCL9); 肿瘤; 靶点治疗

**中图分类号:** R730.54

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1007-7847(2013)01-0086-04

## Research on BCL9 with Tumor and Tumor Target Treatment

WU Shuai, JIAN Bin\*

(Department of Gastrointestinal Surgery, the Yongchuan Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Yongchuan 402160, Chongqing, China)

**Abstract:** The relationship between Wnt signal transduction pathway and tumor has become a hot spot in cancer research. Wnt signaling pathway contains many members, BCL9 is a novel oncogene in this pathway in recent years, its abnormal expression in a variety of tumors of the Wnt signaling pathway disorders show that BCL9 is closely related to oncogenesis. The development of high-specific genes drug for different gene targets in Wnt signaling pathway and the molecular diagnostics of tumors have appeared. The extensive attention is caused by gene drug development of small molecule inhibitors to specifically disrupt the  $\beta$ -catenin/BCL9 interface. Therefore, BCL9 and its relationship with tumor, and BCL9 gene as a target for cancer gene therapy are reviewed.

**Key words:** B-cell/Lymphoma-9(BCL9); tumor; target treatment

(Life Science Research, 2013, 17(1): 086~089)

经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路控制不同环境下的转录程序, 对多细胞动物发育和组织内稳态维持至关重要. 这条通路异常激活可导致癌症发生, 尤其是大肠癌. 这条通路的中心效应器是  $\beta$ -catenin<sup>[1-3]</sup>. Wnt 信号出现, 使  $\beta$ -catenin 在胞质中稳定并向核内集聚, 与细胞核内 TCF/LEF、BCL9/BCL9L 和 Pygopus 结合, 形成 TCF/LEF- $\beta$ -catenin-BCL9-PYGO 核复合物, 是激活 Wnt 信号通路靶基因转录的关键, 这些靶基因包括: CD44、VEGF、c-Myc、cyclinD1、

FGF20、DKK1、WISP1、MYC、CCND1、GCG 等<sup>[4-6]</sup>. 这里涉及的两个基因 BCL9 和 Pygopus (Pygo) 对这条通路激活转录必不可少. 而 BCL9 是 Wnt 通路失调相关肿瘤治疗的新靶点<sup>[7]</sup>.

### 1 BCL9 基因家族结构及功能

#### 1.1 BCL9 基因家族的结构

BCL9 基因家族成员包括 BCL9、BCL9-2、Legless(Lgs)及 XBcl9. BCL9 主要指人类而 BCL9-2 主

收稿日期: 2012-09-06; 修回日期: 2012-11-09

作者简介: 吴帅(1981-), 男, 四川巴中人, 硕士研究生, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究; \*通讯作者: 简斌(1968-), 男, 重庆永川人, 重庆医科大学附属永川医院胃肠外科主治医师, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究, E-mail: jianbin20121111@163.com.

要指鼠类, 它们的同源产物在果蝇中为 *Legless* (*Lgs*), 在两栖动物中为 *XBcl9*. *Lgs* 与 *BCL9* 序列相同性不到 10%, 但它们在结构和功能上同源. *Lgs*/*BCL9* 和 *BCL9-2* 在细胞中的分布不同, 前者是条件核蛋白, 可穿梭于细胞核内外, 在与核内的另一个辅因子 *Pygo* 结合后则分布于核内, 因 *Pygo* 有核定位序列 (NLS), 而后者由于具有核定位序列 (NLS) 完全表达于细胞核内<sup>[8-11]</sup>.

在果蝇中, *Lgs* 是一个含有 1 464 个氨基酸的蛋白质, 不具有常见的保守结构基序. 然而, 在 N-末端有 3 个延伸结构, 大约含 30 个氨基酸, 这些延伸结构称为同源结构域 (HD)<sup>[11]</sup>.

*BCL9* 首先在一位身患前 B 细胞急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者身上被描述, 它定位于染色体 1q21, 发生 (1; 14)(q21; q23) 染色体转位<sup>[8]</sup>. 全长 *BCL9* *cDNA* 克隆的获得, 来自于一个正常人胎脑 *cDNA* 文库 5'-和 3'-末端快速扩增而成. 序列分析预测其为具有 1 394 个氨基酸的蛋白质, 包含 18% 的脯氨酸, 11% 的甘氨酸, 11% 的丝氨酸和 6% 的甲硫氨酸, 还有其他蛋白基序, 但不可识别或与已知蛋白没有明显同源性<sup>[12, 13]</sup>.

*BCL9-2* 是在一次酵母双杂交筛选试验中, 作为酪氨酸磷酸化的  $\beta$ -catenin 的配偶体首次被证实, 它定位于染色体 11q22-24. *BCL9-2* 蛋白为 200 000 kD 的蛋白质, 其氨基酸序列, 与 *BCL9* 有 35% 相同, 有 46% 相似<sup>[5, 8, 14]</sup>.

*BCL9*、*BCL9-2*、*Lgs* 和 *XBcl9* 蛋白均含有 3 个保守区, 称为同源结构域 (HD)1~3. 它们分别为  $\beta$ -catenin 结合域 ( $\beta$ -catenin BD)HD1, *Pygopus* 结合域 (PYBD)HD2 和一个典型的核定位信号肽 (NLS 结构域)HD3. 其次, *BCL9* 与 *BCL9-2* 还含有同源结构域 HD4 到 HD6, 而 *Lgs* 不含有相应结构域. 另外 *BCL9-2* 蛋白含有一个 N-末端结构域 (NHD). NHD 包含两个调节基序, 即可能有 SUMO 化 (sumoylation) 作用的 KXE/D 和有核定位信号作用的 KRRC. KRRC 在人类和小鼠 *BCL9* 蛋白和果蝇 *Legless* 蛋白中均不表达<sup>[8, 11, 14, 15]</sup>.

## 1.2 *BCL9* 基因家族的功能

在经典 Wnt 信号通路中, *BCL9*/*Lgs* 蛋白的主要功能是作为衔接蛋白, 在细胞核内起连接 Aramidillo/ $\beta$ -catenin 和 *Pygo* 蛋白的作用, *BCL9*HD1 与 *Pygo*PHD 指状结构结合, 而 *BCL9*HD2 形成一个螺旋与  $\beta$ -catenin 前 4 个狄徐重复片段 (armdillo repeat) 形成超螺旋的 N-末端对接, 形成 TCF/

LEF- $\beta$ -catenin-*BCL9*-*PYGO* 四聚体核复合物; 其次 *BCL9*/*Lgs* 有招募与  $\beta$ -catenin 结合的辅因子 *Pygo* 的作用和诱使  $\beta$ -catenin 向核内移动并与其结合的作用, 从而促进四聚体核复合物的形成, 激活经典 Wnt 信号通路靶基因的转录, 这在胚胎发育、干细胞生长、肿瘤形成过程中至关重要<sup>[2, 15-19]</sup>.

*BCL9* 同系物 *BCL9-2* 除了作为核内  $\beta$ -catenin 转录的辅因子外, 另一个作用是影响  $\beta$ -catenin 的细胞粘附和转录功能的发挥, 这两种功能的正确选择将有助于机体正常发育, 而错误选择则导致肿瘤生长、浸润、转移<sup>[8, 20]</sup>. Brembeck 等发现: *BCL9-2* 在犬肾上皮细胞 (Madin-Darby canine kidney cells, MDCK cells) 中过表达可诱导上皮细胞-间充质转化 (EMT), 这种细胞形态变化可影响  $\beta$ -catenin 的粘附功能, 促进  $\beta$ -catenin 向核内集聚, 形成转录复合物, 增强靶基因转录, 这是上皮细胞来源恶性肿瘤获得转移和侵袭能力的重要生物过程<sup>[5, 6, 14, 20]</sup>.

最近, Andrew 等<sup>[21]</sup>利用 Cre-Lox 定位技术研究发现: *BCL9*、*BCL9-2* 在 Wnt 介导调节成体 (而非胚胎) 肌祖细胞分化和诱导肌肉再生过程中有重要作用. 而 Mark 等<sup>[11]</sup>对 *XBcl9* 在两栖动物爪蟾中作用的研究指出: 在脊椎动物中, *BCL9*-*Pygo* 两者的相互作用对体轴的发育有重要影响.

因此, 在体内, *BCL9* 和 *BCL9-2* 可能发挥不同的作用, 在动物发育的特定阶段对 Wnt 信号通路可能发挥特定调节效应. 但两者在结构和功能上的同源性决定了它们在许多方面的作用可能相似或相同.

## 2 *BCL9* 与肿瘤的关系

大量研究显示: Wnt 信号通路的异常活化参与了人类多种恶性肿瘤的发病, 此通路的不正常激活是因 *Wnt* 基因本身或通路其他任一成员发生变化引起. 而 *BCL9* 是该通路新发现的一个癌基因, 其异常表达是 Wnt 信号通路激活导致肿瘤的新机制. *BCL9* 在人类多种肿瘤组织中异常表达, 如急性淋巴细胞白血病、多发骨髓瘤、结直肠癌、肝癌、胃癌、乳腺癌及非吸烟患者肺腺癌组织等<sup>[5, 8, 14]</sup>. 不论 Wnt 通路上其他基因有无突变, *BCL9* 都能增强  $\beta$ -catenin 介导的转录活性, 从而促进肿瘤的增殖、迁移和浸润<sup>[5]</sup>.

首先, *BCL9* 家族蛋白属于 B 细胞白血病 (*BCL*) 基因超家族成员, 其频繁地参与启动淋巴

瘤、白血病和其他恶性肿瘤形成<sup>[8]</sup>. Mala Mali 等<sup>[5]</sup>研究发现: *BCL9 mRNA* 高表达于 60% 的多发骨髓瘤原发肿瘤中, 而在结直肠癌原发肿瘤中表达率更高, 约 68%. 这和 Shungo A 等<sup>[14]</sup>研究结果基本一致: *BCL9* 蛋白异常高表达于约 43% 的结直肠癌, 也表达于乳腺癌和多发骨髓瘤细胞系中. 同时, Deka 等<sup>[22]</sup>研究发现: 在小鼠结肠上皮和腺癌中, Wnt 信号介导的干细胞特性的调节, *BCL9*、*BCL9-2* 是关键因素. 这一作用是 *BCL9*、*BCL9-2* 通过对一组 Wnt 靶基因调节实现的, 这些靶基因控制上皮细胞间质转化和干细胞相关特性. 而 Marc R 等<sup>[10]</sup>研究指出: *BCL9-2* 在 Sw480 结肠癌细胞和 Wnt3A 活化的 HEK293 细胞中, 对  $\beta$ -catenin 激活至关重要, 从而促进肿瘤发生.

其次, Ichiro 等<sup>[23]</sup>发现: 相对于正常结直肠粘膜细胞, *BCL9-2* 在低分化和浸润结直肠癌细胞核中表达为 50%, 在早期腺瘤中约 27%. *BCL9-2* 可能在 Wnt 信号异常活化肿瘤形成过程中起重要作用, 在异型增生腺瘤癌变过程中作为关键蛋白. 而 Felix H 等<sup>[15]</sup>用 siRNA 使 *BCL9-2* 转录基因沉默的方法证实: *BCL9-2* 转录基因沉默能减弱细胞迁移, 诱导上皮样表型的出现, 抑制结肠癌细胞系集落的形成而起抑制肿瘤进展的作用. 这也证实了 *BCL9-2* 有诱导上皮细胞间质转化的作用.

综上所述, *BCL9*、*BCL9-2* 在肿瘤发生发展中的作用机制可能包括: 一是能激活或增加  $\beta$ -catenin 转录活性, 并诱使其向细胞核内转移, 进而与之结合形成核内转录复合物, 促进经典 Wnt 信号通路靶基因转录, 促进肿瘤发生、发展; 二是可以减少 *VEGF* 介导的肿瘤血管生成和 *CD44* 介导的肿瘤细胞转移而起抑制肿瘤发生发展的作用; 三是可以诱导和控制上皮细胞间质转化, 从而促进肿瘤的浸润和转移; 四是通过调节 Wnt 靶基因而控制干细胞相关特性<sup>[5, 8, 14]</sup>.

总之, 对 *BCL9* 在肿瘤中的作用机制的研究尚处于起步阶段, 目前报道相对较多的主要是它在结、直肠癌中有重要作用, 且与该类肿瘤患者对化疗药物反应差导致预后不良有密切关系. 在其他肿瘤中的作用研究较少, 且其具体作用机制尚不够明确, 有待进一步研究.

### 3 *BCL9* 基因为靶点的肿瘤基因治疗

由于 *BCL9* 主要作为衔接蛋白, 还起招募其他辅因子与 Wnt 通路  $\beta$ -catenin/Tcf 复合物结合的

作用, 故任何能破坏  $\beta$ -catenin-BCL9-Tcf 作用的化合物, 都可能抑制肿瘤细胞 Wnt 信号通路, 防止肿瘤的发生发展. 其中一个药物设计靶点是 Wnt 转录复合体  $\beta$ -catenin/Tcf 作用面. 然而, 研究作用于这个界面的基因药物似乎非常有挑战性. 首先, 其作用界面大(约 4 800 Å<sup>2</sup>)而坚固(低纳摩尔级的 kD 值); 其次, 这个界面是动态的, 不稳定性不利于小分子药物的作用; 最重要的一点是, Tcf 与  $\beta$ -catenin 犹徐重复片段结构槽结合部位也是钙粘蛋白(Cadherins)、APC 和轴蛋白(Axin)的衔接部位, 破坏它们间的结合可能也会破坏  $\beta$ -catenin 与上述其他蛋白结合而导致新的肿瘤的发生<sup>[15, 24]</sup>.

而相对于  $\beta$ -catenin/Tcf 的作用界面来说,  $\beta$ -catenin/BCL9 作用面可能是更好的药物设计靶点, 因为: 1) *BCL9* 为这个复合物的必要成分且与  $\beta$ -catenin 作用呈中等强度 (kD 值约 0.5  $\mu$ m); 2) 这个作用面小, 且含有凹槽适合小分子化合物停留而起作用; 3) 更重要的是,  $\beta$ -catenin 疏水面为 *BCL9* 结合所必需的, 但不是钙粘蛋白和  $\alpha$ -catenin 结合的关键部位, 且到目前为止, *BCL9* 是与  $\beta$ -catenin 这个区域作用蛋白当中唯一已知蛋白. 另外, James Sampietro 等<sup>[15]</sup>对  $\beta$ -catenin/BCL9/Tcf4 复合物晶体结构分析也显示: *BCL9HD2* 的  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -catenin 的第一个犹徐重复片段上一个界限清楚的槽结合, 而与 TCF 在  $\beta$ -catenin 结合点并没有重叠, 因此, 研发小分子抑制剂基因药物作用于这个界面可能对其他配体与  $\beta$ -catenin 的结合影响轻微或没有影响.

最近, Steven A 等<sup>[24]</sup>已成功合成了以 *BCL9* 为基础的合成肽段, 它能完全抑制  $\beta$ -catenin 与野生型 *BCL9* 蛋白的结合, 说明作用于  $\beta$ -catenin/BCL9 作用面小分子抑制剂基因药物的开发是可行的. 同时, Steven A 等<sup>[25]</sup>使用 Huisgen 1, 3-偶极环加成反应生成三唑订书针样 *BCL9*  $\alpha$ -螺旋肽, 能抑制  $\beta$ -catenin 转录活性, 为研发抑制 *BCL9* 与  $\beta$ -catenin 结合的小分子物质奠定了基础. 另外 Marc R 等<sup>[26]</sup>从植物迷迭香中分选出鼠尾草酸, 是一种能抑制  $\beta$ -catenin 与 *BCL9* 作用的小分子物质, 它含有一个内在的、不稳定的  $\alpha$ -螺旋(H1)氨基末端结构, 这个结构位于  $\beta$ -catenin 与 *BCL9* 的结合部位附近. H1 能减少结直肠癌细胞中  $\beta$ -catenin 基因转录及蛋白表达水平, 这为开发小分子抑制剂提供了新的策略.

上述这些研究结果显示: 作用于  $\beta$ -catenin-

*BCL9* 界面小分子抑制剂的研究将是抗癌治疗中一个非常有吸引力的靶点。

#### 4 结语

综上所述, *BCL9* 在 Wnt 信号异常肿瘤发生发展中具有重要作用, 尤其是在结、直肠癌中的作用表明, *BCL9* 可以作为临床肿瘤分子诊断的新指标。但其在肿瘤发生发展中的具体作用机制有待进一步阐明, 尽管如此, 研发作用于  $\beta$ -catenin-*BCL9* 界面小分子抑制剂基因药物将是抗癌治疗的新靶点。

#### 参考文献 (References):

- [1] THOMAS C R, TREVOR J R, CHRISTOPHER M J, *et al.* Allosteric remodelling of the histone H3 binding pocket in the Pygo2 PHD finger triggered by its binding to the B9L/BCL9 co-factor[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 401(5): 969-984.
- [2] JULIUSZ M, MARC R, MARIANN B. A role of Pygopus as an anti-repressor in facilitating Wnt-dependent transcription[J]. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2008, 105(49): 19324-19329.
- [3] EVA K, JURGEN B, BERNHARD M. Nucleo-cytoplasmic distribution of  $\beta$ -catenin is regulated by retention[J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(7): 1453-1463.
- [4] MASUKO K, MASARU K. WNT signaling pathway and stem cell signaling network[J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(14): 4042-4044.
- [5] MALA M, DANIEL E C, YUNYN Z, *et al.* BCL9 promotes tumor progression by conferring enhanced proliferative, metastatic, and angiogenic properties to cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(19): 1-10.
- [6] 刘向东, 万莹锋. Wnt 信号传导与肿瘤[J]. *癌症进展杂志* (LIU Xiang-dong, WAN Ying-hua. Wnt signal transduction and tumor[J]. *Journal of Cancer Progression*), 2009, 7(3): 296-300.
- [7] 吴帅, 张才全, 赵林, 等. 结直肠癌组织 BCL9 和 VEGF 的表达与临床意义[J]. *生命科学研究* (WU Shuai, ZHANG Cai-quan, ZHAO Lin, *et al.* The expression of BCL9 and VEGF in colorectal cancer and their clinical significance[J]. *Life Science Research*), 2010, 14(3): 246-249.
- [8] FELIX H B, MARTA R, WALTER B. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of  $\beta$ -catenin[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2006, 16(1): 51-59.
- [9] RRYMOND H, KONRAD B. BCL9-2 binds Arm/ $\beta$ -catenin in a Tyr142-independent manner and requires Pygopus for its function in Wg/Wnt signaling[J]. *Mechanisms of Development*, 2007, 124(1): 59-67.
- [10] MARC R, JESPER W, MARIANN B. The function of BCL9 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and colorectal cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8(199): 1-13.
- [11] MARK W K, SANG W C, EMMANUEL T, *et al.* A co-dependent requirement of xBcl9 and Pygopus for embryonic body axis development in xenopus[J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(1): 271-283.
- [12] WILLIS T G, ZALCBERG I R, COIGNET L J, *et al.* Molecular cloning of translocation t (1; 14)(q21; q32) defines a novel gene(BCL9)at chromosome 1q21[J]. *Blood*, 1998, 91(6): 1873-1881.
- [13] CLAUDIO S, HENRIK F, HANNA E, *et al.* Cell-type-specific function of BCL9 involves a transcriptional activation domain that synergizes with  $\beta$ -catenin[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(10): 3526-3537.
- [14] SHUNGO A, TAKAFUMI J, TOSHIO Y, *et al.* Role of a BCL9-related  $\beta$ -catenin-binding protein, B9L, in tumorigenesis induced by aberrant activation of Wnt signaling[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(23): 8496-8501.
- [15] JAMES S, CAROLINE L D, UHN S C, *et al.* Crystal structure of a  $\beta$ -catenin/BCL9/Tcf4 complex[J]. *Molecular Cell*, 2006, 24(2): 293-300.
- [16] FELIX H B, THOMAS S R, JEROEN B, *et al.* Essential role of BCL9-2 in the switch between  $\beta$ -catenin's adhesive and transcriptional functions[J]. *Genes & Development*, 2004, 18(18): 2225-2230.
- [17] THOMAS K, OLIVER P, ERICH B, *et al.* Wnt/wingless signaling requires BCL9/ legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear  $\beta$ -Catenin-TCF complex[J]. *Cell*, 2002, 109(1): 47-60.
- [18] ROMAN K, GEORGE H, KONRAD B. The PHD domain is required to link *Drosophila* Pygopusto Legless/ $\beta$ -catenin and not to histone H3[J]. *Mechanisms of Development*, 2009, 126(8-9): 752-759.
- [19] YOSGIHIRO N, TAKASHI U, HIROAKI H, *et al.* Crystal structure analysis of the PHD domain of the transcription co-activator Pygopus[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 370(1): 80-92.
- [20] TONY J C H, MARK P. Decisions:  $\beta$ -catenin chooses between adhesion and transcription [J]. *Trends in Cell Biology*, 2005, 15(5): 234-237.
- [21] ANDREW S B, FABIENNE M S, JASMINE H, *et al.* BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration[J]. *Developmental Biology*, 2009, 335(1): 93-105.
- [22] JURGEN D, NORBERT W, PASCALE A, *et al.* Bcl9/Bcl9l are critical for Wnt-mediated regulation of stem cell traits in colon epithelium and adenocarcinomas[J]. *Cancer Research*, 2010, 70(16): 6618-6628.
- [23] ICHIRO S, SUSUMU O, HIROYUKI T, *et al.* Up-regulation of a BCL9-related  $\beta$ -catenin-binding protein, B9L, in different stages of sporadic colorectal adenoma[J]. *Cancer Science*, 2007, 98(1): 83-87.
- [24] STEVEN A K, ANDREA D T, ADRIANA C, *et al.* Analysis of the interaction of BCL9 with  $\beta$ -catenin and development of fluorescence polarization and surface plasmon resonance binding assays for this interaction[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(40): 9534-9541.
- [25] STEVEN A K, ADRIANA C, XU R, *et al.* Design of triazole-stapled BCL9  $\alpha$ -helical peptides to target the  $\beta$ -catenin/B-cell CLL/lymphoma 9 (BCL9) protein protein interaction[J]. *Journal Medicinal Chemistry*, 2012, 55(3): 1137-1146.
- [26] MARC R, TREVOR Jr, DEEPTI G, *et al.* An intrinsically labile  $\alpha$ -helix abutting the BCL9-binding site of  $\beta$ -catenin is required for its inhibition by carnosic acid[J]. *Nature Communications*, 2012, 3(680): 1-10.